



УДК 577.152.344.03:541.182

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ *n*-НИТРОАНИЛИДА
N-БЕНЗОИЛ-*L*-ТИРОЗИНА В СИСТЕМЕ АЭРОЗОЛЬ ОТ/ВОДА:
2,3-БУТАНДИОЛ/ОКТАН

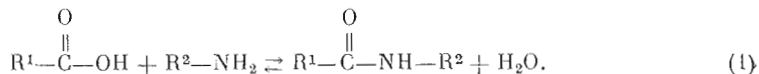
Богданова Н. Г., Блячко Н. Л., Кабаков В. Е.,
Мартинек К.*, Левашов А. В.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
кафедра химической энзимологии;

*Институт органической химии и биохимии ЧСАН, Прага

Показана принципиальная возможность ферментативного синтеза амидной связи в реакции *N*-замещенных аминокислот с *n*-нитроанилином. В качестве практического примера осуществлен синтез *n*-нитроанилида *N*-бензоил-*L*-тирозина, катализируемый α -химотрипсином в системе обращенных мицелл Аэрозоль ОТ/вода: 2,3-бутандиол/октан с общим содержанием воды 0,01%. Выход продукта составил 30%.

Применение ферментов для тонкого органического синтеза во многих случаях имеет несомненные преимущества по сравнению с классическими методами синтетической органической химии [1–4]. Это объясняется прежде всего уникальной избирательностью (специфичностью), т. е. возможностью избежать образования побочных продуктов, и высокой каталитической активностью биокатализаторов, проявляющейся обычно в мягких условиях. В то же время, несмотря на очевидные преимущества ферментативных методов синтеза, применение их существенно ограничено, в первую очередь как раз тем, что ферменты сохраняют свои уникальные свойства в довольно узком диапазоне условий: как правило, в водных растворах и при невысоких температурах, что часто не отвечает термодинамическим условиям достижения высокого выхода продукта катализируемой реакции. Например, равновесие реакции образования пептидной (амидной) связи в водных растворах практически полностью смещено в сторону гидролиза, так как одним из продуктов является вода:



Так, по данным работы [5], выход продукта в реакции образования *n*-нитроанилида *N*-ацетилфенилаланина из *N*-ацетилфенилаланина и *n*-нитроанилина при проведении синтеза в воде составляет не более 0,05%.

Общим подходом, позволяющим сдвинуть равновесие реакции (1) в сторону синтеза пептидной связи, очевидно, может быть существенное снижение содержания воды в реакционной среде. Этот подход к настоящему времени реализован в целом ряде систем, в той или иной мере использующих смешивающиеся или не смешивающиеся с водой органические растворители [4, 6–11], в том числе в системах гидратированных обращенных мицелл [12–14]. Последние были с успехом использованы Луизи с сотр. [15] для проведения ферментативного синтеза пептида в случае, когда одно из исходных веществ нерастворимо в воде, вследствие чего продукт при проведении реакции в водном растворе образуется в ничтожно малых количествах. Однако попытки использования реакционных систем на основе органических растворителей для получения *n*-нитроанилидов *N*-ациламиноокислот из свободных кислоты и амина оказывались неудачными.

Сокращения: Vz – бензоил, ПАВ – поверхностно-активное вещество, BTNA – *n*-нитроанилид *N*-бензоилтирозина. Все аминокислоты *L*-ряда.

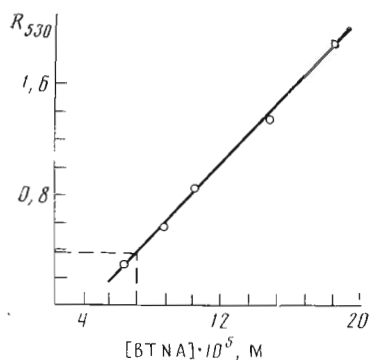


Рис. 1

Рис. 1. Калибровочный график зависимости интенсивности отраженного света от концентрации BTNA в образце

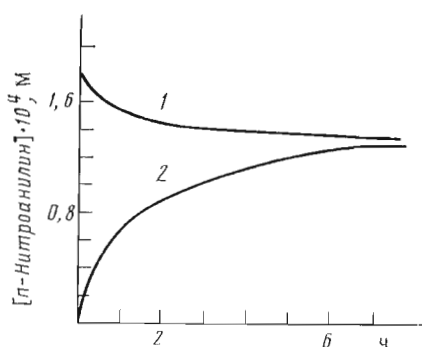


Рис. 2

Рис. 2. Кинетические кривые катализируемого α -химотрипсином в системе АОТ/вода: 2,3-бутандиол/октан синтеза (1) и сольволиза (2) BTNA. Условия эксперимента: $[AOT]=0,1$ М, 2,3-бутандиол/ $H_2O=99/1$, $w_0=0,46$, $[BTNA]=1,8 \cdot 10^{-4}$, n -нитроанилин= $=1,8 \cdot 10^{-4}$, $[Bz-Tyr-OH]=5,6 \cdot 10^{-4}$, $[E]=2 \cdot 10^{-7}$ М, рН 5

В настоящей работе мы показали принципиальную возможность осуществления синтеза n -нитроанилида N -бензоилтирозина (BTNA) из n -нитроанилина и Bz-Tyr-OH в системах обращенных мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ) в органических растворителях.

Обычно гидратированные обращенные мицеллы ПАВ в условиях, оптимальных для функционирования ферментов [12, 16], содержат во внутренней полярной полости достаточно большое количество воды (несколько объемных процентов). Во многих же случаях для повышения выхода продукта реакции (1) требуется более существенное ее снижение, что в свою очередь вызывает резкое уменьшение, а то и полное исчезновение каталитической активности фермента [11, 16].

Преодолеть возникшее препятствие можно путем замены воды во внутренней полости мицеллы на смешивающийся с нею органический растворитель [17]. Дело в том, что принципиальным фактором, регулирующим ферментативную активность в системах обращенных мицелл, служит соотношение размеров молекулы белка и внутренней полости мицеллы. Таким образом, для любой водно-органической смеси даже с экстремально низким содержанием воды (0,01%) существуют экспериментально определяемые условия, в которых фермент проявляет высокую каталитическую активность.

Для проведения реакции синтеза BTNA, катализируемой α -химотрипсином, мы использовали систему обращенных мицелл Аэрозоля ОТ в октане. В качестве смешивающегося с водой органического растворителя взят 2,3-бутандиол в концентрации 99% (по объему) по отношению к воде. При этом общее содержание воды в реакционной системе составило 0,01%. Соотношение молярных концентраций воды и ПАВ ($w_0=0,46$), определяющее размер внутренней полости мицеллы (r_m) было выбрано таким образом, чтобы значение r_m совпадало с размерами молекулы белка (r_p). Именно в этих условиях [16, 17] α -химотрипсин проявляет наибольшую каталитическую активность. Выход продукта реакции в системе Аэрозоль ОТ/2,3-бутандиол — вода/октан зависел от рН вносимого буферного раствора; максимальное значение, равное 30%, наблюдалось при рН 5,0. За протеканием реакции следили, во-первых, по образованию BTNA (его концентрацию определяли методом ТСХ — рис. 1); во-вторых, по убыли n -нитроанилина непосредственно в реакционной среде. В этом случае скорость реакции измеряли спектрофотометрически по изменению поглощения при λ 380 нм (рис. 2). Предельная концентрация BTNA, образовавшегося в результате синтеза (примерно за 15 ч), составляет $6 \cdot 10^{-5}$ М. О том, что эта концентрация равновесная, свиде-

тельствует эксперимент по гидролизу BTNA в тех же условиях: в результате гидролиза образуется такое же количество *n*-нитроанилина (рис. 2, 2), какое расходуется в реакции синтеза (рис. 2, 1).

Продукт выделяли экстракцией из реакционной системы 2 М раствором KCl. Его чистоту проверяли путем ферментативного гидролиза в водном растворе (трис-HCl-буфер, pH 8,0; 25°С). По данным этого эксперимента, выход целевого продукта составил 25–30%.

Экспериментальная часть

В работе использовали α -химотрипсин, Vz-Тур-ОН и *n*-нитроанилин (Reanal, ВНР), трис, 2,3-бутандиол и АОТ (Merck, ФРГ), остальные реактивы отечественного производства квалификации ос.ч. или х.ч.

0,2 мМ раствор α -химотрипсина в 50 мМ ацетат-фосфатном буфере и 2,3-бутандиол солюбилизировали в 0,1 М растворе АОТ в октане (октан производства «Союзреактив» был абсолютирован и любезно предоставлен А. А. Щеголевым). Типичный эксперимент приготовления системы обращенных мицелл, содержащей фермент и смешивающийся с водой органический растворитель, был следующим. К 10 мл раствора АОТ в октане добавляли 1 мкл раствора α -химотрипсина и 99 мкл 2,3-бутандиола. Смесь интенсивно встряхивали (несколько секунд) до получения оптически прозрачного раствора. Конечное содержание бутандиола по отношению к воде составляло в разных экспериментах 80, 90 и 99%, соотношение молярных концентраций воды и ПАВ (w_0) — 1,94; 0,91 и 0,46 соответственно.

Затем к 2 мл ферментсодержащего раствора АОТ в октане добавляли по 5 мкл растворов 0,56 мМ Vz-Тур-ОН и *n*-нитроанилина, смесь интенсивно встряхивали до получения оптически прозрачного раствора. Концентрацию *n*-нитроанилина в реакционной системе варьировали от $2 \cdot 10^{-5}$ до $5 \cdot 10^{-4}$ М. За реакцией образования и гидролиза BTNA следили спектрофотометрически (Beckman-25) по изменению поглощения при λ 380 нм ($\epsilon_{\text{миц}} = 10\,000 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$; $\epsilon_{\text{води}} = 14\,000 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

При подборе оптимальных условий проведения синтеза меняли соотношение смеси 2,3-бутандиол — вода во внутренней полости мицеллы, pH вносимого раствора фермента (3,0; 4,0; 5,0; 6,0) и концентрации исходных реагентов.

Реакционную смесь анализировали после завершения реакции (через 10–20 ч) методом ТСХ на силуфоле (Kavalier, СССР). Исходные вещества и продукт отделяли от АОТ добавлением к анализируемой смеси равного объема ацетонитрила, в результате чего система расслаивалась, при этом *n*-нитроанилин, Vz-Тур-ОН и BTNA экстрагировались в нижний ацетонитрильный слой, а АОТ преимущественно оставался в верхнем слое.

На пластинки наносили аликвоты из обоих слоев реакционной смеси и растворов BTNA в АОТ известной концентрации ($3 \cdot 10^{-5}$ – $2 \cdot 10^{-4}$ М). В качестве элюента использовали этилацетат — метанол — аммиак (50 : 5 : 0,5). После двукратного проявления хроматограммы в иодной камере интенсивность окраски пятен BTNA с R_f 0,73 (R_f *n*-нитроанилина 0,65, R_f Vz-Тур-ОН 0) определяли на отражательном спектрофотометре Shimadzu (Япония). Из линейного калибровочного графика зависимости интенсивности отраженного света (λ 530 нм) от концентрации определяли количество BTNA в реакционной смеси.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jones J. B. // Asymmetric synthesis. V. 5/Ed. Morrison J. D. N. Y.: Acad. Press. 1985. P. 309–341.
2. Whitesides G. M., Wong C.-H. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1985. V. 25. P. 617–626.
3. Akiyama A., Bednarski M., Kim M.-J., Simon E. S., Waldmann H., Whitesides G. M. // Chem. Brit. 1987. № 7. P. 645–654.
4. Семенов А. Н. // Химическая энзимология/Ред. Березин И. В., Мартинек К. М.: МГУ, 1983. С. 76–155.

5. Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К. // Биохимия. 1971. Т. 36. С. 981–984.
6. Dastoli F. R., Price S. // Arch. Biochem. and Biophys. 1967. V. 118. P. 289–291.
7. Butler L. G. // Enzyme Microb. Technol. 1979. V. 1. P. 253–259.
8. Carrea G. // Trends Biotechnol. 1984. V. 2. P. 102–106.
9. Martinek K., Semenov A. N. // J. Appl. Biochem. 1981. V. 3. P. 93–126.
10. Klibanov A. M. // CHEMTECH. 1986. № 6. P. 354–359.
11. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. // Биотехнология. 1988. Т. 4. С. 292–309.
12. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Хмельницкий Ю. Л., Березин И. В. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 669–696.
13. Luisi P. L., Magid L. J. // CRC. Crit. Rev. Biochem. 1986. V. 20. P. 409–474.
14. Martinek K., Berezin I. V., Khmel'nitski Yu. L., Klyachko N. L., Levashov A. V. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1987. V. 52. P. 2589–2602.
15. Luthi P. L., Luisi P. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 7285–7286.
16. Khmel'nitski Yu. L., Kabanov A. V., Klyachko N. L., Levashov A. V., Martinek K. // Structure and reactivity in reversed micelles/Ed. Pileni M. P., 1988.
17. Клячко Н. Л., Богданова Н. Г., Левашов А. В., Кабанов А. В., Пшежецкий А. В., Хмельницкий Ю. Л., Мартинек К., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297. С. 483–487.

Поступила в редакцию
21.X.1988

**ENZYMATIC SYNTHESIS OF N-BENZOYL-L-TYROSINE
p-NITROANILIDE IN THE SYSTEM
AEROSOLE OT/WATER: 2,3-BUTANEDIOL/OCTANE**

BOGDANOVA N. G., KLYACHKO N. L., KABAKOV V. E.,
MARTINEK K., LEVASHOV A. V.

Chair of Chemical Enzymology, M. V. Lomonosov Moscow State University:

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

Enzymatic synthesis of the amide bond in the reaction of N-substituted amino acids with *p*-nitroaniline has been shown feasible. As an example, the synthesis of N-benzoyl-L-tyrosine *p*-nitroanilide from N-benzoyl-L-tyrosine and *p*-nitroaniline catalyzed by α -chymotrypsin has been carried out in the system of reversed micelles of AOT/water: 2,3-butanediol/octane with the total water content 0.01%. The yield was 30%.