



УДК 577.154.2.02:661.185.4

СИНТЕЗ АЛКИЛГЛИКОЗИДОВ, КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ β -ГЛИКОЗИДАЗАМИ В СИСТЕМЕ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ

© 2001 г. О. С. Купцова[#], Н. Л. Клячко, А. В. Левашов*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, 119899, Москва, Воробьевы горы*

Поступила в редакцию 15.01.2001 г. Принята к печати 30.03.2001 г.

Исследована принципиальная возможность ферментативного синтеза алкилгликозидов в системе обращенных мицелл Аэрозоля ОТ (АОТ) в октане. Осуществлен синтез октил- β -галактопиранозида и октил- β -глюкопиранозида из соответствующего сахара (лактозы или глюкозы) и октилового спирта при катализе гликолитическими ферментами β -галактозидазой и β -глюкозидазой соответственно. За счет того, что в качестве органического растворителя использован один из субстратов реакции – октиловый спирт – соотношение реакций трансгликозилирования и гидролиза было смещено в сторону трансгликозилирования. Таким образом, из гидрофильного моно(ди-)сахарида и гидрофобного алифатического спирта в одну стадию были синтезированы алкилгликозиды. Показано, что направление реакции зависит от pH солюбилизированного в мицеллах водного раствора. Для октилгалактозида максимальный выход составил 45, для октилглюкозида – 40%, что значительно превосходит известные ранее выходы ферментативных синтезов в двухфазной системе.

Ключевые слова: алкилгликозиды; система обращенных мицелл; β -галактозидаза; β -глюкозидаза.

ВВЕДЕНИЕ

Длинноцепочечные алкилгликозиды принадлежат к группе неионных поверхностно-активных веществ (ПАВ), являющихся хорошими эмульгаторами и смачивающими агентами. Они также обладают хорошей биоразлагаемостью и антимикробными свойствами [1]. Некоторые из них употребляются в пищевой, фармацевтической промышленности [2]. Кроме того, они используются как субстраты в производстве ацилгликозидов – сахарных эфиров жирных кислот, также являющихся практически значимыми ПАВ [3]. Традиционный химический способ получения аномерно чистых алкилгликозидов протекает в несколько стадий, в ходе которых необходимо прибегать к защите реакционных гидроксильных групп сахара и позже – к их деблокированию, активации аномерного углерода и разделению полученных аномеров [4].

Ферментативные методы синтеза обладают преимуществами по сравнению с химическими, так как обеспечивают регио- и стереоселективность, а продукт может быть получен в одну стадию. Ферментативно катализируемый синтез алкилгликозида может быть осуществлен двумя путями: непосредственной конденсацией (обращенным гидролизом) соответствующих сахара и алкилового спирта (термодинамический подход) [5] и трансгликозилированием (кинетический подход) [6]. Оба про-

цесса проводят в двухфазной системе, где водная фаза содержит гидрофильные фермент (гликозидазу) и субстрат (моно- или дисахарид), а соответствующий гидрофобный спирт является органической фазой. В такой системе гидрофобность продукта, поверхностно-активного вещества, промежуточная между гидрофобностями двух субстратов. В зависимости от длины углеводородной цепи агликона (n) и концентрации продукта (P) его коэффициент распределения между органической и водной фазой ($\alpha_{\text{каж}} = [P]_{\text{РОН}}/[P]_{\text{Н}_2\text{О}}$) для $n = 6-10$ составляет величину 5–30 [7].

Большим неудобством использования двухфазных систем является то, что при увеличении длины углеводородной цепи соответствующего спирта уменьшается его растворимость в воде и, следовательно, доступность для фермента, находящегося в водной фазе. В результате этого скорость синтеза падает, а в системе накапливаются (в случае проведения трансгликозилирования) продукты гидролиза. Таким образом, синтез алкилгликозидов с длиной алкильной цепи более 12 С-атомов в подобной системе практически не идет (см. табл. 1). Чтобы в течение разумного времени добиться приведенных в табл. 1 выходов, приходится прибегать к повышенным температурам. В таких условиях фермент быстро денатурирует, теряя свою активность уже в первые часы [7, 8].

В связи с указанными недостатками синтеза алкилгликозидов химическими методами и ферментативными в двухфазной системе, нами была

[#] Автор для переписки (тел./факс: (095) 939-34-29; эл. почта: kuptsova@enz.chem.msu.ru).

Таблица 1. Результаты катализируемого β-глюкозидазой синтеза *n*-алкил-β-*D*-глюкозидов из глюкозы и соответствующего спирта (C_{*n*}H_{2*n*+1}OH) в двухфазной системе*

<i>n</i> -Спирт, <i>n</i>	Алкил	Время реакции, сут	Спирт/вода, объем/объем	Выход**, %
6	гексил	4	16.7	20
7	гептил	5	16.7	13
8	октил	3	10	6
		4	16.7	9
		6	30	14
		10	50	2
9	нонил	7	16.7	5
10	децил	7	16.7	4
12	додецил	7	16.7	<1

* Реакцию проводили при 60°C, pH 5.5, при интенсивном перемешивании. По материалам работ [6, 7].

** В расчете на исходную глюкозу.

поставлена цель: использовать систему обращенных мицелл аэрозоля ОТ (АОТ) в октане. В отличие от рассмотренных выше условий, система обращенных мицелл позволяет работать как с водорастворимыми, так и с водонерастворимыми веществами в псевдогомогенной среде.

Обращенные мицеллы в органических растворителях представляют собой ассоциаты молекул ПАВ, внутренняя часть которых образована полярными головками, а внешний слой – углеводородными хвостами этих молекул. Важнейшим свойством обращенных мицелл является способ-

ность сольбилизовать (включать внутрь мицелл) воду и другие полярные вещества, причем сольбилизирующая способность сильно зависит от природы мицеллообразующего ПАВ (см., например, [9]). Ферменты, сольбилизованные в органических растворителях с помощью обращенных мицелл ПАВ, способны сохранять свою каталитическую активность [10–13].

Одно из главных достоинств мицеллярных систем – возможность строгого дозирования содержащейся в них воды и целенаправленного варьирования основных физико-химических параметров.

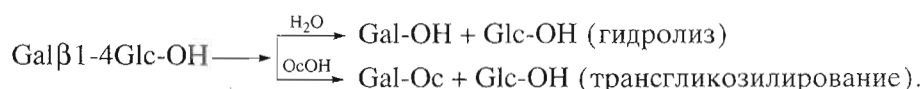
В данной работе исследована возможность ферментативного синтеза поверхностно-активных веществ – алкилглюкозидов – на примере октилглюкозидов и октилгалактозидов в системе обращенных мицелл АОТ, где органическим растворителем служит один из субстратов реакции – алифатический спирт октанол.

В работе также изучены условия, благоприятствующие образованию алкилглюкозидов, и найден метод аналитического выделения полученных продуктов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Катализируемый β-галактозидазой синтез октилгалактопиранозидов из лактозы

Как видно из результатов реакции, проведенной в присутствии β-галактозидазы с лактозой и октанолом (ОсОН) в качестве субстратов (рис. 1), помимо продуктов гидролиза (глюкозы и галактозы), в системе накапливается октилгалактозид. Очевидно, реакция протекает по следующей схеме:



Отсутствие максимума на кривой накопления галактозы свидетельствует либо о том, что донором в реакции трансгликозилирования выступает галактозильная часть лактозы, либо о том, что скорость образования октилгалактозида выше скорости гидролиза лактозы. Следует заметить, что выход октилгалактозида в системе обращенных мицелл АОТ в октане при pH 4.5 и 30°C (20%) заметно превосходит известные ранее результаты подобных синтезов [6, 7]. Повышение температуры до 60°C приводит к увеличению скорости обеих реакций – гидролиза и трансгликозилирования – в равной степени, так что это не отражается на выходе продукта трансгликозилирования. Таким образом, с одной стороны, при необходимости, синтез может быть значительно ускорен повышением температуры, с другой стороны,

проведение синтеза при комнатной температуре, не снижая продуктивности реакции, безусловно, упрощает процесс.

Положение равновесия ферментативных реакций гидролиза и трансгликозилирования смещается довольно существенно при изменении pH раствора от 4.5 до 7.5 (рис. 2). Максимальный выход октилгалактозида (45%) наблюдается при pH 5.5, при этом степень гидролиза также довольно существенна (62%). При pH 6.5 продукта трансгликозилирования накопилось чуть меньше (40%), зато субстрата гидролизовалось только 50%, то есть почти весь субстрат подвергался трансгликозилированию. В этих условиях (pH 6.5) нам удалось добиться выгодного соотношения трансгликолитической функции β-галактозидазы к гидролитической: через 5 сут в реакционной среде 80% галактозы, высвободив-

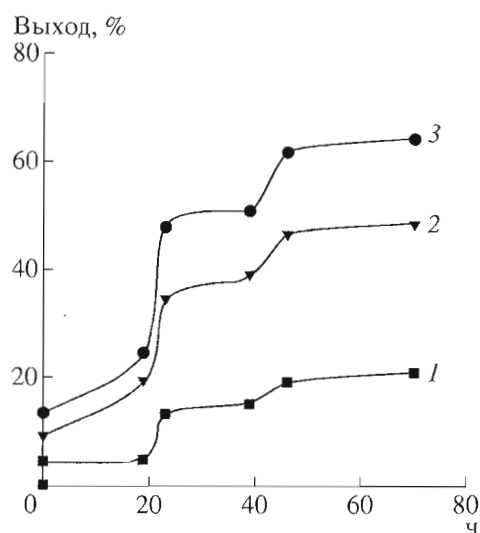


Рис. 1. Накопление октилгалактозида (1), галактозы (2) и глюкозы (3) в реакции катализируемого β-галактозидазой синтеза октилгалактозида из лактозы и октанола (30°C, pH 4.5). Выходы вычислены по данным ТСХ в расчете на исходную лактозу. [Lac-OH]₀ 3 мМ; [E]₀ 2 мкг/мл.

нообразия других алкилгликозидов. Таким же образом нами были получены гептилгалактозид и нонилгалактозид с выходами 43 и 37% соответственно (данные не приведены).

Синтез октилглюкозида с помощью β-глюкозидазы

Для выявления других возможностей синтеза длинноцепочечных алкилгликозидов в системе обращенных мицелл нами был использован еще один гликозилирующий фермент – β-глюкозидаза сладкого миндаля. В отличие от β-галактозидазы, которая в наших условиях не проявила трансгликозилирующей функции в отношении моносахарида (галактозида) (данные не приведены), β-глюкозидаза оказалась пригодной для реакции конденсации (прямого гликозилирования). Так, из глюкозы и октанола мы достигли значительного выхода (20%) октилглюкозида (рис. 3). Помимо целевого продукта в реакционной среде обнаружилось соединение (рис. 3, кривая 3), являющееся судя по его подвижности при ТСХ алкилглюкобиозидом. Оно накапливалось в смеси в количествах, превышающих выход целевого продукта (до 10–15%), вплоть до 120 ч реакции, затем стало убывать и полностью исчезало через 200 ч. Видимо, на ранних этапах синтезируется глюкобиоза, которая сразу же, возможно, не выходя из активного центра фермента, переносится в виде глюкобиозильного остатка на молекулу алифатического спирта с получением октилглюкобиозида.

шейся при гидролизе лактозы, оказалось в виде октилгалактозида.

Итак, с помощью системы обращенных мицелл на примере октилгалактозида нам удалось добиться выгодного соотношения трансгликозилирующей и гидролитической функций β-галактозидазы. Вариация субстратов в подобных условиях может привести к получению большого раз-

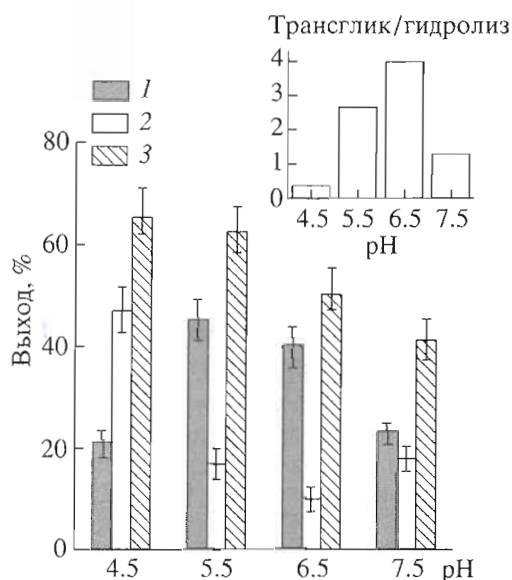


Рис. 2. Выход (в расчете на исходную лактозу) октилгалактозида (1), галактозы (2) и глюкозы (3) в катализируемой β-галактозидазой реакции синтеза октилгалактозида из лактозы и октанола при разных pH. Продукты анализировали через 5 сут. [Lac-OH]₀ 4.5 мМ, [E]₀ 20 мкг/мл, 20°C. Средние стандартные отклонения указаны в результате трех независимых измерений.

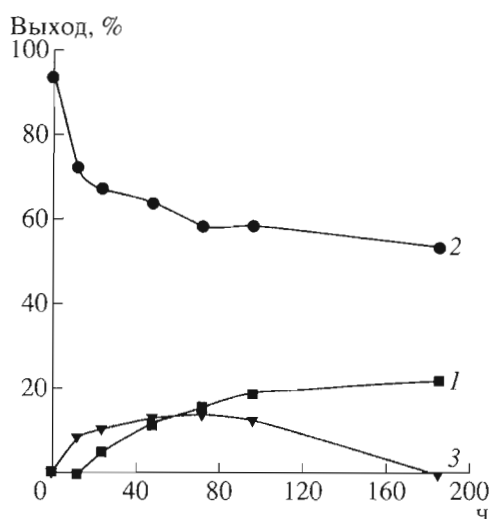
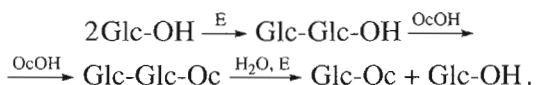


Рис. 3. Накопление октилглюкозида (1), глюкозы (2) и неидентифицированного продукта (3) (см. текст) в катализируемой β-глюкозидазой реакции синтеза октилглюкозида из глюкозы и октанола. Выходы вычислены по данным ТСХ в расчете на исходную лактозу. [Glc-OH]₀ 4.5 мМ, [E]₀ 15 мкг/мл, pH 4.5, 20°C.

Таблица 2. Длины пробега (R_f) и выходы (через 5 сут) продуктов реакции синтеза алкилгликозидов

Продукт	Выход, %	R_f	Система разделения методом ТСХ
Реакция синтеза октилгалактозида из лактозы и октанола, рН 5.5			
Октилгалактозид	45	0.85	Изопропанол–этилацетат–вода, 5 : 4 : 1
Галактоза	17	0.58	
Глюкоза	62	0.69	
Реакция синтеза октилглюкозида из глюкозы и октанола, рН 5.5			
Октилглюкозид	40	0.80	Хлороформ–метанол–вода, 80 : 35 : 5

Предположительная схема образования глюкобиозида выглядит следующим образом:



В пользу данной схемы говорит тот факт, что в реакционной смеси ни на одной из стадий процесса сама глюкобиоза не была обнаружена в заметных количествах.

Как и в случае трансгликозилирования с β -галактозидазой, максимальный выход продукта трансгликозилирования (40%) наблюдается при рН 5.5, а при рН 6.5 и 7.5 выход больше, чем в оптимуме гидролиза (рН 4.5) (данные не приведены). Основные результаты синтеза алкилгликозидов в системе обращенных мицелл сведены в табл. 2.

Отделение алкилгликозидов от других компонентов реакционной смеси методом капиллярного электрофореза

Немаловажной практической задачей явилось отделить алкилгликозиды не только от гидрофильных моно- и дисахаридов, но и от мицеллообразую-

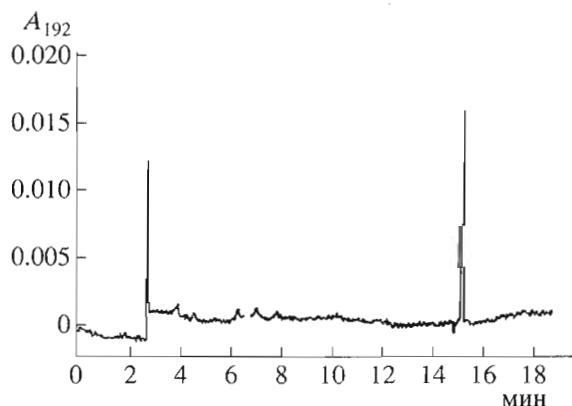


Рис. 4. Электрокапиллограмма с пиками разделенных методом капиллярного электрофореза октилглюкозида (правый пик) и АОТ (левый пик).

щего ПАВ – аэрозоля ОТ, который присутствовал в количествах, на несколько порядков превышающих концентрацию поверхностно-активного продукта. Задача была решена с помощью метода капиллярного электрофореза, позволяющего гибко и в широких пределах менять параметры разделения веществ, базируясь на разнообразии их молекулярных свойств (размер, заряд, хиральность, гидрофобность) и обладающего очень высокой селективностью и чувствительностью.

Компоненты реакционной смеси были переведены в боратный буфер экстракцией водой (буфером). При этом значительно сократился разрыв в концентрациях алкилгликозида и АОТ (коэффициент распределения октилглюкозида между октаном и водой порядка 15, растворимость АОТ в воде около 10^{-3} М, а в октане практически неограничена). Вещества разделились за счет образования отрицательно заряженных боратных комплексов, обладающих для двух анализируемых веществ разными массами и суммарными зарядами. Их интенсивное поглощение в УФ-области позволило следить за процессом с помощью чувствительного УФ-детектора на длине волны 192 нм. На рис. 4 приведены электрофореграммы с результатами разделения АОТ и октилгликозида.

Таким образом, на примере ферментативного синтеза октилгликозидов мы продемонстрировали принципиальную возможность синтеза алкилгликозидов в системе обращенных мицелл. В работе было показано, что синтез длинноцепочечных алкилгликозидов можно осуществлять с выходом, значительно превышающим известные ранее для ферментативных методов в двухфазной системе; направление реакции зависит от рН солюбилизированного в мицеллах водного раствора. В отличие от химических методов синтеза, реакция протекает одностадийно и в мягких условиях. Результаты работы открывают новые возможности ферментативного синтеза поверхностно-активных веществ с использованием системы обращенных мицелл.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

β -Галактозидаза (β -D-галактозид–галактогидролаза, КФ 3.2.1.23) из *Penicillium canescens* выделена, очищена и любезно предоставлена лабораторией проф. А.П. Сеницына, кафедры химической энзимологии МГУ. β -Глюкозидаза (КФ 3.2.1.21) сладкого миндаля (Sigma, США), хроматографически чистая, была обессолена и лиофилизована. Цитрат Na производства “Chemarol”, Чехословакия. Натриевая соль ди(2-этилгексилового) эфира сульфоянтарной кислоты (Аэрозоль ОТ, АОТ), глюкоза, лактоза, галактоза, октил- β -D-глюкопиранозид производства Sigma, США. Октан, октанол, α -нафтол, изопропанол, этилацетат, хлороформ, метанол производства “Реахим”, Россия.

Синтез октилгликозидов в системе обращенных мицелл. В пробирке с закручивающейся крышкой к смеси 2 мл октана, содержащего 0.3 М АОТ и 4 мл *n*-октанола, добавляли 0–60 мкл цитратного буфера с требуемым рН, 100–155 мкл субстрата (0.174 М лактоза, 0.83 М галактоза или 1.11 М глюкоза), интенсивно перемешивали в течение 20–30 мин, затем добавляли 12 мкл соответствующего фермента (β -галактозидаза, 1–10 мг/мл или β -глюкозидаза, 1–5 мг/мл). Пробирку с реакционной смесью закрывали и помещали на встряхивающее устройство. По мере необходимости отбирали пробы по 20 мкл и анализировали методом ТСХ на пластинах Sorbfil (АО “Сорбполимер”, г. Краснодар, Россия). Были использованы две системы растворителей: хлороформ–метанол–вода, 80 : 35 : 5, и изопропанол–этилацетат–вода, 5 : 4 : 1.

Хроматограммы обрабатывали раствором α -нафтола (0.159 г α -нафтола растворяли в 51 мл этанола, добавляли 4 мл воды и 6.5 мл 18 М серной кислоты), прогревали при 110°C 6 мин и обнаруживали продукты по поглощению при 545 нм на сканирующем спектрофотометре Shimadzu CS-9000. В качестве стандарта для идентификации пятен алкилгликозидов использовали свидетель октил- β -D-глюкопиранозид.

Метод капиллярного электрофореза. Вещества были разделены методом капиллярного электрофореза в форме отрицательно заряженных боратных комплексов при использовании в качестве электролита 50 мМ боратного буфера с рН 9.1. В пробирке с закручивающейся крышкой к 3.5 мл реакционной смеси добавляли 5 мл боратного буфера и встряхивали 15 мин. Затем после отстаивания отбирали водную фазу полученной двухфазной системы. Подобным образом из обращенных мицелл в боратный буфер были переведены чистые растворы лактозы, глюкозы, галактозы и октилглюкозида, которые использовали для идентификации продуктов реакции. Разделение проводили

на капиллярном электрофоретическом анализаторе Bio-Rad Biofocus 3000 Capillary Electrophoresis System с непокрытыми silica-fused капиллярами 24 см \times 25 мкм, при напряжении 6 кВ и 25°C. Детекцию на длине волны 192 нм проводили с помощью встроенного в систему высокочувствительного УФ-детектора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Matsumura S., Imai K., Yoshikawa S., Kawaada K., Uchibori T.* // J. Am. Oil Chem. Soc. 1990. V. 67. P. 996–1001.
2. *Hughes F.A., Lew B.W.* // J. Am. Chem. Soc. 1970. V. 47. P. 162–167.
3. *Adelhorst K., Bjorking F., Godfredsen S.E., Kirk O.* // Synthesis. 1990. V. 2. P. 112–115.
4. *Brown G.M., Dubreuil P., Ichaporia F.M., Desnoyers J.E.* // Canadian J. of Chemistry. 1970. V. 48. P. 2525–2531.
5. *Laroute V., Willemot R.-M.* // Biotechnol. Lett. 1992. V. 14. P. 169–174.
6. *Vic G., Biton J., Le Beller D., Michel J.-M., Thomas D.* // Biotechnology and Bioengineering. 1995. V. 46. P. 109–116.
7. *Panintrarux C., Adachi S., Araki Y., Kimura Y., Matsuno R.* // Enzyme and Microbial Technology. 1995. V. 17. P. 32–40.
8. *Ismail A., Ghoul M.* // Biotechnol. Lett. 1991. V. 18(10). P. 1199–1204.
9. *Frank S.G., Zografu G.J.* // J. Colloid and Interface Sci. 1969. V. 29. P. 27–35.
10. *Мартинек К., Левашов А.В., Клячко Н.Л., Хмельницкий Ю.Л., Березин И.В.* // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 669–696.
11. *Левашов А.В.* Катализ ферментами в микрогетерогенных системах агрегатов ПАВ. Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. М.: ВИНТИ, 1987. Т. 4. С. 112–158.
12. *Мартинек К., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Березин И.В.* // Докл. АН СССР. 1982. Т. 269. С. 491–493.
13. *Клячко Н.Л., Пшежецкий А.В., Кабанов А.В., Вакула С.В., Мартинек К., Левашов А.В.* // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. С. 467–472.

Synthesis of Alkyl Glycosides Catalyzed by β -Glycosidases in a System of Reverse Micelle

O. S. Kuptsova[#], N. L. Klyachko, and A. V. Levashov

[#] Phonelfax: +7 (095) 939-3429, e-mail: kuptsova@enz.chem.msu.ru

Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

A basic possibility of enzymic synthesis of alkyl glycosides in a system of the Aerosol-OT (AOT) reverse micelles was studied. Octyl β -D-galactopyranoside and octyl β -D-glucopyranoside were synthesized from the corresponding sugars (lactose or glucose) and octyl alcohol under catalysis with glycolytic enzymes, β -galactosidase and β -glucosidase, respectively. The transglycosylation/hydrolysis ratio was shifted toward transglycosylation by using octyl alcohol, one of the substrates, as an organic solvent. The alkyl glycosides were thus obtained in one step from a hydrophilic mono- or disaccharide and a hydrophobic aliphatic alcohol. The direction of the reaction was shown to depend on the pH of aqueous solution immobilized in reverse micelles. The maximum yields were 45% and 40% for octyl galactoside and octyl glucoside, respectively; they markedly exceeded the yields of enzymic syntheses in a two-phase system reported previously. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: alkyl glycosides, β -galactosidase, β -glucosidase, of reverse micelle system