

11281

1  
2e

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

**DESCRIPCION Y CARACTERIZACION DE SISTEMAS  
MICELARES CON DETERGENTES NO IONICOS:  
SOLUBILIZACION Y ACTIVIDAD DE PROTEINAS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

PRESENTA

**GUADALUPE AYALA AGUILAR**

MEXICO, D. F.

JULIO 1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **I. INTRODUCCION.**

### **A. SOLUBILIZACION DE ENZIMAS EN MICELAS INVERTIDAS.**

## **II. CARACTERISTICAS DE LAS MICELAS INVERTIDAS Y MICROEMULSIONES.**

### **A. CARACTERISTICAS GENERALES.**

- 1. Arreglos estructurales.**
- 2. Parámetros de agregación**
- 3. Propiedades Fisicoquímicas**

### **B. MICROEMULSIONES**

- 1. Composición de las microemulsiones.**
- 2. Formación de las microemulsiones.**
- 3. Caracterización de las microemulsiones.**

- a) Contenido de agua**
- b) Tamaño micelar .**
- c) Estudios de viscosidad**
- d) Diagrama de fases**

## **III. ESTUDIO DE LAS ENZIMAS SOLUBILIZADAS EN LAS MICROEMULSIONES.**

### **A. CARACTERISTICA DE LAS ENZIMAS ESTUDIADAS.**

- 1. Propiedades de la 20  $\beta$  Hidroesteroide deshidrogenasa**
- 2. Propiedades de la Subtilisina.**

### **B. PREPARACION DE LAS ENZIMAS.**

**C. ACTIVIDAD ENZIMATICA.**

**D. ESTUDIOS CINETICOS.**

**E. ESTUDIOS DE RETRANSFERENCIA DE LAS.**

**F. MICROEMULSIONES AL AGUA.**

**G. EXTRACCION DE PROTEINAS.**

**H. SOLUBILIZACION DE PROTEINAS EN MICROEMULSIONES  
A ALTA PRESION.**

**1. Formación de microemulsiones alta presión**

**2. Solubilización de proteínas**

**3. Actividad enzimática**

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSION.**

**A. EFECTO DE LOS DETERGENTES SOBRE LA ACTIVIDAD  
ENZIMATICA.**

**B. FORMACION DE LAS MICROEMULSIONES.**

**1. Efecto del Co-tensioactivo**

**C. CARACTERIZACION DE LAS MICROEMULSIONES.**

**1. Tamaño Micelar.**

**2. Diagrama de fases.**

**3. Viscosidad.**

**D. SOLUBILIZACION DE LAS ENZIMAS EN LAS  
MICROEMULSIONES.**

1. Efecto del  $W_o$  sobre la actividad enzimática.
2. Estabilidad de las enzimas en las microemulsiones.
3. Retranferencia de las enzimas solubilizadas.
4. Estudios Cinéticos.
  - a) Estudios con la 20  $\beta$ -Hidroesteroíde deshidrogenasa.
  - b) Estudios con la Subtilisina.

#### **E. EXTRACCION DE PROTEINAS.**

#### **F. FORMACION DE MICROEMULSIONES A ALTA PRESION.**

1. Formación de microemulsiones en propano líquido.
  - a) Solubilización de proteínas.
  - b) Actividad enzimática en microemulsiones a alta presión.

#### **V. ARTICULOS PUBLICADOS.**

- A. STABILITY AND ACTIVITY OF 20  $\beta$ -HYDROXISTEROID DEHYDROGENASE IN MICROEMULSION OF NON-IONIC DETERGENT.**
- B. PROTEIN EXTRACTION AND ACTIVITY IN REVERSE MICELLES OF A NON-IONIC DETERGENT.**
- C. SOLUBILIZATION AND ACTIVITY OF PROTEINS IN COMPRESIBLE-FLUID BASED MICROEMULSIONS.**

**VI. CONCLUSIONES.**

**VII. BIBLIOGRAFIA.**

## RESUMEN.

La mútua solubilización de agua y un solvente hidrófobo es posible con la ayuda de agentes tensoactivos. La solubilización de proteínas en estos sistemas ofrece nuevos enfoques para el estudio de su estabilidad y propiedades cinéticas así como para su purificación. La solubilidad e integridad estructural de las enzimas en la microemulsión depende principalmente de las propiedades de los tensoactivos. Al mismo tiempo el funcionamiento de las enzimas en estos sistemas está relacionado con las características estructurales de la microemulsión y las propiedades de la fase acuosa.

### I.- Características de las nuevas microemulsiones.

En este trabajo se analizaron cuatro sistemas de microemulsiones utilizando diferentes detergentes no iónicos como tensoactivos, es decir: 1, Brij 58/ Brij 52/ciclohexano; 2, Nonidet P-40/Octanol/ciclohexano; 3, Nonidet P-40/Tritón X-35/ciclohexano; 4, Tween 85/isopropanol/hexano. En todos los sistemas se formaron microemulsiones, sin embargo, los estudios de dispersión de luz indicaron que los sistemas formados por Nonidet P-40/Tritón X-35 y Tween 85/isopropanol están constituidos por micelas de diámetros más homogéneos. En las microemulsiones formadas por el Tween 85 (sorbitan polioxietilene triolato) fue posible determinar algunos parámetros estructurales de las micelas invertidas como son: la fracción de volumen micelar ( $\theta$ ), el número de agregación ( $n$ ) y la concentración de micelas.

### II.- Propiedades de las enzimas solubilizadas en los sistemas descritos.

A.- Se presentan resultados de las propiedades de la 20  $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa de *Streptomyces hydrogenas*, solubilizada en microemulsiones de Nonidet P-40/Tritón X-35. La actividad, estabilidad y las propiedades catalíticas dependieron del contenido de agua en la microemulsión. La velocidad máxima observada en la microemulsión fue de  $3.0 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , mientras que en agua fue de  $5.0 \mu\text{mol. min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . La enzima solubilizada en la microemulsión fue estable por varios días. Al retransferir la enzima de la microemulsión al agua se observó un incremento en la actividad específica. Se reportan también algunas propiedades de la 17  $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa de placenta humana solubilizada en las mismas microemulsiones.

B. - Con el sistema formado por Tween 85/isopropanol/hexano se investigó la hidrólisis del p-Nitrofenol butirato por la subtilisina. La enzima mostró un incremento considerable en la  $K_m$ , sin embargo, a ciertas concentraciones de agua  $K_{cat}$  fue mayor en la microemulsión que en el agua.

C.- Se describe también la capacidad de las microemulsiones de Tween 85 para solubilizar grandes cantidades de proteína. Se estudió el efecto de la fuerza iónica, la concentración de detergentes y concentración del co-tensoactivo en las solubilización de agua y proteína.

D.- Además se encontró que la mezcla Tween 85/isopropanol forman microemulsiones en propano líquido (27 ° C y 500 PSI). En este sistema se solubilizó el citocromo c y fue posible reducirlo con ácido ascórbico a 5000 PSI. Se reporta por primera vez la determinación de constantes cinéticas para una enzima solubilizada en microemulsiones formada con solventes a alta presión. En estos sistemas fue posible recuperar en 100 % de agua la enzima solubilizada en las microemulsiones (en condiciones normales o alta presión) con la misma capacidad catalítica que presentaron antes de la solubilización.



## Summary

Reversed micellar systems are dispersions of water molecules surrounded by a shell of surfactant. In these systems it is possible to solubilize biological molecules inside the water core of the micelles. The solubilization of proteins has important consequences for the application of enzyme purification, as well as biocatalysis. The solubility and stability of the enzyme depend on the properties of the surfactant used.

We described different microemulsions made of non-ionic surfactants, i.e., Brij 58/ Brij 52/cyclohexane; 2, Nonidet P-40/octanol/cyclohexane; Nonidet P-40/Triton X-35/cyclohexane and 4, Tween 85/isopropanol/hexane. All these systems are microemulsions, however the light scattering studies have shown that only the systems formed with Nonidet P-40/Triton X-35 and Tween 85/isopropanol contain micelles with homogeneous sizes. A characterization of the system Tween 85/hexane/isopropanol/water has been carried out, including light scattering, viscosimetry and phase diagram was constructed to outline the phase boundaries.

We studied the catalytic properties of 20  $\beta$ -dehydroxysteroid dehydrogenase from *Streptomyces hydrogenans*. In the microemulsion the activity and stability were dependent on the molecular ratio water to surfactant ( $W_o$ ). The  $V_{max}$  observed in the microemulsion was  $3.0 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . The solubilized enzyme was stable for several days and when the enzyme was transferred back to an all water system it exhibited full catalytic capacity.

We describe the ability of Tween 85/isopropanol microemulsion in hexane to solubilize pure proteins. The dependents of cytochrome C extraction, and buffer of the aqueous phase, detergent concentration, and cosurfactant concentration are described. Increases in ionic strength result in decreased recovery of protein in the organic phase, whereas increases in detergent concentration and cosurfactant concentration result in increased extraction. Ester hydrolysis by Subtilisin has been investigated. The stability of this enzyme was comparable to that in buffer. In addition we have found that Tween 85 and isopropanol from a microemulsion in liquid propane ( $27^\circ \text{C}$  and 500 PSI still highly compressible). In this system cytochrome C was solubilized and its reduction with ascorbic

acid was possible at 5000 PSI. The first determinations of kinetic constants for enzyme-catalyzed reaction in such system are also presented.

## **OBJETIVOS:**

- 1.- Describir sistemas de micelas invertidas constituidas por detergentes no iónicos.
- 2.- Caracterizar los nuevos sistemas por:
  - a) Tamaño Micelar.
  - b) Viscosidad.
  - c) Diagrama de fases.
- 3.- Definir las características de funcionalidad y estabilidad de las enzimas solubilizadas en los sistemas descritos.
- 4.- Determinar los factores que regulan la extracción de proteínas de una solución acuosa a el sistema micelar.
- 5.- Describir un enfoque experimental para la utilización sistemas de micelas invertidas formadas en fluidos compresibles.

## I. INTRODUCCION

### A. SOLUBILIZACION DE ENZIMAS EN MICELAS INVERTIDAS.

Las micelas invertidas son microgotas de agua compartimentalizadas en un solvente hidrofóbico a través de agentes tensoactivos. En estos sistemas los sustratos hidrofílicos y las enzimas solubles permanecen en el interior de la micela, donde éstas podran disponer del el agua que necesitan para mantener su capacidad catalítica; si se utilizan sustratos hidrofóbicos éstos se encuentran disueltos en el solvente orgánico. Las micelas invertidas son sistemas dinámicos en los cuales existe intercambio entre el material solubilizado en el interior de las micelas, las moléculas presentes en el solvente y las otras micelas

El uso de micelas invertidas para el estudio de la actividad catalítica de enzimas se ha incrementado considerablemente en los últimos años. El interés radica en la posibilidad de solubilizar enzimas (solubles o de membrana) en un medio restringido de agua. De esta manera se puede estudiar el efecto del agua sobre las propiedades fisicoquímicas y catalíticas de las proteínas y las enzimas. Por otro lado, la eliminación del exceso de agua en el medio de reacción evita ciertas reacciones indeseables, como aquellas que inducen la desnaturalización de las proteínas y abre nuevas posibilidades de utilización de las enzimas en la biotecnología.

Si bién las enzimas han sido utilizadas desde hace más de 100 años en la transformación de compuestos natu-

rales producidos por el hombre, es recientemente que se ha encontrado un enorme potencial en el uso de las enzimas para la transformación de una gran variedad de compuestos orgánicos. Sin embargo, existen varias propiedades de las enzimas que hacen difícil su aplicación en procesos industriales, por ejemplo, la de mostrar su máxima actividad en medios acuosos y el rango estrecho de condiciones en que permanecen activas. Se han descrito varias técnicas que permiten utilizar a las enzimas en medios no convencionales. En particular, cuando las enzimas son introducida en sistemas anhidros, se ha encontrado que éstas muestran nuevas propiedades; tales como un incremento en la termoestabilidad (57, 58 ), cambios en su especificidad (47, 59 60) y la capacidad de utilizar una gran variedad de sustratos hidrofóbicos.

La eliminación del agua en el medio de reacción ha incrementado el potencial de poder utilizar las enzimas en la industria. Sin embargo, las enzimas necesitan el agua para las interacciones no covalentes que ayudan a mantener la conformación catalíticamente activa (64). Una alternativa para el estudio de enzimas en condiciones en las cuales solo existe el agua que necesitan para mantener sus conformación nativa, la encontramos en las micelas invertidas y las microemulsiones.

La solubilización de enzimas en micelas invertidas tiene importantes aplicaciones en la separación y purificación de enzimas, así como en la biocatálisis. Se han publicado varias revisiones que discuten la historia y los progresos que se han hecho en el área (1-3, 14, 36). La actividad y función de varias enzimas ya han sido estudiadas por diferentes grupos ( 4-6, 27, 37, 39-41 ).

Los detergentes iónicos (CTAB, SDS y AOT) han sido los más utilizados (17-20, 36, ) en el estudio de enzimas en micelas invertidas. En la gran mayoría de los trabajos se ha utilizado el detergente aniónico AOT. Existe una caracterización extensa de las propiedades fisicoquímicas y dinámicas de micelas invertidas de AOT conteniendo enzimas ( 7 ). Sin embargo, el uso de detergentes no iónicos ha estado limitado (25, 8, 26), debido principalmente a la dificultad de obtener microemulsiones.

Los detergentes no iónicos tales como el Triton X-100 (25) y el Brij (26, 65) se han utilizados para el estudio de la solubilización de enzimas en micelas invertidas. Sin embargo, en nuestras manos estos sistemas presentaron algunas dificultades, como es la de no formar microemulsiones estables a diferentes concentraciones de agua. Consideramos importante describir nuevos sistemas de micelas invertidas, particularmente se buscó sustituir los detergentes iónicos convencionalmente utilizados, AOT Y CTAB, por los detergentes no iónicos. De esta manera sería posible estudiar las enzimas que son sensibles a los detergentes iónicos.

En este trabajo se describieron y caracterizaron nuevos sistemas de micelas invertidas constituidos por detergentes no iónicos. También se estudió la estabilidad y propiedades catalíticas de enzimas solubilizadas en algunos de los sistemas descritos. La elección de los sistemas se hizo en base: A) la estabilidad de las enzimas, lo cual implica que se analizó la actividad de las enzimas en la microemulsión y después de transferirlas de la microemulsión a una fase acuosa; B) la capacidad de formar

micelas de tamaños homogéneos. En estos sistemas se investigaron las condiciones para obtener micelas con una gran capacidad para solubilizar agua y proteína. También se investigaron los factores que controlan la extracción de proteínas de una solución acuosa al sistema micelar.

Nuestros estudios se extendieron a la descripción de microemulsiones formadas con solventes a alta presión. En estos sistemas se solubilizó el citocromo c y fue posible reducirlo con ácido ascórbico a 5000 PSI. Se reporta por primera vez la determinación de constantes cinéticas para una enzima solubilizada en las microemulsiones formadas a alta presión.

## II. CARACTERÍSTICAS DE LAS MICELAS INVERTIDAS Y MICROEMULSIONES.

### A. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

#### 1.- Arreglos estructurales.

Cualquier tensoactivo (iónico, no iónico, zwitteriónico o un fosfolípido) es capaz de auto-asociarse en solventes orgánicos apolares. De acuerdo al tipo y combinación de tensoactivos que se utilicen se pueden considerar tres clases: a) micelas invertidas b) microemulsiones, c) Sistemas formados por fosfolípidos.

Las micelas invertidas se constituyen solo de tensoactivos iónicos y ninguna otra clase de molécula anfipática. Son pocos los detergentes que forman micelas invertidas. El más utilizado es el AOT ( 2-etil-hexil sulfosuccinato de sodio) que puede formar micelas invertidas

practicamente en cualquier solvente apolar. Esta es una de las razones por la cual ha sido utilizado ampliamente en el estudio de enzimas en micelas invertidas.

En las microemulsiones del tipo W/O la fase principal es el solvente orgánico en el cual se dispersan microgotas de agua que son estabilizadas por el tensoactivo. Generalmente las microemulsiones requieren de un co-tensoactivo para formar sistemas estables y transparentes. ( 66, 67 ). El co-tensoactivo se intercala en la monocapa del tensoactivo en la interfase agua-solvente expandiendo el área interfacial, provocando que la presión dada por la mezcla co-tensoactivo/tensoactivo sea mayor que la tensión interfacial entre el agua y el solvente, como consecuencia la región polar de los tensoactivos en la monocapa se curven hacia el interior de la micela y se forma la microemulsión.

Las microemulsiones son sistemas transparentes termodinámicamente estables que se componen de tres microdominios: 1.- El dominio acuoso ( W ) constituido principalmente por el amortiguador que se utilizó para formar la microemulsión, 2.- La fase orgánica (O) y 3.- La interfase o microdominio membranal (m) constituida por el tensoactivo y cotensoactivo (Fig 1). El cotensoactivo, puede ser otro detergente o un alcohol entre 3 y 9 átomos de carbono.

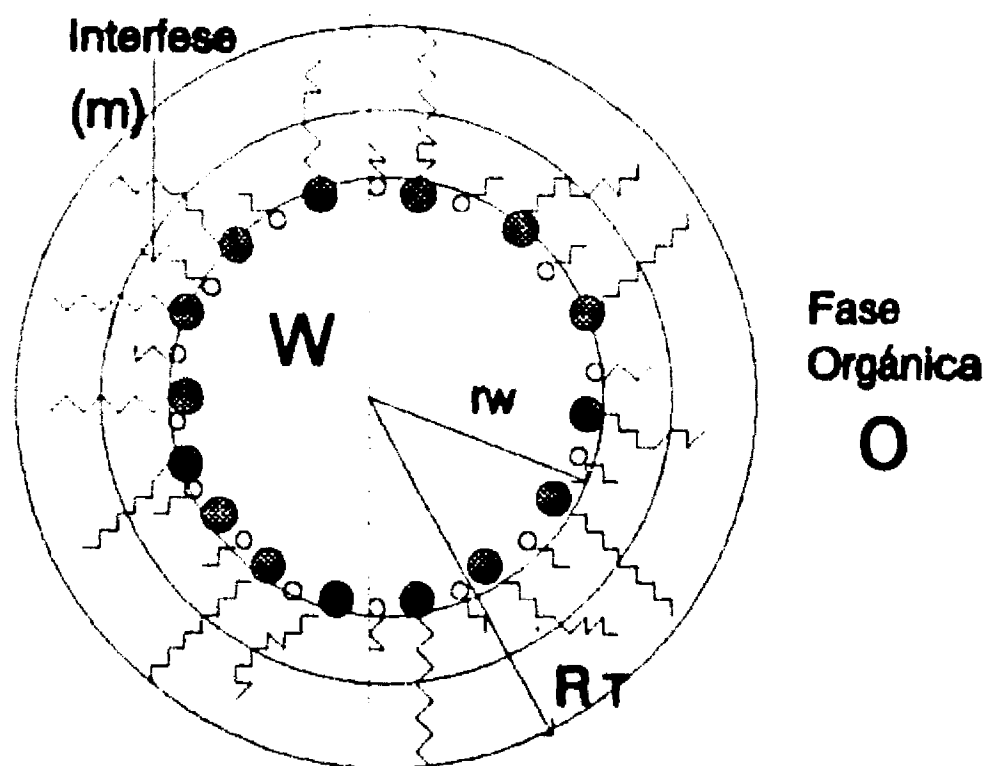
La diferencia entre micelas invertidas y microemulsiones no esta aún bien establecida. Se consideran por separado simplemente tomando en cuenta el diámetro de las micelas y la cantidad de agua que pueden solubilizar, así como por el número de componentes (12). De acuerdo a Ran-



ce (66) las microemulsiones del tipo W/O son parte de la región de micelas invertidas en un diagrama de fase y por lo tanto se consideran que son lo mismo. Por otro lado, Princes (67) postula que la diferencia entre estos dos sistemas, radica en el tipo de interacciones que operan para estabilizar al sistema. En el caso de las micelas invertidas, cuyos diámetros varían entre 10-100 Å, el grado de agregación y la curvatura de la interfase están determinados por las interacciones específicas entre el agua y la región hidrofílica de los tensoactivos. En las microemulsiones, que contienen micelas con diámetros entre 50-1000 Å, la curvatura de la interfase está determinada por las interacciones específicas entre el solvente y la región hidrofóbica de los tensoactivos y las interacciones entre el agua y la región polar de los tensoactivos son menos significativas. En este trabajo, para simplificar usaremos el término micelas invertidas al referirnos a las microemulsiones del tipo W/O.

Los sistemas formados por fosfolípidos también se han utilizado para estudiar enzimas en solventes orgánicos ( 29-34 ). Se ha reportado la formación de micelas invertidas en soluciones constituidas por fosfolípidos en hexano (35), sin embargo, la cantidad de agua que se puede solubilizar es pequeña comparada a la que se puede solubilizar en las micelas invertidas y las microemulsiones. Se ha propuesto ( 68 ) que los fosfolípidos forman estructuras tubulares que incrementan en longitud más que en volumen. Es decir no se forman los agregados globulares que incrementan en diámetro cuando se adiciona agua al sistema; además las estructuras que se forman cuando las enzimas son solubilizadas en estos sistemas son bastante complejas. Por lo que se consideran diferentes a

las micelas invertidas y a las microemulsiones.



**Figura 1: Representación esquemática de la estructura de una micela invertida. En el esquema se representa los tres microdominios: fase acuosa (W), interfase (m), fase orgánica. RT es el radio hidrodinámico y rw es el radio interno**

## 2. PARAMETROS DE AGREGACION.

La asociación de tensoactivos en medios apolares muestra un patrón diferente al equilibrio monómero/micela descrito para los sistemas acuosos ( 9-11 ), por lo que no es posible hablar de una concentración micelar crítica; pero se puede definir la concentración crítica de la microemulsión ( $c_{\mu c}$ ) ( 28 ), que es la concentración de tensoactivo a la cual se empieza a formar la microemulsión. La  $c_{\mu c}$  representa la concentración libre del tensoactivo. Además se puede designar el número de agre-

gación ( $n$ ) que se refiere al número de moléculas de tensoactivos que forman la membrana micelar ( 12, 13 ). La relación molar agua/detergente se expresa como  $W_0$ . A una concentración dada de detergente, a medida que el  $W_0$  se incrementa el tamaño de la micela crece como consecuencia del aumento de agua en el interior de ésta a expensas de un aumento en el número de agregación y una disminución en la concentración de las micelas.

### 3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

La estructura de las micelas invertidas se ha investigado por varias técnicas ( 19, 14 ), tales como difracción de rayos X, dispersión de neutrones, ultracentrifugación, microscopia electrónica, viscometría y resonancia magnética nuclear. Los estudios hechos en micelas invertidas, han indicado que cuando la fracción de volumen de la fase dispersa (  $\theta$  ) no es muy grande se forman las microemulsiones, las cuales están constituida por gotas esféricas de tamaño casi uniforme. Cuando la fracción de volumen (  $\theta$  ) es muy grande, la microemulsión tiene una interfase interna muy flexible la cual se forma y deforma en una escala de tiempo corto.

La medida del diámetro de las micelas invertidas se determina por diferentes técnicas ( 7, 9 ). El método que se usa con mayor frecuencia es la dispersión de luz (62), con el cual se puede obtener el tamaño promedio de las partículas. La polidespersión del sistema también se puede obtener a partir de las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada. El tratamiento matemático de la dispersión de la luz conduce a la determinación del tamaño, asumiendo que las partículas son esféricas y no

interactuantes. Como resultado de que el sistema es "no-ideal" se observan desviaciones de los valores esperados, esto puede proporcionar información sobre la interacción entre las micelas y cambios en su estructura. Los estudios de la viscosidad junto con la espectrofotometría de dispersión de la luz pueden conducir a la determinación del diámetro del núcleo de agua, el número de agregación y la concentración micelar.

## B. MICROEMULSIONES.

### 1. Composición de las microemulsiones.

En el caso de los detergentes no iónicos para la formación de las microemulsiones se requiere de una mezcla apropiada de tensoactivos y cotensoactivos (21-23). Un parámetro útil para la determinación de tales mezclas ( 15, 16 ) es el "balance" hidrofílico/lipofílico (BHL). Este número se obtiene empíricamente en base a una serie de pruebas de emulsificación. Existen una gran variedad de éstos detergentes con un rango amplio en los valores de BHL (Tabla I) que se pueden utilizar en la formación de microemulsiones.

La metodología para la obtención de microemulsiones es relativamente simple; sin embargo el aspecto crítico se encuentra en determinar los componentes que constituirán el sistema, es decir el tensoactivo, el solvente, el co-tensoactivo y el amortiguador que constituirá la fase acuosa. En la Figura 2 se muestran las estructuras de algunos de los tensoactivos que se pueden utilizar para formar microemulsiones. Se muestra también la estructura del AOT, uno de los detergentes

## TABLA I

### VALORES DEL BALANCE HIDROFILICO-LIPOFILICO (BHL) DE ALGUNO DETERGENTES NO IONICOS

DETERGENTE	COMPUESTO	HLB
Brij 30	PEG (4) lauril ester	9.7
Brij 35	PEG (23) lauril ester	16.9
Brij 52	PEG (2) cetil ester	5.3
Brij 56	PEG (10) cetil ester	12.9
Brij 72	PEG (2) oleil ester	4.9
Brij 76	PEG (10) estearil ester	12.4
Lubrol WX	PEG (17) cetil-estearil alcohol	14.9
Esterex	PEG (11) tetradecil alcohol	13.8
Tritón X-100	PEG (9-10) p-t-octilfenol	13.5
Nonidet P-40	PEG (9) p-t-octilfenol	13.1
Tritón N-101	PEG (9-10) nonil fenol	13.4
Tritón X-114	PEG (7-8) p-t-octil fenol	12.4
Tritón X-35	PEG (3) p-octil fenol	7.8
Tritón X-45	PEG (4-5) p-t-octilfenol	10.4
Tween 20	PEG (20) sorbitol monolaurato	16.7
Tween 40	PEG (20) sorbitol monopalmiato	15.6
Tween 60	PEG (20) sorbitol monoesterato	14.9
Tween 80	PEG (20) sorbitol monooleato	15.0
Tween 85	PEG (20) sorbitol trioleato	11.0

El número entre parentesis es la cantidad promedio de unidades de polioxietilenos (PEG)

que puede formar micelas invertidas en practicamente cualquier solvente apolar y sin la adición de un cotensoactivo.

Los detergentes no iónicos Nonidet P-40, Brij 58 están constituidos por una cadena alifática unida a través de un enlace eter a una cadena de polioxietilenos.

Los detergentes de la serie Tween son derivados de los esterres de sorbitan los cuales se obtiene por la esterificación de ácidos grasos con el sorbitol obteniéndose mono-, di- y poliesteres de sorbitan (serie Span), estos ultimos son muy hidrofóbicos ya que no contienen polietilenglicol. Con la adición de oxidos de etileno a los grupos hidroxilos libres se forman los polietilen glicol-(n)-sorbitan ésteres (denominados como polisorbatos). En general los polisorbatos son muy solubles en agua, sin embargo, se pueden obtener compuestos con diferentes grados de hidrofobicidad dependiendo del número de polioxietilenos y/o el número de ácidos grasos esterificados, lo cual permite ajustar los valores de BHL en un rango amplio. En el caso del Tween 85 (Polietilenglicol-(20)-sorbitan triolato), la presencia de tres moléculas de ácido oléico lo hacen un compuesto bastante hidrofóbico.

## 2. Formación de las microemulsiones.

La formación de las microemulsiones se consiguió variando la proporción de dos detergentes, uno con BHL alto y otro con un BHL bajo, o utilizando un alcohol como co-tensoactivo.

### Nonidet P-40/Octanol/ciclohexano

Este sistema consistió de 0.600 gramos de Nonidet P-40 y 0.4 gramos de octanol disueltos en tres mililitros de ciclohexano. La concentración final del detergente más el octanol fué del 25 % (p/v).

### Brij 58/Brij 52/ciclohexano

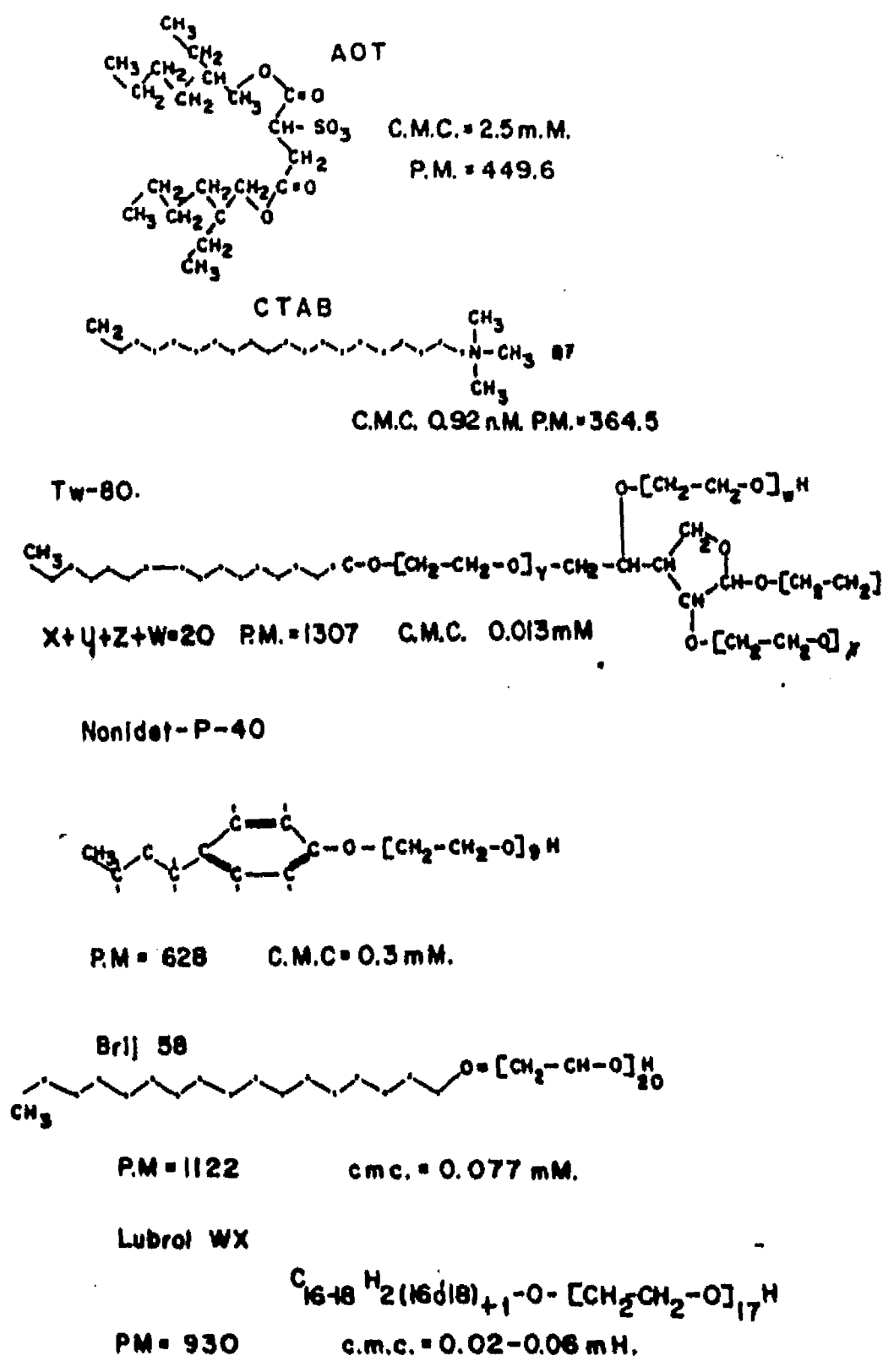
Para formar las microemulsiones se mezclaron estos dos detergentes en una proporción 1:1 (p/p). Con esta mezcla se preparó una solución al 12.7 % (p/v) en ciclohexano. Sin la adición de agua ( a temperatura ambiente) no fue posible formar microemulsiones. Con la adición de 1.66 % (v/v) de agua se formaron microemulsiones en las que se pudo solubilizar hasta un 7 % de agua a temperatura ambiente.

#### Nonidet P-40/Tritón X- 35/ciclohexano

Para la obtención de estas microemulsiones se preparó una solución disolviendo 0.40 gramos de Nonidet P-40 en 3.0 ml de ciclohexano, se agregaron pequeñas alícuotas de agua hasta que el sistema se puso turbio. Posteriormente se agregaron cantidades pequeñas de Tritón X-35 hasta el punto en donde se empezó a observar inestabilidad del sistema (formación de dos fases). Se registró el peso total de Tritón X-35 agregado, encontrándose que la relación óptima entre el Nonidet P-40 y Tritón fue de 8:3.5 (p/p). Fue posible obtener microemulsiones en soluciones que contenían el 12.5 % o el 16 % (p/v) de estos dos detergentes.

#### Tween 85/ Isopropanol/hexano

El Tween 85 es poco soluble en agua y muy soluble en solventes apolares, pero, no es capaz de formar microemulsiones del tipo W/O por si solo. Sin embargo, encontramos que en presencia de isopropanol forma microemulsiones estables y transparentes. La capacidad para solubilizar agua depende de la relación molar Isopropanol/ Tween, así como de la fuerza iónica



**Figura 2. Estructura de algunos de los detergentes utilizados en la purificación de enzimas y en la formación de micelas invertidas. AOT es el 2-etil-hexil sulfosuccinato de sodio, CTAB es el bromuro de cetiltrimetil amonio, Tween 80 es el Polioxietilenglicol (20) sorbitan monoésterato, el Nonidet P-40 es un Polioxietilenglicol (9) octilfenol, el Brij 58 es un polioxetilen (20) cetil eter, el Lubrol WX representa diferentes polioxetileno esterificados a ácidos grasos.**



del amortiguador que constituirá la fase acuosa. La composición de las microemulsiones dependió del análisis que se quería realizar. En general la fase orgánica estuvo constituida por hexano y la fase acuosa por amortiguador de fosfatos (pH 7.0 ) con fuerzas iónicas que variaron de 0.001 M a 1.0 M, la concentración del detergente y del co-tensoactivo varió dependiendo del estudio por realizar (como se indica en la sección de resultados). Para el análisis de la actividad enzimática se utilizó una mezcla constituida por 14 % Tween (p/v)/12 % isopropanol (v/v) en hexano a diferentes concentraciones de agua.

### 3. Caracterización de las Microemulsiones

#### a) Contenido de agua

El contenido de agua se determinó por el método de K. Fischer, el cual consiste básicamente en la titulación de la muestra en un medio de reacción que contine piridina y yodo, la estequiometría de la reacción es:



Este método es muy efectivo en las microdeterminaciones de agua. El yodo es generado electrónicamente *in situ* en el ánodo inmerso en la solución que será titulada en la cual se disolvió un ioduro y los componentes comunes del reactivo de K. Fischer. La cantidad de electricidad requerida para generar el yodo es directamente proporcional a la cantidad de agua en la muestra. Para la determinación de agua en las microemulsiones se inyectaron alícuotas entre 2-10 microlitros.

b) Tamaño Micelar.

El diámetro micelar se determinó por el método de dispersión de la luz, en el cual el tamaño de las partículas se obtiene a partir de la luz que dispersan y a sus coeficientes de difusión traslacional. Las soluciones micelares se prepararon como se describe en la sección anterior. Las soluciones se filtraron utilizando filtros desechables (Gelman Sciences, 0.2  $\mu\text{m}$  Teflon Acrodisk ) para eliminar partículas de polvo. Las mediciones se realizaron utilizando el índice de refracción y la viscosidad del solvente, la temperatura fue 25 .C. El sistema consiste en un fotómetro (Wyatt Technology, Inc. Santa Barbara, CA), la fuente de luz es un láser Helio-Cadmio operado a 514.5 nm. con una fuente estabilizadora (Liconix model 4120N láser, Liconix 50SA, Liconix, Inc. Sunnyvale, CA). Los pulsos luminosos pasan a través de las muestras y se transmiten al tubo fotomultiplicador (Hamamatsu R1104) por medio de una fibra óptica. Los pulsos eléctricos generados por el fotomultiplicador se envían al amplificador discriminador (Modelo PAD-1, Langley Ford Instruments, Amherst, MA). La señal resultante es procesada en un correlacionador (Modelo BI-2030 AT Brookhaven Instruments Co. New York). En esta parte del instrumento se genera la función de correlación que corresponde a la ecuación:

$$G(t) = 1 + e^{-2Dq^2t} \quad (1)$$

la cual expresa el decaimiento de las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada en el tiempo. En la

ecuación se incluye el vector de dispersión  $q$  que se expresa como:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda_0} \eta \sin \frac{\theta}{2} \quad ( 2 )$$

donde  $\eta$  es el índice de refracción del solvente,  $\lambda_0$  es la longitud de onda del rayo incidente, y  $\theta$  es el ángulo de dispersión. El diámetro ( $d$ ) promedio de las partículas se puede obtener a partir de la ecuación Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d} \quad ( 3 )$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión traslacional de las partículas,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\eta$  es la viscosidad del solvente. El coeficiente de difusión traslacional depende del tamaño de las partículas. En el caso más simple, para un sistema de partículas monodispersas, el campo de correlación es un decaimiento exponencial simple. En el caso de un sistema formado por partículas de varios tamaños, el campo de autocorrelación se aleja de una exponencial, estas variaciones en la razón de decaimiento se caracterizan a través de la polidispersión. La cual es una medida de la amplitud de la distribución del tamaño; pero no proporciona información sobre la forma de las partículas.

### c) Estudios de viscosidad.

La viscosidad se midió con un aparato de Cannon-Ubbelohede. El viscosímetro se colocó en un baño a tem-

peratura constante. La viscosidad relativa se midió comparando los tiempos de flujo entre la microemulsión y el solvente. Con estos valores se calculó la viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ), utilizando la expresión:

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (4)$$

La viscosidad reducida se obtuvo dividiendo la viscosidad específica entre la concentración (c) en g/ml. La dependencia de la viscosidad reducida ( $\eta_{sp}/c$  ml/g) en función de los valores de la concentración del detergente, es lineal con un intercepto en la ordenada que corresponde a la viscosidad intrínseca. ( $n$ )

La medida de la viscosidad también se utiliza para calcular la fracción de volumen ( $\theta$ ) que ocupan las partículas, mediante la ecuación (53, 54):

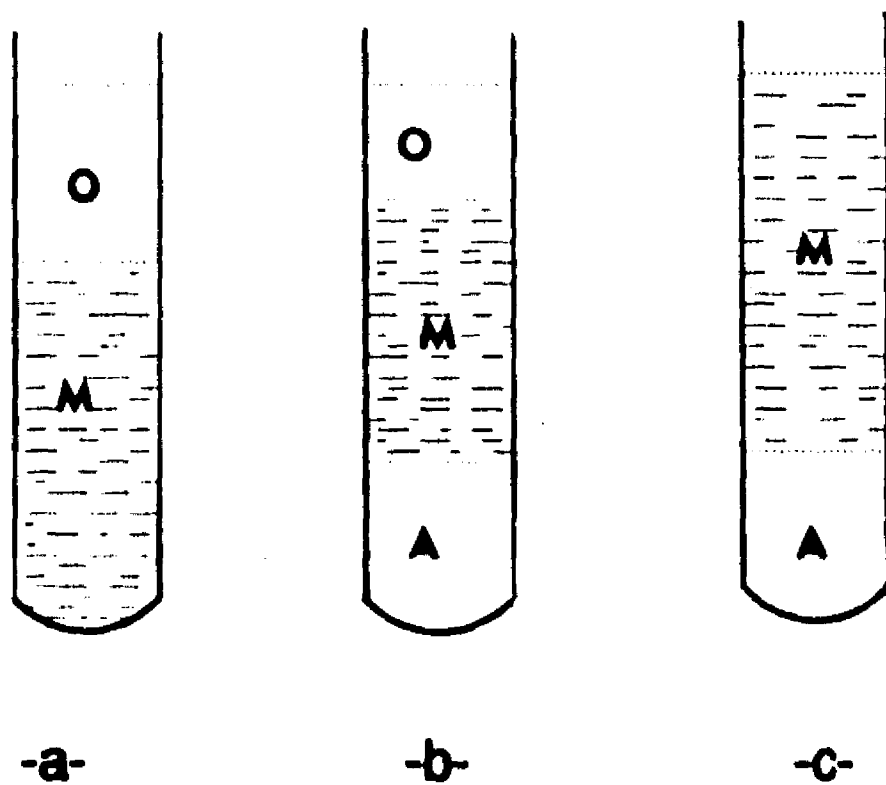
$$\eta_{sp} = 2.5\theta + 14.5\theta^2 \quad (5)$$

Esta indica que la viscosidad específica de una dispersión depende del volumen total ocupan las partículas disueltas en ella. Particularmente se aplica a dispersiones de esferas no rígidas e interactuantes.

#### d) Diagramas de fase.

Desde el punto de vista macroscópico las microemulsiones pueden existir como un sistema de una sola fase o microemulsiones en equilibrio con una de las fases. De

acuerdo a Winsor ( 11 ) pueden existir tres clases de sistemas: Winsor I (WI) que es una microemulsión en equilibrio con el solvente, Winsor II (WII) es una microemulsión en equilibrio con la fase acuosa y Winsor III (WIII) es un sistema de tres fases, es decir una microemulsión en equilibrio con el solvente y la fase acuosa (Fig. 3). La transición de un estado a otro (WI-- WIII-- WII) se puede conseguir: modificando la temperatura, variando la fuerza iónica, o modificando la relación tensoactivo/cotensoactivo.



**Figura 3:** Se muestra los distintos sistemas que se originan en la formación de las microemulsiones: (a) Winsor I, (b) Winsor III, (c) Winsor II. Las fases que constituyen cada uno de los sistemas son: M) microemulsión, A) fase acuosa y O) fase orgánica.

Se investigó el diagrama de fase de la mezcla de

Tween 85/hexano/isopropanol, utilizando como fase acuosa el amortiguador de fosfatos 0.01 M pH = 7.5. Se prepararon diferentes mezclas de Tween 85 en hexano (p/v) conteniendo 13 % de isopropanol. En cada una de las mezclas se adicionaron diferentes cantidades del amortiguador. Después de cada adición las mezclas se agitaron vigorosamente y se dejó alcanzar el equilibrio por 24 horas. Se analizaron las muestras y se registro el número de fases.

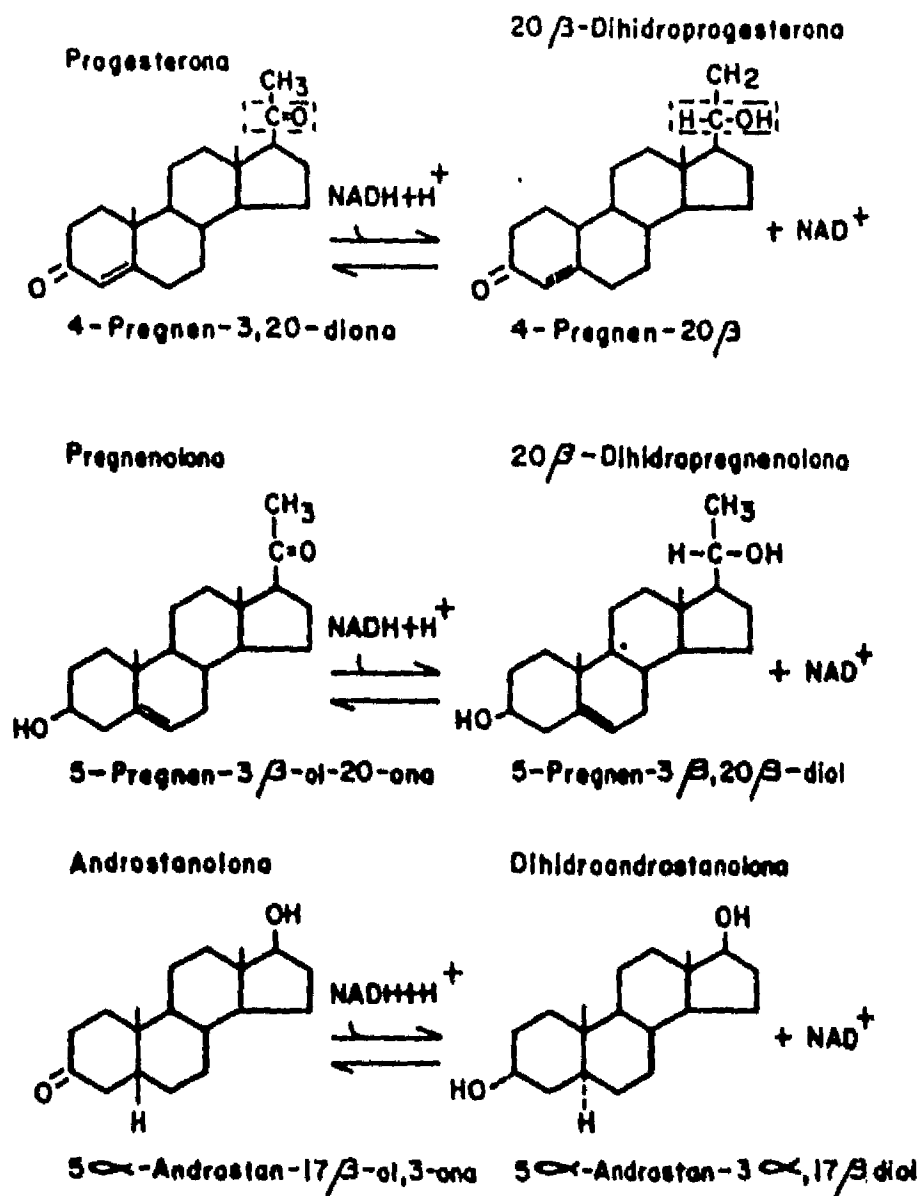
### III ESTUDIOS DE LAS ENZIMAS SOLUBILIZADAS EN LAS MICROEMULSIONES.

#### A. CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ENZIMAS UTILIZADAS

##### 1. Propiedades de la 20 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa

La 20  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( 20  $\beta$  HSDH), (17, 20  $\beta$  21 Trihidroxiesteroide: NAD oxidoreductasa [ Ec. 1.1.1.53 ] cataliza la reducción de cortisona a 20  $\beta$ -dihidrocortisona. Esta enzima tiene una especificidad amplia y puede interconvertir los grupos 20-hidroxi y 20-oxo en varios derivados de 4-pregnen-3-ona, por ejemplo la reducción de progesterona, y derivados del 5  $\alpha$  pregnen, por ejemplo la reducción de la pregnenolona. Esta enzima también puede interconvertir los grupos 3  $\alpha$  hidroxí y 3-oxo de varios androstanos ( Figura 4 ). En relación a sus propiedades catalítica, estudios fluorométricos (45) demostraron que el esteroide y el NADH forman complejos binarios con la enzima, por lo cual se propone un mecanismo al azar.

La 20  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa es una enzima inducible por esteroides y se purificó de Streptomices hydrogenas por Hübener y colaboradores en 1959 (42). Blomquist (43) reportó un peso molecular de 111,000  $\pm$ 7,000 determinado por filtración en gel y un



**Figura 4: Se muestran algunos esteroides que son transformados por la 20  $\beta$ -HSDH.**

peso molecular de  $106,000 \pm 10,000$  determinado por ultracentrifugación. El peso molecular mínimo determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS fue de  $27,000 \pm 2000$  lo cual indica que la enzima contiene 4 subunidades.

## 2. Propiedades de la proteasa Subtilisina

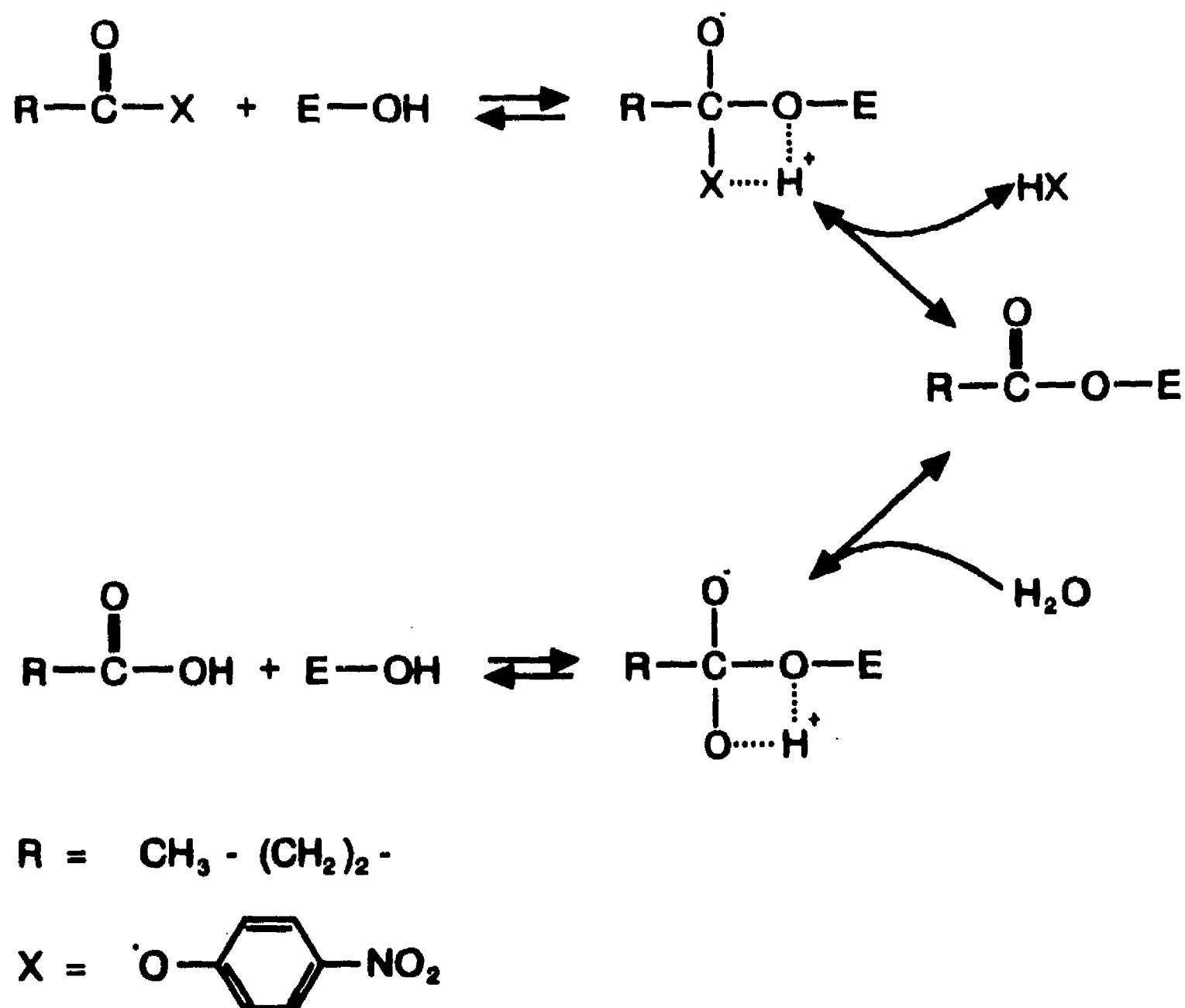
El termino subtilisina se emplea ahora para designar proteasas de serina (proteasas que tienen una serina reactiva en el sitio catalítico) producidas por varias especies de *Bacillus* (49 ). En este trabajo se realizaron estudios utilizando subtilisina Carlsberg.

Subtilisina consiste de una sola cadena polipeptídica que no contiene cisteínas o cistinas, por lo cual no existen puentes disulfuro a diferencia de lo observado en las proteasas pancreáticas. El sitio catalítico de las subtilisinas está constituido por la serina 221, la histidina 64 y el aspártico 32. El arreglo de estos tres residuos corresponde al arreglo del sitio activo de las proteasas pancreáticas, y el mecanismo de reacción es esencialmente similar en ambos grupos de enzimas (50) Con respecto a la especificidad por los sustratos, las subtilisinas son menos estrictas que las proteasas pancreáticas. Por este motivo la subtilisina es capaz de hidrolizar una gran variedad de derivados, ya sea polipeptidos modificados (benzoyl o acetyl L-aminoácidos ) o ésteres de ácidos grasos, también puede hidrolisar una gran variedad de enlaces peptídicos en proteínas.

La secuencia de reacciones que llevan a cabo estas proteasas se muestran en la (figura 5). En la figura se



enfatisa el hecho de que la etapa de acilación es mecanísticamente la inversa de la etapa de desacilación. El grupo R-CO un polipéptido, un aminoácido, u otro grupo acilo. y HX por lo general una amina, un alcohol o cualquier otro grupo desplazable.



**Figura 5: Mecanismo catalítico de las proteasas de serina**

Tomado de Kraut (50)

En la figura la enzima es representada por E-OH, en

la cual el OH es la cadena lateral de la serina reactiva. Después que se ha formado el complejo Enzima-sustrato, el siguiente intermediario que se forma es el complejo tetrahédrico que se estabiliza por la formación de un enlace covalente entre el carbonilo del sustrato y el oxígeno de la serina así como por un hidrógeno parcialmente transferido. Cuando la transferencia del H<sup>+</sup> se completa, el intermediario tetrahédrico se divide en la enzima acilada y se libera el grupo desplazable (amina, alcohol, o aminoácido). Subsecuentemente se lleva a cabo la hidrólisis de la acil-enzima, por un mecanismo inverso al de la acilación con el agua actuando como el nucleófilo que desplaza el grupo acilo, restituyéndose el OH de la serina catalítica y liberando el ácido correspondiente.

#### B. PREPARACION DE LAS ENZIMAS.

Las enzimas analizadas se adquirieron de Sigma Co, a excepción de la 17  $\beta$ -estradiol deshidrogenasa que fue preparada en el laboratorio de acuerdo al método descrito en (61).

Antes de realizar el estudio de las enzimas en las microemulsiones fue necesario substituir el medio en el cual se encontraban por un amortiguador apropiado, que permitiera, por un lado, su solubilización en las microemulsiones y que diera las condiciones óptimas de catalisis.

En el caso de la 20  $\beta$ -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa, que se encontraba en sulfato de amonio, la sal se removió filtrando la suspensión de enzima a través de una columna de bio-gel P-30 (50  $\mu$ l conteniendo 250  $\mu$ g). La

enzima se eluyó con hepes 50 mM pH 7.6; se obtuvieron aproximadamente 0.5 ml con 0.20 mg de proteína.

Para la 17  $\beta$ -estradiol Deshidrogenasa (17  $\beta$  EDH) que se encontraba en amortiguador de fosfatos 5 mM pH 7.0 conteniendo 1 mM EDTA, 0.2 g/l  $\text{NaN}_3$  y 50 % de glicerol, el amortiguador se substituyó dializando esta fracción contra amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.6 durante 24 horas. El dializado se concentró liofilizando y resuspendiendo en un medio que contenía: Hepes 35 mM;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  20 mM; KCl 150 mM y glicerol 10 %.

La subtilisina se disolvió en fosfatos 0.1 M pH 6.0 que contenía 0.1 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Los estudios de actividad se realizaron diluyendo esta fracción en amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.8.

#### C. ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Las enzimas y las coenzimas se solubilizaron en la microemulsión inyectando pequeñas alicuotas (8-80  $\mu\text{l}$ ) de una dilución apropiada. El  $W_o$  se ajustó con el amortiguador en el cual se habían resuspendido. En general la reacción se inició con la adición de los sustratos. La actividad, se siguió registrando la disminución o el incremento en absorvancia del NADH o el  $\text{NAD}^+$  a 340 nm en un espectrofotómetro Amincon DW-2a.

#### D. ESTUDIOS CINETICOS.

En el caso de la 20  $\beta$ -HSDH la determinación de los parámetros cinéticos se realizó de la siguiente manera: en un mililitro de microemulsión (sin agua adicionada) se

solubilizaron la enzima y la coenzima en una dilución apropiada, cuando fue necesario el  $W_o$  se ajustó con el amortiguador (Hepes 50 mM pH 7.6). Esta mezcla se preincubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se inició inyectando 12  $\mu$ l de la cortisona preparada en etanol. Independientemente de si se estaba determinando la  $K_m$  por la coenzima o por el esteroide, siempre se siguió el orden antes indicado. Todas las determinaciones se hicieron usando en la referencia un blanco sin enzima y al cual se le agregaba simultáneamente la solución esteroideal.

Los parámetros cinéticos de la subtilisina para el p-Nitrofenol butirato, se determinaron de la siguiente manera: la enzima se solubilizó en la microemulsión a una concentración final de 2.16  $\mu$ g/ml. La actividad se midió con 0.8 ml de esta solución y la reacción siempre se inició adicionando 200  $\mu$ l de una microemulsión conteniendo el p-Nitrofenol butirato a la concentración necesaria para obtener la concentración deseada en la celda de reacción. El  $W_o$  se ajustó agregando el amortiguador que constituyó el medio de reacción (fosfatos 0.01 M pH = 8). La actividad se siguió registrando el incremento en absorción a 412 nm, debido a la liberación del p-Nitrofenol. Para calcular la actividad específica se utilizó el coeficiente de extinción molar del p-Nitrofenol solubilizado en la microemulsión. Los valores obtenidos a  $W_o$  de 4 y 68 fueron 2.28  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y 2.84  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Para el cálculo de la actividad se utilizó el promedio de estos dos valores.

#### E. ESTUDIOS DE RETRANSFERENCIA.

Para re-extraer las enzimas ya solubilizadas en la

microemulsión a un medio acuoso, se usaron dos procedimientos. Para las enzimas solubilizadas en el sistema formado por Nonidet P-40/Tritón X-35/ciclohexano, se hizo lo siguiente; se evaporó el ciclohexano bajo corriente de aire, una vez eliminado el solvente se agregó un medio B que contenía 10 % de glicerol, KCl 150 mM, (la relación fue de 0.5 ml de medio B por cada ml de microemulsión evaporado); a la mezcla anterior se le agregó octanol (0.5 ml por cada 0.5 ml de medio B). Después se agitó en el vortex por 30 seg, formandose así una suspensión la cual se dejó reposar por 10 minutos. La separación de las fases se consiguió centrifugando la muestra a 1/4 de la máxima velocidad de una centrifuga clínica. La fase superior que correspondía al solvente conteniendo los detergentes se eliminó por succión. En la fase acuosa se determinó la concentración de proteína y la actividad enzimática. En el caso de las enzimas solubilizadas en el sistema formado por Tween 85/isopropanol/hexano, la retransferencia al medio acuoso se consiguió simplemente agregando al sistema un pequeño volumen (100 - 250 ml/ml de microemulsión) de un amortiguador con alta fuerza iónica (0.25-0.50 M). La mezcla se agita en el vortex por 30 seg y las fases se separan por centrifugación. Las enzimas se recuperan en la fase inferior (la fase acuosa) donde se hicieron las determinaciones apropiadas.

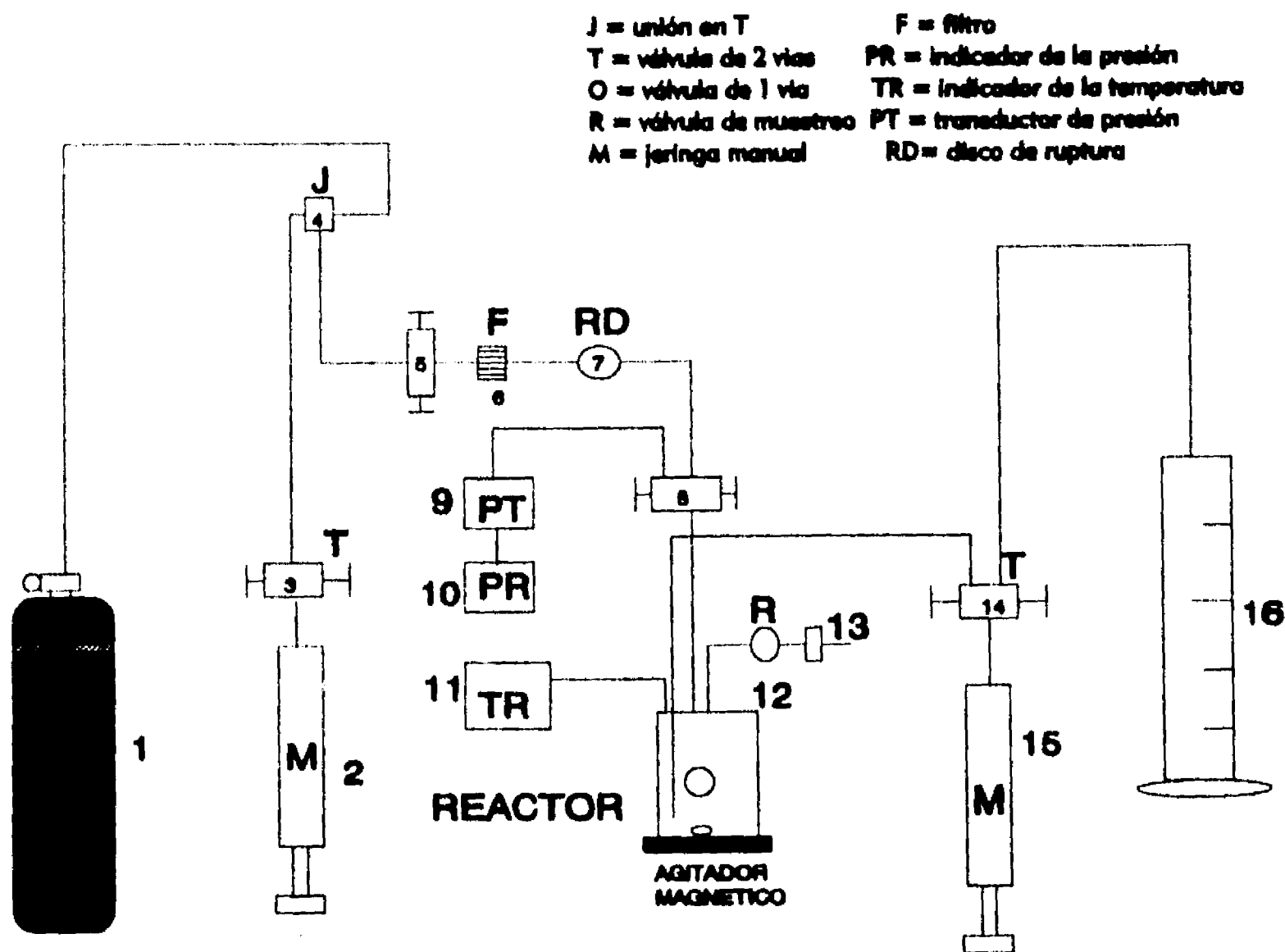
#### F. EXTRACCION DE PROTEINAS.

Se investigó la capacidad de las microemulsiones formadas por Tween 85 para solubilizar agua y proteínas. Se analizaron los efectos de: concentración del detergente, relación molar detergente/isopropanol y fuerza iónica de la fase acuosa en la extracción de proteínas. Como

proteína modelo se utilizó el citocromo C, ya que es posible estimar su concentración directamente en las microemulsiones a través de sus máximos de absorción en la región visible del espectro. Todas las soluciones acuosas consistieron de amortiguador de fosfatos (pH=7.0) con fuerzas iónicas que variaron de 0.001- 0.50 M. En general 1 ml de solución acuosa de la proteína ( a la concentración de 1 mg/ml) se puso en contacto con el hexano que contenía diferentes concentraciones de detergente y de isopropanol. Las dos fases se mezclaron agitando vigorosamente en el vortex, después el sistema se dejó reposar por 24 horas para que se produjera la separación de las fases. Posteriormente en la fase orgánica se estimaron la concentración de agua y proteína. La concentración de agua se determinó por el método, automatizado, de Karl Fisher. Para determinar la concentración de proteína, se utilizó la absorción específica aparente del citocromo c solubilizada en la microemulsión. Esto se realizó de la siguiente manera: La forma oxidada de la proteína (citocromo c) disuelta en amortiguador de fosfatos, se solubilizó en Tween 85 (14 % p/v)/ isopropanol (13 % v/v)/hexano. Se prepararon las diluciones apropiadas para obtener diferentes concentraciones de proteína y se midió la absorbancia a 530 nm para el citocromo C . Los datos se apegaron a la Ley de Lambert-Beer respecto a la concentración de proteína lo cual permitió calcular la absorción específica. De la misma manera se determinó la absorción específica de la hemoglobina.

#### G. SOLUBILIZACION DE PROTEINAS EN MICROEMULSIONES A ALTA PRESION.

Para la obtención de las microemulsiones a alta presión, se diseñó el sistema que se muestra en la Figura 6. Este sistema contiene un reactor que puede colocarse dentro de un espectrofotómetro Perkin Elmer. De esta manera fue posible realizar los diferentes análisis espectrofotométricos.



**Figura 6: Esquema del sistema utilizado para la preparación de microemulsiones a alta presión. El gas propano (1) se transfiere a la jeringa manual (2). Después de enfriar el gas se transfiere al reactor en donde se puso previamente el Tween 85 y el isopropanol. Cuando la microemulsión se ha formado se agrega la solución acuosa de la proteína a través de la jeringa (15). Para las mediciones de concentración de proteína y actividad enzimática, el reactor (12) se desconecta y se coloca en un espectrofotómetro Perkin Elmer.**

### 1. Formación de microemulsiones en propano líquido

Las microemulsiones se formaron con propano líquido altamente compresible 150 PSI (PSI = libra por pulgada cuadrada). Bajo estas condiciones el Tween 85 es insoluble en propano. De acuerdo a los resultados previos el isopropanol es el mejor co-tensoactivo para este detergente. El Tween 85 se colocó en el reactor antes de ensamblarlo. Después se adicionó el propano, enfriado a 4 °C, hasta que la solución se puso turbia; entonces pequeñas cantidades de isopropanol se adicionaron desde otra jeringa hasta que la solución fue transparente nuevamente, el sistema se agitó para conseguir un equilibrio rápido. Esto se repitió hasta que se formó una microemulsión de una sola fase.

## 2. Solubilización de Proteínas.

En general la microemulsión se formó con el 13 % (p/v) de Tween y 15 % de isopropanol en propano líquido como se indicó previamente. Una solución acuosa de la proteína a la concentración de 2.36 mg/ml se introdujo al reactor desde otra jeringa. La fase acuosa fue amortiguador de fosfatos 0.01 M pH = 7. La mezcla se agitó vigorosamente, el sistema se dejó reposar hasta que las fases se separaron. Únicamente la fase orgánica fue visible a través de las ventanas de safiro del reactor. La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente.

## 3. Actividad enzimática.

Se analizó la hidrólisis del N-sucinil-L-alanil-L-alanil-L-pronil 4-nitroanilida ( SAAPNAN ) por la



Tween 85 12.25 % (p/v), isopropanol 16 % (v/v) y 10 % de agua (0.01 M Tris pH 8.6 ). Una solución acuosa del sustrato (0.96 mM) y el Tween 85 se colocaron en el reactor. Una vez ensamblado, se adicionaron el propano y el isopropanol. La presión se incrementó gradualmente inyectando más propano hasta que se formó la microemulsión (2300-2500 PSI). El reactor se puso en el espectrofotómetro para registrar la hidrólisis no específica del sustrato. La reacción se inició inyectando 10  $\mu$ l de una solución de enzima ( 18 mg/ml ). La actividad se midió registrando el cambio de absorción 412 nm, debido a la liberación de la 4-nitroanilida. La actividad específica se cálculo utilizando el coeficiente de extinción aparente de la 4-Nitroanalida (  $5.50 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ) que se determinó en microemulsiones de Tween/isopropanol/hexano.

La actividad de la subtilisina en microemulsiones de Tween 85 14 % p/v, isopropanol 12 % v/v en hexano, se determinó disolviendo alícuotas de (10-20  $\mu$ l) de una solución 1.0 mM del sustrato. El agua necesaria para obtener el  $W_o$  requerido se obtuvo solubilizando Tris 0.01 M pH = 8.6. La reacción se inicio inyectando 10  $\mu$ l de una solución de la enzima (1.76 mg/ml). Las determinaciones en agua fueron como en la microemulsión, pero en este caso el medio de reacción fue Tris 0.01 M pH 8.6. Para la determinación de los parámetros catalíticos  $V_{max}/K_m$  para la enzima solubilizada en propano se determinaron usando la forma integrada de la ecuación de Michaelis-Menten utilizando la metodología descrita para este sustrato ( 55 )

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

En este trabajo se investigaron varios detergentes no iónicos en su capacidad para formar microemulsiones. Los detergentes seleccionados fueron: Nonidet P-40, Tritón X-35, Brij 58, Brij 52 y Tween 85 con los cuales fue posible formar microemulsiones. De los sistemas elegidos, de particular interés fueron las microemulsiones constituidas por el Nonidet P-40/Tritón X-35/ciclohexano y las formadas por Tween 85/isopropanol/hexano. La estabilidad de las enzimas solubilizadas en estos sistemas fue bastante aceptable y bajo ciertas condiciones fue mejor que la estabilidad de las enzimas en solución acuosa. Además las enzimas mostraron actividades comparables a las observadas en medios acuosos.

##### A. EFECTO DE LOS DETERGENTES

En primer lugar se estudio el efecto de algunos detergentes sobre la actividad la 20- $\beta$  HSDH. En la tabla II se muestra el efecto de algunos detergetes sobre la actividad de esta enzima. También se muestra cual fue el efecto de estos detergentes sobre la actividad de la 17  $\beta$ -estradiol deshidrogenasa (17  $\beta$ -EDH). Las enzimas fueron menos estables con los detergentes iónicos que con los detergentes no iónicos. Por ejemplo el CTAB inactivó totalmente a la 17- $\beta$  EDH en presencia de 0.01 % de detergente (la concnetración más baja utilizada)

Aunque aparentemente, la 20- $\beta$ HSDH conservó su actividad en la presencia de CTAB, estudios más detallados mostraron que a una concentración final de 0.4 % la enzima perdió más del 50 % de su actividad; Con el Noni-

det P-40 se requirió de una concentración final del 10 % para que la enzima disminuyera su actividad en un 40 %. Cuando la enzima se preincubó en presencia de CTAB a una concentración final de 0.02 % la enzima perdió más del 80 % de su actividad después de dos hora. Los estudios de estabilidad de las enzimas en presencia de Tween 80 y Nonidet P-40 ( 10 % p/v ) mostraron que las enzimas permanecieron estables por más de 4 horas de preincubación.

**TABLA II**

DETERGENTE	cmc %	ACTIVIDAD REMANENTE %	
		20 $\beta$ -HSDH	17 $\beta$ -EDH
CTAB	0.033	70.0	0.00
AOT	0.11	ND	8.00
CHAPS	0.39	100	100
LUBROL WX	0.003	100	100
NONIDET P-40	0.018	100	100
TWEEN 80	0.002	100	119

**Tabla II: Efecto de los detergentes sobre las actividades de la 17  $\beta$ -Estradiol deshidrogenasa ( 17  $\beta$ -EDH) y la 20  $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa ( 20  $\beta$ -HEDH). La concentración final de todos los detergentes fue de 0.01 %.**

**B. FORMACION DE LAS MICROEMULSIONES**

Las microemulsiones se prepararon como se indica en

la página 14. En la tabla III se resume la composición de las microemulsiones. Se muestra el rango de concentración de agua en el que operan. Con el Nonidet P-40, se pudieron formar microemulsiones estables, desde cero agua adicionada hasta el 7 %; con el Tween-85 fue posible obtener microemulsiones capaces de contener hasta el 26 % de agua.

**TABLA III**

TENSOACTIVO [ ] mM	CO-TENSOACTIVO [ ] mM	% AGUA SOLUBILIZADA	W <sub>o</sub>
BRU 58 53.9	BRU 52 164.5	1.4 - 6.70	3.5 - 17.5
NONIDET- P40 318	OCTANOL 1023	0.27 - 7.0	0.35 - 12.0
NONIDET- P40 185	TRITON X-35 143	0.054 - 10.0	0.135 - 16.7
TWEEN 85 78	ISOPROPANOL 1560	0.847 - 26.0	6.13 - 180.0

**Tabla III : Resumen de los tensioactivos y cotensioactivos utilizados para la formación de microemulsiones. En el caso del sistema Nonidet P-40/Tritón X-35, el Tritón X-35 se consideró como el cotensioactivo. Se muestra el rango en el contenido de agua así como el correspondiente rango en el W<sub>o</sub>.**

Aparentemente, entre más compleja fué la estructura del tensioactivo fué más fácil la formación de micelas invertidas. Por ejemplo, en el caso del Tween-85 esta alta capacidad para solubilizar agua posiblemente se debe a que este detergente además de contener el sorbitol

y varias unidades de polioxietilenos; contiene tres ácidos oleicos constituyendo la región hidrofóbica, los cuales favorecen la penetración del solvente en la monocapa y por lo tanto la estabilización de las de micelas invertidas. Por el contrario, con Brij cuya estructura es más sencilla que el Tween 85 se necesitaron condiciones especiales para formar las microemulsiones

#### 1 . EFECTO DEL CO-TENSOACTIVO.

Esta bién establecido que el co-tensoactivo es un factor esencial para la estabilidad termodinámica de las microemulsiones. Este actua adsorbiendose en la superficie de los globulos de agua disminuyendo la tensión interfacial agua-solvente. Por lo que, una de las propiedades más importantes del co-tensoactivo es su capacidad para interactuar con la interfese. La cantidad de co-tensoactivo necesario para conseguir la estabilidad depende de sus propiedades hidrofílicas-hidrofóbicas. En este trabajo se encontró que mezclando un detergente hidrofóbico (un valor de BHL bajo) con otro detergente más hidrofílico ( un valor de HLB alto), se pudieron formar microemulsiones estables. Como se muestra en los sistemas formados por Brij 58/Brij 52 y Nonidet P-40/ Tritón X-35. Se propone que el detergente más hidrofóbico es el que funciona como el co-tensoactivo, ya que no es soluble en la fase acuosa solo se incorporará en la interface.

En el sistema formado por el Tween 85 los alcoholes hidrofóbicos como el octanol o el hexanol, asi como detergentes muy hidrofóbicos como el Span 85 fueron incapaces de funcionar como co-tensoactivos. Con el isopropanol se pudieron formar microemulsiones estables. El isopropanol es completamente miscible en hexano, Tween 85

y Agua. Posiblemente actua reduciendo la tensión interfacial hexano/agua y aumenteando la hidrofiliidad del Tween 85.

En la figura 7a se muestra el efecto de la concentración del isopropanol y la fuerza iónica, en el número de fases que se formaron. A baja fuerza iónica una concentración muy baja de isopropanol promueve la formación de sistemas de 4 fases que se caracterizan por una interfase muy inestables, con el incremento en la concentración del isopropanol se forman sistemas de 2 fases del tipo Winsor II, cuando la relación isopropanol/Tween alcanza el valor de 20 se obtienen sistemas de una sola fase. A fuerza iónica alta y baja concentración de isopropanol se forman sistemas de 3 fases. Para obtener microemulsiones estables se requirió de una mayor concentración de isopropanol, aunque solo fue posible obtener sistemas del tipo Winsor II aún a las concentraciones más altas de isopropanol. La capacidad para solubilizar agua en función de la relación isopropanol/Tween y la fuerza iónica se muestra en la figura 7b. Cuando la fuerza iónica fue muy baja, el incrementó en la concentración del isopropanol favoreció la solubilización de agua. A fuerza iónica moderada se observó que existe una concentración del isopropanol (12 - 13% v/v), a la cual la capacidad de solubilizar agua es óptima.

Como se mostrará más adelante esta propiedad del sistema Tween 85/ isopropanol puede ser utilizado para la extracción y purificación de proteínas.

La figura 8 describe la habilidad del Tween 85 para solubilizar agua en función de su concentración y la

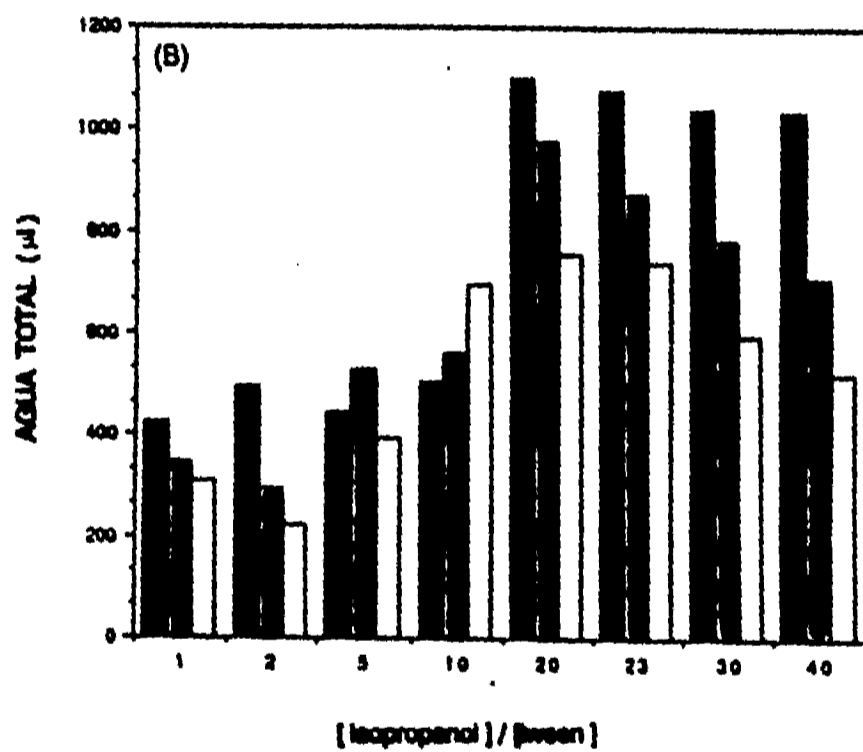
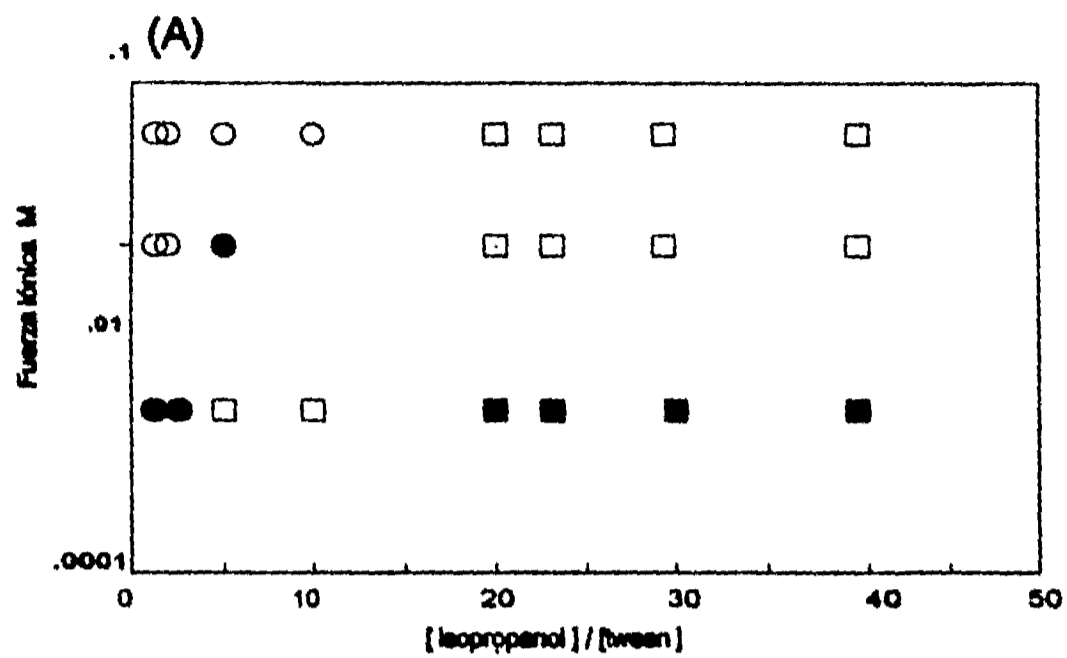
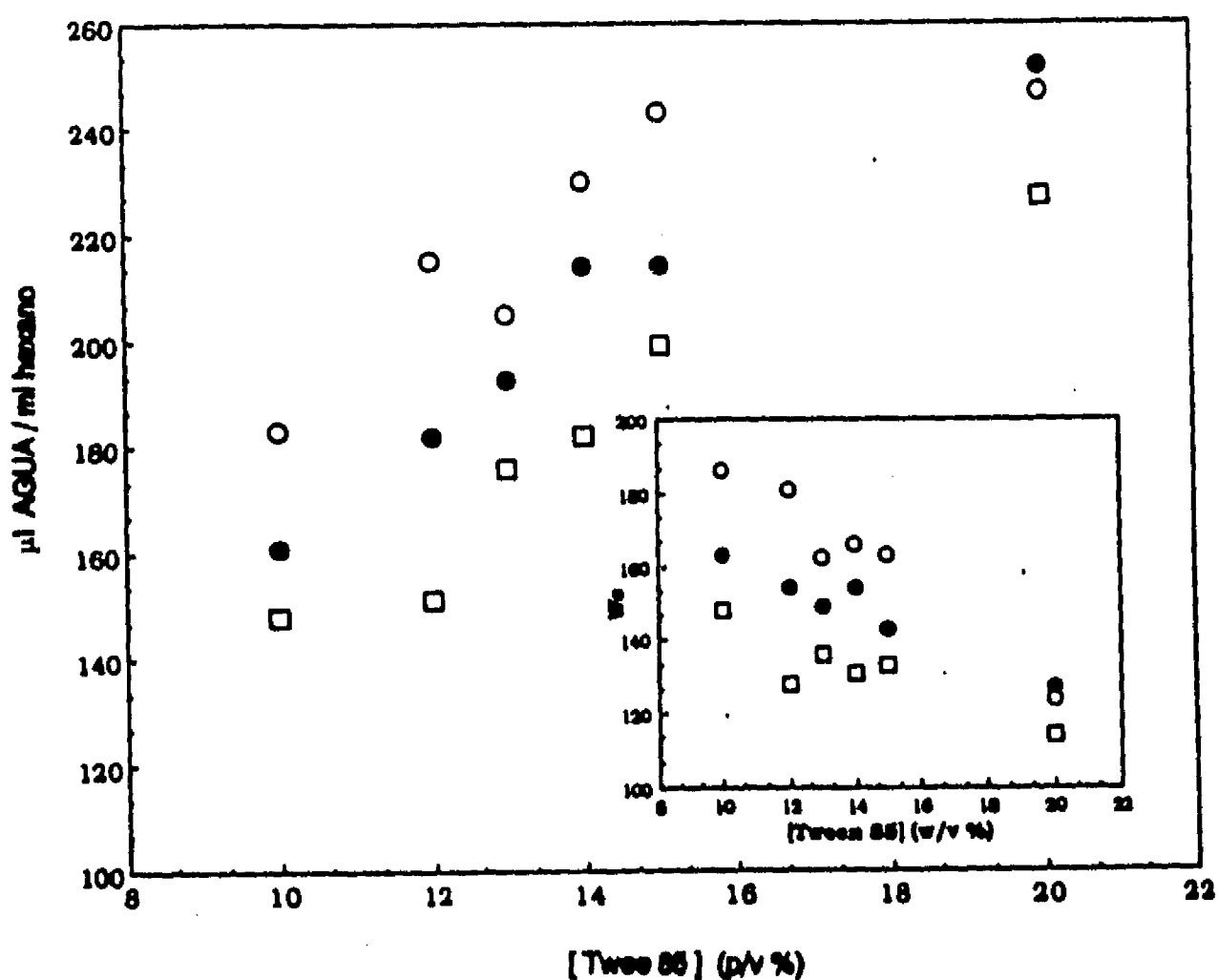


Figura 7: Efecto del isopropanol en la Formación de fases (A) y la solubilización de agua (B) en función de la fuerza iónica. En (A) los símbolos representan los diferentes sistemas que se formaron: 4 fases (●), 3 fase (○), 2 fases (□), 1 fase (■). En (B) se muestra el efecto de la fuerza iónica en la solubilización de agua por las microemulsiones de Tween 85 (14 % w/v) en hexano. fuerza iónica: 0.001 M (■); 0.01 M (■); 0.05 M (□).

fuerza iónica del amortiguador. La cantidad de agua solubilizada aumentó con el incremento en la concentración de detergente, mientras que a una concentración dada de detergente la cantidad de agua solubilizada disminuyó a medida que aumentó la fuerza iónica. Al convertir el contenido de agua en  $W_o$ , se encontró que a baja concentración de Tween el  $W_o$  aumenta, lo cual significa que se formaron micelas más grandes (14).



**Figura 8:** Efecto de la concentración de Tween y la fuerza iónica en la solubilización de agua. La concentración de isopropanol se mantuvo constante a 13 % (v/v). Se muestra la solubilización del amortiguador de fosfatos pH 7 a las fuerzas iónicas de 0.01 M (○), 0.05 M (●), 0.1 (□). El inserto en la grafica muestra los valores del  $W_o$  ([agua]/[Tween]) que se obtuvieron en cada una de las condiciones probadas. La cantidad de agua absorbida por las microemulsiones se determinó por el método de Karl Fisher ( $\pm 5\%$ ).



## C. CARACTERIZACION DE LAS MICROEMULSIONES

### 1. Tamaño micelar.

Se ha propuesto (12, 14) que la solubilización de agua en un sistema de micelas invertidas tiene por consecuencia un incremento en el diámetro de las micelas. En el caso del AOT se ha reportado un aumento proporcional entre el  $W_o$  y el diámetro de las micelas. Sin embargo, éste no es el caso de las microemulsiones de detergentes no iónicos, ya que no existe la certidumbre de que las partículas permanezcan esféricas particularmente a valores altos del  $W_o$ . ( 56 ).

En los sistemas descritos en este trabajo en general se encontró que en la ausencia de agua la polidispersión es alta, esto indica que el tamaño de las micelas es heterogéneo. Con la adición de pequeñas cantidades de agua la polidispersión disminuyó considerablemente. En el sistema formado por Brij 58/Brij 52, los estudios de dispersión de luz mostraron que sólo a una concentración dada de agua se formaron micelas de diámetros homogéneos. En el sistema formado por Nonidet P-40 y octanol fue el que mostró la polidispersión más alta, aún en la presencia de agua. Como se ha mencionado antes esto indica que el tamaño de las micelas es muy heterogéneo, lo cual representa una desventaja para utilizarlos en la solubilización de enzimas, ya que complicaría el análisis cinético.

En el sistema constituido por Nonidet P-40/Tritón X-35 se observó un aumento en el diámetro de las micelas con el incremento en la concentración de agua tabla IV.

**TABLA IV**

<b>Wo</b>	<b>Diámetro nm</b>	<b>Polidispersión</b>
<b>0.13</b>	<b>8.52 (0.87)</b>	<b>0.35 (0.044)</b>
<b>1.87</b>	<b>7.54 (0.11)</b>	<b>0.067 (0.024)</b>
<b>3.05</b>	<b>8.42 (0.32)</b>	<b>0.158 (0.029)</b>
<b>4.92</b>	<b>9.55 (0.10)</b>	<b>0.072 (0.039)</b>
<b>6.77</b>	<b>11.95 (0.079)</b>	<b>0.089 (0.015)</b>
<b>7.92</b>	<b>15.90 (0.071)</b>	<b>0.11 (0.035)</b>
<b>9.66</b>	<b>19.94 (0.738)</b>	<b>0.21 (0.022)</b>
<b>11.43</b>	<b>26.87 (0.23)</b>	<b>0.24 (0.015)</b>

**Tabla IV: Variación del diámetro micelar en función de Wo en micelas de Nonidet P-40/Tritón X-35. El número entre paréntesis representa la desviación estandar**

Además, los valores de la polidispersión, a diferentes concentraciones de agua fueron los más pequeños que se observaron; esto indica homogeneidad en tamaño micelar.

Los valores determinados para el sistema formado por Tween 85/ Isopropanol/hexano se muestran en la tabla (V). Al igual que en las micelas formadas con el AOT, se observó un incremento en el diámetro micelar al aumentar la concentración de agua. En la tabla se muestra también los valores de  $\theta$  determinados (ver la siguiente sección)

a partir de la viscosidad específica. A estos valores tan altos de  $\theta$  las interacciones entre las micelas son bastante apreciables. Estas interacciones afectan el coeficiente de difusión de las micelas, lo cual provoca que se detecten radios mayores (62).

**TABLA V**

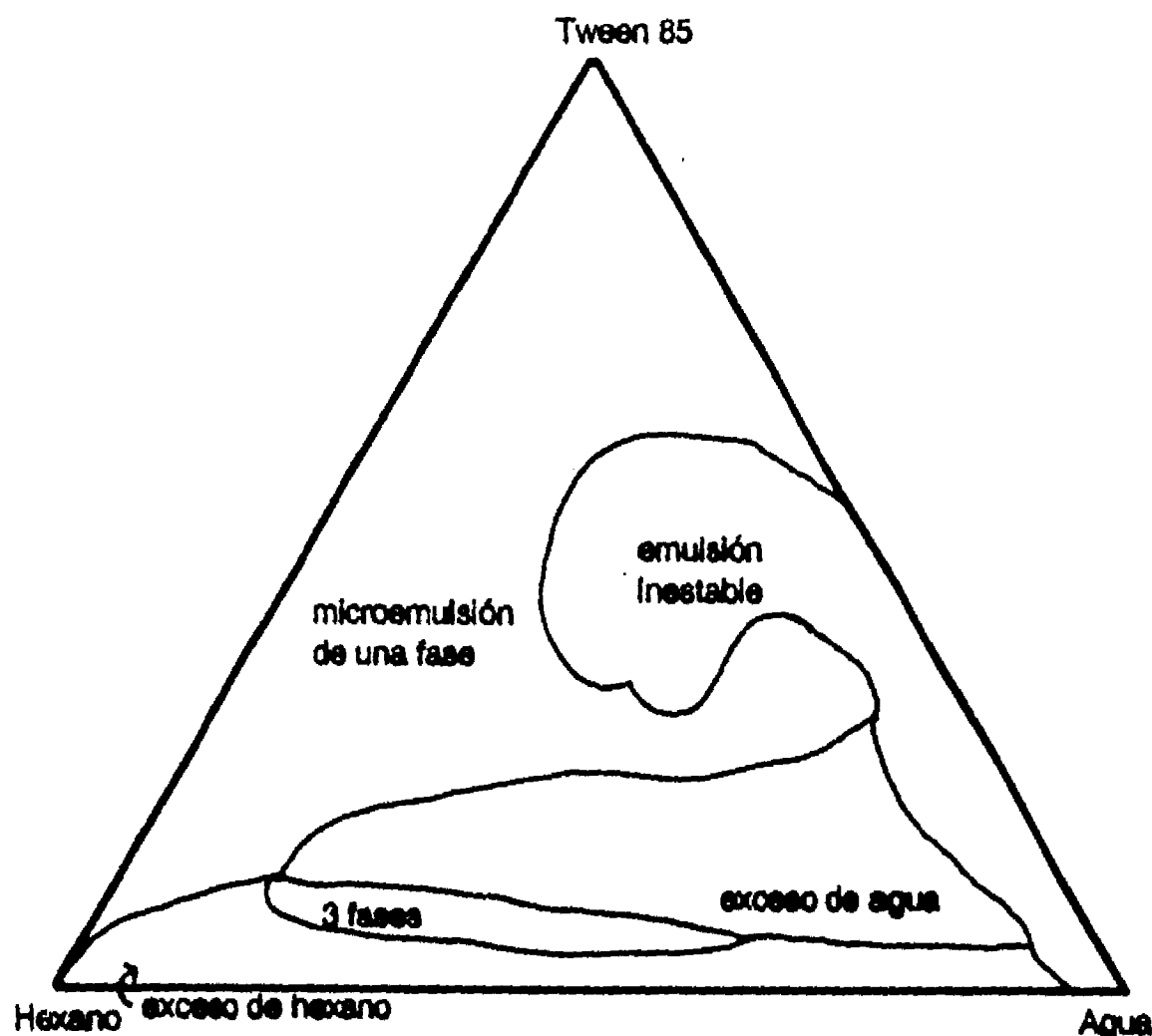
<b>Wo</b>	<b><math>\theta</math></b>	<b>Diámetro nm</b>
6	0.20	8.4
13	0.24	9.4
28	0.34	11.7
42	0.40	13.8
58	0.63	16.2
93	0.93	21.4
107	1.04	23.5
122	1.17	25.7
131	1.24	27.1

**Tabla V. Variación del tamaño micelar en función del Wo en las microemulsiones de Tween 85 (14%) iso-propanol (13%) en hexano. Determinados por el método de dispersión de luz.**

## 2. Diagrama de fases

Si bien no se hizo una caracterización amplia de los

diagramas de fase del sistema Tween 85/isopropanol/hexano/agua. Los estudios hechos a temperatura ambiente ilustran los diferentes tipos de sistemas que se pueden ob-



**Figura 9: Diagrama de fases del sistema Tween 85/hexano conteniendo el 13 % de isopropano. La fase acuosa fue fosfatos 0.01 M pH 7.4. La temperatura fue de 20 C**

tener cuando se mantiene constante la concentración del isopropanol y se varían las concentraciones del Tween, agua y el hexano (figura 9). De particular interés para los estudios de actividad enzimática fue la región donde se obtuvieron las microemulsiones de una sola fase. En

tanto que las microemulsiones en equilibrio con una fase acuosa (sistemas Winsor II) se utilizaron para los estudios de extracción de proteínas.

### 3 . Determinación de la viscosidad.

Los estudios de viscosidad son útiles para obtener información de algunas propiedades fisicoquímicas de las microemulsiones. La figura 10 muestra la dependencia de la viscosidad reducida ( $\eta_{sp}/C$ ) en función de la concentración de tensoactivo.

La viscosidad intrínseca ( $\eta$ ) estimada se muestra en el recuadro. Estos valores son similares a los reportados para proteínas globulares (64). La viscosidad intrínseca depende del grado de solvatación y la estructura de los agregados que forman el sistema. Sin embargo, no se ha descrito ningún modelo apropiado para las micelas invertidas.

Con los valores de la viscosidad específica, se calculó la fracción de volumen micelar ( $\theta$ ), utilizando la ecuación (5). La figura 11 muestra la variación de  $\theta$  en función del  $W_o$ . A estos valores tan altos de  $\theta$ , las interacciones entre las micelas son apreciables. Por lo tanto se alejan de las condiciones en que la ecuación (5) es válida. (63) Sin embargo, es posible obtener algo de información sobre el proceso de hidratación de las micelas. Por ejemplo, cuando la concentración de agua es relativamente baja ( $W_o < 25$ ) se observa que el incremento en el valor de  $\theta$  es pequeño, esto indica que el agua que se agrega al sistema se está utilizando para hidratar los grupos polares. De la extrapolación de estos datos es

posible estimar la fracción de volumen para micelas que no contuvieran agua. Es imposible remover el agua del

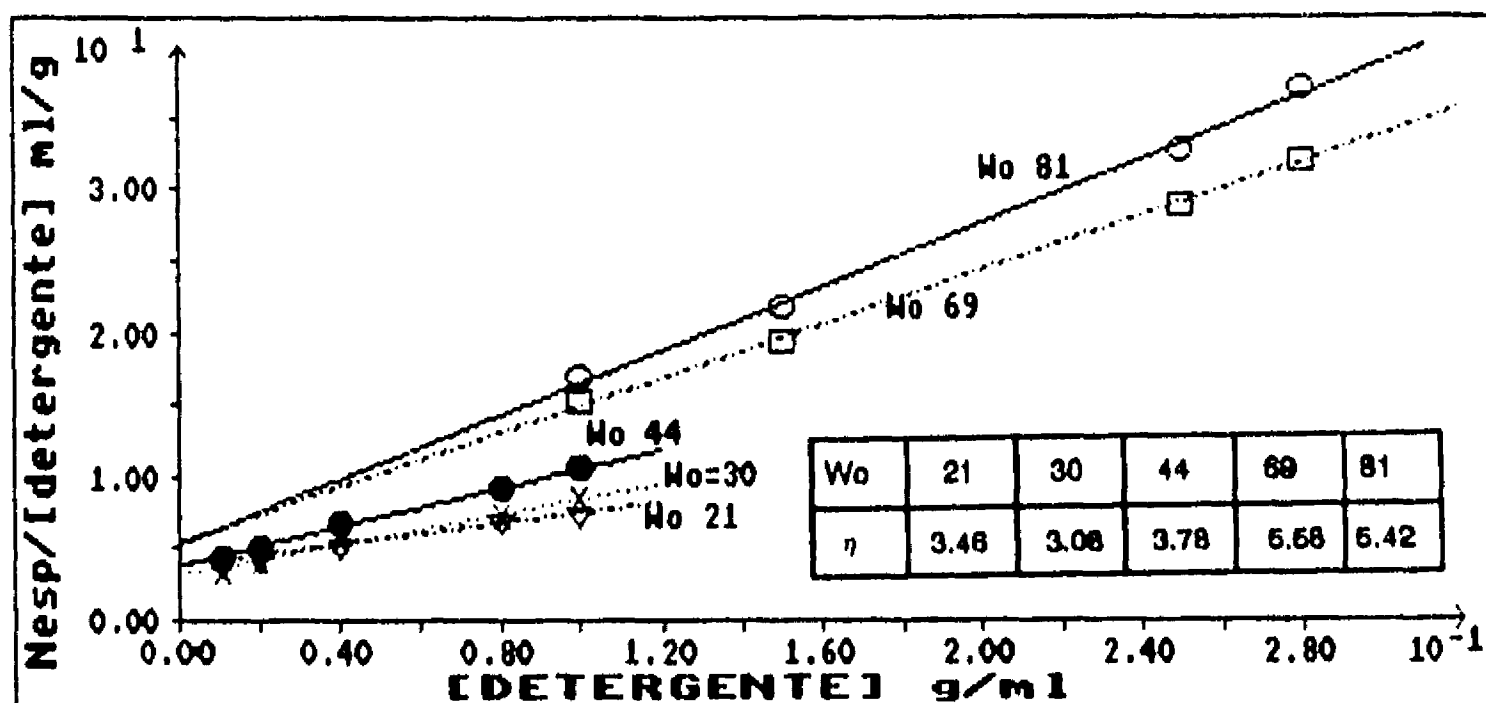


Figura 10: Efecto de la concentración de detergente y agua en la viscosidad específica de las microemulsiones de Tween 85 (14 %) isopropanol (13 %) en hexano. La concentración de agua se varió para obtener los valores de  $W_o$  indicados. En la tabla se muestran los valores de la viscosidad intrínseca obtenidos.

sistema para hacer una medida real. El punto de cambio de la pendiente representa el punto de hidratación, que para el sistema conteniendo el 14 % (p/v) de Tween ocurre alrededor de  $W_o$  25. Arriba de este  $W_o$ , aparece el agua libre en el interior de las micelas. Se ha reportado que cada grupo de oxietilenos se asocia con 2 moléculas de agua ( 38 ).

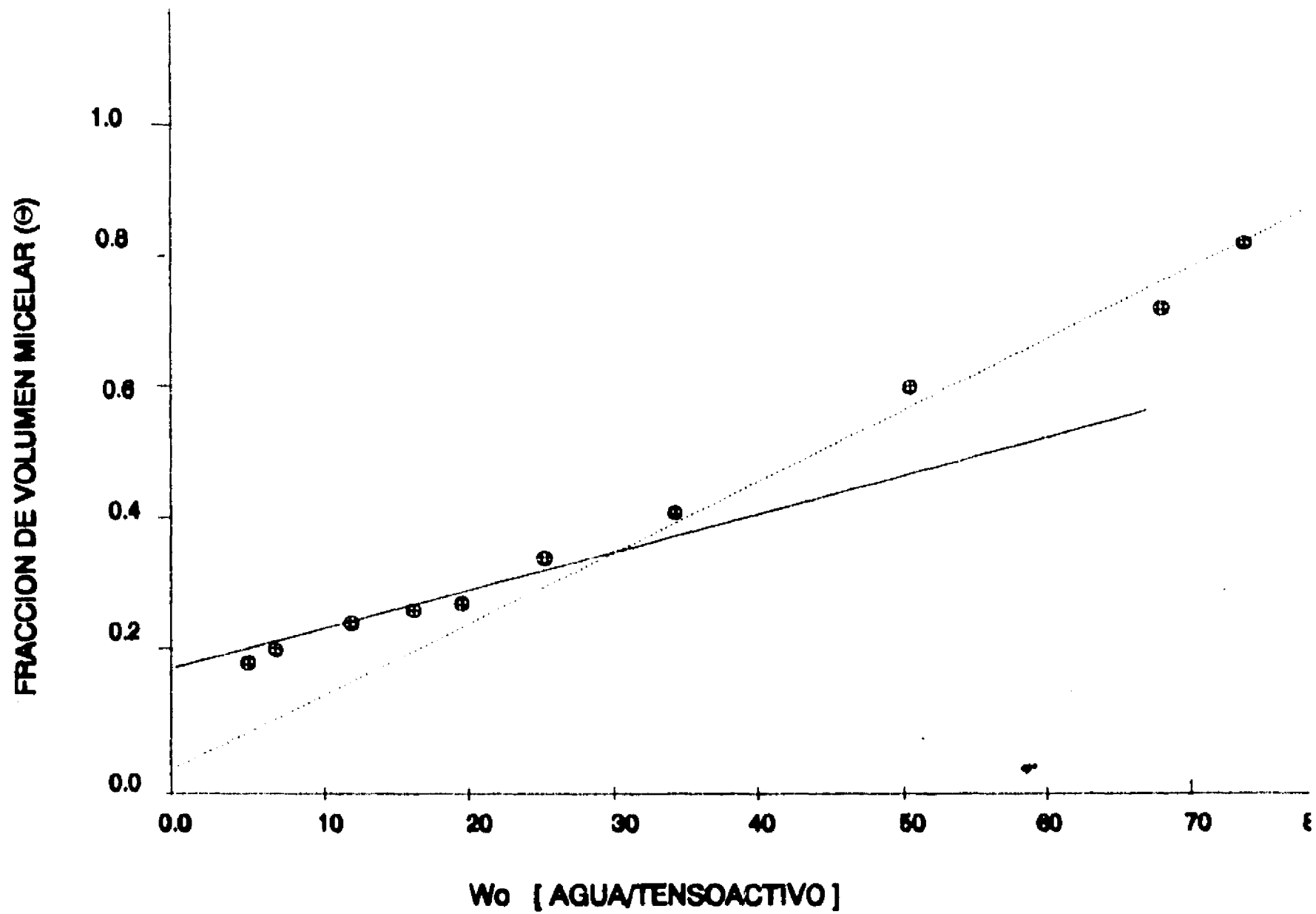
El valor que se obtuvo utilizando el punto de hidratación fue de 1.25. La diferencia se puede deber a dos razones: una sería que algo del detergente es solubilizado en el interior de la micela y el otro se debe a que existe detergente libre en el solvente. Es decir que no forma parte de la membrana micelar. La concentración de este detergente libre es de 10.5 mM. El cálculo de  $W_o$  se hace considerando la concentración total del detergente (76 mM). Si a este valor se resta la concentración de detergente libre (denominada como la concentración crítica de la microemulsión  $c_{MC}$ ), se obtiene un  $W_o$  de 30. Lo cual eleva la proporción a 1.5.

Con los valores de  $(\theta)$  se pudo determinar el número de agregación a través de la función:

$$\theta = \frac{N \cdot [Tens] \cdot V_m}{n} \quad (6)$$

donde  $N$  es el número de Avogadro,  $[Tens]$  es la concentración total de tensoactivo y  $V_m$  es el volumen micelar. En estos cálculos se utilizó el valor corregido de la concentración de detergente, (concentración total menos  $c_{MC}$ ).

El cociente entre la concentración corregida del detergente y el número de agregación nos da la concentración micelar. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla VI.



**Figura 11. Variación de la fracción del volumen micelar en función del  $W_o$ . El valor  $\theta$  se calculó a partir de los valores de la viscosidad específica de acuerdo a la ecuación 5.**



TABLA VI

Wo	$\theta$	Vm cm <sup>3</sup> x 10 <sup>19</sup>	n	[M] μM
4	0.19	3.39	80	810
13	0.25	6.22	113	570
19	0.27	8.11	137	470
28	0.34	10.94	147	445
34	0.41	12.83	141	464
51	0.60	18.18	138	475
68	0.71	23.60	150	436

Tabla VI: Número de agregación (n) y concentración micelar ([M]), determinados a partir de la viscosidad y estudios de dispersión de luz.

#### D. SOLUBILIZACION DE ENZIMAS EN LAS MICROEMULSIONES.

Los estudios con enzimas se realizaron esencialmente en las microemulsiones formadas por Nonidet P-40/Trión X-35 y Tween 85/ isopropanol. Se eligieron estos sistemas por las siguientes propiedades: forman soluciones transparentes y estables a temperatura ambiente. Los estudios de dispersión de luz indicaron que contienen micelas que

aumentan en tamaño con el incremento en la concentración de agua. Con las microemulsiones de Tween 35, isopropanol, se pudo realizar una caracterización más amplia y también se encontró un mayor número de aplicaciones.

#### 1. Efecto del $W_o$ sobre la actividad de las enzimas

Los estudios de la variación de la actividad en función del  $W_o$  para la 20  $\beta$ -HEDH se muestran en la figura 12. La actividad enzimática aumentó progresivamente con el incremento en el  $W_o$  alcanzando la actividad máxima a  $W_o$  de 8. Después de cual el incremento de la actividad es pequeño. El patrón hipérbolico de la variación de la actividad en función del  $W_o$  se diferencia de lo observado en la mayoría de las enzimas analizadas en otros sistemas micelares; en las cuales se ha observado una curva en campana. En la figura también se muestra que la densidad óptica, medida a 340 nm, no varió al adicionar más agua al sistema, esto corrobora la formación de la microemulsión.

La subtilisina mostró una capacidad catalítica muy pobre en el sistema de Nonidet P-40/ Tritón X-35. Posiblemente debido a que su sustrato, el p-nitrofenol se distribuyó principalmente en la fase orgánica. Como lo muestra el hecho de que el espectro de absorción del p-nitrofenol en la microemulsión fue igual al obtenido en ciclohexano con un máximo de absorción 340 nm. Sin embargo, en el sistema formado con Tween 35/isopropanol esta enzima fue muy activa, aún a  $W_o$  bajas.

#### 1. Estabilidad de las enzimas en las microemulsiones.

La 20- $\beta$  HSDH se ha estudiada ampliamente en microemulsiones iónicas; pero muy poco se ha dicho en relación de su estabilidad en dichos sistemas. Sin embargo, la

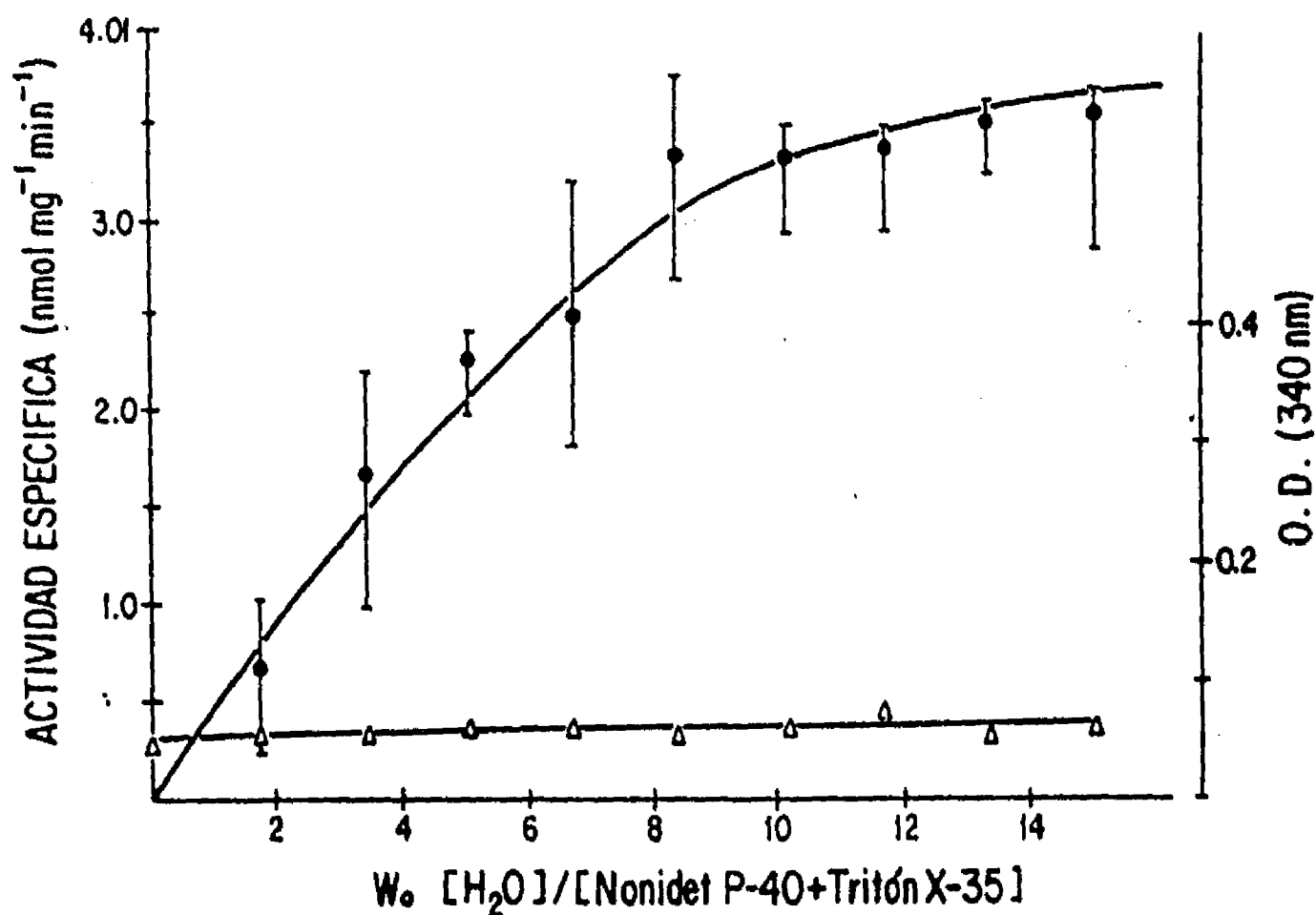


Figura 12. Efecto del  $W_o$  sobre la actividad específica de la 20  $\beta$ -HSDH ( ● ) solubilizada en microemulsiones de Nonidet P-40/Tritón X-35 ( 8 : 3.5 ) en ciclohexano. La actividad se midió con 1 ml de microemulsión que con HEPES 50 mM pH = 7.6 ( como fase acuosa ), 0.30  $\mu$ g de proteína y 100 mM de NADH. La reacción se inició con 12  $\mu$ l de cortisona 25 mM en etanol. La actividad medida en medio acuoso fue de 5.0  $\mu$ mol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> . Se muestra también que la solubilización de agua no incrementa la densidad óptica de las microemulsiones ( △ )

estabilidad como un indicador de la integridad estructural de las enzimas es fundamental para poder relacionar

los cambios observados de las enzimas solubilizadas a las condiciones del medio. En la tabla VII se muestra la relación entre la estabilidad y las características del agua solubilizada. En el amortiguador Hepes así como en agua la actividad de la enzima disminuyó rápidamente, perdiendo más del 80 % de

**TABLA VII**

<b>ACTIVIDAD RESIDUAL %</b>					
		<b>24 horas</b>		<b>96 horas</b>	
<b>Medio</b>	<b>Agua</b>	<b>Microemulsión</b>	<b>Agua</b>	<b>Microemulsión</b>	
<b>Agua</b>	<b>8</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	
<b>Hepes</b>	<b>21</b>	<b>78</b>	<b>8</b>	<b>68</b>	
<b>Medio E</b>	<b>86</b>	<b>46</b>	<b>71</b>	<b>6.5</b>	

Tabla VII: Se analizó el efecto que la composición de la fase acuosa sobre la estabilidad de la 20 B-HSDH solubilizada en microemulsiones de Nonidet P-40/Tritón X-35/ciclohexano. El  $W_o$  se mantuvo constante en 8.4. Se muestra los valores obtenidos en cada uno de los medios, los cuales fueron: Agua, Hepes 50 mM pH=7.6, y el medio E constituido por  $K_2PO_4$  500 mM; KCl 154 mM; DTT 100  $\mu$ M, EDTA 100  $\mu$ M; glicerol 20 % pH =7.4. La incubación se realizó a temperatura ambiente. El 100 % fue la actividad al tiempo cero.

su actividad en 24 horas de incubación. En la microemulsión la estabilidad fue la más alta. La máxima estabilidad se observó en la solución acuosa conteniendo

glicerol (medio E). La estabilidad de la HSDH en micelas invertidas formadas con el amortiguador con Hepes se estudió en función del tiempo de incubación (Figura 13).

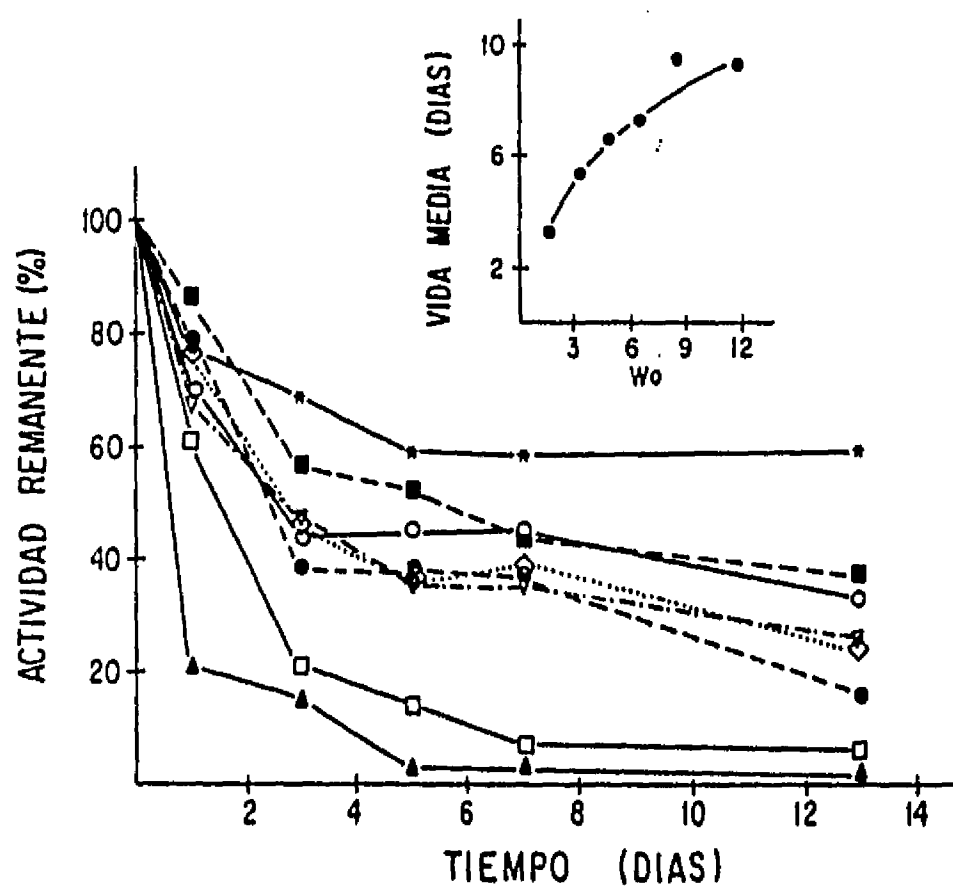


Figura 13: Estabilidad de la 20  $\beta$ -HSDH en microemulsiones en función del  $W_o$ . La actividad se midió con 1 ml de microemulsión que contenía Hepes 50 mM pH= 7.6 (como fase acuosa), 1.0  $\mu$ g de enzima y 100 mM de NADH. La reacción se inició con 12  $\mu$ l de cortisona 25 mM en etanol. Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente y a los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad residual. También se investigó la estabilidad en el Hepes y el medio E (ver tabla IX). Medio E, ( \* );  $W_o = 7$ , ( ■ );  $W_o = 5$ , ( ○ );  $W_o = 4$ , ( ▽ );  $W_o = 3$ , ( ◇ );  $W_o = 2$ , ( ● );  $W_o = 1$ , ( □ ); Hepes, ( ▲ ). En el inserto se muestra el efecto del  $W_o$  sobre la vida media de la enzima.

En todas las condiciones analizadas se observó un decaimiento exponencial de la actividad (a excepción de las micelas al más bajo  $W_o$  y en el medio conteniendo Hepes. ) Con la linearización de las curvas obtenidas se determinó

la velocidad de decaimiento a partir de la cual se determinó la vida media. La enzima mostró su máxima estabilidad en el medio acuoso conteniendo glicerol. Sin embargo los datos indicaron que la vida media de la enzima en la microemulsión aumentó con el contenido de agua hasta el  $W_o = 10$ , donde la vida media fue de una semana (inserto en la figura 13). Es interesante que la 17  $\beta$ -EDH, una enzima muy sensible a los detergentes iónicos, mostró ser activa en la microemulsiones formadas la Nonidet P-40 /Tritón X-35. Además esta enzima conservó la actividad inicial observada en la microemulsión después de 8 hr. de preincubación.

La estabilidad de la subtilisana solubilizada en Tween 85/ isopropanol/hexano se analizó a diferentes concentraciones de agua y a las temperaturas de 30 .C y 50 .C. A 30 .C y no se observó una gran disminución de la actividad en todas las condiciones probadas. Cuando la temperatura se incrementó a 50 .C, la estabilidad dependió del  $W_o$ . La inactivación fue mayor a medida que se incrementó la concentraciones de agua, sin embargo, a baja concentración de agua la enzima fue más estable en la microemulsión que en el medio acuoso

Estos resultados demuestran que las enzimas solubilizadas en microemulsiones formadas por detergentes no iónicos mantienen su capacidad catalítica. Se encontró que en algunos casos la actividad observada en la microemulsión fue bastante reducida. Para establecer si la disminución en actividad era debido a las condiciones proporcionadas por el sistema como serían: baja concentración de agua, compartimentalización de los reactantes y la enzima; o el detergente y/o el solvente la estaban

desnaturalizando, las enzimas se re-extrajeron de la microemulsión a un medio acuoso nuevamente. La tabla VIII se muestra que la actividad específica de las enzimas retransferidas fue de alrededor de 3 veces mayor que la observada en la fracción original, aún considerando que solo se recuperó el 40 % de la proteína solubilizada

**TABLA VIII**

Enzima	Actividad Específica, $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$			Actividad Recuperada %
	Original	Microemulsión $W_o = 8.4$	Retransferida	
17 $\beta$ -EDH	0.683	0.046	1.8	120 (46)
20 $\beta$ -HSDH	4.74	3.54	13.9	123 (42)

**Tabla VIII: Porcentaje de la actividad recuperada después de reextraer las enzimas de la microemulsión a la fase acuosa. Se muestra el valor antes de la solubilización (original). El número entre paréntesis es la cantidad de proteína recuperada.**

la actividad total recuperada fue del 120 %. Lo relevante es que las enzimas no se desnaturalizan aún después de haber estado en las condiciones de la microemulsión. En todos los casos se observó un aumento en la actividad específica, posiblemente debido a que las proteínas desnaturalizadas permanecen en la microemulsión.

### 3. Estudios Cinéticos.

En todos los cálculos se utilizó la concentración de sustratos relativa a el volumen total de la microemulsión. En general a baja concentración de agua, el principal efecto que se observó fue un incremento en la valor de la  $K_m$  y una disminución en el valor de la  $K_{cat}$ . Lo cual se reflejó en una menor eficiencia catalítica para las enzimas solubilizadas en la microemulsión. Se muestran los parámetros cinéticos de la 20  $\beta$ -HSDH y la subtilisina determinados en la microemulsión y en agua.

#### a). Estudios cinéticos con la 20 $\beta$ -HSDH.

Los resultados de los estudios cinéticos realizados con la 20  $\beta$ -HSDH solubilizada en microemulsiones de Nonidet P-40/Tritón X-35 se muestran en la tabla IX. Los valores de la  $K_m$  fueron diferentes para cada uno de los sustratos. La  $K_m$  para la cortisona fue menor a  $W_o$  1.68 que a  $W_o$  de 8.4. Esto se puede explicar como un efecto de la concentración de agua en la distribución de la cortisona en los microambientes de la microemulsión ( el núcleo acuoso, el solvente y la membrana). La cortisona es insoluble en el ciclohexano, por lo que, probablemente se está distribuyendo en la interfase micelar y el agua solubilizada en el interior de la micela. A baja concentración de agua, el interior de la micela es menos polar ( 22, 23), por lo que ofrece un medio apropiado para la solubilización de la cortisona. Cuando se incrementa la concentración de agua la partición de la cortisona al interior de la micela es menor, lo cual se refleja como una disminución de la afinidad por la cortisona a mayor concentración de agua en la microemulsión. En el caso de



la progesterona (un esteroide más hidrofóbico) el incremento en la  $K_m$  fue 200 veces, para esta misma enzima estudiada en microemulsiones de Tritón/ hexanol/octano

**TABLA IX**

Wo	kcat min. <sup>-1</sup>	Cortisona		NADH	
		Km $\mu M$	kcat/Km $\mu M^{-1} \text{min}^{-1}$	Km $\mu M$	kcat/Km $\mu M^{-1} \text{min}^{-1}$
1.68	58.8	29	2.0	10	5.9
8.4	333.0	62	5.4	2	166.0
Agua	532.0	14	38.0	6	88.7

**Tabla IX: Constantes catalíticas de la 20  $\beta$ -HEDH solubilizada en microemulsiones de Nonidet P-40/Tritón X-35 en ciclohexano. Se muestran los valores en medio acuoso para comparación, las determinaciones en la microemulsión se hicieron como se indica en la sección de métodos.**

( 41 ). Esto corrobora que en el caso de sustratos hidrofóbicos la partición tendrá un efecto negativo en la eficiencia de la enzima, lo que como consecuencia dá el incremento en la  $K_m$ .

Con el NADH, se observó lo opuesto que con la

cortisona. La  $K_m$  es mayor en la microemulsión a  $W_o$  de 1.68 que en la microemulsión a  $W_o$  de 8.4. En este caso la partición del sustrato no sería la causa. El NADH un compuesto hidrofílico, se distribuirá principalmente en la fase acuosa. Por lo tanto, se esperaría que la  $K_m$  no se afectara por la partición del NADH. Aunque, es interesante, sin embargo, que la afinidad llegó a ser más alta en la microemulsión que en agua. Aunque el valor de la  $K_{cat}$  es mayor en agua, la eficiencia con la cual se oxida el NADH fue mejor en la microemulsión.

b). Estudios con la Subtilisina.

La hidrólisis del p-Nitrofenol butirato por la subtilisina, se estudio en microemulsiones formadas por Tween 85/isopropanol/hexano. El p-nitrofenol butirato es soluble practicamente en los tres microambientes que constituyen la microemulsión. Por lo cual, se espera que la partición del sustrato sea (37) el principal factor que afecta la  $K_m$  y la  $K_{cat}$  observadas en la microemulsión. Por otro lado, se ha reportado ( 39-41 ) que la  $K_m$  se modifica por otras características de la microemulsión como son la fracción de volumen de la fase acuosa, la concentración de micelas y la velocidad de intercambio en el medio micelar.

Las constantes cinéticas de la hidrólisis del para nitrofenol butirato por la subtilisina se muestran en la tabla X . El valor de la  $K_{cat}$  es esencialmente el mismo en las microemulsiones a las diferentes concentraciones de agua que se analizaron. Sin embargo el valor de la  $K_m$  aumento considerablemente en la microemulsión. Con el

incremento en el  $W_o$ , la  $K_m$  se aproxima al valor observado en agua. En nuestro sistema la concentración micelar es

**TABLA X**

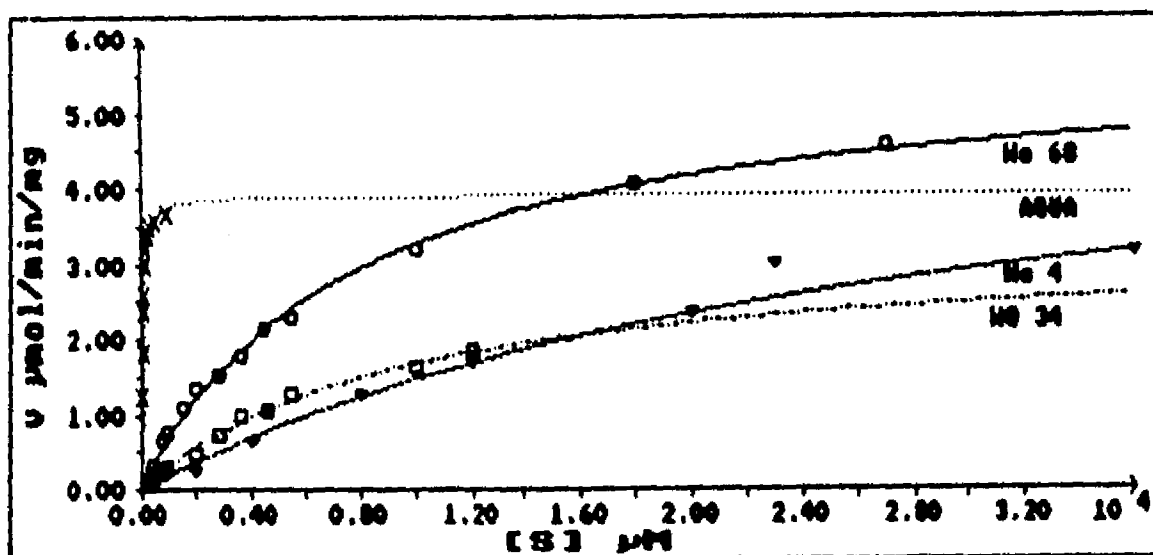
$W_o$	$k_{cat}/k_m$ $M^{-1} \text{ min}^{-1}$	$K_m$ $M$	$k_{cat}$ $\text{min}^{-1}$
4	$5.40 \times 10^3$	$29 \times 10^{-3}$	155.70
34	$1.00 \times 10^4$	$9.3 \times 10^{-3}$	92.70
68	$2.00 \times 10^4$	$7.5 \times 10^{-3}$	154.90
Agua	$2.58 \times 10^6$	$41 \times 10^{-6}$	106.00

**Tabla X: Efecto del  $W_o$  sobre la eficiencia catalítica de la subtilisina hidrolizando el para-nitrofenol butirato. Los ensayos se realizaron espectrofotométricamente midiendo la liberación del para-nitrofenol a 412 nm, la fase acuosa la constituyó el amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7.8. Este medio se utilizó para medir la actividad en agua. La reacción se inició con la adición del sustrato.**

lo suficientemente alta, para ser considerada un factor limitante (tabla VI) y la velocidad de intercambio en el medio micelar es mayor que la  $K_{cat}$ , por lo tanto la  $K_m$  es modificada por la partición del sustrato y el valor de la fracción de volumen de la fase acuosa. El incremento en la  $K_m$  disminuye la eficiencia catalítica de la enzima expresada como la relación  $K_{cat}/K_m$  y a medida que la concentración de agua aumenta el valor de la  $K_m$  disminuye y la eficiencia de la enzima aumenta. Cuando se multiplica

el valor de la  $K_m$  por la fracción de volumen de la fase acuosa ( $\theta$ ) correspondiente. se obtiene que la eficiencia catalítica de la enzima en la microemulsión es esencialmente la misma a todas las concentraciones de agua y es del mismo orden de magnitud del valor observado en agua.

La figura 14 muestra que la enzima solubilizada en la microemulsión puede alcanzar el valor de la velocidad máxima observado en agua, con un incremento substancial en la concentración del sustrato. En agua se observó que cuando la concentración del sustrato fue superior de 4.0 mM, empieza aparecer la inhibición por el producto. En la



**Figura 14. Curvas de actividad de la subtilisina solubilizada en microemulsiones de Tween 85/isopropanol/hexano. Se muestra también la cinética en agua. Las determinaciones de actividad se hicieron como se indica en la sección de métodos. Los datos se analizaron con el programa ENZFITTER por Robin Leatherbarrow, Elsevier Cambrldg.**

microemulsión se utilizaron concentraciones hasta 30 mM, y no se observó inhibición. Posiblemente, en la microemulsión el para-nitrofenol se particiona a la fase orgánica, por lo cual se evita la inhibición por el producto. Es interesante que en la microemulsión la capacidad catalítica fue máxima a la más baja concentración de agua. Sin embargo a concentraciones relativamente bajas del sustrato se observa que la actividad incrementa a medida que se incrementa la concentración de agua en la

microemulsión. Esto se puede deber a que, al incrementar el agua la flexibilidad de la enzima es mayor y la capacidad catalítica es similar a la de la enzima en medio acuoso. Al mismo tiempo la concentración micelar disminuye al aumentar el  $W_o$ . Una concentración micelar alta favorece el intercambio micelar, lo cual es importante para la eliminación del producto y la regeneración de la enzima libre. Además a el  $W_o$  de 4 el diámetro de la micela es de 8.4 nm, suficiente para albergar la subtilisina con un diámetro de 42 Å, y a las unidades de polioxietilenos de Tween 85. Por lo que, a esta concentración de agua la reacción se está llevando a cabo esencialmente en la interfase micelar. Esto permite un mejor intercambio entre el contenido intramicelar y la fase orgánica. De esta manera se eliminaría el producto y la reacción se prolonga por largo tiempo antes de llegar a la saturación.

#### E. EXTRACCION DE PROTEINAS

En las secciones anteriores hemos visto que la capacidad de solubilizar agua ( representada por el  $W_o$  ) para el sistema formado por Tween/isopropanol/hexano/agua

está en relación directa a la concentración de detergente de la relación isopropanol/Tween y de la fuerza iónica de

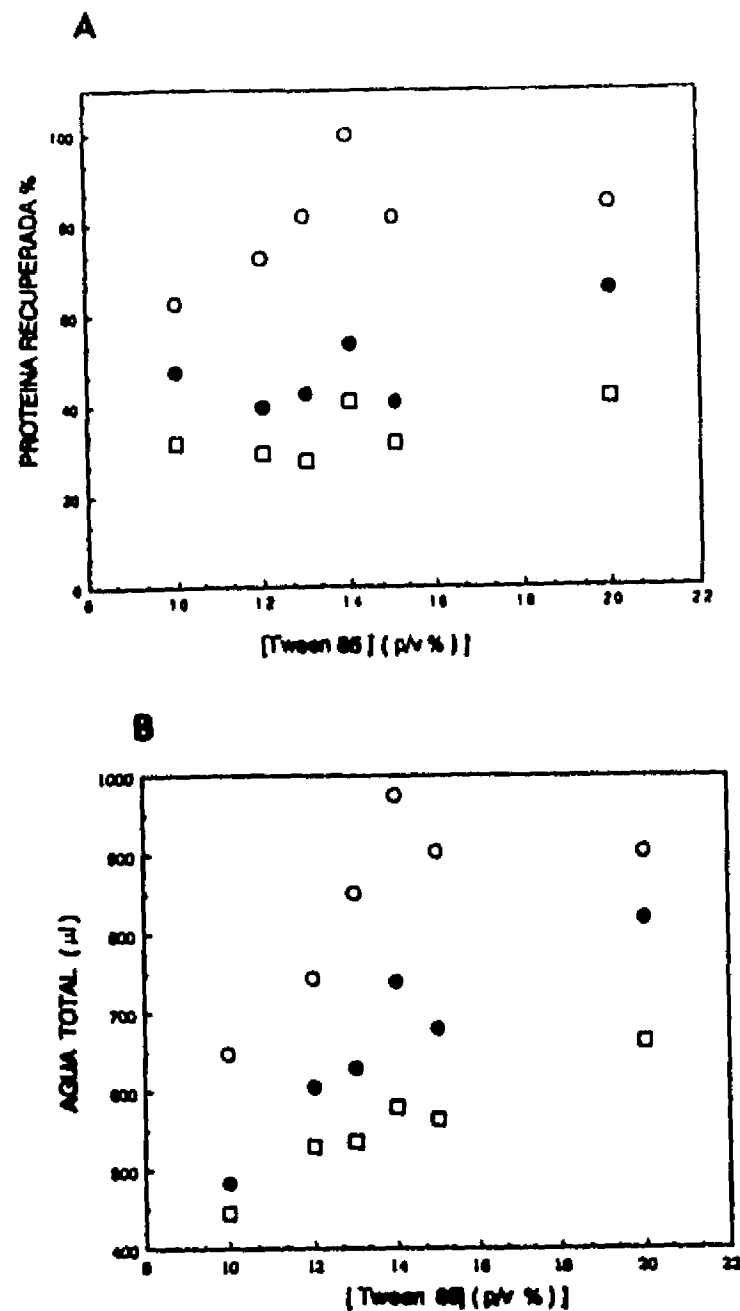
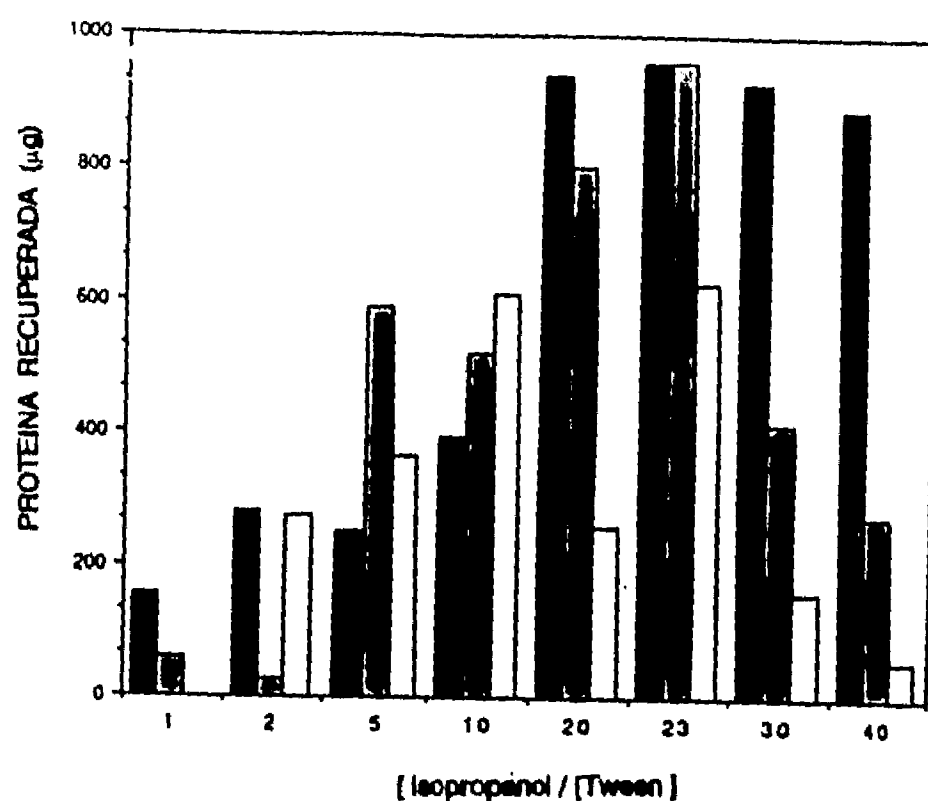


Figura 15: Efecto de la fuerza iónica y la concentración de Tween 85 en la solubilización de proteína y agua. En (A) se muestra el % de citocromo c recuperado ( $\pm 10\%$ ) en la microemulsión en función de la fuerza iónica: 0.01 M ( $\circ$ ), 0.05 M ( $\bullet$ ), 0.1 ( $\square$ ). La concentración de citocromo c se determinó usando el coeficiente de absorción específica del citocromo c determinado experimentalmente. En (B) se muestra el agua total que se solubilizó junto con la proteína. La concentración de agua se determinó por el método de Karl Fisher.

la fase acuosa. Se investigó también el efecto de estas variables en la solubilización de proteína.

La figura 15a muestra el efecto de la concentración de detergente y la fuerza iónica en la solubilización de proteína. A fuerza iónica baja la cantidad de proteína que se extrajo incrementa a medida que se incrementó la concentración de detergente. Cuando la fuerza iónica fue relativamente alta, la cantidad de proteína que se solubilizó fue prácticamente independiente de la concentración de detergente. De hecho a fuerzas iónicas de 0.25 M la cantidad de proteína que se extrajo fue muy pequeña. Este efecto puede ser utilizado para la re-extracción de proteínas de la microemulsión a la fase acuosa nuevamente. En cada uno de los puntos que se muestran en la figura 15a se determinó también la concentración de agua (figura 15b). Se observó un patrón similar al observado en la extracción de proteína, lo cual muestra que la solubilización de la proteína en la microemulsión ocurre a través de la solubilización del agua. Después del 14 % de Tween 85 se observó que la cantidad de proteína que se extrajo disminuyó, debido principalmente a una pequeña precipitación ocurrida en la interfase agua/solvente. Esto resulta también en una disminución en la cantidad de agua solubilizada, ya que la proteína precipitada tiene asociada pequeñas cantidades de agua.

El efecto de la concentración del co-tensoactivo se muestra en la figura 16. Escogiendo la concentración óptima de detergente (14 %), se estudio el efecto de variar la relación isopropanol/Tween 85. en la extracción de proteína. El efecto del isopropanol en la solubilización de proteína dependió de la fuerza iónica.



**Figura 16: Efecto de la concentración de isopropanol en la solubilización de citocromo c por micelas invertidas de Tween 85 en hexano. La concentración del detergente se mantuvo constante a un 14 %. Se observó también el efecto de la fuerza iónica: 0.001 ( ■ ), 0.01 ( ▒ ), 0.05 ( □ ).**

Cuando la fuerza iónica fue baja la máxima solubilización se alcanzó a una relación molecular de 20:1. El incremento posterior en la concentración de isopropanol disminuyó un poco la cantidad de proteína extraída. Al incrementar la fuerza iónica, la máxima solubilización de proteína se observó a la relación de 23:1. Después de este punto si se incrementa la concentración del isopropanol entonces la cantidad de proteína que se extrae disminuye considerablemente. Esto se debe a que ocurre una separación de fases para dar origen a un sistema del tipo Winsor II. Nuevamente se encuentra que variando la proporción de los componentes que constituyen la microemulsión es posible controlar la cantidad de proteína y agua que se solubilizan. De hecho se encontró que es posible solubilizar otro tipo de proteínas y que la concentración



máxima de extracción fue diferente al observado con el citocromo c. Por ejemplo, en el caso de la hemoglobina se encontró que la extracción máxima ocurre entre el 12-13 % de Tween 85. Hemos demostrado que el detergente Tween 85 es capaz de formar micelas invertidas en hexano, las cuales pueden solubilizar grandes cantidades de agua y proteína. Las enzimas solubilizadas conservan su integridad y capacidad catalítica. Estas propiedades del sistema formado por el Tween 85/isopropanol/hexano/agua se puede utilizar como un método para la separación y purificación de proteínas.

#### G. SOLUBILIZACION DE PROTEINAS EN MICROEMULSIONES A ALTA PRESION

##### 1. Formación de las microemulsiones en propano líquido.

Antes de discutir nuestros resultados es importante mencionar que nos interesaba formar una microemulsión a una presión a la cual el propano es altamente compresible. Bajo esas condiciones la solubilidad del Tween es muy baja; pero, con la adición del isopropanol su solubilidad incrementó. En este punto es importante discutir el papel del isopropanol en la formación de la microemulsión en el propano. Es decir funciona como co-tensoactivo o como co-solvente. De los resultados mostrados en la tabla XI se puede ver que a medida que la concentración de Tween incrementa, la cantidad de isopropanol necesaria para obtener la microemulsión fue mayor, sin embargo, la relación molar isopropanol/Tween disminuye. Lo cual significa que el número de moléculas de isopropanol necesarias para solubilizar una molécula de Tween disminuye a medida que se incrementa la concentración de Tween. Quizá

esto significa que el Tween también tiene algún efecto en la estabilidad de la microemulsión. Por lo tanto la principal función del isopropanol es la de incrementar la

**TABLA XI**

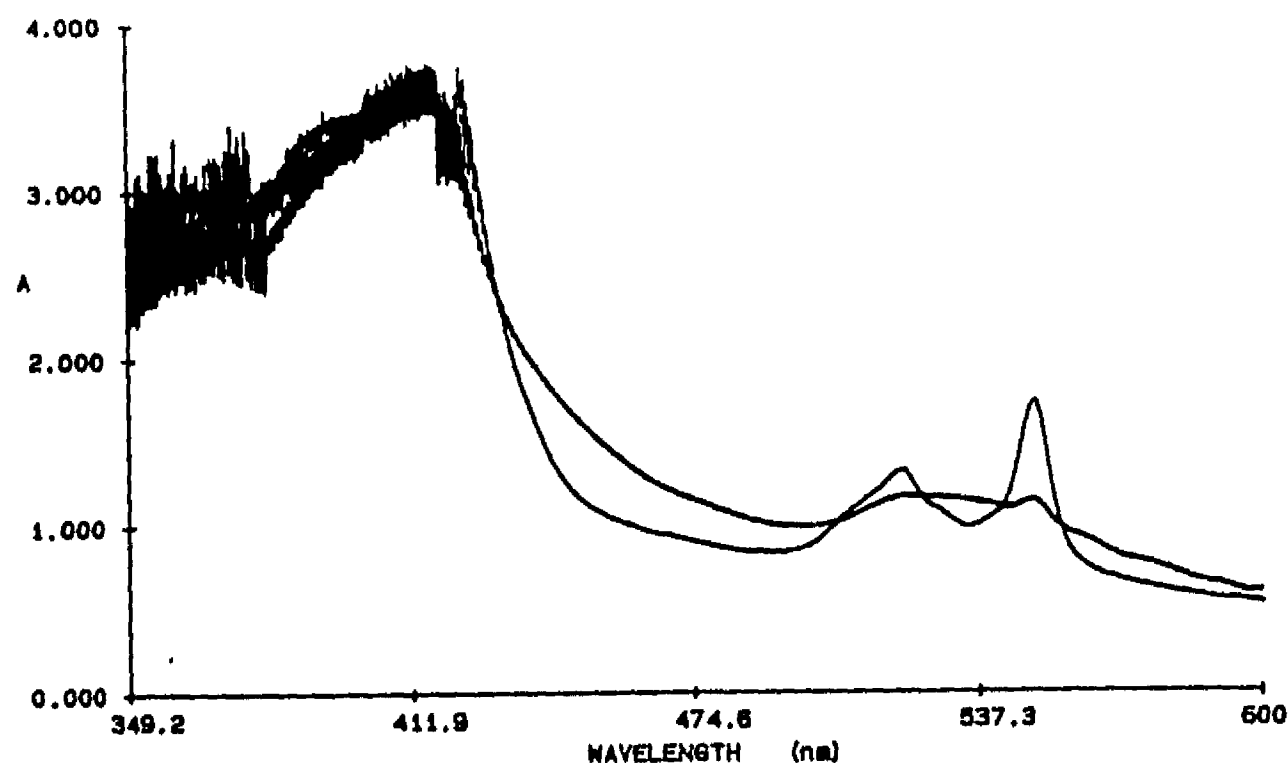
Tween 85] ( mM )	[ Isopropanol ] ( mM )	[Isopropanol] [Tween 85]	Volumen de Agua ( ml )	Wo
54	1890	35	3.53	90
66	1970	31	4.12	86
75	1890	25	4.50	83
97	2150	23	6.00	86

Tabla XI: Se indica la cantidad de isopropanol que se requirió para solubilizar el Tween 85 en el propano líquido. Una vez que se formó la microemulsión a baja presión ( 500 PSI). Se determinó la cantidad de agua que se pudo solubilizar en cada condición, adicionando pequeñas alícuotas del amortiguador de fosfatos 0.01 M pH 7. Cuando el sistema se puso turbio se incrementó la presión hasta clarificarlo nuevamente. Se muestra la máxima cantidad de agua que se solubilizó en cada condición.

densidad del propano, es decir actúa como un co-solvente. El isopropanol fue un requisito para la solubilización de Tween en propano, aún en ausencia de agua. Cuando el agua se adicionó a la microemulsión el requerimiento de isopropanol fue ligeramente mayor. Sin embargo, la capacidad de solubilizar agua fue mayor a medida que se aumentó la presión.

## 2. Solubilización de Proteínas.

La tabla XI muestra las condiciones para obtener microemulsiones de una sola fase ( Winsor I ). Como una



**Figura 17:** Se muestra la reducción *in situ* del citocromo c solubilizado en microemulsiones de Tween 85/isopropanol en propano a un presión de 5000 PSI. El citocromo c se solubilizó en la microemulsión como se indica en la sección de métodos, la reducción se efectuó adicionando 10  $\mu$ l de 0.1 M de ascorbato.

evidencia de que la microemulsión se ha formado, en la figura 17 se muestra el espectro de absorción de las formas oxidada y reducida del citocromo c solubilizado en una microemulsión de Tween 85 en propano líquido.

Se investigó también el efecto de la presión y la temperatura en la solubilización de proteína. Los datos mostrados en la tabla XII indican que la solubilización de la proteína es regulada por la densidad del solvente, la cual depende a su vez de la presión y la temperatura.

TABLA XII

PRESION (PSI)	TEMPERATURA ( °C )		
	26	30	45
300	2 ph, o, ppt, sr, (494 Kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, sr (487.8 Kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, sr (460.89 Kg/m <sup>3</sup> )
1000	2 ph, o, ppt, it (507.1 Kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, it (501.5 Kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, sr (479.4 Kg/m <sup>3</sup> )
2000	2 ph, o, ppt, it (521.2 Kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, it (516.4 Kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, t, r, ppt, it (479.9 Kg/m <sup>3</sup> )
2800	1 ph, it, oc, r (530.5 Kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, it (526.2 Kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, t, r, ppt, it (509.4 Kg/m <sup>3</sup> )
3250	1 ph, oc, r (535.0 Kg/m <sup>3</sup> )	1 ph, oc, r (531.0 Kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, t, r, ppt, it (515.1 Kg/m <sup>3</sup> )

Tabla XII: Efecto de la temperatura y la presión en la formación de la microemulsión en el sistema constituido por propano/ Tween 85/isopropanol. Se indica la habilidad para solubilizar al citocromo C. Se colocaron 4 ml de una solución con 0.25 mg/ml en el reactor, además se adicionaron el Tween 85, y el isopropanol. La presión se incrementó gradualmente hasta observar la formación de la microemulsión. ph = número de fases; o = opaco; ppt = proteína precipitada; it = incremento en transparencia relativa a la presión anterior; r = color rojo en la fase orgánica; sr = apariencia roja; t = transparente oc = una solución óptimamente transparente.

#### a). Extracción de proteína

Con el objeto de investigar la capacidad del sistema Tween 85/isopropanol/propano en la extracción de proteínas, se preparó un sistema del tipo Winsor II, es decir la microemulsión formada en propano coexiste con un exceso de fase acuosa. De esta manera se estudio el efecto de la presión en la extracción de proteínas del exceso de

agua a la microemulsión. Como proteínas modelo se utilizaron la hemoglobina y el citocromo c. Aparentemente a baja presión (500 PSI) prácticamente todo el citocromo c se solubilizó en la microemulsión. Sin embargo bajo estas condiciones se formó un sistema de tres fases, (sistema Winsor III. ): la fase inferior constituida por exceso de agua, la microemulsión formando la fase media y la fase superior que era el propano gaseoso. La alta capacidad de la microemulsión para solubilizar grandes cantidades de proteína probablemente se debió a la formación de una

**TABLA XIII**

<b>Condición Experimental</b>	<b>Actividad Específica (<math>\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}</math>)</b>	<b><math>V_m/K_m \times 10^3</math> (<math>\text{sec}^{-1} \text{M}^{-1}</math>)</b>
<b>Agua</b>	<b>29.44</b>	<b>42.1</b>
<b>Hexano, microemulsión</b>	<b>3.53</b>	<b>3.56<sup>a</sup></b>
<b>Propano, 3,000 psi</b>	<b>4.47</b>	<b>7.43<sup>a</sup></b>
<b>Propano, 4,500 psi</b>	<b>4.47</b>	<b>6.35<sup>a</sup></b>
<b>Reciclada de 3,000 psi</b>	<b>28.00</b>	<b>19.2</b>
<b>Reciclada de 4,500 psi</b>	<b>22.06</b>	<b>17.7</b>

**Tabla XIII: Actividad de la subtilisina en microemulsiones de una sola fase conteniendo Tween 85/isopropanol. Las determinaciones en propano y en hexano se hicieron como se indica en la sección de métodos.**

**<sup>a</sup> Valores aparentes.**

estructura bicontinua, las cuales tienen mayor capacidad para solubilizar agua que un sistema de micelas invertidas. -Cuando la presión alcanzó 2500 PSI se formó un sistema de dos fases, lo cual indica la formación de la micelas invertidas en la microemulsión. En este punto se logro solubilizar practicamente toda la proteína (0.206 mg/ml). Con la hemoglobina se realizaron experimentos similares, aunque solo se requirió de 2000 PIS para formar la microemulsión. Bajo condiciones óptimas se logró extraer 0.32 mg/ml.

b). Actividad enzimática en microemulsiones a alta presión.

La tabla XIII se muestran las constantes cinéticas aparentes determinadas en la hidrolisis del succinil-1-alanil 1-alanil- 1-prolinil 1 fenil para-nitroanilida por la subtilisina. Se muestran los valores determinados en las diferentes fracciones analizadas.

**V. ARTICULOS PUBLICADOS.**

- A. STABILITY AND ACTIVITY OF 20  $\beta$ -HYDROXISTEROID DEHYDROGENASE IN MICROEMULSIONS OF NON-IONIC DETERGENTS.**
  
- B. PROTEIN EXTRACTION AND ACTIVITY IN REVERSE MICELLES OF A NON-IONIC DETERGENT.**
  
- C. SOLUBILIZATION AND ACTIVITY OF PROTEINS IN COMPRESSIBLE-FLUID BASES MICROEMULSIONS.**

STABILITY AND ACTIVITY OF 20  $\beta$ -HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE IN MICROEMULSION OF NON-IONIC DETERGENTS

Guadalupe Ayala and G. Mendoza-Hernández.

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-159, 04510 México D.F., México.

Received July 16, 1990

**ABSTRACT:** We report here the formation of a microemulsion with non-ionic detergents and cyclohexane. The activity and stability of 20  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase solubilized in all water systems and in microemulsions of Nonidet P-40: Triton X-35/water/cyclohexane was investigated. In the microemulsion the activity depended on the molecular ratio of water to surfactant ( $W_o$ ); maximal activity was obtained at  $W_o$  of 8.4. The stability in the microemulsion was higher at  $W_o = 11.75$  i.e. the enzyme, retained about 50 % of activity after eight days

An important number of reports have been published on the catalytic activity of enzymes in reverse micelles (1-5). However there is another class of aggregates, commonly referred as microemulsions; these are made with four components (6-8): a surfactant (ionic or non-ionic), a co-surfactant (usually alkanols), water and an organic liquid (oil). Although the catalytic activity of a number of enzymes have been investigated in reverse micelles and microemulsions, enzyme stability in microemulsion has not been extensively studied (but see ref.9-16)

In different types of systems rates of inactivation vary with the surfactant employed. For example, chymotrypsin lost 75 % of its activity in 2.5 h in the SDS/pentanol/toluene/water microemulsion, while with CTAB the stability was higher (12); with alcohol dehydrogenase (13), rapid loss of enzymatic activity was observed in 24 h in an AOT/isooctane system. It is relevant to the

---

Abbreviations: CTAB, cetyltrimethyl ammonium bromide; AOT, sodium dioctylsulfosuccinate; SDS, sodium dodecyl sulfate; DTT, dithiothreitol.

0158-5231/90/160717-07\$01.00/0

Copyright © 1990 by Academic Press Australia.  
All rights of reproduction in any form reserved.



present work that alcohol dehydrogenase showed a higher stability in microemulsions formed with triton X-100, than when formed with ionic detergents (10). It is known that proteins differ in stability with different detergents. It is believed that this is related to the charge of the polar head and length of the alkyl tail which apparently are important for their cooperative binding to proteins and subsequent denaturation (18). Therefore the use of non-ionic detergents as surfactant to form microemulsion may result in better enzyme stability, since they are less aggressive than charged detergents

We report here the formation of microemulsion formed with the non-ionic surfactants Nonidet P-40 (Octyl phenol ethylene oxide) and Triton X-35 in cyclohexane. In this system 20  $\beta$  Hydroxysteroid dehydrogenase (HSDH) was solubilized. The effect of water content, defined as molecular ratio of water to surfactant ( $W_o$ ), on the catalytic efficiency and in the stability was also investigated. Enzyme activity progressively increased with the value of  $W_o$  up at a  $W_o = 8.4$ . The kinetic parameters at  $W_o = 8.4$  were different to those observed in all water systems. Studies of stability in microemulsions with different water content showed that the half-life of the enzyme increased with amounts of water in the system

#### MATERIALS AND METHODS.

**Reagents** 20  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSDH, EC 1.1.1.53) from Streptomyces hydrogenans (in 3.2 M ammonium sulfate), Nonidet P-40, Triton X-35, cortisone, NADH, and Hepes were obtained from Sigma and cyclohexane from Merck. They were used without further purification.

**Microemulsion** A solution of Nonidet P-40/triton X-35 (8:3.5 w/w) in cyclohexane was used to form microemulsions. The enzyme and NADH were solubilized in this system by injecting small aliquots (2-10  $\mu$ l) of the water mixture into the Nonidet P-40 triton X-35/cyclohexane solution, followed by vigorous stirring. The water required to achieve a given  $W_o$  value was obtained by the injection of a given buffer.  $W_o$  is defined as the molar ratio of water to surfactant ( Nonidet P-40 + Triton X-35)

**Enzyme Activity Measurements:** Ammonium sulfate was removed from HSDH by filtration of the enzyme suspension (50  $\mu$ l containing 250  $\mu$ g ) through a Bio-gel P-30 column. The enzyme was eluted with 50

mM Hepes buffer pH = 7.6; about 0.5 ml with 0.20 mg of enzyme were obtained. To assay HSDH activity in microemulsion, the enzyme and NADH in 50 mM Hepes buffer were injected together. The reaction was started with 12  $\mu$ l of 25 mM of cortisone in ethanol, resulting in an overall steroid and NADH concentration of 300  $\mu$ M and 100  $\mu$ M respectively. The activity was followed by recording the decrease in absorbance of NADH at 340 nm in Amincon DW-2a spectrophotometer in conditions described under results. Measurements in all water systems were as in the microemulsions except that the reaction media was 50 mM Hepes buffer pH = 7.6.

## RESULTS

Microemulsions and effect of  $W_o$  on activity Figure 1 shows the uptake of water by a system that contained Nonidet and Triton X-35. The resultant systems were optically clear, suggesting that homogeneous and stable reversed micelles were formed in the continuous oil phase. Most likely oxyethylene groups of the surfactant molecules face the interior of spherical aggregate, forming a polar core with the aliphatic chains directed towards the organic solvent (7). The variation of specific activity of HSDH as function of  $W_o$  is also shown. Maximum activity was attained at  $W_o = 8.4$ ; above this  $W_o$  the activity increased, but slightly. This behavior differs from that of other enzymes in reverse micelles formed with other surfactants (11-17), in the sense that usually the rate of activity is bell-shaped with respect to  $W_o$ . The  $W_o$  values needed for maximal activity were similar to those reported for polyphenoloxidase entrapped in Brij-96/cyclohexane system (11). In the cationic microemulsion, Hilhorst et al (8) found a high HSDH activity at  $W_o$  of 10, at higher  $W_o$  values the activity decreased slightly.

At  $W_o$  of 8.4 the apparent  $K_m$  for cortisone was higher in the microemulsion (62  $\mu$ M) than in aqueous solution (14  $\mu$ M), while the apparent  $K_m$  for NADH was lower in the microemulsion (2  $\mu$ M) than in water (6  $\mu$ M). The  $V_{max}$  observed in the microemulsion was ( 3.0  $\mu$ moles  $mg^{-1}min^{-1}$ ) and in all aqueous system was (5.0  $\mu$ moles  $mg^{-1}min^{-1}$ ). The reason for these differences is not clear at the moment ( but see ref. 19 for theoretical considerations )

Stability of the Enzyme The application of micellar enzymology in biotechnology depends largely on the stability of enzymes in

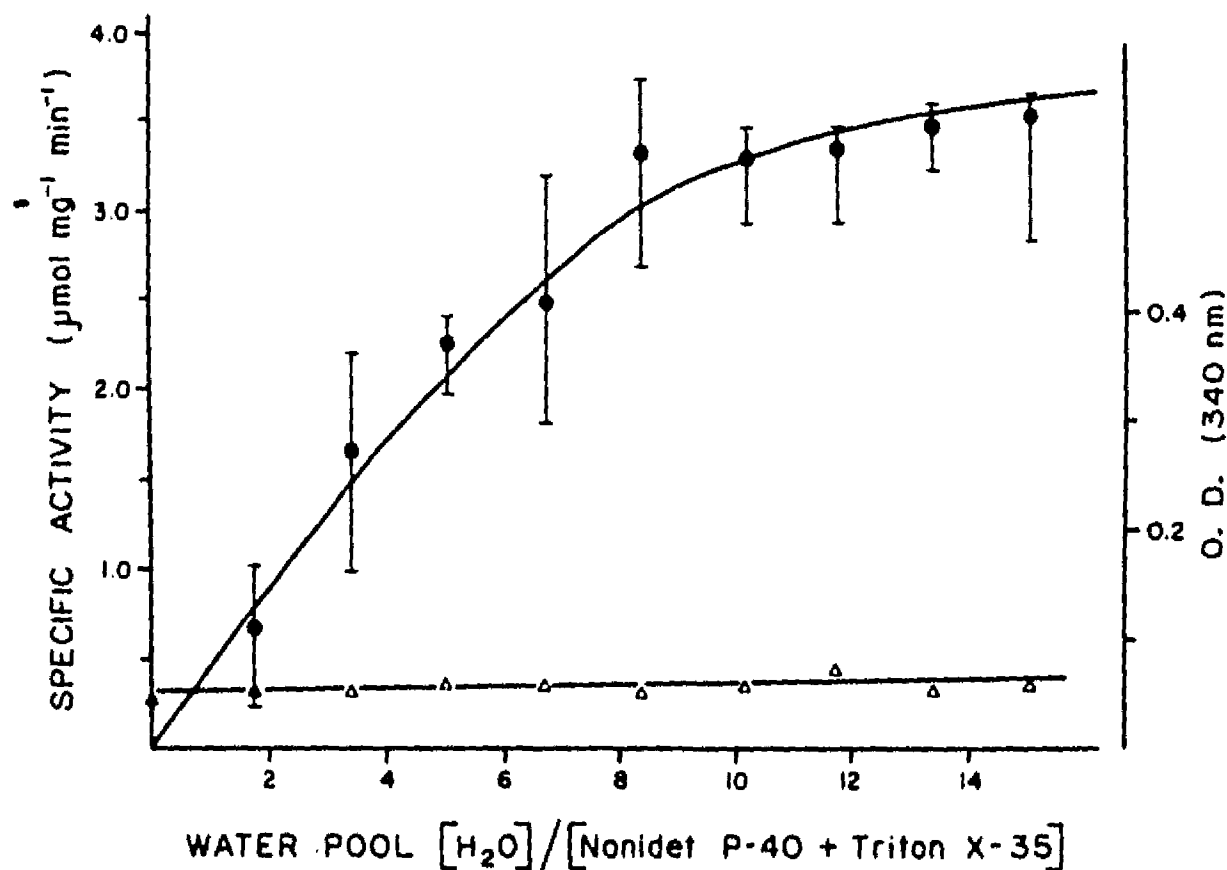


Fig. 1. Uptake of water by a 12.5% (w/v) solution of Nonidet P-40/triton X-35 (weight ratio 8:3.5) in cyclohexane. The turbidity change as function of added water is shown ( $\Delta$ ). The activity recovered in the microemulsion as function of  $W_o$  is also shown ( $\bullet$ ). 50 mM HEPES buffer pH = 7 was used as aqueous solution. The activity was measured with one ml. of the microemulsion that contained 0.30  $\mu$ g of protein and 100  $\mu$ M of NADH. The reaction was started with 12  $\mu$ l of 25 mM of cortisone in ethanol. 5.0  $\mu$ mol  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , was the activity measured in all water system

such system. The relation between enzyme stability of HSDH and the environment of the enzyme as provided by water entrapped in the micellar core is shown in Table I. In HEPES buffer, as well as in water the activity of HSDH fell rapidly, losing more than 80 % of its activity after 24 h of incubation. In the microemulsion the stability was higher (Table I). The highest stability was observed in media that contained glycerol in water (medium E). The stability of HSDH in reverse micelles with HEPES buffer was studied as function of incubation time at different  $W_o$ . The stability of the enzyme was also measured in aqueous buffer, with and without glycerol (fig. 2). A single exponential decay of the enzyme activity was observed in all conditions (except in reverse

TABLE I

EFFECT OF BUFFER ON THE STABILITY OF HSDH  
IN AQUEOUS SOLUTIONS AND IN MICROEMULSIONS

BUFFER	% RESIDUAL ACTIVITY			
	24 HOURS		96 HOURS	
	AQUEOUS SOLUTION	MICROEMULSION	AQUEOUS SOLUTION	MICROEMULSION
WATER	8	40	0	8
HEPES	21	78	8	68
MEDIUM E	86	46	71	65

Table I. The influence of buffer on the stability of HSDH. This was investigated by varying the composition of the aqueous phase in the Nonidet P-40/triton X-35 system.  $W_o$  was kept constant at 8.4. Enzyme stability was also measured in aqueous solutions. Three types of buffer were tested: water, 50 mM Hepes pH = 7.6 and medium E containing 500 mM  $K_2HPO_4$ ; 154 mM KCl; 100  $\mu$ M, DTT; 100  $\mu$ M, EDTA; 20 % glycerol pH = 7.4. The incubation was at room temperature. 100 % was the activity measured at zero time.

micelles at lowest  $W_o$  and which were made with Hepes buffer). The data were linear when the natural logarithm of the percent of remaining activity was plotted against time. The half-life of the enzyme was determined from the rates of inactivation. The enzyme showed the highest stability in aqueous buffer that contained glycerol. However the data indicate that the half-life of the enzyme in microemulsions increased with the water content up to a  $W_o = 10$ , where the half-life was one week (Inset of Fig.2). As mentioned above, the nature of ionic surfactants could account for the loss enzyme activity. Indeed in 10 mM CTAB (0.4 % final concentration), the enzyme exhibited 50 % about of its activity while with 10% Nonidet P-40 the activity diminished by 40 %

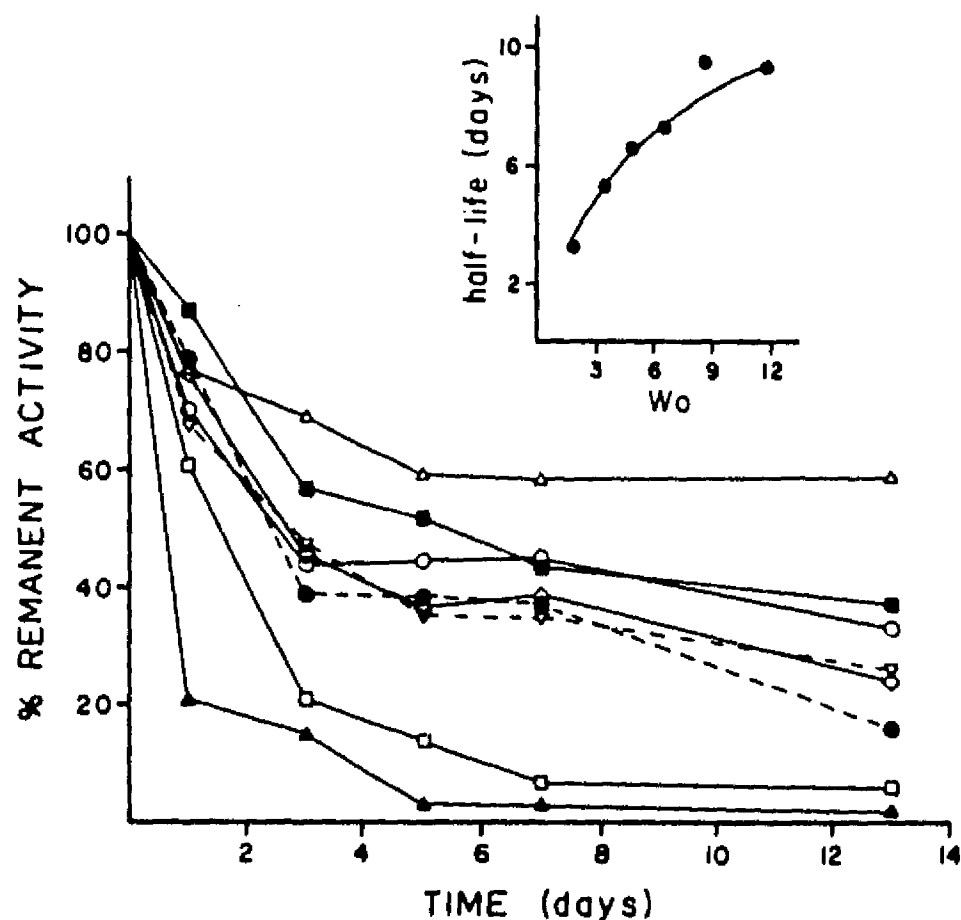


Fig. 2. Operational stability of HSDH in microemulsions at different  $W_0$  and in buffer solutions, 50 mM HEPES pH= 7.6 and in buffer E (see table I). Enzyme solutions were incubated at room temperature and aliquots were taken at specified times to measure residual activity at room temperature. In microemulsions, the aqueous solution was 50 mM HEPES buffer pH = 7.6. The activity was measured as Table I, but using 1  $\mu$ g of protein. Medium E, ( $\Delta$ );  $W_0 = 7$ , ( $\blacksquare$ );  $W_0 = 5$ , ( $\circ$ );  $W_0 = 4$ , ( $\nabla$ );  $W_0 = 3$ , ( $\diamond$ );  $W_0 = 2$ , ( $\bullet$ );  $W_0 = 1$ , ( $\square$ ); HEPES buffer, ( $\blacktriangle$ ). The inset shows the effect of  $W_0$  on the half-life of the enzyme

#### DISCUSSION

As shown here it is possible to have good enzyme activity in wide range of  $W_0$ . This should allow the study of enzyme catalysis at amounts water in which the viscosity of aqueous phase approaches that of interface (3,7). We also found that using non-ionic detergents to trap HSDH in reverse micelles, it is possible to achieve high enzyme stability. Even though Lee et al (10) found better enzyme stability in non-ionic than in ionic microemulsion, we found that in the system here employed stability was higher

than in standard aqueous media. It is likely that this is due to the protective effect of the oxyethylene groups, since in aqueous media glycerol also exerted a protective effect.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants IN-020389-FM from DGAPA University of México and P228CCX891530 from CONACYT (México)

#### REFERENCE

1. Luisi, P.L., Giacomini, M., Pileni, M. P. and Robinson, B. H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* 947, 209-246.
2. Luisi, P.L. (1985) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24, 439-450.
3. Martinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N., Khmelnistki, Y.L., Berezin, I. V. (1986) *Eur. J. Biochem.* 155, 453-468.
4. Luisi, P.L. and Magid, L. J. (1986) *C.R.C. Crit. Rev. Biochem.* 20, 406-474
5. Martinek, K., Klyachko, N. L., Kabanov, A. V., Khmelnistki, Y. L. and Levashov, A. V. (1989) *Biochim. et Biophys. Acta.* 981, 161-172.
6. Samama, J.L., Lee, K.M. and Biellmann J. F. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 609-617.
7. Kumar, C. and Balasubramanian, D. (1980) *J. Phys. Chem.* 84, 1895-1899.
8. Hilhorst, R., Spujit, R. Laane, C. and Veeger, C. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 459-466.
9. Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Darszon, A. (1986) *FEBS Lett.* 203, 41-43
10. Lee, K. M. and Biellman, J. (1987) *FEBS Lett.* 223, 33-36
11. Sánchez-Ferrer, A., Bru, R. and Garcia-Carmona, F. (1988) *FEBS Lett.* 233 363-366
12. Fletcher, P. D. I., Rees, G. D., Robinson, B. H. and Freedman, R. B. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 832, 204-214.
13. Aldercreutz, L. and Bo, Mattiasson (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 609-617.
14. Kumar, A. , Kumar, A. and Katiyar, S.S. (1989) *Biochim. et Biophys. Acta* 996, 1-6.
15. Han, D. and Rhee, J. S: (1986) *Biotech. Bioeng.* 28, 1250-1255  
16 Klyachko, N.L., Levashov, A. V. Pshenzhetky, A. V., Bogdanova, N. G. Berezin, I. V. and Martinek, K. (1986) *Eur. J. Biochem.* 161, 149-154.
17. Martinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N. L., Pantin, V. I. and Berezin, I. V. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.* 657, 277-294.
18. Helenius, A. and Simons, K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29-79.
19. Verhaert, M. D., Hilhorts, R., Vermue, M., Schaafsma T. J. and Veeger, C. (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 59-72

# Protein Extraction and Activity in Reverse Micelles of a Nonionic Detergent

Guadalupe A. Ayala,<sup>1,2</sup> Sanjay Kamat,<sup>1,2</sup> Eric J. Beckman,<sup>1</sup> and Alan J. Russell<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering and <sup>2</sup>Center for Biotechnology and Bioengineering, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania 15261

Received August 5, 1991/Accepted October 11, 1991

We describe, for the first time, the ability of a polyoxyethylene sorbitan trioleate-isopropanol microemulsion in hexane to solubilize pure proteins. The dependences of cytochrome *c* extraction and buffer solubilization by the reverse micellar system on ionic strength of the aqueous phase, detergent concentration, and cosurfactant concentration are described. Increases in ionic strength result in decreased recovery of protein in the organic phase, whereas increases in detergent concentration and cosurfactant concentration result in increased extraction. In addition, subtilisin (a serine protease) is shown to be active in this microemulsion. Further the activity of the enzyme can be regulated by the water content of the micelles, enabling control of enzyme activity by "solvent engineering."

Key words: enzymes • proteins • organic solvents • microemulsions • nonionic surfactants

## INTRODUCTION

Reverse micellar solutions are widely used as separation matrices and as vehicles for novel reactions.<sup>22</sup> One of the most interesting applications of these systems has been the solubilization of proteins in nonaqueous media,<sup>23-27</sup> where submicroscopic aggregates (10–100 nm) of surfactant molecules enable the uptake of water and enzyme molecules into an organic phase. The enzyme remains in an essentially aqueous environment, resulting in proteins which have the conformational freedom necessary to exhibit maximal activity.<sup>8,31</sup> Indeed, it has been reported that enzymes in reverse micelles can exhibit "superactivity."<sup>28</sup>

The solubility and structural integrity of the protein in the reverse micelle are closely related to the properties of the surfactant, aqueous solution, and organic solvent being utilized.<sup>1,32</sup> Most of the available data on protein activity and stability in reverse micelles has been collected for ionic surfactants such as bis-2-ethylhexyl sodium sulfosuccinate (AOT) and sodium dodecyl sulfate (SDS). Hatton and colleagues, in a series of pioneering experiments,<sup>14</sup> have shown that microemulsions of AOT and other detergents in hydrophobic organic solvents can support the solubilization of proteins. Further they have demonstrated that these microemulsions can extract proteins from aqueous solution and that the solubilization capacity depends on the pH, ionic strength, and temperature of the aqueous solution.

\* To whom all correspondence should be addressed.

Perhaps the most detailed study to date has been a structural characterization of AOT/isooctane/buffer reverse micelles containing chymotrypsin. Whereas the effect of the aqueous solution properties on extraction efficiency and selectivity are well documented, the influence of micelle properties on protein structure is less well evolved. For example, using ultraviolet spectroscopy, it has been reported<sup>6</sup> that AOT causes significant changes in the tertiary structure of hemoproteins. Brochette et al.,<sup>4</sup> however, report no change in structure using an identical surfactant/solvent system and fluorescence spectroscopy. Other results suggest that the effect of micelles on protein structure and activity is a unique function of the protein-micelle combination. Woll et al.,<sup>35,36</sup> e.g., observed no change in structure of ribonuclease A or concanavalin A in an AOT/isooctane microemulsion. On the other hand, chymotrypsin loses 75% of its activity in 2.5 h in an SDS/pentanol/toluene/water microemulsion, while with cetyldimethylammonium bromide (CTAB) the enzyme stability was significantly higher.<sup>9</sup> Further, in an AOT/isooctane/alcohol dehydrogenase system there was rapid loss of enzyme activity over 24 h.<sup>1</sup> Finally, extraction into a hexanol/octane/CTAB system apparently does not denature either  $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase or isocitrate dehydrogenase, yet does denature glucose-6-phosphate dehydrogenase.<sup>10</sup>

Although the use of nonionic surfactants has been shown to alleviate significantly protein stability problems in reverse micelles, there has been limited work in this area to date.<sup>2,23,33</sup> There is still little understanding of the dependence of enzyme structure, function, and solubilization on the properties of the surfactant. In general, phase diagrams of nonionic surfactant/water/organic solutions exhibit many similarities to those of analogous ionic detergent systems. The effect of variables such as temperature, pressure, and ionic strength, however, will in many cases be opposite to those observed in ionic-based mixtures.<sup>17,18</sup> Solubilization behavior of nonionic ethoxylated surfactants for water at a particular temperature can, to a first approximation, be correlated to the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) of the material, although HLB alone will not reveal which surfactant system will produce the ideal vehicle for solubilization of a particular protein.

We report here some key characteristics of a microemulsion formed with the nonionic surfactant polyoxyethylene sorbitan trioleate, HLB = 11 (Tween-85), isopropanol, and hexane. The effect of surfactant, isopropanol, and buffer concentration on the solubilization of water and cytochrome *c* in the microemulsion was investigated. We have chosen cytochrome *c* as a model protein because of its covalently bound prosthetic group. Many surfactants absorb strongly in the UV region, preventing a simple analysis of the concentration of most proteins in these systems. The advantage of using a colored protein like cytochrome *c* is that one can measure the amount of protein in the organic phase and analyze the structure of the protein by careful analysis of the absorption from the prosthetic group. In addition, the system was utilized to measure the activity of an enzyme and the solubilization of hemoglobin. To our knowledge this article represents the first example of enzyme and protein solubilization in Tween-85. The data show that Tween-85/isopropanol can solubilize significantly more water and protein than the classic ionic detergents AOT and SDS, and efficient solubilization is possible at neutral pH.

## MATERIALS AND METHODS

Cytochrome *c*, hemoglobin, and subtilisin (EC 3.4.21.14) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Tween-85 was purchased from Fluka or Aldrich. All other reagents were purchased from either Sigma or Aldrich and were of the highest purity available.

### Solubilization of Water and Proteins

All aqueous solutions were composed of phosphate buffer (pH 7.0) with ionic strengths ranging from 0.001 to 1  $\mu$ . One milliliter of aqueous solution (containing where appropriate 1 mg protein/mL water) was contacted with anhydrous hexane ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ) containing various concentrations of Tween-85 and isopropanol (the cosurfactant). The initial ratio of aqueous to organic phases was 1:1. After vigorous shaking, the system was allowed to equilibrate for an experimentally determined length of time. Typically, the system was left for  $\sim 24$  h in order to complete phase separation. The equilibration time can be decreased to a few minutes by centrifugation, but for the present study we did not wish to introduce another variable. After phase separation the concentration of water in the organic solvent was determined by Karl Fischer titration<sup>21</sup> in a Fischer Coulomatic titrator. The concentration of cytochrome *c* was determined by measuring the absorbance of the organic phase at 530 nm in a Perkin-Elmer Lambda 5 spectrophotometer.

The apparent absorption coefficient for cytochrome *c* in the microemulsion (formed by the injection method) was determined as follows. The oxidized form of cyto-

chrome *c* in 0.01  $\mu$  phosphate buffer (pH 7.0) was solubilized in Tween-85 (14%)/isopropanol (13%)/hexane, then diluted to the appropriate protein concentration with the same surfactant mixture, and the absorbance at 530 nm was recorded. The data obeyed Beer's law with respect to protein concentration, and the apparent adsorption coefficient was calculated. The determination was made in a stable one-phase system, and the extinction coefficient did not vary significantly with detergent concentration.

Extraction of hemoglobin and subtilisin into microemulsions was performed in the same way as for cytochrome *c* (see below). In the case of hemoglobin the apparent extinction coefficient for the enzyme was determined experimentally in each detergent system used.

### Reduction of Cytochrome *c* in Reverse Micelles

Oxidized cytochrome *c* (1 mg/mL) was solubilized in Tween-85 (14%)/isopropanol (13%)/hexane as described above (total volume of cytochrome *c* added was 200  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). The absorption spectrum in the range of 350–600 nm was recorded. Subsequently 1  $\mu\text{L}$  of ascorbate (1.0M) was added to the solution. After 15 min the absorption spectrum was collected on a Perkin-Elmer Lambda 2 spectrophotometer.

### Span-85/Tween-85 mixtures

Microemulsions were formed with a mixture of Tween-85 and sorbitan trioleate (Span-85, HLB = 1.0). Using stock solutions of 0.152M Tween-85 and 0.152M Span-85, mixtures of [Tween-85]/[Span-85] (1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 10:1) were prepared with a total surfactant concentration of 0.076M in hexane.

The aqueous phase was 0.01  $\mu\text{M}$  phosphate buffer, pH 7.0, and the initial concentration of cytochrome *c* was 1.0 mg/mL. The water/hexane ratio was 1:3 (v/v). After each component had been added, the mixture was vortexed and allowed to settle at room temperature. The concentration of water and cytochrome was determined as described previously.

### Extinction Coefficient for *p*-Nitrophenol in Reverse Micelles

In order to measure the activity of an enzyme as described below, we must first measure the apparent extinction coefficient for the product, *p*-nitrophenol. *p*-Nitrophenol was solubilized in Tween-85 (14%)/isopropanol (12%)/hexane to a final concentration of 0.275 mM using the injection method and then diluted in the same surfactant mixture to appropriate concentrations. The initial solution of *p*-nitrophenol was made up in buffer, and the microemulsion was a single stable phase. Absorbance at 412 nm was measured spectrophotometrically in a Perkin-Elmer Lambda 2. Under



these conditions the  $W_0$  of the solution was measured by Karl Fischer titration. The apparent extinction coefficient was also measured at increased  $W_0$  by injecting an aliquot of 20 mM *p*-nitrophenol (in 0.1  $\mu$  phosphate buffer, pH 7.8) into the Tween-85/isopropanol/hexane solution described above.

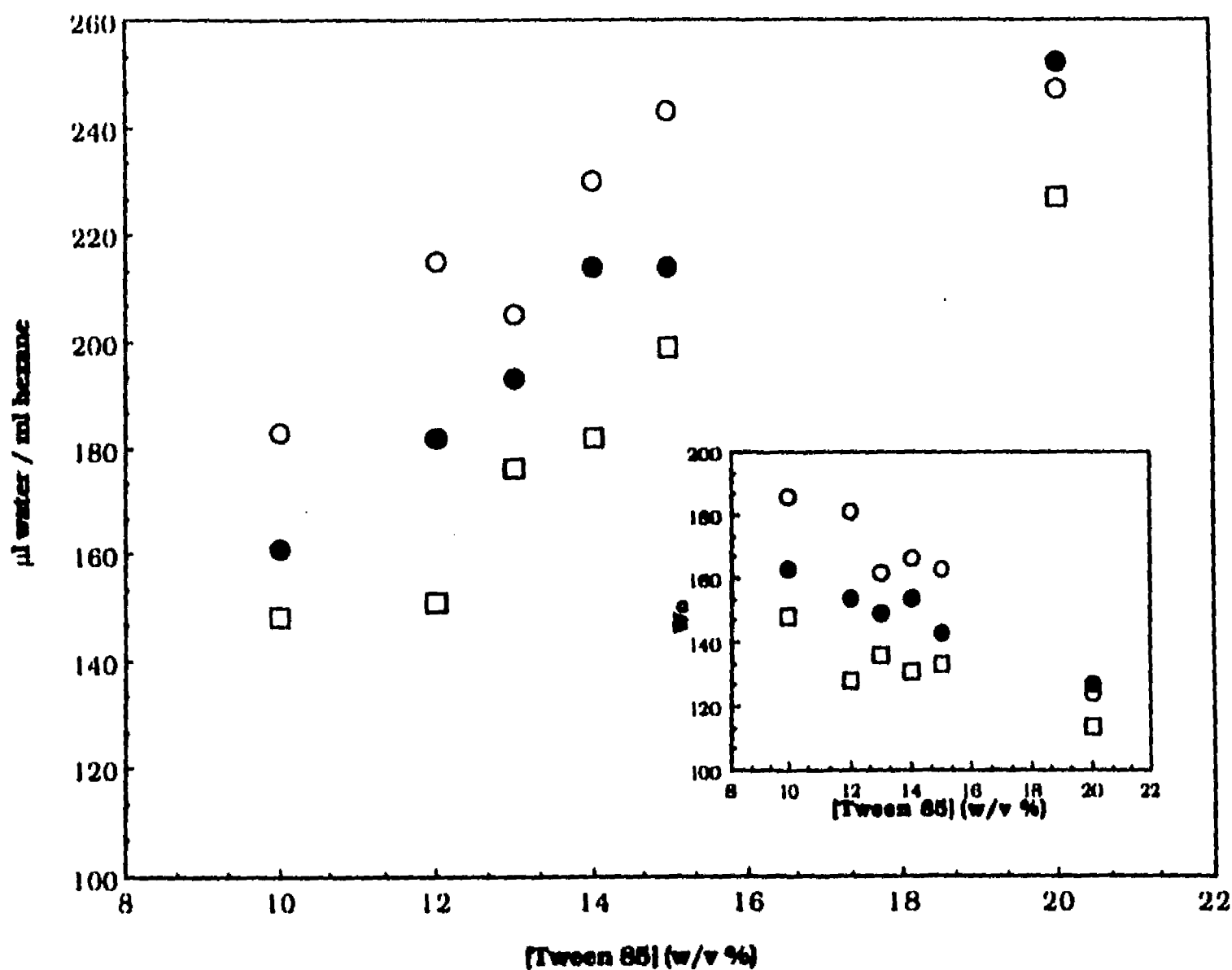
#### Activity Measurements for Subtilisin in Reverse Micelles

A solution of Tween-85 (14%)/isopropanol (12%) in hexane was used to form a microemulsion. This solution was used to prepare a stock of *p*-nitrophenyl butyrate (the substrate for the enzyme). The water required in order to achieve a given  $W_0$  was added by injection of 0.1  $\mu$  phosphate buffer, pH 7.8. Subtilisin Carlsberg was dissolved in phosphate buffer, pH 7.8, 0.01  $\mu$  + 0.1 mM calcium chloride. The reaction was initiated in a cuvette by the injection of 1  $\mu$ L (30  $\mu$ g) into 1 mL of substrate solution (5 mM). The increase in absorbance at 412 nm, caused by the release of *p*-nitrophenol, was followed spectrophotometrically. The apparent absorption coefficient for *p*-nitrophenol at  $W_0 = 73$ , determined as described above, was then used to calculate the specific activity of the enzyme.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Extraction of Cytochrome *c*

The most basic function of any surfactant is to enable water solubilization in organic solvents. Figure 1 describes the ability of Tween-85/isopropanol to solubilize water in hexane as a function of detergent concentration and the ionic strength of the buffer. In all cases shown the upper phase was stable and optically clear, suggesting the formation of a microemulsion. As in other non-ionic surfactant systems,<sup>17</sup> increasing ionic strength leads to a salting-out effect, reducing the water concentration in the organic phase. While increasing surfactant concentration increases the total amount of water solubilized, the ratio of water to surfactant concentration ( $W_0$ ) increases as surfactant concentration decreases. This suggests that for low concentrations of Tween-85 there is the formation of larger micelles and that micelle-micelle interactions have a strong effect on  $W_0$ , unlike ionic surfactants such as AOT.<sup>30</sup> The optimal  $W_0$  values which we are reporting here are approximately twice those reported for an AOT/hexane/propanol/water system<sup>16</sup> and an order of magnitude greater than those for the AOT systems which contain protein.<sup>35</sup>



**Figure 1.** Effect of surfactant and salt concentration on the solubilization of buffer without protein by reverse micelles in hexane. The uptake of water by reverse micelles is shown at different ionic strengths of phosphate buffer, pH 7.0: (○) 0.01  $\mu$ ; (●) 0.05  $\mu$ ; (□) 0.1  $\mu$ . The inset graph shows the  $W_0$  values ( $[\text{water}]/[\text{Tween-85}]$ ) obtained in each experiment. The experiment was performed as described in the text, the concentration of water being determined by Karl Fischer titration ( $\pm 5\%$ ).

The same microemulsion described above has also been tested for its ability to extract cytochrome *c* from aqueous solution. Cytochrome *c* was chosen as a model protein because of its absorption in the range of 400–500 nm. Most reverse micelle solutions have strong absorption in the UV range, which prevents the analysis of protein concentration in microemulsions. The experimentally determined apparent specific absorption coefficient at 530 nm for cytochrome *c* in the Tween-85 microemulsion is 0.715 mL/mg/3 cm. There is no significant change in specific absorption coefficient with changing detergent concentration, suggesting little interaction between the micelle and the protein. In addition, the specific absorption coefficient is equivalent to that measured in aqueous solution.

Figure 2a indicates the effect of ionic strength and detergent concentration upon protein extraction from the aqueous phase. Figure 2b describes the water concentration in the micelles in the presence of protein. When the ionic strength increases, the efficiency of protein extraction decreases, as does the solubilization of water. It is not surprising that the extraction of water and protein appear to parallel each other. In addition, a comparison of Figures 1 and 2b shows that less water is extracted from aqueous solution in the presence of protein. This provides evidence that protein molecules are replacing water molecules in the reverse micelles. Alteration in the size and shape of the micelles in the presence of protein would also account for these data. Indeed, it is well known that nonionic surfactants can have a dispersity of both size and shape. Figure 2 also indicates that above 14% Tween-85 there appears to be a decrease in the extraction of protein from aqueous solution. This is actually the result of a small degree of protein precipitation which occurs at the interface between the aqueous and organic phases in the presence of high concentrations of detergent. Protein precipitation will also reduce the amount of water extracted since the protein precipitate will have associated water. Such a phenomenon has been mentioned previously for protein extraction into ionic surfactants.<sup>24</sup> At the higher ionic strengths, there is no such precipitation, and the degree of protein extraction continues to increase with increasing Tween-85 concentration.

Increasing ionic strength is likely to lead to a salting-out effect,<sup>7</sup> resulting in the transfer of the protein from the organic to the aqueous phase. Indeed, in the presence of ionic strength greater than 0.25  $\mu$  almost no protein was extracted into the organic phase, even though a significant amount of water was still solubilized (data not shown in Fig. 2). The range of ionic strength used in this study is lower than those reported previously.<sup>11,12</sup> For ionic surfactants the effect of increasing salt concentration has been linked to shielding of the electrostatic interaction between the hydrophilic region of the surfactant and the protein.

To test whether isopropanol was the best cosurfactant, we also examined Span-85 as described above. With

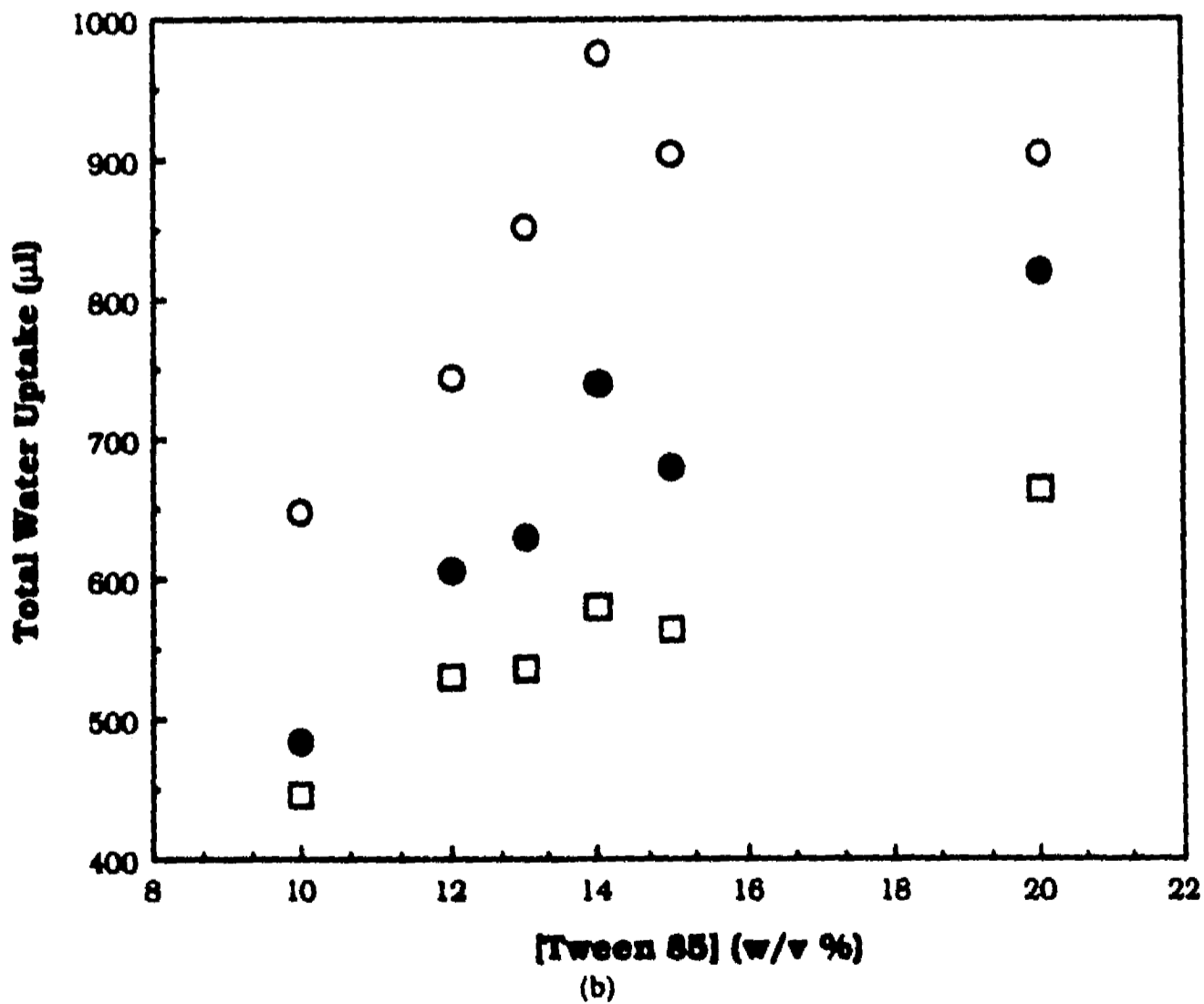
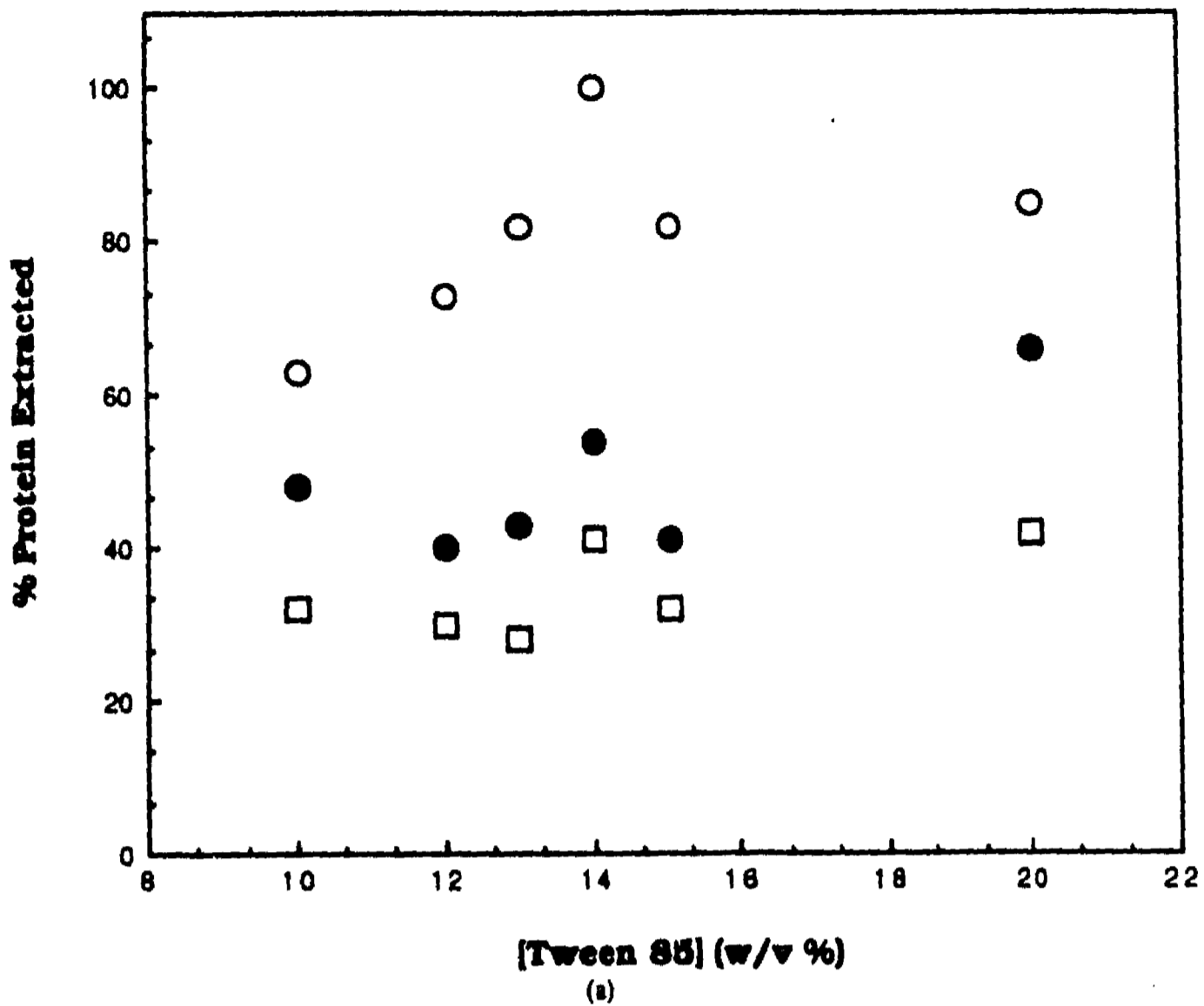
the exception of a Tween-85/Span-85 ratio of 0.2, the Tween-85/Span-85 microemulsions were unable to solubilize large amounts of protein. Unfortunately all microemulsions formed with Tween-85/Span-85 as well as Tween-85/hexanol and Tween-85/octanol were unstable and turbid after 24 h. For these reasons we suggest that isopropanol is a more appropriate cosurfactant to use.

As discussed above, the role of the cosurfactant used in protein extraction systems must also be elucidated. Choosing an optimal detergent concentration and ionic strength for protein extraction, we then studied the effect of changing the ratio of surfactant to cosurfactant on protein and water solubilization. Figure 3, which indicates the effect of cosurfactant on protein and water extraction, shows that isopropanol is needed for water and protein solubilization. As the amount of isopropanol is increased, the micelles which are formed can absorb more water and protein. Again, ionic strength is also important. At very low ionic strength (0.001  $\mu$ ) the solubilization is greater at higher isopropanol/Tween-85 ratios, with maximum solubilization attained at a molecular ratio of 20:1. Further increases in cosurfactant concentration at such low ionic strength does not affect the extent of protein or water solubilization significantly.

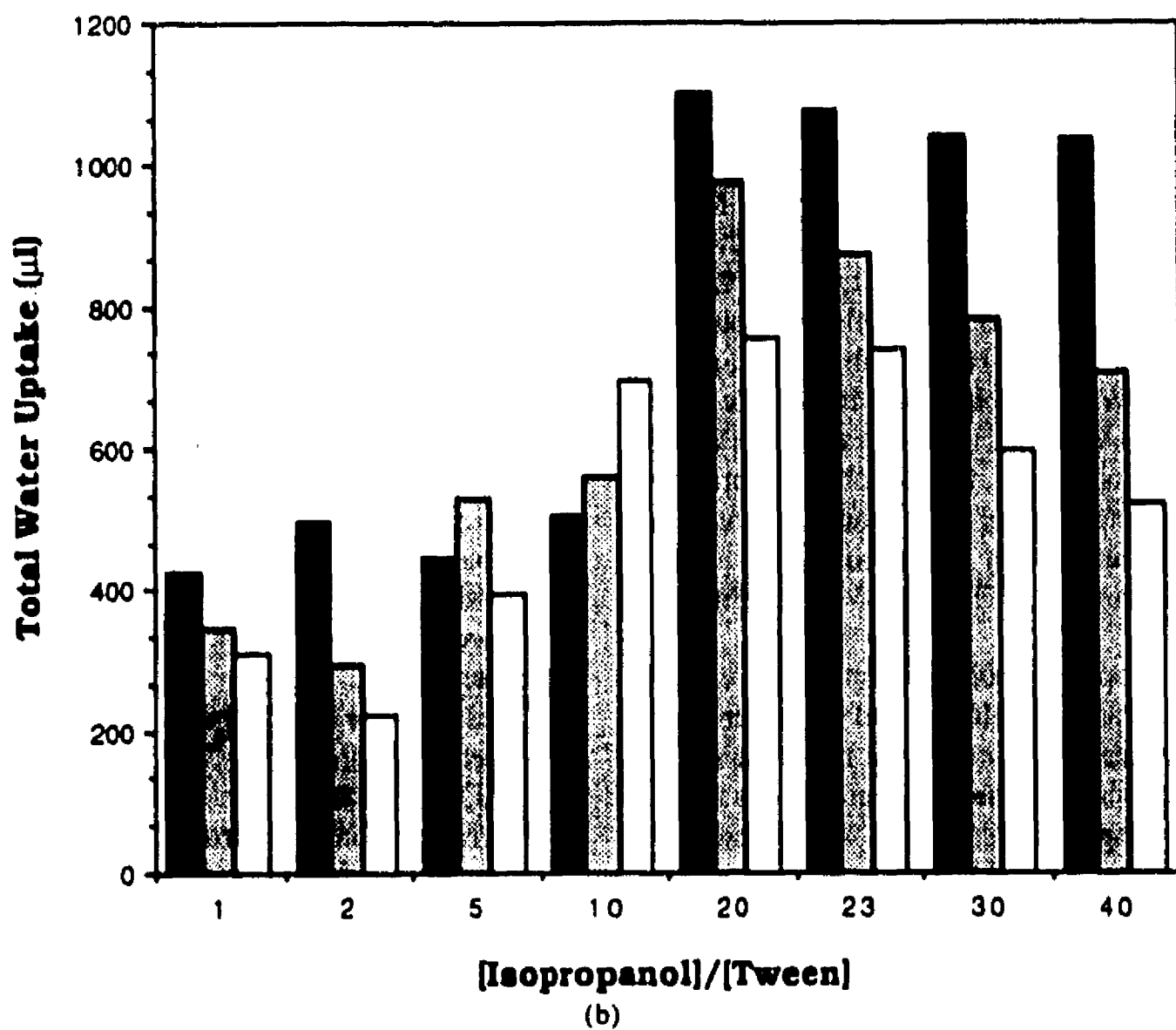
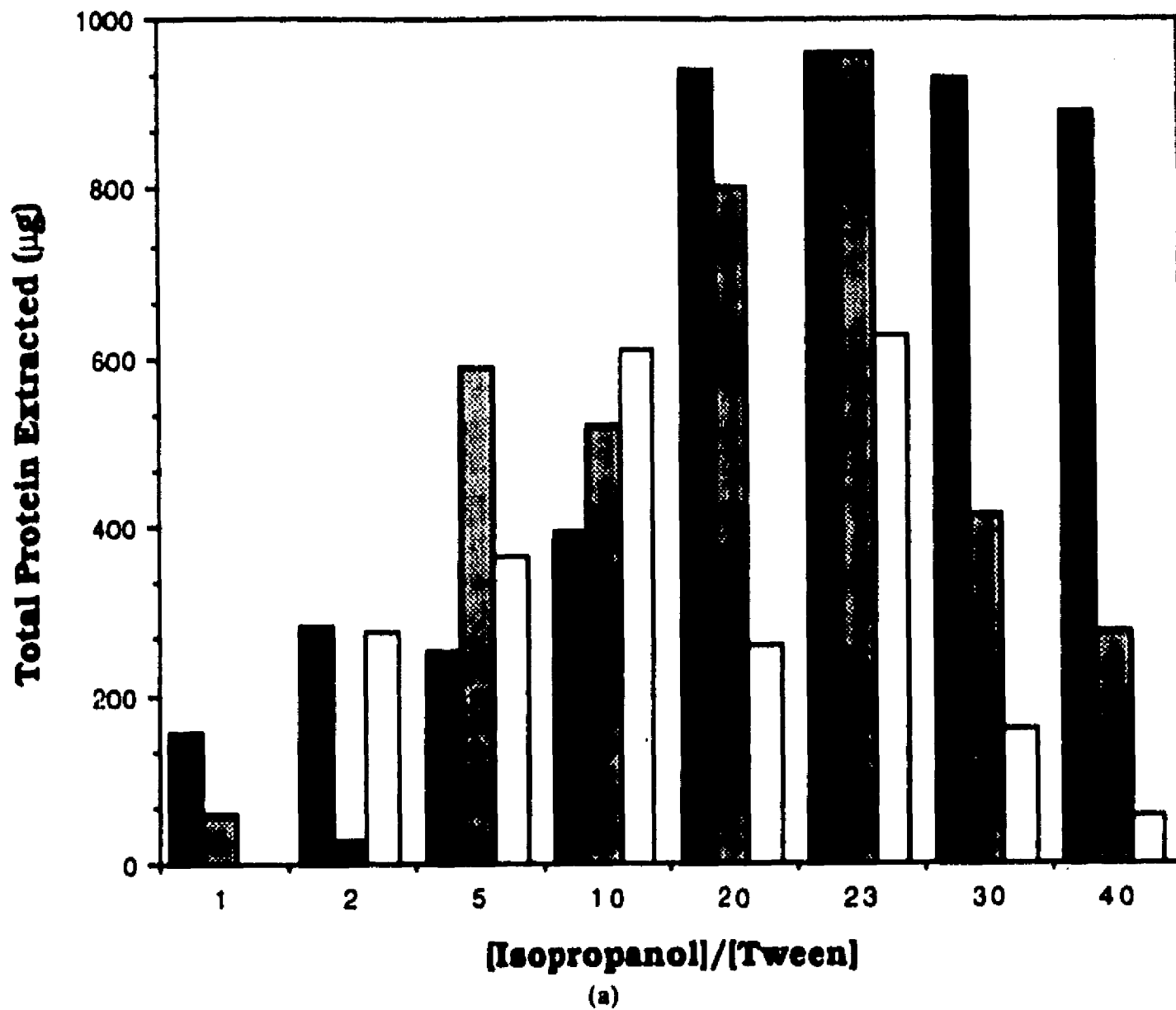
As the ionic strength increases, however, ratios of isopropanol to Tween-85 in excess of 20 induce phase separation (see Fig. 4 for a complete description of the phase behavior of these systems), and recovery of the protein in the microemulsion decreases considerably. The effect of phase separation on water solubilization is not as dramatic. For example, at 0.01  $\mu$  protein extraction drops from 50 to 20% (of the degree of extraction at 23:1) when the ratio of cosurfactant to surfactant changes from 30 to 40, respectively. Meanwhile, the amount of water transferred from the aqueous to organic phase changes from 90 to 80% of the degree of solubilization at 23:1 isopropanol to Tween-85.

Three or four phase systems can also be produced. These simply consist of different ratios of the components in our system: aqueous, organic, detergent, and protein. Similar results are observed at ionic strength 0.05  $\mu$ . These effects can be explained by examining the influence of electrolyte and cosurfactant on the natural radius of curvature of the micelle.<sup>16</sup>

In general, the solubilization capacity (represented by  $W_0$ ) of a microemulsion is a function of the effect of the composition variables on the natural radius of curvature or on the critical radius for demixing.<sup>16</sup> Due to the sum of the interactions between polar head groups, hydrophobic tail groups, organic, and water phases, a micellar interface will tend to bend either toward the organic phase (normal micelles) or the aqueous phase (reverse micelles). Those factors which tend to increase this radius of curvature ( $R_0$ ) will increase  $W_0$ , and vice versa. Increasing  $R_0$  will not increase  $W_0$  without limit, however, since at a particular point (known as the critical



**Figure 2.** Effect of surfactant and salt concentration on the solubilization of protein and buffer by reverse micelles in hexane. Experimental details are given in the text. (a) Percentage of recovery of cytochrome *c* ( $\pm 10\%$ ) in the microemulsion is shown at different ionic strengths: (○)  $0.01 \mu$ ; (●)  $0.05 \mu$ ; (□)  $0.1 \mu$ . The concentration of cytochrome *c* was estimated using an experimentally determined specific absorption coefficient ( $0.715 \text{ mL/mg}$ ). (b) Extraction of water into the reverse micelles ( $\pm 5\%$ ) in the presence of protein is shown at varying ionic strengths: (○)  $0.01 \mu$ ; (●)  $0.05 \mu$ ; (□)  $0.1 \mu$ .



**Figure 3.** Effect of cosurfactant concentration on the solubilization of protein and buffer by reverse micelles in hexane. The amount of protein (a) and water (b) solubilized in the surfactant (Tween-85 at a constant concentration of 14% in all experiments) at different buffer concentrations is shown: 0.001  $\mu$  (filled bars); 0.01  $\mu$  (shaded bars); 0.05  $\mu$  (open bars). Experimental details are provided in the methods section.

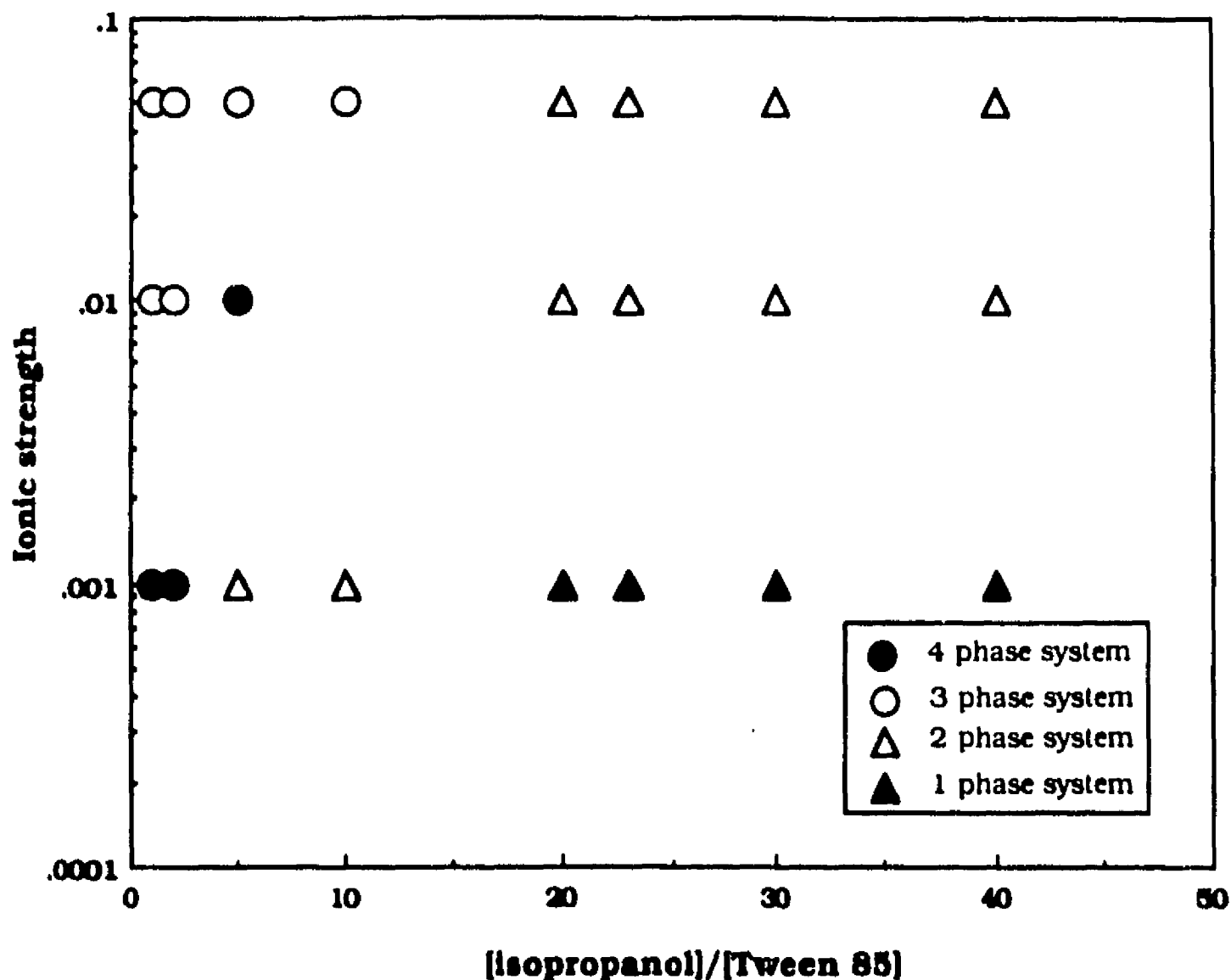


Figure 4. Phase behavior of Tween 85/isopropanol microemulsions. When two phases are formed, a microemulsion in equilibrium with the aqueous phase was formed. Details are given in the text.

radius for demixing,  $R_c$ ) the emulsion will separate into two phases. Our results can be interpreted in terms of effects on  $R_0$  and  $R_c$ .

As in many other micellar systems,  $W_0$  in Tween-85-based microemulsions exhibits a maximum as the cosurfactant concentration increases. Assuming that the propanol is present in the interfacial region, it is likely that these molecules will associate with the polar ethylene oxide groups, raising the effective polar head group area and  $R_0$ . When the increase in micelle radius approaches  $R_c$ , there will be a maximum  $W_0$  (see Fig. 3). It is interesting to note that the number of propanol molecules per surfactant molecule at the point of maximum water solubilization (20) is similar to the number of ethylene oxide groups in Tween-85 (assuming that HLB = 11.0).

Mukerjee<sup>29</sup> developed a molecular model to address the effects of cosurfactant, salt, and oil chain length on solubilization by micelles formed from nonionic surfactants. Their results showed that  $R_0$  decreases as the cosurfactant chain length increases, in agreement with our results using Span-85 and hexanol. Increasing ionic strength was also shown to reduce the effective size of the polar head group, decreasing  $R_0$  and thus  $W_0$ : our results are also in agreement with this correlation.

The phase behavior of these systems shown in Figure 4 is complex, and clearly one should not compare directly the ability of systems with different phase behavior to extract water and protein. Nevertheless, it is interesting that at low concentrations of surfactant there

is significant protein extraction at relatively high ionic strengths. The effect of pH on extraction efficiency will be discussed in a future paper.

#### Reduction of Cytochrome *c*

The overall structure of cytochrome *c* can be analyzed by performing difference spectra between the oxidized and reduced form of the protein. In aqueous solution, redox transition with ascorbate results in characteristic shifts of the absorption peaks and isobestic points for the Soret region and the 500–600 nm region.<sup>4</sup> Our experiments showed that an in situ reduction with ascorbate in a hexane-Tween-85 microemulsion did not differ significantly from the same experiment in water, and previous experiments in a phospholipid-toluene microemulsion.

These results are in marked contrast to a similar experiment performed by Brochette and colleagues<sup>4</sup> for the AOT/isooctane/water/cytochrome *c* system, where  $W_0$ 's greater than 15 produced a microemulsion with significantly reduced ascorbate reduction rates. This reduction in rate was attributed to adsorption of the cytochrome *c* onto the ionic surfactant head groups at the micellar interface.

#### Extraction of Hemoglobin

In order to demonstrate that the detergent system we describe can be utilized for more than one protein, we

tested the extraction of hemoglobin into Tween-85 reverse micelles. Table I presents the results for this system as a function of detergent and salt concentration. Hemoglobin and water are extracted from aqueous solution into the organic phase, the efficiency of extraction depending on the salt and detergent concentration. As expected, the percentage of hemoglobin extracted in a given system was different to that for cytochrome *c* in the same system. At 14% Tween-85 and 0.01  $\mu$ , e.g., 54% of total hemoglobin is extracted, whereas 100% of the cytochrome *c* is extracted. In addition, the optimum conditions for the extraction of hemoglobin are different than those for cytochrome *c*, enabling the possibility for separating the two proteins. Clearly, the use of reverse micellar separations will depend on many factors and must be optimized for each set of proteins.

The size, shape, and charge of hemoglobin and cytochrome *c* are considerably different. It is tempting to suggest that the increased size of hemoglobin relative to cytochrome *c* causes a decreased extraction of the protein, and dynamic light scattering experiments designed to measure the size of the micelles will be used in the future to correlate the difference in micelle protein size to extraction capacity.

### Activity of Subtilisin

Although the extraction of proteins from aqueous media into organic solvents is of interest in its own right, the activity of enzymes in such systems is of particular importance. Since there is no literature concerning the solubilization of enzymes in Tween-85, it is important to consider briefly the activity of an enzyme in this system. We have tested the effectiveness of using a Tween-85/isopropanol/hexane microemulsion for biocatalysis. Subtilisin, a commonly used serine protease, was tested for activity on the substrate *p*-nitrophenylbutyrate as described above. Table II shows that as the  $W_0$  of the reverse micelles changes, so does the activity of the enzyme. A future paper will describe this effect in

**Table I.** Extraction of hemoglobin and water into reverse micelles at different ionic strengths.

[Tween] (%)	0.01 $\mu$		0.05 $\mu$		0.10 $\mu$	
	Protein ( $\mu$ g/mL)	Water ( $\mu$ l/mL)	Protein ( $\mu$ g/mL)	Water ( $\mu$ l/mL)	Protein ( $\mu$ g/mL)	Water ( $\mu$ l/mL)
10	115	242	46	163	56	193
12	120	268	56	212	57	217
13	139	279	50	259	53	222
14	136	274	41	223	56	230
15	131	275	46	221	54	237
20	117	288	31	247	59	248

Experimental details given in the text. The concentration of the protein was determined spectrophotometrically, and the concentration of water was determined by Karl Fischer titration. The specific absorption coefficient of hemoglobin at 411 nm in this system was 3.53 mL/mg. Errors were  $\pm 5\%$  for water determinations and  $\pm 10\%$  for protein determinations.

**Table II.** Effect of  $W_0$  on the activity of subtilisin in reverse micelles.

[Water]/[Tween-85] ( $W_0$ )	Enzyme activity ( $\mu$ mol/min/mg enzyme)
Pure buffer	6.21
60	2.05
20	1.85
13.6	2.00
9.1	1.80
7.7	1.42
6.3	0.87
Pure hexane	$-0.3 \times 10^{-3}$

Experimental details given in the text. The rates of enzyme activity for hydrolysis in pure buffer is given for comparison. In addition, the rate of the transesterification reaction in pure hexane is also shown (determined as described by Chatterjee and Russell<sup>5</sup>).  $W_0$  was determined experimentally ( $\pm 5\%$ ), as was the total water uptake.

far more detail, but clearly an enzyme solubilized in Tween-85 reverse micelles can be extremely active. If one compares the activity of the enzyme under optimal conditions in hexane/Tween-85 with the activity of the same enzyme suspended in anhydrous hexane, the solubilized enzyme is approximately  $10^5$  times more efficient.<sup>5</sup> Our finding that the enzyme has an optimal  $W_0$  agrees with previous studies on the effect of  $W_0$  on enzyme activity.<sup>13</sup>

### CONCLUSION

We have shown that the nonionic surfactant Tween-85 forms stable reverse micelles in hexane which can solubilize large amounts of protein and water in hexane. Analysis of the absorption spectra of cytochrome *c* encapsulated in reverse micelles shows that Tween-85 does not denature the protein. Further evidence of the mild nature of Tween-85 with respect to protein-detergent interactions is that the enzyme subtilisin is catalytically active in these microemulsions. The amount of protein and water which can be absorbed by the reverse micelles in organic solvents is related to the properties of the protein being extracted, the ionic strength of the aqueous phase, and the concentration of the detergent and cosurfactant. At 14% Tween-85 (20:1 isopropanol-Tween-85) and ionic strength 0.001  $\mu$ , concentrations of 0.5 mg/mL cytochrome *c* in hexane are easily obtained. The dependence of extraction efficiency on ionic strength is not identical for different proteins. Thus, a careful choice of salt concentration in the aqueous phase will enable protein purification after optimization. We are now investigating the use of nonionic reverse micelles in the tuning of biocatalyst activity and specificity.

This work was funded by the Army Research Office (DAALO3-90-M0276), the National Science Foundation (BCS-9057312) (PYI to AJR), and Eastman Kodak, Union Carbide Corporation, and PPG. We thank the reviewers for their helpful comments.

## References

1. Aldercreuts, Mattiasson, B. 1987. *Eur. J. Biochem.* **166**: 157-161.
2. Ayala, G., Mendoza-Hernandez, G. 1990. *Biochem. Int.* **22**: 717-723.
3. Becher, P. 1984. In K. L. Mittal, B. Lindman (eds.), *HLB—A survey, surfactants in solution*, vol. 3. Plenum, New York.
4. Brochette, P., Petit, C., Pileni, M. P. 1988. *J. Phys. Chem.* **92**: 3505-3511.
5. Chatterjee, S., Russell, A. J. 1991 (to appear).
6. Eremin, A. N., Metelitsa, D. I. 1984. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **276**: 886-891.
7. Fersht, A. R. 1985. *Enzyme structure and mechanism*. W. H. Freeman, New York.
8. Finney, J. L., Pool, P. L. 1984. *Comm. Mol. Cell. Biophys.* **22**: 129-151.
9. Fletcher, P. D. I., Rees, G. D., Robinson, B. H., Freedman, R. B. 1985. *Biochim. Biophys. Acta* **832**: 204-214.
10. Giovenco, S., Verheggen, F. 1987. *Enz. Microb. Technol.* **9**: 470-473.
11. Goklen, K. E., Hatton, T. A. 1985. *Biotechnol. Prog.* **1**: 69-74.
12. Goklen, K. E., Hatton, T. A. 1987. *Sep. Sci. Technol.* **22**: 831-841.
13. Han, D., Rhee, J. S. 1986. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 1250-1255.
14. Hatton, T. A. 1989. pp. 55-90 In: J. F. Scamehorn and J. H. Harwell (eds.), *Surfactant based separation*. Marcel Dekker, New York.
15. Helenius, A., Simons, K. 1975. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 29-79.
16. Hou, M.-J., Shah, D. O. 1987. *Langmuir* **3**: 1086-1096.
17. Kahlweit, M., Strey, R., Firman, P., Haase, D., Jen, J., Schomacker, R. 1988. *Langmuir* **4**: 499-511.
18. Kahlweit, M., Strey, R., Schomacker, R., Haase, D. 1989. *Langmuir* **5**: 305-315.
19. Khmel'nitsky, Y. L., Hilhorst, R., Veeger, C. 1988. *Eur. J. Biochem.* **176**: 265-271.
20. Kumar, C., Balasubramanian, D. 1980. *J. Phys. Chem.* **84**: 1895-1899.
21. Laitinen, H. A., Harris, W. E. 1975. pp. 361-363 In: *Chemical analysis*. McGraw-Hill, New York.
22. Langevin, D. 1984 In P. L. Luisi and B. E. Saub (eds.), *Biological and technological relevance of amphiphilic structures in apolar media*. Plenum, New York.
23. Lee, K. M., Biellman, J. F. 1987. *FEBS Lett.* **223**: 33-36.
24. Leser, M. E., Wei, G., Luisi, P. L., Maestro, M. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**: 629-635.
25. Luisi, P. L., Magid, J. J. 1986. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **20**: 409-473.
26. Luisi, P. L., Giacomini, M., Pieline, M. P., Robinson, B. H. 1988. *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 209-246.
27. Martinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N., Khmel'nitri, Y. L., Berezin, L. V. 1986. *Eur. J. Biochem.* **155**: 453-468.
28. Menger, F. M., Yamada, K. 1979. *J. Am. Chem. Soc.* **101**: 6731-6733.
29. Mukerjee, S., Miller, C. A., Fort, T. 1983. *J. Coll. Inter. Sci.* **91**: 223-235.
30. Peck, D. G., Johnston, K. P. *J. Phys. Chem.* (to appear).
31. Rupley, J. A., Gratton, E., Careri, G. 1985. *Trends Biochem. Sci.* **8**: 18-22.
32. Samana, J. P., Lee, K. M. 1987. *Eur. J. Biochem.* **166**: 609-617.
33. Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., Garcia-Carmona, F. 1988. *FEBS Lett.* **233**: 363-366.
34. Tanford, C. 1980. pp. 146-164 In: *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*. Wiley, New York.
35. Woll, J. M., Hatton, T. A., Yarmush, M. L. 1989. *Biotechnol. Prog.* **5**: 57-62.
36. Woll, J. M., Willon, A. S., Rahaman, R. S., Hatton, T. A. 1987. pp. 117-130 In: *Protein purification—micro to macro*. A.R. Liss, New York.

# **SOLUBILIZATION AND ACTIVITY OF PROTEINS IN COMPRESSIBLE-FLUID BASED MICROEMULSIONS**

**Guadalupe Ayala , Sanjay V. Kamat , Claire Komives, Eric J. Beckman and  
Alan J. Russell**



# SOLUBILIZATION AND ACTIVITY OF PROTEINS IN COMPRESSIBLE-FLUID BASED MICROEMULSIONS

Guadalupe Ayala<sup>1,2</sup>, Sanjay V. Kamat<sup>1,2</sup>, Claire Komives<sup>1</sup>, Eric J. Beckman<sup>1</sup> and Alan J. Russell<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering and <sup>2</sup>Center for Biotechnology and Bioengineering, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, 15261. \*Corresponding author.

**We have used the pressure dependency of density in near critical propane to design a novel protein extraction system. Active, structurally intact, proteins have been extracted from an aqueous phase into subcritical propane containing the non-ionic detergent polyoxyethylene sorbitan trioleate (Tween-85). The pressure dependence of protein transfer from the aqueous to organic phase is described for cytochrome C and subtilisin. The effect of the microemulsion and compressible propane on protein structure and function is also discussed. The first determinations of kinetic constants for an enzyme-catalyzed reaction in such a system are also presented.**

**M**aterials at pressures and temperatures above their critical values exhibit thermophysical properties which bridge the gap between liquids and gases<sup>1</sup>. A relatively high density imparts a supercritical fluid with the solvating power of a liquid, while a low viscosity simultaneously produces gas-like mass transfer characteristics. In contrast to the behavior of gases and liquids, the physical properties of a supercritical fluid can be tailored over a wide range by modest variations in pressure and/or temperature. Because the solvent power of a fluid, is, to a first approximation, proportional to its density, the solubility of a particular substance in a supercritical fluid is not only a function of the nature of the solvent-solute interaction, but also depends heavily on the system pressure. Careful regulation of the pressure can consequently be used to selectively remove a single compound of interest from a multi-component mixture. The selectivity and high mass transfer rates achievable using supercritical fluids as solvents has spurred successful commercial development in several novel directions.

If proteins could be solubilized in compressible fluids, it should be possible to develop a rapid, inexpensive, single-step purification system. The basis of such a technique would be that proteins can retain their activity in these systems (the focus of this paper), and that the solubility-pressure profiles of different proteins are distinct. For those gases/solvents which do not chemically modify proteins, most enzymes studied to date do not display any loss in activity until the pressure exceeds 400 MPa, far above the pressures necessary for low temperature supercritical fluid work (~50 MPa).

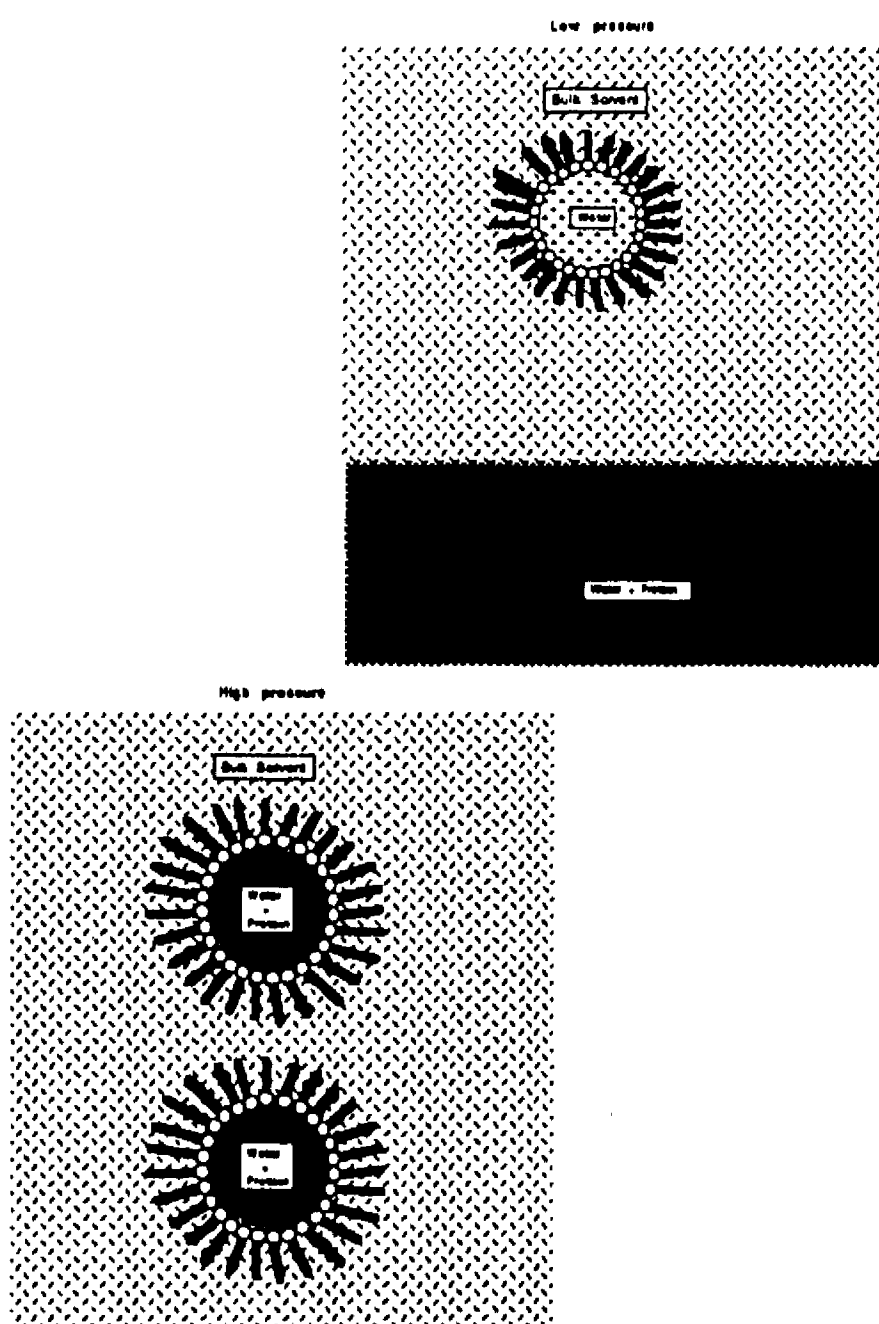
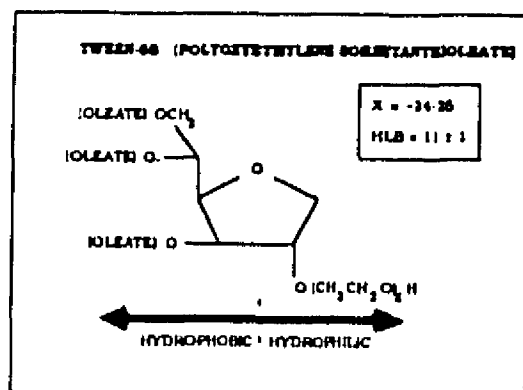
In order to introduce a cytosolic protein into a non-aqueous environment (except the extremely hydrophilic solvent dimethylsulfoxide) one must first introduce solubilizing agents in the organic phase. Hatton and col-

leagues, in a series of pioneering experiments<sup>2</sup>, have shown that reversed micelles in hydrophobic organic solvents can support the solubilization of proteins. Further they have demonstrated that these microemulsions can extract proteins from aqueous solution, and that the efficiency of extraction depends on the pH, ionic strength, and temperature of the aqueous solution. It has been postulated<sup>3</sup> that the effect of pressure alterations on extractions into supercritical fluid/surfactant systems mimics those of changing salt concentrations in the simple aqueous/organic extraction systems described above. The approach we describe here differs from these previous studies in that the supercritical system does not require chemical changes in the aqueous phase to manipulate the degree of solubilization. In addition, the extraction is possible at neutral pH. Of particular utility is the ease of reversing the extraction process, simply by releasing pressure.

There are a number of advantages to regulating protein transfer from an aqueous to an organic phase with variation in pressure rather than variation in the physical properties of the aqueous phase. For example, if the pH of a solution has to be altered in order to achieve extraction into the organic phase, an enzyme might lose activity and/or be irreversibly denatured. This is not unlikely given the dramatic changes in pH necessary in order to extract proteins from aqueous solution: a typical pH change is 3-4 pH units<sup>2</sup>. Small changes in pressure have no appreciable effect on either the structure or function of enzymes, and thus extraction of proteins from aqueous to supercritical fluids should not destroy protein function. Perhaps the most significant advantage of enabling a supercritical fluid to solubilize a protein is that it may be possible to purify a single protein from a mixture after an initial extraction.

Smith and co-workers<sup>4</sup> showed that near-critical bis-2-ethylhexyl sodium sulfosuccinate (AOT)/propane mixtures will extract proteins from aqueous solution. In their study, a 50 mM solution of AOT in propane was brought into contact with an aqueous buffer containing hemoglobin, or cytochrome C, or a hydrophilic dye. The initial pressure was such, as shown by Johnston<sup>5</sup>, that the AOT partitioned primarily to the organic phase. As shown by UV spectroscopy of the aqueous phase, as the pressure was increased, the solutes in the aqueous solution decreased in concentration. The extraction occurred over relatively narrow ranges in pressure, suggesting the use of compressible fluid-based microemulsions as selective separation media. This work did not include any information on the activity, or structural integrity of the proteins in the organic phase, nor was a simultaneous determination of  $W_0$  (the ratio of water concentration to surfactant concentration) in the microemulsions made.

In a recent series of articles<sup>6</sup>, John et al introduced a high pressure technique by which proteins can be induced to precipitate from liquid-based reverse micelles, in contrast to the conventional approach which uses salt or pH. Their method is based on two effects; the formation of clathrate hydrates (solid inclusion compounds of organic gas molecules in water cages) at high pressures



**FIGURE 1** Protein extraction into microemulsions as a function of pressure.

**TABLE 1** The effect of water content on the diameter of Tween-85 (14%) / isopropanol (13%) reversed micelles in hexane, as measured by dynamic light scattering.

Water content (%)	Refractive Index	Diameter (nm)
0.0	1.388	16.7
1.0	1.388	21.6
3.0	1.388	28.2
5.0	1.387	31.7
8.0	1.385	47.8
12.0	1.384	41.6
14.0	1.383	53.8
16.0	1.382	58.7
18.0	1.385	67.9

Sample time was  $7 \times 10^{-6}$  sec. Other details in text.

**TABLE 2** Effect of surfactant concentration on water solubilization by propane/Tween-85/isopropanol microemulsions at 25°C and 4500 psi.

[Tween-85] (mM)	[Isopropanol] (mM)	[Isopropanol] [Tween-85]	Volume of water (ml)	$W_o$
54	1890	35	3.53	90
66	1970	31	4.12	86
75	1890	25	4.50	83
97	2150	23	6.00	86

and moderate temperatures, and the effect of continuous phase density on emulsion stability. In a typical procedure, an AOT/isooctane/water/cytochrome C mixture is added to a high pressure view cell, after which ethylene gas is introduced, generating a two phase system. Increases in ethylene pressure both increase the ethylene mole fraction in the lower micellar phase, decreasing its density, and also increase the probability that clathrate hydrates will form. Both formation of hydrates and decreases in continuous phase density will tend to decrease the  $W_o$  of a micellar system, also decreasing the maximum total protein solubilization capacity. Consequently protein begins to precipitate from solution above a particular pressure. Generally, protein precipitated from solution concurrently as  $W_o$  decreased. Whereas in the absence of added electrolyte the precipitation transition was relatively sharp, addition of KCl broadened the transition substantially, the reason for which was not entirely clear.

Here we present results on the solubilization of proteins in compressible fluid-based microemulsions, and an analysis of activity and structural integrity during and after such high-pressure processing. While previous work used the surfactant AOT, owing to its propensity to form high  $W_o$  reverse micelles in a variety of organic solvents, the use of such an ionic surfactant means that electrostatic interactions should dominate the solubilization behavior of proteins<sup>7</sup>, which would tend to minimize the influence of pressure in a separation process based on a highly compressible fluid. Consequently, in order to focus on the role played by density (which is, of course, controlled with pressure changes) on the extraction process, we have used a non-ionic surfactant based compressible fluid microemulsion.

## RESULTS

**Microemulsion formation.** We have studied the phase behavior of Tween-85/cosurfactant/solvent preparations in detail<sup>8</sup>, and have also measured the size of the micelles using dynamic light scattering. Table 1 shows the variation in the size of spherical micelles of Tween-85 in isopropanol/hexane at different  $W_o$ 's. The experiments were performed on a stable single phase formed by the injection method<sup>9</sup>. As expected, increasing the water content of the micelles results in increased micellar volume. We present this data to indicate that Tween-85 does indeed form micelles in a conventional hydrophobic organic solvent.

Given that in propane the same detergent forms a stable, optically clear, single phase, with the ability to solubilize proteins, it is not unreasonable to hypothesize that a microemulsion is also formed in propane. Figure 1 presents an outline of the dependence of phase behavior upon concentration of detergent, cosurfactant, and pressure for Tween-85/isopropanol/propane mixtures.

**Solubilization of proteins in compressible propane.** After the phase behavior at various combinations of surfactant/cosurfactant concentrations and pressure had been determined (water solubility is summarized in Table 2), proteins were added to the buffer under conditions suitable for single, stable phase formation at high pressure. The ability of the microemulsion to solubilize different proteins as a function of pressure and temperature was then determined. Table 3 indicates that protein solubilization is dependent on solvent density (which is controlled with changes in pressure).

**Activity of enzymes solubilized in compressible propane.** It has been shown that the dimensions and properties of reverse micelles in compressible fluids can be manipulated predictably with changes in pressure.

Table 4 shows determinations of apparent kinetic constants for the subtilisin catalyzed hydrolysis of succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-*p*-nitroanilide at various pressures, and before and after exposure to the microemulsion. It is clear that the activity of the catalyst can be tuned with changing pressure.

Once enzymes have been exposed to the pressure and microemulsion described, activity can be restored in aqueous solution (Table 4). Given the negligible solubility of Tween-85 in water (which was a primary reason for choosing this surfactant) the protein can be separated from the surfactant. During pressurization of the reactor, a small amount of precipitate is formed at the interface of the two phases. This precipitate, which is not possible to quantitate because of the limitation of working under high pressure, is completely resolubilized after depressurization, and at increased pressures (see Table 3).

The solubilization of cytochrome C in the microemulsion has also been observed. In aqueous solution, redox transition with ascorbate results in characteristic shifts of the absorption peaks and isosbestic points for the Soret region and the 500–600 nm region. Our experiments showed that an *in situ* reduction with ascorbate in a propane-Tween-85 microemulsion at high pressure did not differ significantly from the same experiment in water (scan not shown), and previous experiments in a phospholipid-toluene microemulsion<sup>11</sup>.

**Protein extraction from aqueous solution into compressible fluids.** An experiment was performed where a two phase system was prepared by adding more water than the organic phase could solubilize. Under these conditions, an aqueous phase can coexist with a propane phase containing the surfactant, and it is possible to study the partitioning of different proteins between each phase. The extraction of proteins from the excess aqueous phase to the organic phase was then measured as a function of pressure at 25°C. The total amount of cytochrome C solubilized was a function of pressure. At low pressure (500 psi) the microemulsion could solubilize approximately 0.25 mg/ml protein (measured spectrophotometrically using an experimentally determined extinction coefficient). Under these conditions, however, the system was neither a single phase, nor stable, nor optically clear. Rather, protein solubilization was probably enhanced by the formation of a classical bicontinuous structure. Indeed, at 500 psi the system consisted of three distinct phases (a Windsor III system), and the protein was extracted from the aqueous phase to the middle (bicontinuous) phase. Upon formation of the microemulsion at pressures exceeding approximately 2,500 psi almost all the protein in the system was solubilized (0.206 mg/ml). A similar experiment was performed with hemoglobin. Microemulsion formation still took place, although the pressure necessary was only 2,000 psi. The amount of hemoglobin solubilized was approximately 0.32 mg/ml under optimal conditions.

## DISCUSSION

We have previously optimized the concentration and nature of cosurfactant for use of Tween-85 in hexane. In propane, the molar ratio of isopropanol to Tween-85 necessary for microemulsion formation exceeds that for hexane. The reason is probably that at low pressures propane itself requires a co-solvent (for instance isopropanol) in order to solubilize Tween-85. Thus the role of isopropanol is to act as both a co-solvent and a cosurfactant. From Table 2 we see that as Tween concentration increases, the amount of isopropanol necessary to obtain a microemulsion also increases, whilst the ratio of isopropanol/Tween-85 decreases. This implies that the main

role of isopropanol in this system is to act as a co-solvent by increasing the density of a propane mixture. Indeed, the addition of isopropanol is necessary for Tween-85 solubilization, even in the absence of water.

Under all conditions reported in Table 2 it is possible to form a single phase microemulsion. The ability of the system to solubilize water depends, however, on the pressure and concentrations of the surfactant and co-surfactant/solvent. It should be noted that although the actual water solubilization is different in each experiment, the ratio of water to surfactant concentration ( $W_s$ ) remains essentially constant. This implies that the micelles formed under these varying conditions are of equivalent size.

Table 3 describes the effect of temperature and pressure on phase behavior and the ability of the microemulsion to solubilize protein (this data is presented with a complete description of the system properties). In the absence of protein we see that increased pressure results in increased water solubilization, to a maximum of 15% water in the system (Table 2). Table 3 shows that as temperature is increased, the pressure required to form a stable one phase system increased. It is clear that the changes in density which result from temperature or pressure changes affect the aggregation properties of the surfactant. Our data suggest that micelle size increases with increasing density, and that single phase systems are formed when the density exceeds approximately 530 kg/m<sup>3</sup>. Using AOT as a surfactant it is not possible, however, to change micelle size, in the absence of proteins, by changing density<sup>11</sup> in compressible fluids. Note,

**TABLE 3** Effect of temperature and pressure on phase behavior of propane/Tween-85/isopropanol microemulsions, and their ability to solubilize protein.

Pressure (psi)	Temperature (°C)		
	26	30	45
300	2 ph, o, ppt, sr (494.5 kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, sr (487.8 kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, sr (460.89 kg/m <sup>3</sup> )
1000	2 ph, o, ppt, it (507.1 kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, it (501.5 kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, sr (479.4 kg/m <sup>3</sup> )
2000	2 ph, o, ppt, it (521.2 kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, it (516.4 kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, t, r, ppt, it (497.9 kg/m <sup>3</sup> )
2800	1 ph, it, oc, r (530.5 kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, o, ppt, it (526.2 kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, t, r, ppt, it (509.4 kg/m <sup>3</sup> )
3250	1 ph, oc, r (535.0 kg/m <sup>3</sup> )	1 ph, oc, r (531.0 kg/m <sup>3</sup> )	2 ph, t, r, ppt, it (515.1 kg/m <sup>3</sup> )

Cytochrome C (4 ml of 0.25 mg/ml) were placed in the reactor, followed by Tween-85 and isopropanol. The pressure was increased until microemulsion formation was observed. ph = number of phases; o = opaque; ppt = appearance of protein precipitate; it = increasing transparency relative to lower pressure; r = red color in organic phase; sr = overall appearance is red; t = transparent; oc = optically clear solution.

**TABLE 4** Activity of subtilisin in single phase microemulsions Tween-85/isopropanol.

Experimental conditions	Specific activity (μmol/min/mg)	$V_m/K_m \times 10^3$ (sec <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
Buffer	29.44	42.1
Hexane, microemulsion	3.53	3.56 <sup>a</sup>
Propane, 3,000 psi	4.47	7.43 <sup>a</sup>
Propane, 4,500 psi	4.47	6.35 <sup>a</sup>
Recycled from 3,000 psi	28.00	19.2
Recycled from 4,500 psi	22.06	17.7

The substrate used was succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-*p*-nitroanilide. Errors are less than ± 10%. <sup>a</sup>Apparent values.

however, that in conventional solvents altering the physical properties of the solvent has a profound effect on the size of micelles (Table 1). Given the significant differences in the properties and structures of AOT and Tween-85, it is not surprising that they exhibit such different aggregation properties.

The activities we determined are approximately twice those for an identical system in a conventional solvent (hexane). The increase in activity may be related to the increased diffusivities in propane relative to hexane. If the reaction in hexane is limited by the diffusion of substrate into the micelle, then the use of propane would be expected to increase the activity of the system. Naturally, the meaning of the specificity constant in buffer, and the apparent specificity constant in organic solvents are very different. Indeed, the value of enzyme activity in buffer is reported only for comparison to those activities recovered from the microemulsions. Further, changes in the apparent activity of the enzyme could be related to small differences in the partitioning of the substrate (which is more soluble in buffer than hexane) between the reversed micelle and the bulk solvent. It is clear from Table 4 that it is possible to recover substantial activity of subtilisin from Tween-85/propane.

We have focused here on demonstrating that when proteins are solubilized in propane/Tween-85/isopropanol microemulsions, the process is pressure dependent, the proteins are active and in their native conformation, and they can be recovered in a straightforward manner. We are currently evaluating the ability of pressure to regulate effective protein purification of active enzyme from a mixture of proteins solubilized in compressible propane.

#### EXPERIMENTAL PROTOCOL

**Materials.** All surfactants were purchased from Fluka Chemi-

cal Co. (Buchs, Switzerland) and were of the highest purity commercially available. They were used without further purification. Proteins and enzymes were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). All gases were purchased from Harvey Gas Company (Matheson Gas Products, Inc., USA) and were used without further purification or drying. The water content of all solvents used was measured by Karl Fischer titration.

**Dynamic light scattering.** Dynamic light scattering studies on the micelles were performed with a modified Wyatt Dawn F fixed multi-angle photometer (Wyatt Technology, Inc., Santa Barbara, CA) with a helium cadmium laser with power stabilization (Liconix model 4210N laser, Liconix 50SA power stabilizer, Liconix, Inc., Sunnyvale, CA). The signal output was processed by a Langley Ford autocorrelator (Model 1096, LFI, Amherst, MA). Solutions of micelles were filtered prior to the scattering experiments to remove any traces of dust or contaminants. The apparent translational diffusion coefficients for micelles formed with a solution of 14% Tween-85/13% isopropanol/73% hexane (v:v:v) and varying amounts of water (not buffer) were found and the hydrodynamic radius was calculated. The micelle radius was found to vary linearly with the volume of added water.

**Reactor design.** In order to observe phase behavior visually, withdraw samples for analysis, and monitor the progress of the reactions via on-line UV or IR monitoring, we have constructed several variable volume, high pressure, batch mode view cells. The cells are designed for 100 MPa maximum pressure at 100°C. High pressure resistant synthetic sapphire windows, which exhibit tremendous strength and excellent UV and IR transmittance characteristics, are incorporated in the design to enable the reactor to fit into a Perkin Elmer Lambda 2 spectrophotometer. The cell compartment of the spectrophotometer did not require modification. Pressure within the cell was generated using a manually operated syringe pump (High Pressure Equip., Erie, PA).

**Protein extraction.** Tween-85 and isopropanol were placed in the reactor described above, and a syringe pump was used to pressurize the system. Aqueous protein solution (6.4 ml in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0) was added via a second pump. Only the organic phase was visible through the sapphire win-

dow. After vigorous agitation with a magnetic stirrer, a Perkin Elmer Lambda 2 spectrophotometer was used to measure the absorbance of the organic phase between 200 and 1100 nm at a variety of pressures. The scans were repeated several times each hour to test the stability of the microemulsion. After scanning was complete, cells were slowly depressurized, and the protein remaining in the aqueous phase was subjected to further analysis including direct comparisons to the initial sample.

**Enzymatic activity in propane.** Apparent kinetic parameters for the subtilisin-catalyzed hydrolysis of succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-p-nitroanilide (sAAPFN) were determined as follows. sAAPFN (0.96 mM in 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 8.6) (10% of reactor volume) and Tween-85 (12.25% w/v) were placed in the reactor prior to assembly and pressurization with propane. Next isopropanol (16% v/v) was added, and the reactor was further pressurized to the desired pressure for single phase microemulsion formation (~2,500 psi). The reactor was isolated and placed in a spectrophotometer and non-specific hydrolysis of sAAPFN was determined by following the increase in  $A_{412}$  nm. The reaction was initiated by the injection of 10  $\mu$ l of subtilisin (18 mg/ml in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.8). Catalytic activity in hexane/tween-85 was determined as described previously<sup>12</sup>. Use of a low substrate concentration enabled the direct determination of apparent  $k_{cat}/K_m$  as described previously for this enzyme and substrate system<sup>12</sup>.

**Re-transfer of proteins from microemulsions in propane to an aqueous solution.** A protein-containing single phase microemulsion, produced as described above, was vented to air. The Tween-85/isopropanol/protein solution remaining in the reactor was then diluted 1:1 with hexane to reduce viscosity, forming a water in oil microemulsion. The ionic strength of the aqueous phase was increased by addition (1:10 v/v) of a high ionic strength phosphate buffer (0.5 M), pH 7.8, thus enabling the transfer of protein from the organic to the aqueous phase. After brief centrifugation, the aqueous phase was concentrated and analyzed for structural and functional integrity of the protein.

#### Acknowledgments

This work was funded by the Department of Defense, Army Research Office, (DAAL03-90-M-0276), Eastman Kodak, PPG,

Union Carbide Corporation, the University of Pittsburgh Materials Research Center, and a National Science Foundation Presidential Young Investigator Award to A.J.R. (BCS 9057312). S.K. was partially supported by a Ben Franklin Fellowship.

Received 29 June 1992; accepted 10 September 1992.

#### References

1. McHugh, M. A. 1986. *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*. Butterworths, New York.
2. Hatton, T. A. 1989. Reversed micellar extraction of proteins, p. 55-90. *In: Surfactant Based Separation Processes*. Scamehorn, J. F. and Harwell, J. H. (Eds.). Marcel Dekker, NY.
3. Beckman, E. J. and Smith, R. D. 1991. Phase behavior of inverse microemulsion for the polymerization of acrylamide in near critical and supercritical continuous phases. *J. Phys. Chem.* **95**:3253-3256.
4. Smith, R. D., Fulton, J. L., Blitz, J. P. and Fingey, J. M. 1990. Reverse micelles and microemulsions in near critical and supercritical fluids. *J. Phys. Chem.* **94**:781-787.
5. Johnston, K. P., McFann, G. J. and Lemert, R. M. 1980. Pressure tuning of reverse micelles for adjustable solvation of hydrophiles in supercritical fluids. *In: Supercritical Fluid Science and Technology*. Johnston, K. P. and Penninger, J. M. L. (Eds.). American Chemical Society, Washington, DC.
6. Phillips, J. B., Nguyen, H. and John, V. J. 1991. Protein recovery from reverse micellar solutions through contact with a pressurized gas. *Biotechnol. Prog.* **7**:43-48.
7. Goklen, K. E. and Hatton, T. A. 1987. Liquid-liquid extraction of low molecular weight proteins by selective solubilization in reverse micelles. *Sep. Sci. Technol.* **22**:831-841.
8. Ayala, A. G., Kamat, S., Beckman, E. J. and Russell, A. J. 1992. Protein extraction and activity in reverse micelles of a nonionic surfactant. *Biotechnol. Bioengin.* **39**:806-814.
9. Luisi, P. L. and Magid, J. J. 1986. Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **20**:409-473.
10. Escamilla, E., Ayala, G., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., Millan, L. and Darzon, A. 1989. Catalytic activity of cytochrome oxidase and cytochrome C in apolar solvents containing phospholipids and low amounts of water. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**:332-343.
11. Eastoe, J., Robinson, B. H. and Steytler, D. C. 1990. Influence of pressure and temperature on microemulsion. *J. Chem. Soc. Farad. Trans.* **86**:511-517.
12. Russell, A. J., Thomas, P. G. and Fersht, A. R. 1987. Electrostatic effects on modification of charged groups in the active site cleft of subtilisin by protein engineering. *J. Mol. Biol.* **193**:803-813.

## VI. CONCLUSIONES.

El uso de detergentes no iónicos para la formación de micelas invertidas ha resultado en una mayor estabilidad de las enzimas, como contrapartida a lo observado con los detergentes iónicos. También se demostró que las enzimas permanecen activas aún después de haber sido solubilizadas en la microemulsión y reextraerlas a un medio acuoso. Varias enzimas mostraron ser activas en un rango amplio del  $W_o$ . Esto permitirá el estudio de la catálisis enzimática a diferentes concentraciones de agua. Estos sistemas también nos permiten estudiar las enzimas en condiciones en las que el agua presenta propiedades a las del agua libre.

Con el Tween 85 se pudieron formar microemulsiones con una alta capacidad para solubilizar agua y proteínas. De particular importancia fue que este detergente pudo formar microemulsiones en líquidos altamente compresibles. Nosotros proponemos que estos sistemas se pueden utilizar en la purificación y extracción de proteínas. Especialmente, la extracción de proteínas utilizando gases bajo presión tiene la ventaja de que el solvente se elimina al liberar la presión, en tanto que la proteína y el detergente se precipitan. Posteriormente el detergente puede ser eliminado por filtración. Por otro lado, la solubilización de enzimas en microemulsiones a alta presión, permitirá realizar estudios sobre el efecto de la presión en la dinámica estructural de proteínas oligoméricas y correlacionarlos con el contenido de agua en la microemulsión.

Algunas preguntas interesantes que no se respondieron en

este trabajo son: ¿ Por qué las enzimas incrementaron su actividad específica después reextraerlas de la microemulsión ?; ¿ Por qué bajo ciertas condiciones la eficiencia catalítica fue mayor en la microemulsión ?; ¿ Cual es la causa de que ciertas enzimas mostraran mayor actividad y estabilidad en la microemulsión ?.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## VII BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Dekker, M., Hilhorst, R., Laane, C., Anal. Biochem. 178, 1989, pp 217-226.
- 2.- Hatton, T. A., In Hatton, T. A., in Scamehorn, J. F. Harwell, J. H., eds., Surfactant-Based Separation Processes, Marcel Dekker, Inc., 1989, pp 55-90.
- 3.- Leser, M. E., Luisi, P. L., Chimia 44, 1990, pp. 270-282
- 4.- Matzke, S. F., Creagh, A., Haynes, C. A., Prausnitz, J. M., Blanch, H. W., Biotechnology and Bioengineering 40, 1992, pp 91-102
- 5.- Matinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N., Khmel'nitski, Y. L., Berezin, L. V., Eur. J. Biochem. 155, 1986, pp 453-468.
- 6.- Luisi, P. L., Steinmann-Hofmann, B., Methods in Enzymology 136, 1978, pp. 188-216.
- 7.- Luisi, P. L., Giomini, M., Pileni, M. P., Biochim. Biophys. Acta 947, 1987, pp. 93-117.
- 8.- Klyachko, N. L., Levashov, V. A., Pshezhetsky, V. A., Bogdanova Berezin, I. V., and Martinek K., Eur. J. Biochem. 161, 1986 pp 149-154
- 9.- Magid, L., Walde, P., Zampieri, G., Battistel, E., Peng, O., Trotta, E., Maestro, M., Luisi, P. L. Coll Surf. 30, 1988, pp 193-207.
- 10.- Israelachvili, J., in Mittal, K. L., Bothorel, P., eds., Surfactants in Solution 4 Plenum, New York, 1986, pp. 3-33.
- 11.- Zana, R., Lang, J., in Microemulsions: Structure and Dynamics, Friberg, S. E., Bothorel, P., eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1987, pp. 153-172.
- 12.- Fendler, J. H. (1982) en Membrane Mimetic Chemistry, John Wiley and sons; New York pp 48.77.
- 13.- Muller, N. (1978) J. Colloid Interface Sci. 63 384-393.



- 14.- Luisi P. L. and Magid, J. J. (1986) C.R.C. Critical Rev. Biochemistry, 20 409-473.
- 15.- Schulman, J. H. and Montabne, J. B. (1961) Ann. N. Y. Acad. Sci. 92 Art. 2 366.
- 16.- Schulman, J. H. and Friend. J. A. (1949) J. Colloid Sci. 4, 497-
- 17.- Fletcher, P. D. C. Ree, G. D., Robinson, B. H: and Freedman, R. B. (1985) Biochim. Biophys. Acta 832, 204-214.
- 18.- Samana J. P., Lee, Kang Min. (1987) Eur. J. Biochem. 163, 609-617.
- 19.- Hilhorst, R. Sprujit, R. Laane, C., and Veeger, C. (1984) Eur. J. Biochem. 144, 459-466.
- 20.- Hilhorst, R. Laane, C. and Veeger (1983) FEBS Lett, 159, 225-228.
- 21.- Shinoda, Kozo and Hironobu, Kunieda (1973) Journal and Interface Science Vol 42, 381-387.
- 22.- Kumar, C. and Balasubramanian, D. (1979) Journal of Colloid and Interface Science, 69 (2), 271-279.
- 23.- Kumar, C. and Balasubramanian D. (1980) J. Phys. Chem. 84, 1895-1899.
- 24.- Helenius, A. and Simons, K. (1975) Biochim. Biophys. Acta 415, 29-79.
- 25.- Kang-Min Lee, and Biellman J. F. (1987) FEBS, 223 (1) 33-36.
- 26.- Sánchez-Ferrer, A. Bru, R. and García-Carmona, F. (1988) FEBBS Lett 233, 363-366.
- 27.- Tyrakowska, B. Verhart, R. M. D. , Hilhorst, R. and Veeger, C. (1990) Eur. J. Biochem. 187, 81-88.
- 28.- Aveyard, R., Binks, B. P., Fletcher, P. D. I., Langmuir 5 1989, pp. 1210-1217.
- 29.- Darszon, a: Strasser, R. and Montal, M. (1979) Biochem. 18, 5205-5313.
- 30.- Schonfeld, M. Montal, M. and Feher, G. (1980)

- Biochemistry 31, 1535-1542.
- 31.- Huang, S. G., Korenbrot, N. I. and Stoeckenius, W. (1977). *Membr. Biol.*, 36, 115-136.
  - 32.- Escamilla, E., Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Millán, L. and Darszon, A. (1989) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 272, (2), 332-343.
  - 33.- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. (1989) *Biochemistry*, 28, 3177.
  - 34.- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou, A. (1990). *Biochemistry*, 29, 751-
  - 35.- Ramakrishnan, V. R., Darszon, A. and Montal, M. (1983) *The Journal of Biological Chemistry* 258 (8) 4857-4860.
  - 36.- Martinek, K. Levashov, A. V., Klyachko, N. L., Pantin and I. V. Berenzin. (1981) *Biochim. et Biophysica Acta*, 657, 277-294.
  - 37.- Khmelnistky, Y., Neverova, I. N., Polyakov, V. I. Grinberg, V. Y., Levashov, A. V., Martinek, K. (1990) *Eur. J. Biochem.* 190, 155-159.
  - 38.- Ruckenstein, E., Chi, J. C., *J. Chem. Soc. Farad. Trans. II*, 71, 1975, pp. 1690-1707.
  - 39.- Verhaert, R. M., Hilhorst, R., Vermue, M., Schaafsma, T. J., Veeger, C., (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 59-72.
  - 40.- Verhaert, Tyrakowska, B., Hilhorst, R., Schaafsma, T.J., Veeger, C., (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 73-79.
  - 41.- Tyrakowska, B., Verhaert, R. D., Hilhorst R., Veeger, C. (1990) 187, 81-88.
  - 42.- Hubener, H. J., Sahrholz, F. G., Schmidt-Thomé, J., Neemann, G., and Jank, R., (1959) *Biochim. Biophys. Acta* 35, 270.
  - 43.- Blomquist, C. H. (1973) *Arch. Biochim. Biophys.* 159, 590.
  - 44.- Han, D., Rhee, J. S. (1986) *Biotechnol. Bioeng.* 28: pp 1250-1255.

- 45.- Szymanski, S, E, and Furfine, C. S. (1977) Journal of Biological Chemistry 252 (1), 205-211,
- 46.- Rendón, J. L., Cacagno, M., Mendoza-Hernández G., and Ondarza R. N. (1986) Archives of Biochemistry and Biophysics, 248: 215-233
- 47.- A. Zaks, and Alexander M. Klibanov (1988) The Journal of Biological Chemistry, 263, ( 7 ), 3194-3201.
- 48.- Dreyfus, G., Guimaraes-Motta, H., and Silva L. J., (1988) Biochemistry 27 pp 6704-6710.
- 49.- Hagihara, B., "The Enzymes," 2nd ed., Vol 4 p. 193, 1960
- 50.- J. Kraut, Ann. Rev. Biochem., 1977, 46, 331.
- 51.- Ottesen, M. and Svendsen, I., 1970. In Methods in Enzymology (Lorans, L. and Perlman, G., eds.) Vol XIX, pp 199-215, Academic Press, New York.
- 52.- Winsor, P. A., Ed., Solvent Properties of Amphiphilic Compounds, Butterworths, London 1954
- 53.- Guth, E., Simha, R., Kolloid Zeits. 74, 1936 pp. 266-275
- 54.- Guth, E., Gold, O., Phys. Revs., 53, 1938, 322-
- 55.- Russell, A. J., Thomas, P. G. and Fersht, A. R, J. Mol. Biol. 193, pp. 803-813.
- 56.- De Geyer, A., Tabony, J., Chem. Phys. Lett. 113 (1), 1985, pp. 83-88.
- 57.- Alecksey, Zaks., Alexander, Klibanov., (1984) Science 224: 1249-1251.
- 58.- Guadalupe Ayala., M. Tuena de Gómez-Puyou., Alberto Darszon., and Armando Gómez-Puyou. (1986) FEBS 20: 41-43.
- 59.- Zaks, A., Klibanov, A. M., (1986) J. Am. Chem. Soc., 106: 2776-
- 60.- Sakurai, T., Margolin, A. L., Russell, A. J., Klibanov, A. M., (1988) J. Am. Chem. Soc., 110: 7236-7237.

- 61.- Mendoza-Hernández, G., Rendón J. L. and Díaz Zagoya, J. C: (985) Biochim. Biophysic. Res. Commun. 126, 477-481.
- 62.- Pecora, R., ed., Dynamic Light Scattering, Mazer, N. A., Laser Light Scattering in Micellar Systems, pp. 305-346, (Plenum Press, 1985, New York).
- 63.- Day, R. A., Robinson, B. H., Clarck, J. H. R., Doherty, J. V., ussell, A. J., ( 1979 ) J Chem. Soc. Farad Trans. I 75, pp 132-139.
- 64.- Tanford, C., (1980) The Hydrophobic Effect: Formation of micelles and Biological Membranes, Wily New. York.
- 65.- Klyachko, N. L. Levashov, A. V. Pshezhetsky, A. V., Bogdonova, N. G., Berezin, I, V. and Martineck, K. (1986) Eur. J. Biochem. 161: 149-154.
- 66.- Rance, Derek, G., Friberg, S. (1977) J. Colloid and Interface Science 60 (1): 207-209.
- 67.- Prince, Leon, M., (1975) J. Colloid and Interfece Science 52 (1): 182-188.
- 68.- Israelachvili, J., Physical Principles of Surfactant Self-Association into Micelles, Bilayers, Vesicles and and Microemulsion Droplets, in Mittall, K. L., Botherel, P., eds., Surfactant in solution 4, Plenum, New york, 1986, pp 3-33.