

УДК 541.143

**БАКТЕРИОРОДОПСИН КАК ВОЗМОЖНЫЙ ЭЛЕМЕНТ  
МЕМБРАННЫХ БИОРЕАКТОРОВ***Максимычев А. В., Чаморовский С. К.*

Рассмотрены некоторые подходы к созданию мембранных биореакторов, представляющих собой пример интегрированных мембранных систем. Обсуждаются особенности использования организованных молекулярных ансамблей в таких системах в качестве сенсорных и регуляторных элементов. Рассмотрены свойства ретиналь-белкового комплекса бактериородопсина как перспективного компонента интегрированных мембранных систем, способного осуществлять регуляторные функции.

Библиография — 139 ссылок.

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

I. Введение . . . . .	1042
II. Мембранные биореакторы . . . . .	1042
III. Функциональные свойства бактериородопсина в искусственных системах . . . . .	1052

**I. ВВЕДЕНИЕ**

Применение мембранной технологии в современной промышленности позволяет сберегать ресурсы, энергию и значительно уменьшать воздействие неблагоприятных факторов на окружающую среду. В последние годы в мембранных исследованиях наметилась тенденция к объединению различных процессов, поскольку «интегрирование» технологических стадий позволяет в наибольшей степени реализовать потенциальные преимущества мембранных систем. Этот путь представляет собой воплощение принципов, лежащих в основе функционирования биологических систем, которые отличают специфичность и взаимообусловленность процессов, объединение ряда функций в одном элементе, существование регуляторных механизмов на различных стадиях процесса [1]. Прекрасным примером интегрированных фотохимических процессов является природный фотосинтез. Он включает в себя соби́рание солнечной энергии хлорофиллом антенны и другими пигментами, перенос энергии возбуждения на реакционный центр, разделение зарядов в фотосистемах I и II, передачу электрона и другие процессы [2]. Понятие «интегрированные мембранные системы» предполагает не только применение различных мембран на последовательных этапах разделения, но также совмещение функций, например, сопряжение химических превращений с мембранным разделением, включение в системы мембранных сенсоров для контроля динамики и оптимизации процессов и т. д. [3]. Можно ожидать, что комплексное применение мембранных систем окажется наиболее эффективным в таких областях как агропромышленное производство, нефтехимия, биотехнология, переработка сточных вод.

**II. МЕМБРАННЫЕ БИОРЕАКТОРЫ****1. Мембраны в химических реакциях**

Одним из интенсивно развивающихся направлений мембранной технологии является создание мембранных реакторов (МР), в которых продукты реакции (или один из продуктов) отделяются от реакционной смеси. Преимущества МР особенно заметно проявляются при проведении обратимых реакций: непрерывное удаление продуктов смещает реакцию

в прямом направлении и позволяет достигать высокой конверсии исходных веществ. Одна из возможностей реализации такого процесса связана с использованием селективных газоразделительных мембран [4, 5]. Принципиальная схема МР такого типа приведена на рис. 1. (Подробно вопросы мембранного катализа рассмотрены в работе [1] настоящего сборника, поэтому ограничимся лишь некоторыми примерами.) Неравновесность процесса в подобном проточном МР с микропористой стеклянной мембраной позволила увеличить конверсию циклогексана в бензол примерно в 2,5 раза по сравнению с равновесной величиной. Особенно наглядно преимущества МР проявляются при использовании палладиевой мембраны, проницаемой исключительно для  $H_2$  [4]. В этом случае конверсия циклогексана достигает 99,5%, а при надлежащем подборе скоростей потоков исходного вещества и инертного газа-носителя может быть еще более увеличена. Таким образом, бензол становится практически единственным компонентом на выходе из МР, что исключает необходимость разделения бензола и циклогексана, значительно понижая тем самым стоимость производства.

Другим важнейшим направлением в разработке МР является изучение свойств катализаторов, стабилизированных на полимерных мембранах. В этом случае мембрана выполняет роль среды, в которой может создаваться высокая локальная концентрация реагирующих компонентов и необходимое окружение. Значительное число работ посвящено исследованию фотокаталитического разложения сероводорода в присутствии коллоида  $CdS$ , иммобилизованного на фторсодержащей катионообменной мембране типа Нафилон [6—8]. Внутренняя структура мембран этого типа имитирует строение обратных мицелл, поскольку она включает соединенные каналами ионные кластеры, внедренные в гидрофобную фторуглеродную фазу [9, 10]. Катионные субстраты, сорбированные в каналах мембраны из водной фазы, испытывают воздействие сильного электрического поля [11], что, по-видимому, следует учитывать при рассмотрении каталитических свойств комплексов. Высокая химическая стойкость перфторированных полимерных мембран позволяет использовать их в агрессивных средах в широком температурном интервале. Процесс фоторазложения  $H_2S$  вызывает интерес в связи с поисками нетрадиционных энергоносителей, к которым относится и получающийся в результате реакции молекулярный водород. Кроме того, таким путем можно уменьшить воздействие на окружающую среду токсичных соединений серы, многие тонны которых выделяются в качестве отходов в химических, металлургических и нефтехимических производствах [6]. Наконец, элементная сера — второй продукт реакции — является ценным сырьем и его источником могли бы стать газовые месторождения с высоким содержанием сероводорода.

Другая возможность применения мембранных фотокатализаторов для решения экологических проблем связана с очисткой сточных вод от загрязнений. В работе [12] исследована фотодеградация хлорфенолов в водных растворах, активируемая допированным полифенилацетиленом, иммобилизованным в мембране из поливинилхлорида. Иммобилизация полифенилацетилена позволяет стабилизировать его, в частности препятствует высвобождению допирующего агента. Скорость фоторазложения органических примесей существенно возрастает при увеличении электропроводности мембраны. Предполагают, что механизм фотодеградации включает образование промежуточных радикальных состояний, а присутствие в мембране органического проводника с электронной проводимостью делает возможным фотоиницирование и ускоряет окислительно-восстановительные процессы.

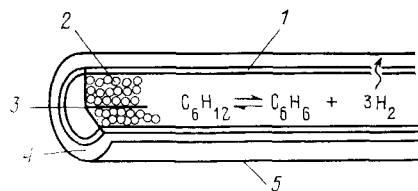


Рис. 1. Схема мембранного реактора с палладиевой мембраной для дегидрирования циклогексана [4]: 1 — палладиевая мембрана, 2 — катализатор, 3 — циклогексан, 4 — инертный газ-носитель, 5 — оболочка

## 2. Мембранные биореакторы

В последние годы широкое распространение получили разработки МР, в которых химические превращения осуществляются под действием катализаторов биологического происхождения. Такого рода аппараты называют мембранными биореакторами (МБР). Решение комплекса проблем, связанных с применением МБР, включая производство, выделение, очистку ферментов и их использование в качестве иммобилизованных биокатализаторов, является сегодня ведущим направлением биотехнологии. Мембраны служат дешевой и надежной основой для иммобилизации ферментов и для создания компактных и гибких устройств, сопрягающих процесс разделения с химической реакцией. Биокатализатор располагается с одной стороны подходящей мембраны, субстрат приводится в контакт с биокатализатором, а получающийся продукт, молекулы которого должны быть достаточно малы, проникает через мембрану. Этот общий принцип устройства МБР реализован в следующих основных типах применяемых МБР, различающихся по конфигурации и режиму проведения реакции [13]: 1) мембранные модули, сопряженные с реакционным объемом, который содержит биокатализатор в растворимой форме; 2) реакторы с мембранами в виде полых волокон, в которых фермент расположен обычно на внешней стороне мембраны, тогда как субстрат циркулирует через внутренний объем волокон; 3) реакторы с мембраной, приготовленной из формовочного раствора, содержащего биокатализатор; 4) реакторы с ферментом, фиксированным поперечными связями на микропористой пленке или ковалентно пришитым к ней.

Появление МБР первого типа стало возможным после создания в 1965 г. ультрафильтрационной мембраны [14], которую использовали для концентрирования ферментов [15, 16]. В 1970 г. был создан первый мембранный биореактор, в котором применялся раствор  $\alpha$ -амилазы из *B. subtilis* для гидролиза крахмала [17]. Значительная часть ферментов, используемых в качестве биокатализаторов, имеет молекулярную массу от 10 до 100 кДа и задерживается мембранами, предназначенными для ультрафильтрации. Реакторы первого типа работают в режиме идеального смешения и в наибольшей степени пригодны для проведения реакций, ингибируемых продуктом, так как последний непрерывно удаляется по мере его образования, что повышает выход. Известны две разновидности МБР идеального смешения, различающиеся организацией потоков субстрата и продукта (рис. 2) [18]. На рис. 2, а приведена схема МБР, работающего в режиме прямой фильтрации. Существенным недостатком таких МБР является засорение мембраны, а также концентрационная поляризация, для устранения которой необходимо интенсивное перемешивание содержимого реакционной емкости. Реакторы, выполненные по указанной схеме используют, в основном, для лабораторных исследований. Проточный МБР, свободный от указанных недостатков, был впер-

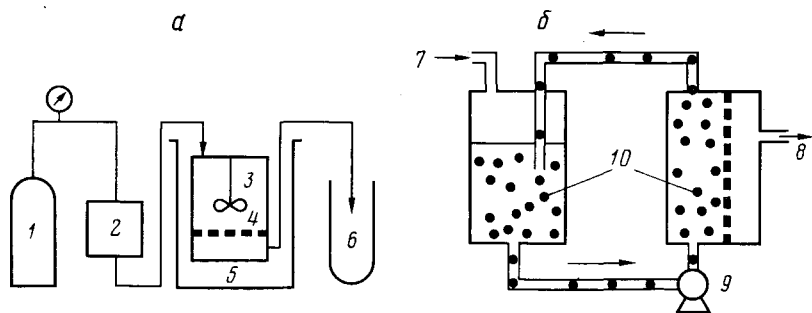


Рис. 2. Мембранные биореакторы с непрерывным перемешиванием [18]: а) реактор прямой фильтрации: 1 — газовый баллон для создания трансмембранного давления, 2 — емкость с субстратом, 3 — реакционный сосуд с мешалкой, 4 — мембрана, 5 — термостатируемая емкость, 6 — сосуд для продукта; б) проточный мембранный биореактор: 7 — исходная смесь, 8 — продукт, 9 — насос, 10 — биокатализатор

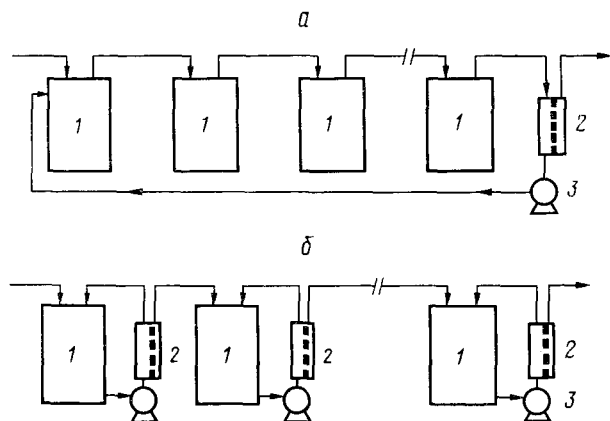


Рис. 3. Каскадные мембранные биореакторы с модулями мембранного разделения на заключительной стадии (а) и на каждой стадии (б): 1 — реактор, 2 — блок мембранного разделения, 3 — насос [18]

вые предложен в работе [19] (рис. 2, б). В отличие от схемы на рис. 2 здесь разделительный мембранный модуль физически отделен от реакционного сосуда, содержащего в качестве катализатора ферменты либо целые клетки. Проточный МБР позволяет многократно использовать биокатализатор и организовать работу в стационарном режиме. Реакторы этого типа пригодны для промышленного использования, например в установках для обработки сточных вод [20, 21]. Для нормального функционирования МБР рассматриваемого типа необходимо, чтобы молекулы продукта были существенно меньше по своему размеру молекул субстрата и биокатализатора. В силу этого ограничения МБР данного типа нашли применение в основном при проведении реакций гидролиза белков, крахмала, целлюлозы [18]. Для МБР, работающих в режиме идеального смешения, характерны небольшие концентрации компонентов и относительно невысокие скорости конверсии.

Поиски высокопроизводительных систем, в которых достигается глубокое превращение исходного вещества, привели к созданию каскадных МБР (рис. 3) [18]. Используют два типа каскадов: с блоком мембранного разделения на заключительной стадии (рис. 3, а) и с рециркуляцией непрореагировавшего компонента на каждой стадии (рис. 3, б). Каскадные системы последнего типа довольно дороги, но обеспечивают системе высокую гибкость, так как создают возможность проведения каждой стадии в оптимальном режиме, что особенно удобно для мультиферментных процессов.

Более высокая степень интеграции химической реакции и мембранного разделения достигается в МБР на основе полых волокон, поскольку в них ячейка мембранного разделения выполняет также функцию реактора. Основным достоинством устройств на основе полых волокон является высокое отношение площади поверхности мембраны к занимаемому объему. Кроме того, режим работы таких МБР приближается к режиму идеального вытеснения, что позволяет достигать глубокой конверсии субстрата. Впервые МБР на основе коммерческих полых волокон, внутри которых заключается фермент, описан в работе [22]. В дальнейшем были предложены различные варианты полволоконных МБР, представляющие две основные конфигурации (рис. 4, а и б). В схеме, представленной на рис. 4, а, фермент нанесен на внешнюю поверхность полого волокна, а субстрат прокачивается через внутренний объем. Продукт может отбираться либо с наружной стороны, либо из внутреннего объема волокна. Для нанесения биокатализатора на поверхность полого волокна широко применяют предварительную ультрафильтрацию раствора фермента или суспензии клеток через мембрану. Например, таким способом на внешнюю поверхность ультрафильтрационных полых волокон

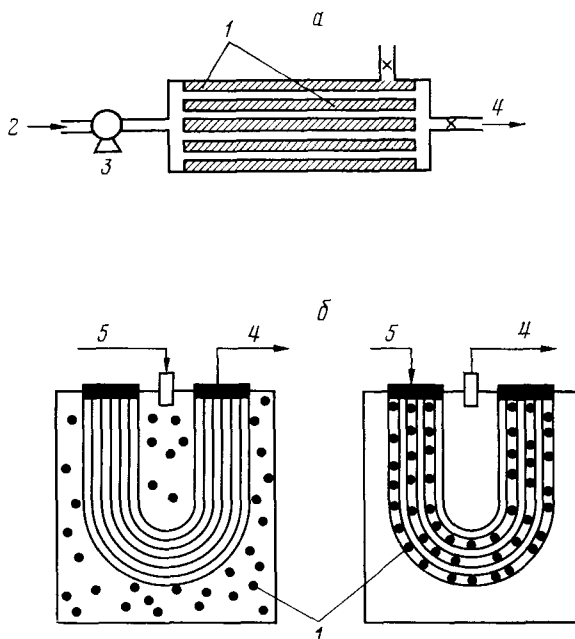


Рис. 4. Основные конфигурации биореакторов с мембранами в виде полых волокон: а) — пучок волокон в оболочке, б) — пучок волокон в емкости, содержащей биокатализатор, либо служащей для отбора продукта; 1 — биокатализатор, 2 — исходная смесь, 3 — насос, 4 — продукт, 5 — субстрат [18]

наносили дрожжевые клетки [23]. При этом клетки фиксируются достаточно прочно, чтобы обеспечить работу МБР в течение примерно 12 суток. Выход продукта реакции прямо пропорционален количеству загруженных в реактор клеток, однако при высокой плотности загрузки резко возрастает давление, необходимое для поддержания приемлемой скорости прохождения субстрата. Значительное повышение трансмембранного давления является нежелательным, так как при этом происходит ускоренное смывание биокатализатора с волокон. Способ фиксации ферментов за счет физической адсорбции обладает рядом достоинств: простотой и универсальностью методики нанесения, сведением к минимуму стерических затруднений в микроокружении фермента, что сопровождается незначительной потерей его активности, а также отсутствием необходимости введения каких-либо добавок к биокатализатору, что облегчает получение стерильных препаратов.

К числу технически важных реакций относится гидролиз триглицеридов с образованием жирных кислот и глицерина. Это превращение осуществляют [24, 25] в МБР, выполненных в виде модуля с полыми волокнами из ароматического полиамида. Гидролиз триглицеридов из растительных масел протекал в присутствии липазы из *Candida cylindracea*, иммобилизованной на внутренней поверхности полых волокон. Иммобилизацию фермента осуществляли путем предварительной ультрафильтрации водного раствора липазы через полые волокна. Субстрат — эмульсию растительного масла — непрерывно подавали во внутренний объем полых волокон. Полиамидная мембрана проницаема лишь для одного из продуктов реакции — глицерина, который диффундировал в водную фазу, находящуюся с внешней стороны волокна. Жирные кислоты удалялись из МБР в составе липидной фазы. Полиамидное волокно обеспечивает хорошее разделение фаз без какой-либо их дисперсии. Поливолоконные МБР позволяют достигать ~90% конверсии субстрата за 2—3 ч [25], время стабильной работы системы — более трех недель. Аналогичный по конструкции МБР был использован для широкомасштабного получения 6-аминопенициллановой кислоты [26].

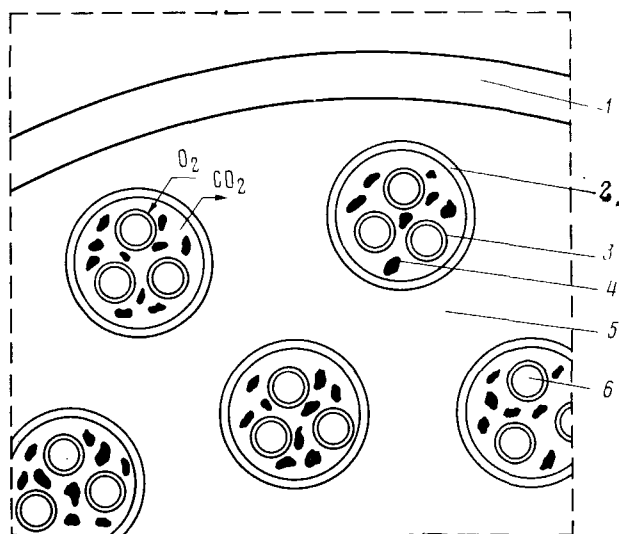


Рис. 5. Сечение биореактора с двойным полым волокном [28]: 1 — стеклянная трубка, 2 — силиконовая трубка, 3 — полипропиленовое полое волокно, 4 — иммобилизованные клетки, 5 — газовая фаза, 6 — жидкая фаза

Одно из ограничений, которые накладываются на использование полволоконных МБР, состоит в том, что субстрат и продукт должны иметь низкий молекулярный вес, позволяющий им диффундировать через мембрану. Именно поэтому такие реакторы часто применяют для гидролиза олигомеров [18]. Другим основным недостатком аппаратов на полых волокнах, отмеченным еще в первой работе [22], является лимитирование скорости химической реакции процессами диффузии. Так, например, при использовании МБР с полыми волокнами из полипропилена для производства фенилаланина мутантными штаммами *E. coli* [27] обнаружено, что скорость химической реакции ограничивается диффузией кислорода, необходимого для жизнедеятельности этих клеток. Полагают, что реакторы такого типа более пригодны для систем с низким потреблением кислорода или при использовании анаэробных организмов. Аналогичные трудности возникают и в том случае, если в ходе ферментативной реакции выделяются газы. Попытки преодолеть эти ограничения привели к созданию МБР на основе двойных полых волокон [28]. Рис. 5 воспроизводит схему устройства двойного полволоконного биореактора, пригодного для культивирования аэробных клеток. Микроорганизмы располагаются внутри объема, образованного силиконовыми трубками, через стенки которых проникает кислород, и полипропиленовыми полыми волокнами, через которые поступает жидкая среда. Производительность МБР на двойных полых волокнах может в 20—30 раз превышать производительность традиционных ферментеров.

Известны МБР, в которых биокатализатор заключен внутри пористой полимерной матрицы [13]. В качестве биокатализатора могут выступать ферменты или целые клетки, устойчивые к воздействию органических растворителей, используемых при формировании мембраны. Значительное число биореакторов этого типа разработано для процессов, используемых в пищевой промышленности. Для совмещения в одной ячейке процессов ультраfiltrации и гидролиза лактозы в молоке и молочной сыворотке предложен МБР в плоском варианте [13]. Лактозу иммобилизуют в микропористой пленке из поливинилхлорида, расположенной непосредственно за ультраfiltrационной мембраной (рис. 6). Сопряжение процессов позволяет избежать нежелательного контакта фермента с частицами молочного жира. Аналогичный процесс осуществлен в присутствии бактерий *Sulfolobus solfataricus* в МБР другой геометрии [29]. Биокатализатор включали в матрицу мембраны, изготовленной в виде по-

лого волокна из смеси полисульфона, поливинилпирролидона и N,N-диметилацетамида. Увеличение содержания лиофилизированных клеток в смеси ухудшало механические свойства волокон и уменьшало регулярность структуры мембран. Однако эти отрицательные эффекты можно скомпенсировать, варьируя молекулярную массу поливинилпирролидона. Исследование взаимосвязи функциональных характеристик данных МБР с их кинетическими и гидродинамическими параметрами показало, что они могут работать как в диффузионном, так и в кинетическом режиме в зависимости от задаваемых на входе условий.

Микроокружение существенно влияет на активность включенного в полимерную матрицу биокатализатора. Важную роль играют механические свойства полимера, его биосовместимость и устойчивость к микробному разрушению [30].

Мембранные биореакторы, в которых иммобилизация фермента достигается за счет образования поперечных связей или ковалентного присоединения к поверхности носителя, обладают рядом преимуществ:

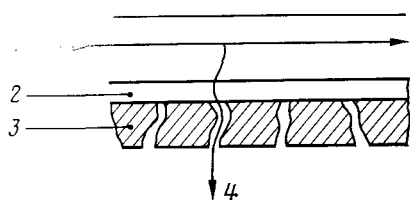


Рис. 6. Схема плоского мембранного реактора с иммобилизованным ферментом [13]: 1 — субстрат, 2 — ультрафильтрационная мембрана, 3 — пленка с иммобилизованным ферментом, 4 — гидролизат

они стабильны, позволяют организовать процесс в непрерывном режиме и контролируемых условиях, получать однородный и относительно дешевый продукт [18]. Однако в зависимости от способа иммобилизации различные ферменты могут терять от 10 до 90% своей активности в свободном состоянии вследствие стерических затруднений и диффузионных ограничений. Один из способов преодоления диффузионного контроля химического процесса в МБР основан на применении асимметричной керамической мембраны

[31]. Инвертазу иммобилизуют на ней путем фильтрации сквозь пористую подложку и последующей обработки глутаральдегидом. Высокая механическая прочность мембраны позволяет проводить химическую реакцию в режиме фильтрации при давлениях 50—450 кПа. Время контакта между ферментом и субстратом зависит от давления, изменение которого позволяет регулировать скорость реакции. Устранение диффузионных ограничений обеспечивает существенное увеличение потока вещества через мембрану.

Проведенные исследования способствовали появлению большого числа разнообразных конструкций МБР и показали широкие возможности их использования. Среди областей, в которых внедрение МБР может оказаться очень эффективным, выделим получение экологически чистых и возобновляемых энергоносителей. Последние 15 лет характеризуются резким увеличением использования алкогольсодержащих автомобильных топлив, которые в некоторых странах уже сегодня приобрели практическое значение [32, 33]. Анализ показывает [32], что сопряжение ферментации с процессами обратного осмоса, ультрафильтрации, испарения через мембрану позволяет улучшить экономические показатели производства и сделать целесообразным широкое использование бутанола, этанола и ацетона в качестве топлива. Интенсивно разрабатываются конструкции различных мембранных ферментеров [34, 35], в том числе для получения этанола [18].

Перспективной основой будущей энергетики считают метан и молекулярный водород. Один из возможных способов получения  $H_2$  — путем фоторазложения сероводорода — упоминался ранее. Альтернативный подход основан на том, что водород и метан являются продуктами жизнедеятельности большого числа микроорганизмов [33, 36, 37], в том числе фототрофных, для которых источником энергии служит свет. Водород могут выделять как целые клетки, так и изолированные полиферментные системы, содержащие гидрогеназы [38], причем активность гидрогеназ значительно превышает активность катализаторов на основе ме-

таллов платиновой группы и сохраняется достаточно долго на высоком уровне (период полунинактивации составляет около 60 суток [39]). Таким образом, создание ферментеров для производства водорода и метана, в которых реализовались бы принципы МБР (см., например, рис. 5), представляет несомненный интерес для решения энергетических проблем. Обзор современных концепций в области конструирования МБР для растительных клеток содержится в работе [40]. Благоприятным обстоятельством для разработки гидрогеназосодержащих МБР является также то, что при включении гидрогеназ в липидные липосомы (прием, который используется для иммобилизации биокатализаторов на синтетических мембранах [41]) в ряде случаев наблюдается повышение не только стабильности, но и активности фермента [42].

### 3. Организованные молекулярные ансамбли

Значительный интерес при разработке интегрированных мембранных систем представляют организованные молекулярные ансамбли — структуры, спонтанно образуемые амфифильными молекулами в водных растворах. Простейшими организованными молекулярными ансамблями являются монослои на поверхности раздела фаз, мицеллы, микроэмульсии, бислои, везикулы [43]. Стремление к самоорганизации липидных молекул в виде двойного слоя определяет основные структурные особенности биологических мембран. Наибольшее внимание привлекают липосомы — замкнутые, имеющие внутреннюю водную фазу, бислойные липидные мембраны размером 20–500 нм, а также монослои молекул. Использование липосом для проведения химических реакций обусловлено следующими основными причинами [41, 43]. Во-первых, во внутреннем объеме и в стенке липосомы вещества находятся в относительно высоких концентрациях. Во-вторых, формирование липосом сопровождается созданием чрезвычайно развитой поверхности. Например, при концентрации липида 4 мг/мл площадь липосомальных мембран составляет  $\sim 1$  м<sup>2</sup>/мл. В-третьих, липосомальные мембраны характеризуются высокой проницаемостью для неэлектролитов ( $10^{-4}$ – $10^{-6}$  см<sup>3</sup>/см<sup>2</sup>·с) и низкой проницаемостью для гидрофильных молекул ( $10^{-9}$ – $10^{-10}$  см<sup>3</sup>/см<sup>2</sup>·с), в особенности для ионов ( $10^{-14}$ – $10^{-15}$  см<sup>3</sup>/см<sup>2</sup>·с). Липосома, содержащая во внутренней водной фазе какой-либо фермент, представляет собой по сути мембранный микрореактор, выполненный на молекулярном уровне [44]. Липосомы могут быть использованы в МБР для мягкой иммобилизации ферментов [41]: вначале фермент встраивается в липосомальную мембрану либо заключаются во внутреннюю водную фазу, затем липосомы подвергают иммобилизации на пористой мембране. Стабильность иммобилизованных липосом по сравнению со свободными существенно выше. Другой путь повышения устойчивости состоит в создании вокруг везикулы полимерной оболочки, химически связанной с внешней поверхностью мембраны [45]. Везикулы, стабильные в течение нескольких месяцев могут быть приготовлены из молекул с двойными связями, которые после формирования везикул подвергают полимеризации [43].

Аналогичные полимерным везикулам, но более крупные образования — микрокапсулы — исследованы в качестве «контейнеров» для биокатализаторов в пионерских работах [46, 47]. Микрокапсулы диаметром от 1 до 100 мкм получали методом межфазной поликонденсации, эмульгируя водные растворы ферментов в органической фазе. В капсулы из пайлона или коллодия заключали раствор фермента, целые клетки или их фрагменты, причем в течение примерно недели сколь-нибудь заметного высвобождения белка из капсул не обнаруживалось. Мембраны капсул проницаемы для низкомолекулярных субстратов и продуктов, перенос осуществляется путем диффузии по водным порам диаметром  $\sim 1,6$  нм и в наиболее удачных образцах активность ферментов, регистрируемая по скорости накопления продукта, приближается к активности в нативном состоянии [46]. Изучены возможности



применения микрокапсул для биохимических исследований *in vitro*, а также для терапевтических целей *in vivo*. Одно из существенных ограничений в использовании такого рода систем состоит в опасности денатурации белка при межфазной полимеризации в процессе формирования микрокапсулы. Ранние работы по инкапсулированию ферментов явились основой для разработки первых МБР, содержащих биокатализатор внутри полых волокон [22].

Развитие работ по микрокапсулированию привело к созданию систем для проведения реакций межфазного катализа на границе раздела жидкость/жидкость. Фермент иммобилизуют на внешней поверхности пористой нейлоновой капсулы, заполненной водным буферным раство-

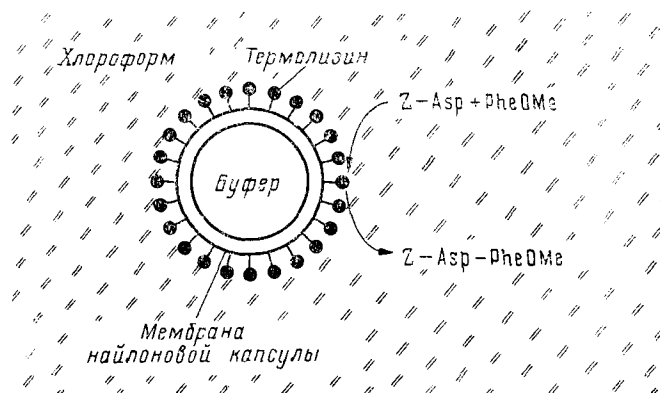


Рис. 7. Устройство капсульного мембранного биореактора для синтеза пептидов [48]

ром [48], которую помещают в органическую фазу (рис. 7). Реакция синтеза пептидов происходит на границе между водной фазой и хлороформом при этом фермент защищен от инактивирующего воздействия органического растворителя поверхностным слоем просачивающегося буфера. В отличие от традиционных капсульных МБР в данном биореакторе исходные вещества и продукты не обязательно должны иметь малые молекулярные массы. Другими достоинствами системы являются простота отделения биокатализатора от субстрата и продукта, а также отсутствие индукционного периода катализируемой реакции, связанного с процессами набухания [48].

Большие технологические возможности обеспечивает использование организованного ансамбля молекул в виде монослоя на границе фаз. Предложенная Ленгмюром методика нанесения мономолекулярных слоев на поверхность твердой подложки составляет сегодня основу многочисленных разработок в области микроэлектроники, оптики и электрооптики, создания фотоэлектрических преобразователей и систем обработки информации [49]. Внедрение методов получения ультратонких слоев в мембранную технологию позволяет наметить новые подходы к созданию интегрированных систем [50]. Прежде всего следует отметить возможность получения предельно тонких композиционных мембран, которые могли бы использоваться для создания высокопроизводительных МБР. Высокая упорядоченность расположения молекул в монослое позволяет проводить химические превращения в особых условиях, в которых могут проявляться тонкие специфические эффекты. Последовательное нанесение различных монослоев обеспечивает создание смешанных структур, свойства которых можно контролировать на молекулярном уровне, достигая максимальной интеграции. Введение в тонкослойные системы подходящих функциональных компонентов делает их чувствительными к химическим, электрическим или оптическим сигналам, которые можно использовать для управления свойствами нанесенной пленки. В таких системах может осуществляться не только

материальный перенос, но и передача информации. Таким образом, рассмотрение интегрированных мембранных систем требует расширения традиционных представлений о мембране как о пассивной избирательно проницаемой перегородке, поскольку в такого рода системах она может играть роль активного элемента, воздействуя на химическое состояние вещества (мембранные реакторы) или участвуя в формировании и преобразовании сигналов (мембранные сенсоры).

Остановимся кратко на некоторых примерах использования тонкослойных мембранных систем. Предложен способ создания тонкослойной мембраны из фрагментов клеточных стенок некоторых бактерий [51]. Имобилизация гликопротеиновых фрагментов, имеющих однородные по размеру поры диаметром 2–6 нм, на поверхности пористой синтетической подложки позволяет использовать полученную мембрану для ультрафильтрации в интервале рН от 1 до 13.

Исследования процессов фотоиницированного внутримолекулярного переноса электронов в упорядоченных системах донор — сенсibilизатор — акцептор, сформированных методом Лспгмюра — Блуджет, показали, что возможна реализация состояния с разделенными зарядами в наносекундном масштабе времени [50]. Система, функционирующая как фотодиод, получена путем нанесения на золотой электрод мономолекулярных пленок, содержащих связанные остатки виологена, пирена и ферроцена [52].

Широкое применение находят тонкослойные мембраны в качестве чувствительных элементов химических датчиков для биомедицинских исследований и контроля процессов в биореакторах *in situ* [53]. Одно из направлений создания сенсорных устройств состоит в использовании структуры полупроводникового полевого транзистора в качестве основы для нанесения мембраны, обладающей специфической химической чувствительностью [53–55]. Обычно применяют планарные кремниевые транзисторы с оксидной или нитридной диэлектрической пленкой, на область затвора которых нанесен имобилизованный фермент. Изменение электрического потенциала на затворе вследствие химического взаимодействия с субстратом модулирует состояние проводящего канала, которое регистрируют электрическими методами. Этот принцип использован для создания биодатчиков, чувствительных к глюкозе, АТФ, глутаминовой кислоте, мочеvine и другим органическим соединениям [53–55]. Биосенсоры этого типа обладают рядом несомненных достоинств: они миниатюрны, хорошо «интегрируются» в технологические схемы, создают возможность объединения в одном полупроводниковом кристалле различных датчиков, имеют хорошие метрологические характеристики и высоко технологичны в изготовлении. Использование ферментов в биодатчиках обеспечивает возможность регистрации широкого спектра веществ с огромной чувствительностью (концентрация обнаруживаемых веществ может достигать  $10^{-19}$  М) [56]. Применение тонкослойных мембран в сенсорных устройствах оправдано тем, что время отклика датчика обратно пропорционально квадрату толщины воспринимающей мембраны и может составлять несколько секунд [54].

Мембраны на основе бислойных и мультислойных молекулярных структур успешно используют для высокоселективного определения анионов и катионов электрохимическими [57, 58] и спектроскопическими [59] методами. Мономолекулярный липидный слой на границе раздела вода/воздух исследован в качестве модели обонятельной мембраны [60]. Адсорбция газообразного компонента (диэтилового эфира) или его встраивание в липидный монослой приводила к резкому увеличению проницаемости пленки для паров воды.

Фото- или хемочувствительность мембран может быть использована не только для создания регистрирующих систем, но и для активного регулирования функциональных свойств мембран в интегрированных системах. Возможность управляющего воздействия на компоненты сложных мембранных систем значительно увеличивает число независимых операционных переменных, позволяет реализовать новые режимы

работы и увеличить гибкость таких систем, например мембранных биореакторов.

Одним из биологических объектов, обладающих широким набором функциональных свойств, которые могут найти техническое применение, является мембранный белковый комплекс бактериородопсин. Ниже рассмотрены основные свойства бактериородопсина и возможности его использования в мембранных системах.

### III. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОРОДОПСИНА В ИСКУССТВЕННЫХ СИСТЕМАХ

#### 1. Пурпурные мембраны, содержащие бактериородопсин

Хорошо известно, что липидные мембраны играют ключевую роль в процессах преобразования энергии живыми клетками. В высокоспециализированных биологических мембранах, осуществляющих такие фундаментальные процессы как дыхание или фотосинтез, связанные с мембраной мультиферментные комплексы катализируют целую цепь сопряженных реакций переноса электронов и протонов, в ходе которых происходит запасание химической энергии [61].

В последнее время большое внимание исследователей привлекают так называемые пурпурные мембраны (ПМ), синтезируемые бактериями *Halobacterium halobium*. В этих сравнительно простых, но высокоспециализированных мембранах под действием света осуществляется векторный трансмембранный перенос  $H^+$  [62].

Пурпурные мембраны из *H. halobium* на ~75% состоят из единственного белка — бактериородопсина (Бр) [62], остальные 25% составляют кислые липиды [63]. Бактериородопсин представляет собой одноцепочечный белок, состоящий из 248 аминокислотных остатков [64, 65] и имеющий молекулярную массу около 26,5 кДа. Хромофорной группой белка является альдимин ретиналя, который ковалентно связан с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина, образуя основание Шиффа [62].

Методы малоуглового рассеяния и дифракции рентгеновских лучей [66], а также эксперименты по ограниченному протеолизу и иммунохимическому связыванию с моноклональными антителами [67] показали, что полипептидная цепь молекулы Бр образует семь  $\alpha$ -спиральных трансмембранных тяжей, соединенных участками белка, экспонированными в водную фазу на поверхностях мембраны. Согласно данным электронной микроскопии, молекулы Бр в плоскости мембраны формируют плотную гексагональную квазикристаллическую решетку [68], основным структурным элементом которой являются тримеры Бр (рис. 8).

Бактериородопсин в мембране может находиться в двух устойчивых формах — темноадаптированной и светоадаптированной, между которыми возможны переходы. В светоадаптированном Бр ретиналь находится в полностью *транс*-конформации, а темноадаптированный Бр представляет собой эквимольную смесь 13-*цис*- и полностью *транс*-изомеров [69]. Как 13-*цис*-Бр, так и полностью *транс*-Бр обладают фотохимической активностью и характеризуются циклами фотохимических превращений.

Фотохимический цикл светоадаптированного, полностью *транс*-Бр изучен достаточно подробно, начиная с первичных субпикосекундных стадий. В ходе цикла происходит депротонирование и последующее репротонирование шиффова основания и изомеризация ретиналя относительно двойной связи  $C(13)=C(14)$ . В ходе фотоцикла полностью *транс*-Бр проходит по крайней мере через шесть метастабильных состояний — интермедиатов J, K, L, M, N и O, времена жизни которых лежат в диапазоне 0,4 пс — 5—10 мс (см. обзоры [70, 71]).

Гораздо меньше известно о фотоцикле 13-*цис*-Бр, для которого постулируется наличие трех интермедиатов:  $^3C$ ,  $^3C$  и  $^{610}C$  (610 нм — максимум оптического поглощения интермедиата). В состоянии  $^3C$  фото-

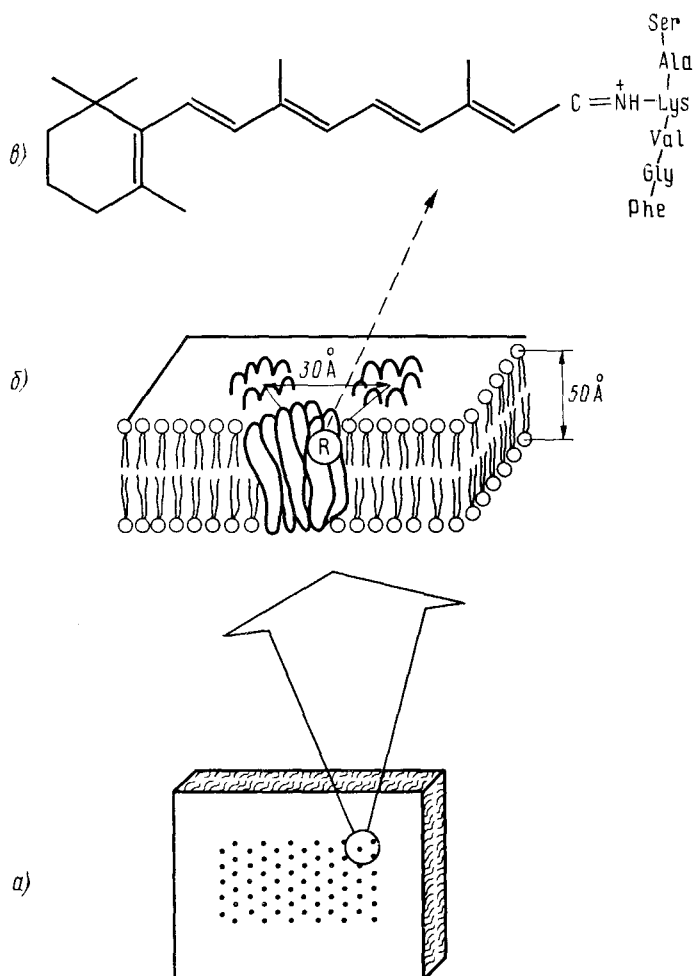


Рис. 8. Структура пурпурных мембран, содержащих бактериородопсин [68]: а) фрагмент пурпурной мембраны, точками обозначены молекулы бактериородопсина, образующие квазикристаллическую структуру; б) тример бактериородопсина; в) хромофорная группа бактериородопсина - ретиналь, связанный шиффовым основанием с Lys-216 полипептидной цепи бактериородопсина

цикл разветвляется и существует вероятность перехода Бр в полностью *транс*-форму [72].

Природа первичного интермедиата фотоцикла привлекает пристальное внимание исследователей в связи с тем, что именно в нем запасается энергия, которая в дальнейшем используется для трансмембранного переноса  $H^+$ .

С помощью импульсной лазерной абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии с субпикосекундным временным разрешением было установлено, что после поглощения кванта света светоадаптированный Бр переходит в синглетное возбужденное состояние, время жизни которого  $\tau=0,4-0,7$  пс [73]. Скорость релаксации возбужденного состояния совпадает со скоростью образования интермедиата *I*, спектр поглощения которого сдвинут по отношению к спектру Бр в длинноволновую область на  $\sim 30$  нм. Интермедиат *I* за  $\tau=5$  пс в свою очередь переходит в интермедиат *K*, спектр поглощения которого сдвинут по отношению к спектру Бр в длинноволновую область на 20 нм [73, 74]. Время жизни интермедиата *K* составляет 1–2 мкс и совпадает со временем образования интермедиата фотоцикла, имеющего максимум поглощения

вблизи 550 нм ( $L_{550}$ ). На этой и предшествующих стадиях альдими ретиналя в Бр находится в протонированном состоянии.

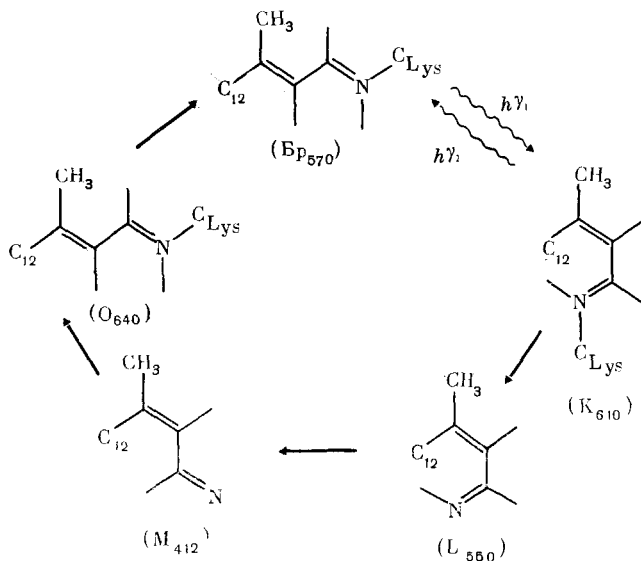
Следующий этап цикла фотохимических превращений Бр — переход от интермедиата  $L_{550}$  к одной из важнейших в функциональном отношении форме  $M_{412}$ , которая отвечает депротонированному состоянию шиффова основания ретиналя. Интермедиат  $M_{412}$  образуется приблизительно через 40 мкс после поглощения фотона. Образование фотопродукта  $M_{412}$  можно регистрировать методом низкотемпературной или импульсной абсорбционной спектроскопии в полосе поглощения около 410 нм, а также по появлению полосы  $1570\text{ см}^{-1}$  валентных колебаний  $\text{C}=\text{C}$  в кинетических спектрах резонансного комбинационного рассеяния (КР).

Процесс образования формы  $M_{412}$  является одним из ключевых этапов функционирования Бр, как светозависимого протонного насоса. На стадиях образования и распада интермедиата  $M_{412}$  регистрируют наиболее существенные изменения ионного состояния ряда ароматических аминокислотных остатков и карбоксильных групп белка. Установлено, что на этом этапе происходит отщепление протона от шиффова основания и перенос  $\text{H}^+$  через мембрану.

Через  $\sim 10$  мс после образования интермедиата  $M_{412}$  наблюдается регенерация исходной формы  $\text{Br}_{570}$ . Как правило, этот переход описывается следующей последовательностью фотореакций:  $M_{412} \rightarrow (\text{N}_{520}) \rightarrow \rightarrow \text{O}_{640} \rightarrow \text{Br}_{570}$  (интермедиат  $\text{N}_{520}$  помещен в скобки, поскольку многие авторы не подтверждают его существование).

Применение импульсной спектроскопии комбинационного рассеяния с пикосекундным временным разрешением позволило изучить динамику конформационных изменений ретиналя. В области  $1100\text{--}1400\text{ см}^{-1}$  спектры КР 13-цис-Бр и полностью транс-Бр существенно различаются. Спектр КР, зарегистрированный через несколько пикосекунд после действия лазерной вспышки на светоадаптированный (полностью транс-Бр) образец, чрезвычайно напоминает спектр 13-цис-Бр. При замене среды с  $\text{H}_2\text{O}$  на среду с  $\text{D}_2\text{O}$  наблюдается аналогичное спектральное соответствие между «пикосекундным интермедиатом» и 13-цис-Бр, но в несколько другом диапазоне длин волн ( $950\text{--}1050\text{ см}^{-1}$ ). Полоса, соответствующая связи  $\text{C}=\text{NH}$  шиффога основания ( $1646\text{ см}^{-1}$ ) в пикосекундном временном интервале подвергается уширению и сдвигу, что может указывать на изменение электронной структуры и непосредственного окружения групп  $\text{C}=\text{NH}$  [75, 76].

Квантовохимический анализ колебательных спектров с дейтерированным или модифицированным  $^{13}\text{C}$  в положении  $\text{C}(15)$  ретиналем, зарегистрированных методом ИК-спектроскопии с Фурье-преобразованием, а также спектров резонансного комбинационного рассеяния ана-



логичных препаратов Бр с биосинтетически модифицированным  $^{13}\text{C}$  ретиналом показывает, что в фотохимическом цикле происходят следующие изменения структуры хромофора:  $\text{Br}_{570}$  (полностью *транс*)  $\rightarrow$   $\rightarrow \text{K}(13,14\text{-}s\text{-цис}) \rightarrow \text{L}(13,14\text{-}s\text{-цис}) \rightarrow \text{M}(13\text{-цис}) \rightarrow \text{O}$  (полностью *транс*) [77, 78].

Цикл фотохимических превращений светоадаптированного БР и структурные перестройки ретинала вблизи шиффова основания показаны на схеме.

## 2. Фотоэлектрические процессы

В ходе фотохимических превращений Бр происходит перенос протонов из внутриклеточного объема через мембрану во внешнюю среду, что приводит к созданию градиента электрохимического потенциала ионов водорода на клеточной мембране. Энергия, запасенная в виде разности электрохимических потенциалов, используется для синтеза АТФ, мембранного транспорта, движения бактериальной клетки, процессов метаболизма и др. Точный механизм активного протонного транспорта в Бр не установлен. В литературе обсуждаются энергетические, структурные и кинетические аспекты функционирования протонного канала [79, 80].

Прямое экспериментальное измерение фотоэлектрической активности Бр [81, 82] основано на сохранении функциональных свойств Бр при встраивании его в искусственные фосфолипидные мембраны, липосомы или пропитанные фосфолипидом мембранные фильтры, разделяющие растворы электролита. Действие света вызывает перенос  $\text{H}^+$  между разделенными мембраной отсеками и создает разность электрических потенциалов, которая может быть измерена с помощью обратимых электродов или потенциал-чувствительных зондов.

Использование малоинерционной системы регистрации, а также импульсного лазерного возбуждения позволяет увеличить временное разрешение метода измерения фотопотенциала до микро- [83] и пикосекунд [84, 85]. Процессы нарастания и спада фотопотенциала, генерируемого Бр, имеют несколько фаз, коррелирующих в первом приближении с образованием и распадом интермедиатов К, L и М фотоцикла Бр [83]. Предполагают, что генерация фотопотенциала в таких системах связана с внутримембранным смещением заряженных групп (токи смещения) и трансмембранным переносом  $\text{H}^+$ .

Модельные системы, содержащие Бр в составе искусственных липидных мембран, могут представлять собой липосомы или плоские макроскопические мембраны. С помощью потенциал-чувствительных красителей показано, что в искусственных липидных везикулах в стационарных условиях на мембране возникает фотопотенциал до 200 мВ [86]. В липосомах направление протонного транспорта может совпадать с направлением переноса в клетках или быть противоположным ему [87] в зависимости от метода приготовления липосом, типа использованных липидов и рН среды [88, 89].

В состав липосом Бр может быть встроен как единственный белковый компонент, либо в сочетании с другими мембранными белками, такими как АТФаза, цитохромоксидаза и другие ферменты дыхательной цепи [87, 90–93]. В последнем случае мембранный электрохимический потенциал, генерируемый Бр при освещении, может обеспечивать энергией процессы фосфорилирования, а также оказывать регуляторное действие на активность ферментов. Организованные молекулярные ансамбли, получаемые при встраивании Бр и других ферментов в бислойные липидные мембраны, позволяют реализовать функциональное сопряжение между белками, причем мономерный Бр служит более эффективным источником энергии, чем нативные ПМ в силу более плотной упаковки мономера в липосоме [94].

Бактериородопсин способен сорбироваться на поверхности раздела фаз октан/вода и в условиях освещения в присутствии акцептора электронов в октановой фазе генерирует разность потенциалов между фазами

величиной до 0,5 В [95]. При введении АТФазы в такую систему в ней может протекать фотофосфорилирование.

Фотоэлектрическая активность Бр в составе плоских бислойных («черных») липидных мембран впервые показана в работах [96, 97]. Установлено, что фотопотенциал величиной 100–180 мВ, возникающий при облучении светом с длиной волны около 560 нм (максимум поглощения Бр), уменьшается до нуля под действием синего света, поглощаемого интермедиатом М и обращающего фотоцикл. Аналогичное управление фотоэлектрическими свойствами Бр под действием света различного спектрального состава имеет место и в других модельных системах.

Основным недостатком плоских бислойных липидных мембран является их малая стабильность. Добавление наполнителей к растворам, из которых формируются мембраны, позволяет в несколько раз увеличить время жизни мембраны и величину пробойного напряжения [98]. Еще более стабильные системы получают при сорбировании Бр на пропитанные липидом пористые фильтры или коллодиевые мембраны [99].

В ряде работ зарегистрирована фотоэлектрическая активность Бр, иммобилизованного в полиакриламидном геле [100, 101]. Кинетические характеристики фотоэлектрических сигналов указывают на сохранение интактности Бр при полимеризации геля.

Бактериородопсин или пурпурные мембраны могут быть иммобилизованы в других полимерных матрицах (поливиниловый спирт, желатина). Такие сухие мембраны с добавками, модифицирующими спектральные и кинетические свойства Бр, получили название пленок «Биохром». Они представляют собой перспективный фотохромный материал для реверсивной оптической записи информации [102].

Иммобилизация Бр увеличивает и без того высокую стабильность этого белка, уникальную для биологических систем. Так, Бр сохраняет фотохимическую активность в широком интервале температур (от гелиевых до  $\sim 370$  К), рН (3–10) и ионной силы раствора (от дистиллированной воды до насыщенного раствора NaCl) и обладает повышенной устойчивостью к действию протеолитических ферментов [67, 103], некоторых органических растворителей и детергентов [104]. Пленки «Биохром» или сухие пленки, приготовленные из ПМ, сохраняют функциональную активность в течение многих месяцев и даже лет и выдерживают без потери активности до  $10^7$  циклов переключения «свет — темнота». Для некоторых областей применения наиболее перспективными представляются именно такие «твердотельные» системы, получаемые путем иммобилизации и высушивания Бр на твердых подложках. Функционирование Бр в сухих мембранах имеет ряд особенностей по сравнению с его функционированием в целой клетке или в водной суспензии ПМ.

### 3. Особенности фотохимических реакций бактериородопсина в сухих мембранах

Бактериородопсин сохраняет способность к обратимым фотохимическим превращениям в условиях частичного обезвоживания, причем в достаточно влажных пленках ( $\geq 60\%$ ) цикл превращений практически такой же, как в водной суспензии [105, 106]. Образование и распад интермедиата М, т. е. депротонирование и протонирование хромофорной группы Бр в отсутствие воды как жидкой фазы, указывают на то, что эти процессы в клетке, по-видимому, протекают с участием эндогенных доноров и акцепторов протона, которыми являются, вероятно, аминокислоты Туг и Asp, локализованные вблизи шиффова основания [80, 105].

Наряду со сходством фотохимических процессов, протекающих в суспензии и в сухих препаратах ПМ, между ними наблюдаются и некоторые существенные различия. 1) При малой влажности положение максимума в спектре поглощения многослойных пленок ПМ сдвинуто

на 5–10 нм в коротковолновую область по сравнению с максимумом в суспензии [107]. 2) Темновая и световая адаптация в мультислойных пленках ПМ при относительной влажности  $<100\%$  отличается от адаптации в суспензии ПМ [107, 108]. В пленках, находящихся в светоадаптированном состоянии, соотношение между изомерами Бр с 13-*цис*-ретиналом и с полностью *транс*-ретиналом зависит от длины волны возбуждающего света и от влажности. 3) Наряду с фотохимическими превращениями полностью *транс*-Бр в сухих препаратах ПМ наблюдаются фотопревращения 13-*цис*-Бр, в фотоцикле которого отсутствует депротонированный интермедиат М. 4) Фотохимический цикл полностью *транс*-Бр в сухих мембранах редуцирован по сравнению с фотоциклом в водной суспензии — в нем отсутствуют интермедиаты L и O [106, 109, 110], а в более влажных мембранах цикл Бр приближается по характеристикам к фотоциклу в клетках [111].

При глубоком обезвоживании ПМ происходит сдвиг максимума поглощения Бр от 570 к 530 нм [112]. В новом состоянии, по данным спектроскопии комбинационного рассеяния, альдимин находится в депротонированной форме, а ретиналь — преимущественно в 13-*цис*-конфигурации. При освещении обезвоженной Бр<sub>530</sub> претерпевает цикл фотохимических превращений со следующими стадиями: образование ба-тоинтермедиата со спектральным максимумом при 630 нм, образование интермедиата с максимумом при 412 нм (время образования  $\tau=2,5$  мс) и релаксация последнего за время  $\tau=2$  с в исходную форму Бр<sub>530</sub>.

Помимо указанных выше особенностей фотоцикла в сухих пленках можно отметить также увеличение времени жизни интермедиата М, которое при комнатной температуре составляет несколько секунд и даже десятков секунд [109, 110, 113] по сравнению с несколькими миллисекундами в водной суспензии. Время жизни состояния М увеличивается также при добавлении глицерина к водным растворам ПМ [114, 115].

Для углубленного исследования и более полного использования молекулярных фотохромных и фотоэлектрических свойств Бр были разработаны способы получения ориентированных пленок или мембран, содержащих в качестве рабочего элемента ПМ.

#### 4. Методы получения ориентированных пленок пурпурных мембран и фотоэлектрические свойства таких пленок

Описаны различные способы ориентации пурпурных мембран: методом центрифугирования [116], на межфазной границе воздух/вода вследствие гидрофобных взаимодействий [117], в магнитном поле вследствие анизотропии диамагнитной восприимчивости белковых сегментов [118], на заряженных поверхностях, модифицированных полилизинном [119], в электрическом поле воздушного конденсатора [105], в электрическом поле, приложенном непосредственно к суспензии [120]. Для ориентирования пурпурных мембран и для стабилизации полученной структуры использовали также химическую сшивку [121].

Ориентирование ПМ в магнитном поле [118] основывается на диамагнитных свойствах  $\alpha$ -спиральной структуры белка, в которую преимущественно организованы молекулы Бр. При действии магнитного поля на суспензию ПМ в последней возникает некоторая упорядоченность, которая может быть зафиксирована высушиванием.

Ориентированные пленки ПМ были получены путем осаждения на подложку монослоев, сформированных методом Ленгмюра — Блоджет [117, 122]. Исследование состояния монослоев ПМ и смеси ПМ с жирными кислотами на границе раздела воздух/вода позволило определить их динамические характеристики и подтвердило возможность формирования мультислоев по методике Ленгмюра — Блоджет [123]. Мембранные системы, состоящие из ориентированных молекулярных слоев ПМ, полученных методом Ленгмюра — Блоджет и нанесенных на тонкую тефлоно-



вую подложку или другой нейтральный носитель, рассматриваются некоторыми авторами как прототипы молекулярных вычислительных элементов [124, 125]. Эта система достаточно доступна и стабильна для проведения строгих количественных измерений, и в то же время молекулярная организация ПМ достаточно сложна, что создает основу для модификации структуры с целью управления фотосигналом.

Методами центрифугирования и седиментации [116] можно получить многослойные пленки, внутри которых ПМ расположены строго параллельно плоскости подложки. Однако при таком способе формирования пленки ПМ с равной вероятностью могут ориентироваться в сторону подложки как цито-, так и периплазматической поверхностью. Получаемые препараты отличаются высокой степенью упорядоченности упаковки ПМ, однако направление фотоиндуцированного переноса  $H^+$  в каждой из мембран выбирается случайно из двух возможных.

Подобные упорядоченные пленки можно получить путем высушивания суспензии ПМ на стеклянной, майларовой или слюдяной пластине. В этом случае ПМ самопроизвольно «укладываются» на плоскость подложки в силу значительного превышения диаметра ПМ над их толщиной (около 300 и 5 нм соответственно). Однако при такой самопроизвольной седиментации может наблюдаться изгибание дисков ПМ и другие искажения их структуры.

Значительный интерес представляют способы ориентирования ПМ, основанные на различиях в свойствах цито- и периплазматической поверхностей. Пурпурные мембраны обладают значительным постоянным дипольным моментом, обусловленным различной плотностью поверхностных зарядов на противоположных сторонах мембраны. Величина этого дипольного момента при pH 7 составляет  $\sim 140$  Д [126]. Замораживание суспензии ПМ во внешнем электрическом поле позволяет создать и зафиксировать преимущественную ориентацию ПМ по отношению к вектору приложенного электрического поля [127].

Для получения препаратов ориентированных ПМ использовали также высушивание в постоянном электрическом поле капли суспензии, нанесенной на электропроводящую подложку [105]. Однако поскольку высушивание проводили в поле воздушного конденсатора, значительное различие диэлектрических проницаемостей воздуха и суспензии ПМ не позволяло достичь значительной напряженности электрического поля внутри суспензии и, кроме того, поле внутри капли было существенно неоднородным. Поэтому высокая степень упорядоченности ПМ в препаратах, получаемых указанным методом, не достигалась.

Значительно большей упорядоченности удалось добиться при использовании электрофоретического метода осаждения пурпурных мембран на плоском электроде [120]. В этом случае электрическое поле прикладывают непосредственно к деионизованной суспензии ПМ. Известно, что в составе ПМ содержатся кислые липиды [63], которые в нейтральной среде заряжены отрицательно. По этой причине пурпурные бланки обладают электрофоретической подвижностью и при pH около 7 происходит движение ПМ в сторону анода.

Анализ перечисленных методик показывает, что электрофоретическое осаждение и последующее высушивание ПМ на электропроводной подложке позволяет получить препараты, в которых бактериородопсиновые бланки упорядочены в максимальной степени. Под действием света такие высокоориентированные мембранные структуры генерируют электрический потенциал до 10—11 В (при толщине образца около 10 мкм [128]). Фотоэлектрический сигнал, генерируемый Бр, состоит из двух компонентов: тока смещения, связанного с перераспределением зарядов внутри мембраны, и постоянного фототока, вызванного трансмембранным переносом протонов и сопряженного с электрохимическими реакциями на поверхности электродов [129].

Значительная величина фотосигнала и компактность системы, способствующая уменьшению паразитных электрических емкостей, позволили зарегистрировать с помощью пикосекундной лазерной техники нара-

стание фотоэлектрического сигнала, фронт которого оказался короче 5 пс [84], а также создать на основе ПМ первый биологический фотодиод, обладающий пикосекундным временным разрешением [85].

Важным свойством мембран, содержащих Бр, является зависимость их спектральных и фотоэлектрических характеристик от приложенного внешнего электрического поля, что создает основу для управления мембранными системами [71, 130].

## 5. Использование бактериородопсина в мембранных реакторах

Использование внешних воздействий для регулирования режима работы МБР отражает тенденцию к организации процессов в соответствии с принципами, реализующимися в биологических системах. Гибкие перестраиваемые системы, по-видимому, обладают большими потенциальными возможностями для их оптимизации. Исследование фотохимических превращений в полимерных пленках как возможного способа регуляции свойств мембран представляет несомненный интерес. Фоточувствительные полипептидные мембраны могут быть приготовлены из поли-*L*-глутаминовой кислоты, содержащей хромофорные парарозанилиновые группы [131]. При облучении ультрафиолетовым светом происходит фотодиссоциация, сопровождаемая конформационным переходом полипептида в  $\alpha$ -спиральную структуру. В темноте наблюдается релаксация структуры к исходной, процесс носит термоактивационный характер. Поскольку транспортные свойства мембраны зависят от конформационного состояния полипептида [132], освещение может использоваться как способ изменения проницаемости мембраны. Помимо фотодиссоциации известны еще два фотохимических процесса, приводящих к существенному изменению свойств молекул, образующих тонкие мембраны: *цис-транс*-изомеризация и превращения, включающие изменение гидрофильности головных групп амфифилов. Фотореакции последнего типа изучены в мультислоях фоточувствительных амфифильных молекул, сформированных методом Ленгмюра — Блоджет [133]. При освещении пленок светом ближней ультрафиолетовой области наблюдается уменьшение их проницаемости для ионов, что связывают с формированием более компактной структуры пленки. Переход мембраны в непроводящее состояние является фотообратимым, релаксация происходит под действием видимого света. Таким образом, система ведет себя как ионный фототриггер: поглощение небольших доз излучения вызывает довольно значительное изменение электрического тока. Интересной особенностью рассматриваемых соединений является то, что по отношению к Бр они могут играть роль фотоингибитора, поскольку область поглощения индуцированной УФ-облучением формы вещества перекрывает полосу поглощения бактериородопсина [133].

Проницаемость синтетических мембран из поливинил-полипептидного сополимера, образующего полипептидные микродомены, существенно зависит от pH среды [134], определяющего конформационное состояние полипептидных участков. При соответствующем выборе геометрии, а также способа иммобилизации пигмента, по-видимому, можно использовать протон-транспортную функцию Бр для воздействия на процессы переноса органических субстратов через рассматриваемые мембраны. Вероятно, и другие ферменты, катализирующие реакции с участием  $H^+$ , можно рассматривать как возможные регуляторы pH-зависимых свойств синтетических мембран. Окислительно-восстановительные процессы также влияют на свойства некоторых мембран, например из поли-*L*-цистеина [135].

Проницаемость мультислойных мембран, сформированных из амфифилов жидкокристаллического типа, является функцией приложенного к мембране электрического поля [136]. В зависимости от химического состава мембраны ее проницаемость может зависеть либо от латерального, либо от трансмембранного электрического поля. В последнем случае, по-видимому, фотоэлектрическая активность Бр может быть ис-

пользована для регулирования проницаемости жидкокристаллических пленок.

Величина электрического потенциала не только влияет на пассивные процессы проникновения веществ через мембрану, но в некоторых случаях определяет также активность биокатализатора. Так, обнаружено значительное увеличение активности алкогольдегидрогеназы, иммобилизованной на электропроводной мембране из полипиррола, при возрастании потенциала, прикладываемого к подложке [137]. Увеличение активности фермента связывают с преодолением диффузионных ограничений для продуктов и субстратов вследствие изменения суммарного заряда мембранной матрицы. Можно предположить, что использование обладающего электрогенными свойствами Бр в системах такого типа окажется весьма эффективным, поскольку приложение к мембране потенциала 0,7 В более чем в 10 раз увеличивало активность фермента [137]. Фотопотенциалы такой величины сравнительно легко можно получить при использовании ориентированных препаратов Бр. Для регулирования фотоактивности самого Бр предложено использовать катионные амфифилы, которые способны к образованию бислоев в водной фазе [138]. Эти вещества образуют связи с отрицательно заряженными группами на поверхности ПМ, что приводит к блокированию процессов захвата бактериородопсином протонов из среды. Другой подход к регулированию свойств Бр связан с развитием генной инженерии. Методы генной инженерии позволили получить аналоги Бр, в молекулах которых отдельные аминокислотные остатки заменены другими [139]. К настоящему времени получено 14 таких мутантов, протон-транспортная активность и спектральные свойства которых иные, чем у нативного бактериородопсина.

Таким образом, разработаны разнообразные конструктивные типы мембранных биореакторов, пригодных для проведения большого числа промышленно важных процессов с хорошими экономическими показателями. Можно предположить, что для дальнейшего развития МБР весьма полезным окажется более глубокое заимствование принципов организации процессов в биологических системах. Созданию более гибких и эффективных интегрированных мембранных систем может способствовать использование регулируемых элементов, свойства которых изменяются под влиянием химических веществ, света, электрического или магнитного полей, а также других видов воздействий. Представляется интересным исследовать сильно неравновесные режимы работы МБР, при которых возникают пространственно-временные осцилляции концентраций и потоков компонентов. Глубокая модуляция свойств может достигаться в гибридных системах, включающих те или иные биологические комплексы и функциональные полимерные мембраны. В таких системах можно контролировать минерализацию рабочих объемов и нормировать подачу субстратов за счет симпорта или антипорта компонентов, переносимых транспортными белками. Бактериородопсин, обладающий широкими функциональными возможностями и исключительно высокой стабильностью, является удобным объектом для применения в элементах регулирования. В упорядоченных молекулярных ансамблях Бр может выполнять роль быстродействующего фотоэлектрического и фотоэлектрохимического преобразователя. Простота и технологичность получения содержащих Бр мембранных систем создает предпосылки для их практического использования. Несомненный интерес представляет также изучение возможностей применения в гибридных системах помимо Бр других энергозависимых биологических комплексов — реакционных центров фотосинтезирующих систем, транспортных АТФаз и др.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Тимашев С. Ф. // Успехи химии. 1988. Т. 57. С. 876.
2. Honda K. // The 1987 International Congress on Membranes and Membrane Processes (ICOM 87). Tokyo. 1987. P. 6.
3. Drioli E. // Ibid. P. 33.

4. Itoh N., Shindo Y., Haraya K., Hakuta T.//Ibid. P. 654.
5. Kameyama T.//Ind. Eng. Chem. Fundam. 1981. V. 20. P. 97.
6. Пармон В. Н.//Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1986. Т. 31. С. 537.
7. Груздков Ю. А., Савинов Е. Н., Пармон В. Н.//Тез. докл. II Всесоюз. конф. «Фотокаталитическое преобразование солнечной энергии». Новосибирск, 1987. С. 65.
8. Mau A. W.-H.//J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 6537.
9. Timashev S. F.//Synthetic Polymeric Membranes/Ed. Sedláček B. et al. Berlin — New York: Walter de Gruyter, 1987. P. 437.
10. Lee P. C., Meisel D.//J. Amer. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 5477.
11. Mika A. M., Lorenz K.//ICOM 87. P. 769.
12. Campanella L., Majone M., Morgia C., Salvi A. M.//Ibid. P. 773.
13. Leiva M. H. L., Gekas V.//Ibid. P. 461.
14. Blatt W. F., Fejnberg M. P., Hopfenberg H. B.//Science. 1965. V. 150. P. 224.
15. Blatt W. F., Robinson S. M.//Anal. Biochem. 1968. V. 26. P. 151.
16. Wang D. I. C., Sonoyama T., Mateles R. I.//Ibid. 1968. V. 26. P. 277.
17. Butterworth T. A., Wang D. I. C., Sinskey A. J.//Biotechnol. Bioeng. 1970. V. 12. P. 615.
18. Cheryan M., Mehta M. A.//Membrane Separations in Biotechnology/Ed. McGregor W. C. New York — Basel, 1986. C. 255.
19. Porter M. C., Michaels A. L.//Chem. Technol. 1970. V. 1. P. 59.
20. Winnicki T.//ICOM 87. P. 635.
21. Kanayama H., Tomoyashii T., Katayama S.//Ibid. P. 652.
22. Rony P. R.//J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. P. 8247.
23. Pizzichini M., Sperandei M.//ICOM 87. P. 212.
24. Pronk W., Knol A., Riet K.//Ibid. P. 637.
25. Kilara A., Shahani K. M., Wagner F. M.//Biotechnol. Bioeng. 1977. V. 19. P. 1703.
26. Klagba W., Braun J., Le Goffic F.//ICOM 87. P. 639.
27. Paterson S. L., Fane A. G., Fell C. J. D., Rogers P. L.//Ibid. P. 644.
28. Chang H. N., Chung B. N., Park J. K.//Ibid. P. 658.
29. Iorio G., Drioli E., Catapano G.//Ibid. P. 627.
30. Cantarella M., Cantarella L., Cirielli G. et al.//Ibid. P. 646.
31. Nakajima M., Jimbo N., Nishizawa K. et al.//Ibid. P. 453.
32. Leeper S. A.//Membrane Separations in Biotechnology/Ed. McGregor W. C. New York — Basel, 1986. P. 161.
33. Варфоломеев С. Д., Березин И. В.//Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1986. Т. 31. С. 489.
34. Erikssen A. G.//ICOM 87. P. 397.
35. Markl H., Lecher M., Gotz F.//Ibid. P. 666.
36. Кондратьева Е. Н., Гоготов И. И. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 1981. 344 с.
37. Варфоломеев С. Д., Панцхава Е. С.//Биотехнология. М.: Наука, 1984. С. 125.
38. Гоготов И. Н.//Биоконверсия солнечной энергии. Пушино, 1984. С. 54.
39. Зорин Н. А., Серебрякова Л. Т., Гоготов И. Н., Проскураков И. И.//Там же. С. 167.
40. Shuler M. L.//Membrane Separations in Biotechnology/Ed. McGregor W. C. New York — Basel, 1986. P. 303.
41. Sada E., Katoh S. M., Terashima M.//ICOM 87. P. 633.
42. Гоготов И. Н., Серебрякова Л. Т., Зорин Н. А., Ковач К. Л.//Биоконверсия солнечной энергии. Пушино, 1984. С. 199.
43. Шафирович В. Я., Шилов А. Е.//Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1986. Т. 31. С. 542.
44. Mossa G., Di Ciullo A., Avigliano L. et al.//ICOM 87. P. 660.
45. Kondo T., Ohshima H., Kato A., Fukuda K.//Ibid. P. 753.
46. Chang T. M. S.//Science. 1964. V. 146. P. 524.
47. Chang T. M. S., MacIntosh F. C., Mason S. G.//Can. J. Physiol. Pharmacol. 1966. V. 44. P. 115.
48. Okahata Y.//Acc. Chem. Res. 1986. V. 19. P. 57.
49. Roberts G. G.//Sensors and Actuators. 1983. V. 4. P. 131.
50. Fujihira H.//ICOM 87. P. 683.
51. Sleytr U. B., Messner P.//Ann. Rev. Microbiol. 1983. V. 37. P. 311.
52. Yamada H., Fujihira M.//ICOM 87. P. 693.
53. Reichert W. M., Bruckner J. J.//Thin Solid Films. 1987. V. 152. P. 345.
54. Nakamoto S., Kimura J., Kuriyama T.//ICOM 87. P. 605.
55. Gotoh M., Tamiya E., Karube L.//Ibid. P. 616.
56. Иваницкий Г. Р.//Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации. Пушино, 1985. С. 3.
57. Hirata Y., Fujihira H.//ICOM 87. P. 697.
58. Shinohara H., Iritani Y., Aizawa M.//Ibid. P. 620.
59. Hakashima N., Moriguchi I., Nakano K., Takagi M.//Ibid. P. 729.
60. Matsuo A., Sundon A., Takekawa Y.//Ibid. P. 614.
61. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. М.: Наука, 1972. 203 с.
62. Oesterhell D., Stoerkenius W.//Nature. 1971. V. 233. P. 149.
63. Чекулаева Л. Н., Циренина М. Л., Варвер Б. А.//Укр. биохим. журн. 1980. Т. 52. С. 429.

64. Ouchinnikov Yu. A., Abdullaev N. G., Feigina M. Yu. et al.//FEBS Lett. 1979. V. 100. P. 219.
65. Khorana N. G., Gerber G. E., Herlihy W. C. et al.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5046.
66. Henderson R., Unwin N. T.//Nature. 1975. V. 257. P. 28.
67. Ouchinnikov Yu. A.//FEBS Lett. 1982. V. 148. P. 219.
68. Henderson R.//Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 1977. V. 6. P. 87.
69. Oesterheld D., Meentzen M., Schuman L.//Eur. J. Biochem. 1973. V. 40. P. 453.
70. Балашов С. П., Литвин Ф. Ф. Фотохимические превращения бактериородопсина. М.: Изд-во МГУ, 1985. 164 с.
71. Рубин А. Б., Кононенко А. А., Пащенко В. З. и др. Принципы регуляции и модельные системы первичных процессов фотосинтеза. М.: ВИНТИ. Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. 1987. Т. 22. 212 с.
72. Sperling W., Rafferty C. N., Kohl K. D., Dencher N. A.//Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms//Eds Caplan S. R. et al. Amsterdam: Elsevier 1978. P. 321.
73. Sharkov A. V., Pakulev A. V., Chekalin S. V., Matveetz Yu. A.//Biochim. Biophys. acta. 1985. V. 808. P. 94.
74. Pollard H.-J., Franz M. A., Zinth W. et al.//Biophys. J. 1986. V. 49. P. 651.
75. Hsien C. L., Elsayed M. A., Nicol M., Nagumo M.//Photochem Photobiol. 1983. V. 38. P. 83.
76. Stockburger M., Alshuth T., Hilderbrand P.//The time resolved vibrational spectroscopy. Proc. II Int. Conf. Emil Warburg Symp. Berlin, 1985. P. 240.
77. Gewart K., Seibert F.//EMBO J. 1986. V. 5. P. 805.
78. Tavan P., Schulten K.//Biophys. J. 1986. V. 50. P. 81.
79. Merz H., Zundel G.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. V. 101. P. 540.
80. Engelhard M., Hess B., Gerwert K., Siebert F.//Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1987. V. 368. P. 545.
81. Drachev L. A., Kaulen A. D., Ostroumov S. A., Skulachev V. P. FEBS Lett. 1974. V. 39. P. 43.
82. Drachev L. A., Jasaitis A. A., Kaulen A. D. et al.//Nature. 1974. V. 249. P. 321.
83. Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Skulachev V. P.//Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. P. 461.
84. Groma G. I., Szabo G., Varo Gy.//Nature. 1984. V. 308. P. 557.
85. Trissl H.-W.//Optoelectronik Magazin. 1987. V. 3. P. 105.
86. Renthal R., Lanyi J. K.//Biochem. 1976. V. 15. P. 2136.
87. Racker E., Stoekenius W. J.//Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 62.
88. Hwang S.-B., Stoekenius W. J.//Membr. Biol. 1977. V. 33. P. 325.
89. Happe M., Teather R. M., Overath P. et al.//Biochim. Biophys. acta. 1977. V. 465. P. 415.
90. Drachev L. A., Jasaitis A. A., Kaulen A. D. et al.//J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 7072.
91. Casadio R., Sorgato M. C.//Biophys. J. 1984. V. 45. Pt. 2. P. 92.
92. Groma G. I., Helgersson S. L., Wolber P. K. et al.//Ibid. V. 45. Y. 985.
93. Mirsky V. M., Sokolov V. I.//Bioelectrochem. Bioenergetics. 1983. V. 11. P. 327.
94. Wagner N.//Eur. J. Biochem. 1987. V. 165. P. 177.
95. Yaguzhinsky L. S., Boguslavsky L. I., Volkov A. G., Rakhmaninova A. B.//Nature. 1976. V. 259. P. 494.
96. Dancshazy Zs., Karvaly B.//FEBS Lett. 1976. V. 72. P. 136.
97. Herrman T. R., Rayfield G. W.//Biochim. Biophys. acta. 1976. V. 443. P. 623.
98. Shieth P., Packer P.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976. V. 71. P. 603.
99. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П.//Молекуляр. биология. 1975. № 11. С. 1377.
100. Toth-Baconadi R., Hristova S. G., Keszthelyi L.//FEBS Lett. 1986. V. 195. P. 164.
101. Der A., Hargittai P., Simon J.//J. Biochem. Biophys. Methods. 1985. V. 10. P. 245.
102. Всеволодов Н. Н., Ивацкий Г. Р., Соскин М. С., Тараненко В. Б.//Автометрия. 1986. Т. 2. С. 41.
103. Dumont M. E., Tredwhella J., Engelman D. M., Richards F. M.//Membr. Biol. 1985. V. 88. P. 233.
104. Shrenkenbach T.//Photosynthesis in relation to model systems/Ed. Barber J. Amsterdam: Elsevier, 1977.
105. Nagy K.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978. V. 85. P. 383.
106. Lasarev Yu. A., Terpugov E. I.//Biochim. Biophys. acta. 1980. V. 590. P. 324.
107. Korenstein R., Hess B.//FEBS Lett. 1977. V. 82. P. 1.
108. Koyama T., Bogomolni R. A., Stoekenius W.//Biophys. J. 1985. V. 48. P. 201.
109. Чаморовский С. К., Пукуленко А. Я.//Изв. АН СССР. Сер. биол. 1984. № 2. С. 294.
110. Chamorovsky S. K., Lukashev E. P., Kononenko A. A., Rubin A. B.//Biochim. Biophys. acta. 1983. V. 725. P. 403.
111. Varo Gy., Keszthelyi L.//Biophys. J. 1983. V. 43. P. 47.
112. Hilderbrandt P., Stockburger M.//Biochemistry. 1984. V. 23. P. 5539.
113. Korenstein R., Hess B.//Nature. 1977. V. 270. Y. 184.
114. Всеволодов Н. Н., Чекулаева Л. Н.//Биофизика. 1978. Т. 23. С. 1019.
115. Rayfield G. W.//Photochem. Photobiol. 1986. V. 43. P. 171.
116. Clark M., Rotshchild K. J., Luippold D. A., Simon B. A.//Biophys. J. 1980. V. 31. P. 85.

117. *Hwang S. B., Korenbrot J. F., Stoeckenius W.*//Biochim. Biophys. acta. 1978. V. 509. P. 300.
118. *Neugebauer B., Blaurock A. E., Woveester D. L.*//FEBS Lett. 1977. V. 78. P. 31.
119. *Fischer K. A., Janagimoto K., Stoeckenius W. J.*//Cell Biol. 1978. V. 77. P. 611.
120. *Varo Gy.*//Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 1981. V. 32. P. 301.
121. *Oesterhelt D.*//FEBS Lett. 1976. V. 64. P. 20.
122. *Trissl H.-W., Monthal M.*//Nature. 1977. V. 266. P. 655.
123. *Schildkraut J., Lewis A.*//Thin Solid Films. 1985. V. 134. P. 13.
124. *Okajima T. L., Hong F.*//Biophys. J. 1986. V. 50. P. 901.
125. *Hong F.*//Biosystems. 1986. V. 19. P. 223.
126. *Tsuji K., Neumann E.*//Int. J. Biol. Macromol. 1981. V. 3. P. 231.
127. *Ormos P., Reinisch L., Keszthelyi L.*//Biochim. Biophys. acta. 1983. V. 722. P. 471.
128. *Максимычев А. В., Лукашев Е. П., Кононенко А. А. и др.*//Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 294.
129. *Максимычев А. В., Чаморовский С. К., Тимашев С. Ф. и др.*//Там же. 1984. Т. 1. С. 1290.
130. *Kononenko A. A., Lukasev E. P., Maximychev A. V. et al.*//Biochim. Biophys. acta. 1986. V. 850. P. 162.
131. *Kinoshita T.*//J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 608. P. 6399.
132. *Kinoshita T.*//Colloid. Polim. Sci. 1983. V. 261. P. 933.
133. *Nishiyama K., Fujihura M.*//ICOM 87. P. 707.
134. *Maeda M., Chung D.-W., Inoue S.*//Ibid. P. 255.
135. *Takizawa A. J.*//Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 1986. V. 24. P. 665.
136. *Okahata Y., En-na G.*//ICOM 87. P. 656.
137. *Aizawa M., Yabuki S., Shinohara H., Chiba T.*//Ibid. P. 631.
138. *Katsura T.*//Ibid. P. 234.
139. *Khorana H. G.*//Microb. Energy Transduct: Genet. Struct. and Funct. Membr. Proteins. Conf. Cold Spring Harbor, 1986. N. Y., 1986. P. 141.

Научно-исследовательский физико-химический институт им. Л. Я. Карпова,  
Москва  
Московский государственный университет,  
биологический факультет