



УДК 541.128.1 + 577.150.2

## ПРЕПАРАТИВНЫЙ ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ В ДВУХФАЗНОЙ ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ

*Мартинек К., Клибанов А. М., Салохин Г. П.,  
Семенов А. Н., Березин И. В.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Предложен новый подход к проведению препаративного ферментативного синтеза в водно-органических системах. Реакцию ведут в двухфазной системе «вода — смешивающийся с водой органический растворитель». Фермент находится в водной фазе, и поэтому не возникает традиционной проблемы его стабилизации против инактивации неводным растворителем. Содержание воды можно сделать сколь угодно малым, что позволяет резко сдвигать положение равновесия в реакциях, где одним из продуктов является вода (синтез сложных эфиров и амидов, полимеризация аминокислот, сахаров и нуклеотидов, реакции дегидратации и т. д.), в сторону образования продуктов. Второй, не менее важный источник сдвига равновесия — это свободная энергия переноса продукта из воды в органическую фазу. Предлагаемый подход апробирован на примере катализируемого химотрипсином синтеза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-триптофана из соответствующих кислоты и спирта. Выход — практически 100% (в воде в отсутствие органической фазы ~ 0,01%). Используя в качестве катализатора щелочную фосфатазу, с выходом 30% синтезировали глицерофосфат из глицерина и фосфата (в воде в отсутствие органической фазы выход составляет менее 0,1%).

Ферменты как биокатализаторы отличаются от обычных химических катализаторов исключительно высокой каталитической активностью в мягких условиях и уникальной субстратной специфичностью. Это делает весьма привлекательной перспективу применения ферментов в тонкой химической технологии. Однако до недавнего времени практическое применение ферментов фактически ограничивалось лишь их традиционным использованием в пищевой промышленности; это объясняется тем, что ферменты, к сожалению, довольно нестабильны при функционировании в химических реакторах и, кроме того, являются недостаточно технологичным материалом.

В последние годы положение дел стало коренным образом меняться благодаря тому, что на стыке ряда химических и биологических дисциплин начало формироваться новое научное направление — получение и исследование иммобилизованных ферментов [1]. В результате иммобилизации (например, ковалентного присоединения ферментов к водонерастворимым частицам, включения ферментов в гели или полые волокна, адсорбции ферментов на различных поверхностях) можно достигнуть резкого повышения стабильности ферментов. Кроме того, появляется возможность их отделения от растворимых субстратов и продуктов, а также повторного использования [1—3]. Этим и объясняется резкий скачок в прикладном использовании ферментов. Особенно перспективным представляется применение ферментов как катализаторов в тонком органическом

синтезе, при получении лекарственных препаратов и синтезе важных биохимических соединений. К настоящему времени уже осуществляется в полупромышленном или лабораторном масштабе ряд такого рода ферментативных процессов: разделение рацематов синтетических аминокислот [4—10], синтез аминокислот [10—12] и антибиотиков [12—14], трансформация стероидов [15, 16], синтез лекарственных препаратов [17, 18], пиррол-порфиблиногена [19], *D*- $\alpha$ -оксинитрилов [20], получение фармацевтически чистых меченых аминокислот [21], синтез важных биохимических веществ, таких, как АТФ [22], NAD [23] и другие [24], синтез гомополинуклеотидов [25, 26]. Не вызывает сомнений, что применение ферментов в препаративном органическом синтезе будет интенсивно развиваться и в дальнейшем [27].

В то же время имеется одно обстоятельство, принципиально ограничивающее использование ферментов как катализаторов практически нужных химических реакций. Дело в том, что многие ферменты приспособлены для эффективного функционирования лишь в водных растворах. Это не позволяет синтезировать с их помощью те химические соединения, для которых термодинамическое равновесие их образования в водном растворе сдвинуто в неблагоприятную сторону. Характерными примерами таких процессов являются реакции синтеза сложных эфиров, полимеризации аминокислот, сахаров, реакции дегидратации и т. д. В этих процессах наряду с нужным продуктом образуется вода, поэтому при проведении реакций в водных растворах равновесие, как правило, сильно сдвинуто в сторону исходных веществ.

Очевидно, что выход из такого затруднения может состоять в переходе от воды как среды реакции к неводному растворителю. В развитие этой идеи появилось довольно большое количество работ, посвященных попыткам провести ферментативные реакции в органических растворителях или водно-органических смесях с высокой концентрацией неводного компонента [28—37]. Однако во всех корректных работах такого рода констатируется, что при переходе от воды как среды реакции к органическому растворителю каталитическая активность ферментов резко падает и исчезает их субстратная специфичность.

Поэтому был предпринят ряд попыток «заставить» ферменты работать в органических растворителях или водно-органических смесях с высокой концентрацией органического компонента, повысив их стабильность к денатурирующему действию неводной среды в результате их иммобилизации [38—47]. Однако даже в самых удачных работах такого рода при концентрациях органического компонента выше 90% иммобилизованный фермент все же инактивируется. Таким образом, с точки зрения препаративного ферментативного синтеза поставленная проблема остается нерешенной. Весьма возможно, что в таком виде она принципиально неразрешима, поскольку при переходе от воды к неводной среде неизбежно происходит существенное изменение конформации ферментов [30, 48] и, как следствие, резкое нарушение их каталитической функции.

Учитывая все вышеизложенное, в настоящей работе мы предлагаем принципиально новый подход к проведению препаративного ферментативного синтеза в неводных растворителях.

Во всех известных нам работах, где исследовали поведение ферментов в водно-органических или органических средах, в качестве неводного компонента брали такие растворители, как ацетон, ацетонитрил, диоксан, диметилсульфоксид, диметилформамид, метанол, этанол и др.; общей чертой этих растворителей является то, что они неограниченно смешиваются с водой. Именно вследствие этого приходится решать проблему стабилизации ферментов против инактивации органическим компонентом. Основная идея нашего подхода состоит в том, что органический растворитель, добавляемый к водной фазе, содержащей фермент, должен быть практически не смешиваемым с водой (например, хлороформ, эфир, жир-

ные алифатические спирты, углеводороды и т. д.). В таком случае полученная система будет состоять из двух фаз — водной и органической. Фермент будет находиться лишь в водной фазе, поскольку, во-первых, его можно там иммобилизовать, а во-вторых, если нет, то обычно белки, обладая удовлетворительной растворимостью в воде, практически нерастворимы в гидрофобных растворителях [30]. В такой системе отпадет необходимость решать проблему стабилизации фермента против денатурации неводным компонентом. Вводимые растворимыми в органической фазе субстраты будут свободно [49, 50] диффундировать из нее в воду, там под действием фермента претерпевать химическое превращение, а образующиеся продукты будут диффундировать из воды обратно в органическую фазу. Таким образом, термодинамическое равновесие в проводимой химической реакции будет устанавливаться по всей водно-органической системе через воду (с помощью находящегося в воде катализатора-фермента). Объемная доля органической фазы в описанной системе может быть в принципе сколь угодно близка к единице; следовательно, условия равновесия в такой двухфазной системе могут быть сколь угодно близки к равновесию в чистой органической среде (и тем не менее процесс будет катализироваться ферментом).

Ферментативная система «вода — несмешивающийся органический растворитель» может быть создана как эмульсия водного раствора фермента в органической среде или, что гораздо удобнее методически и технологически, как суспензия в органической среде пористых частиц (например, пористого стекла или керамики, гидрофильного геля и т. д.), пропитанных водным раствором фермента; водный раствор фермента может также быть заключен в микрокапсулы [51, 52] или полые волокна [12, 53]. Фермент может быть использован как в свободном, так и в иммобилизованном состоянии.

*1-й пример синтеза: этиловый эфир N-ацетил-L-триптофана (специфический субстрат химотрипсина).* Предлагаемая идея — проводить ферментативный органический синтез в двухфазной водно-органической среде с высоким содержанием неводного компонента — была апробирована нами на примере катализируемого химотрипсином синтеза этилового эфира N-ацетил-L-триптофана из этанола и N-ацетил-L-триптофана. Константы равновесия для синтеза этиловых или метиловых эфиров аминокислот слабо зависят от природы аминокислоты и обычно отличаются от единицы не более чем на порядок (в расчете на неионизованную форму кислоты) [54—56]. Следовательно, поскольку при синтезе наряду со сложным эфиром образуется вода, при проведении реакции в воде равновесие будет сильно сдвинуто в сторону исходных реагентов. Более того, при нейтральных значениях pH (при которых действует используемый нами фермент) имеет место дополнительный сдвиг равновесия, неблагоприятный для синтеза сложного эфира и обусловленный термодинамически выгодной ионизацией одного из исходных компонентов — кислоты. В итоге константа равновесия ( $K_w$ ) валового процесса



принимает значение

$$K_w = K_{\text{недис}} / (1 + K_a / [\text{H}^+]),$$

где  $K_{\text{недис}}$  — константа равновесия в воде для неионизованной формы,  $K_a$  — константа диссоциации кислоты в водном растворе. Следовательно, при pH 7 и  $pK_a \sim 4$  выход образовавшегося сложного эфира будет ничтожно малым ( $\sim 0,01\%$ ) даже при относительно высокой концентрации этанола ( $\sim 10$  М). Тем не менее предлагаемый нами подход позволяет сдвинуть равновесие (1) в двухфазной системе «вода — несмешивающийся

«органический растворитель» почти полностью вправо; выход составил в этом случае практически 100% (!).

Ферментативный синтез вели следующим образом: пористое стекло вымачивали в водном (1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7) растворе химотрипсина ( $5 \cdot 10^{-4}$  М), 0,3 г полученного препарата переносили в 30 мл хлороформа, содержащего субстраты ( $10^{-2}$  М N-ацетил-L-триптофан и 1 М этанол); систему перемешивали в течение ночи и нашли (см. «Экспериментальную часть»), что весь N-ацетил-L-триптофан превратился в соответствующий этиловый эфир. Идентичность полученного продукта коммерческому этиловому эфиру N-ацетил-L-триптофана доказана с помощью газожидкостной хроматографии (совпадением времен удерживания).

Фермент в данной системе оказывает решающее влияние на скорость достижения равновесия. Так, в контрольном эксперименте было найдено, что выход продукта в отсутствие фермента практически равен нулю, в то время как при указанной концентрации катализатора время полупревращения процесса составляет 2 ч. Это указывает на то, что фермент в двухфазной системе работает примерно с той же каталитической эффективностью, что и в чистой воде [56].

*Теоретические заметки.* Наблюдаемый сдвиг равновесия должен иметь общий характер для химических реакций. Чтобы показать это, рассмотрим реакцию



Пусть целью синтеза является, например, получение продукта С. Его выход, очевидно, определяется выражением

$$[C] = K \frac{[A][B]}{[D]}. \quad (3)$$

Из уравнения (3) вытекает, что существует два источника сдвига равновесия (увеличения выхода продукта С) при переходе от воды как среды реакции к описанной двухфазной водно-органической системе.

Во-первых, если вторым продуктом (D) в реакции (2) является вода, то уменьшение ее концентрации в системе, согласно уравнению (3), приведет к повышению выхода продуктов. Так, в описанном выше синтезе мы перешли от 100% воды к ~1% водной системе; это дает нам ~100-кратное повышение выхода сложного эфира.

Во-вторых, сдвиг равновесия в реакции (2) возможен за счет изменения значения эффективной константы равновесия при переходе от воды к двухфазной системе. Пусть для реакции (2) константа равновесия в воде равна  $K_w$ . Тогда эффективная константа равновесия в двухфазной системе ( $K$ ) определяется (по аналогии с [57]) выражением

$$K = K_w \frac{(1 + \alpha P_C)(1 + \alpha P_D)}{(1 + \alpha P_A)(1 + \alpha P_B)}, \quad (4)$$

где  $\alpha$  — отношение объемов неводной и водной фаз;  $P_A$ ,  $P_B$ ,  $P_C$  и  $P_D$  — коэффициенты распределения реагентов между неводной и водной фазами. Допустим, что исходные реагенты А и В плохо растворяются в органической фазе, но хорошо растворимы в воде, т. е. имеют низкие коэффициенты распределения — например,  $P_A \approx P_B \approx 10^{-2}$ . В таком случае, если хотя бы один из продуктов плохо растворим в воде, но хорошо растворим в органической фазе, т. е. имеет высокий коэффициент распределения (например,  $P_C \approx 100$ ), то при взятом нами значении  $\alpha \approx 100$  из уравнения (4) получим  $K > 2500 \cdot K_w$ . Таким образом, константа равновесия в двухфазной системе превышает константу равновесия в воде более чем на 3 порядка. Описанная ситуация характерна, в частности, и для синтеза (1), где из двух гидрофильных молекул образуется гидрофобная молекула.

2-й пример синтеза: глицерофосфат (субстрат щелочной фосфатазы). Казалось бы, предлагаемый нами подход к проведению препаративного ферментативного синтеза не применим к системам, где продукты — ионы, поскольку они не будут переходить из воды в органическую фазу. Однако эту трудность, очевидно, можно преодолеть, подбирая для ионных реагентов гидрофобные противоионы. Мы экспериментально доказали это утверждение, синтезируя с помощью щелочной фосфатазы глицерофосфат из глицерина и фосфата.

В воде при pH 7 и 25° для синтеза  $\alpha$ -глицерофосфата из глицерина и фосфата  $\Delta G^\circ = 2,1$  ккал/моль [58]. Следовательно, если взять концентрацию глицерина избыточной по сравнению с фосфатом и равной в условиях опыта  $3 \cdot 10^{-2}$  М, то выход глицерофосфата из фосфата составит менее 0,1%, т. е. равновесие будет сильно сдвинуто в сторону гидролиза.

Ферментативный синтез глицерофосфата в двухфазной системе вели следующим образом: щелочную фосфатазу (40 мг) растворяли в 1 мл 0,2 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8), содержащем  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $\text{MgSO}_4$ ; в этом растворе при перемешивании в течение 30 мин вымачивали пористое стекло, после этого 0,5 г стекла декантировали и суспендировали в 40 мл хлороформа, содержащего  $3 \cdot 10^{-2}$  М глицерина и  $8 \cdot 10^{-4}$  М полученного нами (см. «Экспериментальную часть») фосфата тетрабутиламмония. Систему перемешивали 15 ч, после чего определяли количество синтезированного глицерофосфата (см. «Экспериментальную часть»). Выход составил  $\sim 30\%$  (в отсутствие фермента выход практически равен нулю). Таким образом, по сравнению с водой выход увеличен нами более чем в 300 раз.

Мы надеемся, что разработанный нами подход к проведению ферментативного синтеза в двухфазных водно-органических системах найдет свое применение во многих областях препаративной органической химии.

### Экспериментальная часть

Использовали: бычий  $\alpha$ -химотрипсин Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова (содержание активного фермента, определенное спектрофотометрическим титрованием [59], составляло 68%); щелочную фосфатазу из кишечника цыпленка (Sigma, уд. акт. 5,9 ед./мг); пористое стекло (Corning Glass Works, размер частиц 16/50 меш, диаметр пор 750 Å); *N*-ацетил-*L*-триптофан (Reanal); глицерин, этанол, бромистый тетрабутиламмоний, неорганические соли, кислоты, щелочь, органические растворители («Союзреактив», марки ос. ч. или ч. д. а.).

Фосфат тетрабутиламмония получали по аналогии с описанным в работе [60]: к 3,32 г бромистого тетрабутиламмония добавляли 1,5 мл 85% фосфорной кислоты, смесь переносили в 40 мл диоксана, перемешивали 10 мин, а затем отгоняли диоксан (уходящий вместе с растворенным бромистым водородом). Процедуру с диоксаном повторяли 5 раз. Затем остаток эмульгировали в хлороформе и отгоняли на вакуумном роторном испарителе для удаления диоксана; эту процедуру повторяли 3 раза, а остаток затем опять растворяли в хлороформе. Определенная нами (см. ниже) концентрация фосфата тетрабутиламмония в хлороформе составляла  $3 \cdot 10^{-2}$  М.

Выход этилового эфира *N*-ацетил-*L*-триптофана при ферментативном синтезе определяли следующим образом: реакционную систему отфильтровывали, полученный раствор досуха упаривали на роторном испарителе, остаток растворяли в равном исходному объеме этанола, отбирали 2 мл раствора и переносили их в кювету рН-стата (Radiometer TTT 1c) в 18 мл 0,1 М раствора КСl. Затем, поддерживая pH 7,5, в кювету вводили 0,5 мл  $10^{-6}$  М раствора химотрипсина. Концентрацию этилового эфира *N*-ацетил-*L*-триптофана находили, титруя щелочью ( $10^{-2}$  М КОН) *N*-ацетил-*L*-триптофан, образующийся при ферментативном гидролизе. Выход сложного эфира при ферментативном синтезе в двухфазной системе опре-

деляли на основании четырех независимых экспериментов; выход в них составил  $100 \pm 3\%$ .

*Выход глицерофосфата* при ферментативном синтезе определяли двумя независимыми методами. *А.* Реакционную смесь упаривали досуха на роторном испарителе, затем добавляли 20 мл 0,1 М глицинового буфера (рН 13), инкубировали 1 ч при перемешивании и определяли неорганический фосфат по методике [61]. Выход глицерофосфата находили по разности между исходным содержанием неорганического фосфата в системе и найденным после синтеза. *Б.* Реакционную смесь упаривали досуха, затем добавляли 20 мл 0,1 М глицинового буфера (рН 13), инкубировали 1 ч при перемешивании, доводили рН до 10,2, добавляли 1 мг/мл щелочной фосфатазы и  $5 \cdot 10^{-3}$  М  $MgSO_4$ , определяли неорганический фосфат по методике [61], инкубировали при перемешивании (25°) в течение 12 ч и снова определяли неорганический фосфат. Прирост неорганического фосфата, очевидно, равен количеству синтезированного ранее глицерофосфата. Методики *А* и *Б* давали практически одинаковые значения (отличающиеся друг от друга не более чем на 2%) для выхода глицерофосфата при ферментативном синтезе. Выход сложного эфира при ферментативном синтезе в двухфазной системе определяли на основании четырех независимых экспериментов; выход в них составил  $28 \pm 2\%$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Имобилизованные ферменты (1976) (Березин И. В., Мартинек К., Антонов В. К., ред.), Изд. МГУ.
2. Zaborsky O. R. (1973) *Immobilized Enzymes*, Chemical Rubber Co. Press, Cleveland.
3. Goldman R., Goldstein L., Katchalski E. (1971) in *Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports* (Stark G. R., ed.), pp. 1—78, Acad. Press, N. Y.
4. Tosa T., Mori T., Fuse N., Chibata I. (1966) *Enzymologia*, 31, 214—238.
5. Tosa T., Mori T., Fuse N., Chibata I. (1967) *Enzymologia*, 32, 153—168.
6. Tosa T., Mori T., Fuse N., Chibata I. (1967) *Biotechnol. and Bioeng.*, 9, 603—615.
7. Tosa T., Mori T., Fuse N., Chibata I. (1969) *Agric. and Biol. Chem.*, 33, 1047—1052.
8. Tosa T., Mori T., Chibata I. (1969) *Agric. and Biol. Chem.*, 33, 1053—1059.
9. Ohno Y., Stahmann M. A. (1971) *Macromolecules*, 4, 350—354.
10. Weetall H. H., Baum G. (1970) *Biotechnol. and Bioeng.*, 12, 399—407.
11. Wykes J. R., Dunnill P., Lilly M. D. (1971) *Nature New Biol.*, 230, 187.
12. Marconi W., Gulinelli S., Morisi F. (1974) *Chim. e ind.*, 56, 417—426.
13. Self D. A., Kay G., Lilly M. D. (1969) *Biotechnol. and Bioeng.*, 11, 337—348.
14. Hamilton B. K., Montgomery J. P., Wang D. I. (1974) in *Enzyme Engineering* (Pye E. K., Wingard L. B., Jr., eds.), vol. 2, pp. 153—158, Plenum Press, New York and London.
15. Mosbach K., Larson P.-O. (1970) *Biotechnol. and Bioeng.*, 12, 19—27.
16. Grove M. J., Strandberg G. W., Smiley K. L. (1971) *Biotechnol. and Bioeng.*, 13, 709—711.
17. Sofer S. S., Ziegler D. M., Popovich R. P. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 57, 183—189.
18. Parikh I., MacGlashan D. W., Fenselau C. (1976) *J. Med. Chem.*, 19, 296—299.
19. Gurne D., Shemin D. (1973) *Science*, 180, 1188—1190.
20. Becker W., Pfeil E. (1966) *J. Amer. Chem. Soc.*, 88, 4299—4300.
21. Cohen M. B., Spolter L., Chang C. C., MacDonald N. S., Takahashi J., Bobinet D. D. (1974) *J. Nucl. Med.*, 15, 1192—1195.
22. Marshall D. L. (1973) *Biotechnol. and Bioeng.*, 15, 447—453.
23. Traub A., Kaufmann E., Teitz Y. (1969) *Anal. Biochem.*, 28, 469—476.
24. Brown H. D., Patel A. B., Chattopadhyay S. K. (1968) *J. Chromatog.*, 35, 103—105.
25. Hoffman C. H., Harris E., Chodroff S., Michelson S., Rothrock J. W., Peterson E., Reuter W. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 41, 710—714.
26. Thang M. N., Grafle M., Grunberg-Manago M. (1968) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 31, 1—8.
27. Edwards V. H. (1972) in *Enzyme Engineering* (Wingard L. B., Jr., ed.), pp. 343—353, John Wiley and Sons, N. Y.
28. Barnard M. L., Laidler K. J. (1953) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 44, 338—346.
29. Inagami T., Sturtevant J. M. (1960) *Biochim. et biophys. acta*, 38, 64—69.
30. Singer S. J. (1962) in *Advances in Protein Chemistry* (Anfinsen C. B., Anson M. L., Bailey K., Edsall J. T., eds.), vol. 17, pp. 1—68, Acad. Press, N. Y.
31. Bettelheim F. A., Lukton A. (1963) *Nature*, 198, 357—359.
32. Bettelheim F. A., Senatore P. (1964) *J. chim. phys. et phys.-chim. biol.*, 61, 105—110.
33. Bielski B. H. J., Freed S. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, 89, 314—323.

34. Мосолов В. В., Афанасьев П. В., Долгих М. С., Лушникова Е. В. (1968) Биохимия, 33, 1030—1038.
35. Хургин Ю. И., Росляков В. Я., Азизов Ю. М., Каверзнева Е. Д. (1968) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2840.
36. Азизов Ю. М., Зверинская И. Б., Никитина А. Н., Росляков В. Я., Хургин Ю. И. (1968) Изв. АН СССР. Сер. хим., 2843.
37. Klyosov A. A., Viet N. V., Berezin I. V. (1975) Eur. J. Biochem., 59, 3—7.
38. Hussain Q. Z., Newcomb T. F. (1964) Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 115, 301—305.
39. Tosa T., Mori T., Chibata I. (1971) Enzymologia, 40, 49—63.
40. Schwabe C. (1969) Biochemistry, 8, 795—802.
41. Barth T., Jost K., Rychlik I. (1973) Collect. Czech. Chem. Commun., 38, 2011—2015.
42. Horvath C. (1974) Biochim. et biophys. acta, 358, 164—177.
43. Tanizawa K., Bender M. L. (1974) J. Biol. Chem., 249, 2130—2134.
44. Wan H., Horvath C. (1975) Biochim. et biophys. acta, 410, 135—144.
45. Weetall H. H., Vann W. P. (1976) Biotechnol. and Bioeng., 18, 105—118.
46. Butler L. G., Squires R. G. (1975) Enzyme Technol. Digest, 4, 3, 108.
47. Kelly S. J., Butler L. G., Squires R. G. (1976) Enzyme Technol. Digest, 5, 2, 107.
48. Брандтс Дж. Ф. (1973) в кн. Структура и стабильность биологических макромолекул (Тимашев С. П., Фасман Г. Д., ред.), с. 174—254, «Мир», М.
49. Davies J. T., Rideal E. K. (1961) Interfacial Phenomena, Acad. Press, N. Y.
50. Scholtens J. R., Bijsterbosch B. H. (1976) FEBS Lett., 62, 233—235.
51. Chang T. M. S. (1964) Science, 146, 524—525.
52. Chang T. M. S. (1972) Artificial Cells (Thomas C. C., ed.), Springfield.
53. Dinelli D. (1972) Process Biochem., 7, 9—12.
54. Козлов Л. В., Гинюдман Л. М. (1965) Биохимия, 30, 1051—1054.
55. Jencks W. P., Cordes S., Carriulo J. (1960) J. Biol. Chem., 235, 3608—3614.
56. Martinek K., Klyosov A. A., Kazanskaya N. F., Berezin I. V. (1974) Int. J. Chem. Kinet., 6, 801—811.
57. Martinek K., Osipov A. P., Yatsimirski A. K., Berezin I. V. (1973) Tetrahedron, 29, 963—969.
58. Гинюдман Л. М. (1954) Биохимия, 19, 666—676.
59. Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2930—2935.
60. RajBhandary U. Z., Young R. J., Khorana H. G. (1964) J. Biol. Chem., 239, 3875—3884.
61. Well-Melherble H., Green K. (1951) Biochem. Z., 49, 286—291.

Поступила в редакцию  
27.XII.1976

## PREPARATIVE ENZYMATIC SYNTHESIS IN BIPHASIC AQUEOUS-ORGANIC SYSTEM

MARTINEK K., KLIBANOV A. M., SAMOKHIN G. P.,  
SEMENOV A. N., BEREZIN I. V.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow*

A new approach to preparative enzymatic synthesis in aqueous-organic systems has been suggested. The gist of the method is that the enzymatic synthesis is carried out in a biphasic system «water — waterimmiscible organic solvent». The enzyme is in the aqueous phase, the fact eliminating the traditional problem of stabilizing the enzyme against its being inactivated by a nonaqueous solvent. Therefore the content of water in the suggested system may be extremely low, unlike that in commonly used «water — watermiscible organic solvent» systems. This allows the equilibrium to be drastically shifted in the reactions where water is one of the final products (e. g. synthesis of esters and amides, polymerization of amino acids, sugars and nucleotides, dehydration reactions etc.) towards the products.

The approach has been exemplified with synthesis of N-acetyl-L-tryptophan ethyl ester from the respective acid and alcohol. Particles of porous glass were impregnated with an aqueous buffer solution of chymotrypsin and suspended in chloroform containing N-acetyl-L-tryptophan and ethanol. In water (no organic phase) the yield of the ester in such synthesis is about 0.04%, whereas in the biphasic system it is almost 100%. This idea is also applicable when the product is an ion—in this case a hydrophobic counterion should be capable of providing solubility of the product in the nonaqueous phase. The method was also applied, with alkaline phosphatase used as a catalyst, to synthesize glycerophosphate from glycerol and inorganic phosphate with a 30% yield (in water, in the absence of organic phase the yield does not exceed 0.1%).