



УДК 577.152.1.04+661.185.223

**КИНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ
В СИСТЕМАХ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ: ПРИМЕНЕНИЕ
ПСЕВДОФАЗНОГО ПОДХОДА ДЛЯ СЛУЧАЯ СУБСТРАТОВ,
СПОСОБНЫХ РАСПРЕДЕЛЯТЬСЯ МЕЖДУ ВСЕМИ ФАЗАМИ
МИЦЕЛЛЯРНОЙ СИСТЕМЫ**

Хмельницкий Ю. Л., Неверова И. Н., Поляков В. И.**,
Гринберг В. Я.**, Левашов А. В.**, Мартинек К.****

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва;

** Кафедра химической энзимологии Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова;*

*** Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР,
Москва;*

**** Институт органической химии и биохимии ЧСАН, Прага*

Предложена кинетическая теория ферментативных реакций, протекающих в системах обращенных мицелл поверхностно-активных веществ в органических растворителях с участием субстратов, способных распределяться между всеми псевдофазными мицеллярной системы — водными ядрами мицелл, мицеллярной мембраной и органическим растворителем. Данная теория позволяет определить истинные (относящиеся только к водной псевдофазе, где расположен солиобилизованный фермент) каталитические параметры фермента, если известны коэффициенты распределения субстрата между псевдофазами. Применимость теории продемонстрирована на примере катализируемой алкогольдегидрогеназой реакции окисления алифатических спиртов в системе обращенных мицелл Аэрозоля ОТ в октане. Для определения коэффициентов распределения спиртовых субстратов между фазами мицеллярной системы использован метод проточной калориметрии. Показано, что в первом приближении в качестве оценки коэффициента распределения субстрата между водной псевдофазой и псевдофазой органического растворителя можно использовать коэффициент распределения этого субстрата в простой двухфазной системе, состоящей из воды и органического растворителя, используемого для получения мицеллярной системы. Истинные значения константы Михаэлиса для спиртовых субстратов алкогольдегидрогеназы в мицеллярной системе, определенные с помощью предложенного подхода, близки к наблюдаемым в водном растворе и отличаются от кажущихся значений, отнесенных ко всему объему системы. На основании полученных данных показано, что обнаруженный ранее сдвиг субстратной специфичности алкогольдегидрогеназы при переходе от водного раствора к системе обращенных мицелл Аэрозоля ОТ в октане является кажущимся и обусловлен эффектами распределения спиртовых субстратов между псевдофазами мицеллярной системы.

В последнее время все более широкое распространение получает мицеллярная энзимология, которая изучает действие ферментов в системах обращенных мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ) в органических растворителях с низким содержанием воды [1—4]. При кинетическом анализе ферментативных реакций в таких системах могут возникнуть затруднения, связанные с тем, что мицеллярная среда носит резко выраженный микрогетерогенный характер: она представляет собой взвесь мелких (диаметром до 10^3 А) водных капель, стабилизированных ПАВ, в органическом растворителе. При этом фермент локализуется только внутри этих капель (мицелл), тогда как субстрат может быть распределен по всему объему системы. Очевидно, что это обстоятельство необходимо учитывать при кинетическом анализе. Для учета распределения субстрата

Принятые сокращения: ПАВ — поверхностно-активные вещества, АОТ — Аэрозоль ОТ.

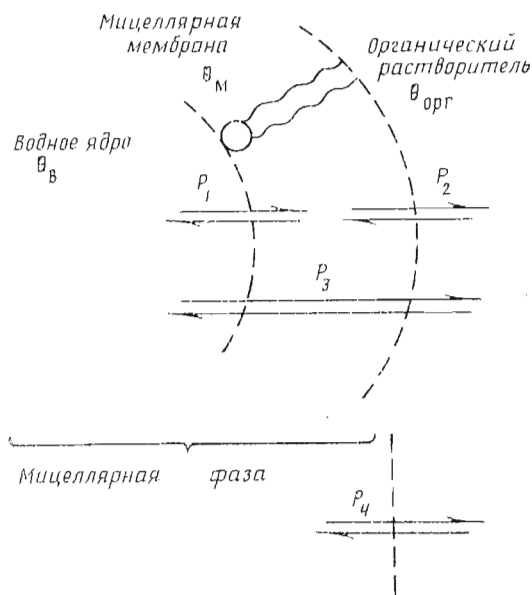


Рис. 1. Схема распределения субстрата ферментативной реакции в системе гидратированных обращенных мицелл. Обозначения см. в тексте

может быть использован псевдофазный подход, согласно которому мицеллярная система состоит из двух «фаз»: фазы органического растворителя и псевдофазы мицелл. Псевдофазный подход был успешно использован для описания кинетики неферментативных реакций в мицеллярных системах [5], а также ферментативных реакций в системах обращенных мицелл [6–9]. Однако представление о мицеллярном растворе как о псевдодвухфазной системе в значительной мере упрощено, поскольку псевдофаза гидратированных обращенных мицелл в действительности не однородна, а включает в себя две псевдофазы, образованные совокупностью водных ядер гидратированных обращенных мицелл и мицеллярных мембран. Поэтому в общем случае необходимо учитывать возможность распределения субстрата по трем состояниям: внутри водной полости гидратированных обращенных мицелл, в мицеллярной мембране и в органическом растворителе. Настоящая работа представляет собой попытку сформулировать кинетическую теорию ферментативных реакций в системах обращенных мицелл с участием субстрата, способного распределяться между всеми этими состояниями.

Кинетическая модель

В рамках предлагаемой модели система гидратированных обращенных мицелл рассматривается как система, состоящая из трех фаз (рис. 1): фазы мицеллярной воды, образованной совокупностью сольоблизованных внутри обращенных мицелл водных микрокапель, фазы мицеллярной мембраны и фазы органического растворителя. Субстрат ферментативной реакции, протекающей в такой системе, может распределяться по всем трем фазам, причем соотношение концентраций субстрата в различных фазах задается соответствующими коэффициентами распределения:

$$P_1 = [S]_m / [S]_v, \quad (1)$$

$$P_2 = [S]_{орг} / [S]_m, \quad (2)$$

$$P_3 = [S]_{орг} / [S]_v, \quad (3)$$

где индексы «в», «м», «орг» — фазы мицеллярной воды, мицеллярной мембраны и органического растворителя. Коэффициент распределения субстрата между совокупной мицеллярной фазой (включающей как мицел-

лярную воду, так и мицеллярную мембрану) и органическим растворителем описывается выражением

$$P_4 = \frac{[S]_в \frac{\Theta_в}{\Theta_в + \Theta_м} + [S]_м \frac{\Theta_м}{\Theta_в + \Theta_м}}{[S]_{орг}} = \frac{\Theta_в + P_1 \Theta_м}{P_3 (\Theta_в + \Theta_м)}, \quad (4)$$

где $\Theta_в$ и $\Theta_м$ — объемные доли фаз мицеллярной воды и мицеллярной мембраны.

Что касается фермента, то он не распределяется между фазами, а находится целиком внутри фазы мицеллярной воды [6, 7]. В этом случае для образования фермент-субстратного комплекса молекула субстрата должна полностью покинуть фазу мицеллярной мембраны или органического растворителя. С точки зрения формального описания это означает, что фермент проявляет каталитическую активность только по отношению к субстрату, находящемуся в водной фазе. Тогда начальную скорость ферментативной реакции, отнесенную к объему всей системы, можно выразить следующим образом:

$$v = \frac{k_{кат, в} [E]_{0, в} [S]_{0, в}}{K_{м, в} + [S]_{0, в}} \cdot \Theta_в. \quad (5)$$

Уравнения материального баланса имеют вид:

$$[S]_{0, общ} = [S]_{0, в} \Theta_в + [S]_{0, м} \Theta_м + [S]_{0, орг} \Theta_{орг}, \quad (6)$$

где $\Theta_{орг}$ — объемная доля фазы органического растворителя, и

$$[E]_{0, общ} = [E]_{0, в} \Theta_в. \quad (7)$$

Подставляя уравнения (1)–(3), (6) и (7) в уравнение (5) получим

$$v = \frac{k_{кат(наж)} [E]_{0, общ} [S]_{0, общ}}{K_{м(наж)} + [S]_{0, общ}}, \quad (8)$$

где

$$k_{кат(наж)} = k_{кат, в}, \quad (9)$$

$$K_{м(наж)} = K_{м, в} (\Theta_в + P_1 \Theta_м + P_3 \Theta_{орг}). \quad (10)$$

Из уравнения (9) следует, что величина наблюдаемой каталитической константы ($k_{кат(наж)}$) не испытывает влияния эффектов распределения субстрата и является параметром, характеризующим истинные каталитические свойства фермента, находящегося внутри обращенной мицеллы. Что касается наблюдаемой константы Михаэлиса, то, как видно из уравнения (10), ее величина может значительно отличаться от истинного значения ($K_{м, в}$) вследствие эффектов распределения субстрата. Для определения этого истинного значения необходимо знать коэффициенты распределения субстрата между различными фазами, имеющимися в системе.

В частном случае водорастворимого субстрата, который концентрируется исключительно в водной фазе, так что $P_1 = P_3 = 0$, соотношение (10) принимает вид

$$K_{м(наж)} = K_{м, в} \Theta_в. \quad (11)$$

Последнее выражение совпадает с уравнением для константы Михаэлиса для гидрофильных субстратов, полученных нами ранее [6, 7] в рамках простейшей модели, без учета распределения субстрата между фазами мицеллярной системы.

Применение модели для описания кинетики действия алкогольдегидрогеназы в системе обращенных мицелл Аэрозоль ОТ (АОТ) в октане

Выбор системы. Удобной модельной реакцией для проверки предложенного подхода является катализируемое алкогольдегидрогеназой окисление алифатических спиртов, поскольку спиртовые субстраты образуют

Коэффициенты распределения (М/М) алифатических спиртов между фазами в системе гидратированных ($w=29$) обращенных мицелл АОТ в октане

Спирт	P_1^*	P_2	P_3	P_4	P^{**}
Этанол	0,14	0,378	0,053	12,8	0,0066
<i>n</i> -Бутанол	1,5	0,115	0,173	6,7	0,164
<i>n</i> -Гексанол	13,0	0,094	1,22	4,8	2,83
<i>n</i> -Октаanol	151,8	0,142	21,6	2,8	55,6
<i>n</i> -Декаanol	1222	0,228	279,0	1,9***	1100

* Из работы [12].

** Коэффициент распределения спиртов в двухфазной системе вода/октан, из работы [13].

*** Найдено линейной экстраполяцией зависимости $\lg P_4$ от числа атомов углерода в углеводородной цепи молекулы спирта.

широкий ряд с плавно изменяющимися гидрофобными свойствами и способны распределяться между всеми фазами мицеллярной системы. Кинетические характеристики реакции ферментативного окисления алифатических спиртов в системе обращенных мицелл АОТ в октане были подробно изучены нами ранее [10].

Коэффициенты распределения алифатических спиртов между фазами в системе гидратированных обращенных мицелл АОТ в октане. Анализ кинетических данных в рамках уравнения (10) требует знания коэффициентов распределения спиртов P_1 и P_3 (значения Θ_v , Θ_m и $\Theta_{орг}$, также входящие в уравнение (10), можно легко определить исходя из состава реакционной системы, используя литературные данные [11] для плотности обращенных мицелл АОТ в октане). В качестве оценки значений P_1 мы использовали коэффициенты распределения алифатических спиртов между водным раствором и мембраной эритроцитов [12], которую в первом приближении можно рассматривать как модель мицеллярной мембраны. Значения P_1 , взятые из работы [12], приведены в табл. 1.

При заданных значениях P_1 коэффициенты P_3 могут быть определены из уравнения (4), если известны коэффициенты P_4 , описывающие распределение спиртов между органической фазой (октаном) и совокупной мицеллярной фазой. В отличие от коэффициента P_3 величина P_4 поддается прямому экспериментальному измерению с помощью метода проточной микрокалориметрии. Этот метод был ранее успешно использован [14] для определения коэффициентов распределения спиртов между нормальными (водными) мицеллами додецилсульфата натрия и водой. Суть его состоит в том, что в калориметр непрерывно подаются поток раствора спирта в октане и поток не содержащего спирта раствора гидратированных обращенных мицелл АОТ в октане. В детекторной ячейке калориметра потоки смешиваются и регистрируется тепловой эффект процесса взаимодействия спирта с мицеллами. Количественный анализ [14] происходящих процессов приводит к уравнению

$$\frac{[C]V_c}{Q} = \frac{1}{\Delta H} + \frac{1}{\Delta H P_4} \left(\frac{V_{общ}}{V_m} - 1 \right), \quad (12)$$

где $[C]$ — концентрация раствора спирта в октане до смешения с мицеллярным раствором (моль/л), V_c — скорость подачи этого раствора в калориметр (л/ч), Q — измеряемый тепловой эффект смешения (за вычетом тепловых эффектов разбавления спирта и мицелл АОТ при смешении потоков, измеряемых в отдельном эксперименте) (Дж/ч), ΔH — молярная энтальпия взаимодействия спирта с мицеллами (Дж/моль), $V_{общ}$ — суммарная скорость подачи растворов спирта и мицелл (л/ч), V_m — скорость подачи мицеллярной фазы (л/ч). Величина V_m определяется следующим образом:

$$V_m = \frac{[АОТ]V_{АОТ}\bar{v}(M_{АОТ} + wM_{H_2O})}{1000}, \quad (13)$$

Результаты калориметрического изучения взаимодействия алифатических спиртов с гидратированными ($w=29$) обращенными мицеллами АОТ в октано

[АОТ], М	$V_{\text{АОТ}}$, мл/ч	[С], М	$V_{\text{С}}$, мл/ч	Q , Дж/ч	[АОТ], М	$V_{\text{АОТ}}$, мл/ч	[С], М	$V_{\text{С}}$, мл/ч	Q , Дж/ч
Этанол					<i>n</i> -Гексанол				
0,20	45,42	0,003	39,60	1,76	0,36	47,66	0,0015	35,04	0,82
0,20	43,39		41,67	1,76	0,44	50,01		38,81	0,97
0,36	48,91		36,95	2,03	0,52	49,70		33,60	0,84
0,36	45,00		40,05	2,11	0,60	42,60		34,83	1,05
0,36	47,90		45,79	2,61	0,28	44,93	0,002	37,35	0,95
0,44	39,81		36,80	2,25	0,36	45,64		36,22	1,00
0,60	41,90		34,86	2,15	0,20	43,05	0,006	31,99	1,90
0,60	39,44		38,86	2,49					
<i>n</i> -Бутанол					<i>n</i> -Октанол				
0,27	47,42	0,003	42,96	1,77	0,36	45,87	0,0015	37,04	0,86
0,28	44,63		38,66	0,93	0,44	46,86		36,91	0,97
0,35	39,71		42,90	1,97	0,52	45,61		33,32	1,01
0,36	46,33		37,06	0,62	0,60	35,33		34,92	1,18
0,42	46,56		41,58	2,11	0,60	41,16		34,89	1,31
0,50	45,73		37,86	2,16	0,32	36,72		37,74	3,41
0,52	46,56		34,18	2,17	0,40	40,54		32,67	3,16
0,58	42,32		37,75	2,27					
0,60	40,90		35,55	2,45					

где [АОТ] — концентрация АОТ в мицеллярном растворе до смешения с раствором спирта (моль/л), $V_{\text{АОТ}}$ — скорость подачи этого раствора в калориметр (мл/ч), \bar{v} — удельный парциальный объем мицелл АОТ в октано ($\text{см}^3/\text{г}$), $M_{\text{АОТ}}$ и $M_{\text{H}_2\text{O}}$ — молекулярная масса АОТ и воды, $w = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}]$ — степень гидратации обращенных мицелл АОТ. Все эксперименты были выполнены при постоянной величине $w=29$; при этой степени гидратации удельный парциальный объем обращенных мицелл АОТ в октано $\bar{v}=0,936 \text{ см}^3/\text{г}$ [11].

Представление экспериментальных данных, полученных при различных концентрациях АОТ и спирта, в координатах уравнения (12) ($[С]V_{\text{С}}/Q$ против $V_{\text{обм}}/V_{\text{м}}-1$) позволяет определить величину коэффициента распределения спирта между обращенными мицеллами и органическим растворителем (P_1). Важно подчеркнуть, что свойства обращенных мицелл АОТ в октано не зависят от концентрации АОТ, а определяются лишь величиной степени гидратации w [15, 16], которая в наших экспериментах была постоянной. Иными словами, при варьировании концентрации АОТ в системе меняется лишь число мицелл, сами же мицеллы остаются неизменными.

Анализ данных калориметрических измерений тепловых эффектов процесса взаимодействия различных алифатических спиртов с обращенными мицеллами АОТ в октано (табл. 2) в координатах уравнения (12) дает прямолинейную зависимость (рис. 2), из тангенса угла наклона которой можно определить величину коэффициента распределения P_1 . Найденные таким образом значения коэффициента P_1 и рассчитанные затем по уравнению (4) коэффициенты P_2 приведены в табл. 1. Для сравнения в этой же таблице представлены взятые из литературы [13] значения коэффициента распределения P спиртов в макродвухфазной системе вода/октано. Видно, что значения P_2 и P в целом согласуются между собой. Некоторое расхождение между ними может быть связано с тем фактом, что вода, находящаяся внутри обращенных мицелл, существенно отличается по свойствам от воды объемной [1]. Этот результат весьма важен, поскольку он означает, что при кинетическом анализе ферментативных реакций, протекающих в системах обращенных мицелл, в рамках уравнений (8)–(10) в качестве оценки величины P_2 можно применять (по край-

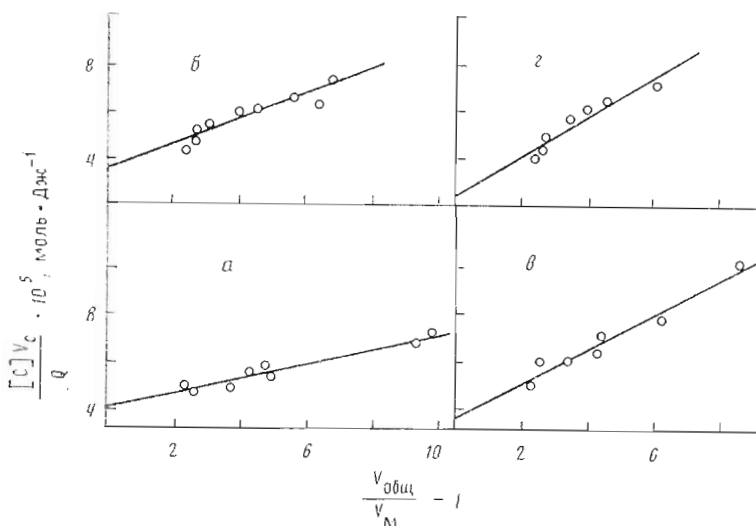


Рис. 2. Результаты калориметрического изучения взаимодействия алифатических спиртов этанола (а), *n*-бутанола (б), гексанола (в) и октанола (г) с гидратированными обращенными мицеллами АОТ в октаноле (табл. 2), в координатах уравнения (12)

ней мере в первом приближении) коэффициенты распределения изучаемого субстрата в простой двухфазной системе, состоящей из воды и органического растворителя, используемого для получения мицеллярной системы.

Найденные значения P_3 позволяют оценить также коэффициент распределения спиртов между октаном и мицеллярной мембраной P_2 , так как, согласно уравнениям (1)–(3), $P_2 = P_3/P_1$. Из табл. 1 видно, что наименьшим коэффициентом распределения P_2 , т. е. наибольшим сродством к мицеллярной мембране (при связывании из фазы органического растворителя), обладает гексанол. Возможно, это объясняется структурной комплексментарностью молекулы гексанола и гидрофобного «хвоста» молекулы АОТ, представляющего собой 2-этилгексилный радикал.

Кинетический анализ реакции окисления алифатических спиртов, катализируемой алкогольдегидрогеназой в системе обращенных мицелл АОТ в октаноле. Анализ наблюдаемых кинетических параметров указанной реакции, определенных в условиях насыщения фермента по NAD^+ при степени гидратации обращенных мицелл $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] = 29$, а также кинетических констант для соответствующих реакций в водном растворе (табл. 3) показывает, что кинетические параметры, и в первую очередь значения константы Михаэлиса, определенные в водном растворе и в мицеллярной системе, значительно отличаются друг от друга. Такое различие приводит, в частности, к существенному изменению наблюдаемой субстратной спе-

Таблица 3

Кинетические параметры реакции окисления алифатических спиртов, катализируемой алкогольдегидрогеназой

Спирт	Водный раствор		Обращенные мицеллы АОТ в октаноле		
	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_M \cdot 10^3, \text{М}$	$k_D, \text{с}^{-1}$	$K_{M(\text{важ})} \cdot 10^3, \text{М}$	$K_M, \text{в} \cdot 10^3, \text{М}$
Этанол	9,2	39,8	1,71	9,9	96,6
<i>n</i> -Пропанол	9,8	16,0	1,84	6,0	—
<i>n</i> -Бутанол	9,1	11,0	1,80	4,0	15,3
<i>n</i> -Пентанол	9,6	7,9	1,84	7,0	—
<i>n</i> -Гексанол	9,8	3,3	1,80	12,1	7,4
<i>n</i> -Гептанол	9,2	2,7	1,70	25,5	—
<i>n</i> -Октанол	7,1	1,7	1,82	37,7	1,5
<i>n</i> -Нонанол	3,8	1,0	1,00	70,0	—
<i>n</i> -Деканол	1,6	0,54	0,44	92,0	0,31

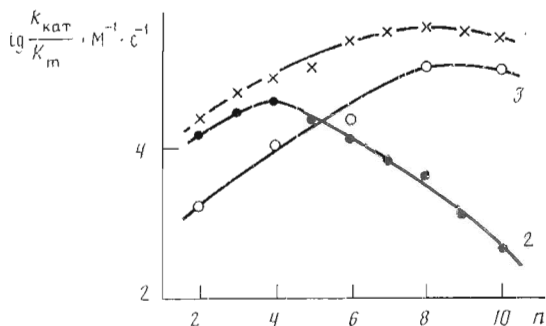


Рис. 3. Зависимость логарифма константы скорости второго порядка реакции окисления алифатических спиртов, катализируемой алкогольдегидрогеназой, от длины углеводородной цепи в молекуле субстрата $\text{H}(\text{C}_n\text{H}_2)_n\text{OH}$ в водном растворе (1) и в системе гидратированных обращенных мицелл АОТ в октаноле (2, 3). Кривая 2 получена с использованием наблюдаемых значений константы Михаэлиса для спиртовых субстратов ($K_{m(\text{набл})}$), а кривая 3 — с использованием истинных значений константы Михаэлиса ($K_{m, \text{в}}$), рассчитанных по уравнению (10)

цифичности алкогольдегидрогеназы при переходе от водного раствора к системе гидратированных обращенных мицелл АОТ в октаноле [10, 17]. Из зависимости наблюдаемой константы скорости второго порядка, $k_{\text{кат}}/K_m$, являющейся мерой субстратной специфичности фермента, от длины молекулы спиртового субстрата для водного (рис. 3, 1) и мицеллярного (рис. 3, 2) растворов видно, что в водном растворе наилучшим субстратом является октанол (максимальное значение $k_{\text{кат}}/K_m$), а в системе обращенных мицелл — бутанол.

Однако анализ этих же кинетических данных в рамках уравнения (10) позволяет иначе взглянуть на эффект наблюдаемого сдвига субстратной специфичности. Значения истинной константы Михаэлиса для спиртов ($K_{m, \text{в}}$), рассчитанные по уравнению (10) с использованием коэффициентов P_1 и P_3 из табл. 1 и значений $K_{m(\text{набл})}$ из табл. 3, представлены в табл. 3. Входящие в уравнение (10) значения Θ_v , Θ_m и $\Theta_{\text{орг}}$ (для $[\text{АОТ}] = 0,1 \text{ M}$, $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] = 29$) составляют 0,049; 0,036 и 0,915 соответственно (при расчете объемных долей использовано значение плотности обращенных мицелл АОТ при $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] = 29$, равное $1,069 \text{ г/см}^3$ [11]). Из табл. 3 видно, что значения $K_{m, \text{в}}$ очень близки к наблюдаемым в водном растворе ($K_{m, \text{водн}}$), т. е. каталитические свойства алкогольдегидрогеназы, характеризуемые величиной константы Михаэлиса спиртового субстрата, в водном растворе и внутри гидратированных обращенных мицелл практически не различаются. Вследствие этого профиль зависимости константы скорости второго порядка $k_v/K_{m, \text{в}}$ от длины углеводородной цепи спиртового субстрата по форме совпадает с соответствующим профилем, полученным в водном растворе (рис. 3, 3 и 1 соответственно). Некоторое различие в абсолютных значениях констант скорости второго порядка объясняется снижением каталитической константы при переходе от водного раствора к системе обращенных мицелл (ср. значения k_v и $k_{\text{водн}}$ в табл. 3). Совпадение формы кривых 1 и 3 на рис. 3 означает, что истинная субстратная специфичность алкогольдегидрогеназы, солюбилизованной обращенными мицеллами АОТ в октаноле, не отличается от субстратной специфичности этого фермента в водном растворе.

Таким образом, в случае ферментативных реакций, протекающих в системах обращенных мицелл с участием субстратов, способных распределяться между всеми фазами мицеллярной системы, наблюдаемый сдвиг таких важнейших каталитических параметров, как константа Михаэлиса и субстратная специфичность, может быть не связан с изменением истинных каталитических свойств фермента, а обусловлен простыми эффектами распределения субстрата. Кинетический анализ ферментативных реакций такого типа удобно проводить в рамках предложенной в настоящей работе кинетической модели, основанной на псевдофазном подходе и учитывающей распределение субстрата по всем фазам мицеллярной системы.

Фермент (кристаллическая суспензия; Reanal, Венгрия) очищали по методике [18]. Содержание активных центров, определенное по методике [19], составило 94%. Октаи очищали как описано ранее [20]. Спирты перед использованием перегоняли. Никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺; Sigma, США) и Аэрозоль ОТ (натриевая соль динизоктилтового эфира сульфоянтарной кислоты; Мерск, ФРГ) использовали без очистки. Водные растворы готовили в 0,02 М фосфатном буфере (рН 8,8). Для приготовления мицеллярных растворов к 0,1 М раствору АОТ в октано добавляли необходимые количества водных растворов алкогольдегидрогеназы, NAD⁺ и буфера и интенсивно встряхивали в течение 1–2 мин до получения оптически прозрачного гомогенного раствора. Содержание активного фермента, определяемое по методике [19], при солиubilизации не изменяется. Концентрацию фермента варьировали в пределах (0,5–8,0) · 10⁻⁸ М (в расчете на весь объем реакционной смеси). Все измерения в мицеллярных системах выполнены при степени гидратации [H₂O]/[АОТ]=29. При проведении реакции в водном растворе концентрация фермента составляла 1 · 10⁻⁸ М.

Реакцию в системе обращенных мицелл начинали добавлением раствора спирта в растворе АОТ в октано. Кинетику реакции окисления спирта регистрировали спектрофотометрически по поглощению образующегося NADH на длине волны 340 нм с помощью двухлучевого спектрофотометра Beckman-25 с термостатируемым кюветным отделением при 25° С. Значения молярного коэффициента экстинкции NADH равны 6,22 · 10³ и 5,5 · 10³ М⁻¹ · см⁻¹ для водного раствора и коллоидного раствора воды в октано соответственно. Для определения параметров уравнения Михаэлиса использовали метод начальных скоростей с линеаризацией экспериментальных данных в координатах [S]/v – [S] в условиях насыщения по NAD⁺ при концентрациях этого кофермента 6,5 · 10⁻⁴ М в водном растворе и 6,5 · 10⁻³ М в мицеллярном растворе (в расчете на объем водной фазы).

Определение теплот смешения и разбавления растворов спирта и АОТ проводили при 25° С на дифференциальном проточном микрокалориметре ДПМК-1 (Специальное конструкторское бюро биологического приборостроения АН СССР, Пушкино). Растворы спирта и мицелл АОТ в октано готовили как описано выше, термостатировали их в течение 1 сут при 25° С, после чего проводили эксперимент по смешению в калориметре, определяя суммарный тепловой эффект (Q_{общ}). Он представляет собой сумму вкладов искомой теплоты взаимодействия спирта с мицеллами АОТ (Q), а также теплот разбавления растворов спирта (Q_c) и мицелл АОТ (Q_{лот}), которые определяли в отдельном эксперименте. Величину Q находили из соотношения

$$Q = Q_{\text{общ}} - (Q_c + Q_{\text{лот}}).$$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. // Успехи химии. 1984. Т. 53. № 4. С. 545–565.
2. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Хмельницкий Ю. Л., Березин И. В. // Бюлл. мембраны. 1985. Т. 2. № 7. С. 669–696.
3. Martinek K., Levashov A. V., Khlmelniitsky Yu. L., Klyachko N. L., Berezin I. V. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 155. № 3. P. 453–468.
4. Luisi P. L., Giomini M., Pileni M. P., Robinson B. H. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 947. № 1. P. 209–246.
5. Березин И. В., Мартинек К., Яцимирский А. К. // Успехи химии. 1973. Т. 42. № 10. С. 1729–1756.
6. Левашов А. В., Пангин В. И., Мартинек К., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1980. Т. 252. № 1. С. 133–136.
7. Левашов А. В., Клячко Н. Л., Пангин В. И., Хмельницкий Ю. Л., Мартинек К. // Биооргани. химия. 1980. Т. 6. № 6. С. 929–943.
8. Fletcher P. D. I., Rees G. D., Robinson B. H., Freedman R. B. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 832. № 2. P. 204–214.
9. Fletcher P. D. I., Robinson B. H., Freedman R. B., Oldfield C. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1. 1985. V. 81. № 11. P. 2667–2679.
10. Мартинек К., Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1982. Т. 263. № 3. С. 737–741.

11. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Черняк В. Я., Мартинек К. // Биохимия. 1982. Т. 47. № 1. С. 86—99.
12. Seeman P. // Pharmacol. Rev. 1972. V. 24. № 4. P. 583—655.
13. Leo A., Hansch C., Elkins D. // Chem. Rev. 1971. V. 71. № 6. P. 525—616.
14. De Lisi R., Genova C., Tarco Liveri V. // J. Colloid Interface Sci. 1983. V. 95. № 2. P. 428—434.
15. Zulauf M., Eicke H. F. // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. № 4. P. 480—486.
16. Fletcher P. D. I., Howe A. M., Perrins N. M., Robinson B. H., Toprakcioglu C., Dore J. C. // Surfactants in Solution. V. 3./Eds Mittal K. L., Lindman B. N. Y.: Plenum Press. 1984. P. 1745—1758.
17. Martinek K., Levashov A. V., Khmel'nitsky Yu. L., Klyachko N. L., Berezin I. V. // Science. 1982. V. 218. № 4575. P. 889—891.
18. Bernhard S. A., Dunn M. F., Luisi P. L., Shack P. // Biochemistry. 1970. V. 9. № 1. P. 185—192.
19. Theorell H., Yonetani T. // Biochem. Z. 1963. B. 338. S. 537—553.
20. Мартинек К., Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Семенов А. Н., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1981. Т. 256. № 6. С. 1423—1426.

Поступила в редакцию
10.IV.1989

KINETIC THEORY OF ENZYMATIC REACTIONS IN REVERSED MICELLAR SYSTEMS. APPLICATION OF THE PSEUDOPHASE APPROACH TO PARTITIONING SUBSTRATES

KHMELNITSKY Yu. L., NEVEROVA I. N.*, POLYAKOV V. I.***, GRINBERG V. Ya.**,
LEVASHOV A. V.*, MARTINEK K.***

*A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the
USSR, Moscow;*

* *Department of Chemistry, M.V. Lomonosov State University, Moscow;*

** *Institute of Elementoorganic Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow;*

*** *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy
of Sciences of Czechoslovakia, Prague*

A kinetic theory is suggested for enzymatic reactions proceeding in reversed micellar systems in organic solvents and involving substrates capable of partitioning among all pseudophases of the micellar system, i. e. aqueous cores of reversed micelles, micellar membranes and organic solvent. The theory allows one to determine true (i. e. referred to the aqueous phase where solubilized enzyme is localized) catalytic parameters of the enzyme, provided partition coefficients of the substrate among different phases are known. The validity of the kinetic theory was verified by the example of the reaction of oxidation of aliphatic alcohols catalyzed by HLADH in the system of reversed Aerosol OT micelles in octane. In order to determine partition coefficients of alcohols between phases of the micellar system, the flow microcalorimetry technique was used. It was shown that in the first approximation the partition coefficient of the substrate in a simple biphasic system consisting of water and corresponding organic solvent can be used as an estimate for the partition coefficient of the substrate between aqueous and organic solvent phases of the micellar system. True values of the Michaelis constant of alcohols in the micellar system, determined using suggested approach, are equal to those obtained in aqueous solution and differ from apparent values for the total volume of the system. The results clearly show that the previously reported shift in the substrate specificity of HLADH observed on going from aqueous solution to the system of reversed Aerosol OT micelles in octane is apparent and can be explained on the basis of partitioning effects of alcoholic substrates between phases of the micellar system.