

Μικρογαλακτώματα II: Ένα Νέο Περιβάλλον για Ενζυμικές Μελέτες

Άρης Ξενάκης

Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, Ελλάδα

Λέξεις κλειδιά: Μικρογαλακτώματα, αντίστροφα μικύλλια, ένζυμα
Key words: Microemulsions, reverse micelles, enzymes

Δεκτή για δημοσίευση: 15 Ιανουαρίου 1990

Π ε ρ ί λ η ψ η: Το ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι μελέτες βιολογικών μορίων μέσα σε μικρογαλακτώματα πηγάζει από τη δυαδική, κατά μια έννοια, υπόσταση των συστημάτων αυτών. Από τη μια μεριά έχουμε μακρομογενή διαλύματα, γεγονός που επιτρέπει τις μελέτες δομής, ενώ από την άλλη, το βιολογικό μόριο βρίσκεται εντοπισμένο σε ένα μικροπεριβάλλον, οι ιδιότητες του οποίου διαφέρουν σημαντικά από τις ιδιότητες της κύριας μάζας του διαλύτη, πλησιάζοντας τις ιδιότητες του ενδοκυτταρικού νερού. Η ιδιαιτερότητα του μικροπεριβάλλοντος μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη διαμόρφωση του βιομορίου, επηρεάζοντας τη δραστηρότητά του. Ένζυμα εγκλωβισμένα σε αντίστροφα μικύλλια μπορεί να εμφανίσουν διαφορετικές συγγένειες ως προς ορισμένα υπο-

στρώματα, ή ακόμα και να καταλύσουν μη υδατοδιαλυτά υποστρώματα. Αυτές οι ιδιότητες των μικρομορίων μέσα στα μικρογαλακτώματα, οδηγούν σε μια σειρά βιοτεχνολογικών εφαρμογών, όπως οι βιοδιαχωρισμοί, η ενζυμικά καταλυόμενη οργανική σύνθεση, η υποκατάσταση του αίματος, η εκλεκτική μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών, η επεξεργασία λυμάτων κλπ.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε άρθρο που δημοσιεύεται στο τεύχος αυτό του περιοδικού (1) αναφέρεται ότι τα αμφίφιλα επιφανειοενεργά μπορούν να οδηγήσουν στην παρασκευή μακροσκοπικά ομογενών διαλυμάτων νερού και ελαίου.

Τα μικρογαλακτώματα αυτά, όπως γενικά ονομάζονται, ανάλογα με τις σχετικές ποσότητες των συστατικών τους, μπορούν να έχουν διαφορετικές δομές και διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τα μικρογαλακτώματα ελαίου μέσα σε νερό - ο/w - ή διογκωμένα μικύλλια και τα

μικρογαλακτώματα νερού μέσα σε έλαιο - w/o - ή αντίστροφα μικύλλια. Και στις δύο περιπτώσεις οι διαστάσεις των συσσωματωμάτων της διεσπαρμένης φάσης (που συνήθως είναι σφαιρικά σταγονίδια) μπορούν να είναι τέτοιες, ώστε να είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με ορισμένα μόρια βιολογικής σημασίας, όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, RNA ή DNA. Από τους δύο τύπους μικρογαλακτωμάτων, περισσότερες εφαρμογές στον τομέα αυτό βρίσκουν τα αντίστροφα μικύλλια, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως με στόχο (α) τη διαλυτοποίηση μη υδατοδιαλυτών υποστρωμάτων λιπολυτικών ενζύμων και (β) τη μελέτη των παγιδευμένων ενζύμων στο εσωτερικό των αντίστροφων μικυλλίων.

Η διαλυτοποίηση λιπιδικών υποστρωμάτων σε οργανικούς διαλύτες έχει απασχολήσει τους ενζυμολόγους από αρκετό καιρό. Για παράδειγμα, ο Hanahan (2) το 1952 παρατήρησε την υδρόλυση της λεκιθίνης υπό τη δράση της φωσφολιπάσης μέσα σε ένα μίγμα μεθανόλης και αιθέρα. Αργότερα αποδείχθηκε ότι το φωσφολιπίδιο (λεκιθίνη) σχημάτιζε αντίστροφα μικύλλια, που επέτρεπαν την επαφή του ενζύμου (στο υδατικό κέντρο των μικυλλίων) με το υπόστρωμα (μεμβράνη του μικυλλίου).

Η κυρίως μελέτη ενζύμων μέσα σε μικρογαλακτώματα ουσιαστικά άρχισε από το 1977, οπότε συνθετικά επιφανειοενεργά χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά για τη διαλυτοποίηση ενζύμων. Πρωτοπόροι στις μελέτες αυτές ήταν δύο ομάδες, μια ελβετική (Luisi *et al.*) και μια ρωσική (Martinek *et al.*). Ειδικότερα, οι πρώτοι (3) ανακάλυψαν ότι η α-χυμοθρυψίνη διαλυμένη μέσα σε ένα μικρογαλάκτωμα νερού σε κυκλοεξάνιο που σταθεροποιείται με ένα κατιονικό επιφανειοενεργό (βρωμιούχο Ν-οκτυλτριμεθυλαμμώνιο) είχε το ίδιο φάσμα απορρόφησης με ένα υδατικό διάλυμα του ίδιου ενζύμου. Επίσης παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε καμιά αποδιάταξη (denaturation) του ενζύμου παρόλη την παρουσία του επιφανειοενεργού.

Παράλληλα η δεύτερη ομάδα (4), ανακάλυψε ότι η α-χυμοθρυψίνη και η υπεροξειδάση διαλυμένες σε μικύλλια του ανιονικού επιφανειοενεργού AOT [δισ-(2-αιθυλεξυλ)σουλφοηλεκτρικό νά-

τριο] σε οκτάνιο ή βενζόλιο διατηρούν την καταλυτική τους δράση. Αυτό το αποτέλεσμα της διατήρησης της ενζυμικής δράσης οδήγησε και άλλα εργαστήρια στη μελέτη ενζύμων μέσα σε μικρογαλακτώματα ή γενικότερα σε οργανωμένες-δισπαρμένες φάσεις. Το ενδιαφέρον για τον τομέα αυτό συνεχώς αυξάνεται, καθώς έγινε φανερό ότι αυτά τα συστήματα είναι πρότυπα μικροετερογενή μέσα για τη διεξαγωγή ενζυμικών αντιδράσεων. Τα όρια διάκρισης των μελετών σε μεμβρανικά, λιπιδικά και κλασικά υδατικά ένζυμα αρχίζουν πλέον να εκλείπουν στη σύγχρονη ενζυμολογία.

ΔΙΑΛΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

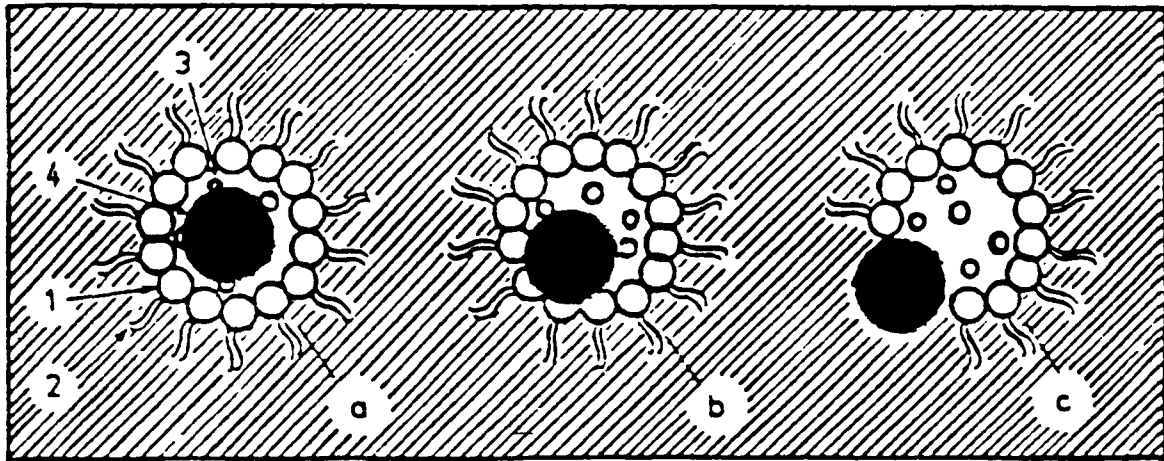
Για τη διαλυτοποίηση ενζύμων σε μικρογαλακτώματα τύπου αντίστροφων μικυλλίων αναφέρονται γενικά (5) τρεις τρόποι:

1. Προσθήκη του ενζύμου υπό στερεή μορφή σε ένα μικρογαλάκτωμα δεδομένης σύστασης και ανάδευση για τη διάλυσή του.

2. Διαδικασία μεταφοράς φάσεων, στην οποία ένα υδατικό διάλυμα του ενζύμου έρχεται σε επαφή με ένα μικρογαλάκτωμα. Το ένζυμο, έτσι, εκχυλίζεται από το υπερκείμενο μικρογαλάκτωμα και μεταφέρεται μέσα στα αντίστροφα μικύλλια.

3. Προσθήκη μιας δεδομένης ποσότητας πυκνού υδατικού διαλύματος του ενζύμου σε ένα διάλυμα επιφανειοενεργού σε οργανικό διαλύτη. Οι συγκεντρώσεις πρέπει να είναι τέτοιες ώστε να επιτυγχάνεται η επιθυμητή τελική συγκέντρωση του ενζύμου, αλλά και η επιθυμητή τελική σύσταση του μικρογαλακτώματος.

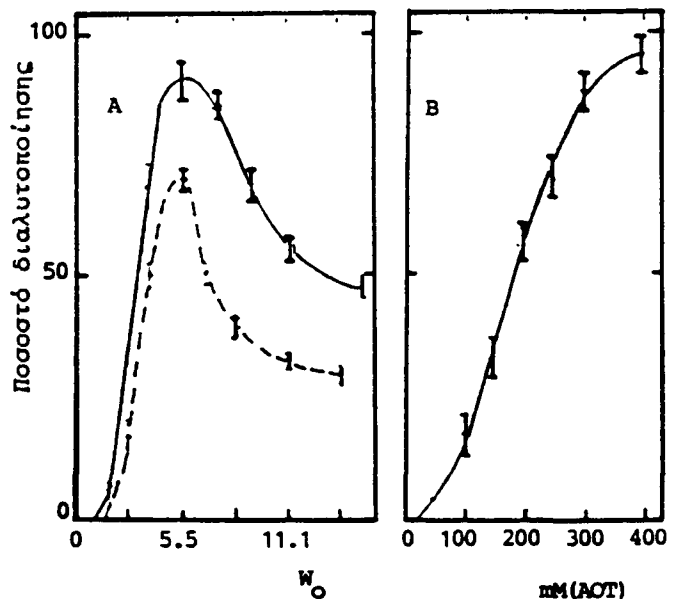
Πριν γίνει αναφορά σε ορισμένα παραδείγματα διαλυτοποίησης ενζύμων, ας εξεταστεί ο πιθανός μοριακός μηχανισμός εντοπισμού του ενζύμου μέσα στα μικροσταγονίδια. Το πρωτεϊνικό μόριο μπορεί να διαλέξει το ιδανικό, με τη θερμοδυναμική έννοια, μικροπεριβάλλον για τον εντοπισμό του ανάλογα με τη φύση του. Πράγματι ένα μόριο υδρόφιλης πρωτεΐνης μπορεί να αποφύγει μια πιθανή επαφή με τον οργανικό διαλύτη και τη μικυλλιακή μεμβράνη-μεσεπιφάνεια, εντοπιζόμενο στο υδατικό κέντρο των



Σχήμα 1. Αντίστροφα μικύλλια που περιέχουν ένα: α) υδρόφιλο, β) επιφανειοενεργό και γ) υδρόφοβο βιομόριο. (1) Πολική κεφαλή, (2) υδρόφοβη αλυσίδα της επιφανειακά ενεργής ουσίας, (3) Αντι-ιόν ή μόρια νερού, (4) βιομόριο (ένζυμο) (6)

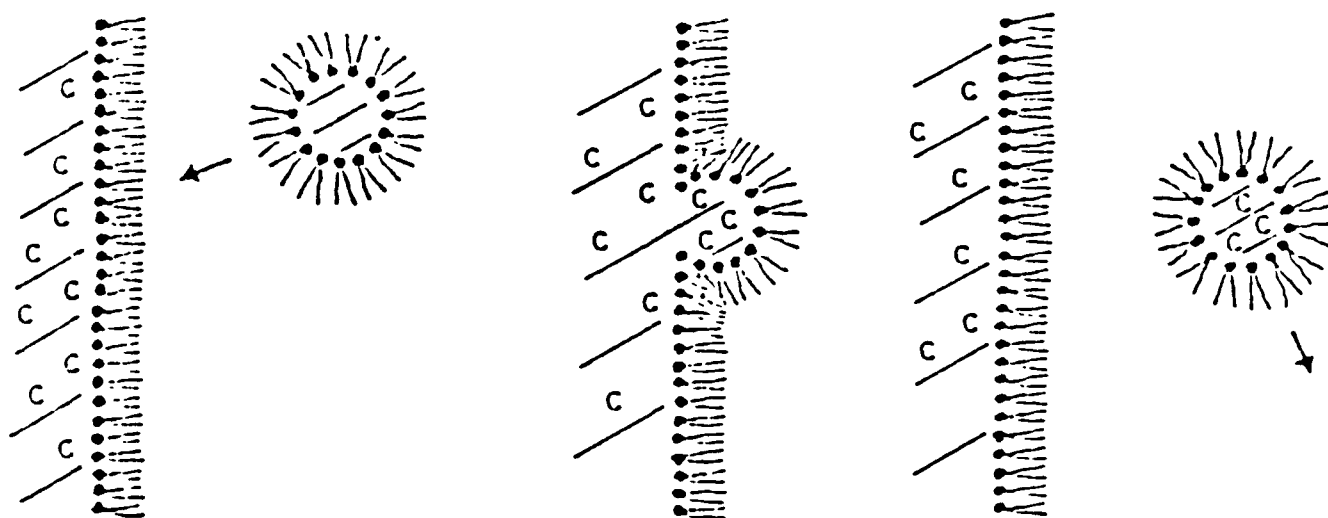
αντίστροφων μικυλλίων (σχήμα 1α) (6). Ένα άλλο ένζυμο, που το μόριό του παρουσιάζει ιδιότητες επιφανειοενεργού (π.χ. οι λιπάσες), μπορεί να αλληλεπιδρά με την επιφάνεια του μικυλλίου και να εισχωρεί μερικά μέσα σ' αυτό (σχήμα 1β). Τέλος, ένα τυπικά μεμβρανικό ένζυμο μπορεί να έρχεται σε επαφή ακόμα και με τον οργανικό διαλύτη (σχήμα 1γ).

Ένα παράδειγμα διαλυτοποίησης ενζύμου, όταν αυτό προστίθεται υπό τη στερεά του μορφή (1ος τρόπος), είναι η λιποφιλίνη (ή Folch-Pi πρωτεΐνη), που αποτελεί μέρος της μυελίνης· το ένζυμο αυτό πρακτικά είναι αδιάλυτο στο νερό. Στο σχήμα 2 (7) δίνεται η εκατοστιαία διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης σε ένα μικρογαλάκτωμα συναρτήσει του μοριακού κλάσματος w_0 ($w_0 = [H_2O]/[AOT]$) και αποτελεί χαρακτηριστικό του μεγέθους των μικροσταγονιδίων και της συγκέντρωσης του AOT, για δεδομένο λόγο w_0 . Είναι δυνατό να διαπιστωθεί ότι η μέγιστη διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται σε πολύ μικρές τιμές του w_0 , που αντιστοιχούν σε ποσοστά νερού μικρότερα του 0,5% κατ' όγκο. Για μικρότερες, όμως, τιμές του w_0 , το νερό, το οποίο περιέχεται σε αντίστροφα μικύλλια, είναι δεσμευμένο με την πολική εσωτερική επιφάνεια, που σχηματίζουν τα μόρια του AOT (1). Επειδή η ολική ποσότητά του είναι μικρή, δεν υπάρχει



Σχήμα 2. Διαλυτοποίηση του πρωτεολιπιδίου Folch-Pi σε αντίστροφα μικύλλια AOT/Ισοοκτανίου/Νερού. Η ολική συγκέντρωση είναι 20 μM. Α) Εξάρτηση από το w_0 για συγκεντρώσεις [AOT] = 300 και 200 μM. Β) Εξάρτηση από τη συγκέντρωση του AOT για $w_0 = 5.56$ (7)

ουσιαστικά ελεύθερο νερό στο κέντρο των μικυλλίων. Διαπιστώνεται, λοιπόν, ότι το λίγο νερό που περιέχεται στα μικρογαλακτώματα αυτού του τύπου έχει αυξημένες διαλυτικές



Σχήμα 3. Μηχανισμός διαλυτοποίησης με τη μέθοδο της υγρής εκχύλισης (5)

ικανότητες απ' ό,τι ένα κανονικό υδατικό διάλυμα.

Να επισημανθεί εδώ ότι οι συγκεντρώσεις του ενζύμου έχουν δοθεί σαν ολικές συγκεντρώσεις. Αν θεωρηθεί η τοπική (ή ενδομικυλλιακή) συγκέντρωση, αυτή για μια τιμή του $w_0 = 5$ πολλαπλασιάζεται με ένα παράγοντα 200. Για ουσίες διαλυτές μόνο στην υδατική φάση, οι δύο συγκεντρώσεις θα συνδέονται με τη σχέση: $c_{ολ} = F_w \cdot c_{wp}$, όπου $c_{ολ}$ η ολική συγκέντρωση, c_{wp} η τοπική (water pool) και F_w ο μερικός όγκος του νερού. Έχει παρατηρηθεί για τη λυσοζύμη, π.χ., ότι η τοπική συγκέντρωση c_{wp} είναι μεγαλύτερη από τη διαλυτότητα του ενζύμου αυτού στο νερό. Στη δεδομένη περίπτωση έχει υπολογισθεί (5) ότι, για μια συγκέντρωση AOT 50 mM η συγκέντρωση των μικυλλίων είναι 0,43 mM και η ολική συγκέντρωση του ενζύμου μετά την εκχύλιση από τη στερεή κατάσταση για $w_0=5$ είναι $c_{ολ}=0,10$ mM. Αυτό σημαίνει ότι το 23% των μικυλλίων περιέχουν από ένα μόριο λυσοζύμης και ότι η τοπική της συγκέντρωση, c_{wp} , είναι 0,022 M.

Σύμφωνα με το δεύτερο τρόπο διαλυτοποίησης ενζύμων σε μικρογαλακτώματα, ένα υδατικό διάλυμα του συγκεκριμένου ενζύμου αφήνεται σε

επαφή με ένα διάλυμα AOT σε οργανικό διαλύτη (π.χ. ισοοκτάνιο). Το υπερκείμενο οργανικό διάλυμα, που αρχικά δεν περιέχει νερό (δεν υπάρχουν δηλαδή ακόμα σχηματισμένα αντίστροφα μικύλλια), εκχυλίζει το ένζυμο και συγχρόνως ενσωματώνει και μια ποσότητα νερού.

Στην τελική ισορροπία, τα μικύλλια που σχηματίζονται περιέχουν στο κέντρο τους το εκχυλισμένο ένζυμο. Οι δύο φάσεις κατά τη διάρκεια της εκχύλισης αναδεύονται ελαφρά, χωρίς να διαταράσσεται η μεσεπιφάνειά τους, που πιθανόν να είχε σαν αποτέλεσμα την καταστροφή του μικρογαλακτώματος. Στο σχήμα 3 (5) παρουσιάζεται ένας πιθανός μηχανισμός διαλυτοποίησης με τη μέθοδο της μεταφοράς. Σύμφωνα με αυτόν, το μικύλλιο πλησιάζει τη μεσεπιφάνεια διαχωρισμού της υδατικής από την οργανική φάση, στην οποία βρίσκεται μια μονοστιβάδα από επιφανειοενεργά. Στο σημείο αυτό το μικύλλιο μπορεί να ενσωματωθεί μερικώς με τη μεμβράνη ανοίγοντας κατά κάποιο τρόπο ένα διάδρομο, από τον οποίο το ένζυμο θα μπει στο εσωτερικό του μικυλλίου. Τέλος, το μικύλλιο επανέρχεται στο κυρίως σώμα του οργανικού διαλύτη. Η θερμοδυναμική της διεργασίας αυτής δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί τελείως, φαίνε-

ται, όμως, ότι το σύστημα αυθόρμητα οδηγείται προς την ενσωμάτωση της διαλελυμένης ουσίας, λόγω της αύξησης της εντροπίας, στο εσωτερικό του μικυλλίου. Αυτή η αύξηση οφείλεται στην αποδιοργάνωση της δομής του νερού, που προκαλείται από την αραίωση. Η χρησιμοποίηση της μεθόδου αυτής περιορίζεται σε ορισμένες μόνο δυνατές συγκεντρώσεις ενζύμου μέσα σε μικύλλια και για δεδομένη ποσότητα διεσπαρμένου νερού. Πέρα από το μειονέκτημα της μεγάλης σχετικά χρονικής διαδικασίας υπάρχει και ο κίνδυνος να μη σχηματισθεί ένα διαυγές διάλυμα μικυλλίων θερμοδυναμικά σταθερό.

Τέλος αναφέρεται η τρίτη μέθοδος διαλυτοποίησης ενζύμων σε μικρογαλακτώματα, η μέθοδος δηλαδή του σχηματισμού του μικρογαλακτώματος με σύγχρονη διαλυτοποίηση των ενζύμων. Συγκεκριμένα σε ένα διάλυμα του επιφανειοενεργού μέσα σε οργανικό διαλύτη προστίθενται λίγα μικρόλιτρα από ένα πυκνό υδατικό διάλυμα του βιομορίου. Το μίγμα που προκύπτει είναι στην αρχή θολό, μετά όμως από λίγο χρονικό διάστημα (1 λεπτό περίπου) γίνεται διαυγές. Για τη μικρογαλακτωματοποίηση αυτή αρκεί μια ελαφριά ανάδευση χωρίς να είναι ανάγκη να προστεθεί οποιασδήποτε μορφής ενέργεια (μηχανική - θερμότητα).

Η μέθοδος αυτή είναι και η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη για την παρασκευή μικρογαλακτωμάτων, τα οποία περιέχουν βιοπολυμερή. Για ορισμένα μάλιστα βιολογικά μόρια, όπως π.χ. υψηλού μοριακού βάρους DNA αυτή είναι η μοναδική μέθοδος που επιτρέπει τη διαλυτοποίησή τους σε αντίστροφα μικύλλια. Στην περίπτωση αυτή το μικρογαλάκτωμα χάνει σύντομα τη σταθερότητά του (διαύγεια), πράγμα που θέτει σε αμφισβήτηση τη θερμοδυναμική του σταθερότητα.

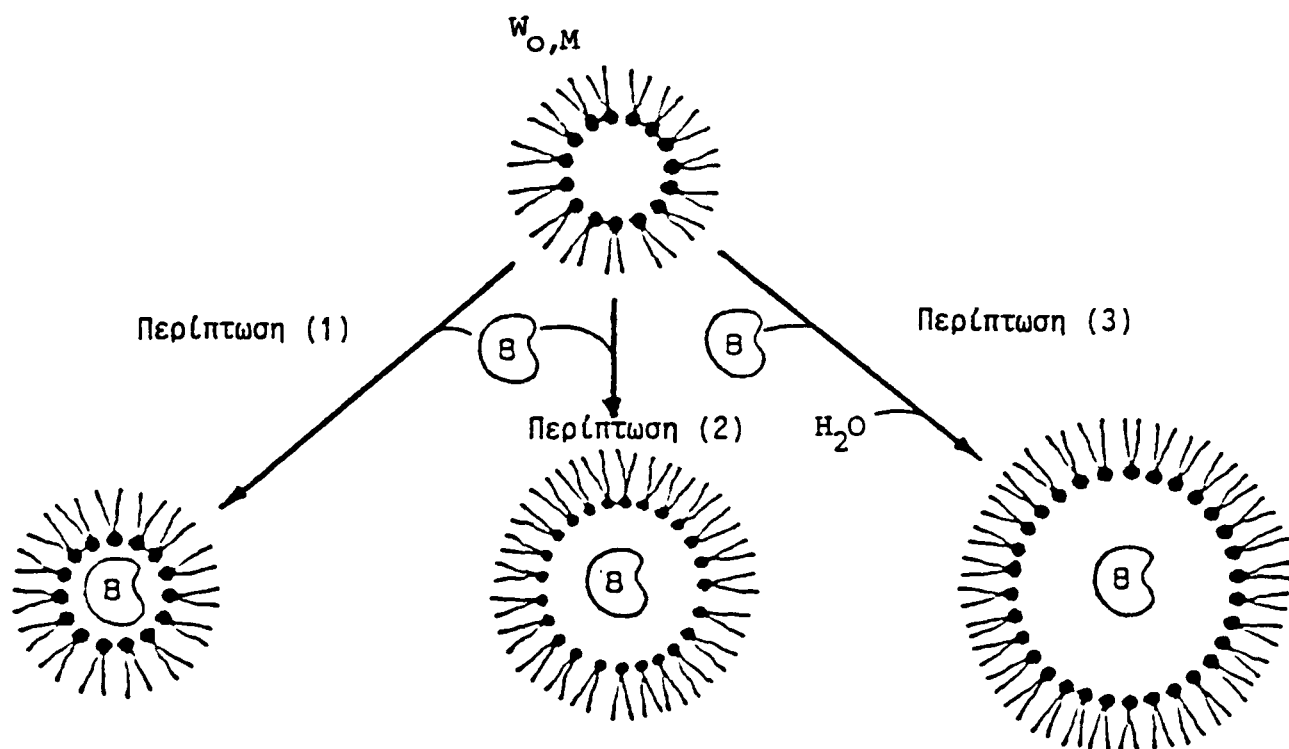
Η περίπτωση της επίδρασης της διαλελυμένης βιολογικής ουσίας στη θερμοδυναμική σταθερότητα του μικρογαλακτώματος είναι ένας παράγοντας ελάχιστα μελετημένος μέχρι σήμερα. Τις περισσότερες φορές - κυρίως για όχι πολύ μεγάλα βιομόρια - θεωρείται ότι η επίδραση αυτή είναι πολύ μικρή. Είναι, έτσι, δυνατή η επίτευξη του κατάλληλου μικρογαλακτώματος, που περιέ-

χει την επιθυμητή ποσότητα του βιομορίου, με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου μικρογαλακτώματος. Αν είναι γνωστό, δηλαδή, ότι μια δεδομένη αναλογία νερού/επιφανειοενεργού/οργανικού διαλύτη (ελαίου) δίνει ένα μονοφασικό διάλυμα (1), είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί αυτή η μέθοδος για να επιτευχθεί το κατάλληλο διάλυμα του βιομορίου. Επομένως, στην περίπτωση αυτή γίνεται δεκτό ότι η σταθερότητα του μικρογαλακτώματος δε θα διαταραχθεί από την παρουσία ενός επιπλέον συστατικού: του βιομορίου.

Οποσδήποτε η γνώση των θερμοδυναμικών παραμέτρων, που επιτρέπουν την επίτευξη των μικρογαλακτωμάτων, βοηθάει πολύ στη δεδομένη εφαρμογή και απαλλάσσει από τυχόν κινδύνους αποσταθεροποίησης του διαλύματος. Στη συνέχεια του άρθρου διερευνάται πώς επηρεάζεται η δομή των μικρογαλακτωμάτων από την παρουσία βιομορίων.

Αναφορικά με τις τυπικές συγκεντρώσεις που μπορούν να επιτευχθούν με την τρίτη μέθοδο, καθοριστικός παράγοντας είναι οπωσδήποτε η διαλυτότητα του βιολογικού μορίου στο υδατικό αρχικό διάλυμα (stock), το οποίο θα προστεθεί στον οργανικό διαλύτη. Για παράδειγμα (5), στην περίπτωση της λυσοζύμης μπορεί να παρασκευαστεί αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης μέχρι 20 mg/ml που αντιστοιχεί σε 1,4 mM. Στο μικρογαλάκτωμα τώρα η φαινόμενη συγκέντρωση (ολική συγκέντρωση) θα είναι μικρότερη κατά τον παράγοντα αραίωσης. Έτσι για ένα διάλυμα 50 mM AOT και με το γραμμομοριακό λόγο $w_0=10$, η συγκέντρωση θα είναι 0,0127 mM. Επειδή, όμως, η λυσοζύμη βρίσκεται στην υδατική μικροφάση (στο κέντρο των μικυλλίων), η υδάτινη τοπική συγκέντρωσή της θα ισούται προφανώς με την αρχική, πριν το σχηματισμό του μικρογαλακτώματος, δηλαδή 1,4 mM. Στη δεδομένη περίπτωση του παραδείγματος αυτού μόνο το 4% των μικυλλίων θα περιέχουν πρωτεΐνη.

Γενικότερα, αν οι διαστάσεις των μικυλλίων είναι μεγαλύτερες από τις διαστάσεις της προς διάλυση πρωτεΐνης, σε μικρές συγκεντρώσεις αυτής υπάρχει στοιχειομετρική αντιστοιχία με τα μικύλλια 1 προς 1 και μια περίσσεια άδειων



Σχήμα 4. Πιθανές μεταβολές της δομής του μικυλλίου από την ενσωμάτωση του βιομορίου (5)

μικυλλίων. Αυτό ισχύει ανεξάρτητα από τον τρόπο παρασκευής του μικρογαλακτώματος με την πρωτεΐνη.

ΔΟΜΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

Ο εντοπισμός βιολογικών μορίων σε μικρογαλακτώματα έχει πιθανότατα επιπτώσεις στη δομή τόσο των μικυλλίων όσο και του ίδιου του βιομορίου. Ορισμένα από τα ερωτήματα που προκύπτουν σχετικά με τη δομή των συστημάτων αυτών είναι.

Σε ποιο σημείο ακριβώς του υδατικού κέντρου (water-pool) των μικυλλίων βρίσκεται το βιομόριο; Ποια η σχέση της θέσης αυτής με τις υδρόφιλες/λιπόφιλες ιδιότητες και το φορτίο του βιομορίου; Τα μικύλλια είναι πάντα σφαίρες; Μήπως τα βιομόρια προκαλούν συνένωση μικυλλίων προς μεγαλύτερα, ή κατανέμονται στα υπάρχοντα υδατικά κέντρα; Μήπως το νερό

υφίσταται μια ανακατανομή στο σύστημα, διακρίνοντας πλέον δύο τιμές του λόγου w_0 : μία για μικύλλια πλούσια σε νερό που περιέχουν βιολογικά μόρια και μία για άδεια μικύλλια με λίγο νερό;

Όσον αφορά τα υδρόφιλα βιομόρια (υδρόφιλα ένζυμα π.χ.), οι πειραματικές ενδείξεις επιβεβαιώνουν τη στοιχειομετρική αντιστοιχία βιομορίου-μικυλλίου 1 προς 1. Η δομή τους περιγράφεται ικανοποιητικά από το πρότυπο του υδατινού κελύφους (water shell model), κατά το οποίο το ένζυμο βρίσκεται μέσα στο υδατικό κέντρο του μικυλλίου, περιστοιχιζόμενοι από στιβάδες νερού (υδατικό κέλυφος), που προστατεύουν το ένζυμο από τα μόρια του επιφανειοενεργού και από τον οργανικό διαλύτη.

Υποθέτοντας, αρχικά, ότι η μορφή των μικυλλίων δεν αλλάζει από την ενσωμάτωση του βιομορίου, ο Luisi (5) κωδικοποίησε τις πιθανές μεταβολές κατά τον ακόλουθο τρόπο (σχήμα 4) (5). Ορίζοντας ένα μεταβατικό γραμμομοριακό

λόγο $w_{o,m}$, που αντιστοιχεί στο μικύλλιο εκείνο, του οποίου ο όγκος του υδατικού κέντρου του V_k μόλις υπερβαίνει τον όγκο του βιομορίου V_b , διακρίνεται ένα υποσύνολο χαμηλών τιμών w_o και ένα υποσύνολο ψηλών w_o . Οι διάφορες δυνατές διαμορφώσεις δομής χαρακτηρίζονται πλήρως αν προσδιοριστούν για κάθε «γεμάτο» μικύλλιο τα μεγέθη: ακτίνα του υδατικού κέντρου R_k , ο αριθμός των μορίων του ΑΟΤ ανά μικύλλιο ρ_{AOT} (aggregation number), ο γραμμομοριακός λόγος $w_o = [H_2O]/[AOT]$ και ο αριθμός των άδειων μικυλλίων, που απαιτούνται για το σχηματισμό ενός «γεμάτου» μικυλλίου.

Για τιμές του w_o μεγαλύτερες του $w_{o,m}$ το βιομόριο μπορεί να μπει στο υδατικό κέντρο του μικυλλίου προκαλώντας:

1. Την απομάκρυνση μορίων νερού (καταλαμβάνοντας τη θέση τους) έτσι ώστε η αρχική ακτίνα $R_{k,o}$ να ισούται με την ακτίνα του υδατικού κέντρου του μικυλλίου που περιέχει το βιομόριο (γεμάτο) $R_{k,g}$: $R_{k,o} = R_{k,g}$. Ο αριθμός ρ_{AOT} παραμένει επομένως ο ίδιος, ενώ ισχύει $w_{o,g} < w_{o,o}$, όπου τα σύμβολα ο, Γ, Α αντιστοιχούν στο αρχικό μικύλλιο, στο γεμάτο και στο άδειο τελικό μικύλλιο.

2. Τη διόγκωση του υδατικού κέντρου κατά τον όγκο του βιομορίου έτσι ώστε $R_{k,g} = (V_{k,o} + V_b)^{1/3} / (4/3\pi)^{1/3}$. Τώρα το ρ_{AOT} αυξάνει εφόσον $R_{k,g} > R_{k,o}$. Στην περίπτωση αυτή ισχύει και πάλι $w_{o,A} > w_{o,o} > w_{o,g}$.

3. Την ενσωμάτωση περισσότερων μορίων νερού έτσι ώστε $w_{o,g} > w_{o,o} > w_{o,A}$. Η περίπτωση αυτή απαιτεί την προσφορά μορίων νερού και ΑΟΤ από περισσότερα του ενός άδεια αρχικά μικύλλια.

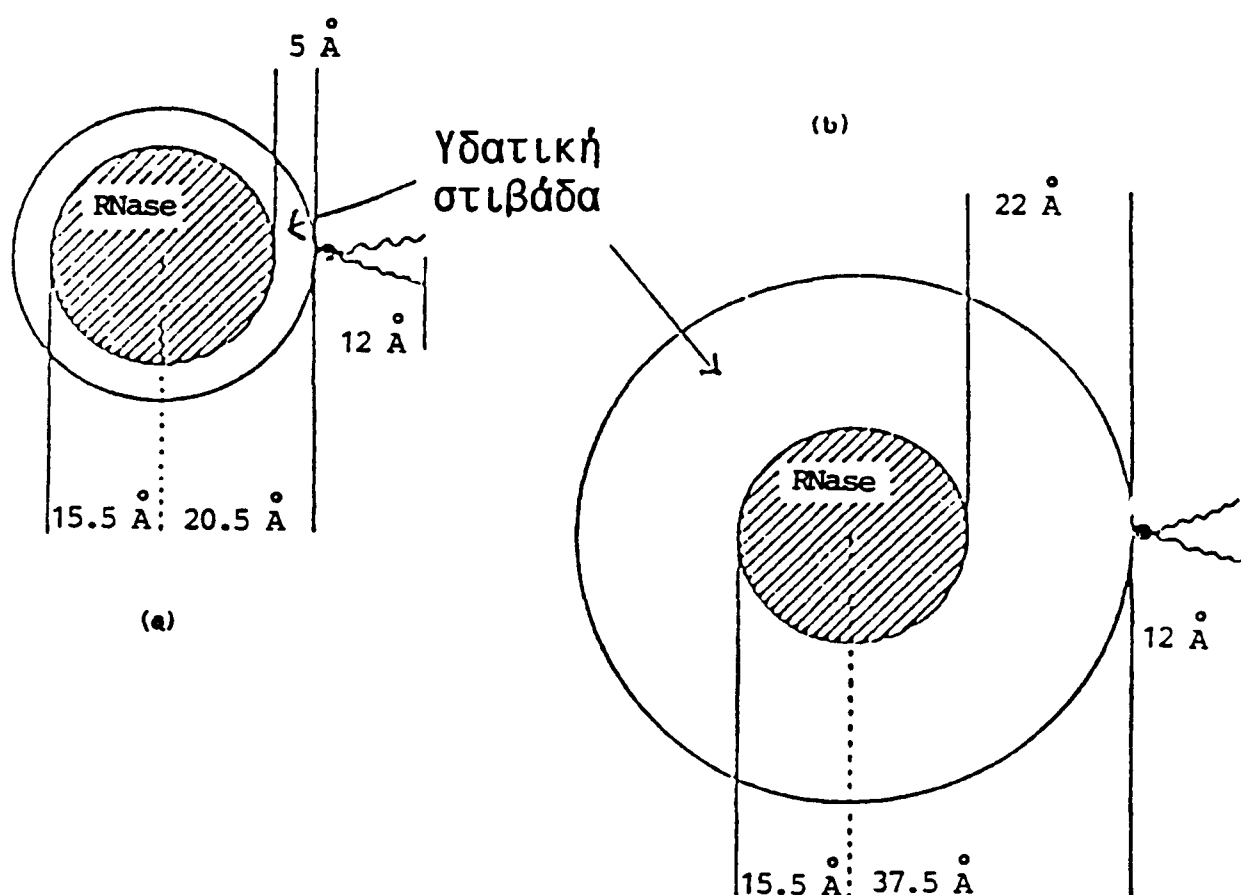
Για τιμές του w_o μικρότερες από το $w_{o,m}$ (μεγάλα βιοπολυμερή), το βιομόριο δε μπορεί να χωρέσει στο υπάρχον υδατικό κέντρο του μικυλλίου με απλή απομάκρυνση νερού (περίπτωση 1), με αποτέλεσμα να σχηματίζεται γύρω του ένα νέο μεγαλύτερο μικύλλιο. Στην περίπτωση αυτή η τρίτη εκδοχή είναι πιο πιθανή, αφού επιτρέπει τη διατήρηση του υδατικού κελύφους γύρω από το βιομόριο.

Μέχρι σήμερα δεν έχει ακόμα διατυπωθεί μια θερμοδυναμική θεωρία, η οποία να προβλέπει τις

διαστάσεις και τη δομή των αντιστρόφων μικυλλίων συναρτήσει της χημικής δομής του επιφανειοενεργού και των άλλων παραμέτρων του μικρογαλακτώματος, όπως η περιεκτικότητα σε νερό, ή η συγκέντρωση ξένων μορίων, όπως τα βιομόρια. Όλες οι μελέτες, επομένως, πάνω στη δομή και το μέγεθος των μικρογαλακτωμάτων που περιέχουν βιομόρια στηρίζονται αποκλειστικά σε πειραματικά αποτελέσματα. Οι πειραματικές αυτές μέθοδοι κάθε άλλο παρά απλές είναι όταν εφαρμόζονται στα συγκεκριμένα συστήματα. Το κύριο πρόβλημα οφείλεται στην ετερογένεια των μικυλλίων μεταξύ τους, αφού διακρίνουμε «γεμάτα» και «άδεια» με/από βιομόρια μικύλλια.

Η περίπτωση μιας κατανομής 1 βιομορίου σε κάθε 1 αρχικό μικύλλιο γενικά επιτυγχάνεται δύσκολα, αλλά και στην περίπτωση αυτή δεν είναι εκ των προτέρων γνωστή η ανακατανομή των μικυλλίων (σύμφωνα με τα παραπάνω). Όταν η συγκέντρωση των άδειων μικυλλίων είναι πολύ μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση του βιομορίου, τότε η παραδοχή «ένα μόριο βιομορίου ανά γεμάτο μικύλλιο» είναι σωστή. Στην περίπτωση αυτή οι μέθοδοι προσδιορισμού των παραμέτρων των γεμάτων μικυλλίων πρέπει να μπορούν να διακρίνουν τα γεμάτα μικύλλια ανάμεσα από ένα μεγάλο αριθμό άδειων (μεγάλο background). Αυτό σημαίνει ότι οι πειραματικές μέθοδοι πρέπει να έχουν μεγάλη ευαισθησία.

Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι που οι διάφορες ομάδες χρησιμοποιούν είναι η αναλυτική υπερφυγοκέντρωση, η δυναμική σκέδαση του φωτός, η σκέδαση νετρονίων υπό μικρή γωνία (SANS) και η σκέδαση ακτίνων Χ υπό μικρή γωνία (SAXS). Η μέθοδος της αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης ήταν η πρώτη που δοκιμάστηκε για τέτοια συστήματα και είναι η σχετικά πιο απλή. Στηρίζεται στην καταγραφή των πρωτεϊνών στα 280 nm πράγμα που επιτρέπει τη μη εμφάνιση των μικυλλίων που δεν περιέχουν βιομόρια. Από το έστω και ασθενές σήμα που δίνουν τα «γεμάτα» μικύλλια μπορούν να υπολογισθούν οι συντελεστές καθίζησης και διάχυσης καθώς και τα μοριακά βάρη. Έτσι βρέθηκε ότι το «μοριακό βάρος» των μικυλλίων που περιέχουν ορισμένα ένζυμα (RNάση, λυσοζύμη και ηπατική αλκοολική



Σχήμα 5. Πρότυπα μικυλλίων που περιέχουν RNάση. Η τιμή του λόγου $w_0 = [H_2O]/[AOT]$ είναι 1) $w_0=5$ και 2) $w_0=20$ (8)

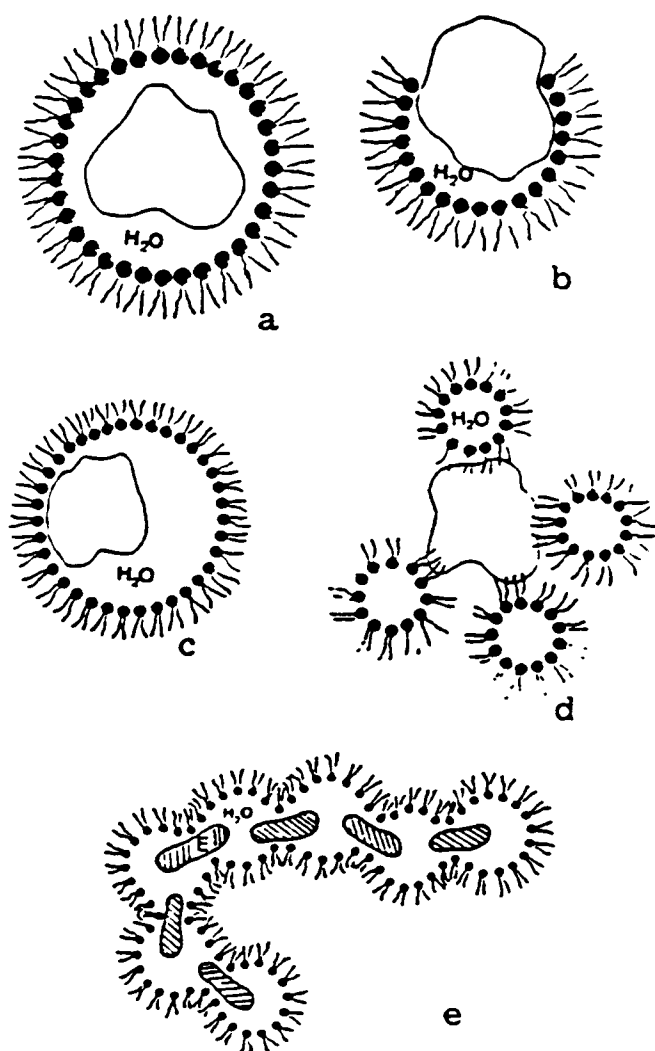
αφυδρογόνωση) ήταν μεγαλύτερο από το αντίστοιχο «μοριακό βάρος» των άδειων μικυλλίων. Στο σχήμα 5 (8) φαίνεται ότι η RNάση προστατεύεται από μια λεπτή στιβάδα νερού, όταν ο λόγος w_0 είναι μικρός. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα το υδατικό κέντρο του γεμάτου με ένα μόριο RNάσης μικυλλίου έχει σχηματισθεί από δύο άδεια αρχικά μικύλλια.

Σε άλλα πειράματα με τη μέθοδο της αναλυτικής υπερφύγοκέντρωσης χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί ιχνηθέτες (probes), που ανάλογα με τη δομή τους μπορούσαν να βρίσκονται είτε στη μεμβράνη των μικυλλίων, είτε στο υδατικό κέντρο τους, ώστε να γίνει δυνατή η καταγραφή και των άδειων μικυλλίων.

Στον υπολογισμό των μοριακών βαρών με αυτή τη μέθοδο χρειάζονται ορισμένες παραδο-

χές που συχνά δεν επαληθεύονται. Όταν π.χ. είναι πολύ μικρός ο αριθμός γεμάτων μικυλλίων, ή όταν η διαφορά μεγέθους με τα άδεια είναι μικρή, η ευαισθησία της μεθόδου δεν επιτρέπει την άντληση αξιολογήσιμων πληροφοριών. Αντίθετα, οι μέθοδοι σκέδασης επιτρέπουν την απευθείας εξέταση των μεγεθών των μικυλλίων κατάλληλης σύστασης.

Η μέθοδος της σκέδασης νετρονίων υπό μικρή γωνία, για παράδειγμα, επιτρέπει την άμεση μέτρηση των διαστάσεων των υδατικών κέντρων των μικυλλίων. Έτσι βρέθηκε (9) ότι σε μικρογαλάκτωμα, που περιείχε βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (MBP - myelin basic protein), υπήρχαν δύο μεγέθη γεμάτων μικυλλίων 27 Å και 87 Å. Η πρώτη περίπτωση αποδόθηκε σε απλά μικύλλια με ένα πρωτεϊνικό μόριο, ενώ η



Σχήμα 6 Πιθανά πρότυπα θέσεων που καταλαμβάνει ένα βιομόριο στα αντιστρεψιμικά μικυλλία α) Πρότυπο υδατικού κελύφους, β) Το βιομόριο έχοντας ένα πολύ λιπόφιλο τμήμα έρχεται σε άμεση επαφή με τον οργανικό διαλύτη γ) Το βιομόριο προσροφάται στη μεμβράνη του μικυλλίου δ) Η διαλυτοποίηση γίνεται με τη βοήθεια περισσοτέρων του ενός αρχικών μικυλλίων ε) Περίπτωση ενοποίησης μικυλλίων γύρω από περισσότερα βιομόρια (5)

ακτίνα των 87 Å ταιριάζει σε ένα συσσωμάτωμα μικυλλίων γύρω από ένα μόριο MBP

Γενικά, τα μέχρι σήμερα αποτελέσματα διαπιστώνουν ότι και οι τρεις διαφορετικές συμπεριφορές, που περιγράφηκαν προηγουμένα, είναι δυνατές. Φαίνεται ότι οι τροποποιήσεις στη δομή

των μικυλλίων εξαρτώνται από τη φύση του αρχικού μικυλλίου, αλλά και από το συγκεκριμένο βιομόριο.

Όσον αφορά τις αλλαγές δομής που υφίστανται τα ίδια τα βιολογικά μόρια, όταν φιλοξενούνται στο υδατικό κέντρο των σταγονιδίων των μικρογαλακτωμάτων, αν για τον προσδιορισμό της δομής των μικυλλίων υπάρχουν ορισμένες δυσκολίες, η διεκρίνιση προβλημάτων δομής των βιομορίων στο συγκεκριμένο περιβάλλον είναι ακόμα πιο δυσπρόσιτη. Αρχικά πρέπει να απαντηθεί το ερώτημα της ακριβούς θέσης που καταλαμβάνει το βιομόριο, για να εξετασθεί μετά η πιθανή σχέση της θέσης με τη μεταβολή της δομής του. Επίσης υπάρχει και η διεκρίνιση του ρόλου των άλλων συστατικών στο υδατικό κέντρο των μικυλλίων, όπως είναι το επιφανειοενεργό και τα αντι-ιόντα του (counter-ions).

Όσον αφορά τη θέση του βιομορίου μέσα στο μικύλλιο, πειραματικά αποτελέσματα στηρίζουν έμμεσα το πρότυπο του υδατινού κελύφους (water shell model: το βιομόριο περιστοιχίζεται από λίγες στιβάδες νερού, που το προστατεύουν από τον οργανικό διαλύτη και το επιφανειοενεργό). Μετρήσεις φθορισμού και κυκλικού διχρωισμού έδειξαν ότι η μορφή των φασμάτων εξαρτάται από το λόγο ενυδάτωσης w_0 , γεγονός που σημαίνει ότι η πρωτεΐνη είναι ευαίσθητη στη συγκέντρωση του νερού. Επιβεβαιώνεται δηλαδή η επαφή πρωτεΐνης-νερού μέσα στο μικύλλιο. Ένα άλλο στοιχείο είναι η διατήρηση της καταλυτικής ικανότητας των ενζύμων μέσα σ' αυτό το περιβάλλον, με συγκρίσιμες, ως προς καθαρά υδατικά διαλύματα, ορισμένες σημαντικές παραμέτρους, όπως κινητικές σταθερές ή άριστο pH. Τέλος, για τιμές του $w_0 > 10$, η μορφή των φασμάτων φθορισμού, κυκλικού διχρωισμού και ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR), είναι σχεδόν ίδια με εκείνη των φασμάτων σε υδατικό περιβάλλον, τεκμηριώνοντας την ύπαρξη υδατικού περιβάλλοντος και στο υδατικό κέντρο των μικυλλίων.

Εκτός από το πρότυπο του υδατινού κελύφους, έχουν προταθεί και άλλες διαμορφώσεις, ιδίως για λιγότερο υδρόφιλα βιομόρια. Στο σχήμα 6 (5) φαίνονται ορισμένες πιθανές καταστάσεις.

Ένα υδρόφοβο πρωτεϊνικό μόριο, για παράδειγμα, μπορεί κάλλιστα να έρχεται σε άμεση επαφή με τον εξωτερικό οργανικό διαλύτη, ή να συνδέεται με τη μεμβράνη των επιφανειοενεργών μορίων. Μια ιδιαίτερη περίπτωση είναι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων μικυλλίων γύρω από ένα βιομόριο, ή και η κατάλληλη ενοποίησή τους προς σχηματισμό ενός είδους δικτύου.

Οι ιδιότητες του νερού των μικυλλίων διαφέρουν από τις ιδιότητες του κυρίως όγκου του (bulk water) (1). Η διαφορά αυτή αυξάνεται, όταν υπάρχουν επιπλέον στα υδατικά κέντρα των μικυλλίων και βιομόρια. Δεν επηρεάζονται, όμως, μόνο οι ιδιότητες του νερού από το φιλοξενούμενο βιομόριο, αλλά και ορισμένες φυσικές παράμετροι, όπως τα pK ή το pI . Αυτή η πιθανότητα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη, όταν επιχειρείται μια πειραματική διευκρίνιση της δομής των βιομορίων. Οι πειραματικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται γι' αυτό το σκοπό είναι η φασματοσκοπία απορρόφησης UV, η φθορισμομετρία, ο κυκλικός διχρωσμός και οι μέθοδοι μαγνητικού συντονισμού (NMR-EPR).

Τα φάσματα απορρόφησης UV των πρωτεϊνών σε μικυλλιακό περιβάλλον γενικά δείχνουν μια μικρή μετατόπιση προς το ερυθρό, σε σχέση με τα αντίστοιχα φάσματα σε υδατικό διάλυμα. Αυτό εξηγείται από τη μικρότερη πολικότητα του υδατικού κέντρου, η οποία πλησιάζει περισσότερο την πολικότητα της μεθανόλης. Όσον αφορά τους συντελεστές μοριακής απορρόφησης (ϵ), γενικά έχει βρεθεί, ότι δεν επηρεάζονται στο συγκεκριμένο μικροπεριβάλλον. Φυσικά για μικρές τιμές του w_0 οι τυχόν αποκλίσεις του ϵ γίνονται σημαντικότερες, όπως άλλωστε ισχύει για όλα τα είδη φασματοσκοπίας.

Τα φάσματα φθορισμού αλλάζουν ελάχιστα στο μικυλλιακό περιβάλλον και μόνο για μικρογαλακτώματα με αρχικό $w_0 < 10$. Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται αύξηση της κβαντικής απόδοσης και μετατόπιση του μέγιστου προς το ιώδες, γεγονός που αποδίδεται σε μια αύξηση της υδροφοβίας του περιβάλλοντος. Μετρήσεις, εξάλλου, πόλωσης φθορισμού δίνουν ενδείξεις για την κινητικότητα του βιομορίου μέσα στο μικύλλιο.

Τα πειράματα με τη μέθοδο του κυκλικού διχρωσισμού στην περιοχή του άπω υπεριώδους δείχνουν μια αύξηση της ελλειπτικότητας σε σχέση με τις ηλεκτρονικές μετατοπίσεις του χρωμοφόρου πεπτιδίου. Μια τέτοια συμπεριφορά αποδίδεται σε αύξηση της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης λόγω αύξησης της υδροφοβίας του περιβάλλοντος. Αυτή η αλλαγή οφείλεται είτε στην έλλειψη ελεύθερου νερού γύρω από την πρωτεΐνη (λόγω της μικρής συνολικής ποσότητάς του για $w_0 < 10$), είτε στην αλληλεπίδραση με τον οργανικό διαλύτη, ή τις υδρόφοβες αλυσίδες του επιφανειοενεργού. Η δεύτερη περίπτωση είναι δυνατή μόνο όταν ο συγκεκριμένος οργανικός διαλύτης ή το επιφανειοενεργό δεν αποδιατάσσουν (denaturate) την πρωτεΐνη.

Όσον αφορά τις μεθόδους μαγνητικού συντονισμού, που θεωρούνται γενικά ισχυρότατα μέσα για μελέτες δομής, στην περίπτωση των μικρογαλακτωμάτων δεν έχουν ακόμα χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη έκταση. Η δυσκολία έγκειται συνήθως στην ευαισθησία, η οποία έχει σχέση με τις συγκεντρώσεις των βιομορίων, που γενικά είναι στα όρια της ανιχνευσιμότητας (για το NMR) και με την πολυπλοκότητα του φάσματος, που δυσκολεύει την ταυτοποίηση των συχνοτήτων συντονισμού, οι οποίες έχουν μετατοπισθεί λόγω νέου (άγνωστου) περιβάλλοντος. Πειράματα, τέλος, ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού - EPR - δείχνουν (10, 11) ότι η κινητικότητα της πρωτεΐνης μειώνεται στο μικυλλιακό περιβάλλον (για μικρές τιμές του w_0).

Πρέπει όμως να παρατηρηθεί ότι τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών δεν δεσμεύουν εκ των προτέρων τη συμπεριφορά άλλων παρεμφερών συστημάτων. Μια αλλαγή π.χ. στη σύσταση του μικυλλίου (αλλάζοντας τη φύση του επιφανειοενεργού) μπορεί να προκαλέσει τεράστιες αποκλίσεις από το αναμενόμενο αποτέλεσμα. Έχει παρατηρηθεί ότι το AOT επηρεάζει περισσότερο τα φάσματα της πρωτεΐνης απ' ό,τι το βρωμιούχο κετυλτριμεθυλαμμώνιο (CTAB - κατιονικό επιφανειοενεργό), ενώ τα μη ιονικά επιφανειοενεργά δείχνουν την περισσότερη ουδέτερη συμπεριφορά.

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ

Η μελέτη των ενζύμων (προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας, προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων, μελέτη μηχανισμού δράσης) μέσα σε μικρογαλακτώματα μπορεί να γίνει με τις ίδιες κλασικές μεθόδους, που εφαρμόζονται στα υδατικά διαλύματα. Μια ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση μπορεί να ξεκινήσει αναμειγνύοντας δύο μικρογαλακτώματα ίδιας σύστασης (ίδιου w_0), που περιέχουν αντίστοιχα το ένζυμο E και το υπόστρωμα S, ή προσθέτοντας λίγα μικρολίτρα υδατικού διαλύματος ενζύμου σε ένα μικρογαλάκτωμα με υπόστρωμα (προκαλώντας μια μικρή μεταβολή του w_0), ή τέλος ακολουθώντας την αντίστροφη πορεία, δηλαδή προσθέτοντας υπόστρωμα από ένα πυκνό διάλυμα σε ένα μικρογαλάκτωμα, που περιέχει ήδη το ένζυμο. Η επιλογή της διαδικασίας που θα ακολουθηθεί για μια ενζυμική μελέτη εξαρτάται από τη φύση του κάθε ενζύμου. Έτσι π.χ., όταν το ένζυμο είναι σχετικά ασταθές μέσα σε αντίστροφα μικύλλια (περίπτωση λυσοζύμης), επιλέγεται η λύση της προσθήκης του στο τελευταίο στάδιο.

Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων k_m και k_{cat} γίνεται με τα κλασικά διαγράμματα Lineweaver-Burk, όπως ακριβώς και στα υδατικά διαλύματα. Συνήθως προστίθεται ένας σταθερός όγκος υποστρώματος, μεταβάλλοντας κάθε φορά τη συγκέντρωσή του, έτσι ώστε στα τελικά μικρογαλακτώματα ο λόγος w_0 να είναι σταθερός. Η διαφορά από την κλασική ενζυμική αντίδραση έγκειται στο ότι το υπόστρωμα πιθανόν να κατανέμεται μεταξύ της υδατικής μικροφάσης, όπου βρίσκεται το ένζυμο, και της συνεχούς οργανικής φάσης. Για υποστρώματα που έχουν τελείως υδρόφιλο χαρακτήρα, πρόβλημα κατανομής δεν υπάρχει και μπορεί να θεωρηθεί, ότι η ολική συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]_{ολ}$ είναι ίση με την τοπική συγκέντρωση (μέσα στα υδατικά κέντρα) $[S]_{wp}$ επί το μερικό όγκο του νερού F_w : $[S]_{ολ} = [S]_{sp} \cdot F_w$. Είναι, όμως, λάθος να υπολογίζονται δύο τιμές για την k_m , αφού έχουμε μια ενζυμική αντίδραση στο

συγκεκριμένο σύστημα και ο κορεσμός του ενζύμου γίνεται για ένα δεδομένο μοριακό λόγος ενζύμου/υποστρώματος. Η τιμή της k_m , λοιπόν, που πρέπει να θεωρείται, όταν συγκρίνεται η ενζυμική αντίδραση μέσα στο μικρογαλάκτωμα με την ενζυμική αντίδραση σε υδατικό διάλυμα, είναι η υπολογιζόμενη με τις ολικές συγκεντρώσεις $k_{ολ}$ ή $k_{wp} \cdot F_w$.

Από τις μέχρι σήμερα μελέτες ενζύμων σε μικρογαλακτώματα μπορεί να διατυπωθούν, σε γενικές γραμμές, τα ακόλουθα:

1. Τα ένζυμα διατηρούν τις καταλυτικές τους ιδιότητες σε παρεμφερή βαθμό με τα υδατικά διαλύματα.

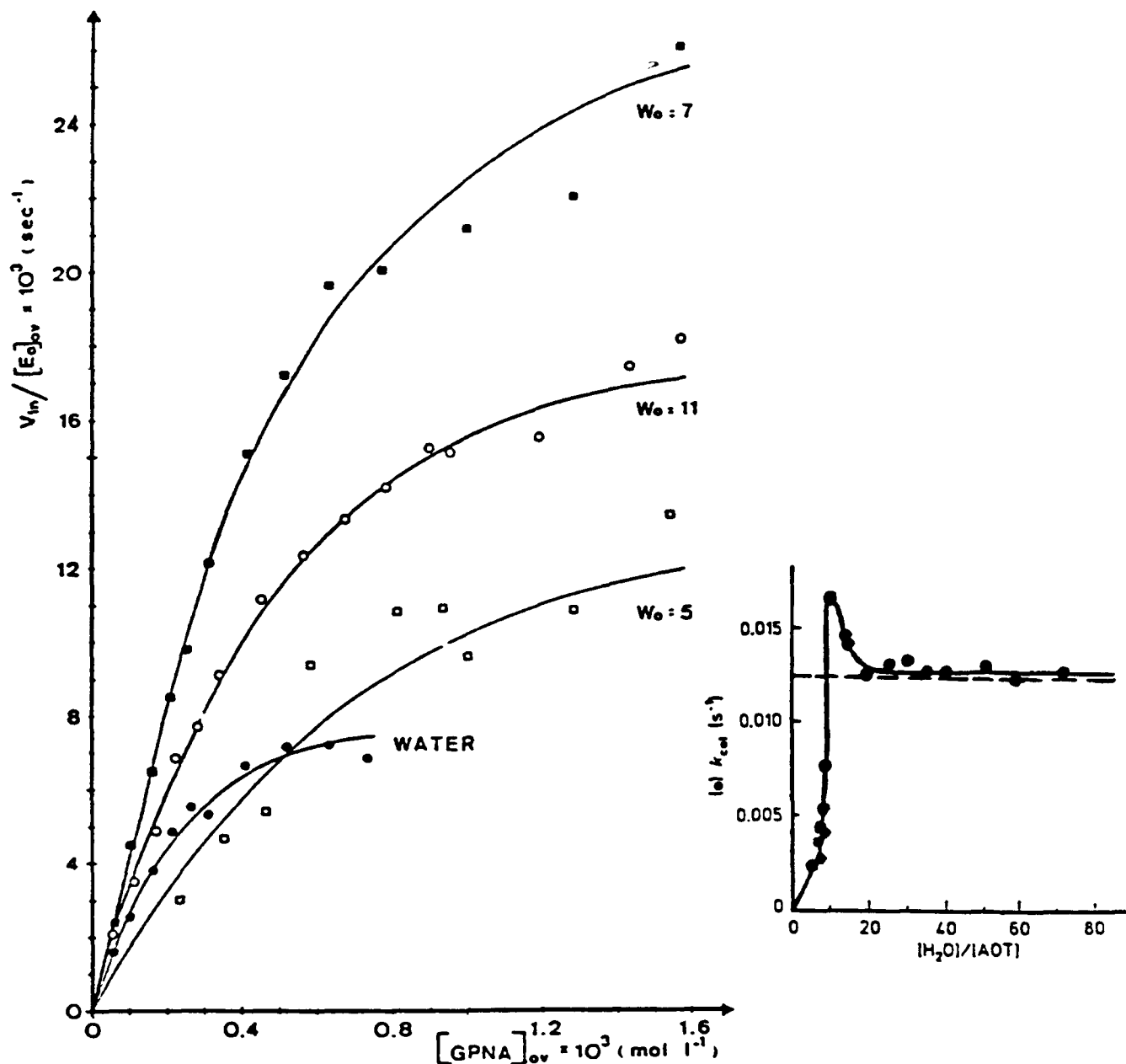
2. Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην κινητική και η συμπεριφορά κατά Michaelis-Menten εξακολουθεί να ισχύει και στο συγκεκριμένο μικροπεριβάλλον.

3. Η δραστηριότητα εξαρτάται από το βαθμό ενυδάτωσης w_0 των μικυλλίων και είναι μέγιστη σε μικρές τιμές του w_0 (περίπου 10) και όχι σε μεγαλύτερες, όπως, ίσως, περίμενε κανείς.

4. Μπορούν να γίνουν ενζυμικές αντιδράσεις και σε υποστρώματα αδιάλυτα στο νερό, αφού μπορούν να βρίσκονται στη συνεχή οργανική φάση και να έρχονται σε επαφή με το ένζυμο διαμέσου της μεμβράνης των μικυλλίων, και, τέλος,

5. Η σταθερότητα των ενζύμων γενικά συγκρίνεται με τη σταθερότητά τους στο νερό, ενώ μειώνεται όταν το w_0 μεγαλώνει (όπως και η ενζυμική δραστηριότητα). Η επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης w_0 στην ενζυμική δραστηριότητα είναι χαρακτηριστική για την περίπτωση της αχυμοθρυψίνης (σχήμα 7) (5, 6). Η μεταβολή έχει τη μορφή κώδωνα με το μέγιστο να αντιστοιχεί περίπου στο $w_0=10$. Παράλληλα πειράματα με EPR έδειξαν ότι στην τιμή αυτή αντιστοιχεί η μικρότερη κινητικότητα του ενζύμου μέσα στο μικύλλιο, ενώ το μέγεθος του υδατικού κέντρου του σχεδόν συμπίπτει με τις διαστάσεις του ενζύμου.

Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο της ενζυμικής κατάλυσης μέσα σε μικρογαλακτώματα είναι η πιθανότητα αλλαγής της εκλεκτικότητας ως προς το υπόστρωμα. Για παράδειγμα, η παγκρεατική

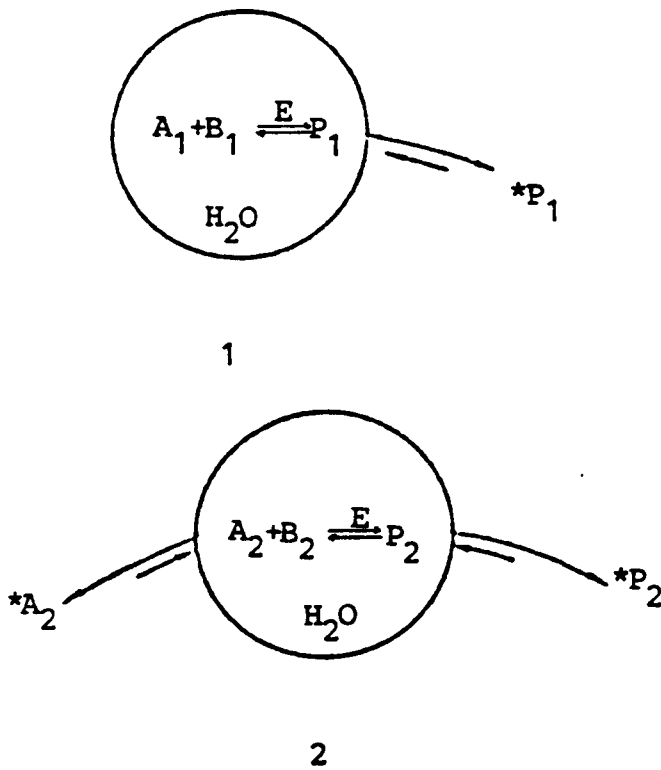


Σχήμα 7. Δραστικότητα της α-χυμοθρυψίνης στο νερό και σε αντίστροφα μικύλλια διαφόρων w_0 (5). Στο ένθετο φαίνεται η συνάρτηση της k_{cat} , από το λόγο w_0 (6)

λιπάση, σε υδατικό διάλυμα καταλύει τα γλυκερίδια ανεξάρτητα των αντίστοιχων λιπαρών οξέων. Σε μικρογαλακτώματα, όμως, η τριελαΐνη υδρολύεται 15 φορές πιο αποτελεσματικά απ' ό,τι η τριβουτυρίνη (12). Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για μικροβιακής προέλευσης λιπάσες (13).

Τέλος, όσον αφορά τη σταθερότητα των

ενζύμων, υπάρχουν περιπτώσεις που ο εγκλωβισμός τους μέσα σε αντίστροφα μικύλλια αποτρέπει την αποδιάταξή τους. Έτσι π.χ. το κυτόχρωμα P-450, που σε υδατικό περιβάλλον είναι ιδιαίτερα τρωτό, σε μικυλλιακό περιβάλλον ο χρόνος ημιζωής του είναι μεγαλύτερος και συγκρίσιμος με το χρόνο ημιζωής στο φυσικό του περιβάλλον (μικροσώματα) (14).



Σχήμα 8. Πιθανές θέσεις των αντιδρώντων σε μια ενζυμική αντίδραση. 1) Τα δύο αντιδρώντα A_1 , B_1 είναι υδατοδιαλυτά ενώ το προϊόν διαλύεται στον οργανικό διαλύτη. 2) Το αντιδρόν A_2 κατανέμεται μεταξύ της συνεχούς οργανικής φάσης και του υδατικού κέντρου του μικυλλίου (16)

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Η ανάπτυξη της ενζυμολογίας μέσα σε μικρογαλακτώματα έχει φτάσει σε ένα επίπεδο, το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη πολλών εφαρμογών σε διάφορους τομείς. Με τις μελέτες αυτές έχουν αρχίσει να διευκρινίζονται ορισμένοι σημαντικοί παράγοντες, όπως ο ρόλος του νερού τόσο στην πρωτεϊνική δομή, όσο και στο μηχανισμό της ενζυμικής κατάλυσης. Έχει γίνει δυνατή η χρήση φυσικών λιπιδίων για το σχηματισμό μικυλλίων και τη μελέτη των σχηματιζομένων, σ' αυτό το περιβάλλον, συμπλόκων πρωτεΐνης-λιπιδίου. Αντιδράσεις που απαιτούν ένα διφασικό σύστημα, όταν δηλαδή το υποστρώμα είναι αδιάλυτο στο νερό, μπορούν να γίνουν πλέον σε μια φάση, υπερπηδώντας όλες τις τεχνικές δυσκολίες των ετερογενών αντιδράσεων. Ειδικότερα, υδρόφοβα υποστρώματα μπορούν να αντιδρούν πολύ πιο

αποτελεσματικά διαμέσου της μικρομεμβράνης των μικυλλίων καταλυόμενα από ένζυμα που βρίσκονται στο υδατικό κέντρο τους. Τέλος, είναι δυνατή η ανάπτυξη της κρυσταλλομολογίας μέσα σε μικυλλιακό περιβάλλον, αφού το νερό των μικυλλίων παγώνει σε θερμοκρασίες αρκετά κάτω από το μηδέν (15).

Στη συνέχεια αναφέρονται ορισμένες βιοτεχνολογικές εφαρμογές που έχουν αρχίσει ήδη να χρησιμοποιούνται.

Οργανική σύνθεση

Η δυνατότητα καταλυτικής μετατροπής υποστρωμάτων που είναι αδιάλυτα στο νερό βρίσκει πολλές εφαρμογές στην οργανική σύνθεση. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση της σύνθεσης ενός αδιάλυτου στο νερό πεπτιδίου, που καταλύεται από την α-χυμοθρυψίνη. Στο σχήμα 8 (16) εικονίζεται η αντίδραση ενός υδατοδιαλυτού αντιδραστήριου (B) με ένα άλλο αντιδραστήριο (A) που κατανέμεται μεταξύ του οργανικού διαλύτη και της υδατικής φάσης του κέντρου των μικυλλίων, όπου βρίσκεται και το ένζυμο. Το προϊόν της αντίδρασης P, επειδή είναι υδρόφοβο, αποβάλλεται από το μικύλλιο προς τη συνεχή οργανική φάση.

Τα πλεονεκτήματα της μικυλλιακής αυτής αντίδρασης είναι εμφανή: παρόλο που η αντίδραση γίνεται σε μια μακροσκοπικά ομογενή φάση, τα προϊόντα διαχωρίζονται συνεχώς από τα αντιδρώντα, προκαλώντας επομένως μετατόπιση της ισορροπίας προς τα προϊόντα, βελτιώνοντας δηλαδή την απόδοση.

Έχουν αναφερθεί παρασκευές στεροειδών, προσταγλανδινών, αλκαλοειδών, λιπιδίων κλπ. με τη διαδικασία της ενζυμικής καταλύσεως σε μικυλλιακό περιβάλλον. Μια ειδική περίπτωση είναι η μετατροπή της προγεστερόνης με μοριακό υδρογόνο, χρησιμοποιώντας ένα μικρογαλάκτωμα με τρία ένζυμα (17). Το τελικό προϊόν απομακρύνεται από τα μικύλλια λόγω της διαφοράς διαλυτότητας που εμφανίζει.

Μια παραλλαγή των μικυλλιακών συστημάτων είναι οι αντιδράσεις σε διφασικά συστήματα νερού/οργανικού διαλύτη, όπου με ελάττω-

ση του ποσοστού του νερού σε πολύ μικρές τιμές, ή με εκλογή ενός οργανικού διαλύτη με μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα (ως προς το προϊόν), επιτυγχάνεται αύξηση της απόδοσης (18).

Αναλυτικές εφαρμογές

Η εφαρμογή των ενζύμων για αναλυτικούς σκοπούς απαιτεί συνήθως τη χρήση υδατοδιαλυτών ενώσεων. Η ανάπτυξη των αντιδράσεων σε μικυλλιακό περιβάλλον επιτρέπει την επέκταση των γνωστών τεχνικών και σε μη υδατοδιαλυτές ενώσεις. Ένα παράδειγμα στον τομέα της προστασίας του περιβάλλοντος είναι οι αναλύσεις ρυπαντών (όπως ορισμένα εντομοκτόνα), οι οποίες είναι πολύ δύσκολες, ή και αδύνατες, λόγω της μη διαλυτότητάς τους στο νερό. Επίσης έχει αναφερθεί η χρήση μικυλλίων για την ανάλυση μη υδατοδιαλυτών βιταμινών (19) με λιποξυγενάση και D-αμινοξική οξειδάση.

Μια ειδική περίπτωση αναλυτικών εφαρμογών είναι οι *βιοδιαχωρισμοί*. Παρόλο που τελευταία η βιοτεχνολογία έχει αναπτυχθεί πολύ κυρίως προς τις κατευθύνσεις των ζυμώσεων και της γενετικής μηχανικής, η βελτίωση των συνθηκών απομόνωσης και καθαρισμού των βιοπροϊόντων δεν είναι ανάλογη και ακολουθούνται κλασικές μέθοδοι (20). Έχει όμως υπολογιστεί ότι κατά μέσο όρο το 90% του κόστους των ουσιών, που παράγονται με μεθόδους υψηλής τεχνολογίας, κατανέμεται στα τελευταία στάδια της παραγωγής. Για παράδειγμα, στην τεχνική ανασυνδυασμού DNA τα προϊόντα καθαρίζονται με χρωματογραφία πτήλης, μέθοδος που δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας. Είναι πομένως εμφανής η ανάγκη ανάπτυξης νέων μεθόδων καθαρισμού και απομόνωσης με δυνατότητες βιομηχανικής εφαρμογής.

Μια τέτοια μέθοδος είναι η υγρή εκχύλιση, που μπορεί να γίνει και με συνεχή διαδικασία πανειλημμένων ανακυκλώσεων. Έχει, έτσι, αναφερθεί η εκχύλιση ενζύμων με πολυαιθυλενολυκόλη σε ένα διφασικό σύστημα οργανικού διαλύτη/νερού. Η χρήση μικρογαλακτωμάτων, ξάλλου, έχει αποδειχθεί (21) ότι γενικά βελ-

τώνει σημαντικά τη διαδικασία εκχύλισης. Είναι επομένως δυνατή η ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού ενζύμων (ή άλλων βιομορίων) με υγρή εκχύλιση, παρουσία μικρογαλακτωμάτων.

Μια ενδιαφέρουσα περίπτωση υγρής εκχύλισης είναι εκείνη που γίνεται μεταξύ τριών φάσεων κατά τον ακόλουθο τρόπο από ένα υδατικό διάλυμα, στο οποίο περιέχονται τα βιομόρια προς διαχωρισμό, εκχυλίζεται εκλεκτικά από ένα μικρογαλάκτωμα w/o (νερού σε οργανικό διαλύτη) το συγκεκριμένο-επιθυμητό βιομόριο. Στη συνέχεια ακολουθεί η αντίστροφη διαδικασία εκχύλισης μέσα από το μικρογαλάκτωμα του βιομορίου από ένα καθαρό υδατικό διάλυμα. Το όλο σύστημα μπορεί να γίνεται συνεχώς σε μια σκευή σχήματος Π με τα δύο υδατικά διαλύματα να διαχωρίζονται από το υπερκείμενο μικρογαλάκτωμα. Η εκλεκτική εκχύλιση μπορεί να βασίζεται σε διάφορες ιδιότητες των βιομορίων, όπως το διαφορετικό μέγεθος, ή το διαφορετικό πρωτεϊνικό φορτίο. Στην πρώτη περίπτωση αναφέρουμε το διαχωρισμό κυτοχρώματος-C από αλβουμίνη, όπου με κατάλληλη επιλογή μικυλλίων η αλβουμίνη ως μεγαλύτερη δεν μπορεί να περάσει στη διεσπαρμένη φάση του μικρογαλακτώματος, ενώ στη δεύτερη περίπτωση στηρίζεται ο διαχωρισμός ριβονουκλεάσης, κυτοχρώματος-C και λυσοζύμης (22).

Ενεργειακές εφαρμογές

Μεταξύ των ήπιων μορφών ενεργείας, μπορούμε να κατατάξουμε και τη χρήση της ηλιακής ενεργείας προς μίαν άλλη κατεύθυνση: την παραγωγή ενεργείας από τη φωτόλυση του νερού. Πολλές ομάδες έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούν μικρογαλακτώματα για τη βελτίωση της βιοφωτόλυσης του νερού, με καταλύτη την υδρογενάση (23). Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των συστημάτων είναι ότι παρέχουν τη δυνατότητα κατάλληλου διαχωρισμού των προκύπτων φορτίων.

Ιατροφαρμακευτικές εφαρμογές

Η χημική μετατροπή πρωτεϊνών από μη

υδατοδιαλυτές ουσίες μέσα σε μικυλλιακό περιβάλλον επιτρέπει την παρασκευή ενεργών μορίων με υδρόφοβο χαρακτήρα, τα οποία είναι ικανά να αλληλεπιδρούν με τις βιολογικές μεμβράνες. Είναι επομένως δυνατόν να παρασκευασθούν τέτοιες ουσίες που να έχουν θεραπευτικές ιδιότητες (24)

Άλλη εφαρμογή στον ιατρικό τομέα είναι η μεταφορά ενεργών ουσιών από μικρογαλακτώματα προς ένα συγκεκριμένο όργανο του σώματος. Τα μικρογαλακτώματα μπορούν να παγιδεύσουν στη διεσπαρμένη φάση, διάφορες ουσίες με λιπόφιλες, υδρόφιλες ή και αμφίφιλες ιδιότητες, οι οποίες απελευθερώνονται στο όργανο-στόχο, αναλόγως του περιβάλλοντος (targetting) (25) Η χρήση μικρογαλακτωμάτων για το σκοπό αυτό αναμένεται να λύσει τα προβλήματα που αντιμετωπίζει η στόχευση φαρμάκων με φυσικά λιπώματα ή κυστίδια (26).

Τέλος, μια σημαντική εφαρμογή στον τομέα αυτό είναι η προσωρινή υποκατάσταση του αιματος από μικρογαλακτώματα υπερφθοριωμένων υδρογονανθράκων, που έχουν αυξημένη διαλυτότητα σε οξυγόνο (1, 27).



Microemulsions II: A new medium for enzymatic studies

by
Aris Xenakis

National Hellenic Research Foundation, 48 Vas
Constantinou ave., 11635, Athens, Greece

S U M M A R Y. This paper is a review of recent results on the application of microemulsions for enzymic studies. The interest that these studies present is based on the particular properties of microemulsion systems. Namely these fine dispersions of water in organic solvents, stabilized by surfactant molecules, are macrohomogeneous allowing one to perform structural investigations of the bio-

molecules that can be hosted in the aqueous dispersed phase. Furthermore, the properties of this microphase differ from those of bulk water, approaching the conditions existing in the cells. The biomolecules when localised in such a restricted microenvironment may have different conformations from those known in classical water solutions. The activity of enzymes hosted in reverse micelles may also be altered, showing different affinities for particular substrates, while it is possible to catalyse water-insoluble substrates. These features give many possibilities for numerous biotechnological applications in various fields such as bioseparations, enzymatically catalysed organic synthesis, blood substitution, drug targeting, waste water treatment etc.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- 1 Xenakis, A. Microemulsions I Introduction *Epitheor Klin Farmakol Farmakokinet El Ekd.* 8 15 (1990)
- 2 Hanahan, D.J. *J Biol Chem* 195 199 (1952)
- 3 Luisi, P.L., Henninger, F., Joppich, M., Dossena, A., Casnati, G. Solubilization and properties of α -chymotrypsin in cyclohexane *Biochem Biophys Res Commun* 74 1384 (1977)
- 4 Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N., Berezin, I.V. Catalysis of watersoluble enzymes in organic solvents. Stabilization of enzyme against denaturation (inactivation) when they are included in inversed micelles of surface active substance *Dokl Acad Nauk SSR* 236 920 (1977)
- 5 Luisi, P.L., Magid, L. Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions *Crit Rev Biochem* 20 409 (1986)
- 6 Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N., Khmel-nitski, Y.L., Berezin, I.V. Micellar enzymology *Europ J Biochem* 155 453 (1986)
- 7 Delahodde, A., Vacher, M., Nicot, C., Waks, M. Solubilization and insertion into reverse micelles of the major myelin transmembrane proteolipid *FEBS Lett* 172 343 (1984)
- 8 Bonner, F.J., Wolf, R., Luisi, P.L. Micellar solubilization of biopolymers in hydrocarbon solvents I A structural model for protein-containing reverse micelles *J Solid-Phase Biochem* 5 255 (1980)
- 9 Magid, L., Imre, V.E., Jackle, H. Unpublished results
- 10 Cazianis, C.T., Xenakis, A., Evangelopoulos, A.E. Spin label studies of glycogen phosphorylase hosted in microemulsion droplets *Biochem Biophys Res Commun* 148 1151 (1987)
- 11 Xenakis, A., Cazianis, C.T. Solubilization of phosphory-

- lase into microemulsion droplets. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 76: 159 (1988)
12. Malakhova, E.A., Kurganov, B.I., Levashov, A.V., Berezin, I.V., Martinek, K.: A new approach to the study of enzymatic reactions with the participation of water-insoluble substrates. Pancreatic lipase enclosed in inverted micelles of a surface-active substance in an organic solvent. *Dokl. Acad. Nauk. SSR* 270: 474 (1983)
 13. Xenakis, A., Valis, T.P., Kolisis, F.N.: Use of microemulsion systems as media for heterogenous enzymic catalysis. *Progr. Colloid Polym. Sci.* 79: 88 (1989)
 14. Eremin, A.N., Metelitsa, D.I.: Mixed inverted micelles of surfactants in hydrocarbons. A model of microsomal membrane ultrastructure. *Dokl. Acad. Nauk. SSR* 267: 221 (1982)
 15. Douzou, P., Debey, P., Franks, F.: Supercooled water as medium for enzyme reactions at subzero temperatures. *Biochem. Biophys. Acta* 523: 1 (1977)
 16. Luthi, P., Luisi, P.L.: Enzymatic synthesis of hydrocarbon soluble peptides with reverse micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 106: 7285 (1984)
 17. Hilhorst, R., Spruijt, R., Laane, C., Veeger, C.: Rules for the regulation of enzyme activity in reversed micelles as illustrated by the conversion of apolar steroids by 20- β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 144: 459 (1984)
 18. Martinek, K., Klivanov, A.M., Samokhin, G.P., Semenov, A.N., Berezin, I.V.: Preparative enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic system. *Bioorgan. Chem.* 3: 696 (1977)
 19. Kurganov, V.I., Tsetlin, L.G., Malakhova, E.A., Chebatarova, N.A., Lankin, Y.Z., Levashov, A.V., Glebova, G.D., Berezovski, V.M., Martinek, K., Berezin, I.V.: Regulation of catalytic activity of enzymes included in hydrated reverse micelles of a surfactant in organic solvent. A new approach to the study of inhibiting action of water insoluble compounds. *Dokl. Acad. Nauk. SSR* 282: 1263 (1985)
 20. Kadam, K.L.: Reverse micelles as a bioseparation tool. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 266 (1986)
 21. Xenakis, A., Tondre, C.: Transport of alkali metal picrates by w/o microemulsions used as liquid membranes: influence of the nature of the surfactant and cosurfactant. *J. Colloid Interface Sci.* 117: 442 (1987)
 22. Goklen, K.E., Hatton, T.A.: Liquid extraction of low molecular weight proteins by selective solubilization in reverse micelles. *Separ. Sci. Technol.* 22: 831 (1985)
 23. Hilhorst, R., Laane, C., Veeger, C.: Photosensitized production of hydrogen peroxide in reverse micelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3927 (1982)
 24. Kabanov, A.V., Namiotkin, S., Levashov, A.V., Martinek, K.: Transmembrane transport of artificially hydrophobized proteins (enzymes). *Biol. Membr.* 2: 985 (1985)
 25. Attwood, D., Florence, A.: *Surfactant Systems, their Chemistry, Pharmacy and Biology*. Ed. Chapman and Hall, London, 1983
 26. Dimitriadis, G.J.: Liposomes as drug carriers. *Epitheor. Klin. Farmakol. Farmakokinet. El. Ekd.* 1: 125 (1983)
 27. Mathis, G., Delpuech, J.J.: French Patent, No 8022875 (1982)