



УДК 541.128.1+577.150.2

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ В ДВУХФАЗНЫХ
ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

II *. СДВИГ ХИМИЧЕСКОГО РАВНОВЕСИЯ

Семенов А. Н., Мартинек К., Березин И. В.

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

Проведен термодинамический анализ равновесных ферментативных реакций в двухфазных системах «вода — не смешивающийся с водой органический растворитель». Рассмотрена теоретическая модель, предполагающая параллельное установление химического равновесия в каждой фазе, сопровождаемое равновесным распределением реагентов между обеими фазами, и определена зависимость эффективной константы равновесия $K_{эфф}$ от соотношения объемов водной и органической фаз и коэффициентов распределения. Показано, что сдвиг равновесия, наблюдаемый для реакции окисления изобутанола в изобутиральдегид, катализируемой алкогольдегидрогеназой, в двухфазной системе «вода — гексан», определяется (в полном соответствии с теорией) коэффициентами распределения реагентов. Варьируя состав органической фазы, положение равновесия (по сравнению с водными растворами) можно сдвинуть в сторону как исходных, так и конечных реагентов. Предсказанный теоретически экстремальный характер зависимости величины $K_{эфф}$ от соотношения объемов водной и органической фаз найден в случае катализируемого α -химотрипсином синтеза этилового эфира *N*-бензоил-*L*-фенилаланина из соответствующей кислоты и спирта.

Ферменты — наиболее эффективные среди известных в настоящее время катализаторов. Катализируемые ими химические превращения протекают в мягких условиях, с высокими скоростями и, как правило, абсолютно специфично. Поэтому неудивительно, что ферменты все шире начинают применять в препаративном органическом синтезе [2—4]. Однако равновесие многих представляющих практический интерес химических реакций смещено в сторону исходных веществ. Для того чтобы повысить выход нужного продукта, в органической химии изменяют условия реакции: pH, температуру, растворитель и т. п. Но ферменты сохраняют каталитическую активность лишь в довольно узком диапазоне условий, а именно в водных растворах, при нейтральных или близких к нейтральным значениям pH и при не слишком высоких температурах. Следовательно, в присутствии ферментов возможность сдвига равновесия традиционными методами органической химии существенно ограничена.

В настоящее время достигнуты значительные успехи при стабилизации ферментов по отношению к денатурирующим воздействиям высоких температур и экстремальных значений pH (см. обзоры [5—7]). Денатурации ферментов в органическом растворителе можно избежать, если проводить реакцию в двухфазной системе «вода — не смешивающийся с водой органический растворитель» [4, 8]. Фермент, будучи локализован в водной

* Сообщение I см. [4].

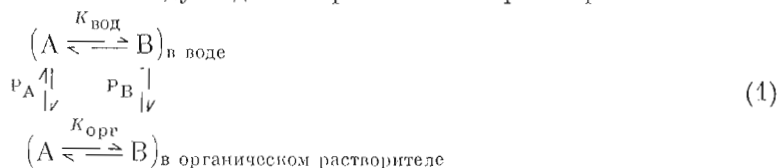
фазе, не имеет неблагоприятного контакта с органической средой и поэтому сохраняет каталитическую активность.

Двухфазные водно-органические системы как среда реакции широко применяются в органической химии с несколько иной целью: чтобы осуществить так называемый интерфазный катализ или, иными словами, катализ фазовым переносом (phase-transfer catalysis). Проведение реакций в двухфазных системах позволяет изменить специфичность, скорость и другие *кинетические* параметры катализируемого процесса [9–11]. Однако влияние двухфазного характера среды на *равновесие* химических реакций в литературе по интерфазному катализу до сих пор не обсуждалось.

В предыдущем сообщении [1] мы показали, что равновесие химической реакции в двухфазной системе в общем случае отличается от равновесия этой же реакции в воде (при прочих равных условиях). Цель настоящей работы — рассмотреть физико-химические принципы сдвига равновесия (изменения выхода продуктов) химической реакции в двухфазных системах по сравнению с водными растворами и в связи с этим указать на новые возможности, которые открываются в препаративном органическом синтезе при применении двухфазных систем, содержащих ферменты.

Теоретический анализ

1. Рассмотрим реакцию $A \rightleftharpoons B$. В двухфазной системе происходит распределение реагентов между водой и органическим растворителем:



Эффективная константа равновесия реакции равна отношению общих концентраций реагентов А и В, отнесенных к объему всей системы:

$$K_{\text{эфф}} = \frac{[B]_{\text{общ}}}{[A]_{\text{общ}}}$$

Подставляя в эту формулу $[A]_{\text{общ}}$ и $[B]_{\text{общ}}$, полученные из уравнений материального баланса

$$[A]_{\text{общ}}(V_{\text{вод}} + V_{\text{орг}}) = [A]_{\text{вод}}V_{\text{вод}} + [A]_{\text{орг}}V_{\text{орг}}, \quad (2)$$

$$[B]_{\text{общ}}(V_{\text{вод}} + V_{\text{орг}}) = [B]_{\text{вод}}V_{\text{вод}} + [B]_{\text{орг}}V_{\text{орг}}, \quad (3)$$

путем несложных преобразований легко прийти к уравнению

$$K_{\text{эфф}} = K_{\text{вод}} \frac{1 + \alpha P_B}{1 + \alpha P_A} \quad (4)$$

или

$$K_{\text{эфф}} = K_{\text{орг}} \frac{1 + 1/\alpha P_A}{1 + 1/\alpha P_B}, \quad (5)$$

где $K_{\text{вод}}$ и $K_{\text{орг}}$ — константы равновесия реакции (1) в воде и органическом растворителе соответственно, $\alpha = V_{\text{орг}}/V_{\text{вод}}$ — отношение объемов органической и водной фаз, а P_A и P_B — коэффициенты распределения веществ А и В, равные отношению их концентраций в органической и водной фазах. Анализ схемы реакции (1) обнаруживает аналогию с рассмотрением равновесной реакции, протекающей в присутствии мицелл поверхностно-активных веществ [12].

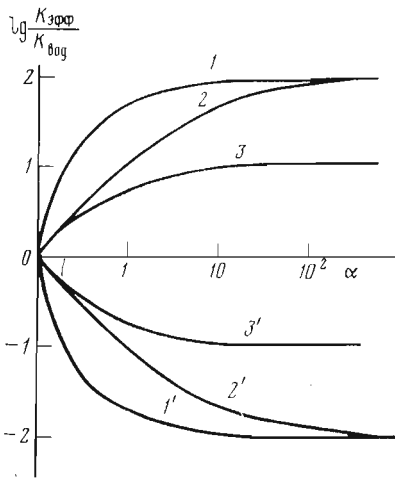


Рис. 1

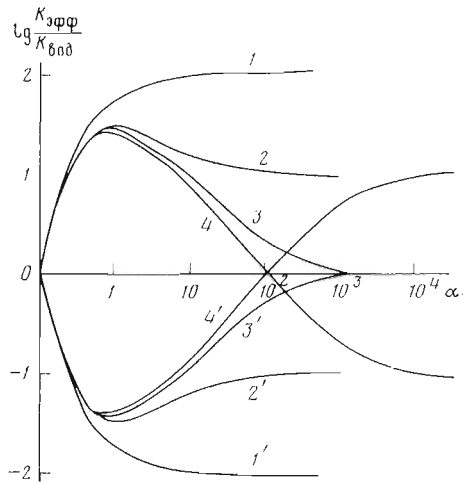


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость эффективной константы равновесия реакции типа $A \rightleftharpoons B$ в двухфазной водно-органической системе от соотношения объемов органической и водной фаз (α) при некоторых соотношениях коэффициентов распределения: 1 - $P_A=1, P_B=100, P_B/P_A=100$; 2 - $P_A=0,1, P_B=10, P_B/P_A=100$; 3 - $P_A=1, P_B=10, P_B/P_A=10$; 1' - $P_A=100, P_B=1, P_B/P_A=0,01$; 2' - $P_A=10, P_B=0,1, P_B/P_A=0,01$; 3' - $P_A=10, P_B=1, P_B/P_A=0,1$

Рис. 2. Зависимость эффективной константы равновесия реакции типа (6) $A+B \rightleftharpoons C+D$ в двухфазной водно-органической системе от соотношения объемов органической и водной фаз (α) при некоторых соотношениях коэффициентов распределения: 1 - $P_A=P_B=1, P_C=10^2, P_D=1$; 2 - $P_D=10^{-1}$; 3 - $P_D=10^{-2}$; 4 - $P_D=10^{-3}$; 1' - $P_C=P_D=1, P_A=10^2, P_B=1$; 2' - $P_B=10^{-1}$; 3' - $P_B=10^{-2}$; 4' - $P_B=10^{-3}$

Как видно из формулы (4), значение $K_{эфф}$ изменяется при увеличении α монотонно, а именно: в зависимости от выбора органического растворителя либо возрастает (при $P_A < P_B$), либо уменьшается (при $P_A > P_B$). При достаточно больших значениях α (когда содержание водной фазы весьма мало) константа равновесия стремится к пределу, равному $K_{вод} P_B/P_A = K_{орг}$. На рис. 1 показаны характерные зависимости $K_{эфф}$ от α при некоторых соотношениях коэффициентов распределения.

2. Для более распространенных реакций вида



эффективная константа равновесия в двухфазной системе равна

$$K_{эфф} = K_{вод} \frac{(1+\alpha P_C)(1+\alpha P_D)}{(1+\alpha P_A)(1+\alpha P_B)}, \quad (7)$$

где P_C и P_D - коэффициенты распределения веществ C и D. Чтобы проанализировать вид полученной зависимости (7), рассмотрим первую производную $K_{эфф}$ по α :

$$\frac{dK_{эфф}}{d\alpha} = \frac{(P_C+P_D) - (P_A+P_B) + 2\alpha(P_C P_D - P_A P_B) + \alpha^2 P_A P_B P_C P_D \left(\frac{1}{P_A} + \frac{1}{P_B} - \frac{1}{P_C} - \frac{1}{P_D} \right)}{(1+\alpha P_A)^2 (1+\alpha P_B)^2} K_{вод} \quad (8)$$

При высоком содержании водной фазы (малых значениях α) наклон зависимости $K_{эфф}$ от α определяется в основном знаком первого слагаемого, т. е. разностью величин (P_A+P_B) и (P_C+P_D) . При увеличении α все больший вклад начинают вносить второе и третье слагаемые, и, наконец, при

очень малом содержании воды (больших значениях α) ход зависимости $K_{эфф}(\alpha)$ определяется главным образом соотношением обратных коэффициентов распределения. Таким образом, при разном содержании водной фазы вид зависимости $K_{эфф}(\alpha)$ определяют разные соотношения коэффициентов распределения реагентов. Это приводит к тому, что зависимость $K_{эфф}$ от α может иметь более сложный вид, чем в предыдущем случае. Так, функция (7) является монотонной лишь при условиях

$$\begin{cases} P_C + P_D \geq P_A + P_B \\ \frac{1}{P_C} + \frac{1}{P_D} < \frac{1}{P_A} + \frac{1}{P_B} \end{cases} \quad (9)$$

или

$$\begin{cases} P_C + P_D > P_A + P_B \\ \frac{1}{P_C} + \frac{1}{P_D} \leq \frac{1}{P_A} + \frac{1}{P_B} \end{cases} \quad (10)$$

когда $K_{эфф} > K_{вод}$ (рис. 2, I), и

$$\begin{cases} P_C + P_D \leq P_A + P_B \\ \frac{1}{P_C} + \frac{1}{P_D} > \frac{1}{P_A} + \frac{1}{P_B} \end{cases} \quad (11)$$

или

$$\begin{cases} P_C + P_D < P_A + P_B \\ \frac{1}{P_C} + \frac{1}{P_D} \geq \frac{1}{P_A} + \frac{1}{P_B} \end{cases} \quad (12)$$

когда $K_{эфф} < K_{вод}$ (рис. 2, I').

Если же выполняются неравенства

$$\begin{cases} P_C + P_D > P_A + P_B \\ \frac{1}{P_C} + \frac{1}{P_D} > \frac{1}{P_A} + \frac{1}{P_B} \end{cases} \quad (13)$$

то на зависимости $K_{эфф}(\alpha)$ появляется максимум (рис. 2, 2-4). Условия существования минимума (рис. 2, 2'-4') описывает система неравенств

$$\begin{cases} P_C + P_D < P_A + P_B \\ \frac{1}{P_C} + \frac{1}{P_D} < \frac{1}{P_A} + \frac{1}{P_B} \end{cases} \quad (14)$$

3. Для реакций вида



эффективная константа равновесия равна

$$K_{эфф} = K_{вод} \frac{(1 + \alpha P_C)(1 + \alpha)}{(1 + \alpha P_A)(1 + \alpha P_B)}, \quad (16)$$

т. е. описывается тем же уравнением, что и реакции типа (6) (если положить $P_D = 1$), и, следовательно, подчиняется тем же закономерностям.

4. Выше мы показали, как изменяется эффективная константа равновесия химической реакции в двухфазной водно-органической системе, если варьировать содержание воды и природу органической фазы (коэффициенты распределения реагентов) для реакций разного типа. В препаративном органическом синтезе более важной характеристикой реакции является выход продуктов. Однако обычно ограничиваются рассмотрением константы равновесия, так как для большинства реакций эта величина и

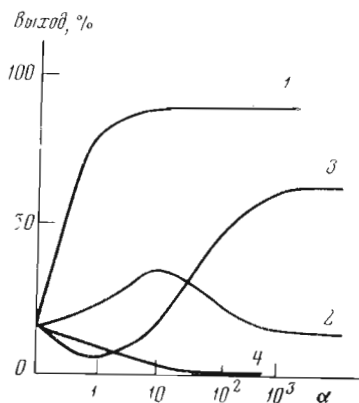


Рис. 3

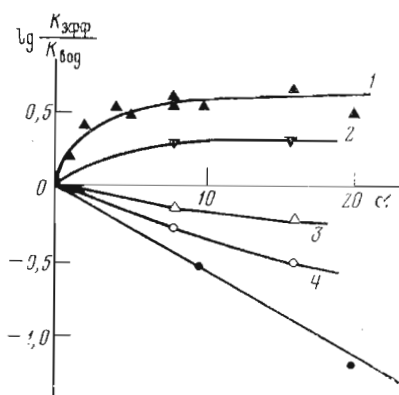


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость выхода продукта С в реакции (17) от соотношения объемов органической и водной фаз (α) при некоторых соотношениях коэффициентов распределения: 1 — $P_A=P_B=1$, $P_C=50$; 2 — $P_A=P_B=0,1$, $P_C=0,01$; 3 — $P_A=10$, $P_B=0,01$, $P_C=1$; 4 — $P_A=P_B=1$, $P_C=0,1$. Для всех случаев принимали $K_{\text{вод}}=10$

Рис. 4. Зависимость эффективной константы равновесия реакции (19) окисления изобутанола, катализируемой алкогольдегидрогеназой в двухфазной водно-органической системе, от соотношения объемов органической и водной фаз (α) и природы органической фазы: 1 — гексан; 2 — 87,5% гексана + 12,5% этилацетата; 3 — 50% гексана + 50% этилацетата; 4 — 25% гексана + 75% этилацетата; 5 — этилацетат

выход продуктов изменяются симбатно. Отдельно необходимо рассмотреть лишь реакции, протекающие с участием воды, например



В этом случае выход продукта С в двухфазной системе зависит от концентрации воды двояко: во-первых, через константу равновесия, определяемую функциями типа (4) или (7) и, следовательно, зависящую от α ; во-вторых, непосредственно, по закону действующих масс. В итоге имеем

$$[C] = K_{\text{эфф}} \frac{[A][B]}{[H_2O]} = K_{\text{вод}} \frac{[A][B](1+\alpha)(1+\alpha P_C)}{55,5(1+\alpha P_A)(1+\alpha P_B)}. \quad (18)$$

Это уравнение, так же как и уравнения (7) и (16), содержит член α^2 в числителе и знаменателе, и поэтому зависимость $[C]$ от α может иметь весьма сложный вид (рис. 3). В частности, при некоторых соотношениях коэффициентов распределения наблюдается даже уменьшение выхода продукта С при уменьшении концентрации второго продукта (воды) в системе (рис. 3, 2–4). Это обусловлено тем, что при увеличении α константа равновесия уменьшается быстрее, чем концентрация воды (см. уравнение (18)).

Проведенное выше рассмотрение равновесия химических реакций в двухфазных водно-органических системах позволяет сделать следующие выводы.

Во-первых, равновесие химической реакции в двухфазной системе в общем случае определяется константой равновесия этой реакции в одной из фаз, коэффициентами распределения исходных и конечных реагентов и отношением объемов органической и водной фаз. Зная уравнение, которое описывает равновесие реакции в двухфазной системе, и коэффициенты распределения (из литературы или из независимых экспериментов), можно вычислить значение $K_{\text{эфф}}$ и выход продуктов реакции, т. е. предсказать направление и величину изменения равновесия в двухфазной системе по сравнению с водой. К сожалению, в настоящее время в литературе недо-

статочны сведений о коэффициентах распределения различных веществ, а имеющиеся данные не всегда надежны [13].

Во-вторых, зависимость величины $K_{эфф}$ и выхода продуктов химической реакции в двухфазной системе от отношения объемов фаз α может иметь довольно сложный вид. Это необходимо учитывать при выборе экспериментальных условий для проведения синтезов. В частности, при определенных соотношениях коэффициентов распределения наблюдаемое значение $K_{эфф}$ реакции (6) в двухфазной системе может быть больше (рис. 2, 2-4) или соответственно меньше (рис. 2, 2'-4'), чем константы равновесия этой же реакции в каждой из фаз.

Пример 1: катализируемое алкогольдегидрогеназой окисление изобутанола в двухфазной водно-органической системе

Эффективная константа равновесия реакции
 $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{OH} + \text{NAD} \rightleftharpoons (\text{CH}_3)_2\text{CHCHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$ (19)
 в двухфазной системе равна

$$K_{эфф} = K_{вод} \frac{(1 + \alpha P_{альд})(1 + \alpha P_{\text{NADH}})}{(1 + \alpha P_{\text{спирт}})(1 + \alpha P_{\text{NAD}})} \quad (20)$$

или

$$K_{эфф} \approx K_{вод} \frac{1 + \alpha P_{альд}}{1 + \alpha P_{\text{спирт}}}, \quad (21)$$

если полагать, что P_{NAD} и $P_{\text{NADH}} \ll 1$, поскольку используемый кофактор ферментативной реакции как в восстановленной, так и в окисленной форме заряжен и, следовательно, практически не растворяется в используемых органических растворителях (см. рис. 4). Мы убедились экспериментально (спектрофотометрическим путем), что в условиях опыта NAD и NADH действительно локализованы в водной фазе.

Экспериментальные результаты, иллюстрирующие изменение $K_{эфф}$ для реакции (19) в двухфазных системах по сравнению с водой, представлены на рис. 4. Значение $K_{вод}$ (рН 8,4) = $5,7 \cdot 10^{-4}$ (см. [16]).

Исследуемая реакция представляет собой пример системы, в которой исходные и конечные реагенты очень слабо различаются по гидрофобности. Так, в классической системе вода — октанол коэффициенты распределения альдегидной и спиртовой группы различаются всего лишь на 12% [13]. Тем не менее можно подобрать такой растворитель, чтобы коэффициенты распределения исходных и конечных реагентов различались достаточно сильно (за счет, например, специфических сольватационных эффектов). Так, применяя в качестве органической фазы гексан (рис. 4, 1), этилацетат (рис. 4, 5) или смеси этих растворителей (рис. 4, 2-4), нам удалось варьировать значение $K_{эфф}$ для реакции (19) в пределах двух порядков.

Для одной из используемых систем (вода — гексан) в независимом эксперименте были определены коэффициенты распределения спирта и альдегида (см. «Экспериментальную часть»). Они оказались равными 0,25 и 1,2 соответственно. Построенная по уравнению (21) с использованием этих значений теоретическая зависимость $K_{эфф}/K_{вод}$ от α удовлетворительно совпадает с экспериментальными результатами (рис. 4, 1).

Пример 2: катализируемый α -химотрипсином синтез этилвого эфира N-бензоил-L-фенилаланина

Неравенства (13) — (14), описывающие условия существования максимума на зависимости $K_{эфф}$ от α для реакций типа $A + B \rightleftharpoons C + D$, выполняются, если $P_C \gg P_A \sim P_B \gg P_D$. Такое соотношение часто реализуется на опыте, если один из продуктов — вода, так как ее коэффициент распределения

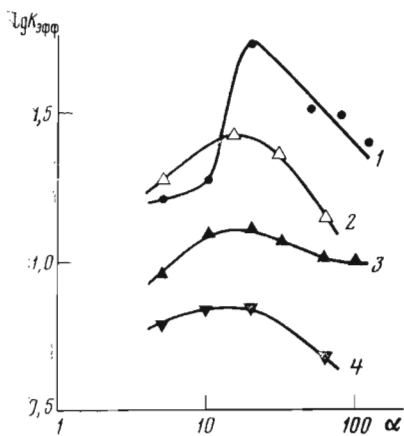


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость эффективной константы равновесия реакции (22) синтеза этилового эфира *N*-бензоил-*L*-фенилаланина, катализируемой α -химотрипсином в двухфазной системе, от соотношения объемов органической и водной фаз (α) и природы органической фазы: 1 — хлороформ, 2 — бензол, 3 — четыреххлористый углерод, 4 — диэтиловый эфир. Константа равновесия реакции (22) в воде равна $5,5 \cdot 10^{-3}$ (на рисунке не показана)

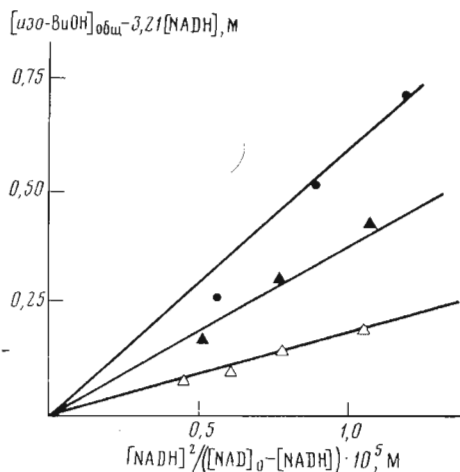


Рис. 6

Рис. 6. Типичные зависимости, получающиеся при определении коэффициента распределения изобутанола в двухфазной системе вода — гексан (см. уравнение (23)) при отношении объемов органической и водной фаз (α), равном 0 (1), 2 (2) и 10 (3)

для большинства органических растворителей не превышает 10^{-2} [13]. В качестве примера рассмотрим реакцию синтеза этилового эфира *N*-бензоил-*L*-фенилаланина из кислоты и спирта:



Зависимость $K_{\text{эфф}}$ от α в случае всех четырех растворителей, использованных в качестве органической фазы (хлороформ, бензол, четыреххлористый углерод и диэтиловый эфир), имеет более или менее сильно выраженный максимум (рис. 5). Этот результат подтверждает теоретически предсказанную особенность двухфазных систем, которая заключается в том, что величина $K_{\text{эфф}}$ может быть в принципе больше обоих предельных значений, характеризующих положение равновесия в той и другой фазах. С точки зрения практического применения двухфазных систем для целей препаративного органического синтеза наличие максимума означает, что существует такое соотношение объемов органической и водной фаз α , при котором сдвиг равновесия (и следовательно, выход продуктов) химической реакции наибольший. Очевидно, это значение α является оптимальным для проведения синтеза.

В воде равновесие реакции синтеза этилового эфира *N*-бензоил-*L*-фенилаланина (22) практически полностью смещено в сторону исходных веществ, поскольку $K_{\text{равн}}$ ($\text{pH } 7,0$) = $5,5 \cdot 10^{-3}$ [14]. При переходе к двухфазным системам константа равновесия в зависимости от природы органической фазы увеличивается (в оптимальных условиях) в $5 \cdot 10^5$, $2,5 \cdot 10^5$, $1,6 \cdot 10^5$ и $5 \cdot 10^4$ раз в случае хлороформа, бензола, четыреххлористого углерода и диэтилового эфира (рис. 5). Увеличивается и выход продукта (до 80, 64, 62 и 26% соответственно), в то время как в воде (при прочих равных условиях) он составляет менее 0,001% [14]. Таким образом, в результате применения двухфазных систем удалось поднять выход сложного эфира практически от нуля до препаративного уровня.

Аналогичные результаты были получены нами ранее при ферментативном синтезе в двухфазных системах этилового эфира *N*-ацетил-*L*-трипто-

фана (выход 100%) и глицерофосфата (выход 30%) из соответствующих кислот и спиртов [4].

Мы надеемся, что разрабатываемый нами метод ферментативного синтеза в двухфазных водно-органических системах найдет широкое применение в различных областях препаративной органической химии.

Экспериментальная часть

В работе использовали бычий α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1) Олайнского завода химреактивов (марка А); алкогольдегидрогеназу (КФ 1.1.1.1) из печени лошади (уд. акт. 2 ед/мг), NAD и NADH (Reanal, ВНР); N-бензоил-L-фенилаланин (Serva, США); силикагель отечественного производства (удельная поверхность 38,8 м²/г, диаметр пор 600 Å); минеральные соли, щелочь, органические растворители («Союзреактив») марки ос.ч. или ч.д.а.

Ферментативный синтез этилового эфира N-бензоил-L-фенилаланина проводили следующим образом: 1,5 г силикагеля вымачивали при пониженном давлении в 0,5 М фосфатном буфере (рН 7,0), отделяли от избытка буфера, добавляли 0,5 мл 0,05 М раствора N-бензоил-L-фенилаланина в воде, содержащего 10 мг α -химотрипсина, перемешивали 10 мин и добавляли определенное количество органического растворителя (5–200 мл) и этанол до концентрации 0,1 М. Систему перемешивали 2 дня при температуре 20° С, отделяли органическую фазу, упаривали на роторном испарителе досуха, остаток растворяли в 2,5 мл этанола, отбирали 0,5 мл раствора и переносили в кювету рН-стага ТТТ 1с (Radiometer, Дания), содержащего 4,5 мл 0,1 М раствора КСl. Затем, поддерживая рН 7,5, в кювету вводили 0,02 мл 10⁻⁵ М раствора α -химотрипсина. Концентрацию сложного эфира находили, титруя щелочью (10⁻² М КОН) N-бензоил-L-фенилаланин, образующийся при ферментативном гидролизе.

Реакция окисления изобутанола, катализируемая алкогольдегидрогеназой, в двухфазной системе исследовалась по скорости образования NADH. К 0,4 мл 0,1 М пирофосфатного буфера (рН 8,4) добавляли 0,1 мл запасного раствора NAD (10 мг/мл в воде), 0,03 мл изобутанола, 0,01 мл кристаллической суспензии алкогольдегидрогеназы (16 мг/мл) в растворе (NH₄)₂SO₄ и определенное количество органического растворителя (1–10 мл). Систему перемешивали 20–30 мин при 20° С, отбирали 0,3 мл водной фазы, вносили в кювету спектрофотометра (Beckman, США), содержащего 2 мл 8 М мочевины, и определяли оптическую плотность на 340 нм. Коэффициент экстинкции NADH принимали равным 6200 [15].

Коэффициент распределения изобутанола в системе вода — гексан определяли следующим образом: к 2 мл воды добавляли определенное количество изобутанола (0,05–0,15 мл) и гексана (10–20 мл), тщательно перемешивали при 20° С, отбирали 1 мл водной фазы, добавляли к нему 2 мл 0,1 М пирофосфатного буфера (рН 8,4), 0,2 мл запасного раствора (10 мг/мл) и 0,01 мл кристаллической суспензии алкогольдегидрогеназы (16 мг/мл). Через 30 мин по величине оптической плотности на 340 нм определяли концентрацию NADH в реакционной смеси. Эта концентрация связана с общей концентрацией изобутанола в двухфазной системе соотношением

$$[\text{изобутанол}]_{\text{общ}} = 3,21 \frac{1 + \alpha P_{\text{изобут}}}{1 + \alpha} \cdot \frac{1}{K} \cdot \frac{[\text{NADH}]^2}{[\text{NAD}]_0 - [\text{NADH}]} + 3,21 [\text{NADH}], \quad (23)$$

где K — константа равновесия реакции окисления изобутанола в воде, $[\text{NAD}]_0$ — исходная концентрация NAD в реакционной смеси. Это соотношение получается совместным решением уравнения материального баланса по изобутанолу

$[изобутанол]_{общ} (V_{орг} + V_{вод}) = [изобутанол]_{вод} V_{вод} + [изобутанол]_{орг} V_{орг}$
и уравнения для константы равновесия реакции окисления изобутанола

$$K = \frac{[изобутиральдегид] [NADH]}{[изобутанол] ([NAD]_0 - [NADH])}$$

При данном соотношении объемов органической и водной фаз (α) в координатах $[изобутанол]_{общ} - 3,21[NADH] \div [NADH]^2 / ([NAD]_0 - [NADH])$ получается прямая с тангенсом угла наклона, равным $3,21(1 + \alpha P_{изобут}) / K(1 + \alpha)$ (рис. 6). При $\alpha = 0$ наклон равен $3,21/K$, при $\alpha \neq 0$ тангенс увеличивается в $1 + \alpha P_{изобут} / 1 + \alpha$ раз. Определив наклон при $\alpha = 0$ и при каком-нибудь отличном от нуля значении α и взяв их отношение, можно вычислить коэффициент распределения изобутанола. Аналогично определяли коэффициент распределения изобутиральдегида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мартинек К., Клибанов А. М., Самохин Г. П., Семенов А. Н., Березин И. В. (1977) Биооргани. химия, 3, 696–702.
2. Имобилизованные ферменты (1976) Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К., ред., т. 2, изд. МГУ.
3. Methods in Enzymology (1976) Mosbach K., ed., vol. 44, Acad. Press, New York – San Francisco – London.
4. Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry (1976) Jones J. B., Sih C. J., Perlman D., eds, John Wiley & Sons, New York – London.
5. Martinek K., Berezin I. V. (1978) J. Solid-Phase Biochem., 2, 343–385.
6. Мартинек К. (1979) в кн.: Успехи биоорганического катализа (Березин И. В., Мартинек К., ред.), с. 105–157, изд. МГУ.
7. Torchilin V. P., Martinek K. (1979) Enzyme Microb. Technol., 1, 74–85.
8. Klivanov A. M., Samokhin G. P., Martinek K., Berezin I. V. (1977) Biotechnol. Bioeng., 19, 1351–1361.
9. Dehmloew E. V. (1974) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 13, 170–179.
10. Dehmloew E. V. (1977) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 16, 493–505.
11. Маюша М. (1977) Успехи химии, 56, 2174–2202.
12. Martinek K., Osipov A. P., Yatsimirski A. K., Berezin I. V. (1973) Tetrahedron, 29, 963–969.
13. Leo A., Pansch C., Elkins D. (1971) Chem. Rev., 71, 525–646.
14. Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К. (1977) Биооргани. химия, 3, 99–104.
15. Biochemica Information (1973) Boehringer Mannheim GmbH, 132.
16. Ленинджер А. (1976) Биохимия, с. 433, «Мир», М.

Поступила в редакцию
13.IX.1979

ENZYMATIC SYNTHESIS IN BIPHASIC WATER-ORGANIC SYSTEMS. II. THE CHEMICAL EQUILIBRIUM SHIFT

SEMENOV A. N., MARTINEK K., BEREZIN I. V.

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

Thermodynamic analysis has been performed for enzymatic equilibrium reactions in the biphasic systems «water-waterimmiscible organic solvent». A theoretical model has been considered which assumes a parallel establishment of equilibrium in each phase and concomitant equilibrium distribution of the reagents between the phases. The dependence of the apparent equilibrium constant K_{eff} on the volume ratio of organic and aqueous phases and on partition coefficients was found. For isobutanol oxidation into isobutyric aldehyde catalyzed by alcoholdehydrogenase, the equilibrium shift in the water-hexane biphasic system was shown to be determined (in accordance with the theory) by the partition coefficients of the reagents. As compared to aqueous solutions, the equilibrium can be shifted either towards initial reagents or end products by varying the composition of the organic phase. A theoretically predicted extremal dependence of K_{eff} on the volume ratio of aqueous and organic phases was observed in the α -chymotrypsin catalyzed synthesis of N-benzoyl-L-phenylalanine ethyl ester from protected amino acid and alcohol.