



УДК 541.128.1+577.15.02

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ В ДВУХФАЗНЫХ ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

III. СДВИГ ИОННЫХ РАВНОВЕСИЙ *

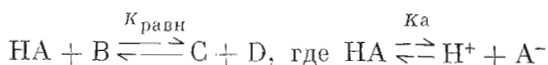
Семенов А. Н., Мартинек К.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

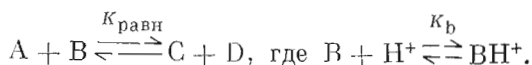
Изучены ионные равновесия в двухфазных системах «вода — не смешивающийся с водой органический растворитель». Показано, что в таких системах имеет место сдвиг эффективной величины pK кислот и оснований по сравнению с водными растворами, величина сдвига может быть до 5 и более единиц pH . Сдвиги pK поногенных реагентов, наблюдаемые в двухфазных системах, можно использовать в препаративном органическом синтезе для увеличения выхода целевого продукта в термодинамически неблагоприятных реакциях, катализируемых ферментами. Рассмотрены физико-химические причины сдвига равновесия химической реакции, протекающей с участием одного или двух ионогенных реагентов. Предложенный подход апробирован на примере катализируемых α -химотрипсином реакций синтеза этилового эфира *N*-бензоил-*L*-фенилаланина и синтеза дипептида *N*-ацетил-*L*-триптофанил-*L*-лейцинамида.

Недавно было предложено в качестве среды для катализируемых ферментами реакций синтеза использовать двухфазные системы «вода — не смешивающийся с водой органический растворитель» [2, 3]. В таких системах происходит существенный сдвиг химического равновесия (изменение константы равновесия на несколько порядков). Это позволяет в препаративном органическом синтезе повышать выход целевого продукта в термодинамически неблагоприятных реакциях, сохраняя при этом микроокружение катализатора (фермента), оптимальное для его функционирования.

В предыдущем сообщении [1] мы проанализировали количественные закономерности сдвига равновесия (увеличения выхода продуктов) химических реакций в двухфазных водно-органических системах по сравнению с водными растворами на примере реакций типа $A \rightleftharpoons B$, $A+B \rightleftharpoons C+D$ и $A+B \rightleftharpoons C+H_2O$. На практике весьма часто реализуется ситуация, когда такие относительно простые реакции осложняются ионизацией реагентов, например:



или

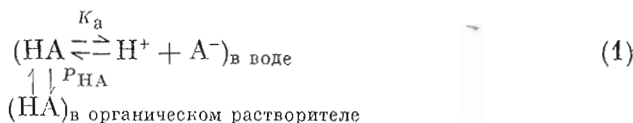


* Сообщение II см. [1].

При переходе от воды к двухфазным системам следует ожидать изменения не только константы равновесия собственно химической реакции ($K_{\text{равн}}$, как это было показано ранее [1–3]), но и степени ионизации ионогенного реагента. В результате сдвиг равновесия суммарного процесса (характеризуемого двумя эффективными константами равновесия $K_{\text{равн}}$ и K_a или соответственно $K_{\text{равн}}$ и K_b) будет, очевидно, зависеть от рН.

Цель настоящей работы заключается в том, чтобы, во-первых, проанализировать физико-химические причины изменения констант ионных равновесий в двухфазных водно-органических системах по сравнению с водными растворами; во-вторых, рассмотреть рН-зависимость равновесия химических реакций, протекающих с участием ионогенных реагентов; в-третьих, обратить внимание на перспективы, которые открываются в такой системе для увеличения выхода продуктов в катализируемых ферментами термодинамически неблагоприятных синтетических реакциях.

Сдвиг ионных равновесий. При ионизации кислоты в двухфазной водно-органической системе



будем полагать, что в органической фазе растворима лишь недиссоциированная ее форма*, здесь K_a — константа ионизации кислоты в воде, P_{HA} — коэффициент распределения незаряженной формы кислоты между органической и водной фазами. Эффективная константа ионизации кислоты в двухфазной системе определится соотношением

$$pK_{a, \text{двухфаз}} = \text{pH} - \lg \frac{[\text{A}^-]_{\text{общ}}}{[\text{HA}]_{\text{общ}}},$$

где $[\text{A}^-]_{\text{общ}}$ и $[\text{HA}]_{\text{общ}}$ — общие концентрации диссоциированной и недиссоциированной форм кислоты, рассчитанные на объем всей системы; рН характеризует водную фазу. Величины $[\text{A}^-]_{\text{общ}}$ и $[\text{HA}]_{\text{общ}}$ можно найти в результате совместного решения уравнений для константы диссоциации кислоты в воде:

$$pK_a = \text{pH} - \lg \frac{[\text{A}^-]_{\text{общ}}}{[\text{HA}]_{\text{общ}}}$$

и коэффициента распределения неионной формы между фазами

$$P_{\text{HA}} = [\text{HA}]_{\text{орг}} / [\text{HA}]_{\text{вод}},$$

а также уравнения материального баланса недиссоциированной формы кислоты:

$$[\text{HA}]_{\text{сбщ}} (V_{\text{вод}} + V_{\text{орг}}) = [\text{HA}]_{\text{вод}} V_{\text{вод}} + [\text{HA}]_{\text{орг}} V_{\text{орг}}.$$

Тогда

$$pK_{a, \text{двухфаз}} = pK_a + \lg(1 + \alpha P_{\text{HA}}), \quad (2)$$

где $\alpha = V_{\text{орг}} / V_{\text{вод}}$ — отношение объемов органической и водной фаз**.

Из уравнения (2) вытекает, что в двухфазных водно-органических системах наблюдаемое значение рК кислоты возрастает на величину $\lg(1 + \alpha P_{\text{HA}})$. Коэффициенты распределения P_{HA} для многих органических кислот лежат в интервале $10-10^3$ [4]; следовательно, при содержании водной фазы, равном, например, 1 об. % (т. е. при α , равном 100), сдвиг

* Это предположение, как правило, справедливо — см., например, [4]. Исключение составляют лишь сильнополярные растворители, которые способны экстрагировать из воды заряженные соединения с противоионами в виде ионных пар [5].

** В условиях, когда в органической фазе растворяется не только нейтральная, но и заряженная форма кислоты, сдвиг ионного равновесия также будет иметь место, но зависимость рК_а от α будет несколько сложнее.

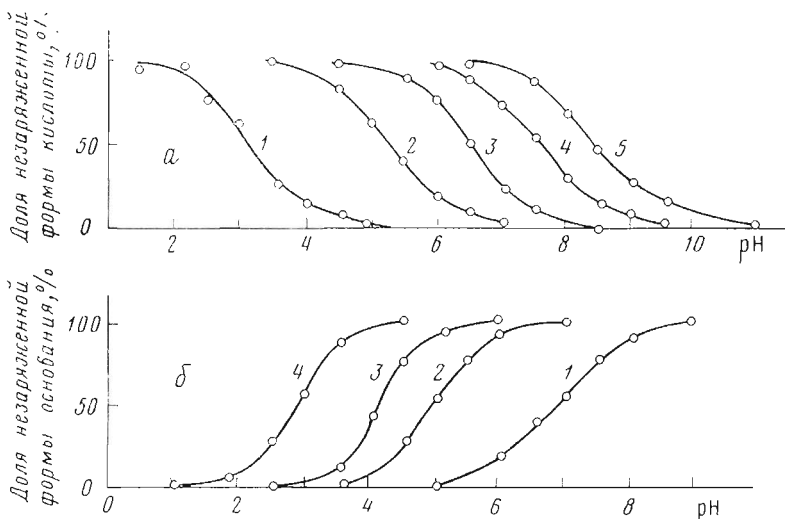
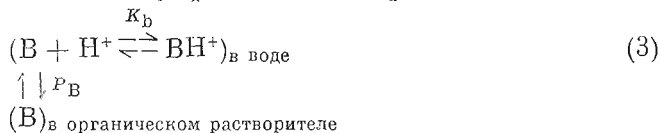


Рис. 1. Кривые спектрофотометрического титрования 2,4-динитрофенилтриптофана (а) и нейтрального красного (б) в двухфазных водно-органических системах вода — диэтиловый эфир и вода — хлороформ при разных соотношениях объемов органической и водной фаз (α): а — 0 (1), 0,1 (2), 1 (3), 10 (4), 50 (5); б — 0 (1), 0,1 (2), 1 (3), 30 (4)

pK_a должен составить 3–5 единиц. При дальнейшем увеличении α и соответствующем выборе органической фазы (позволяющем изменить величину P_{HA}) эта разница может стать еще более значительной.

Протонизацию основания в двухфазной водно-органической системе



описывает функция, аналогичная уравнению (2):

$$pK_{b, \text{двухфаз}} = pK_b - \lg(1 + \alpha P_B), \quad (4)$$

где K_b и $K_{b, \text{двухфаз}}$ — константы ионизации основания В в воде и двухфазной системе соответственно; P_B — коэффициент распределения основания В. Видно, что при переходе к двухфазным системам наблюдаемое значение pK_b уменьшается на величину $\lg(1 + \alpha P_B)$.

Предсказанные нами сдвиги величин pK в двухфазных системах действительно имеют место на опыте (рис. 1). В качестве модельных соединений были использованы 2,4-динитрофенилтриптофан (кислота) и нейтральный красный (основание) — вещества, за ионизацией которых удобно следить спектрофотометрически. Как видно из рисунка, при переходе от воды к двухфазным системам происходит сдвиг эффективного значения pK , величина которого зависит от соотношения объемов органической и водной фаз и достигает более чем 5 единиц в случае 2,4-динитрофенилтриптофана (рис. 1а, ср. кривые 1 и 5, содержание водной фазы 2 об.%) и почти 4 единиц в случае нейтрального красного (рис. 1б, ср. кривые 1 и 4, содержание водной фазы 3,3 об.%).

Зависимость эффективного значения pK от $\lg \alpha$ линейна (см. рис. 2), как и следует из уравнений (2) и (4) при достаточно малом содержании в системе воды. Для нейтрального красного в системе вода — хлороформ нами найден в независимом опыте (см. «Экспериментальную часть») коэффициент распределения незаряженной формы. Он оказался равен 500 ($\lg P = 2,7$). Построенная по уравнению (4) с использованием этого зна-

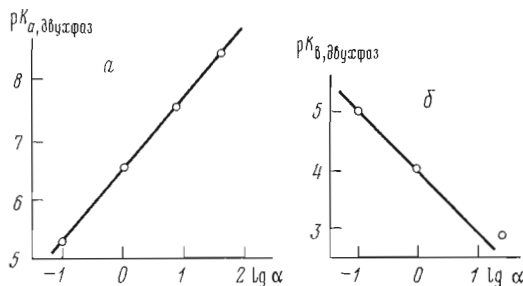
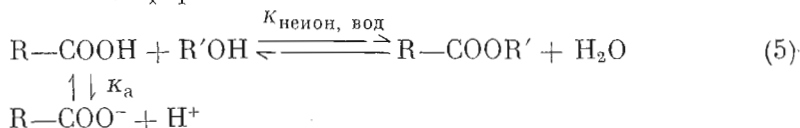


Рис. 2. Зависимость эффективных значений констант ионизации 2,4-динитрофенилтриптофана (а) и нейтрального красного (б) в двухфазных системах от соотношения объемов органической и водной фаз (α). По данным рис. 1

чения теоретическая зависимость удовлетворительно совпадает с экспериментальными результатами (см. рис. 2б).

Реакции с участием одной ионогенной группы. Примером химической реакции, протекающей с участием одной ионогенной группы, может служить синтез сложного эфира

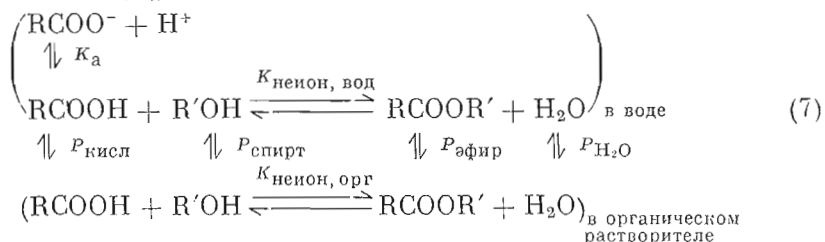


Наблюдаемая константа равновесия этой реакции в воде ($K_{\text{вск}}$) зависит от pH и равна: *

$$K_{\text{вод}} = \frac{[\text{эфир}] \cdot [\text{H}_2\text{O}]}{[\text{RCOOH} + \text{RCOO}^-] [\text{R'OH}]} = \frac{K_{\text{неион, вод}}}{1 + \frac{K_a}{[\text{H}^+]}} \quad (6)$$

где $K_{\text{неион, вод}}$ — константа равновесия реакции (5) в воде, рассчитанная на неионизованную форму кислоты. При нейтральных и близких к нейтральным значениях pH (в оптимальных условиях для функционирования ферментов, способных катализировать синтез) кислота, как правило, полностью диссоциирована и поэтому суммарное равновесие реакции (5) практически полностью смещено влево (см. [6]).

При переходе от воды к двухфазным водно-органическим системам равновесие реакции (5) определится также и распределением незаряженных реагентов между фазами:



Эффективная константа равновесия суммарного процесса (7) может быть записана в виде

$$K_{\text{двухфаз}} = \frac{[\text{RCOOR}']_{\text{общ}} [\text{H}_2\text{O}]_{\text{общ}}}{[\text{RCOOH} + \text{RCOO}^-]_{\text{общ}} [\text{R'OH}]_{\text{общ}}} = \frac{K_{\text{неион, двухфаз}}}{1 + \frac{K_a, \text{двухфаз}}{[\text{H}^+]}} \quad (8)$$

* При расчетах констант равновесия за стандартное состояние всех реагентов (в том числе и воды) принимали концентрацию 1 М.

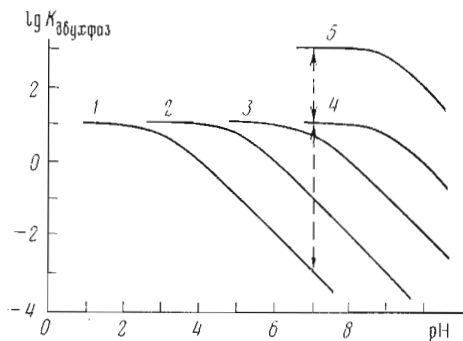


Рис. 3

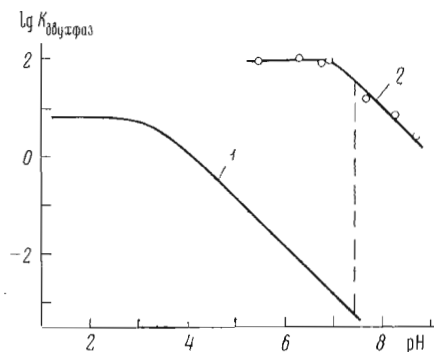


Рис. 4

Рис. 3. Теоретические кривые pH-зависимости эффективной константы равновесия реакции (7) синтеза сложного эфира в двухфазных водно-органических системах при разных соотношениях объемов органической и водной фаз (α): 0 (1), 1 (2), 10^2 (3), 10^3 (4), 10^4 (5). Рассчитано по формулам (2) и (8), принимая $K_{\text{неион, вод}} = 10$ (ср. [6]), $K_a = 10^{-3}$, $P_{\text{кисл}} = 10^2$. Для кривых 1–4 принято $K_{\text{неион, вод}} = K_{\text{неион, вод}}$; для кривой 5 значение $K_{\text{неион, двухфаз}}$ рассчитано по уравнению (9), полагая $P_{\text{эфир}} = 10^5$, $P_{\text{спирт}} = 0,1$, $P_{\text{H}_2\text{O}} = 10^{-2}$ (ср. [4])

Рис. 4. pH-Зависимость эффективной константы равновесия реакции синтеза этилового эфира N-бензоил-L-фенилаланина в воде (1) и в двухфазной системе вода-хлороформ (содержание водной фазы 5 об.%) (2). Кривую (1) рассчитывали по формуле (6), принимая $K_{\text{неион, вод}} = 7$ [5] и $pK_a = 3,3$ (определено в независимом эксперименте методом спектрофотометрического титрования)

где $[H^+]$ — концентрация ионов водорода в водной фазе и $K_{a, \text{двухфаз}}$ определяется уравнением (2); $K_{\text{неион, двухфаз}}$ — константа равновесия в двухфазной системе, рассчитанная (см. [4]) на неионизованную форму кислоты:

$$K_{\text{неион, двухфаз}} = K_{\text{неион, вод}} \frac{(1 + \alpha P_{\text{эфир}})(1 + \alpha P_{\text{H}_2\text{O}})}{(1 + \alpha P_{\text{кисл}})(1 + \alpha P_{\text{спирт}})}, \quad (9)$$

где $P_{\text{эфир}}$, $P_{\text{H}_2\text{O}}$, $P_{\text{спирт}}$ и $P_{\text{кисл}}$ — коэффициенты распределения сложного эфира, воды, спирта и недиссоциированной формы кислоты.

Проанализируем уравнение (8) более подробно. Поскольку в двухфазных системах эффективное значение pK_a кислоты по сравнению с водой может только увеличиться (см. уравнение (2)), область максимального значения константы равновесия суммарной реакции (7) всегда смещается в сторону более высоких значений pH. Как было показано выше (см. анализ уравнения (2) и экспериментальные данные на рис. 1), величина этого сдвига вполне может составить (в зависимости от величины $P_{\text{на}}$ данной кислоты и содержания водной фазы в системе) 3–5 ед. pH и более. Нами были рассчитаны по уравнению (8) pH-зависимости эффективной константы равновесия процесса (7) (рис. 3). При этом для кривых 1–4 условно принято (чтобы отдельно проанализировать вклад, обусловленный только сдвигом pK_a кислоты в двухфазной системе), что $K_{\text{неион, вод}} = K_{\text{неион, двухфаз}}$. Как видно, двухфазные системы открывают реальную возможность (подбирая значение α) совместить pH-область, термодинамически благоприятную для синтеза целевого продукта (pH-область, где константа равновесия достигает предельно высокого значения), с pH-оптимумом каталитической активности фермента. А именно: если в воде для синтеза термодинамически благоприятными являются лишь «кислые» значения pH (кривая 1), то по мере уменьшения содержания водной фазы в двухфазной системе можно pH-независимую область предельно высокого значения константы равновесия продвинуть далеко до нейтральных или щелочных значений pH, где оптимально работает тот или другой используемый фермент. В результате такого сдвига (при реально достижимых значениях $\alpha \sim 10^4$) изменение константы равновесия, наблюдаемое,

например, при рН 7, составляет 4 порядка — ср. кривые 1 и 4 на рис. 3 (пунктир).

Более того, в двухфазной водно-органической системе заложен дополнительный источник сдвига равновесия, подробно обсужденный нами ранее [4]. Дело в том, что наряду с эффективным значением pK_a , характеризующим диссоциацию исходной кислоты, в двухфазной системе может измениться также и эффективная константа равновесия самого синтеза, протекающего с участием недиссоциированной формы $RCOOH$ — см. уравнения (7) и (8). Вклад этого рН-независимого эффекта в суммарную константу равновесия $K_{\text{двухфаз}}$ определяется уравнением (9). Как было показано в работах [1—3], при благоприятных соотношениях коэффициентов распределения исходных и конечных реагентов этот дополнительный сдвиг равновесия в сторону целевого продукта также может быть весьма существенным. На рис. 3 величина этого дополнительного рН-независимого вклада в суммарный сдвиг равновесия достигает двух порядков. Это видно по смещению кривой 5 вверх по сравнению с кривой 4. В результате при нейтральных значениях рН (~ 7) суммарное изменение константы равновесия в сторону синтеза достигает 6 порядков при реально достижимых значениях α , соответствующих содержанию водной фазы в двухфазной системе 0,01 об. % (ср. кривые 1 и 5).

Известно, что совместить рН-оптимумы константы равновесия реакции и каталитической активности фермента можно в принципе иным путем: иммобилизуя фермент на заряженных (полиэлектролитных) носителях. В результате иммобилизации на заряженном носителе изменяется локальная концентрация ионов водорода вблизи фермента, что приводит к сдвигу рН-зависимости его каталитической активности в сторону кислотных или щелочных (в зависимости от знака заряда носителя) значений рН [7, 8]. Следовательно, подбирая полиэлектролитный носитель для иммобилизации, можно сдвинуть рН-оптимум фермента в область значений рН, термодинамически благоприятных для синтеза целевого продукта. Именно такой путь представляется перспективным для получения, например, «полусинтетических» β -лактамных антибиотиков с помощью пенициллинамидазы [9]. Этот подход, однако, не нашел до настоящего времени практического применения по крайней мере по двум причинам: во-первых, наблюдаемые эффекты сдвига рН-зависимости активности фермента, как правило, невелики (не более 2 единиц рН), и, во-вторых, такие сдвиги могут достигаться только при низкой ионной силе среды (не более 10^{-2} М), что, например, не позволяет работать в присутствии высоких концентраций заряженного субстрата, в буферных системах и т. п. Кроме того, данный подход (связанный с иммобилизацией фермента на полиэлектролитном носителе) не затрагивает фактически термодинамику катализируемой реакции (в отличие от предлагаемого нами метода двух фаз) и поэтому в принципе не позволяет улучшить константу равновесия (или соответственно выход целевого продукта) при любом заданном значении рН.

Катализируемый α -химогрисином синтез этилового эфира N-бензоил-L-фенилаланина. Примером рН-зависимой реакции типа (7) может служить синтез этилового эфира N-бензоил-L-фенилаланина из кислоты и спирта. Эта реакция ранее была изучена [1] при одном значении рН. Из сравнения рН-зависимостей эффективной константы равновесия, наблюдаемой в двухфазной системе хлороформ — 5 об. % воды, и константы, характеризующей равновесие в воде и рассчитанной по уравнению (6) (при $K_{\text{неион, вод}} = 7$ (см. [6]) и $pK_a = 3,3$ — определено в независимом эксперименте методом спектрофотометрического титрования, рис. 4), видно, что при переходе от воды к двухфазной водно-органической системе произошел сдвиг эффективного значения pK_a более чем на 3 единицы (см. смещение кривой 2 вправо по оси абсцисс по сравнению с кривой 1). Кроме того, эффективное значение константы равновесия, характеризующее синтез с участием неионной формы кислоты ($K_{\text{неион, двухфаз}}$), возросло более чем на

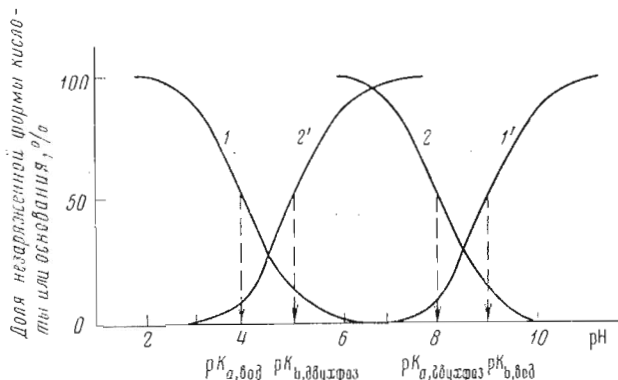
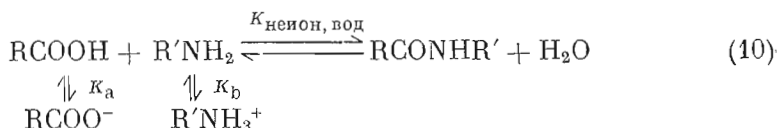


Рис. 5. Теоретические кривые титрования карбоксильного (1, 2) и аминного (1', 2') компонентов реакции (10) в воде (1, 1') и двухфазной водно-органической системе (2, 2'). Рассчитывали по формулам (2) и (4) для $\alpha=10^2$, полагая $P_{\text{кисл}} = P_{\text{амин}} = 10^2$

порядок (см. смещение кривой 2 вверх по оси ординат). В итоге сдвиг суммарной константы равновесия, наблюдаемый при pH 7,5 (оптимум каталитической активности используемого α -химотрипсина), составляет ~ 5 порядков (см. пункт на рис. 4). В результате стало возможным при нейтральных значениях pH обратить реакцию гидролиза практически полностью в сторону синтеза; выход сложного эфира в данной системе составил $\sim 80-100\%$ (в зависимости от концентраций реагентов, см. «Экспериментальную часть»). В воде при прочих равных условиях выход не превышал 0,001% [6].

Реакция с участием двух ионогенных групп. Примером реакции, протекающей с участием двух ионогенных групп, может служить синтез амидной связи:



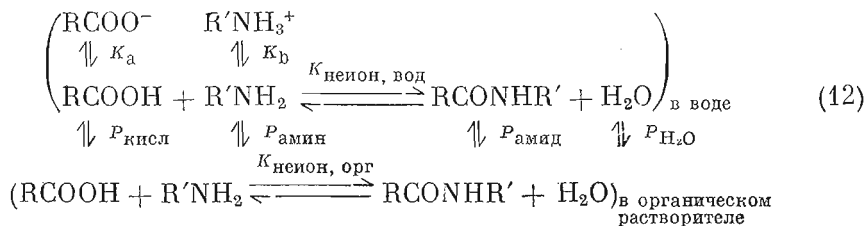
Константа равновесия этой реакции в воде зависит от pH и равна:

$$K_{\text{вод}} = \frac{K_{\text{неион, вод}}}{1 + [\text{H}^+]/K_b + K_a/[\text{H}^+] + K_a/K_b} \quad (11)$$

Значения pK_a карбоновых кислот лежат обычно в интервале 3–4, а pK_b аминов $\sim 8-10$. Следовательно, в воде во всем интервале значений pH хотя бы один из исходных реагентов находится практически полностью в заряженной форме (см. рис. 5, 1 и 1'). В результате равновесие суммарной реакции (10), как правило, сдвинуто влево, т. е. в сторону гидролиза (см. [6]). Иными словами, даже при оптимальном pH (см. рис. 6, 1) суммарное значение константы равновесия неблагоприятно отличается от константы $K_{\text{неион, вод}}$ (рассчитанной на неионизованные формы кислоты и амина) на множитель $K_b/K_a \approx 10^{-4}-10^{-5}$. Это следует из уравнения (11), если исходить из указанных выше наиболее распространенных характеристик кислотности исходных реагентов.

В двухфазной водно-органической системе равновесие рассматриваемой реакции будет более сложным, поскольку необходимо учесть распре-

деление неионных реагентов между фазами:



Наблюдаемая в этом случае константа равновесия примет вид

$$K_{\text{двухфаз}} = \frac{[\text{амид}]_{\text{общ}} [\text{H}_2\text{O}]_{\text{общ}}}{[\text{RCOOH} + \text{RCOO}^-]_{\text{общ}} [\text{R}'\text{NH}_2 + \text{R}'\text{NH}_3^+]_{\text{общ}}} = \frac{K_{\text{неион, двухфаз}}}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_b, \text{двухфаз}} + \frac{K_a, \text{двухфаз}}{[\text{H}^+]} + \frac{K_a, \text{двухфаз}}{K_b, \text{двухфаз}}}, \quad (13)$$

где эффективные значения констант кислотности определяются уравнениями (2) и (4), а константа равновесия, рассчитанная на неионизованные формы реагентов по аналогии с уравнением (9) (см. также [3]), равна

$$K_{\text{неион, двухфаз}} = K_{\text{неион, вод}} \frac{(1 + \alpha P_{\text{амид}})(1 + \alpha P_{\text{H}_2\text{O}})}{(1 + \alpha P_{\text{кисл}})(1 + \alpha P_{\text{амид}})}. \quad (14)$$

Как видно из схемы (12), распределение неионных компонентов реакции между фазами должно оказывать влияние как на стадии ионизации кислоты и амина, так и на равновесие синтеза амида из неионизованных форм этих исходных реагентов. Из уравнения (13) следует, что каждый из этих вкладов, который вносится в изменение наблюдаемой константы равновесия соответственно за счет сдвига ионных равновесий (см. знаменатель в правой части уравнения) и за счет сдвига равновесия синтеза из неионизованных реагентов (см. числитель), можно проанализировать раздельно.

Так, в двухфазных водно-органических системах по сравнению с водой эффективное значение pK_a кислоты всегда увеличивается, а величина pK_b основания всегда уменьшается (см. уравнения (2) и (4)). Это означает, что при нейтральных значениях pH в той или иной степени повышается доля незаряженных форм как кислоты, так и амина (см. рис. 5, 2 и 2'), и, следовательно, равновесие реакции (10) должно сдвигаться вправо, т. е. в сторону синтеза. Чтобы оценить величину этого pH-зависимого эффекта, рассмотрим, насколько может измениться наблюдаемая константа равновесия в рамках одного знаменателя правой

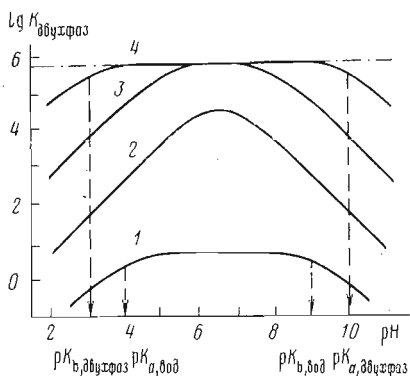


Рис. 6. Теоретические кривые pH-зависимости константы реакции (10) синтеза амидной связи в воде (1) и двухфазных водно-органических системах (2-4) при $\alpha=1$ (2), 10^2 (3) и 10^4 (4). Рассчитывали по формуле (13), полагая $K_{\text{неион, двухфаз}} = K_{\text{неион, вод}} = 5 \cdot 10^5$, ср. [6], и $K_a = 10^4$, $K_b = 10^{-9}$, $P_{\text{кисл}} = P_{\text{амин}} = 10^2$. Горизонтальным пунктиром обозначена величина константы равновесия реакции (10), рассчитанная на неионизованные формы реагентов ($K_{\text{неион, вод}}$)

части уравнения (13). При этом будем исходить из типичных значений $pK_a=4$, $pK_b=9$, $K_{\text{неион, вод}}=5 \cdot 10^5$ (см. [6]) и $P_{\text{кисл}}=P_{\text{амин}}=10^2$ (ср. [4]). Чтобы раздельно проанализировать рН-зависимый и рН-независимый эффекты, примем, что $K_{\text{неион, двухфаз}}=K_{\text{неион, вод}}$. Видно, что по мере уменьшения содержания воды в системе происходит сближение эффективных значений pK исходных реагентов и, наконец, даже их инверсия. За счет этого возрастает оптимальное значение суммарной константы равновесия; при этом значение $K_{\text{двухфаз}}$ стремится (в результате инверсии характеристик кислотности исходных амина и кислоты) к величине $K_{\text{неион, двухфаз}}$. Иными словами, в конечном итоге (при весьма малом содержании воды) ионные равновесия исходных реагентов *полностью* сдвинуты в сторону их неионных форм. При реально достижимых значениях $\alpha=10^2-10^4$ соответствующее изменение константы равновесия составит 5 порядков (ср. кривые 1 и 4 на рис. 6).

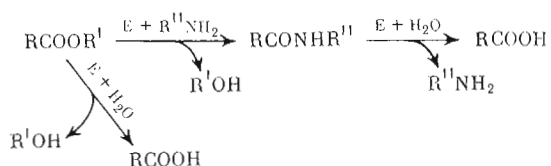
Дополнительный источник сдвига суммарного равновесия (10) заключается в том, что при благоприятных соотношениях коэффициентов распределения не только исходных, но и конечных реагентов может измениться также и эффективная константа равновесия самого синтеза, идущего с участием неионизованных форм реагентов (см. уравнение (14) и более подробно в [1]). Величина этого рН-независимого эффекта в зависимости от соотношения коэффициентов распределения реагентов также может достигать нескольких порядков [3]. Таким образом, двухфазные водно-органические системы открывают реальную возможность для сдвига равновесия реакций типа (10) в сторону синтеза.

Пептидный синтез. Наиболее заманчивым представляется использовать разрабатываемый нами подход для синтеза пептидной связи. В настоящее время синтетические олигопептиды и их производные широко применяются в научно-исследовательской практике, в медицине, пищевой и легкой промышленности [10], однако их химический синтез весьма сложен (особенно в случае оптически активных и лабильных соединений), а также соединений, содержащих большое количество требующих защиты функциональных групп. Применение ферментов позволяет существенно упростить процедуру синтеза. При этом, однако, возникает проблема увеличения выхода конечного продукта, поскольку ферменты «работают» в водном растворе, а равновесие реакции (10) в воде, как уже говорилось, практически полностью сдвинуто в сторону гидролиза. В настоящее время разработаны три подхода, позволяющих увеличить выход целевого продукта в ферментативной реакции.

1. Получаемый продукт иногда плохо растворим в воде (существенно хуже исходных реагентов), и за счет этого можно сместить равновесие вправо [11–19]. Метод обладает двумя существенными недостатками: 1) требование низкой растворимости конечного продукта сильно ограничивает выбор соединений, которые могут быть синтезированы таким способом [14]; 2) образование осадка в процессе реакции затрудняет применение в качестве катализаторов нерастворимых производных ферментов.

2. Выход продукта можно повысить, уменьшив концентрацию воды в системе, т. е. если проводить реакцию не в воде, а в водно-органической смеси с высоким содержанием неводного компонента [20–24]. В таких системах, кроме того, происходит некоторый сдвиг величины pK_a кислоты (pK_b аминного компонента при этом практически не изменяется); в результате равновесие реакции (10) дополнительно сдвигается вправо [20]. Недостатком метода является то, что в присутствии высоких концентраций органических растворителей существенно ухудшаются такие важные характеристики ферментов, как каталитическая активность, специфичность и стабильность [20, 25, 26]. Даже в оптимальных условиях концентрация воды не может уменьшаться более чем в 10–20 раз, что, естественно, ограничивает возможности метода.

3. В качестве исходного реагента используют не свободную кислоту, а ее активированное производное (обычно сложный эфир) [27–30]. В присутствии амина реакция гидролиза этого активированного производного частично протекает через промежуточное образование амида:



При этом наблюдаемая зависимость концентрации амида (пептида) от времени имеет вид кривой с максимумом, причем в максимуме концентрация амида может быть существенно выше равновесной [31, 32]. Недостатком этого неравновесного (кинетического) подхода является необходимостью синтеза активированного производного.

Перечисленных недостатков лишен рассмотренный выше метод ферментативного синтеза пептидной связи в двухфазных водно-органических системах. В большинстве случаев не смешивающиеся с водой органические растворители весьма незначительно растворяются в водной фазе — не более нескольких об. % [4]. В таких концентрациях органические растворители, как правило, незначительно влияют на каталитическую активность и стабильность ферментов [25, 26]. Тем не менее в отдельных случаях, например при наличии специфических взаимодействий, даже в таких условиях каталитические свойства ферментов могут ухудшаться. В этом случае следует, очевидно, подобрать другой, более инертный (по отношению к ферменту) органический растворитель. Метод позволяет синтезировать практически любые пептиды непосредственно из амидного и карбоксильного компонентов с высоким выходом. Кроме того, поскольку получающийся пептид, как правило, полностью экстрагируется в органическую фазу, а фермент локализован в воде, существенно упрощается процедура выделения и очистки конечного продукта и отделения катализатора от реакционной смеси для повторного использования.

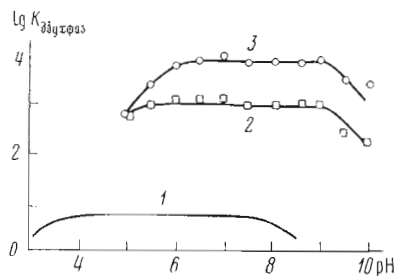
Катализируемый α -глютамином пептидный синтез. Разрабатываемый нами метод апробирован на примере реакции синтеза N-ацетил-L-триптофанил-L-лейцинамида:



Экспериментальные результаты представлены на рис. 7 (кривые 2 и 3) в виде зависимости константы равновесия реакции (15) в двухфазной системе вода — этилацетат от pH при различных соотношениях объемов органической и водной фаз. Из рисунка видно, что при переходе от воды как среды реакции к двухфазной водно-органической системе происходит сдвиг величины pK_a карбоксильного компонента (N-ацетил-L-триптофана) почти на 3 единицы (при содержании водной фазы 2 об. %; см. сдвиг кривой 3 вправо по отношению к кривой 1). Несколько неожиданным представляется тот факт, что значение pK_b лейцинамида при переходе от воды к двухфазной системе несколько увеличилось. Это можно объяснить, по-видимому, тем, что этилацетат, будучи весьма полярным растворителем (или вследствие специфических сольватационных взаимодействий), более эффективно экстрагирует из воды заряженную форму лейцинамида [5].

Тем не менее суммарная константа равновесия реакции синтеза возросла более чем на 3 порядка. В результате равновесие реакции (15) значительно сдвинулось вправо и нам удалось осуществить препаративный синтез дипептида. Выход продукта в системе вода — этилацетат (содержание водной фазы 2 об. %) при концентрациях исходных реагентов [N-

Рис. 7. pH-Зависимость эффективной константы равновесия реакции синтеза *N*-ацетил-*L*-триптофанил-лейцинамида в воде (1) и двухфазной системе вода — этилацетат при содержании водной фазы 17 об. % (2) и 2 об. % (3). Кривую (1) рассчитывали по формуле (11), принимая $K_{\text{исчон. вод}} = 5 \cdot 10^5$ [6], $pK_a = 3,2$ (определено в независимом эксперименте методом спектрофотометрического титрования), $pK_b = 8$ [33]



$\text{Ac-L-Trp}]_0 = [L\text{-Leu-NH}_2]_0 = 4 \cdot 10^{-4}$ М и pH 7,0 составил 44%. Более того, при избытке одного из реагентов выход может достигать почти 100%, в то время как в воде в этих условиях не превышает 0,01% [6]. Таким образом, применение двухфазных систем позволило поднять выход с ничтожно малого до препаративного уровня.

Экспериментальная часть

В работе использовали: бычий α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1) Олайнского завода химреактивов (марка А); *N*-бензоил-*L*-фенилаланин (Serva, США), *N*-ацетил-*L*-триптофан и *L*-лейцинамид (Rcanal, Венгрия), 2,4-динитрофенилтриптофан, нейтральный красный, минеральные соли, щелочи, органические растворители (Союзреактив) марки ос.ч. или ч.д.а.

Значение pK_a *N*-бензоил-*L*-фенилаланина и *N*-ацетил-*L*-триптофана определяли следующим образом: 0,1 мл 8 мМ запасного раствора соответствующей кислоты смешивали при 20° С с 2 мл 0,5 М фосфатного буфера и при значениях pH 1–7 определяли поглощение при 250 нм в случае *N*-бензоил-*L*-фенилаланина и при 293 нм в случае *N*-ацетил-*L*-триптофана. В кювете сравнения — раствор этой же кислоты такой же концентрации при pH 1. Затем строили зависимость поглощения от pH и величину pK_a определяли по положению точки перегиба.

Значение pK_a 2,4-динитрофенилтриптофана в системе вода — диэтиловый эфир определяли следующим образом: к 5 мл 30 мкМ раствора 2,4-динитрофенилтриптофана в диэтиловом эфире добавляли определенное количество (0,1–50 мл) буфера ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{CH}_3\text{COONa} + \text{H}_3\text{BO}_3$, 0,1 М по каждому компоненту) с pH от 1 до 11, перемешивали и определяли поглощение органической фазы при 20° С и 340 нм. Затем строили зависимость поглощения от pH и величину pK_a определяли по положению точки перегиба.

Значение pK_b нейтрального красного в системе вода — хлороформ определяли следующим образом: 0,5 мл 5 мМ запасного раствора нейтрального красного в 60% этаноле смешивали с 0,95 мл буфера ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{CH}_3\text{COONa} + \text{H}_3\text{BO}_3$, 0,1 М по каждому компоненту) с pH от 1 до 6, добавляли определенное количество хлороформа (0,1–30 мл), перемешивали, отбирали 0,5 мл водной фазы, добавляли 2 мл буфера с pH 4,0 и определяли поглощение при 20° С при 510 нм. Затем строили зависимость поглощения от pH и величину pK_b определяли по положению точки перегиба.

Коэффициент распределения нейтрального красного определяли следующим образом: к 5 мл 5 мМ раствора нейтрального красного в хлороформе добавляли равный объем 0,1 М фосфатного буфера с pH 9,0. Систему перемешивали, давали отстояться до полного разделения фаз и определяли поглощение водной фазы при 450 нм. Отбирали 0,5 мл органической фазы, упаривали досуха, остаток растворяли в 20 мл того же буфера и определяли поглощение при 450 нм. Коэффициент распределения рассчитывали как отношение этих двух величин поглощения (с учетом разбавления).

Ферментативный синтез этилового эфира *N*-бензоил-*L*-фенилаланина проводили по методике, описанной нами ранее [3].

Ферментативный синтез *N*-ацетил-*L*-триптофанил-*L*-лейцинамида вели следующим образом: 10 мг α -химотрипсина растворяли в 1 мл 0,03 М раствора *L*-лейцинамида в воде, добавляли 0,5 мл 0,5 М фосфатного буфера (рН 5–10) и определенное количество насыщенного водой этилацетата, содержащего 0,4 мМ *N*-ацетил-*L*-триптофана (7,5–75 мл). Систему перемешивали несколько суток при 20° С, отбирали 5 мл органической фазы, упаривали на роторном испарителе досуха и остаток растворяли в 1 мл этилацетата. Полученный раствор наносили на пластинки марки «Silufol», хроматографировали в системе хлороформ – этанол – 36% водный аммиак, 100 : 20 : 1, пятно с *R_f* 0,30 вырезали, элюировали 5 мл этанола, центрифугированием отделяли частицы силикагеля и определяли поглощение раствора при 280 нм. Коэффициент молярного поглощения *N*-ацетил-*L*-триптофанил-*L*-лейцинамида в этаноле принимали равным 6500 М⁻¹ см⁻¹. Для оценки этой величины нами были определены коэффициенты молярного поглощения *N*-ацетил-*L*-триптофана, двух его производных (метилового эфира и амида) и *N*-глицилтриптофана в этаноле. Значения коэффициентов молярного поглощения для них оказались равными 6450, 6600, 6600 и 6250 М⁻¹ см⁻¹ соответственно. Среднее значение (6500) нами было использовано в работе.

Авторы выражают искреннюю благодарность чл.-кор. АН СССР И. В. Березину за постоянный интерес к работе, плодотворное обсуждение и полезные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Семенов А. Н., Мартинек К., Березин И. В. (1980) Биоорг. химия, 6, 600–608.
2. Мартинек К., Клибанов А. М., Самохин Г. П., Семенов А. Н., Березин И. В. (1977) Биоорг. химия, 3, 696–702.
3. Klibanov A. M., Samokhin G. P., Martinek K., Berezin I. V. (1977) Biotechnol. and Bioeng., 19, 1351–1361.
4. Leo A., Hansch C., Elkins D. (1971) Chem. Rev., 71, 525–616.
5. Шварц М. (1975) в кн.: Ионы и ионные пары в органических реакциях (Шварц М., ред.), с. 13–40. «Мир», М.
6. Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1977) Биоорг. химия, 3, 99–104.
7. Имобилизованные ферменты (1976) Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К., ред., т. 2, с. 58–62, Изд-во МГУ.
8. Березин И. В., Клибанов А. М., Мартинек К. (1975) Успехи химии, 44, 17–47.
9. Шведас В.-Ю. К., Клесов А. А. (1978) в кн.: Итоги науки и техники, сер. «Биологическая химия», т. 12 (Кретович В. Л., Березин И. В., ред.), изд. ВНИИТИ, М.
10. Synthetic production and utilization of amino acids (1974) Kaneko T., Izumi Y., Chibata I., Itoh T., eds, Kodansha Ltd Tokyo, John Wiley and Sons New York, chapter 6.
11. Bergmann M., Fruton J. S. (1938) J. Biol. Chem., 124, 321–329.
12. Kimmel J. R., Smith B. L. (1957) in Adv. enzymol. and related subjects biochem., vol. 19 (Nord F. F., ed.), pp. 308–312, Interscience publishers, Inc. New York.
13. Luisi P. L., Saltman R., Vlach D., Guarnaccia R. (1977) J. Mol. Cat., 2, 133–138.
14. Saltman R., Vlach D., Luisi P. L. (1977) Biopolymers, 16, 631–638.
15. Isowa Y., Ohmori M., Ichikawa T., Kurita H., Sato M., Mori K. (1977) Bull. Chem. Soc. Jap., 50, 2762–2765.
16. Isowa Y., Ohmori M., Sato M., Mori K. (1977) Bull. Chem. Soc. Jap., 50, 2766–2772.
17. Isowa Y., Ichikawa T., Ohmori M. (1978) Bull. Chem. Soc. Jap., 51, 271–276.
18. Oka T., Morihara K. (1978) J. Biochem., 84, 1277–1283.
19. Wong C.-H., Chen S.-T., Wang K.-T. (1979) Biochim. et biophys. acta, 576, 247–249.
20. Homandberg G. A., Mattis J. A., Laskowski M.-Jr. (1978) Biochemistry, 17, 5220–5227.
21. Homandberg G. A., Laskowski M. Jr. (1979) Biochemistry, 18, 586–592.
22. Inouye K., Watanabe K., Morihara K., Tochino Y., Kanaya T., Emura J., Sakakibara S. (1979) J. Amer. Chem. Soc., 101, 751–752.
23. Morihara K., Oka T., Tsuzuku H. (1979) Nature, 280, 412–413.
24. Vann W. P., Weetall H. H. (1976) J. Solid-Phase Biochem., 1, 297–306.
25. Butler L. G. (1979) Enzyme Microb. Technol., 1, 253–259.
26. Клибанов А. М., Семенов А. Н., Самохин Г. П., Мартинек К. (1978) Биоорг. химия, 4, 82–86.

27. Ботвиник М. М., Остославская В. И. (1958) Докл. АН СССР, 123, 285–288.
28. Ботвиник М. М., Остославская В. И. (1961) Ж. общ. химии, 31, 3234–3243.
29. Morihara K., Oka T. (1977) Biochem. J., 163, 531–542.
30. Oka T., Morihara K. (1977) J. Biochem., 82, 1055–1062.
31. Марголин А. Л. (1978) Канд. дис. «Кинетико-термодинамическое изучение ферментативного синтеза β -лактамных антибиотиков», МГУ.
32. Svedas V. K., Margolin A. L., Berezin I. V. (1980) in: Enzyme Engineering: Future Directions (Wingard L. B., Berezin I. V., Klyosov A. A., eds), pp. 257–293, Plenum Press, N. Y.
33. Hay R. W., Porter L. J., Morris P. J. (1966) Austral. J. Chem., 19, 1197–1205.

Поступила в редакцию
26.XII.1979

ENZYMATIC SYNTHESIS IN BIPHASIC AQUEOUS-ORGANIC SYSTEMS. III. THE SHIFT OF IONIC EQUILIBRIA

SEMENOV A. N., MARTINEK K.

Chemical Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

Ionic equilibria in biphasic systems «water – immiscible organic solvent» have been studied. In such systems, the shift of the effective pK values of acids and bases up to 5 and more pH units, as compared with aqueous solutions, takes place. The pK shifts of ionogenic reagents observed in biphasic systems can be utilized in preparative organic synthesis in order to increase the yield of the end product in thermodynamically unfavourable reactions catalyzed by enzymes. Physico-chemical reasons for the equilibrium shift of a chemical reaction involving one or two ionogenic reagents are considered. The proposed approach is tested in the α -chymotrypsin catalyzed synthesis of N-benzoyl-L-phenylalanine ethyl ester and N-acetyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide.