

阳离子Gemini型表面活性剂对 α -糜蛋白酶超活性的诱导效应

岳 铮¹, 白光月²

¹湖北省水文水资源应急监测中心, 湖北 武汉

²河南师范大学化学化工学院, 河南 新乡

收稿日期: 2024年10月19日; 录用日期: 2024年11月13日; 发布日期: 2024年11月28日

摘 要

本文主要研究了阳离子gemini型表面活性剂 $C_{12}C_sC_{12}Br_2$ ($s = 2, 6$ 和 10) 在稀溶液状态下对 α -糜蛋白酶活性的影响。在稀溶液体系中我们选择了几种具有典型间隔链长度的gemini表面活性剂12-s-12 ($s = 2, 6$ 和 10) 探究不同头基距离的表面活性剂与 α -CT之间不同程度的相互作用, 同时将传统单链阳离子表面活性剂DTAB作为对比研究。结果表明, 12-s-12/ α -CT体系在所研究的浓度范围内均出现“钟形”的超活性区域, 催化效果比DTAB/ α -CT要好。 α -CT相对活性的大小与gemini型表面活性剂的间隔链长度也有关系, 即spacer越长, 头基的电荷密度相对越小, 超活性出现的越早而且最大相对活性值也越高。

关键词

α -糜蛋白酶, Gemini型表面活性剂, 超活性

Cationic Supreactivity of α -Chymotrypsin Induced and Regulated by Positive Charge of Gemini Surfactants

Zheng Yue¹, Guangyue Bai²

¹Hydrological and Water Resources Emergency Monitoring Center of Hubei Province, Wuhan Hubei

²School of Chemistry and Chemical Engineering, Henan Normal University, Xinxiang Henan

Received: Oct. 19th, 2024; accepted: Nov. 13th, 2024; published: Nov. 28th, 2024

Abstract

In this work we studied the catalytic activity of α -chymotrypsin (α -CT) in gemini surfactants

文章引用: 岳铮, 白光月. 阳离子 Gemini 型表面活性剂对 α -糜蛋白酶超活性的诱导效应[J]. 分析化学进展, 2024, 14(4): 243-250. DOI: 10.12677/aac.2024.144029

C₁₂C_sC₁₂Br₂ (s = 2, 6, 10) solution. We selected several cationic gemini surfactants (12-s-12, s = 2, 6, 10) to investigate the effects of different spacer lengths on the activity of α -chymotrypsin, meanwhile the conventional single-chain cationic surfactant DTAB was also used as a comparative study. In all cases, the superactivity of 12-s-12/ α -CT system appears in a bell-shape in a concentration region below their respective critical micelle concentration and, the catalytic effect is better than that of DTAB/ α -CT system. The relative activity of α -CT was related to the spacer chain length of the gemini surfactant, that is, the gemini surfactant with longer spacer might have a much stronger influence on the enzyme activity due to larger size and its stronger hydrophobicity of its head group.

Keywords

α -Chymotrypsin, Gemini Surfactant, Superactivity

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

生命系统的功能性和完整性离不开酶的催化作用, 提高酶的活性和稳定性是工业经济发展以及药物医学研究的必然要求。大量文献表明阳离子表面活性剂能够提高酶的催化效率[1], 近年来, Gemini 型表面活性剂由于其具有更好的物理化学性质以及更多的实际应用需要被认为是比较有潜力的研究对象。 α -糜蛋白酶在医学治疗方面也具有重要意义, 比如手术后的伤口愈合以及消炎和防止局部水肿等等。在这篇文章中, 我们研究了 gemini 型表面活性剂在稀溶液状态时与 α -糜蛋白酶的相互作用, 诱导 α -糜蛋白酶出现超活性提高催化效率必将具有非凡的意义和价值。

Gemini 型表面活性剂分子具有两组极性头基和两条疏水烷基链, 这两部分由间隔链(spacer)在头基处共价相连, 由于其二聚体结构, 它们表现出较低的临界胶束浓度, 较强的表面张力降低能力以及较好的增溶能力被认为是一类新型的表面活性剂[2], 除了良好的物理化学性质, gemini 型表面活性剂还可以作为添加剂在防腐剂, 护发素, 以及对皮肤和眼睛无刺激的个人护理中有良好的应用[3], 由于其显著的化学性质和广泛的应用, 近年来关于 gemini 表面活性剂与酶的相互作用研究层出不穷。

α -糜蛋白酶(α -CT)是一种被广泛研究的丝氨酸蛋白酶, 具有众所周知的结构和作用机理, 它可以催化蛋白质中肽键的水解, 也能够作用于小的酰胺和酯[4]-[6]。 α -CT 的分子量为 24,800, 是一种尺寸为 $40 \times 40 \times 51 \text{ nm}^3$ 的球形蛋白, 也可以近似的看作半径为 22 nm 的球体[7]。 α -糜蛋白酶在 PH = 3 的溶液中为单体 - 二聚体平衡的结构, 而在 PH = 7 的溶液下是以单体 - 六聚体平衡的形式存在[8]。一个 α -CT 分子有八个色氨酸残基, 其中两个(Trp-27 和 Trp-29)掩埋在分子的内部区域, 有四个氨基酸(Trp-51、Trp-141、Trp-172 和 Trp-215)暴露面积低于酶分子总表面积的 20%, 而另外两个色氨酸残基(Trp207)和(Trp237)暴露于溶剂中的面积分别为 46%和 49% [9]。 α -CT 的活性位点由组氨酸-57, 丝氨酸-195 和天门冬氨酸-102 组成[10], 活性位点与酶的催化活性密切相关。许多文献将 α -CT 选为模型酶来研究表面活性剂对球蛋白活性和稳定性的影响[11]。

2. 实验部分

2.1. 实验试剂

本实验中使用的商品试剂均为分析纯, 具体试剂详见表 1, 本实验中的季铵盐型双子(gemini 型)表面

活性剂(12-s-12, s = 2、6 和 10)按照文献的方法在本实验室制备[12], 纯度 >99.0%, 所有合成 12-s-12 所用的试剂均为分析纯。

实验中需要的磷酸盐缓冲溶液(PBS)由二次去离子水(电导率 $1.2 \times 10^{-6} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$)配制而成, 采用双重纯水蒸馏器(SZ-93, 上海亚荣生化仪器厂)蒸馏获得, 称量 $\text{NaHPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的质量分别为 1.0335 g 和 0.3301 g 定容于 500 mL 容量瓶中, 得到 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (PH = 7.3)的缓冲溶液。实验中如没有特别说明缓冲溶液的浓度, 均为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS。

Table 1. Test drugs (agents) required for the experiment
表 1. 实验所需试剂

试剂中文名称	试剂其他名称	纯度/型号	商家
α -糜蛋白酶	α -Chymotrypsin	1000 u/mg	阿拉丁
乙酸-2-萘酯	2-naphthylacetate	>98%	阿拉丁
2-萘酚	2-Naphthyl	>99%	TCI
乙二醇	ethylene glycol	分析纯	天津市天力化学试剂有限公司
十二烷基三甲基溴化铵	DTAB	>99%	阿拉丁
十二水合磷酸氢二钠	$\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
二水磷酸二氢钠	$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	分析纯	国药集团化学试剂有限公司

2.2. 实验方法

α -糜蛋白酶的活性是通过底物乙酸-2-萘酯在磷酸缓冲溶液中的水解速率进行评估测定的。通过使用 TU-1900 双光束紫外可见分光光度计得到在分解产物 2-N 在最大吸收波长(328 nm)下吸光度随时间的变化曲线, 再将其转换为 2-N 的浓度随时间的变化曲线, 由曲线初始线性部分的斜率来表征 α -CT 的活性, 具体可见图 1。

活性测量实验中, α -糜蛋白酶储备液避光保存 30 min 后使用, 底物 2-NA 溶解于乙二醇中, 同时采用超声震荡加速溶解 30 min, 由于加入的乙二醇的体积分数非常低, 为 3% ($V_{\text{乙二醇}}/V_{\text{总}}$), 并且已经有文献证明, 具有与乙二醇相似结构的甘油不会改变缓冲溶液中 α -CT 的构象[13], 因此乙二醇的存在不会影响酶活性的测量。活性测量时温度恒定为 25℃, 测定温度由低温恒温槽控制。

实验前先打开恒温槽、紫外可见分光光度计和紫外分析软件各预热 15 min, 选择时间扫描光度模式, 波长设定为 328 nm, 扫描方式选择单次扫描。实验开始前进行空气校零, 然后分别向两个 3 mL 的比色皿中加入等体积的缓冲溶液、表面活性剂溶液和 α -CT 溶液, 充分混合后放入比色皿槽内恒温避光保存 10 min, 避光放置后进行光度校零, 然后向样品池中加入 2-NA 溶液, 即可开始活性测量。

参比池除了不含有底物 2-NA 以外, 其他实验条件均与样品池相同。实验得到的 328nm 下 2-N 吸光度随时间的变化规律可以通过消光系数 $\epsilon_{328} = 1.53 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [14]处理得到 2-N 的浓度随时间的变化曲线。

3. 结果与讨论

3.1. 阳离子 Gemini 表面活性剂对 α -糜蛋白酶超活性的影响

活性实验中, α -糜蛋白酶水解底物 2-NA 生成产物 2-N, 在 328 nm 下测量 2-N 的吸光度随时间的变化, 单次扫描 10 min, 得到 2-N 吸光度随时间的变化曲线。通过 2-N 在 328 nm 下的消光系数 $\epsilon_{328} = 1.53$

$\times 10^3 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 转化为浓度随时间的变化曲线, 如图 1 所示, 再由曲线的斜率得到 α -CT 的水解速率。在表面活性剂存在下 α -CT 的水解速率除以在缓冲溶液中的速率, 即可得到相对活性。

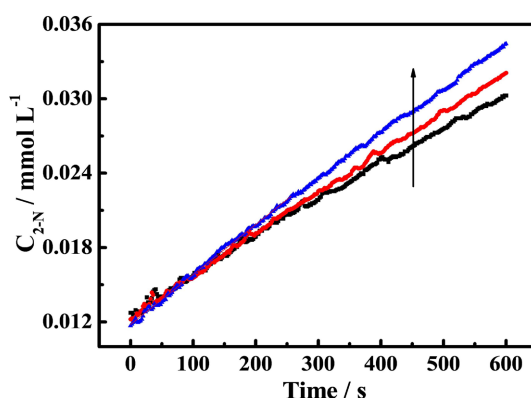


Figure 1. At 298.15 K, variation of the concentration of 2-N obtained by catalyzing substrate hydrolysis of α -CT after 10 minutes of cultivation in 12-10-12 with time, the slope of the curve represents the decomposition rate of α -CT. The 12-10-12 concentrations in the direction of the arrow in the figure are: 0.005 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.01 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.04 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 1. 在 298.15 K 时, α -CT 在 12-10-12 中培养 10 min 后催化底物水解得到产物 2-N 的浓度随时间的变化曲线, 曲线的斜率代表 α -CT 的分解速率。图中随着箭头方向 12-10-12 的浓度依次为: 0.005 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.01 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.04 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

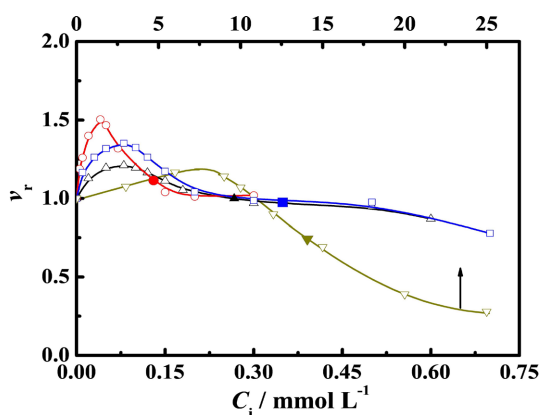


Figure 2. At 298.15 K, the enzyme was incubated 10 min in the surfactant solution before 2-NA was added to trigger the enzymatic reaction. Variation of the relative activity (v_r) of α -CT with concentration of: $\text{C}_{12}\text{C}_2\text{C}_{12}\text{Br}_2$ (Δ), $\text{C}_{12}\text{C}_6\text{C}_{12}\text{Br}_2$ ($\square$), $\text{C}_{12}\text{C}_{10}\text{C}_{12}\text{Br}_2$ ($\circ$) and DTAB (∇ , top abscissa), respectively. The solid symbols represent the cmc locations corresponding to the surfactants expressed by the open symbols with the same shapes, respectively

图 2. 在 298.15 K 时, α -CT 在表面活性剂 12-s-12 中培养 10 min 后其相对活性随着 12-s-12 浓度的变化曲线。图中实心符号分别表示各自表面活性剂对应的 cmc 位置, v_r 表示 α -CT 在表面活性剂存在下催化 2-NA 水解的初始速率与没有表面活性剂时的初始速率的比值。C_i 分别表示 12-2-12 (Δ); 12-6-12 ($\square$); 12-10-12 ($\circ$); DTAB (∇ , 顶部横坐标)

图 2 为 0.10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ α -CT 在表面活性剂 12-s-12 (s = 2、6 和 10) 或 DTAB 中培养 10 min 后水解 0.081 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2-NA 的相对活性变化曲线。结果显示, 12-s-12/ α -CT 或 DTAB/ α -CT 体系在各自低浓度区(表面

活性剂的临界胶束浓度以下)域均存在 α -CT 的超活性($v_r > 1$), 在某一浓度下达到相对活性的最大值, 之后随着表面活性剂浓度的增加, 相对活性逐渐减小。从图 2 中可以得到 12-s-12 ($s = 2, 6$ 和 10)和 DTAB 的最大相对活性, 分别为 $v_{r,max} = 1.2, 1.35, 1.5$ 和 1.2, 不难发现 α -CT 的相对活性与 gemini 表面活性剂的 spacer 长度正相关, 即随着 spacer 长度的增加, 相对活性逐渐增加, 这一现象与已有文献关于 spacer 长度对酶活性和结构的影响表现出相似性[3] [15]。这个结果同样也吻合了表面活性剂阳离子头基的疏水性或尺寸大小可以调控 α -CT 活性的结论[4] [16] [17]。

另一方面, gemini 型表面活性剂的电荷密度会随着 spacer 长度的增加而减小, 当 spacer 足够长时, 电荷密度会减小到一个比较小的值, 类似于单链的阳离子表面活性剂的电荷密度。DTAB/ α -CT 体系在这里作为对比, 因为 DTAB 的阳离子头基类似于 gemini 型表面活性剂头基的一部分, 并且 DTAB 与 α -CT 的相互作用已经被很好的研究[18]。实验中 DTAB/ α -CT 体系所得到的最大相对活性比 12-s-12/ α -CT 体系低, 说明单链的 DTAB 与含有共价连接基团的 gemini 型表面活性剂相对对 α -CT 具有不同的相互作用。

3.2. 缓冲溶液浓度对 α -糜蛋白酶活性的调控

为了进一步探究具有不同 spacer 长度的表面活性剂 12-s-12 ($s = 2, 6$ 和 10)其头基的电荷密度对 α -CT 活性的影响, 我们尝试通过部分中和表面活性剂头基的电荷来改变头基的电荷密度, 即引入无机盐反离子或带负电的表面活性剂。PH = 7.3 的磷酸盐缓冲溶液, 应用于所有的细胞质中, 其中 $H_2PO_4^-$ 作为质子供体, HPO_4^{2-} 作为质子受体:



并与阳离子表面活性剂能达到同时平衡:



在这个体系中, 我们直接忽略阳离子表面活性剂与 $H_2PO_4^-$ 的相互作用。公式(2)中描述的反应可以通过由缓冲溶液配制的表面活性剂溶液滴入相应浓度的缓冲溶液的电导率的变化来证实, 如图 3, 当增大缓冲溶液浓度时, 磷酸根阴离子与阳离子表面活性剂之间的静电作用增强, 导致表面活性剂的电导率值先减小后增加, 同时也进一步说明增大缓冲溶液浓度是可以削弱表面活性剂头基的电荷密度的。

图 4 为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ α -CT 在表面活性剂存在下的相对活性随缓冲溶液浓度的变化曲线。对于 12-s-12/ α -CT 体系, 其最大相对活性所对应的缓冲溶液浓度与 12-s-12 的 spacer 长度有关, 即 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别对应于 12-10-12, 12-6-12 和 12-2-12, 这一规律与表面活性剂头基电荷密度的增加顺序一致。作为对比的 DTAB/ α -CT 体系, 在缓冲溶液浓度达到 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时出现 α -CT 的最大相对活性。

从这个结果, 我们可以认为 12-s-12 头基电荷密度的削弱在一定程度上有利于激活 α -CT, 具有较短间隔链长度的表面活性剂, 或者说, 具有较大电荷密度的表面活性剂在较高浓度缓冲溶液的调控下更有利于得到较高的相对活性。具有不同 spacer 长度的表面活性剂对 α -CT 活性具有不同的影响也可以从头基的尺寸以及疏水性来解释[4] [16], 即表面活性剂头基的尺寸越大, 头基的电荷密度相对越低, 导致表面活性剂与 α -CT 之间的静电作用越弱。

另一方面, 对于表面活性剂头基的疏水作用似乎是不确定的, 因为我们还不能证明疏水的亚甲基间隔链是否插入了酶的疏水区域。如果我们假设连接两个头基的 spacer 与 α -CT 负电荷周围的疏水残基间的疏水作用是明显的, 那么这就会缩短带正电的表面活性剂与带负电的 α -CT 之间的距离, 从而增强它们之间的静电作用, 但这将与之前讨论的电荷密度影响或头基的尺寸效应等结论相互矛盾。

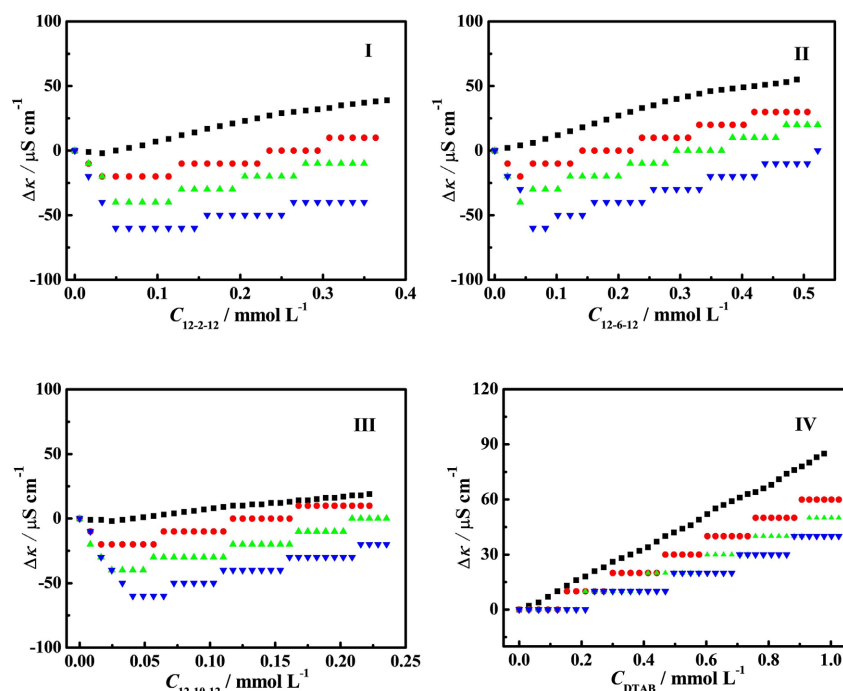


Figure 3. Variation of the conductivity ($\Delta\kappa$) of: (I) $C_{12}C_2C_{12}Br_2$, (II) $C_{12}C_6C_{12}Br_2$, (III) $C_{12}C_{10}C_{12}Br_2$ and (IV) DTAB with concentration of phosphate buffer at 298.15 K. The different symbols in the figure represent the concentrations of buffer solutions respectively: (■) 10 $mmol\cdot L^{-1}$; (●) 30 $mmol\cdot L^{-1}$; (▲) 50 $mmol\cdot L^{-1}$; (▼) 70 $mmol\cdot L^{-1}$. The pH value of all the buffer solution with different concentration is 7.3

图 3. 在 298.15 K 时, 四种阳离子表面活性剂的电导率值随着缓冲溶液浓度的变化曲线: (I) 12-2-12; (II) 12-6-12; (III) 12-10-12; (IV) DTAB。图内不同的符号分别表示缓冲溶液的浓度: (■) 10 $mmol\cdot L^{-1}$; (●) 30 $mmol\cdot L^{-1}$; (▲) 50 $mmol\cdot L^{-1}$; (▼) 70 $mmol\cdot L^{-1}$ 。所有浓度缓冲溶液 PH = 7.3

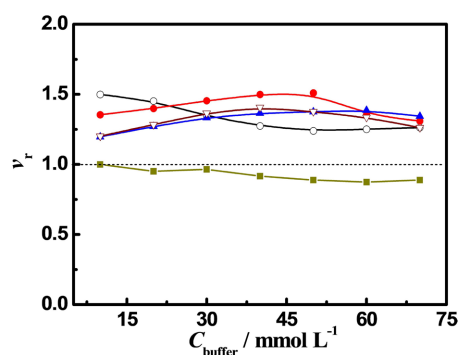


Figure 4. At 298.15 K, variation of the relative activity (v_r) of 0.10 $g\cdot L^{-1}$ α -CT with concentration of phosphate buffer. The symbols indicate the surfactants: (▲) $C_{12}C_2C_{12}Br_2$ of 0.07 $mmol\cdot L^{-1}$, (●) $C_{12}C_6C_{12}Br_2$ of 0.08 $mmol\cdot L^{-1}$, (○) $C_{12}C_{10}C_{12}Br_2$ of 0.04 $mmol\cdot L^{-1}$, (▽) DTAB of 6 $mmol\cdot L^{-1}$ and (■) pure phosphate buffer, respectively. The concentrations of the other components were constant 0.081 $mmol\cdot L^{-1}$ 2-NA and 3(v/v)% glycol, respectively. The incubation time of α -CT was 10 minutes before 2-NA was added in all the experiments

图 4. 在 298.15 K 时, 0.10 $g\cdot L^{-1}$ α -CT 的相对活性随着缓冲溶液浓度的变化曲线。不同符号分别表示: (▲) 0.07 $mmol\cdot L^{-1}$ 的 12-2-12, (●) 0.08 $mmol\cdot L^{-1}$ 的 12-6-12, (○) 0.04 $mmol\cdot L^{-1}$ 的 12-10-12, (▽) 6 $mmol\cdot L^{-1}$ 的 DTAB 以及 (■) 缓冲溶液。实验中, 底物 2-NA 的浓度为 0.081 $mmol\cdot L^{-1}$, 乙二醇的含量为 3% (v/v), 所有实验的培养时间均为 10 min

为了进一步确认 α -CT 相对活性随着缓冲溶液浓度的变化主要来源于表面活性剂电荷密度的改变而不是简单地 PBS 影响, 我们做了 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ α -CT 在纯磷酸盐缓冲溶液中的活性(见图 4, 虚线以下)。 α -CT 在 $10 \sim 70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的缓冲溶液中的相对活性总体变化不大, 其中相对活性最低达到 90%, 说明高浓度的磷酸缓冲溶液本身对 α -CT 的活性仅有微弱的影响。

4. 结语

12-s-12/ α -CT ($s = 2, 6$ 和 10)或 DTAB/ α -CT 体系在各自低浓度(临界胶束浓度以下)区域均存在 α -CT 的超活性($V_r > 1$), 其中 12-s-12 ($s = 2, 6$ 和 10)的催化效果比单链 DTAB 要好。 α -CT 相对活性的大小与 gemini 型表面活性剂的间隔链长度有关, 即 spacer 越长, 头基的电荷密度相对越小, 超活性出现得越早而且最大相对活性值也越高。通过改变磷酸盐缓冲液的浓度来调控 α -CT 活性。磷酸盐抗衡离子与表面活性剂阳离子之间的非共价静电缔合会降低表面活性剂头基的平均电荷密度, 因此将会改变表面活性剂对 α -CT 相对活性的影响。

参考文献

- [1] 陈潇濛. 碱性脂肪酶与表面活性剂相互作用研究[J]. 化工设计通讯, 2023, 49(2): 63-65.
- [2] Mondal, S., Das, S. and Ghosh, S. (2015) Interaction of Myoglobin with Cationic Gemini Surfactants in Phosphate Buffer at pH 7.4. *Journal of Surfactants and Detergents*, **18**, 471-476. <https://doi.org/10.1007/s11743-015-1680-z>
- [3] Verma, S.K., Ghritlahre, B.K., Ghosh, K.K., Verma, R., Verma, S. and Zhao, X. (2016) Influence of Amine-Based Cationic Gemini Surfactants on Catalytic Activity of α -Chymotrypsin. *International Journal of Chemical Kinetics*, **48**, 779-784. <https://doi.org/10.1002/kin.21032>
- [4] Spreti, N., Alfani, F., Cantarella, M., D'Amico, F., Germani, R. and Savelli, G. (1999) α -Chymotrypsin Superactivity in Aqueous Solutions of Cationic Surfactants. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **6**, 99-110. [https://doi.org/10.1016/s1381-1177\(98\)00139-8](https://doi.org/10.1016/s1381-1177(98)00139-8)
- [5] 白光月, 刘君玲, 王九霞, 等. 阳离子双子表面活性剂诱导的 α -CT 超活性和构象变化(英文) [J]. 物理化学学报, 2017, 33(5): 976-983.
- [6] Fersht, A. (1985) *Enzyme: Structure and Mechanism*. 2nd Edition, W.H. Freeman.
- [7] Creagh, A.L., Prausnitz, J.M. and Blanch, H.W. (1993) The Effect of Aqueous Surfactant Solutions on Alcohol Dehydrogenase (LADH). *Biotechnology and Bioengineering*, **41**, 156-161. <https://doi.org/10.1002/bit.260410120>
- [8] Hamill, A.C., Wang, S. and Lee, C.T. (2007) Solution Structure of an Amyloid-Forming Protein during Photoinitiated Hexamer-Dodecamer Transitions Revealed through Small-Angle Neutron Scattering. *Biochemistry*, **46**, 7694-7705. <https://doi.org/10.1021/bi700233k>
- [9] Celej, M.S., D'andrea, M.G., Campana, P.T., Fidelio, G.D. and Bianconi, M.L. (2004) Superactivity and Conformational Changes on Alpha-Chymotrypsin Upon Interfacial Binding to Cationic Micelles. *Biochemical Journal*, **378**, 1059-1066. <https://doi.org/10.1042/bj20031536>
- [10] Verma, S.K. and Ghosh, K.K. (2011) Effect of Cationic Surfactants on the Enzymatic Activity of α -Chymotrypsin. *Kinetics and Catalysis*, **52**, 6-10. <https://doi.org/10.1134/s0023158411010216>
- [11] 孙怡, 周伟, 张晋菲, 等. 表面活性剂和 pH 值对脂肪酶活力稳定性的影响[J]. 精细石油化工, 2024, 41(3): 26-28.
- [12] Wang, Y., Bai, G., Marques, E.F. and Yan, H. (2006) Phase Behavior and Thermodynamics of a Mixture of Cationic Gemini and Anionic Surfactant. *The Journal of Physical Chemistry B*, **110**, 5294-5300. <https://doi.org/10.1021/jp054323z>
- [13] Castro, G.R. (2000) Properties of Soluble α -Chymotrypsin in Neat Glycerol and Water. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 143-150. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(00\)00197-6](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(00)00197-6)
- [14] Abuin, E., Lissi, E. and Duarte, R. (2004) Distinct Effect of a Cationic Surfactant on the Transient and Steady State Phases of 2-Naphthyl Acetate Hydrolysis Catalyzed by α -Chymotrypsin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **31**, 83-85. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.07.009>
- [15] Valiullina, Y.A., Ermakova, E.A., Faizullin, D.A., Mirgorodskaya, A.B. and Zuev, Y.F. (2014) Structure and Catalytic Activity of α -Chymotrypsin in Solutions of Gemini Surfactants. *Russian Chemical Bulletin*, **63**, 273-279. <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0423-z>

- [16] Alfani, F., Cantarella, M., Spreti, N., Germani, R. and Savelli, G. (2000) α -Chymotrypsin Superactivity in Cetyltrimethylammonium Bromide-Rich Media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **88**, 1-16.
<https://doi.org/10.1385/abab:88:1-3:001>
- [17] Ghosh, K.K. and Verma, S.K. (2009) Effects of Head Group of Cationic Surfactants on the Hydrolysis of p-Nitrophenyl Acetate Catalyzed by α -chymotrypsin. *International Journal of Chemical Kinetics*, **41**, 377-381.
<https://doi.org/10.1002/kin.20408>
- [18] Savelli, G., Spreti, N. and Di Profio, P. (2000) Enzyme Activity and Stability Control by Amphiphilic Self-Organizing Systems in Aqueous Solutions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **5**, 111-117.
[https://doi.org/10.1016/s1359-0294\(00\)00043-1](https://doi.org/10.1016/s1359-0294(00)00043-1)