

Г. Б. СЕРГЕЕВ, В. А. БАТЮК, Б. М. СЕРГЕЕВ

## КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ЗАМОРОЖЕННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

(Представлено академиком Н. М. Эмануэлем 3 IX 1973)

Выявление общих закономерностей широкого круга химических и биохимических реакций при пониженных температурах, в частности в замороженных водных растворах, представляет интерес как с теоретической, так и с практической точек зрения. Реакционная способность белков в основном исследуется в условиях, близких к живым организмам. Изучение ферментов в экстремальных условиях представляет большой интерес для более детального понимания механизма их действия и изменения специфичности функционирования.

В настоящей работе впервые исследована кинетика пероксидазного окисления хинолфосфатов перекисью водорода в замороженных водных растворах. Неферментативное окисление хинолфосфатов хорошо изучено в жидкой фазе <sup>(2)</sup>. На примере 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-фосфата показано, что при понижении температуры раствора ниже его точки замерзания скорость реакции во льду растет, достигая максимума вблизи температуры  $-17^{\circ}\text{C}$ . Таким образом, ферментативная реакция осуществляется в твердой фазе и для нее обнаружено явление отрицательного температурного коэффициента. Кинетика и механизм ферментативных реакций в замороженных растворах не исследованы. Только в работе <sup>(1)</sup> наблюдали ускорение ферментативного гидролиза. В работе использовали пероксидазу из хрена, фирмы «Reanal», перекись водорода марки х.ч. и бариевую соль 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-фосфата (ДНХФ). Концентрации реагентов в реакционной смеси:  $[\text{HRP}] = 7,5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ;  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ;  $(\text{ДНХФ}) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . Ионная сила устанавливалась раствором хлористого натрия ( $0,1 \text{ M NaCl}$ ), pH среды 7 (фосфатный буфер). За кинетикой реакции следили спектрофотометрически на длине волны  $\lambda$  275 мμ по накоплению продукта окисления — 2,3-диметил-1,4-нафтохинона. В жидкой фазе реакцию проводили непосредственно в кювете регистрирующего спектрофотометра. При изучении реакции в замороженных растворах изменения оптической плотности регистрировали после размораживания предварительно замороженных и выдержанных в криостате в течение необходимого времени образцов. Фазовые переходы, происходящие при замораживании и плавлении образцов, не оказывают существенного влияния на протекание реакции.

На рис. 1 представлена температурная зависимость начальной скорости окисления в замороженных водных растворах. Видно, что при понижении температуры раствора ниже его точки замерзания скорость реакции увеличивается, достигая максимального значения вблизи  $-17^{\circ}$ , а затем вновь уменьшается. При  $-17^{\circ}\text{C}$  реакция идет в 1,6 раза быстрее, чем при  $+35^{\circ}\text{C}$  и в 9 раз быстрее, чем при  $0^{\circ}\text{C}$ . Для сравнения на том же графике стрелкой указана величина начальной скорости реакции в жидкой фазе при  $0^{\circ}$ . На рис. 2 представлена температурная зависимость коэффициента трансформации  $\chi$  для реакции ферментативного окисления в аррениусовских координатах. Использование коэффициентов трансформации позволяет определить энергию активации реакции без знания ее механизма <sup>(3)</sup>. Из рис. 2 видно, что температурная зависимость коэффициента трансформации носит

сложный характер. Энергия активации, рассчитанная из температурной зависимости  $\chi$  для жидкой фазы, равна 7,6 ккал/моль, а в замороженных растворах меняется с температурой. Эффективная энергия активации реакции в замороженных растворах, определенная из тангенса угла наклона касательной к кривой зависимости  $\ln \chi$  от  $1/T$ , в интервале от 0 до  $-17^\circ$  отрицательна ( $\sim -23$  ккал/моль), при  $-17^\circ$  равна нулю, а ниже  $-17^\circ$  положительна ( $\sim 19$  ккал/моль).

Полученные экспериментальные факты не укладываются в рамки традиционных представлений о влиянии температуры на скорость химических реакций, основанных на соотношении Аррениуса. Данные по изучению структуры замороженных водных растворов методами я.м.р. и э.п.р. указывают на наличие в таких системах жидкой микрофазы (\*). Ее существование связано, по-видимому, с тем, что термодинамически равновесному состоянию системы при температуре опыта отвечает не твердый раствор с равномерным распределением растворенных веществ в массе замерзшего растворителя, а двухфазная система, состоящая из замерзшего практически чистого растворителя и жидких областей с повышенной концентрацией растворенных веществ. Концентрирование реагентов является в таком случае причиной

увеличения скорости реакции в замороженных растворах. При понижении температуры реакция должна замедляться в соответствии с соотношением Аррениуса. Таким образом, имеются два фактора, противоположно влияющих на скорость реакции при понижении температуры раствора ниже его точки заморзания. Их конкуренцией объясняется наблюдаемый экстремальный характер температурной зависимости скорости реакции.

Представления о существовании в замороженных растворах жидкой микрофазы позволяют проводить количественный анализ экспериментальных данных по кинетике ферментативных реакций в твердой фазе. Пусть реакция протекает как в жидком, так и в замороженном растворе без изменения числа молей, согласно стехиометрическому уравнению:  $A+B+K \rightarrow C+D+K$ , где  $K$  — гомогенный катализатор. Предполагается, что в замороженных растворах реакция идет в жидкой микрофазе. При замораживании реакционной смеси все вещества (реагенты, продукты реакции и катализатор) остаются в растворенном состоянии и полностью концентрируются во включениях, образуя жидкую микрофазу. Ее объем определяется начальной концентрацией растворенных веществ и такими свойствами растворителя, как температура заморзания  $T_0$  и криоскопическая постоянная  $\Delta$ :

$$\Delta = (T_0 - T) / \left( \sum_i C_i \right)_{\text{ж}}, \quad (1)$$

где  $(\sum_i C_i)_{\text{ж}}$  — суммарная концентрация растворенных веществ в жидких включениях,  $T$  — температура опыта. Скорость реакции  $W_{\text{оп}}$  и в жидких, и в замороженных растворах описывается уравнением

$$W_{\text{оп}} = k_{\text{эфф}} [A] [B] [K], \quad (2)$$

где  $[A]$ ,  $[B]$  и  $[K]$  — концентрации реагентов и катализатора в расчете на объем жидкого незамороженного раствора, а  $k_{\text{эфф}}$  — эффективная константа

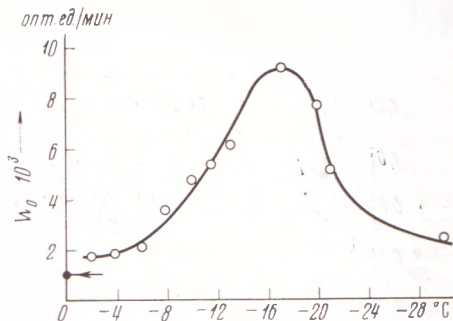


Рис. 1. Зависимость начальной скорости  $W_0$  ферментативного окисления нафтохинолфосфата в замороженных водных растворах от температуры. Стрелка соответствует скорости окисления в жидком растворе при  $0^\circ \text{C}$

скорости реакции, учитывающая зависимость скорости от температуры по уравнению Аррениуса и ускорение за счет концентрирования реагентов. Для реакции в жидкой микрофазе можно написать следующее выражение:

$$W_{\text{оп}} V = W_{\text{ж}} V_{\text{ж}}, \quad (3)$$

где  $W_{\text{ж}}$  — скорость реакции в жидкой микрофазе, и уравнение материального баланса

$$V \left( \sum_i C_i \right) = V_{\text{ж}} \left( \sum_i C_i \right)_{\text{ж}}, \quad (4)$$

где  $V$  — объем жидкого образца,  $V_{\text{ж}}$  — объем жидкой микрофазы,  $\sum C_i$  —

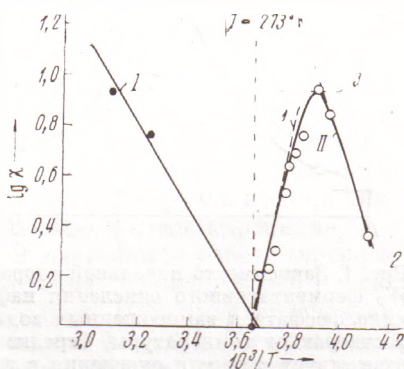


Рис. 2

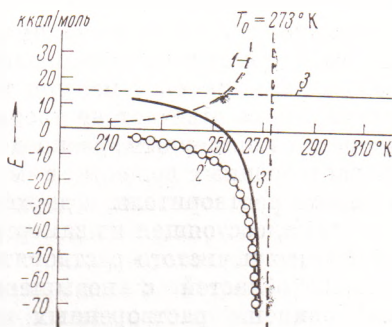


Рис. 3

Рис. 2. Температурная зависимость коэффициента трансформации  $\chi$  реакции ферментативного окисления нафтохинолфосфата в аррениусовских координатах в жидкой фазе (1) и в замороженных водных растворах (II). 1, 2 и 3 — касательные

Рис. 3. Предсказываемая моделью взаимозависимость энергии активации и температуры реакции в жидкой и твердой фазах. 1 — зависимость температуры, при которой скорость каталитической химической реакции в замороженных водных растворах максимальна, от энергии активации процесса в жидкой фазе; 2, 3 — зависимость эффективной энергии активации реакции в замороженных водных растворах от температуры (для реакции с энергией активации в жидкой фазе 15 ккал/моль (3))

суммарная концентрация растворенных веществ в жидком, незамороженном образце. Совместное решение (1)–(4) позволяет получить выражение для  $k_{\text{эфф}}$  и степени превращения  $\xi = [A]/[A]_0$ :

$$k_{\text{эфф}} = k^0 e^{-E/RT} \frac{(T_0 - T)^2}{\Delta^2 ([A]_0 + [B]_0 + [K])^2}, \quad (5)$$

$$\xi = \frac{[A]}{[A]_0} = 1 - \frac{[A]_0}{[B]_0} \exp \left\{ \frac{k^0 e^{-E/RT} [K] (T_0 - T)^2 t ([B]_0 - [A]_0)}{\Delta^2 ([A]_0 + [B]_0 + [K])^2} \right\} - \frac{[A]_0}{[B]_0}. \quad (6)$$

Дифференцируя (5) по температуре и приравнявая производную нулю, получаем выражение для температуры  $T^*$ , при которой скорость реакции в замороженном растворе проходит через максимум:

$$T^* = 1/2 \left( \sqrt{\frac{E^2}{4R^2} + \frac{2ET_0}{R}} - \frac{E}{2R} \right). \quad (7)$$

Дифференцируя по обратной температуре выражение для  $\ln k_{\text{эфф}}$ , получаем уравнение для определения эффективной энергии активации реакции в замороженном растворе

$$E_{\text{эфф}} = E - 2RT^2 / (T_0 - T). \quad (8)$$



Из выражения (8) следует, что при понижении температуры ниже точки замерзания раствора эффективная энергия активации реакции меняет знак и остается отрицательной вплоть до температуры  $T^*$ , затем обращается в нуль и вновь становится положительной. Температура  $T^*$ , как это видно из (7), зависит лишь от свойств данной системы, т. е. энергии активации реакции в жидкой фазе и температуры замерзания чистого растворителя. Основные выводы из рассматриваемой модели каталитических реакций в замороженных растворах иллюстрируются рис. 3. Кривая 1 представляет собой зависимость температуры  $T^*$  от энергии активации в жидкой фазе. При увеличении энергии активации  $T^*$  приближается к температуре замерзания растворителя.

Согласно предложенной модели, для каталитических реакций в замороженных растворах должно наблюдаться явление отрицательного температурного коэффициента, т. е. скорость ферментативной реакции в твердой матрице замороженного растворителя будет увеличиваться при понижении температуры. Действительно, данные рис. 2 показывают, что скорость ферментативного окисления 2,3-диметил-1,4-нафтохинол-1-фосфата во льду растет с понижением температуры от 0 до  $-17^\circ$ . Зависимость эффективной энергии активации реакции в замороженных растворах от температуры описывается уравнением (8) и хорошо подтверждается экспериментальными данными, приведенными на рис. 2. Из рис. 2 видно, что зависимость  $E_{\text{эфф}}$  от температуры замороженного раствора представляет собой кривую с максимумом, т. е. скорость каталитических реакций в замороженных растворах не подчиняется уравнению Аррениуса. Предсказываемая моделью температурная зависимость эффективной энергии активации каталитической реакции в замороженных водных растворах иллюстрируется рис. 3. Кривая 3 показывает изменение  $E_{\text{эфф}}$  во всем температурном интервале для реакции с энергией активации в жидкой фазе, равной 15 ккал/моль. Как видно, при замораживании системы должно наблюдаться скачкообразное изменение  $E_{\text{эфф}}$ . В замороженных растворах, при приближении к температурам весьма близким к температуре плавления, реакция будет идти с большим отрицательным температурным коэффициентом. Кривая 2 характеризует вклад в величину  $E_{\text{эфф}}$  члена, обусловленного изменением фазового состояния системы. Рассмотренные закономерности подтверждаются экспериментально. Они характерны, в частности, для ферментативного окисления с участием пероксидазы.

Полученные экспериментальные данные об ускорении ферментативных реакций объяснены существованием в замороженных растворах жидкой микрофазы. Следует однако подчеркнуть, что свойства такой фазы отличаются от истинной жидкой фазы. Необходимы дальнейшие исследования термодинамических и кинетических характеристик структурных неоднородностей, образующихся в матрицах отверделых растворов. Таким образом, замораживание можно использовать для управления и стимулирования химических и биохимических реакций. Кинетика процесса меняется при переходе системы из одного фазового состояния в другое. Полученные данные по пероксидазному окислению хинолфосфатов позволили предложить механизм, объясняющий установленные закономерности каталитических реакций в замороженных растворах.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
17 VIII 1973

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> N. E. Grant, H. E. Alburn, Nature, 212, № 5058, 194 (1966). <sup>2</sup> Г. Б. Сергеев, В. А. Батюк, ДАН, 190, № 6, 1399 (1970). <sup>3</sup> Н. М. Эмануэль, Д. Г. Кнорре, Курс химической кинетики, М., 1969, стр. 53. <sup>4</sup> В. А. Батюк, М. Б. Степанов, Г. Б. Сергеев, Тез. докл. V Всесоюз. Совещ. по кинетике и механизму химических реакций в твердом теле, Черногловка, 1973, стр. 89.