

УДК 577.152.3

## ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТИ ПАПАИНА В РАЗЛИЧНЫХ МИЦЕЛЛЯРНЫХ СИСТЕМАХ

Л.Ю. Филатова, Е.С. Оксенойт, К.С. Яковлева, Н.И. Иванова, Н.Л. Клячко

(кафедра химической энзимологии, кафедра химии природных соединений, кафедра коллоидной химии; e-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru)

Изучен гидролиз PypPheAlaPNa, катализируемый папаином в обращенных мицеллах ионогенного ПАВ, Аэрозоля ОТ в октане, в отсутствие и в присутствии НПАВ различной природы. Обнаружено, что в обращенных мицеллах АОТ- зависимость активности папаина от степени гидратации ПАВ имеет два максимума, соответствующих проявлению активности мономерной и олигомерной формами фермента. Установлено, что добавление НПАВ различной природы к Аэрозолю ОТ в октане приводит к изменению каталитических свойств фермента, в частности к его активации в присутствии Плуороника L61. Созданы и охарактеризованы наноэмульсии из нетоксичных НПАВ и органических растворителей, лецитина и Твина в эвкалиптовом масле; методом фотон-корреляционной спектроскопии показано, что размеры частиц таких наноэмульсий находятся в диапазоне от 34 до 266 нм в зависимости от содержания воды, природы и концентрации компонентов системы, а значения коэффициента формы лежат в интервале 20–30, что предполагает наличие частиц палочкообразной формы. Важно отметить, что в таких системах, пригодных для использования в медицине и косметологии, обнаружена активность папаина.

**Ключевые слова:** папаин, обращенные мицеллы, микроэмульсии, наноэмульсии, АОТ, НПАВ, лецитин, эвкалиптовое масло.

**Список сокращений:** PypPheAlaPNa – паранитроанилин пироглутамил-фенилаланил-аланина; АОТ, Аэрозоль ОТ – натриевая соль ди-(2-этил)-гексилового эфира сульфоянтарной кислоты;  $w_0$  – степень гидратации; ДМСО – диметилсульфоксид; ЭДТА – этилендиаминтетраацетат; ДТТ – дитиотреитол;  $V$  – скорость ферментативной реакции, отн.ед./мин;  $K_{ин}$  – константа инактивации, мин<sup>-1</sup>;  $V_{макс}$  – максимальная скорость реакции, отн. ед./мин;  $K_M$  – константа Михаэлиса, мМ;  $V_{из}$  – скорость реакции в изолированной мицелле, отн. ед./мин.

### Введение

Папаин (КФ 3.4.22.2) – один из протеолитических ферментов, относящихся к классу гидролаз и подклассу цистеиновых протеаз (гидролиз белков, пептидов, амидов, сложных эфиров). Его молекула состоит из одной полипептидной цепи, содержит 212 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 23,5 кДа. Интерес к этому ферменту в последние годы связан с возможностями его использования в медицине (подавление воспалительных процессов) и косметологии (компонент средств для депиляции) [1].

Включение ферментов в обратные наноэмульсии (микроэмульсии, обращенные мицеллы) типа вода–масло является одним из эффективных способов регуляции каталитической эффективности и стабильности биокатализаторов [2–4]. Литературных данных о

функционировании папаина в мицеллярных системах немного. Авторы работ [1, 5] исследовали гидролиз пара-нитроанилина N- $\alpha$ -бензоил-L-аргинина, катализируемый папаином в обращенных мицеллах АОТ в октане, а также влияние добавок неионогенных ПАВ (Твин 20 и Твин 80) на этот процесс. Однако изучению оптимальных условий (концентрация ПАВ, степень гидратации, рН, состав буфера), при которых проявляется каталитическая активность папаина, в этих работах уделено мало внимания.

Цель данной работы – выявить оптимальные условия функционирования папаина в системах обращенных мицелл ПАВ различной природы, в частности при модификации обращенных мицелл ионогенного АОТ в октане молекулами неионогенного ПАВ (НПАВ). В качестве исходной мы выбрали хорошо изученную тройную систему АОТ–вода–октан, по-

сколькo она имеет обширную область существования обращенных мицелл (обратных микроэмульсий) с узким распределением частиц по размерам [6, 7], что позволяет четко определить оптимальные условия функционирования различных ферментов, как мономерных, так и олигомерных [8–10]. Кроме того, описаны примеры использования АОТ для медицинских целей, например, в работе [11] изучено включение антибиотиков тетрациклина и доксорубина в обращенные мицеллы, построенные из молекул АОТ.

## Экспериментальная часть

### Материалы

Для приготовления растворов обращенных мицелл (наноэмульсий) использовали АОТ (“Sigma”, США) без дополнительной очистки; *n*-октан, “ч.д.а.” (“Реахим”, Россия); НПАВ (Плюроники L61, L101, F108, L64, Бриджи 30, 52, 96, Спаны 20, 65 – все фирмы “Serva”), лецитин (ООО “Протеин”, Россия), Твин 80 и Твин 20 (“Ферак”, США), эвкалиптовое масло (“Мосхимфармпрепараты”, Россия).

Папаин (“Sigma”, США) растворяли в водном буферном растворе, содержащем фосфат натрия, “ос.ч.” (“Реахим”, Россия); ЭДТА и ДТТ (“Sigma”, США).

Субстрат PypPheAlaPNa был синтезирован по методике [12]; в работе использовали его раствор в диметилсульфоксиде, ДМСО (“Sigma”, США). Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду.

### Приготовление растворов

Для приготовления раствора 0,1 М АОТ в октане к 100 мл октана добавляли 4,46 г Аэрозоля ОТ. Полученный раствор перемешивали не менее 12 ч при комнатной температуре до полного растворения ПАВ. Для приготовления раствора 0,1 М АОТ/0,6% Плюроника L61 в октане к 100 мл 0,1 М АОТ добавляли 1,2 г Плюроника L61. Полученную смесь перемешивали не менее 12 ч при комнатной температуре до полного растворения ПАВ. Для приготовления раствора фермента к 1 мл буфера, содержащего 20 мМ фосфата натрия, 0,1–5,0 мМ ЭДТА (этилендиаминтетраацетата), 3–10 мМ ДТТ (дитиотреитола), добавляли 5 мг папаина. Для приготовления раствора субстрата 7,8 мг PypPheAlaPNa растворяли в 1 мл ДМСО.

Для включения фермента в обращенные мицеллы с заданной степенью гидратации ( $w_0 = [H_2O]/[ПАВ]$ ) к

1 мл мицеллярного 0,05–0,30 М раствора АОТ в октане добавляли 10–200 мкл водного буферного раствора (рН 7,5), содержащего 20 мМ фосфата натрия и переменные количества ЭДТА и ДТТ. Полученную смесь энергично встряхивали до образования гомогенного оптически прозрачного раствора. Затем добавляли раствор фермента (5 мкл, 5 мг/мл) в том же буфере и снова встряхивали до образования гомогенного оптически прозрачного раствора. Для определения каталитической активности фермента, включенного в обращенные мицеллы, добавляли рассчитанное количество раствора субстрата в ДМСО (2 мкл, 0,1 М), встряхивали, следя за тем, чтобы раствор оставался прозрачным.

### Спектрофотометрические измерения

Ход реакции контролировали спектрофотометрически, используя спектрофотометр “Ultraspec 2100” с термостатируемым кюветным отделением, при 25°C. За реакцией гидролиза следили по накоплению продукта реакции (*пара*-нитроанилина) при длине волны поглощения  $\lambda = 400$  нм в кварцевой кювете объемом 1 мл и длиной оптического пути 10 мм.

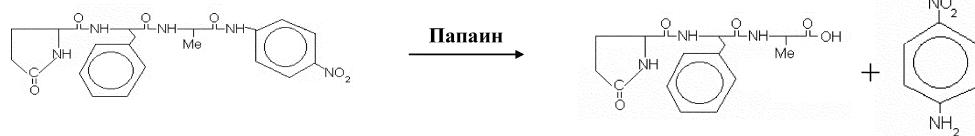
### Определение размеров частиц

Для определения размеров частиц в обратных микроэмульсиях применяли метод динамического рассеяния света. Измерения проводили в неполяризованном свете с помощью фотонного корреляционного спектрометра, состоящего из He–Ne-лазера с длиной волны падающего излучения 632,8 нм, гониометра, 72-канального коррелометра “ФотоКорр-М” и компьютера. Использовали цилиндрические кварцевые кюветы с внутренним диаметром 1 см и объемом 5 см<sup>3</sup>. Образцы очищали от пыли, пропуская через фильтры фирмы “Millipore” (0,45 мкм) непосредственно в измерительную кювету.

Угол рассеяния при измерении составлял 90°. Анализ автокорреляционной функции флуктуации интенсивности производили методом кумулянтов [13] и регуляризации [14]. Значения среднего гидродинамического радиуса частиц вычисляли по уравнению Стокса–Эйнштейна [15]

$$R_h = kT/6D_0\pi\eta, \quad (1)$$

где  $\eta$  – вязкость растворителя,  $D_0$  – коэффициент диффузии рассеивающих частиц,  $k$  – постоянная Больцмана.



### Измерение вязкости

Для измерения вязкости и определения формы частиц обращенных мицелл использовали капиллярный вискозиметр ВПЖ-24. Коэффициент формы частиц рассчитывали по уравнению Эйнштейна [15]

$$(\eta_0 - \eta)/\eta_0 = \kappa \varphi, \quad (2)$$

где  $\eta$  – вязкость раствора,  $\eta_0$  – вязкость растворителя,  $\kappa$  – коэффициент формы,  $\varphi$  – объемная доля частиц дисперсной фазы.

### Результаты и их обсуждение

Гидролиз PypPheAlaPNa, катализируемый папаином, представлен на схеме. Следует отметить, что катализ многими ферментами в обращенных мицеллах АОТ в октане подчиняется схеме Михаэлиса–Ментен [16]: зависимость скорости реакции от концентрации фермента ( $E_0$ ) при  $S_0 \gg E_0$  имеет линейный вид, а от концентрации субстрата ( $S_0$ ) – вид кривой с насыщением в соответствии с гиперболическим видом уравнения:

$$V = V_{\text{макс}} S/(S + K_M), \quad (3)$$

где  $V_{\text{макс}}$  – максимальная скорость реакции, равная  $k_{\text{кат}} \cdot E_0$ ;  $k_{\text{кат}}$  – число оборотов фермента, т.е. число молекул субстрата, превращаемых реакционным центром молекулы фермента в единицу времени,  $E_0$  – концентрация фермента,  $K_M$  – константа Михаэлиса;  $S$  – концентрация субстрата.

Катализ папаином в обращенных мицеллах 0,1 М АОТ в октане подчиняется тем же закономерностям. Нами выявлена линейная зависимость начальной скорости реакции гидролиза PypPheAlaPNa от концентрации фермента и зависимость с насыщением от концентрации субстрата.

Зависимость каталитической активности ( $V/[E]$ , где  $V$  – скорость химической реакции при данной концентрации фермента,  $[E]$  – концентрация фермента) папаина от степени гидратации ПАВ ( $w_0$ ) для обращенных мицелл 0,1 М АОТ в октане приведена на рис. 1. На рисунке показано, что данная зависимость

характеризуется наличием двух оптимумов каталитической активности: при  $w_0 = 13$  и  $w_0 = 25$ . Первый из них отвечает тому случаю, когда размер внутренней полости мицеллы практически равен размеру молекулы фермента, что обеспечивает поддержание активной конформации молекулы папаина (принцип геометрического соответствия) [8]. Изменяя степень гидратации ПАВ, можно варьировать в широком диапазоне размеры внутренней полости обращенных мицелл. Это означает, что если белок (фермент) имеет тенденцию к образованию надмолекулярных ассоциатов и способен функционировать в виде таких ассоциатов, то их образование и функционирование будет отмечаться появлением дополнительных оптимумов на зависимости каталитической активности фермента от степени гидратации [8–9, 16–17]. На основании уравнений

$$r_B = 0,7 \sqrt[3]{M} \quad [8, 16], \quad (4)$$

$$r_M = 1,5 w_0 + 4 \quad [6, 7], \quad (5)$$

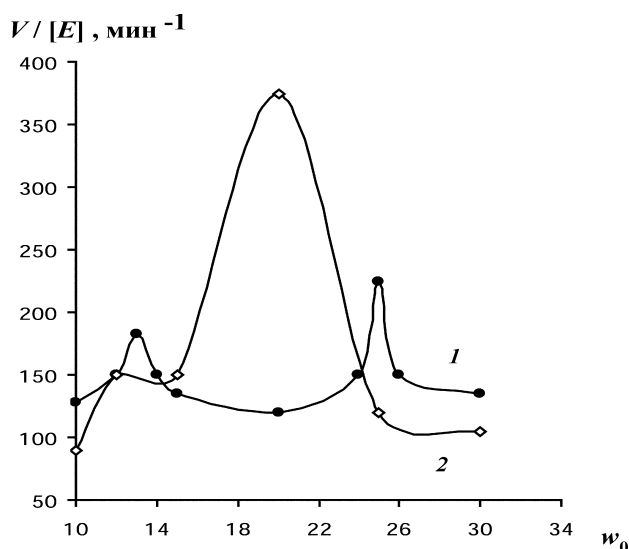


Рис. 1. Зависимость каталитической активности папаина от степени гидратации ПАВ: 1 – 0,1 М АОТ в октане; 2 – 0,1 М АОТ/0,6% Пльороника L61 в октане. Концентрация фермента в кювете  $1 \times 10^{-6}$  М, субстрата –  $2 \times 10^{-4}$  М

где  $r_B$  и  $r_M$  – радиусы молекулы белка и внутренней полости мицеллы (нм или Å),  $M$  – молекулярная масса белка (кДа),  $w_0$  – степень гидратации, можно заключить, что  $r_B$  белка с молекулярной массой 23,5 кДа будет равен 20 Å, мицелла с таким радиусом создается при степени гидратации, равной 11. При  $w_0 = 24$  радиус внутренней полости мицеллы увеличится до 40 Å, т.е. можно предположить, что появление второго оптимума на кривой зависимости каталитической активности папаина от степени гидратации отражает функционирование фермента в виде димера. Более точную информацию об олигомерном составе фермента, функционирующего при степени гидратации 25, можно будет получить по данным скоростной седиментации [9–10, 16].

Для выяснения влияния добавок НПАВ на каталитическую активность папаина к раствору 0,1 М АОТ в октане добавляли от 0,1 до 10% (от молярной концентрации) НПАВ (Плюроники L61, L101, F108, L64, Бриджи 30, 52, 96, Спаны 20, 65, экспериментальные данные не приведены). Эти неионогенные ПАВ нетоксичны и биоразлагаемы, поэтому могут быть использованы в препаратах медицинского и косметического назначения. Модифицируя ими систему АОТ–вода–октан, мы как бы «приближаем» состав данных микроэмульсий к составу препаратов, используемых на практике. Увеличение активности папаина наблюдалось только при использовании Плюроника L61 (рис. 1), причем наибольший эффект достигался при содержании данного НПАВ 0,6% по молям. Поэтому именно эту систему мы выбрали в качестве объекта для изучения каталитических свойств папаина и их сравнения со свойствами данного фермента в обращенных мицеллах индивидуального АОТ в октане.

Сразу же следует заметить, что при добавлении 0,6% Плюроника L61 к 0,1 М АОТ в октане зависимость активности фермента от степени гидратации имеет колоколообразный вид с одним максимумом при  $w_0 = 20$  (это может быть связано с тем, что данная система характеризуется более широким, чем АОТ, распределением частиц по размерам).

При изучении зависимости активности фермента от pH было установлено, что оптимальным является значение pH 7,5. Это относится как к обращенным мицеллам АОТ в октане ( $w_0 = 13$  и  $w_0 = 25$ ), так и к мицеллам АОТ/0,6% Плюроника L61 ( $w_0 = 20$ ). Следует отметить, что авторы работ [1, 5] получили такую же величину оптимального значения pH. Поскольку тиольная группа имеет высокую способность к окислению, реакции с участием папаина проводят в присутствии активаторов тиол-дисульфидного обмена. В роли активаторов могут выступать различные низкомолекулярные тиолы, цианиды и ряд других веществ, обладающих свойствами восстановителей, например цистеин, глутатион, тиогликолевая кислота, тиосульфат и боргидрид натрия [18–19].

Для получения максимальной активности папаина необходимо одновременное присутствие не только восстановителя, но и веществ, способных связывать ионы металлов [19]. Это можно объяснить тем, что тиольная группа цистеина в активном центре фермента является эффективным комплексообразователем ионов металлов, примеси которых могут попасть в раствор фермента с компонентами буфера и будут способствовать инактивации фермента. В качестве хелатирующего соединения часто используется ЭДТА.

В данной работе в качестве активаторов мы взяли ДТТ и ЭДТА. С целью выявления оптимальных условий функционирования данного фермента в системе

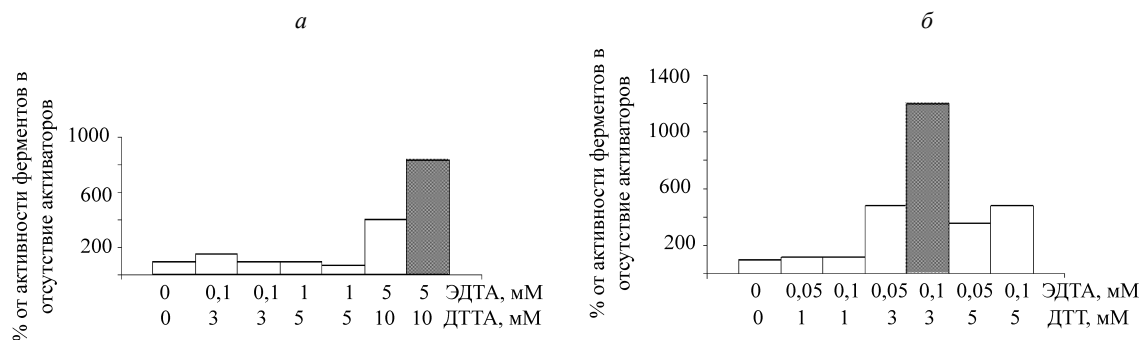


Рис. 2. Зависимость активности папаина от концентрации ЭДТА и ДТТ в буферном растворе, содержащем фермент (помимо этих компонентов буфер содержал 20 мМ фосфата натрия, pH 7,5): а – в 0,1 М АОТ в октане при  $w_0 = 25$ ; б – в 0,1 М АОТ/0,6% Плюроника L61 в октане при  $w_0 = 20$ . Концентрация фермента в кювете –  $1 \times 10^{-6}$  М, субстрата –  $2 \times 10^{-4}$  М

обращенных мицелл 0,1 М АОТ в октане концентрации активаторов в водной фазе варьировались в широких пределах: от 0,1 до 5,0 мМ (ЭДТА) и от 1 до 10 мМ (ДТТ). Дальнейшее увеличение концентраций ЭДТА (больше 5 мМ) и ДТТ (больше 10 мМ) невозможно, так как образуются мутные растворы. Как показано на рис. 2, а, каталитическая активность папаина в обращенных мицеллах АОТ пропорциональна концентрации активаторов. По-видимому, это связано с тем, что подобные соединения расходуется также на окисление различных примесей, содержащихся в ПАВ.

Иная картина наблюдается в системе АОТ/0,6% Плуороника L61 в октане: здесь оптимум каталитической активности наблюдается при достаточно низких концентрациях активаторов 0,1 мМ ЭДТА и 3 мМ ДТТ (рис. 2, б) при прочих равных условиях. Это связано с тем, что мицеллы с НПАВ менее устойчивы к разрушающему действию на них этилендиаминтетраацетата и дитиотреитола. В связи с этим для сравнения свойств папаина в мицеллах АОТ и в мицеллах АОТ/0,6 % Плуороника L61 в октане был подобран следующий состав добавляе-

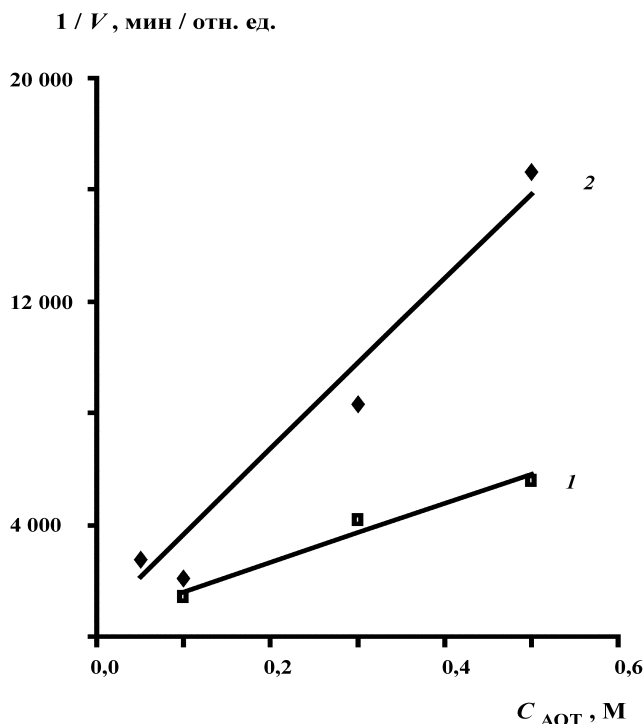


Рис. 3. Зависимость каталитической активности папаина от концентрации ПАВ (экстраполяция к активности фермента в изолированной мицелле) при постоянной (оптимальной) степени гидратации: 1 – АОТ в октане ( $w_0 = 13$ ), 2 – АОТ/0,6% Плуороника L61 в октане ( $w_0 = 20$ ). Концентрация фермента в кювете  $1 \times 10^{-6}$  М, субстрата –  $2 \times 10^{-4}$  М

Таблица 1

**Кинетические параметры в оптимумах каталитической активности папаина, экстраполированные к одной изолированной мицелле, и термодинамические значения констант инактивации для различных систем. Концентрация фермента в кювете  $1 \times 10^{-6}$  М, субстрата –  $2 \times 10^{-4}$  М**

Система	$w_0$	$V_{из}$ , отн. ед./мин	$V_{из}/[E]$ , мин <sup>-1</sup>	$K_{ин}$ , мин <sup>-1</sup>
0,1 М АОТ в октане	13	$2 \times 10^{-3}$	500	$1,2 \times 10^{-2}$
	25	$2,3 \times 10^{-3}$	575	$7 \times 10^{-3}$
М АОТ/0,6% Плуороника L61 в октане	20	$1,7 \times 10^{-3}$	425	$1 \times 10^{-1}$

мого буфера: 20 мМ фосфат; 0,1 мМ ЭДТА; 3 мМ ДТТ при pH 7,5.

Варьирование концентрации ПАВ при постоянной степени гидратации приводит к изменению концентрации мицелл в системе, размеры мицелл при этом не меняются. При концентрации ПАВ, стремящейся к нулю, мы получаем “истинную” активность фермента, проявляемую им в единственной мицелле. Зависимость активности фермента от концентрации ПАВ является тестом на мембраноактивность фермента. Активность мембранонезависимых ферментов не зависит и от концентрации ПАВ [16].

Если построить зависимость обратной скорости реакции гидролиза пептида, катализируемого папаином, от концентрации ПАВ, то можно получить скорость реакции в одной изолированной мицелле ( $V_{из}$ )

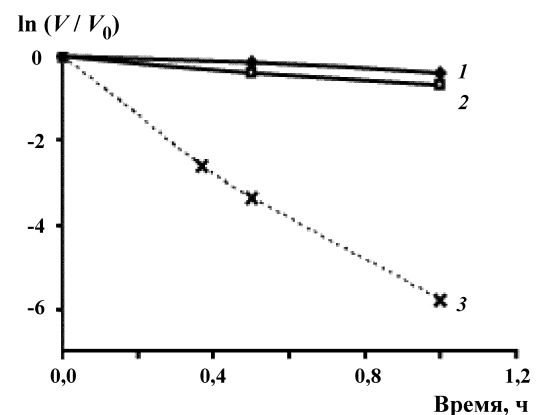


Рис. 4. Зависимость остаточной активности папаина при его инкубации в системах: 1 – 0,1 М АОТ в октане,  $w_0 = 25$ , 2 – 0,1 М АОТ в октане ( $w_0 = 13$ ), 3 – 0,1 М АОТ/0,6% Плуороника L61 в октане ( $w_0 = 25$ ). Концентрация фермента в кювете  $1 \times 10^{-6}$  М, субстрата –  $2 \times 10^{-4}$  М

по отрезку, отсекаемому на оси ординат (рис. 3). Результаты расчета кинетических параметров ( $V_{из}$  и  $V_{из}/[E]$ ) для изолированной мицеллы приведены в табл. 1. Видно, что наилучшие параметры (наибольшие значения  $V_{из}$  и  $V_{из}/[E]$ ) наблюдаются для системы АОТ–вода–октан при  $w_0 = 25$ .

Для изучения стабильности папаина в системах обращенных мицелл была построена зависимость логарифма остаточной активности фермента от времени его инкубации. Как показано на рис. 4, зависимость имеет вид прямой линии для обеих систем, что свидетельствует о том, что инактивация фермента подчиняется кинетике первого порядка, т.е. основной вклад в этот процесс вносит денатурация (и/или конформационные изменения в молекуле фермента).

Константа скорости инактивации может быть вычислена по тангенсу угла наклона зависимости. На рис. 4 видно, что добавление Плуороника L61 вносит существенный вклад в инактивацию фермента. Это связано, вероятно, с усилением мембранотропных свойств (влияние столкновений мицелл на активность и стабильность фермента).

Далее в работе была предпринята попытка получения наноэмульсий, более «близких» по составу к препаратам медицинского назначения, чем исследованные ранее Аэрозоль ОТ в октане и смесь Аэрозоль ОТ/Плуороник L61 в октане. Кроме того, ис-

следовалась активность папаина в полученных композициях.

Проведено исследование максимальной солюбилизирующей емкости систем, содержащих 1–9% лецитина и 1–4% Твина 20 (или Твина 80) в эвкалиптовом масле. Значение этой величины составило 0,5–1,5% буфера (20 мМ фосфат натрия, 0,1 мМ ЭДТА, 3 мМ ДТТ рН 7,6) в данной области концентраций лецитина и Твинов. Методом фотон-корреляционной спектроскопии установлено, что размеры частиц в таких системах меняются в пределах от 34 до 266 нм в зависимости от содержания воды, природы и концентрации компонентов системы, а значения коэффициента формы лежат в интервале 20–30. Таким образом, в данных наноэмульсиях присутствуют достаточно крупные частицы палочкообразной формы. Результаты этих исследований приведены в табл. 2. Зависимость каталитической активности папаина от содержания буферного раствора имеет колоколообразную форму с максимумом, соответствующим равенству размеров мицелл и молекул фермента (рис. 5). Значения активностей папаина в смешанных мицеллах лецитин–Твин 20 более высокие, чем в мицеллах АОТ. Диапазон концентраций субстрата, необходимых для измерений, также более широкий, что позволяет оценить такие параметры, как  $V_{макс}$  и  $K_M$  (табл. 2) Изучение стабильности фермента в

Таблица 2

**Характеристика размеров и формы смешанных мицелл лецитина и Твинов 20 и 80 в эвкалиптовом масле и кинетические параметры функционирования папаина. Концентрация фермента в кювете  $1 \times 10^{-6}$  М, субстрата –  $2 \times 10^{-4}$  М**

Содержание ПАВ	Содержание буферного раствора, %	Размер частиц, нм		Коэффициент формы	$K_M$ , мМ	$V_{макс} \times 10^3$ , отн. ед/мин
		метод кумулянтов	метод регуляризации			
Лецитин (5%)	0,5	206	266	21	0,07	24,2
Твин 20 (1,5%)	0,7	262	266	23	–	–
Лецитин (9%)	0,5	123	133	25	0,15	13,8
Твин 20 (1%)	0,7	150	133	24	–	–
Лецитин (5%)	0,5	34	67	24	–	–
Твин 80 (4%)	1	35	44	22	–	–
Твин 80 (4%)	1,5	239	266	27	–	–

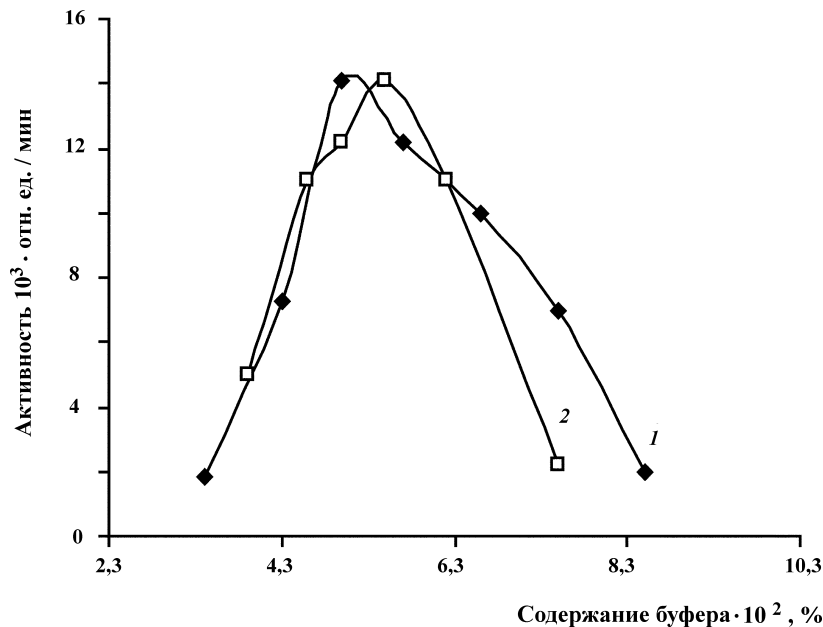


Рис. 5. Зависимость каталитической активности папаина от содержания буфера (20 мМ фосфат натрия, 0,1 мМ ЭДТА, 3мМ ДТТ, рН 7,5) в смешанных обращенных мицеллах лецитина и Твина 20 в эвкалиптовом масле: 1 – 5% лецитина, 1% Твина 20, 2 – 5% лецитина, 1,5% Твина 20. Концентрация фермента в кювете  $1 \times 10^{-6}$  М, субстрата –  $2 \times 10^{-4}$  М

данных эмульсионных композициях, выявление рН оптимумов каталитической активности папаина, выяснение влияния концентрации ПАВ на активность фермента будет являться предметом дальнейших исследований.

### Выводы

В данной работе проведено исследование влияния добавок различных НПАВ на каталитическую активность папаина в обращенных мицеллах АОТ в октане. Установлено, что добавление Плуороника

L61 увеличивает каталитическую активность данного фермента. Выявлены оптимумы функционирования и сравнены активности папаина в мицеллах 0,1 М АОТ в октане и в этой же системе, содержащей 0,6% Плуороника L61. Кроме того, получены и охарактеризованы микроэмульсионные системы, содержащие нетоксичные НПАВ (лецитин и Твины) в эвкалиптовом масле. Показано, что подобные наноэмульсии являются более благоприятной средой для ферментативного катализа, чем система АОТ–вода–октан.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vicenet L.C., Aires-Barros R., Empis J.M.A // J. Chem. Technol. Biotechnol. 1994. **60**. P. 291.
- Klyachko N.L., Levashov A.V. // Curr. Opin. Colloid Int. Sci. 2003. **8**. P. 179.
- Sarker D.K. // Curr. Drug Deliv. 2005. **2**. P. 319.
- Biasutti M.A., Abuin E.B., Silber J.J., Correa N.M., Lissi E.A. // Adv. Colloid Interface Sci. 2008. **136** (1-2). P. 1.
- Fan Ke-Ke, Ouyang Pingkai, Wu Xijun, Lu Zuhong // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2001. **76**. P. 27.
- Eicke H.-F., Rehak J. // Helvetica Chim. Acta. 1976. **59**. P. 2883.
- Kohling R., Woenckhaus J., Klyachko N.L., Winter R. // Langmuir. 2002. **18**. P. 8626.
- Клячко Н.Л., Пшежецкий А.В., Кабанов А.В., Вакула С.В., Мартинек К., Левашов А.В. // Биол. мембраны. 1990. **7**. С. 467.
- Kabanov A.V., Klyachko N.L., Nametkin S.N., Merker S., Zaroza A.V., Bunik V.I., Ivanov M.V., Levashov A.V. // Protein Eng. 1991. **4**. P. 1009.
- Klyachko N.L., Shchedrina V.A., Efimov A.V., Kazakov S.V., Gazaryan I.G., Kristal B.S., Brown A.M. // J. Biol. Chem. **280**. P. 16106.
- Chavanpatil M.D., Khair A., Panyam J. // Pharmaceutical Res. **24**. P. 803.
- Stepanov V.M., Rudenskaya G.N., Vasil'eva L.I., Krest'anova I.N., Khodova O.M., Bartoshevitch Y.E. // Int. J. Biochem. 1986. **18**. P. 369.
- Koppel D.E. // J. Chem. Phys. 1972. **57**. P. 4814.
- Stanley M.E. // Introduction to Phase Transition and Critical phenomena. London: Oxford University Press. 1971. P. 40.

15. Hiemenz P. // Principles of Colloid and Surface Chemistry. N.Y.; M.; Dekker. 1986. P. 86.
16. Левашиов А. В., Клячко Н. Л. // Изв. АН. Сер. хим. 2001. № 10. С. 1638.
17. Laithy E. I. // AAPS Pharm. Sci. Tech. 2003. 4. article 11. P. 567.
18. Егорова Е. М., Ревина А. А., Ростовицкова Т. Н., Киселева О. И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2001. 42. С. 322.
19. Kurganov B.I., Chebotareva N.A. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1999. 47. P. 319.

Поступила в редакцию 25.09.08

## INVESTIGATION OF ACTIVITY AND STABILITY OF PAPAIN IN DIFFERENT MICELLAR SYSTEMS

L.Yu. Filatova, Ye.S. Oxenoyt, K.S. Yakovleva, N.I. Ivanova, N.L. Klyachko

(Division of Chemical Enzymology, Division of Chemistry of Natural Compounds)

Research of hydrolysis of substrate PyrPheAlaPNa by papain in reverse micelles of Aerosol OT in octane was made. Optimal conditions of the enzyme functioning in this system were found. It was established, that in reverse micelles of AOT in octane dependence of activity of papain on hydration number had two optimums, which corresponded to activity of monomolecular and oligomeric papain. As found, addition of nonionic surfactants to Aerosol OT in octane led to change of catalytic properties of the enzyme. As applied aspect of work microemulsions consisting of nontoxic.

**Key words:** *Papain, reverse micelles, Aerosol OT, Pluronic L61, lecithin, Tween-20.*

**Сведения об авторах:** *Филатова Любовь Юрьевна* – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (*lubfil@rambler.ru*); *Яковлева Ксения Сергеевна* – студентка 5 курса химического факультета МГУ (*ksubene@yandex.ru*); *Оксенойт Елена Семеновна* – науч. сотр. лаборатории химии белка кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ, канд. хим. наук (*biorg@biorg.chem.msu.ru*); *Иванова Нина Ивановна* – доцент кафедры коллоидной химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук; *Клячко Наталья Львовна* – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (*klyachko@enzyme.chem.msu.ru*).