

# Enzyme als Gastmoleküle in inversen Micellen

Von Pier Luigi Luisi\*

Inverse Micellen können sich in flüssigen Kohlenwasserstoffen bilden, denen Wasser und geringe Anteile eines Tensids zugesetzt werden. Dabei lagern sich die polaren Kopfgruppen des Tensids zu Kugeln zusammen; die lipophilen Ketten weisen – anders als bei normalen Micellen in Wasser – nach außen. Die inversen Micellen enthalten Wasser, das in dieser „Wasserlache“ (je nach Molverhältnis zum Tensid) andere Eigenschaften als reines Wasser haben kann. Erstaunlicherweise nehmen die inversen Micellen auch sehr viel größere Moleküle als Wasser auf, z. B. Enzyme und sogar Plasmide. Diese neuen Biopolymer-Aggregate lassen sich als Mikroreaktoren ansehen, deren physikalische Eigenschaften über den Wassergehalt gesteuert werden können. Bemerkenswert ist die Fähigkeit enzymhaltiger inverser Micellen, mit wasserunlöslichen, in Kohlenwasserstoffen löslichen Substraten zu reagieren. Als Beispiel sei die Oxidation von Linolsäure mit Lipxygenase genannt.

## 1. Einleitung

Dieser Beitrag gibt eine Übersicht über neuere Arbeiten an Enzymen, die in unpolaren Lösungsmitteln solubilisiert worden sind, und zwar durch inverse Micellen.

Zunächst sollen einige grundlegende Eigenschaften der inversen Micellen behandelt werden. In Tabelle 1 sind einige gebräuchliche amphiphile Moleküle aufgelistet, die

Tabelle 1. Aggregation von amphiphilen Molekülen in unpolaren Lösungsmitteln. n = mittlere Aggregationszahl [a].

Amphiphil	Lösungsmittel	T [°C]	Konz.- Bereich [Gew.-%]	n
Dodecylammonium-propionat	Benzol	25	0.09–0.21	3
Dodecylammonium-propionat	Cyclohexan	20	0.023–0.034	5
Dodecylammonium-benzoat	Benzol	25	0.20–0.33	3.6
Dodecylammonium-benzoat	Cyclohexan	20	0.8–3	3.6–9
Natrium-1,2-bis(2-ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethansulfonat (AOT)	Cyclohexan	28	1–3	45–66
Natrium-1,2-bis(2-ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethansulfonat (AOT)	Benzol	28	1–3	23
Lithium-dinonylnaphthalinsulfonat	Benzol	35	0.5–6	7
Lithium-dinonylnaphthalinsulfonat	Cyclohexan	35	0.5–6	8
$\alpha$ -Monoglyceryl-oleat	Benzol	20	0.01–0.06	19
Lecithin	Benzol	20	0.001–0.01	80
Lecithin	Benzol	25	0.07–1	73

[a] Tabelle aus [1] entnommen und umgestellt.

solche Aggregate in unpolaren Lösungsmitteln bilden. Bekanntlich kommen in wäßrigen Lösungen<sup>[1]</sup> andere Arten von Aggregaten vor, z. B. Doppelschichten, Vesikel und Liposomen, die aber hier nicht betrachtet werden sollen. Abbildung 1 gibt einen Eindruck vom Aufbau normaler (wäßriger) und inverser Micellen sowie von der Struktur des Tensids AOT, das wir bei unseren Untersuchungen vorwiegend verwendet haben. Wichtig ist, daß es sich bei den Micellen um relativ geordnete Strukturen handelt, die durch

bestimmte (wenn auch gemittelte) Werte für Radius, Molekulargewicht und Packungsdichte charakterisiert sind. Für einen Chemiker, der an der spontanen Entstehung geordneter Strukturen interessiert ist, sind Micellen ein ideales Untersuchungsobjekt. Aus Abbildung 1 sollte aber nicht abgeleitet werden, daß Micellen starre Strukturen sind: Sie sind im Gegenteil durch dynamische Prozesse gekennzeichnet<sup>[2–4]</sup>. Beispielsweise haben inverse Micellen die wichtige Eigenschaft, daß sie bei einem Zusammenstoß zusammenfließen (koaleszieren)<sup>[4]</sup>. Es wird angenommen, daß dieser Vorgang über ein „transientes Dimer“ mit einem Kommunikationskanal abläuft, der einen schnellen Materialaustausch ermöglicht. Dies ist in Abbildung 2 dar-

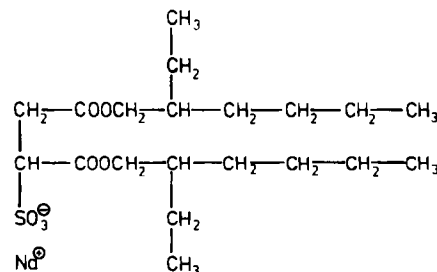
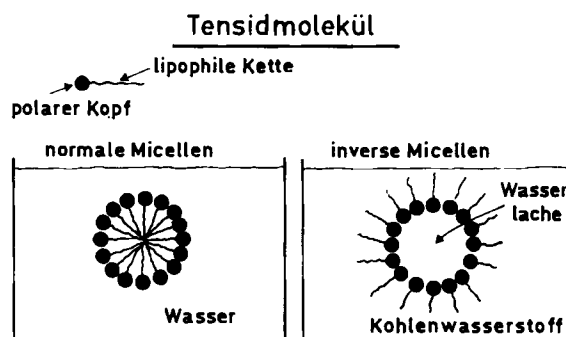


Abb. 1. Idealisierte Darstellung von normalen (wäßrigen) und inversen Micellen im Querschnitt sowie Struktur von Natrium-1,2-bis(2-ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethansulfonat (AOT). Typische Bedingungen für inverse Micellen: Isooctan (2,2,4-Trimethylpentan), 25–100 mM AOT, 0.5–2% Wasser. Inverse Micellen sind annähernd monodisperse, dynamische Aggregate, die relativ viel Wasser (ca. 10%) solubilisieren können. Bei Molverhältnissen ( $w_0$ ) von  $[H_2O]/[AOT] \geq 7$  sollte man von Mikroemulsionen sprechen (siehe Text).

[\*] Prof. Dr. P. L. Luisi  
Institut für Polymere der Eidgenössischen Technischen Hochschule  
ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich (Schweiz)

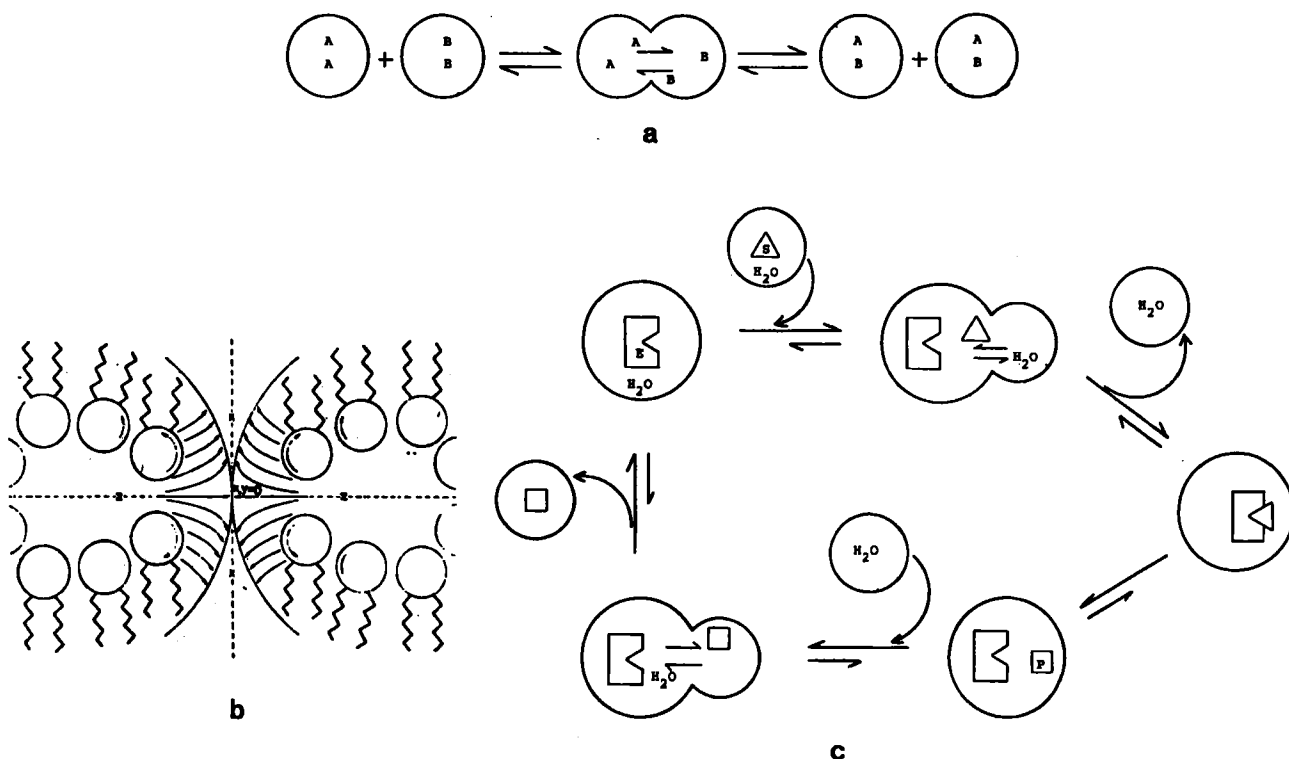


Abb. 2. Dynamische Eigenschaften inverser Micellen. a) Austausch von Material zwischen zwei invers-micellaren Lösungen als Vorbedingung für die Reaktion zwischen A und B (aus [2]). Das Zusammenfließen der Micellen und der Austausch finden über ein transientes Dimer statt; dieses Konzept wurde von Eicke et al. [4a] ausgearbeitet. b) Berührungsstelle vor dem Zusammenfließen, schematisch (aus [4a]). c) Vorschlag für den Cyclus einer enzymatischen Reaktion im stationären Zustand unter Anwendung dieser Konzepte (aus [24]).

gestellt, ebenso wie die Bedeutung dieses Phänomens für den Aktivitätszyklus von Enzymen (siehe Abschnitt 4).

Von großer Bedeutung ist die Wechselwirkung der inversen Micellen mit Wasser. Aufgrund ihres polaren Kerns können sie Wasser in unpolaren Lösungsmitteln solubilisieren. Dieses solubilisierte Wasser wird üblicherweise als „Wasserlache“ bezeichnet<sup>[2]</sup>. Wir wollen nun die inversen Micellen, die von Natrium-1,2-bis(2-ethylhexyloxycarbonyl)-1-ethansulfonat (AOT) gebildet werden, näher betrachten. Das System, mit dem wir es meistens zu tun haben werden, besteht aus AOT, Isooctan und Wasser. Ein wichtiger Parameter ist das Molverhältnis von Wasser zu Tensid,  $w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$ . Dieses Verhältnis – und nicht der Wasser- oder Tensidgehalt im Kohlenwasserstoff – bestimmt die meisten strukturellen und physikalischen Eigenschaften von inversen Micellen<sup>[1,5,6]</sup>. Das Wasser in der Wasserlache ist teilweise an deren polaren Wänden „gebunden“ und nur oberhalb einer bestimmten kritischen Konzentration relativ „frei“. Die Wassermoleküle sind nun bei AOT bis möglicherweise  $w_0 = 6-8$  fest an die Kopfgruppen gebunden<sup>[6,7]</sup>; freies Wasser existiert in der Wasserlache erst oberhalb dieses Wertes. Tatsächlich schwellen inverse Micellen an, wenn ihr Wassergehalt steigt<sup>[5,6]</sup>. Abbildung 3 (durchgezogene Linie<sup>[5,6]</sup>) veranschaulicht dieses Phänomen (inverse Micellen mit Enzymen als Gastmolekülen siehe Abschnitt 3).

Besonders bei niedrigen  $w_0$ -Werten, wenn die Micellen kleiner sind und ein relativ großer Teil des Wassers an die Micellwände gebunden ist, verhält sich das Wasser in den inversen Micellen „anomal“, das heißt, es hat etwas andere physikalische Eigenschaften als reines Wasser<sup>[8-10]</sup>. Bei steigendem Wassergehalt nähern sich die physikali-

schen Eigenschaften der Wasserlache asymptotisch denen von Wasser. Dennoch kann selbst bei relativ hohen  $w_0$ -Werten ein kleiner Unterschied bestehen bleiben.

Üblicherweise sieht man die  $w_0$ -Region, in der das Wasser frei wird, als Grenze zwischen Micellen und Mikro-

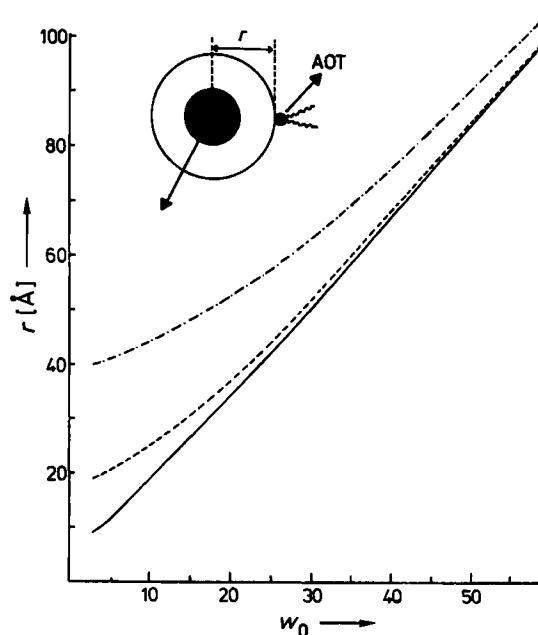


Abb. 3. Radius  $r$  der inversen AOT-Micellen als Funktion von  $w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$ . (—): „Leere“ Micellen, das heißt Micellen, die nur Wasser enthalten. Diese Kurve korrespondiert mit den Daten von Eicke et al. [5, 6] (nach [24]). (---): Protein = Ribonuclease (RNase); (- · - ·): Protein = Leber-Alkohol-Dehydrogenase (LADH). Sämtliche Angaben in dieser Abbildung und den folgenden Abbildungen beziehen sich auf Raumtemperatur, wenn nicht anders vermerkt.

emulsionen an. Mikroemulsionen kann man durchaus als ein System voneinander getrennter Wassertropfchen in der Ölphase (Kohlenwasserstoffphase) betrachten, während Micellen ein homogenes System bilden, in welchem das Wasser nur zur Solvation der Tensidmoleküle dient. Wir vernachlässigen diesen Unterschied normalerweise in unseren Veröffentlichungen, weil wir stets einen großen  $w_0$ -Bereich untersuchen und es verwirrend wäre, die Nomenklatur in Abhängigkeit vom  $w_0$ -Wert zu ändern – außerdem ist die Grenzlinie sowieso nicht so exakt zu ziehen. Der Unterschied zwischen Micellen und Mikroemulsionen sollte aber im Auge behalten werden, denn die physikalischen Eigenschaften des Systems (zum Beispiel Massentransport, Dynamik, Reaktivität und Struktur von Gastmolekülen) können in den beiden  $w_0$ -Bereichen verschieden sein.

Nach dem bisher Gesagten kann man erwarten, daß in inversen Micellen solubilisierete Biopolymere ihre Reaktivität und Konformation in Abhängigkeit von den micellaren Parametern, insbesondere von  $w_0$ , verändern. Da sich die physikalischen Eigenschaften der Wasserlache bei steigendem  $w_0$  denen von reinem Wasser nähern, kann die enzymhaltige Micelle als Mikroreaktor angesehen werden, dessen physikalische Eigenschaften sich kontinuierlich ändern lassen, indem man einfach den Wasseranteil vergrößert oder verringert. Möglicherweise werden diese neuen Biopolymer-Aggregate von biotechnologischem Nutzen sein und darüber hinaus dem Chemiker grundlegende Informationen über die Wechselwirkungen von Proteinen mit Wasser und mit membranartigen Oberflächen liefern.

## 2. Experimentelle Probleme

Abbildung 4 zeigt die drei Techniken, die bis jetzt zur Herstellung enzymhaltiger micellarer Lösungen angewendet worden sind. Die erste Methode (Abb. 4a) haben wir in unserer Gruppe zuerst für Peptide benutzt<sup>(11, 12)</sup> und als „Phasentransfermethode“ bezeichnet. Dabei wird die wäßrige Lösung des Proteins mit der micellaren AOT-Lösung überschichtet. Durch leichtes Rühren wird ein Teil des

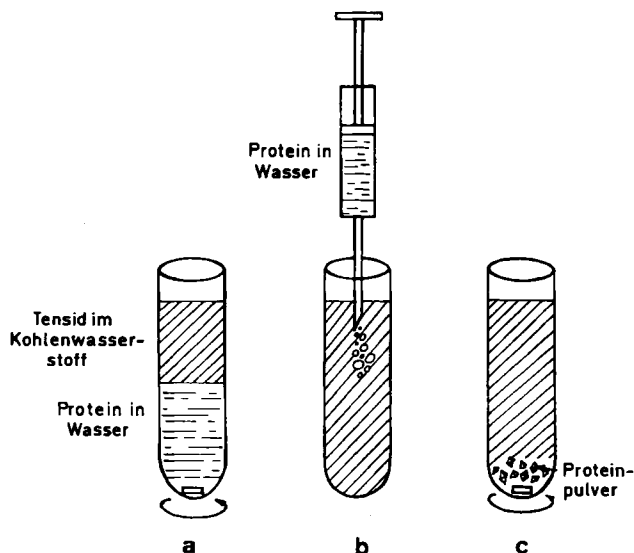


Abb. 4. Die drei bisher bekannten Methoden zur Solubilisierung von Proteinen in inversen Micellen. a) „Phasentransfermethode“; b) „Injektionsmethode“ (am häufigsten verwendet); c) Methode für wasserunlösliche Proteine.

Proteins langsam aus der wäßrigen Lösung in die Kohlenwasserstoffphase transferiert. (Dieser Vorgang kann, z. B. bei 280 nm, photometrisch verfolgt werden.) Diese Methode erfordert relativ viel Zeit, hat aber den Vorteil, daß sich das System am Ende im thermodynamischen Gleichgewicht befindet und daß die resultierende biopolymerhaltige micellare Kohlenwasserstofflösung im allgemeinen stabil ist. Diesen Punkt kann man besser verstehen, wenn man die Phasentransfer- mit der Injektionsmethode (Abb. 4b) vergleicht, bei der einige Mikroliter der konzentrierten Vorratslösung des Proteins in die Lösung von AOT in der Kohlenwasserstoffphase injiziert werden. (Weder dabei noch bei den anderen Solubilisierungsmethoden wird beschallt.) Sollte die unpolare Phase dabei mit Protein übersättigt werden, so daß die micellare Lösung metastabil ist, nimmt später möglicherweise die Proteinabsorption mit der Zeit ab; dies zeigt an, daß das Protein aus dem micellaren System ausfällt. Diese Methode ist jedoch so schnell und so einfach, daß sie zur Methode der Wahl geworden ist. In den meisten Fällen konnten wir stabile micellare Lösungen der Proteine bis hinauf zu  $w_0 = 5-30$  erhalten, indem wir einfach eine konzentrierte Vorratslösung des Proteins im pH-Bereich 7–10 bei Raumtemperatur in die Kohlenwasserstofflösung des Tensids injizierten.

Generell ist es wichtig, den Stabilitätsbereich des proteinhaltigen invers-micellaren Systems abzustecken. Eine einfache Möglichkeit, das relativ schnell zu tun, ist in Abbildung 5 skizziert. Sie zeigt die Bereiche von Temperatur und Wassergehalt, in denen das enzymhaltige micellare System thermodynamisch stabil ist. Wir arbeiten normalerweise nur mit völlig durchsichtigen micellaren Proteinlösungen. Ein praktisches Kriterium dafür ist die Intensität des gestreuten Lichts bei 330 nm. Lösungen mit einer optischen Dichte über 0.1 werden verworfen.

Die in Abbildung 4a und 4b dargestellten Methoden eignen sich für wasserlösliche Proteine. Besonders vorteilhaft und interessant ist die Fähigkeit inverser Micellen zur Solubilisierung wasserunlöslicher Proteine. Nach Abbildung 4c wird dazu das pulverförmige unlösliche Protein in der micellaren Kohlenwasserstoffphase, die bereits eine be-

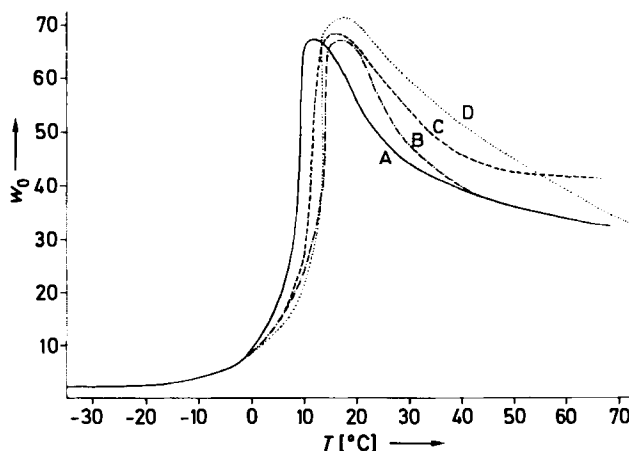


Abb. 5. Stabilität von inversen AOT-Micellen in Isooctan, ohne Enzyme oder mit Enzymen. Die Fläche unter der Kurve repräsentiert den stabilen Bereich, in dem die unpolaren micellaren Lösungen klar sind. Außerhalb dieses Bereichs erhält man trübe und/oder instabile micellare Lösungen. A (—) Grundlösung: 0.05 M AOT mit 50 mM Boratpuffer, pH 8.5; B (---) Grundlösung mit Lipoxigenase (0.16 µM); C (— · —) Grundlösung mit Ribonuclease (175 µM); D (····) Grundlösung mit Ribonuclease (17.5 µM).

stimmte Menge Wasser enthält (z. B.  $w_0 = 3-30$ ), leicht gerührt. Dieses Solubilisierungsphänomen wird vielleicht auf der Basis des bereits erwähnten Befundes verständlicher, daß Wasser in inversen Micellen andere physikalische Eigenschaften als reines Wasser haben kann, so daß auch seine Solubilisierungskraft möglicherweise verändert ist. Diese Methode kann für wasserunlösliche Membranproteine von Nutzen sein, denn die proteinhaltigen Micellen können bis zu einem gewissen Grad proteinhaltige Lipidmembranen imitieren. Dieses Forschungsgebiet ist aber noch nicht so intensiv untersucht worden, wie es wünschenswert wäre; bis jetzt ist uns keine systematische Studie über wasserunlösliche Membranproteine in inversen Micellen bekannt geworden. *Waks, Carol et al.* (CNRS, Paris) gelang es, das Folch-Pi-Proteolipid (oder Lipophyllin) zu solubilisieren (vgl. Abb. 6), dessen Wechselwirkungen mit dem wasserlöslichen basischen Myelin-Protein<sup>[13]</sup> sie derzeit untersuchen. Wie man weiß, sorgen diese beiden Proteine für die lamellare Struktur des Myelins. Mit inversen Micellen kann man nun die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen studieren, von denen das eine wasserlöslich und das andere wasserunlöslich ist.

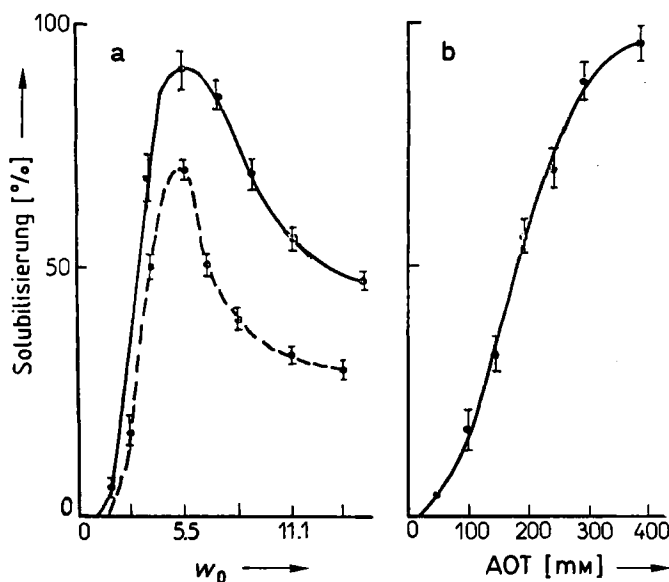


Abb. 6. Solubilisierung des Folch-Pi-Proteolipids in inversen Micellen aus Isooctan/AOT/Wasser. Die Gesamtkonzentration des Proteolipids im Assay betrug  $20 \mu\text{M}$  ( $20 \text{ nmol/mL}$ ). Eine micellare Lösung dieser Konzentration entspricht 100% Solubilisierung. a) Ausmaß der Solubilisierung gegen  $w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$  bei 300 (—) und 200 (---) mM AOT. b) Ausmaß der Solubilisierung gegen die AOT-Konzentration bei  $w_0 = 5.56$  (Balken: experimentelle Fehler) (nach [13]).

Tabelle 2 faßt die wichtigsten Arbeiten zusammen, die bis jetzt über in inversen Micellen solubilierte Proteine erschienen sind. Am aktivsten auf diesem Gebiet sind derzeit die Gruppen von *Martinek* in der Sowjetunion, *Robin-*

Tabelle 2. Schematische Darstellung der Aktivitäten von Arbeitsgruppen auf dem Gebiet von Enzymen in inversen Micellen.

Gruppe	System	wichtigste Untersuchungen, wichtigste Resultate
<i>Martinek et al.</i> (1978) [55]	$\alpha$ -Chymotrypsin und Peroxidase in AOT/Octan	Aktivitätsuntersuchungen: Enzyme bleiben aktiv

<i>Levachov et al.</i> (1980) [56]	$\alpha$ -Chymotrypsin und andere Enzyme in AOT/Octan oder CTAB/Octan/ $\text{CHCl}_3$ [a]	Bestimmung von $k_{\text{cat}}$ und $K_m$ , theoretische Betrachtungen über Enzymkinetik in inversen Micellen
<i>Martinek et al.</i> (1981) [37]	Chymotrypsin in AOT/Octan	Ultrazentrifugen-Untersuchungen an „leeren“ und „gefüllten“ Micellen
<i>Martinek et al.</i> (1982) [35]	Peroxidase in AOT/Octan	Enzymaktivität viel höher als in Wasser
<i>Malakhova et al.</i> (1983) [57]	Pancreas-Lipase in AOT/Octan Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase	Substratspezifität bestimmt Änderung der relativen Substratspezifität
<i>Misiorowski, Wells</i> (1974) [58]	Phospholipase $A_2$ in Phosphatidylcholin/Ether/MeOH	Kinetische Untersuchungen; Tensid agiert als Substrat
<i>Fletcher et al.</i> (1984) [59]	$\alpha$ -Chymotrypsin in AOT und $\text{C}_{12}\text{E}_4$ /Octan [b]	Kinetische Untersuchungen mit mehreren Substraten; $k_{\text{cat}}$ ähnlich wie in reinem Wasser
<i>Kumar, Balasubramanian</i> (1980) [60]	$\alpha$ -Chymotrypsin und Rinderserumalbumin in mehreren Tensiden	Spektroskopische Untersuchungen und Aktivitätsmessungen
<i>Menger, Yamada</i> (1979) [29]	$\alpha$ -Chymotrypsin in AOT/Heptan	Untersuchung der Aktivität in Abhängigkeit von pH und $w_0$
<i>Douzou et al.</i> (1978) [61]	Cytochrom P-450 in Sorbitantristearat	Cryoenzymologie in inversen Micellen möglich
<i>Douzou et al.</i> (1979) [62]	Trypsin in AOT/Heptan	Aktivität ähnlich wie in Wasser, Cryoenzymologie
<i>Ramakrishnan et al.</i> (1983) [63]	Rhodopsin in Phospholipiden/Hexan	Modell für das Protein in inversen Micellen
<i>Darszon et al.</i> (1979) [64]		Enzym bleibt photochemisch aktiv
<i>Schönfeld et al.</i> (1980) [65]	Reaktionszentren von <i>Rhodospseudomonas</i>	Zentren bleiben photochemisch aktiv
<i>Hilhorst et al.</i> (1982) [66]	Hydrogenase in CTAB/Octan/ $\text{CHCl}_3$ [a]	Lichtinduzierte Wasserstoffbildung mit Sensibilisatoren in der Grenzfläche
<i>Hilhorst, Laane, Veeger</i> (1983) [39]	Hydrogenase in CTAB/Octan/Hexanol [a]	Multienzym-System mit Progesteron als Substrat in der organischen Phase
<i>Delahodde et al.</i> (1984) [13]	Folch-Pi-Proteolipid in AOT/Isooctan	Solubilisierung eines wasserunlöslichen Proteins in inversen Micellen; spektroskopische Untersuchungen
<i>Pileni</i> (1981) [67]	Cytochrom in AOT/Isooctan	Reduktion von Cytochrom durch Photoelektronen-Transfer
<i>Luisi et al.</i> (1977-1979) [42, 12]	$\alpha$ -Chymotrypsin, Trypsin, Pepsin, Glucagon in Methyltrioctylammoniumchlorid/Cyclohexan	Transport von Enzymen in die organische Phase, spektroskopische Eigenschaften untersucht, Verlust der Enzymaktivität
<i>Wolf, Luisi</i> (1979) [23]	Ribonuclease in AOT/Octan	Spektroskopische Eigenschaften ähnlich wie in Wasser, Enzym bleibt aktiv
<i>Meier, Luisi</i> (1980) [25]	Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase in AOT/Isooctan	Spektroskopische Untersuchungen und Aktivitätsbestimmungen
<i>Bonner et al.</i> (1980) [24]	Mehrere Enzyme in AOT/Isooctan	Ultrazentrifugen-Untersuchungen und Vorschlag des Wasserhüllenmodells
<i>Barbarić, Luisi</i> (1981) [19]	$\alpha$ -Chymotrypsin in AOT/Isooctan	Aktivität und spektroskopische Eigenschaften in Abhängigkeit von $w_0$ und pH
<i>Grandi et al.</i> (1981) [22]	Lysozym in AOT/Isooctan	

[a] CTAB = Hexadecyltrimethylammoniumbromid. [b]  $\text{C}_{12}\text{E}_4$  = Tetraäthylenglycol-monododecylether.

son in Großbritannien, *Laane* in den Niederlanden sowie *Balasubramanian* in Indien. Einige Gruppen in Frankreich (*M. P. Pileni*, *M. Waks*, *J. F. Biellmann*) befassen sich mit zusätzlichen Problemen. – Wir werden in Abschnitt 4 und 5 auf Tabelle 2 zurückkommen.

Es ist uns gelungen, fast alle Arten von Proteinen zu solubilisieren. Schwierigkeiten gibt es allerdings noch bei den Häm-haltigen Proteinen: Hämoglobin und Myoglobin z. B. sind in inversen Micellen aus AOT/Isooctan nicht stabil, möglicherweise deswegen, weil die Häm-Gruppierung schnell dissoziiert, sobald das Protein in den inversen Micellen solubilisiert wird. Auch konnten wir bei Verwendung von AOT keine reproduzierbaren Aktivitätsdaten für Cytochrom P-450 erhalten.

Ein interessantes praktisches Problem betrifft die Definition und Bestimmung des pH-Wertes in der Wasserlache. Die Schwierigkeit rührt daher, daß man in einer Isooctanlösung, die etwa nur 1% Wasser enthält, eine Glaselektrode nicht zuverlässig anwenden kann; selbst wenn dies möglich wäre, würde man keine brauchbaren Werte erhalten, weil das Wasser der Wasserlache, insbesondere bei niedrigen  $w_0$ -Werten, ein neuartiges Lösungsmittel mit unbekannten Eigenschaften ist, für das es keine pH-Eichung gibt. Bei hohen Wassergehalten sind die Probleme wahrscheinlich weniger ernst (vgl. z. B. [14–17]). Allgemein scheint sich der pH-Wert inverser Micellen nicht mit Sicherheit bestimmen zu lassen. Wir haben eine empirische Eichung auf der Grundlage von  $^{31}\text{P}$ -NMR-Daten vorgeschlagen [16] (dabei wird die Konzentration der Phosphationen anhand der chemischen Verschiebung gemessen) – um jedoch durch diese Experimente pH-Werte zu erhalten, mußten wir annehmen, daß der pK-Wert der Phosphationen in inversen Micellen und in Wasser übereinstimmt –, eine willkürliche, aber doch recht vernünftige Annahme.

Ein anderes praktisches Problem betrifft die Definition der Konzentration der Gastmoleküle im Innern von inversen Micellen. Der Einfachheit halber soll ein mol einer Verbindung A, die nur in Wasser löslich ist, in einem Liter einer invers-micellaren Kohlenwasserstoffphase mit 1% Wasser ( $F_w = 0.01$ ) betrachtet werden. Die „Gesamtkonzentration“ (bezogen auf das Gesamtvolumen, das heißt Kohlenwasserstoff plus Wasser) beträgt  $[A]_{\text{ges}} = 1 \text{ M}$ ; die Konzentration in der Wasserlache (allein auf die „Wasser-Mikrophase“ bezogen) beträgt  $[A]_{\text{wl}} = [A]_{\text{ges}}/F_w = 100 \text{ M}$  (vgl. [18]). Geschwindigkeiten und alle anderen Daten mit der Dimension einer Konzentration können somit durch zwei Zahlenwerte ausgedrückt werden. Welcher davon ist physikalisch relevant? Das ist nicht nur eine rhetorische Frage, sondern berührt die Physik der inversen Micellen selbst. Zum Beispiel: Beträgt die Konzentration der  $\text{Na}^+$ -Ionen (der Gegenionen der Sulfonatgruppen) in inversen Micellen 50 mM oder  $(50/F_w) \text{ mM}$ ? Diese Frage ist auch wichtig, wenn Zahlenwerte in der Literatur verglichen werden sollen. In einigen simplen Fällen allerdings erübrigt sich die Frage, und die Unterschiede in der entscheidenden physikalischen Größe verschwinden, wenn die richtige Normalisierungsbasis durchgehend angewendet wird. Die Michaelis-Menten-Konstante in der Enzymkinetik ist ein solches Beispiel [36].

Das letzte, aber keineswegs unbedeutendste praktische Problem ist die Reinheit des Tensids. Käufliches AOT enthält meistens drei Arten von Verunreinigungen. Eine oder

mehrere noch nicht identifizierte Fremdstoffe geben sich durch UV-Absorption zu erkennen (Abb. 7). Außerdem enthält käufliches AOT oft eine saure Verunreinigung. Letztere kann eine signifikante Abnahme des pH-Wertes der Wasserlache gegenüber dem der wäßrigen Vorratslösung hervorrufen, die zur Herstellung der Wasserlachen in den Micellen verwendet wurde. Wir haben zwei Wege gefunden, um den Anteil der UV-absorbierenden Spezies beträchtlich zu vermindern: HPLC und Extraktion [20]. Auch die saure Verunreinigung kann entfernt werden [34]; bestimmte käufliche Proben sind in dieser Hinsicht von Anfang an viel besser als andere. *Robinson et al.* [18] haben auf eine andere Schwierigkeit hingewiesen: AOT kann im Alkalischen teilweise hydrolysieren. Schließlich kann käufliches AOT einen unbestimmten Anteil an Kochsalz enthalten, und Kochsalz ist eine Determinante der Konformation der Gast-Biomoleküle [10]. Grundsätzlich sollte man

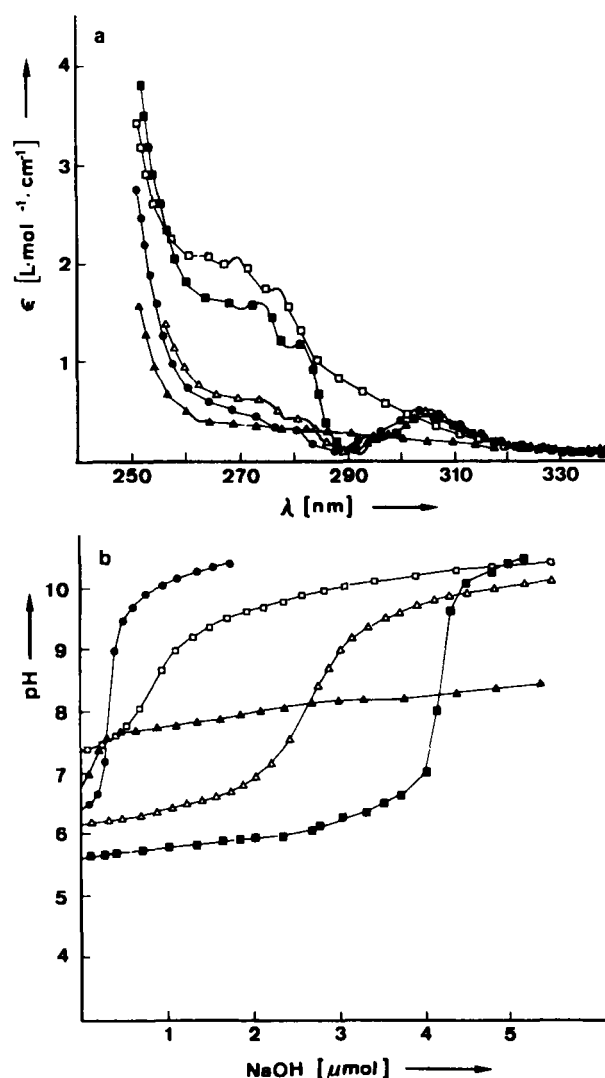


Abb. 7. UV-Absorptionsspektren (a) und potentiometrische Titrationskurven (b) von AOT aus verschiedenen Quellen. Die Spektren stammen von 50 mM AOT-Lösungen in spektroskopisch reinem Isooctan; es wurden ungefähr 2.2 mmol AOT in 10 mL Wasser/Methanol (1:1 v/v) vorgelegt und mit 0.1 N NaOH titriert. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  wurde so berechnet, als ob die Absorption nur auf AOT zurückzuführen wäre. So bedeutet z. B.  $\epsilon = 1 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  eine Absorption von 0.05 in einer Zelle von 1 cm Dicke. (□—□): Käufliches AOT (Firma SERVA); (Δ—Δ): gereinigt nach [34]; (■—■): gereinigt nach [34]; (●—●): Reinigung siehe Text; (▲—▲): gereinigt durch HPLC (nach [20]).

daher die Ionenstärke einer standardisierten wäßrigen AOT-Vorratslösung durch routinemäßige konduktometrische Messungen überprüfen.

Bei den heutigen verfeinerten Untersuchungsmethoden (z. B. in der Spektroskopie und Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivität und Konformationseigenschaften) ist nur das Arbeiten mit Proben bekannter chemischer Reinheit sinnvoll; nur dann lassen sich auch Ergebnisse aus mehreren Laboratorien vergleichen. Wir möchten diese Diskussion mit einem Beispiel beenden. Abbildung 8 zeigt das pH-Aktivitäts-Profil von  $\alpha$ -Chymotrypsin in Wasser und in zwei micellaren AOT-Kohlenwasserstoffphasen. Die erste Kurve ist unserer ersten Untersuchung entnommen<sup>[19]</sup>, als wir die Konsequenzen der sauren Verunreinigungen in käuflichem AOT noch nicht völlig erkannt hatten und nur die beschriebene Reinigungsprozedur anwendeten. In diesem Fall verschiebt sich das pH-Aktivitäts-Profil nach alkalischen Werten hin; dies kann (ganz oder teilweise) mit einer sauren Verunreinigung erklärt werden. Die andere Kurve ist mit einer HPLC-gereinigten AOT-Probe aufgenommen worden<sup>[20]</sup>, und nun zeigt die micellare Lösung ungefähr das gleiche pH-Aktivitäts-Profil wie die wäßrige Lösung. Dieses Ergebnis kann allerdings nicht verallgemeinert werden: So bleibt z. B. bei Lysozym und Ribonuclease auch mit gereinigtem AOT eine Verschiebung des pH-Optimums erhalten<sup>[20, 21]</sup>. Bei  $\alpha$ -Chymotrypsin scheinen die sauren Verunreinigungen in unseren alten AOT-Proben die Konformationseigenschaften (z. B. die stärker helicale Struktur) oder die merkwürdige Zunahme

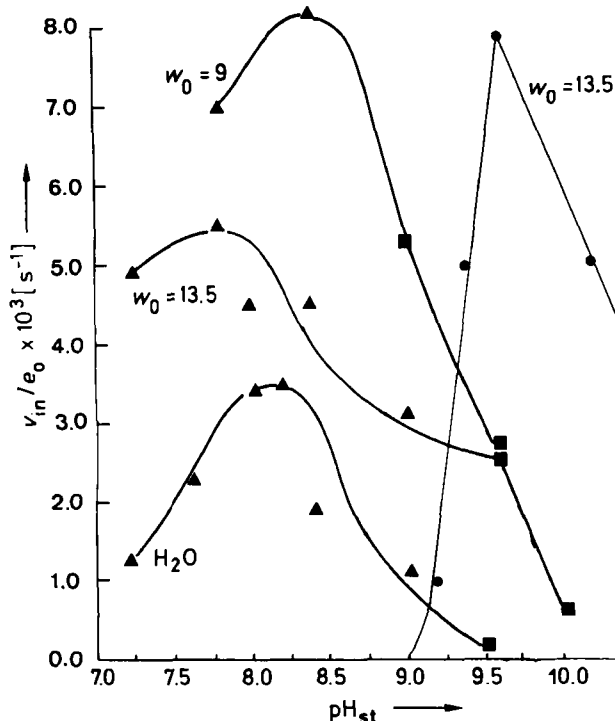


Abb. 8. Einfluß der Reinheit von AOT auf das pH-Profil enzymatischer Reaktionen am Beispiel der  $\alpha$ -Chymotrypsin-katalysierten Hydrolyse von *N*-Glutaryl-phenylalanin-*p*-nitroanilid. Die rechte Kurve ( $w_0 = 13.5$ ) stammt aus einer unserer älteren Arbeiten [19]: AOT wurde nach damaligen Literaturvorschriften gereinigt. Die beiden linken Kurven ( $w_0 = 9$  und  $w_0 = 13.5$ ) sind mit HPLC-gereinigtem AOT gemessen worden (hergestellt von P. Lüthi [30]; vgl. [20]). Ein anderes Beispiel dieser Art ist in [20] gezeigt.  $\text{pH}_{\text{St}}$  = pH-Wert der Vorratslösung;  $v_{\text{in}}/e_0$  = Anfangsgeschwindigkeit/Anfangsenzymkonzentration.

von  $k_{\text{cat}}$  bei niedrigem  $w_0$  über den in wäßriger Lösung gefundenen Wert hinaus nicht zu beeinflussen<sup>[19]</sup>.

### 3. Strukturelle Aspekte

Wo und wie liegt das Biopolymer im Innern der inversen Micelle vor – oder allgemeiner – was kann man über die Struktur der proteinhaltigen inversen Micellen aussagen? Diese Fragen sind bis heute nicht völlig geklärt. Wie Abbildung 9 zeigt, lassen sich mehrere Modelle konzipieren;

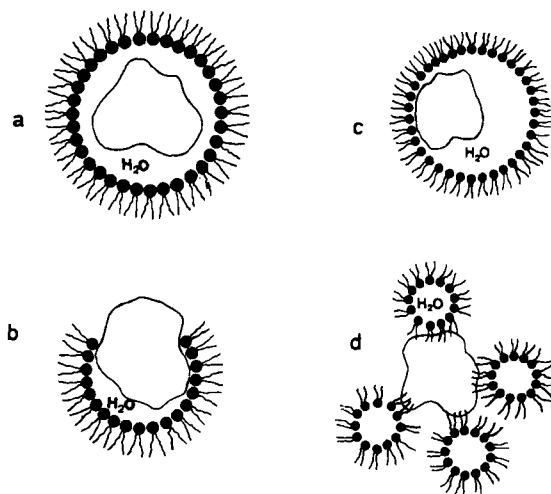


Abb. 9. Mögliche Modelle für ein Protein als Gast in einer inversen Micelle (siehe Text). a) Wasserhüllenmodell. Das Protein ist in der Mitte der Wasserlücke lokalisiert und wird vor der Micellwand durch eine Wasserschicht geschützt. b) Das Protein hat einen stark lipophilen Teil, der direkt mit den Kohlenwasserstoffketten wechselwirkt. c) Das Protein ist an der Micellwand adsorbiert. d) Das Protein wird mit mehreren kleinen Micellen solubilisiert, deren Kohlenwasserstoffketten mit den hydrophoben Teilen des Proteins wechselwirken.

möglicherweise ist die Antwort auf die obige Frage je nach Enzym verschieden. Wir nehmen an, daß die meisten Befunde durch das Wasserhüllenmodell (siehe Abb. 9a) interpretiert werden können. Nach diesem Modell befindet sich das Protein in der Mitte der Wasserlücke und ist durch eine Wasserschicht vor der geladenen Innenwand der Micelle und vor dem äußeren organischen Milieu geschützt<sup>[22, 24]</sup>. Für diese Annahme gibt es bis jetzt nur Indizienbeweise. Zum Beispiel hängen Konformation und Aktivität der Enzyme von  $w_0$  ab<sup>[22–27]</sup>; das deutet darauf hin, daß das Enzym gegenüber der Menge des umgebenden Wassers empfindlich ist. Dies wäre nicht der Fall, wenn das Enzym mit dem aktiven Zentrum und dessen Umgebung an der Innenwand der inversen Micelle haften würde, oder wenn das Enzym in der Hauptsache dem organischen Medium ausgesetzt wäre. Im letztgenannten Fall würden die meisten Enzyme sowieso denaturiert. Schließlich deutet der gemessene Cirkulardichroismus bei einigen Enzymen, z. B. Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase, Ribonuclease und Lipoxigenase, auf ziemlich ähnliche Konformationen in den inversen Micellen und in reinem Wasser hin<sup>[25, 28, 23]</sup>. (Bei Lysozym und anderen Enzymen zeigen sich dagegen deutliche Unterschiede<sup>[23, 19]</sup>.)

Ein zusätzlicher indirekter Beweis für das Wasserhüllenmodell ist der Befund, daß die Enzymkinetik in inversen Micellen anscheinend im wesentlichen die gleiche wie in

wäßriger Lösung ist<sup>[22-27]</sup>. Darüber hinaus bildet das pH-Aktivitäts-Profil der Enzyme in inversen Micellen eine sehr ähnliche – nur etwas verschobene – Glockenkurve wie in reinem Wasser<sup>[22, 27, 29]</sup>. Wenn das Enzym aufgrund elektrostatischer Effekte an der Micellinnenwand haften würde, wären bei der Dissoziation unter Erhöhung seiner negativen Ladung recht drastische Aktivitätsänderungen zu erwarten. Bei  $\alpha$ -Chymotrypsin läßt sich ein weiterer indirekter Beweis ableiten: Die Fluoreszenzeigenschaften von  $\alpha$ -Chymotrypsin in inversen Micellen mit  $w_0 \geq 7$  (das heißt, wenn „freies“ Wasser vorhanden ist) und in reinem Wasser<sup>[19]</sup> sind sehr ähnlich. Dies deutet darauf hin, daß das aktive Protein im wesentlichen von Wasser umgeben ist.

Anhand des Wasserhüllenmodells haben wir eine Methode entwickelt, die zum Teil auf Ultrazentrifugen-Experimenten basiert<sup>[24]</sup> und die es uns ermöglicht, die Dimensionen der proteinhaltigen Micellen und die micellaren Parameter abzuschätzen, die solche Aggregate charakterisieren. Diesem Modell liegen einige Annahmen zugrunde, deren wichtigste besagt, daß das Volumen einer proteinhaltigen Micelle die algebraische Summe aus dem Volumen des Proteins und dem Volumen des ursprünglich in der „leeren“ Micelle vorhandenen Wassers ist und daß  $w_0$  sich nicht ändert. Die beiden gestrichelten Kurven in Abbildung 3 zeigen die Größe der proteinhaltigen Micellen in Abhängigkeit von  $w_0$  gemäß unserem Modell<sup>[24]</sup>. Auffallend ist, daß bei kleinen Proteinen wie Ribonuclease bei  $w_0 \geq 15$  nur ein sehr kleiner Größenunterschied zwischen „leeren“ (nur mit Wasser gefüllten) und (mit dem Protein) „gefüllten“ Micellen besteht. Im Gegensatz dazu induziert das Protein bei kleinen  $w_0$ -Werten eine Vergrößerung der inversen Micellen (mit einer darauffolgenden Massen-Umverteilung in der micellaren Lösung). Bei einem größeren Enzym wie Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase ( $M_r$  80000) sind die Micellen mit Gastmolekülen auch bei hohen  $w_0$ -Werten immer größer als die leeren Micellen. Es ist heute zweifelhaft, ob das erste angenäherte Modell für alle Enzyme gilt. Die Gruppe um Martinek hat ein Modell präsentiert, das ebenfalls auf Befunden von Ultrazentrifugen-Messungen basiert. Nach diesem Modell ruft die Aufnahme von  $\alpha$ -Chymotrypsin keine wesentliche Vergrößerung der inversen Wirtsmicelle hervor<sup>[26, 31]</sup>. Unsere Neutronenstreuungs-Untersuchungen (durchgeführt im Oak Ridge National Laboratory in Zusammenarbeit mit L. Magid) scheinen dagegen um mindestens 30% größere Dimensionen für die lysozymhaltigen Micellen zu ergeben, als unser ursprüngliches Modell vorhergesagt hatte. Die Dinge sind demnach noch völlig im Fluß.

#### 4. Reaktivität von Enzymen in inversen Micellen

Auf der bisher erarbeiteten Grundlage sollte sich qualitativ verstehen lassen, welche micellaren Parameter die Aktivität eines in inversen Micellen eingelagerten Enzyms beeinflussen können. Wenn genug „freies“ Wasser vorliegt (nämlich bei  $w_0 > 7-8$ ), könnte man erwarten, daß die Aktivität sehr ähnlich wie in reinen wäßrigen Lösungen ist und daß der Cyclus im stationären Zustand einfach wie in Abbildung 2c dargestellt werden kann: Demnach bilden Enzym- und Substratmoleküle den aktiven Komplex, der schließlich zum Produkt zerfällt, das vom Enzym abdisso-

ziiert. Der Unterschied gegenüber der Reaktion in wäßriger Lösung liegt nun darin, daß in micellarer Lösung jeder bimolekulare Schritt die Kollision und das Zusammenfließen der Micellen erfordert<sup>[24]</sup>.

Bei niedrigen  $w_0$ -Werten, wenn die meisten Wassermoleküle an die innere Oberfläche der AOT-Micellen gebunden sind, könnte man Wechselwirkungen zwischen der Proteinoberfläche und der Innenwand der inversen Micellen erwarten, die den Mechanismus beeinflussen können. Bei niedrigen  $w_0$ -Werten können außerdem Abweichungen vom normalen Aktivitätsprofil erwartet werden, weil das Wasser in der Wasserlache ein neuartiges Lösungsmittel ist. Ein anderer Effekt, der die Enzymaktivität in dieser Hinsicht beeinflussen kann, ist der lokale pH-Wert. Auch die Transportgeschwindigkeit des Substrats in die inversen Micellen hinein und des Produkts aus ihnen heraus kann im Prinzip eine Rolle spielen. In der Abhängigkeit von der Struktur der Micellen oder vom Konzentrationsverhältnis von Micellen und Substratmolekülen können diese Vorgänge möglicherweise zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden.

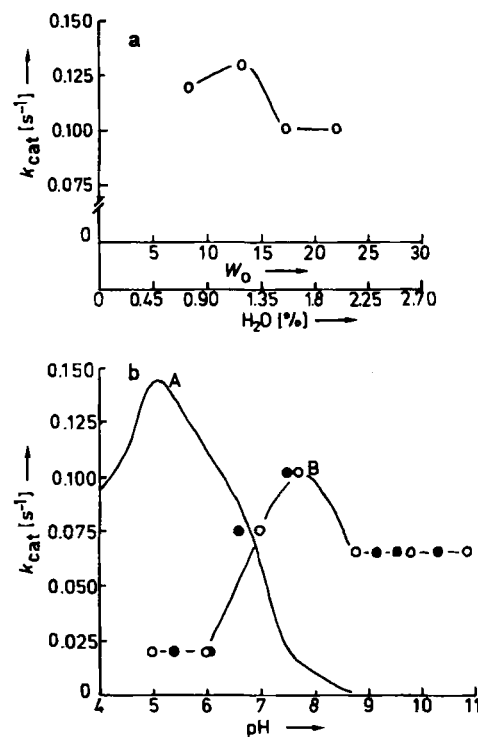


Abb. 10. Abbau von Chitin mit Lysozym in micellaren Lösungen aus 50 mM AOT/Isooctan; Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{cat}$  vom Wassergehalt (a) und vom pH-Wert (b). Kurve A zeigt zum Vergleich eine wäßrige Lösung; Kurve B bezieht sich auf die micellaren Lösungen. ○: pH-Werte der Vorratslösungen, die zum Bereiten der Wasserlachen in den inversen Micellen verwendet wurden ( $pH = pH_n$ ); ●: pH-Werte, die  $^{31}P$ -NMR-spektroskopisch in den invers-micellaren Lösungen gemessen wurden;  $w_0 = 16.8$  (aus [16] und [22]).

Vor diesem Hintergrund sollen nun einige Enzyme betrachtet werden. Abbildung 10 zeigt die Aktivität von Lysozym in Abhängigkeit vom pH-Wert in Wasser und in inversen Micellen. Es fällt auf, daß die Geschwindigkeit um  $w_0 = 10$  und nicht beim maximalen Wassergehalt am höchsten ist. Dieser überraschende Befund kann auf alle Hydrolasen verallgemeinert werden. Bemerkenswert ist auch

die Verschiebung des pH-Optimums im Vergleich zu Wasser, die einem Unterschied im pK-Wert der an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste zugeschrieben werden könnte. Die Umsatzzahl beim pH-Optimum ist nicht viel anders als in Wasser; demnach scheint sich Lysozym mit Ausnahme der pH-Verschiebung der Aktivitätskurve in inversen Micellen ziemlich normal zu verhalten. Wenn man die Konformation des Proteins in inversen Micellen betrachtet, liegen die Dinge jedoch nicht so einfach. Wie Abbildung 11 zeigt, existieren große Unterschiede in den Circular dichroismus (CD)-Spektren von Lysozym in Wasser und in micellaren Lösungen<sup>[22,21]</sup>. Bekanntlich spiegelt das CD-Spektrum im nahen UV die Situation der aromatischen Aminosäurereste des Proteins wider, während das CD-Spektrum im fernen UV, besonders im Bereich von 220 nm, durch die Sekundärstruktur des Proteins bestimmt wird. Zunächst soll das nahe UV betrachtet werden. Weil die UV-Absorptionsspektren von Lysozym in diesem Gebiet in Wasser und in inversen Micellen gleich sind<sup>[22]</sup>, kann man die im CD-Spektrum beobachteten Veränderungen auf Konformationsänderungen zurückführen. Demnach sind wahrscheinlich mehrere aromatische Seitenketten von Lysozym in Wasser und in inversen Micellen verschieden angeordnet. Die CD-Spektren im Bereich kleinerer Wellenlängen, wo auch die UV-Absorption der micellaren Lösung höher ist, können mit einer Zunahme des helicalen Anteils erklärt werden. Demnach zeigen die CD-Spektren in Abbildung 11, daß das Enzym seine konformationelle Spezifität verloren hat, ohne an Aktivität zu verlieren. Um dieses Paradoxon zu interpretieren, haben wir vorgeschlagen, daß die Konformationsänderungen des Enzyms vielleicht nur periphere Bereiche betreffen<sup>[22]</sup>, die ziemlich weit vom aktiven Zentrum entfernt sind. Man darf aber nicht vergessen, daß sich drei der fünf Tryptophanreste von Lysozym in der Nähe des aktiven Zentrums oder darin befinden; man kann sich nicht gut vorstellen, daß sich die Konformation dieser aromatischen Reste ändert, ohne daß die gesamte Geometrie des aktiven Zentrums beeinflusst wird. Wir untersuchen derzeit die CD-Spektren von Lysozym in inversen Micellen in Gegenwart von Inhibitoren und/oder Substraten, um diesen Punkt zu klären.

Auch bei Chymotrypsin ist die Situation sehr interessant. Wie man Tabelle 2 entnehmen kann, haben sich bisher mindestens vier Gruppen mit diesem System befaßt. *Menger* und *Yamada*<sup>[29]</sup>, die Chymotrypsin als erste in inversen Micellen untersuchten, fanden zunächst mit einem Ester-Substrat beim nominellen pH-Wert 7 keine Aktivität. Der Grund war, daß die micellare Umgebung das pH-Aktivitäts-Profil des Enzyms drastisch verändert hatte. Tatsächlich konnten sie im alkalischen pH-Bereich eine sehr hohe Aktivität nachweisen. Wir fanden mit dem Amid-Substrat *N*-Glutaryl-phenylalanin-*p*-nitroanilid, daß bei niedrigen  $w_0$ -Werten die Umsatzzahl größer ist als in Wasser<sup>[19]</sup>. Der Effekt ist zwar nicht sehr groß, aber doch beachtenswert. Von besonderem Interesse ist in diesem Fall die Beziehung zwischen der Aktivität und der Konformation der Hauptkette des Enzyms, die wieder durch Circular dichroismus bestimmt wird. Auch hier wird die Elliptizität bei 220 nm verstärkt, was wiederum als Zunahme des helicalen Anteils interpretiert werden kann. Um die Aktivitätserhöhung zu interpretieren, ist postuliert worden<sup>[19]</sup>,

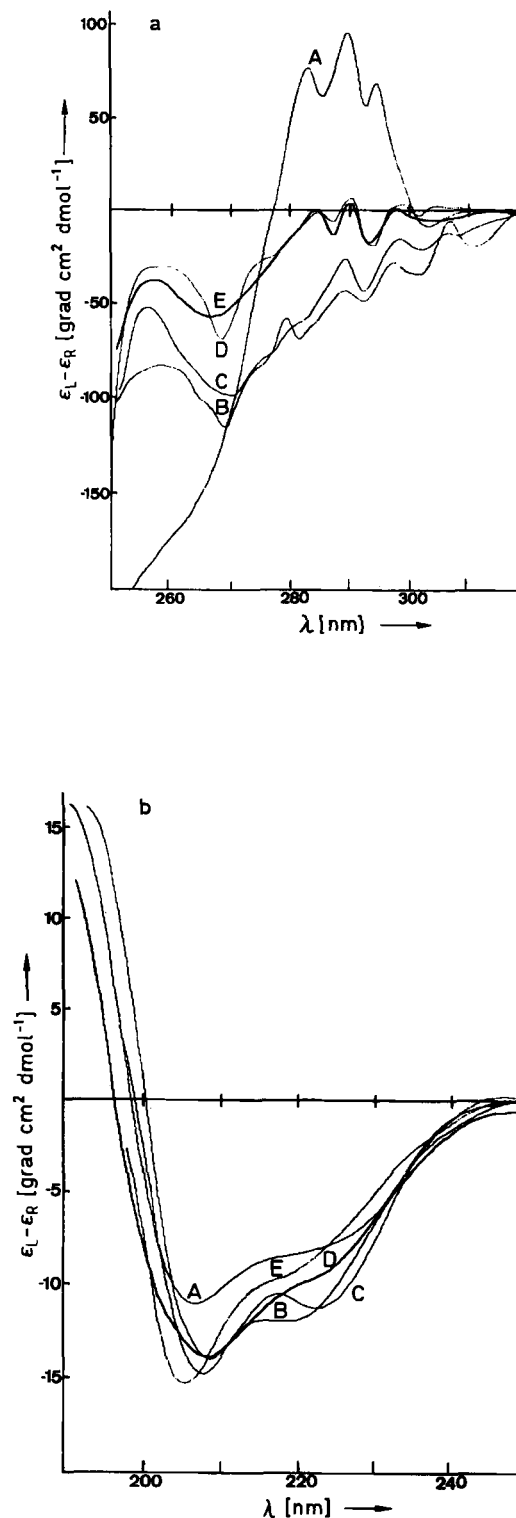


Abb. 11. CD-Spektren von Lysozym im nahen (a) und fernen UV (b); in Wasser (A) und in inversen AOT-Micellen bei  $w_0=3$  (B),  $w_0=6$  (C),  $w_0=16$  (D) und  $w_0=25$  (E).

daß in inversen Micellen das Konformationsgleichgewicht von  $\alpha$ -Chymotrypsin zur aktiveren Form des Enzyms verschoben ist.  $\alpha$ -Chymotrypsin ist nicht das einzige Beispiel für „Superaktivität“. Auch für Ribonuclease<sup>[23,34]</sup> und für Lysozym<sup>[21]</sup> ist, ebenfalls bei niedrigen  $w_0$ -Werten, ein Anstieg gefunden worden. *Martinek* et al.<sup>[27,35]</sup> haben von einer großen Aktivitätserhöhung von Peroxidase berichtet (Abb. 12).



Dehydrogenasen sind in der präparativen bioorganischen Chemie besonders interessant. Aus Tabelle 2 geht hervor, daß Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase von mehreren Gruppen untersucht worden ist. Zusätzlich zur Reduktion von Acetaldehyd wurde auch die Reduktion eines stark lipophilen Substrats (Decanal) und eines Steroidhormons getestet<sup>[25]</sup>. Einen interessanten Befund mit diesem Enzym veröffentlichte die russische Gruppe um *Martinek*: Die relative Spezifität von Alkoholen scheint in invers-micellaren Lösungen anders zu sein als in wäßriger Lösung<sup>[35]</sup>.

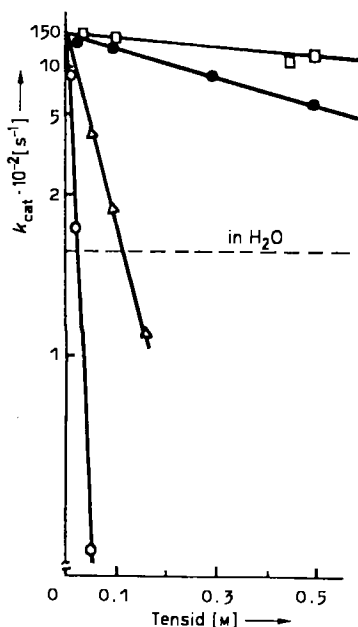


Abb. 12. Oxidation von Pyrogallol mit Peroxidase. Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{cat}$  von der Tensidkonzentration (aus [2]). (□—□): AOT in Octan, 0,1 M Imidazolpuffer; (●—●): AOT in Octan; (Δ—Δ): Dodecylammonium-propionat in Ethylether/Benzol (1:2); (○—○): Eilecithin in Methanol (2,5% v/v)/Pentanol (5% v/v)/Octan. 26°C,  $w_0 = 13$ , 0,025 M wäßriger Puffer (Phosphat-Borat-Acetat), pH 7,0. Der kinetische Assay wurde nach [37] durchgeführt.

Bei den kinetischen Parametern ist es eine wichtige Frage, ob  $K_m$  in inversen Micellen anders als in Wasser ist. Wir haben bereits darauf hingewiesen<sup>[36]</sup>, daß  $K_m$  in inversen Micellen als  $K_{m,ges}$  dargestellt werden sollte, damit es korrekt mit den Werten in wäßriger Lösung verglichen werden kann. Tabelle 3 zeigt einige typische Beispiele. Im allgemeinen stimmen die  $K_m$ -Werte in Wasser und in inversen Micellen weitgehend überein. Die Effizienz der Enzyme (üblicherweise angegeben als  $k_{cat}/K_m$ ) wird demnach durch die Solubilisierung in inversen Micellen auch nicht beeinträchtigt. Die Stabilität der Enzyme in inversen Micellen ist für kinetische Studien wichtig; für biotechnologische Anwendungen ist sie unerlässlich (siehe dazu Abschnitt 5). Bis jetzt gibt es nicht viele systematische Untersuchungen über dieses wichtige Thema. Bei Chymotrypsin<sup>[19]</sup> hängt die zeitliche Stabilität von  $w_0$  ab; das Enzym kann bei niedrigen  $w_0$ -Werten nicht nur aktiver, sondern auch stabiler sein als in Wasser. *Martinek* et al. haben die Stabilität mehrerer Enzyme in inversen Micellen aus mehreren Tensiden und/oder organischen Lösungsmitteln untersucht<sup>[37]</sup>.

Tabelle 3. Kinetische Parameter enzymatischer Reaktionen in inversen Micellen (Isooctan/AOT/Wasser).  $pH_{st}$  = pH-Wert der Vorratslösung [a].

System	$K_m$ [ $\mu$ M] [b]	$K_m^{NADH}$ [ $\mu$ M]	$v/e$ [ $s^{-1}$ ]
LADH in Wasser [c], pH 7.1	110–375	10–11	114
LADH in Wasser, pH 9	400	3	5
LADH in Micellen, $w_0 = 42$ , $pH_{st} = 8.8$	300	23	80
LADH in Micellen, $w_0 = 19$ , $pH_{st} = 9.2$	—	20	30
Lysozym in Wasser [d], pH 5.1	10	—	0.14
Lysozym in Micellen, $w_0 = 22.2$ , $pH_{st} = 7.6$	2	—	0.10
$\alpha$ -Chymotrypsin in Wasser [e], pH 7.9	600	—	0.7
$\alpha$ -Chymotrypsin in Micellen, $w_0 = 13.5$ , $pH_{st} = 9.8$	450	—	2.3
$\alpha$ -Chymotrypsin in Micellen, $w_0 = 9$ , $pH_{st} = 11.8$	400	—	4.2

[a] Tabelle aus [53] entnommen und umgestellt. Einzelheiten siehe [19, 22, 25]. [b] Als Gesamtkonzentration angegeben. [c] Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase mit Acetaldehyd als Substrat. [d] Chitin-Oligomere als Substrat. [e] N-Glutaryl-phenylalanin-p-nitroanilid als Substrat.

## 5. Biotechnologische Bedeutung

Bis jetzt sind hydrophile Enzyme mit ihren wasserlöslichen Substraten behandelt worden. Ein sehr interessanter Aspekt enzymhaltiger inverser Micellen ist ihre Fähigkeit, wasserunlösliche, in Kohlenwasserstoffen lösliche Substrate aufzunehmen und umzuwandeln. Als Beispiel soll Lipoxxygenase gewählt werden. Das Enzym, obwohl lipophil, ist gut in Wasser löslich (und unlöslich in Kohlenwasserstoffen) und ist daher wahrscheinlich in der Wasserphase der inversen Micellen anzutreffen. Der Befund, daß das kinetische Verhalten dem in Wasser ähnelt, stützt diese Ansicht. Das Substrat Linolsäure ist bei neutralen oder sauren pH-Werten nicht oder nur sehr wenig in Wasser löslich. Es löst sich aber in Isooctan und kann als reine Flüssigkeit zu einer micellaren Lösung gegeben werden, die Lipoxxygenase enthält. Die spektrophotometrische Analyse der Lösung zeigt, daß das Substrat enzymatisch in die erwarteten Produkte umgewandelt wird<sup>[28]</sup>. Typische Meßwerte sind in Abbildung 13 zu sehen. Der wichtigste Punkt

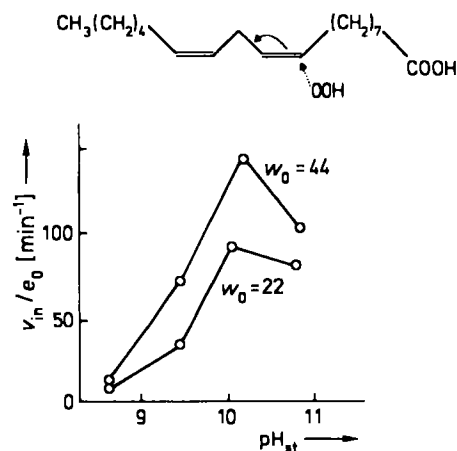


Abb. 13. pH-Aktivitäts-Profil der Lipoxxygenase-Reaktion. Enzyme in inversen Micellen reagieren sowohl mit wasserlöslichen als auch mit wasserunlöslichen (in Kohlenwasserstoffen löslichen) Substraten. Ein Beispiel ist die Oxidation von Linolsäure mit Lipoxxygenase. [Enzym] =  $2.5 \cdot 10^{-8}$  M, [Substrat] =  $4 \cdot 10^{-4}$  M, [AOT] =  $10 \cdot 10^{-3}$  M, Isooctan. Angegeben sind Gesamtkonzentrationen.  $v_{st}/e_0$  siehe Abb. 8.

dabei ist, daß das im Kohlenwasserstoff gelöste Substrat seinen Weg zum aktiven Zentrum des Enzyms in der inversen Micelle findet, das heißt durch die Wasserhülle, die das Enzym umgibt. Wie dies geschehen kann, ist bis jetzt nicht geklärt. Es mag sein, daß die besonderen physikalischen Eigenschaften des Wassers in den inversen Micellen, zum Beispiel eine geringere Dielektrizitätskonstante, zu einer höheren Löslichkeit lipophiler Substrate führen. Eine andere Möglichkeit besonders für Linolsäure oder analoge Substrate wie Arachidonsäure besteht darin, daß sie als Cotenside in die micellare Grenzschicht eingebaut werden und daß das Enzym dynamisch mit der inneren Micellwand in Wechselwirkung tritt. Die Löslichkeit lipophiler Stoffe in inversen Micellen ist aber nicht auf Fettsäuren beschränkt; auch Steroide<sup>[25,39]</sup>, langkettige Aldehyde<sup>[25]</sup> oder wasserunlösliche Peptide<sup>[40]</sup> werden leicht von den jeweiligen Enzymen in inversen Micellen als Substrate akzeptiert. Daß der Mechanismus dieser Aufnahme noch nicht geklärt ist, mindert die biotechnologische Relevanz dieses Befundes nicht: Wasserunlösliche, in Kohlenwasserstoffen lösliche Substrate können enzymatisch in ihre Produkte umgewandelt werden (Übersicht über die wenigen verfügbaren Ergebnisse siehe <sup>[28]</sup>). Dies könnte den Weg für eine neue Anwendung von Enzymen in Organischer Chemie und Biotechnologie eröffnen. Das Interesse wird durch die Beobachtung noch vergrößert, daß sich fast alle bisher getesteten Enzyme in inversen Micellen solubilisieren lassen – es handelt sich demnach um eine weitgehend allgemeine Methode (im Gegensatz dazu scheint z. B. die Anwendung von Enzymen in zweiphasigen Systemen nicht zu verallgemeinern zu sein, weil viele Enzyme unter solchen Bedingungen schnell denaturiert werden). Vorläufige Ergebnisse über die Anwendung von  $\alpha$ -Chymotrypsin zur Knüpfung von Peptidbindungen sollten ebenfalls erwähnt werden: Acetyl-alanyl-phenylalanin-ethylester und Leucinamid werden enzymatisch zum wasserunlöslichen, in Isooctan löslichen, geschützten Tripeptid AcAla-Phe-LeuNH<sub>2</sub> gekuppelt, das nach seiner Erzeugung in der Wasserphase in die Kohlenwasserstoffphase ausgestoßen wird. Die Reaktion wird in einem Enzymreaktor mit Kohlenwasserstoff-beständigen, semipermeablen, hohlen Fasern durchgeführt<sup>[40]</sup>, in denen die enzymhaltigen inversen Micellen eingeschlossen sind. Dadurch kann das reine Produkt physikalisch vom Enzym und von den Reagentien abgetrennt werden.

Obwohl solche Reaktionen für organische Synthesen interessant sein dürften, gibt es noch kein Beispiel für eine relevante praktische Anwendung von Enzymen in inversen Micellen. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, sind *Hilhorst, Laane* und *Veeger*<sup>[39,41]</sup> in Wageningen diesem Ziel bis jetzt am nächsten gekommen. Sie konnten in invers-micellarer Lösung gleichzeitig drei Enzyme solubilisieren, die in einer Kettenreaktion ein Ketosteroid regioselektiv reduzieren. Abbildung 14 zeigt, daß molekularer Wasserstoff von einer Hydrogenase (H<sub>2</sub>ase) auf Methylviologen (MV) übertragen wird, das seinerseits das System NAD/NADH mit Lipoamid-Dehydrogenase (LipDH) regenerieren kann. Schließlich reduziert NADH das Ketosteroid in einer von einer spezifischen Steroid-Dehydrogenase (HSDH) katalysierten Reaktion.

Die enzymatische Umwandlung lipophiler Substrate ist nicht der einzige Bereich, in dem inverse Micellen für bio-

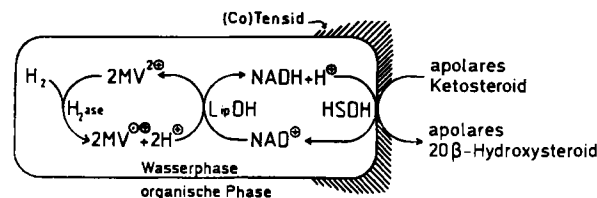


Abb. 14. Das Schema von *Hilhorst, Laane* und *Veeger* [39]: Drei Enzyme wirken in inversen Micellen in einer Kettenreaktion zusammen und reduzieren ein wasserunlösliches Ketosteroid (siehe Text).

technologische Anwendungen genutzt werden können. Ein anderer interessanter Aspekt ergibt sich zum Beispiel aus dem Phasentransfer von Proteinen und Nucleinsäuren. In der Tat geht unser Interesse an den inversen Micellen auf den Transfer von Aminosäuren, Peptiden und später Polypeptiden und Proteinen aus einer wäßrigen Lösung in eine unpolare Lösung zurück, die das Tensid enthält<sup>[11,12,42]</sup>.

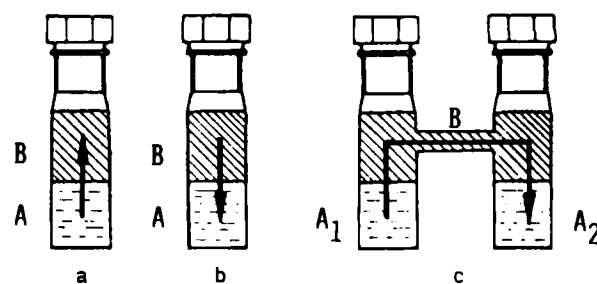


Abb. 15. Phasentransferprozesse. a) Beim „Vorwärtstransfer“ wird das Protein aus der Wasserphase A in eine micellare Lösung B gebracht; b) beim „Rückwärtstransfer“ wird das Protein aus der micellaren Lösung B in eine Wasserphase A überführt; c) beim „Doppeltransfer“ wird das Protein vektoriell mit der invers-micellaren Lösung B, die sich in einer Brücke befindet, von der ersten Wasserphase A<sub>1</sub> zur zweiten Wasserphase A<sub>2</sub> transportiert. Die Gefäße werden während des Experimentes leicht geschüttelt. Das Schütteln wird periodisch zur Probenahme unterbrochen.

Abbildung 15 zeigt die drei Möglichkeiten beim Phasentransfer (vgl. <sup>[46]</sup>). Beim „Vorwärtstransfer“ wird das Protein aus einer wäßrigen Lösung in eine darübergeschichtete micellare Lösung transportiert. Beim „Rückwärtstransfer“ wird das im unpolaren Medium solubilisierete Enzym als wäßrige Lösung zurückgewonnen. Beim „Doppeltransfer“ überführt man das Biopolymer aus einer Wasserphase in eine andere Wasserphase; die Brücke zwischen diesen Phasen enthält den Kohlenwasserstoff mit den inversen Micellen. In allen Fällen wird der Transport des Proteins von den Micellen bewerkstelligt. Bis jetzt haben wir nur vorläufige Ergebnisse präsentiert, doch scheint es möglich zu sein, die Methode zur Trennung von Biopolymeren zu verwenden. Mit solchen Projekten sind zur Zeit mehrere Gruppen beschäftigt<sup>[43,44]</sup>. Die Trennung von Proteinen und Nucleinsäuren sollte ebenfalls möglich sein, da der Transfer von DNA wesentlich langsamer als der von Proteinen ist. – Auch die von der Gruppe von *Speiser* aufgezeigte Anwendung inverser Micellen als Arzneistoff-Trägersystem<sup>[45]</sup> sollte erwähnt werden (vgl. <sup>[46]</sup>).

Die biotechnologische Relevanz wird also vehement getestet; in einigen Jahren wird sich zeigen, ob und in welchem Ausmaß sich die gegenwärtigen Erwartungen erfüllen haben.

## 6. Nucleinsäuren

Die Innenwand inverser AOT-Micellen ist negativ geladen, und obwohl eine stöchiometrische Menge positiv geladener Natrium-Ionen vorhanden ist, war die Solubilisierung von negativ geladenen Polyelektrolyten wie RNA oder DNA doch eine Überraschung. Nucleinsäuren lassen sich in unpolaren micellaren Lösungen schnell solubilisieren<sup>[47]</sup>; bei alkalischen pH-Werten ist dies sogar einfacher. Der Mechanismus der Aufnahme von Nucleinsäuren ist noch nicht klar. Wir wissen, daß die Solubilisierung hochmolekularer DNA nur bei relativ hohen  $w_0$ -Werten, zum Beispiel über 14, stattfinden kann. Proteine verhalten sich anders.

Ändert sich die Struktur hochmolekularer Nucleinsäuren bei der Aufnahme in inverse Micellen? Die Solubilisierung wird von einer Abnahme der Absorption um 260 nm und einer korrespondierenden Zunahme der Elliptizität begleitet<sup>[47]</sup>. Dies kann als Zunahme der Basenpaar-Wechselwirkungen interpretiert werden (es werden mehr Wasserstoffbrücken gebildet), die eine Zunahme des hypochromen Effekts im UV und eine konformationelle Versteifung der Makromoleküle bewirkt<sup>[32]</sup>. Das Bild ist also dem für Proteine vorgeschlagenen nicht unähnlich. Der Effekt ist deutlicher bei RNA, die in wäßriger Lösung flexibler ist, als bei DNA, die schon als steife Doppelhelix vorliegt; bei Oligonucleotiden mit niedrigem Molekulargewicht ist der Effekt nicht signifikant. Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, daß auch das Plasmid pBR 332 ( $M_r = 2.7 \cdot 10^6$ ) in inversen Micellen aus Isooctan/AOT/Wasser solubilisiert werden kann. Wir sind noch mit der Untersuchung der Struktur solcher Aggregate beschäftigt; es ist nicht leicht vorstellbar, wie eine kleine Micelle solch ein großes Molekül aufnehmen kann. Sicher ist mit der Aufnahme eine Vergrößerung der ursprünglichen Micelle mit einer Substanz-Umverteilung verbunden. Das Interesse an diesen Solubilisierungsexperimenten rührt auch daher, daß die CD-Spektren der plasmidhaltigen Micellen (Abb. 16) zur

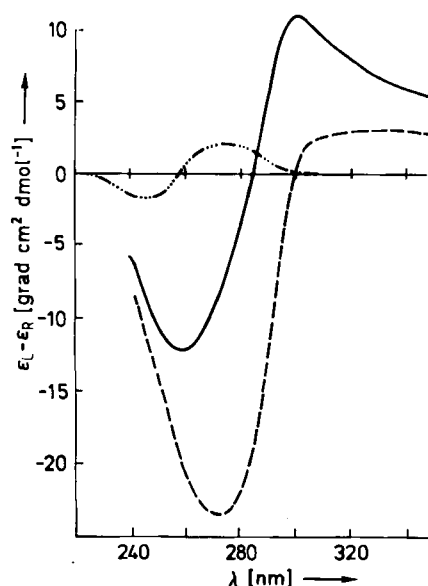


Abb. 16. CD-Spektren der DNA des Plasmids pBR-322 in inversen AOT-Micellen ( $\psi$ -Spektrum). (---): Boratpuffer; (—): AOT/Isooctan,  $w_0 = 18.5$ ; (---): AOT/Isooctan,  $w_0 = 14.8$  [69].

$\Psi$ -Familie gehören<sup>[48]</sup>. Von solchen Spektren wird angenommen, daß sie für supergepackte DNA charakteristisch sind, wie sie in vivo vorkommt, wenn den langen Makromolekülen nur ein sehr kleiner Raum zur Verfügung steht (Kopf eines Virus, Chromatin). Die spektroskopische Untersuchung solcher Strukturen in inversen Micellen sollte dadurch erleichtert werden, daß das Kohlenwasserstoffmedium spektroskopisch nicht mit Wasser oder Nucleinsäuren interferiert. Untersuchungen in dieser Richtung sind in unserer Gruppe im Gange<sup>[69]</sup>.

## 7. Schlußbemerkungen

Biopolymerhaltige inverse Micellen interessieren nicht nur wegen ihrer möglichen biotechnologischen Bedeutung, sondern auch deswegen, weil solche Strukturen möglicherweise in vivo in biologischen Membranen vorkommen<sup>[33, 49–52, 68]</sup>. Vielleicht der erste Hinweis darauf leitet sich von der wohlbekannten hexagonalen Struktur ab, die gelegentlich von Phospholipiden gebildet wird. Die Gruppe von *de Kruijff* in Utrecht<sup>[49, 50, 52]</sup> hat die überzeugendsten Argumente für die biologische Relevanz inverser Micellen vorgelegt. Noch läßt sich die Frage nach der biologischen Relevanz inverser Micellen für die Membranstruktur aber nicht definitiv beantworten (vgl. [38]). Die Frage nach der möglichen Existenz inverser Micellen in vivo hängt eng mit der Frage zusammen, ob und in welchem Ausmaß inverse Micellen als geeignete Modelle für biologische Membranen angesehen werden können. Auf den Mißbrauch des Begriffs „biologisches Modell“ soll hier nicht eingegangen werden (vgl. Appendix zu [36]).

Trotz der ungeklärten biologischen und biotechnologischen Bedeutung von Biopolymeren in inversen Micellen zeigt diese Übersicht dennoch die Faszination des Gebiets. Es erstreckt sich über recht verschiedene Teilbereiche, von der Biotechnologie zur reinen Biologie, von einfacher Enzymologie bis zur Struktur von Nucleinsäuren, und berührt eine Vielzahl wichtiger physikalischer Aspekte. Dazu gehören der Transfer von Makromolekülen und niedermolekularem Material durch Grenzflächen ebenso wie Struktur und Stabilität neuartiger Biopolymer-Aggregate.

*Meinen Studenten Ergin Imre und Bettina Steinmann-Hoffmann sowie Dr. Hans Jäckle und Prof. Lee Magid, Gastprofessor von der University of Tennessee, danke ich für die sehr wertvollen Diskussionen.*

Eingegangen am 25. Juni 1984 [A 536]  
Übersetzt von Dipl.-Chem. Renate Keller, Mainz

- [1] J. H. Fendler: *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley, New York 1982.
- [2] F. M. Menger, J. A. Donohue, R. F. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 286.
- [3] S. Harada, Z. A. Schelly, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 2098.
- [4] a) H. F. Eicke, T. C. W. Shepherd, A. Steinemann, *J. Colloid Interface Sci.* 56 (1976) 168; b) B. H. Robinson, D. Steytler, R. Tack, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* 75 (1979) 481; c) R. Zana, J. Lang in K. L. Mittal, J. H. Fendler: *Solution Behaviour of Surfactants*, Vol. 2, Plenum, New York 1982.
- [5] H. F. Eicke, J. Rehak, *Helv. Chim. Acta* 59 (1976) 2883.
- [6] M. Zulauf, H. F. Eicke, *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 480.
- [7] M. Wong, J. K. Thomas, T. Nowak, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 4730.
- [8] H. F. Eicke, P. Kvita in [9], S. 21.
- [9] P. L. Luisi, B. Straub: *Reverse Micelles - Technological and Biological Relevance*, Plenum, New York 1984.
- [10] L. Gierasch in [9], S. 265.

- [11] A. Dossena, V. Rizzo, R. Marchelli, G. Casnati, P. L. Luisi, *Biochim. Biophys. Acta* 446 (1976) 493.
- [12] P. L. Luisi, F. Henninger, M. Joppich, A. Dossena, G. Casnati, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74 (1977) 1384.
- [13] A. Delahodde, M. Vacher, C. Nicot, M. Waks, unveröffentlicht.
- [14] O. A. El Seoud, R. C. Vieira, *J. Colloid Interface Sci.* 93 (1983) 289.
- [15] B. Robinson in [9], S. 69.
- [16] R. E. Smith, P. L. Luisi, *Helv. Chim. Acta* 63 (1980) 2302.
- [17] O. A. El Seoud in [9], S. 81.
- [18] P. D. I. Fletcher, A. M. Howe, B. Robinson, D. C. Steytler in [9], S. 73.
- [19] S. Barbarić, P. L. Luisi, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 4239.
- [20] P. L. Luisi, P. Meier, V. E. Imre, A. Pande in [9], S. 323.
- [21] B. Steinmann-Hoffmann, P. L. Luisi, unveröffentlicht.
- [22] C. Grandi, R. E. Smith, P. L. Luisi, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 837.
- [23] R. Wolf, P. L. Luisi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89 (1979) 209.
- [24] F. J. Bonner, R. Wolf, P. L. Luisi, *J. Solid-Phase Biochem.* 5 (1980) 225.
- [25] P. Meier, P. L. Luisi, *J. Solid-Phase Biochem.* 5 (1980) 269.
- [26] K. Martinek, Y. L. Khmel'nitsky, A. V. Levashov, N. L. Klyachko, A. N. Smenov, I. V. Berezin, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 256 (1981) 1423.
- [27] K. Martinek, N. L. Klyachko, A. V. Levashov, I. V. Berezin, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, im Druck.
- [28] P. L. Luisi, P. Lüthi, I. Tomka, A. Pande, Proc. VII Int. Enzyme Eng. Conf., Academic Press, New York, im Druck.
- [29] F. M. Menger, K. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 6731.
- [30] P. Lüthi, Teil der geplanten Dissertation, ETH Zürich.
- [31] K. Martinek, A. V. Levashov, Y. L. Khmel'nitsky, N. L. Klyachko, V. Y. Chernyak, I. V. Berezin, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 258 (1981) 1488; *Anal. Biochem.* 118 (1981) 42.
- [32] C. R. Cantor, P. R. Schimmel: *Biophysical Chemistry*, Vol. 2, Freeman, San Francisco 1980.
- [33] M. Montal in [9], S. 221.
- [34] C. A. Martin, L. J. Magid, *J. Phys. Chem.* 85 (1981) 3938.
- [35] K. Martinek, A. V. Levashov, Y. L. Khmel'nitsky, N. L. Klyachko, I. V. Berezin, *Science* 218 (1982) 889.
- [36] P. L. Luisi, L. Magid, Proc. XVII Int. Solvay Conf., CRC Press, Boca Raton, FL, im Druck.
- [37] K. Martinek, A. V. Levashov, N. L. Klyachko, V. I. Pantin, I. V. Berezin, *Biochem. Biophys. Acta* 657 (1981) 277.
- [38] J. Seelig in [9], S. 209.
- [39] R. Hilhorst, C. Laane, C. Veeger, *FEBS Lett.* 159 (1983) 31.
- [40] P. Lüthi, P. L. Luisi, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [41] R. Hilhorst, R. Spruijt, C. Laane, L. Veeger, *Eur. J. Biochem.*, im Druck.
- [42] P. L. Luisi, F. Bonner, A. Pellegrini, P. Wiget, R. Wolf, *Helv. Chim. Acta* 62 (1979) 740.
- [43] K. van't Riet, Proc. 3rd Eur. Conf. Biotechnol., im Druck.
- [44] T. A. Hatton et al., unveröffentlicht.
- [45] P. P. Speiser in I. T. Lingle, D. D. Breimer: *Applied Biology and Therapeutics*, Vol. 6, Elsevier, New York 1983.
- [46] P. L. Luisi, V. E. Imre, H. Jäckle, A. Pande in D. D. Breimer, P. P. Speiser: *Topics in Pharmaceutical Sciences*, Elsevier, New York 1983.
- [47] V. E. Imre, P. L. Luisi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107 (1982) 538.
- [48] L. S. Lerman in J. Duchesne: *Physicochemical Properties of Nucleic Acids*, Vol. 3, Academic Press, London 1973, S. 59-76.
- [49] B. de Kruijff, P. R. Cullis, A. J. Verkleij, *TIBS* März 1980, S. 79.
- [50] P. R. Cullis, B. de Kruijff, M. J. Hope, R. Nayar, S. L. Schmid, *Can. J. Biochem.* 58 (1980) 1091.
- [51] J. Wirz, J. P. Rosenbush in [9], S. 231.
- [52] P. R. Cullis, M. J. Hope, *Nature (London)* 271 (1982) 672.
- [53] P. L. Luisi, R. Wolf in K. L. Mittal, J. H. Fendler: *Solution Behaviour of Surfactants*, Vol. 2, Plenum, New York 1982.
- [54] M. Wong, J. K. Thomas, M. Grätzel, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 2391.
- [55] K. Martinek, A. V. Levashov, N. L. Klyachko, I. V. Berezin, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 236 (1978) 951.
- [56] A. V. Levashov, N. L. Klyachko, V. I. Pantin, Y. L. Khmel'nitsky, K. Martinek, *Bioorg. Khim.* 6 (1980) 929.
- [57] E. A. Malakhova, B. I. Kurganov, A. V. Levashov, I. V. Berezin, K. Martinek, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 270 (1983) 474.
- [58] R. L. Misiowski, M. A. Wells, *Biochemistry* 13 (1974) 4921.
- [59] P. D. I. Fletcher, R. B. Freedman, J. Mead, C. Oldfield, B. H. Robinson, *Colloids Surfaces* 10 (1984) 193.
- [60] C. Kumar, D. Balasubramanian, *J. Colloid Interface Sci.* 74 (1980) 64.
- [61] P. Douzou, P. Debey, F. Franks, *Biochim. Biophys. Acta* 523 (1978) 1.
- [62] P. Douzou, E. Keh, C. Balny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 681.
- [63] V. R. Ramakrishnan, A. Darszon, M. Montal, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 4857.
- [64] A. Darszon, R. Strasser, M. Montal, *Biochemistry* 18 (1979) 5205.
- [65] M. Schönfeld, M. Montal, G. Feher, *Biochemistry* 19 (1980) 1535.
- [66] R. Hilhorst, C. Laane, C. Veeger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 3927.
- [67] M. P. Pileni, *Chem. Phys. Lett.* 81 (1981) 603.
- [68] V. R. Ramakrishnan, A. Darszon, M. Montal, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 4857.
- [69] E. Imre, Teil der geplanten Dissertation, ETH Zürich.