

УДК 612.124.017:577.15

ИССЛЕДОВАНИЕ ЩЕЛОЧНОГО И ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА *n*-НИТРОФЕНИЛАЦЕТАТА В ПЕРКОЛИРУЮЩЕЙ МИКРОЭМУЛЬСИИ ВОДА – МАСЛО НА ОСНОВЕ АОТ

Н. Л. Захарченко^{1*}, Е. А. Ступишина¹, Ю. Ф. Зуев¹, В. Д. Федотов¹, А. Б. Миргородская²

¹Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, 420503, Казань, Лобачевского, 2/31; факс: (7-8432) 38-75-77; e-mail: zakhartchenko@sci.kcn.ru; ²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН, 420088 Казань, Арбузова 8; факс: (7-8432) 75-22-53; e-mail: vos@iopc.kcn.ru)

Растворы обращенных мицелл и микроэмульсии в последнее время все чаще используют в качестве систем, моделирующих действие биокатализаторов в живой клетке. Изменение таких параметров, как температура, содержание воды, ионная сила раствора, влияет на структуру и физико-химические свойства мицелл, а также предположительно на кинетику химических реакций, протекающих в них. В свете этого были проведены реакции ферментативного и щелочного гидролиза амфифильного субстрата *n*-нитрофенилацетата в микроэмульсии вода – масло на основе Аэрозоля ОТ в условиях кластеризации обращенных мицелл. Было обнаружено влияние структурных свойств исследуемых микроэмульсий на кинетические параметры реакций. Изменения структуры микроэмульсий контролировали с помощью методов ЯМР-самодиффузии и электропроводности.

Катализ химических реакций в организованных средах (мицеллах, микроэмульсиях, жидких кристаллах) привлекает широкое внимание исследователей [1, 2]. Обратные мицеллярные системы (например, микроэмульсии вода в масле) используются в качестве объектов, моделирующих механизм действия биокатализаторов [3]. Наиболее типичным анионным поверхностно-активным веществом (ПАВ), способным к образованию обратных мицеллярных агрегатов без добавок со-ПАВ, является бис(2-этилгексил)сульфосукцинат натрия (АОТ). Структура и физико-химические свойства обратных мицеллярных систем зависят от ряда параметров, таких, как температура, содержание воды, ионная сила раствора [4]. Хотя псевдофазная модель мицеллярного катализа [5] не учитывает геометрию частиц, логично предположить, что изменение указанных параметров и сопутствующая ему модификация агрегатов будут оказывать влияние на химические реакции, протекающие в мицеллах. В обратных мицеллах на основе АОТ с повышением температуры наблюдается так называемый феномен перколяции [6], обусловленный образованием кластеров в мицеллярной системе, появление которых может существенно отразиться на кинетических параметрах реакций.

Ранее при изучении кинетики щелочного гидролиза *O*-этил-*O*-*n*-нитрофенилхлорметилфосфоната в обратной мицеллярной системе АОТ – декан – вода авторами [7] было показано изменение реакционной способности субстрата выше порога перколяции [8, 9].

Целью настоящей работы является выяснение наличия аналогичной зависимости для щелочного и ферментативного гидролиза *n*-нитрофенилацетата (ПНФА) в обратной мицеллярной системе АОТ – декан – вода до и после порога перколяции.

Методы исследования

В качестве реакционной среды была выбрана микроэмульсия вода – масло, представляющая собой дисперсию водных микрокапель, стабилизированную монослоем АОТ в декане. Концентрация АОТ ($C_{АОТ}$) составляла 0,42 М, молярное отношение воды к ПАВ (W_0) – 20.

Данные о структуре микроэмульсии получали с помощью метода N^1 ЯМР с Фурье-преобразованием и импульсным градиентом магнитного поля. Диффузионные измерения выполняли с помощью модифицированного ЯМР спектрометра «TESLA BS-587A» на частоте резонанса протонов 80 МГц. Значение импульсного градиента магнитного поля достигало 50 Гс/см. Измерения электропроводности проводили на приборе ОК 102/1 («Radelkis», Венгрия) с измерительной частотой 80 Гц и 3 кГц. Исследования выполняли в интервале температур 10–60°.

Кинетические измерения гидролиза ПНФА проводили на спектрофотометре «UV-VIS SPECORD M40» в термостатируемой кювете с толщиной поглощающего слоя 1 см в интервале от 19 до 57°. За протеканием процесса следили по изменению оптической плотности растворов при длине волны 412 нм (образование *n*-нитрофенолят-аниона). Щелочной гидролиз проводили в условиях псевдопервого порядка: концентрация NaOH в водной фазе составляла 0,05–0,2 М, исходная концентрация ПНФА – $4 \cdot 10^{-5}$ М.

Ферментативный гидролиз ПНФА трипсином протекал в буферном растворе (0,1 М Трис – HCl; pH 8,1). Субстрат вносили в микроэмульсию в спиртовом растворе. Концентрация этанола в водной фазе микроэмульсии составляла 1%. По данным авторов [10] этанол такой концентрации не оказывает заметного влияния на каталитическую активность фермента. При определении максимальной скорости реакции ($V_{макс}$) и константы Михаэлиса (K_M) [11] использовали преобразование Лайнуивера–Берка и метод наименьших квадратов.

Поскольку трипсин является гидрофильным белком, то для расчета каталитической константы скорости реакции $k_{кат} = V_{макс} / E_0$ [11] начальную концентрацию фермента (E_0) оценивали на водный пул микроэмульсии (она составила $2,5 \cdot 10^{-5}$ М), а начальные концентрации субстрата (S_0) рассчитывали на весь объем микроэмульсии (вследствие амфифильности свойств ПНФА) и варьировали от $5 \cdot 10^{-4}$ до $23 \cdot 10^{-4}$ М.

Результаты исследования

На спектре N^1 ЯМР исследуемой микроэмульсии можно выделить три основные линии: отдельная линия воды (4,50 м.д.) и две близлежащие линии –CH₂– и –CH₃ (1,24 и 0,84 м.д. соответственно), в которые дают вклад сигналы от протонов АОТ и декана. Были получены коэффициен-

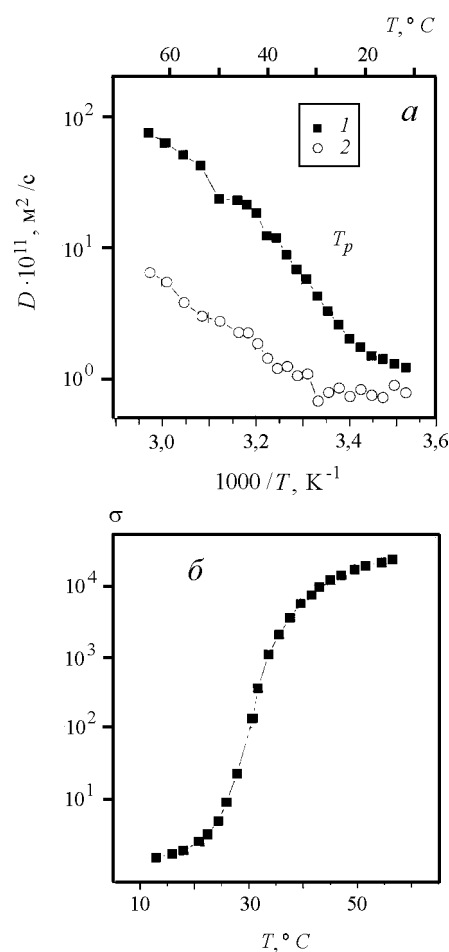


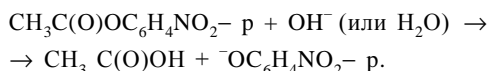
Рис. 1. Зависимость: а – коэффициентов самодиффузии воды и АОТ от температуры в обратной микроэмульсии АОТ – вода – декан ($C_{АОТ} = 0,42$ М, $W_0 = 20$); б – электропроводности микроэмульсии от температуры

ты самодиффузии (КСД) для каждой из компонент микроэмульсии. Температурная зависимость КСД воды и АОТ представлена на рис. 1, *a*. Дисперсионная среда (декан) характеризуется КСД, порядок величины которого 10^{-9} м²/с. Температурная зависимость КСД дисперсионной среды слабо отличается от чистого декана и здесь не приведена.

Среди особенностей диффузионного поведения компонент микроэмульсии можно отметить то, что КСД воды и АОТ имеют близкие значения в области низких температур. С ростом температуры наблюдается резкое увеличение КСД воды и АОТ, причем их температурная зависимость имеет характерный S-образный вид.

Исследуемая микроэмульсия была использована как среда для проведения щелочного и ферментативного гидролиза ПНФА.

В одном случае в качестве нуклеофила выступает гидроксид-ион, во втором – вода, действие которой катализируется присутствием гидролитического фермента трипсина (на приведенной ниже схеме опущены стадии, характерные для ферментативного процесса: образование фермент-субстратного комплекса, ацилирование фермента и последующее деацилирование):



В условиях стационарной кинетики получены наблюдаемая константа скорости первого порядка k_{obs} процесса щелочного гидролиза, а также каталитическая константа и константа Михаэлиса–Ментен, характеризующие ферментативные процессы. Линейность зависимости наблюдаемой константы скорости гидролиза ПНФА от концентрации щелочи (при концентрациях NaOH, равных 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 М, константа k_{obs} составляет 0,0017; 0,007; 0,0132; 0,0207 с⁻¹ соответственно) свидетельствует о том, согласно [12], что именно химическое взаимодействие, а не переход эфира из органической фазы к границе раздела фаз определяет скорость процесса. На рис. 2, *a* представлена зависимость каталитической константы ($k_{\text{кат}}$) от температуры при ферментативном гидролизе ПНФА, а на рис. 2, *б* – зависимость k_{obs} от температуры для щелочного гидролиза ПНФА в системе аррениусовских координат.

Обсуждение результатов

Диффузионное поведение компонент микроэмульсии можно объяснить с точки зрения процесса кластеризации микрокапель [8, 9]. Известно, что с увеличением температуры или объемной доли дисперсной фазы θ в микроэмульсиях вода – масло на основе АОТ наблюдается процесс агрегации микрокапель в кластеры. Этот процесс, с одной стороны, резко увеличивает скорость обмена обратных мицелл своим содержимым, а с другой – уменьшает их площадь контакта с органической средой. Наиболее явно процесс агрегации обратных мицелл проявляется в электропроводности микроэмульсии (σ) (рис. 1, *б*) и связан с явлением электрической перколяции, при этом точка максимальной крутизны T_p на температурной зави-

симости σ соответствует образованию в системе первого «бесконечного» кластера.

С ростом температуры КСД воды растет, так как решающим становится вклад диффузии по водным каналам в пределах кластеров. При этом появляется путь для движения противоионов натрия, что проявляется в резком увеличении электропроводности микроэмульсии. Точки перегиба на зависимостях D и σ достаточно хорошо совпадают и дают температуру образования первого «бесконечного» кластера вблизи $T = 31,5^\circ$. Кроме того, образование трехмерной кластерной структуры из микрокапель, соединенных водными каналами, ведет также к росту КСД молекул АОТ. В этом случае решающим становится вклад диффузии молекул АОТ по поверхности кластеров.

Детергентные микроэмульсии, являясь оптически прозрачными и макроскопически однородными, обладают микрогетерогенностью. В их составе можно выделить три микрообласти (водное ядро, поверхностный слой и масля-

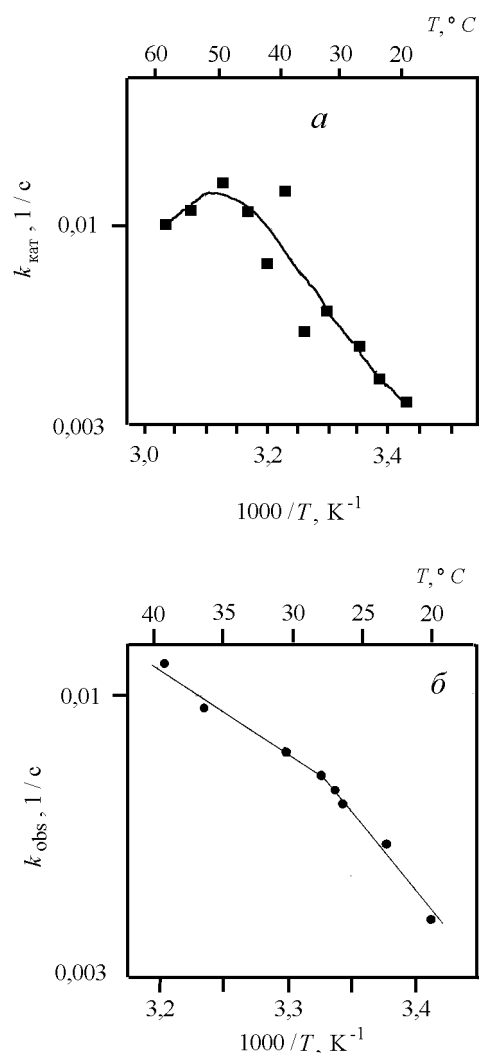


Рис. 2. Зависимость: *a* – отношения каталитической константы к константе Михаэлиса для реакции ферментативного гидролиза ПНФА трипсином от температуры для обратной микроэмульсии АОТ – вода – декан ($C_{\text{АОТ}} = 0,42$ М, $W_0 = 20$); *б* – наблюдаемой константы скорости щелочного гидролиза ПНФ 0,1 н. раствором NaOH от температуры для той же микроэмульсии

**Константы Михаэлиса для гидролиза ПНФА трипсином в микроэмульсии вода – масло
($W = 20$, $C_{AOT} = 0,42$) в исследуемом диапазоне температур**

$T, ^\circ\text{C}$	19	23	26	30,5	34	37	40	43	49	55	57
$K_m \cdot 10^3, \text{M}$	7,58	5,41	5,73	4,33	4,41	5,50	4,18	6,39	4,62	3,40	4,10

Примечание. В водном буферном растворе при $T = 25^\circ$ и pH 7,5 $k_{\text{кат}} = 9,5 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, $K_M = (30 + 6) \cdot 10^{-6} \text{ M}$ [14].

ная фаза), каждая из которых характеризуется специфическими свойствами. При использовании микроэмульсий в качестве реакционной среды скорость химических процессов, протекающих в ней, будет определяться локализацией реагентов и свойствами микроокружения. ПНФА хотя и является амфифильным соединением, распределен главным образом в масляной фазе и в поверхностном слое (коэффициент распределения между углеводородом и водой равен 10,8 [13]). Второй реагент (высокогидрофильный гидроксид-ион или трипсин) сконцентрирован в водном пуле. Следовательно, можно предположить, что реакция будет происходить на границе раздела фаз, и площадь контакта будет определять скорость химического процесса.

При обсуждении кинетики щелочного гидролиза ПНФА следует принимать во внимание, что отрицательный заряд головных групп АОТ препятствует концентрированию гидроксид-иона на поверхности раздела фаз, что приводит к замедлению в ~200 раз по сравнению с водными растворами щелочи той же концентрации.

Изменение структуры микроэмульсии в результате кластерообразования может привести к изменению структуры поверхностного слоя мицелл. Логично предположить, что это отразится на кинетических параметрах реакции щелочного гидролиза ПНФА. На рис. 2, б показано, что в области кластерообразования меняется наклон аррениусовской зависимости наблюдаемой константы скорости реакции (k_{obs}) изучаемого процесса. Температурный рост скорости реакции расщепления ПНФА снижается при $T > 27^\circ$, т.е. вблизи порога перколяции ($T = 31,5^\circ$). Подобное поведение наблюдалось авторами ранее для О-этил-О-*n*-нитрофенилхлорметилфосфоната в той же системе на основе АОТ [7]. Изменения в скоростях реакции могут быть связаны с уменьшением площади межфазной поверхнос-

ти и с изменением свойств поверхностного слоя АОТ, вызванного кластерообразованием. В случае ферментативного гидролиза ПНФА прежде всего следует отметить отличия в каталитической активности трипсина в исследуемой микроэмульсии по сравнению с водой. Изменения претерпевает главным образом константа Михаэлиса (увеличение в микроэмульсии приблизительно на 2 порядка), зависящая от распределения субстрата в системе обращенных мицелл. Температура практически не влияет на K_M (таблица). Величина $k_{\text{кат}}$, отражающая реакционную способность фермента и связанная с его состоянием в мицелле, при 25° оказывается величиной одного порядка для микроэмульсий и для водных растворов (примечание). Значение этого параметра растет по мере роста температуры в соответствии с уравнением Аррениуса, явных изменений наклона зависимости $\lg k_{\text{кат}} = f(1/T)$ вблизи порога перколяции обнаружено не было (рис. 2, а). Вероятно, из-за того, что ПНФА не является специфическим субстратом в отношении трипсина, в этом процессе не удастся уловить изменения активности фермента, связанные с влиянием среды при переходе от воды к обратным мицеллам или вызванных перестройкой межфазного слоя при кластерообразовании. При $T > 35^\circ$ наблюдается температурный оптимум активности трипсина, что согласуется с литературными данными [15].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что кластеризация обращенных мицелл оказывает заметное влияние на скорость щелочного гидролиза ПНФА. В случае ферментативного гидролиза этого субстрата такого влияния не было обнаружено. Различия реакционного поведения субстрата отражает, по-видимому, разную чувствительность реагентов к изменению их локализации и микроокружения, вызванному структурными перестройками микроагрегатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левашов А.В., Клячко Н.Л., Мартинек К. // Биоорган. химия. 1981. **5**. С. 670.
2. Миргородская А.Б., Кудрявцева Л.А., Иванов Б.Е. // Изв. АН, сер. хим. 1996. С. 336.
3. Мартинек К., Левашов А.В., Хмельницкий Ю.А., Клячко Н.Л. / Физико-химические проблемы ферментативного катализа. М., 1984. С. 18.
4. Leodidis E.B., Hatton T.A. // Langmuir. 1989. **5**. P. 741.
5. Garcia-Rio L., Leis J.R., Pena M.E., Iglesias E // J. Phys. Chem. 1993. **97**. P. 3437.
6. Mays H. // J. Phys. Chem. 1997. **101** P. 10271.
7. Zakharova L.Y., Valeeva F.G., Kudryavtseva L.A., Zakhartchenko N.L., Zuev Y.F. // Mendeleev Commun. 1998. **6**. P. 207.
8. Alexandridis P., Holzwarth J.F., Hatton T.A. // J. Phys. Chem. 1995. **99**. P. 8222.
9. Feldman Y., Kozlovich N., Alexandrov Y., Nigmatullin R., Ryabov Y. // Phys. Rev. 1996. **54**. P. 5420.
10. Гладилин А.К., Левашов А.В. // Биохимия. 1998. **63**. P. 408.
11. Ферит Э. // Структура и механизм действия ферментов. М., 1980.
12. Menger F.M., Donohue J.A., Williams R.F. // J. Am. Chem. Soc. 1973. **95**. P. 286.
13. Bhattacharya S., Senhalatha K. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1996. **2**. P. 2021.
14. Клесов А.А., Федосеев В.Н., Куппет О.Г. // Биохимия. 1977. **42**. С. 1939.
15. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М., 1969.