

УДК 541.128+577.15

КАТАЛИЗ ФЕРМЕНТАМИ В ОРГАНИЧЕСКОМ СИНТЕЗЕ

Мартинек Карел, Семенов А. Н.

Рассмотрено современное состояние и перспективы внедрения ферментативного катализа в тонкий органический синтез. Проанализированы физико-химические подходы, которые позволяют увеличить выход целевого продукта в условиях, благоприятных для биокатализа (в оптимуме катализической активности и стабильности фермента). Наряду с классическими равновесными и кинетическими препаративными методами детально обсуждены термодинамические закономерности и общие методические аспекты нового подхода — ферментативного синтеза в двухфазных системах «вода — несмешивающийся с водой органический растворитель».

Библиография — 170 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1376
II. Равновесные подходы	1377
III. Кинетические препаративные подходы	1383
IV. Ферментативный синтез в двухфазных системах «вода — несмешивающийся с водой органический растворитель»	1387
V. Современное состояние и перспективы внедрения ферментативного катализа в органический синтез	1397

I. ВВЕДЕНИЕ

Применение биологических катализаторов (ферментов) в тонком органическом синтезе представляется весьма перспективным и во многих случаях имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с классическими методами синтетической химии. Это обусловлено прежде всего тем, что ферменты обладают уникальной специфичностью (избирательностью), т. е. катализируемые ими реакции протекают, как правило, по единственному пути без побочных процессов. Более того, непревзойденная катализическая активность ферментов обеспечивает проведение синтеза в мягких условиях. Следовательно, внедрение биокатализа в практику могло бы привести к экономии энергии и ресурсов и, кроме того, уменьшить ущерб, который наносит современная химическая технология окружающей среде.

Несмотря на эти очевидные достоинства ферментативного катализа, решающие шаги в данной области наметились лишь в последние 10—15 лет. Это связано, во-первых, с общим прогрессом в изучении свойств, структуры и функций ферментов (см., например, [1—4]) и, во-вторых, с созданием иммобилизованных ферментов [5, 6]. В результате иммобилизации (например, ковалентного присоединения фермента к водонерастворимой частице, включения фермента в гель, адсорбции фермента на носителе) можно гетерогенный катализатор отделить от реакционной среды и использовать повторно. Кроме того, иммобилизация — это метод для целенаправленного изменения (улучшения) практически важных свойств ферментов [5—7] и в первую очередь их стабильности [8—11]. И наконец, в-третьих, ферменты стали доступными в больших

количествах в связи с развитием методов их микробиологического синтеза и выделения [12, 13].

Успехи, достигнутые при использовании биокатализа в препаративном органическом синтезе, а также возможные перспективы их применения обсуждены в ряде обзоров [5, 6, 14—27]. Подавляющее большинство ферментативных процессов разработано пока лишь в лабораторном масштабе; характерные примеры приведены в [8, 9]. Однако уже сейчас некоторые процессы стали промышленными [14, 15].

Существует тем не менее одно обстоятельство, ограничивающее более широкое применение ферментов в препаративном органическом синтезе. Дело в том, что ферменты сохраняют свои уникальные катализитические свойства лишь в довольно узком диапазоне условий, а именно в водных растворах при нейтральных или близких к нейтральным значениях pH и при не слишком высоких температурах. Однако равновесие многих практически важных реакций сдвинуто в этих условиях в сторону исходных реагентов. Иными словами, при использовании биокатализа нередко возникает ситуация, когда условия, необходимые для сохранения катализитических свойств фермента, несовместимы с термодинамическими условиями, оптимальными для достижения высокого выхода катализируемой реакции.

Противоречие между относительно «жесткими» условиями, в которых должна протекать химическая реакция, и «нежной» природой биокатализатора (его относительно лабильной структурой) можно в принципе разрешить. Один из путей — стабилизация фермента против инактивирующих влияний повышенной температуры, экстремальных значений pH, органических растворителей и т. п. На этом пути уже достигнуты существенные успехи [8—11], и исследования продолжаются (см., например [16]). Поэтому можно надеяться, что в будущем классические подходы препаративного органического синтеза (изменение температуры и pH, подбор реакционной среды) станут обычными также и для ферментативных реакций. В настоящем обзоре будут рассмотрены принципиально иные решения данной проблемы, а именно физико-химические подходы, которые позволяют увеличить выход целевого продукта без стабилизации фермента непосредственно в условиях, благоприятных для биокатализа.

II. РАВНОВЕСНЫЕ ПОДХОДЫ

Равновесными назовем те подходы, которые позволяют увеличить выход целевого продукта (в катализируемых ферментами термодинамически неблагоприятных реакциях синтеза) за счет сдвига химического равновесия.

1. Метод, основанный на низкой растворимости продукта

Причина сдвига химического равновесия в благоприятную сторону может заключаться в том, что один или несколько конечных продуктов плохо растворимы в воде (в условиях проведения реакции) и выпадают в осадок.

Физико-химическую сущность этого явления рассмотрим на примере реакции:



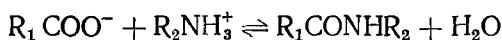
Эффективная константа равновесия ($K_{\text{эфф}} = ([C]_{\text{раст}} + [C]_{\text{осад}})/[A][B]$) равна:

$$K_{\text{эфф}} = \frac{K}{[C]_{\text{раст}}} \left\{ [A]_0 (K/[C]_{\text{раст}})^{\frac{1}{2}} - 1 \right\}, \quad (2)$$

если истинная константа равновесия (в отсутствие осадка) равна $K = [C]/[A][B]$, и уравнение материального баланса имеет вид: $[A]_0 = [A] + [C]_{\text{раств}} + [C]_{\text{осад}}$ при $[A]_0 = [B]_0$, где $[A]_0$, $[B]_0$ — начальные концентрации исходных реагентов, $[A]$, $[B]$ и $[C]$ — равновесные концентрации реагентов в растворе, $[C]_{\text{раств}}$ — максимальная концентрация растворенного продукта (растворимость), $[C]_{\text{осад}}$ — концентрация реагента, выпавшего в осадок (отнесенная к объему всей системы). Уравнение (2) справедливо лишь при наличии осадка, т. е. при $[A]_0 > [C]_{\text{раств}} + [A] = [C]_{\text{раств}} + ([C]_{\text{раств}}/K)^{1/2}$.

Из формулы (2) следует, что сдвиг равновесия (1), наблюдаемый при выпадении продукта в осадок, должен быть более значительным в условиях высоких концентраций исходного реагента и, естественно, при более низкой растворимости конечного продукта.

Применение. Обычно описанный метод применяют для синтеза амидной (пептидной) связи по общей схеме:

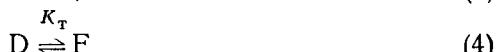


В этой реакции растворимость продукта, как правило, существенно ниже растворимости исходных реагентов, поскольку при синтезе исчезают два заряда (см., например, синтез анилидов [28—31] и фенилгидразидов [30, 32, 33] аминокислот, а также олигопептидов заданной последовательности [29, 30, 34—43]). Катализаторами здесь служат различные протеолитические ферменты: α -химотрипсин, трипсин (см., например, [38]), бактериальные металлопротеиназы [40], папаин [43] и др.

Ограничения метода. Метод обладает двумя существенными недостатками. Во-первых, требование низкой растворимости конечного продукта сильно ограничивает выбор соединений, которые могут быть синтезированы таким способом [37], чтобы обеспечить достаточно низкую растворимость соответствующего продукта, иногда необходимо защищать ионогенные группы в исходных реагентах [36, 43]. Во-вторых, образование осадка в процессе реакции затрудняет применение в качестве катализаторов водонерастворимых производных ферментов.

2. Применение последовательных реакций

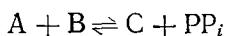
Выход реакции увеличивается, если один из продуктов вовлекается в последующую (ферментативную или неферментативную) термодинамически выгодную реакцию, например:



Поскольку реакция (4), дополнительно введенная в систему, должна быть термодинамически выгодной, т. е. должно выполняться условие $\Delta G_t < 0$, то константа равновесия суммарной реакции $A + B \rightleftharpoons C + F$ будет больше, чем константа равновесия исходной реакции (3):

$$K_s = \exp \left(- \frac{\Delta G^0 + \Delta G_t^0}{RT} \right) > K = \exp \left(- \frac{\Delta G^0}{RT} \right). \quad (5)$$

Реакции с выделением неорганического пиофосфата. Особенно плодотворным этот метод оказался в приложении к реакциям типа



где PP_i — неорганический пиофосфат. Последующий гидролиз пио-

фосфата, катализируемый добавленной в систему неорганической пирофосфатазой (П):



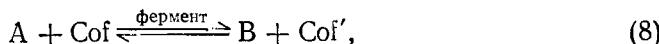
является термодинамически очень выгодной реакцией; например, при pH 7 для реакции (6) величина $\Delta G_r^\circ = -5,27$ ккал/моль [44]. Это обеспечивает существенный сдвиг равновесия суммарной реакции в сторону продуктов.

Так, например, при синтезе нуклеотида оротидин-5'-монофосфата (OMP) из оротовой кислоты (OA) и 5'-фосфорибозил-1'-пирофосфата (PRPP):



катализируемом фосфорибозилтрансферазой, удалось [45] поднять выход с 54 до 100% именно за счет введения дополнительного процесса (6). Этот метод (основанный на удалении побочного пирофосфатного продукта) использован при ферментативном синтезе НАД [46], меченых галактоз [47], нуклеиновых кислот [48] и β -UDP-ацетилглюкозамина [49].

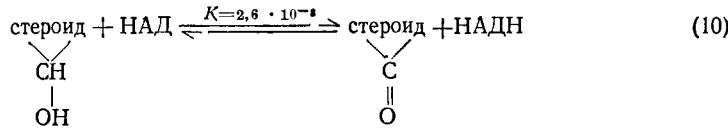
Регенерация кофактора ферментативной реакции. Многие ферментативные реакции протекают с участием кофакторов:



где Cof и Cof' — исходная и «израсходованная» формы кофактора соответственно (см. [50, 51]). Расходование кофактора существенно повышает стоимость продуктов и в конечном итоге сдерживает применение ферментов в широких масштабах для целей органического синтеза. Поэтому в последние годы большие усилия направлены на создание так называемых систем регенерации кофактора. Регенерация происходит обычно в результате какой-либо сопряженной ферментативной или неферментативной реакции (или совокупности реакций) типа

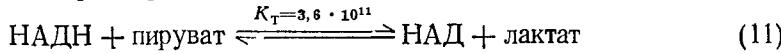


(см. обзоры [6, 9]). Следовательно, при регенерации кофактора выход продукта B может определиться равновесием суммарной реакции A+C ⇌ B+D. Наглядно это показано [52] при модификации стероидов:



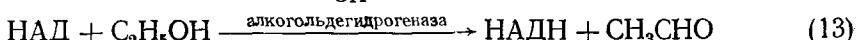
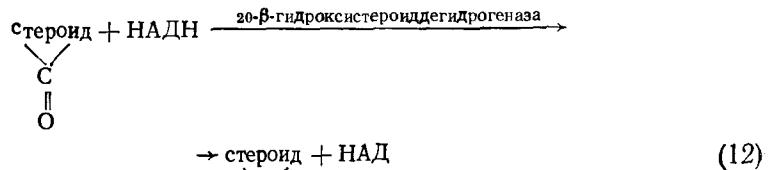
катализируемой 20- β -гидрокистероиддегидрогеназой.

Регенерация кофактора:

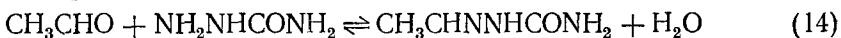


катализируемая лактатдегидрогеназой — это термодинамически выгодный процесс. Именно поэтому равновесие суммарного процесса (10) — (11) сдвинуто в сторону образования продукта, а именно кетоформы стероида: $K_2 = K_1 K_r \approx 10^4$.

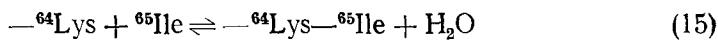
Другие примеры. В аналогичной системе с регенерацией кофактора



найдено [53], что суммарная константа равновесия ≈ 1 . Поэтому для сдвига равновесия в сторону образования оксиформы стероида использовали известную реакцию прочного связывания побочного ацетальдегида в семикарбазон:



Итак, добавочный процесс, протекающий последовательно с реакцией синтеза и обусловливающий сдвиг суммарного равновесия вправо,— это может быть как *ферментативная*, типа (6), так и *неферментативная* химическая реакция, например (14). В принципе природа этого термодинамически выгодного вспомогательного процесса может быть и физической. Так, Ласковски с сотр. [54] наблюдал катализируемый трипсином синтез пептидной связи в активном центре соевого ингибитора трипсина:



Равновесие реакции синтеза сдвинуто вправо вследствие того, что продукт образует прочный комплекс (константа связывания $\sim 10^8$) с трипсином.

3. Ферментативный синтез в водно-органических смесях

Синтез таких соединений, как простые и сложные эфиры, амиды, ангидриды и т. д. проводят обычно путем обращения реакций гидролиза. Следовательно, один из продуктов — вода:



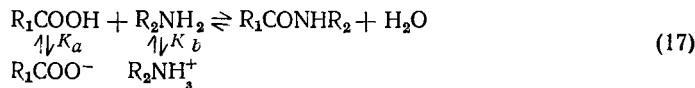
Поэтому в условиях ферментативной реакции (в воде) равновесие таких реакций вследствие высокой концентрации водного компонента ($55,5 M$) смещено, как правило, влево.

Физико-химические «источники» сдвига равновесия. Очевидно, выход продукта С можно увеличить, если уменьшить концентрацию воды в системе, поскольку $[C] = K[A][B]/[H_2O]$. С этой целью реакцию удобно проводить не в воде, а в водно-органической смеси с высоким содержанием неводного компонента: диметилсульфоксида, формамида, диметилформамида, диоксана, ацетона, этиленгликоля, глицерина, одноатомных спиртов и др. (см. обзоры [9, 11, 55]).

Наряду с этим тривиальным «концентрационным» эффектом на равновесие (16) оказывают влияние также и факторы среды, такие как изменение диэлектрической проницаемости или полярности и т. п. Среди такого рода специфических эффектов весьма общим следует считать

сдвиг равновесия, обусловленный изменением рК_a участвующих в реакции кислот и (или) оснований.

Рассмотрим это явление на примере реакции синтеза амидной связи:



В воде (при любых значениях pH) равновесие этой реакции смешено влево прежде всего за счет термодинамически выгодных процессов ионизации по крайней мере одного из исходных реагентов. При переходе к водно-органической смеси с высоким содержанием неводного компонента происходят закономерные сдвиги наблюдаемых значений рK_a и рK_b, обусловленные как электростатическими, так и сольватационными эффектами [56]. Наиболее существенным образом изменяется, как правило, значение рK_a кислоты: оно увеличивается, т. е. происходит сдвиг равновесия ионизации в сторону незаряженной формы. В результате равновесие всей реакции (17) смещается в сторону синтезируемого продукта [57, 58]. Так, например, при переходе от воды к 85%-ному раствору 1,4-бутандиола константа равновесия реакции синтеза пептидной связи увеличилась в 80 раз [57].

Изученные системы. Водно-органические смеси с высоким содержанием неводного компонента использованы для синтеза этилового и глицеринового эфиров N-ацетил-L-тирозина [59], мочевины [60], глицерофосфата [61], эфиров жирных кислот [62, 63], дипептидов [57, 64], человеческого инсулина [64, 65], а также для ресинтеза гидролизованной пептидной связи в рибонуклеазе [58]. Сделана также попытка (неудачная) синтезировать сахар из глюкозы и фруктозы [66].

Ограничения метода. Существенным недостатком метода является то, что в присутствии высоких концентраций органических растворителей, как правило, наблюдается значительное ухудшение таких важных характеристик ферментов, как каталитическая активность, специфичность и стабильность (см. работу [61] и ссылки в ней, а также обзор [55]). Поэтому неоднократно делались попытки защитить фермент от инактивации органическими растворителями путем иммобилизации (см. обсуждение в [67, 68]). Однако этот подход до сих пор не привел к достаточно стабильным ферментным препаратам. Поэтому чаще всего авторы просто методом проб и ошибок подбирают условия (органический растворитель и его концентрацию), в которых сдвиг равновесия в сторону синтеза был бы достаточно большим и в то же время не наблюдалось бы значительной инактивации фермента.

В противовес таким эмпирическим подходам недавно сформулирован [61] научно обоснованный критерий для выбора органического растворителя как компонента среды в ферментативных (в том числе и синтетических) реакциях. Тем не менее даже в наиболее оптимальных условиях не удается снизить концентрацию воды в системе более чем в 10—20 раз, что, естественно, ограничивает возможности метода.

Критерий для подбора оптимального растворителя (с точки зрения его влияния на фермент) можно обосновать, исходя из общих представлений об относительной роли сил, поддерживающих нативную структуру белковых молекул в водных растворах: доминирующую роль играют «гидрофобные взаимодействия» [69, 70] (несмотря на недавние сомнения [71, 72]). Следовательно, «хороший» для белка неводный растворитель не должен нарушать такие взаимодействия.

Для ответа на вопрос о том, какие растворители обладают этим свойством, мы в работе [61] обратились к результатам, полученным для

процесса мицеллообразования поверхностно-активных веществ в различных растворителях. Так, Рэй [73] пришел к выводу, что гидрофобные взаимодействия — это лишь частный случай сольвофобных взаимодействий.

По способности к реализации сольвофобных взаимодействий все растворители можно разделить на три класса: к первому классу относятся вода, глицерин, этиленгликоль, аминоэтанол, формамид и некоторые другие; ко второму — метилформамид и диметилформамид, а к третьему — метанол, этанол, толуол. В наибольшей степени сольвофобные взаимодействия реализуются в растворителях, относящихся к первому классу (так, мицеллы детергента образуются только в них); в значительно меньшей степени — в растворителях второго класса и практически отсутствуют в растворителях третьего класса. Такое различие обусловлено, по мнению Рэя [73], тем, что растворители первого класса содержат в молекуле по крайней мере два или три фрагмента, способных к образованию водородных связей. В результате межмолекулярных взаимодействий водородные связи образуют жесткие (термодинамически невыгодные) каркасные структуры растворителя вокруг сольвофобных растворенных молекул. Это приводит к сольвофобным (или, в частном случае, гидрофобным) взаимодействиям. В ряду растворителей первого класса наиболее эффективно сольвофобные взаимодействия реализуются (оценено по величинам критических концентраций мицеллообразования) в воде и глицерине; у остальных указанных способность существенно ниже.

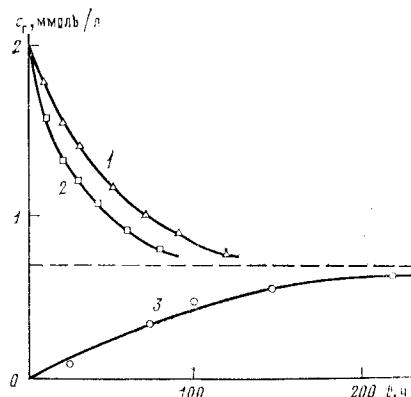
Эти данные позволили нам сформулировать [61] критерий для выбора оптимального растворителя. Критерий универсален, поскольку эффективность сольвофобных, так же как и гидрофобных [74], взаимодействий определяется не природой взаимодействующих молекул, а прежде всего природой растворителя. Следовательно, если полагать, что основная роль в поддержании структуры белковых молекул принадлежит гидрофобным взаимодействиям, то следует признать, что наилучшими растворителями для проведения ферментативных реакций должны быть растворители первого класса, а среди них — вода (которая используется в природе) и глицерин. В связи с этим уместно заметить, что в некоторых работах действительно было экспериментально найдено, что растворители, относящиеся к первому классу, особенно глицерин и в меньшей степени этиленгликоль, гораздо слабее денатурируют белки, чем прочие. Этот эмпирический факт нашел свое физико-химическое объяснение [61, 73].

Для подтверждения рассмотренных взглядов нами изучена [61, 75] зависимость каталитической активности нескольких ферментов (кислой фосфатазы, α -химотрипсина, формиатдегидрогеназы и пенициллиназы) от концентрации в водном растворе некоторых органических растворителей. Найдено [61, 75], что глицерин и этиленгликоль (относящиеся к первому классу) в меньшей степени инактивируют ферменты, чем диметилформамид (второй класс) или этанол (третий класс). Такой же вывод следует из сравнительного исследования, которое недавно провел Батлер [55] для кислой фосфатазы в водном растворе этиленгликоля (первый класс) и метанола (третий класс). Эти факты хорошо согласуются с развиваемой в [61] концепцией, согласно которой нативная структура белковых молекул (а, следовательно, их каталитическая активность) поддерживается в тех растворителях, которые способны к сольвофобным взаимодействиям. Вместе с тем следует отметить, что трехмерная структура белковых молекул поддерживается не только гидрофобными взаимодействиями, но и другими видами связей — элек-

тростатическими или водородными и т. д. [69]; поэтому замена воды на другой растворитель не может пройти для белка полностью «незамеченной». Этим и объясняется, вероятно, снижение каталитической активности при слишком высокой концентрации глицерина [61, 75] (см. также обсуждение критериев для выбора растворителя в обзоре [55]). Тем не менее во многих случаях водно-глицериновые растворы (или же смеси вода — растворитель первого класса) вполне пригодны как среда в реакциях синтеза [59, 61, 76—82]. Рассмотрим один пример.

Ферментативный синтез глицерофосфата. В воде (при рН 5) константа равновесия «не благоприятствует» синтезу глицерофосфата [83]:

Рис. 1. Кинетические кривые катализируемого кислотой фосфатазой гидролиза (1, 2) и синтеза (3) глицерофосфата в 95%-ном глицерине, c_t — концентрация глицерофосфата; 1 — α -, 2 — β -глицерофосфат. Пунктир соответствует равновесной концентрации глицерофосфата [61]



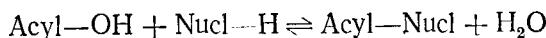
Так, например, при концентрациях глицерина и неорганического фосфата, равных 2 ммоль/л, выход глицерофосфата должен составить лишь $\sim 0,01\%$. По-другому обстоит дело в 95%-ном глицерине. На рис. 1 (кривая 3) приведена кинетика накопления глицерофосфата при ферментативном синтезе из глицерина и фосфата [61]. К тому же уровню глицерофосфата в системе можно прийти и при катализируемом кислотой фосфатазой сольволизе α -глицерофосфата (кривая 1) или β -глицерофосфата (кривая 2). Это указывает, что достигаемый уровень накопления глицерофосфата в системе является истинно термодинамически равновесным и не ограничивается, например, инактивацией фермента в водно-органической смеси. Как видно из рис. 1, выход глицерофосфата в 95%-ном глицерине составляет $\sim 35\%$, что вполне приемлемо для preparatивных целей.

III. НЕРАВНОВЕСНЫЕ (КИНЕТИЧЕСКИЕ) ПОДХОДЫ

В некоторых случаях удается достичь такой высокой концентрации целевого продукта, которая не соответствует термодинамически равновесному состоянию системы, а возникает и сохраняется определенное время по причинам чисто кинетическим. Этот подход широко используется для увеличения выхода продуктов в катализируемых ферментами термодинамически неблагоприятных реакциях синтеза.

1. Реакции переноса, катализируемые гидролитическими ферментами

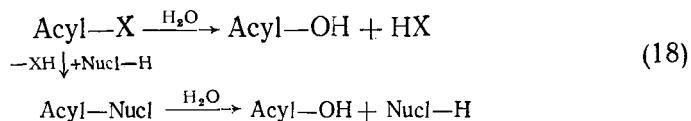
Если в реакции:



равновесие смещено в сторону исходных реагентов, то выход продукта

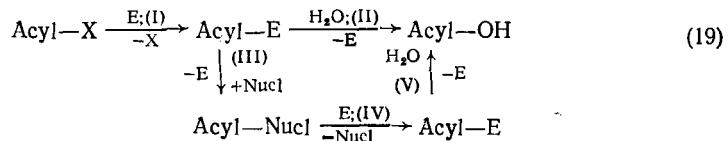
Acyl—Nucl можно существенно увеличить с помощью описанного ниже кинетического приема.

Физико-химическая сущность метода. Например, нужно синтезировать производное Acyl—X, которое (наряду с неизбежным гидролизом) способно вступать достаточно эффективно во взаимодействие с нуклеофилом (Nucl—H):



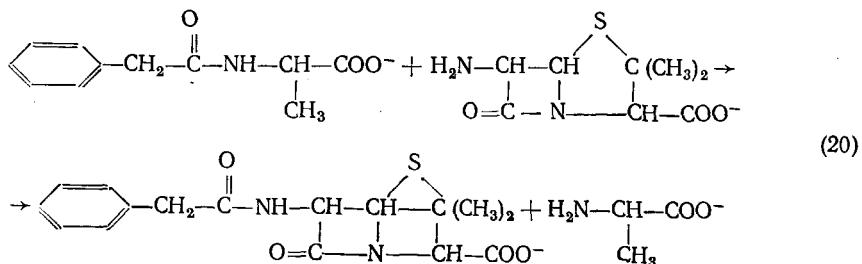
Тогда желаемый продукт Acyl—Nucl будет образовываться в реакционной смеси как промежуточное соединение, которое далее гидролизуется. Очевидно, что зависимость концентрации промежуточного продукта Acyl—Nucl от времени должна иметь вид кривой с максимумом (см. кинетические закономерности последовательных реакций [84]). Важно то, что при определенных соотношениях концентраций реагентов и констант скоростей отдельных стадий максимальная концентрация Acyl—Nucl может оказаться существенно выше равновесной.

Рассмотрим реакцию (18) более подробно в каталитическом режиме (с участием какой-либо гидролазы). Механизм катализа многими ферментами класса гидролаз включает образование промежуточного ковалентного соединения ацильной части субстрата с ферментом — ацилфермента [3, 85]. На последующих стадиях ацилфермент разлагается под действием воды с регенерацией каталитически активного фермента (E) и выделением соответствующей кислоты (стадии (I), (II)):



Однако если в системе присутствует нуклеофил Nucl, способный эффективно конкурировать с водой, то возможно протекание параллельной реакции ((I) и (III)), и в реакционной смеси будет образовываться промежуточный продукт Acyl—Nucl, который далее ферментативно гидролизуется на стадиях (IV), (V) (см. [3, 86]).

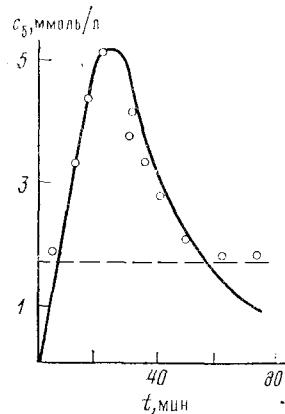
Кинетика накопления и гидролиза продукта Acyl—Nucl описывается системой дифференциальных уравнений, которую в общем случае нельзя решить в аналитическом виде, и для ее решения необходимо использовать методы численного интегрирования на ЭВМ. Кинетические закономерности ферментативного переноса ацильного остатка на нуклеофил весьма подробно изучены в [87, 88]. На рис. 2 показано в качестве примера, как накапливается в реакционной смеси бензилпенициллин при его синтезе из фенилацетилглицина и 6-аминопенициллановой кислоты:



Реакцию катализировали [87] пенициллинамидазой. Из рис. 2 видно, что концентрация продукта в кинетическом оптимуме значительно превосходит равновесный уровень (пунктир).

Для дальнейшего развития данного кинетического метода важно то, что экспериментальные результаты вполне описываются теоретической кривой, которая построена с использованием кинетических и равновесных констант, определенных в независимых экспериментах [87, 88]. Это открывает возможность предсказывать максимальный выход и, следовательно, оптимизировать процесс синтеза.

Рис. 2. Кинетическая кривая накопления продукта в реакции синтеза бензилпенициллина (c_0 — концентрация бензилпенициллина) из фенилацетилглицина и 6-аминопенициллановой кислоты, катализируемой пенициллинамидазой. Точки — экспериментальные данные, линия — результат решения системы дифференциальных уравнений методом численного интегрирования на ЭВМ [87]



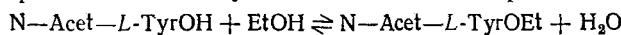
Применение. Ботвинник с сотр. одна из первых применила указанный метод для стереоспецифического синтеза олигопептидов заданной последовательности (в качестве катализатора использовали α -химотрипсин) [89, 90]; позднее синтез пептидов подробно изучен в работах японских авторов [91, 92]. Метод также использован для катализируемого пенициллинамидазой синтеза β -лактамных антибиотиков [87, 88, 93], фосфатидилсерина [94] и фосфатидилэтаноламина [95] (в качестве катализатора использовали фосфолипазу).

Ограничения метода и перспективы. Применение метода ограничено тем, что нужно подобрать (и синтезировать) такой исходный субстрат Acyl—X, который, достаточно медленно гидролизуясь по катализическому пути (II) (см. реакцию (19)), весьма эффективно (быстро) вступал бы во взаимодействие с добавленным нуклеофилом (стадия (III)). Максимальный выход продукта Acyl—Nucl ограничен также и его последующим гидролизом (стадии (IV) и (V)). В принципе обе эти гидролитические «помехи» данного метода можно хотя бы частично подавить, если проводить синтез в условиях, обеспечивающих выпадение продукта в осадок [89—92]. В будущих исследованиях можно попытаться уменьшить нежелательный гидролиз исходного реагента Acyl—X и продукта Acyl—Nucl, проводя синтез не в воде, а в водно-органической смеси с высоким содержанием неводного компонента. Для этой же цели (для увеличения кинетически контролируемого выхода) может оказаться полезным также применение двухфазных систем «вода — несмешивающийся с водой органический растворитель» (см. ниже).

2. Кинетически контролируемое равновесие

Недавно [96] обнаружено весьма интересное явление — гидролиз этилового эфира N-ацетил-L-тирофена, катализируемый α -химотрипсином, иммобилизованным на заряженных носителях (сефадексы), про-

текает при pH 8 не до конца (всего лишь на 60—90% в зависимости от условий). Более того, в этих же условиях (в воде в присутствии фермента, иммобилизованного на носителе) протекает реакция синтеза сложного эфира из соответствующей кислоты и спирта:



(см. рис. 3). В результате можно достичь одного и того же состава реакционной смеси как со стороны синтеза, так и со стороны гидролиза. Этот предельный состав не изменяется в течение продолжительного времени. В то же время такое состояние системы не соответствует истинному термодинамическому равновесию. Так, если в систему добав-

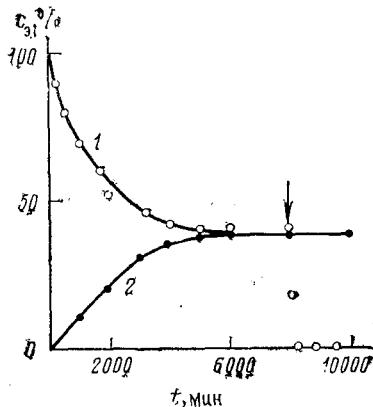


Рис. 3

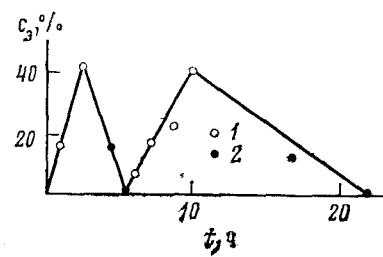


Рис. 4

Рис. 3. Кинетические кривые реакций гидролиза (1) и синтеза (2) этилового эфира N-ацетил-L-тироцина (C_3 — его концентрация), катализируемых α -химотрипсином, иммобилизованным на заряженных носителях (сефадексы). Стрелкой отмечен момент добавления неиммобилизированного фермента [96]

Рис. 4. Кинетические кривые синтеза (1) и гидролиза (2) этилового эфира N-ацетил-L-тироцина, катализируемых иммобилизованным на спиропирановой матрице α -химотрипсином; 1 — система освещена, 2 — система находится в темноте [97]

вить некоторое количество свободного (неиммобилизованного) фермента, то концентрация эфира падает практически до нуля.

По мнению авторов [96], это явление связано с тем, что в двойном электрическом слое (ДЭС), который существует на поверхности носителя, изменяется свободная энергия химической реакции (по сравнению со свободной энергией этой же реакции в отсутствие электрического поля) за счет энергии ориентации диполей реагентов. В итоге может оказаться, что внутри ДЭС равновесие реакции в большей степени благоприятствует синтезу продукта, чем в воде. Конечно, объем ДЭС на поверхности носителя составляет обычно лишь долю общего объема системы, и, следовательно, сдвиг равновесия в нем должен сказать весьма незначительно на суммарном равновесном составе реагентов во всей системе. Однако если скорости реакций в объеме системы малы по сравнению с соответствующими скоростями в ДЭС, т. е. если равновесие реакции во всей системе будет устанавливаться только через ДЭС, то наблюдаемый равновесный состав реагентов может кинетически контролироваться равновесием реакции в двойном электрическом слое.

Именно поэтому авторы [96] предложили для такого рода явлений термин «кинетически контролируемое равновесие».

Кинетический контроль равновесия можно осуществить, например, катализитическим путем, если катализатор включить внутрь ДЭС. В этом случае скорость реакции внутри ДЭС будет, естественно, больше, чем в объеме системы и поэтому (если равновесие внутри ДЭС благоприятствует синтезу) можно достичь высокого выхода продукта, разумеется, неравновесного в объеме всей системы. Именно такая ситуация реализуется по мнению авторов [96] в рассмотренном выше примере.

С тех же позиций можно, по-видимому, объяснить тот факт, что гидролиз того же субстрата (этиловый эфир N-ацетил-L-тирофина) протекает только на 60%, если катализировать реакцию α -химотрипсином, иммобилизованным на спиропирановой матрице [97]; соответственно на 40% проходит реакция синтеза из кислоты и спирта (рис. 4). Интересно отметить, что данный эффект имеет место лишь при освещении; в темноте реакция синтеза не идет, а гидролиз протекает на 100%. Как показано на рис. 4, вследствие этого появилась возможность регулировать положение «кинетически контролируемого равновесия» с помощью света. Японские авторы объясняют это явление тем, что свойства матрицы, определяющие, по-видимому, равновесие химической реакции вблизи или внутри нее, различны в темноте и на свету [97].

Обе системы открыты совсем недавно (сообщения о них появились в 1978 и 1979 гг. соответственно), сравнительно мало изучены (для второй системы еще не вполне ясен механизм действия) и поэтому пока трудно судить об их достоинствах и недостатках, а также о потенциальных возможностях применения в ферментативном органическом синтезе.

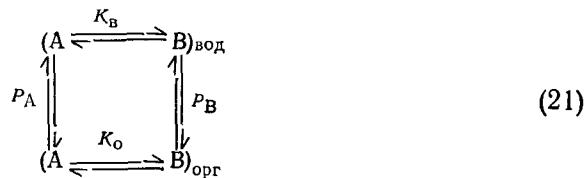
IV. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ В ДВУХФАЗНЫХ СИСТЕМАХ «ВОДА — НЕСМЕШИВАЮЩИЙСЯ С ВОДОЙ ОРГАНИЧЕСКИЙ РАСТВОРИТЕЛЬ»

Каждый из описанных выше методов, позволяющих сдвигать равновесие (или, в более общем виде, увеличивать выход целевого продукта) в катализируемых ферментами термодинамически неблагоприятных реакциях синтеза, применим лишь для ограниченного числа случаев. Недавно предложен равновесный подход, который, по-видимому, представляет собой более общее решение проблемы. Его суть заключается в том, что реакцию проводят в двухфазной системе вода — несмешивающийся с водой органический растворитель [67, 68]. Фермент находится в водной фазе, и поэтому не нужно решать традиционную проблему стабилизации фермента по отношению к его денатурации под действием органического растворителя. Вводимые растворенными в органической фазе субстраты будут диффундировать из нее в воду, претерпевать там химическое превращение под действием фермента, а образующиеся продукты будут диффундировать из воды обратно в органическую фазу. Таким образом, термодинамическое равновесие в проводимой реакции будет устанавливаться по всей водно-органической системе через воду (с помощью находящегося там в воде катализатора — фермента). Объемная доля органической фазы может быть в принципе сколь угодно близка к единице (содержание воды должно быть лишь достаточным, чтобы растворить с сохранением каталитической активности нужное количество фермента). Следовательно, условия равновесия в такой системе могут быть сколь угодно близки к равновесию в чистой органической среде.

Ферментативная двухфазная система может быть создана либо в виде двух несмешивающихся слоев, либо как эмульсия водного раствора фермента в органической фазе или, наконец, путем включения фермента в обращенные мицеллы поверхностью-активного вещества [16, 98] (см. также обзоры [8—11]) или в жидкие мембранны [99]. Однако для технологии гораздо более удобна суспензия в органической среде частиц (пористое стекло или керамика, полые волокна, гранулы геля, микрокапсулы и т. д.), пропитанных водным раствором фермента. Фермент может быть использован как в свободном, так и в иммобилизованном состояниях.

Физико-химическая сущность сдвига химического равновесия. При переходе от воды (как среды реакции) к двухфазной системе с малым содержанием водного компонента обнаружен [67, 68] существенный сдвиг химического равновесия. Одна из причин сдвига равновесия, наблюдавшегося в реакциях типа $A + B \rightleftharpoons C + H_2O$ (где один из продуктов — вода), представляется очевидной: это концентрационный эффект, обусловленный уменьшением в двухфазной системе концентрации водного реагента. Существует, однако, еще один, более общий источник сдвига, а именно: изменение эффективной константы равновесия за счет распределения реагентов между фазами. Рассмотрим количественные закономерности этого явления на примере некоторых простых реакций.

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



Здесь индексы «в» и «о» относятся соответственно к воде и органическому растворителю. Эффективную константу равновесия реакции (21), равную отношению общих концентраций реагентов A и B, отнесенных к объему всей двухфазной системы, т. е. $K_{\text{эфф}} = [B]_{\text{общ}}/[A]_{\text{общ}}$, можно записать [100—102] в следующем виде:

$$K_{\text{эфф}} = K_B \frac{1 + \alpha P_B}{1 + \alpha P_A}, \quad (22)$$

или

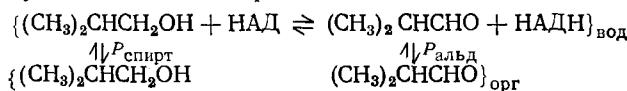
$$K_{\text{эфф}} = K_O \frac{1 + 1/\alpha P_A}{1 + 1/\alpha P_B}, \quad (23)$$

где K_B и K_O — константы равновесия реакции (21) в воде и органическом растворителе соответственно; $\alpha = V_o/V_{\text{в}}$ — отношение объемов органической и водной фаз; $P_A = [A]_o/[A]_{\text{в}}$ и $P_B = [B]_o/[B]_{\text{в}}$ — коэффициенты распределения реагентов между фазами.

Как видно из формулы (22), значение $K_{\text{эфф}}$ 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 $K_B P_B / P_A \equiv K_O$. Коэффициенты распределения органических соединений между водой и коммерчески доступными органическими растворителями имеют обычно значения от 10^{-4} до 10^4 [103, 104]. Следо-

вательно, предельный сдвиг равновесия ($K_{\text{эфф}}/K_b$) может быть в принципе весьма значительным.

В качестве примера рассмотрим реакцию окисления изобутанола, катализируемую алкогольдегидрогеназой:



Эта реакция хорошо изучена в воде [105]. В двухфазной системе [100—102] положение равновесия этой реакции описывается уравнением, аналогичным (22), поскольку используемый кофактор ни в окисленной, ни в восстановленной формах (будучи электростатически заряженным) не переходит из воды в органический растворитель.

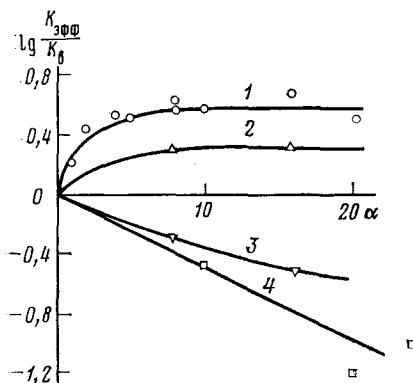


Рис. 5

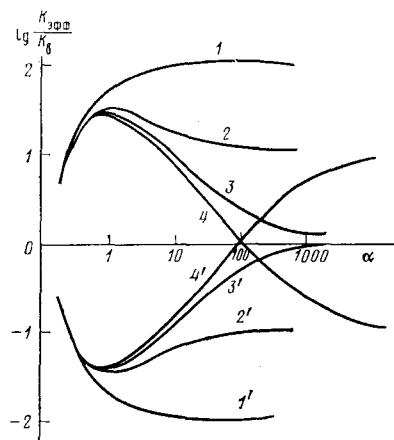


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость эффективной константы равновесия ($K_{\text{эфф}}$) реакции окисления изобутанола в изобутиральдегид, катализируемой алкогольдегидрогеназой в двухфазной системе вода — органический растворитель, от соотношения объемов фаз (α) и состава органической фазы этилацетат — гексан: 1 — 0, 2 — 12,5, 3 — 50, 4 — 100% этилацетата [100, 101]

Рис. 6. Зависимость $K_{\text{эфф}}$ реакции типа $A+B \rightleftharpoons C+D$ в двухфазной системе вода — органический растворитель от α при некоторых значениях коэффициентов распределения: 1—4: $P_A=P_B=1$, $P_C=10^2$, $P_D=1$ (1), 10^{-1} (2), 10^{-2} (3), 10^{-3} (4); 1'—4': $P_C=P_D=1$, $P_A=10^2$, $P_B=1$ (1'), 10^{-1} (2'), 10^{-2} (3'), 10^{-3} (4') (Из работ [100—102])

Следовательно, для NAD и NADH коэффициенты распределения практически равны нулю. Таким образом,

$$K_{\text{эфф}} \approx K_b \frac{1 + \alpha P_{\text{альд}}}{1 + \alpha P_{\text{спирт}}} . \quad (24)$$

Экспериментальные результаты представлены на рис. 5. На примере рассмотренной системы следует отметить два момента. Во-первых, исследуемая реакция представляет собой систему, в которой исходные и конечные реагенты очень слабо различаются по гидрофобности. Так, в классической системе вода — октанол коэффициенты распределения альдегидной и спиртовой групп различаются всего лишь на 12% [103]. Тем не менее можно подобрать такой растворитель (см. рис. 5), чтобы коэффициенты распределения исходных и конечных реагентов различались в 10 раз.

чались достаточно сильно (за счет, например, специфических сольватационных эффектов). В результате, варьируя природу органической фазы, удалось изменить эффективную константу равновесия в весьма широких пределах (в ~ 100 раз). Во-вторых, как видно из рис. 5, теоретическая кривая 1 (построенная согласно уравнению (24) с использованием коэффициентов распределения изобутанола и изомасляного альдегида, найденных в независимом опыте) удовлетворительно согласуется с экспериментом.

Реакция A + B ⇌ C + D. Зависимость эффективной константы равновесия от соотношения объемов органической и водной фаз (α):

$$K_{\text{эфф}} = K_{\text{в}} \frac{(1 + \alpha P_{\text{C}})(1 + \alpha P_{\text{D}})}{(1 + \alpha P_{\text{A}})(1 + \alpha P_{\text{B}})} \quad (25)$$

имеет более сложный вид [100—102], чем для предыдущей реакции первого порядка. Типичные случаи приведены на рис. 6.

Предельный сдвиг равновесия, наблюдаемый в двухфазной системе при весьма малом содержании воды, может быть в принципе еще более значительным, чем в простой реакции $A \rightleftharpoons B$ (см. выше). Это представляется очевидным, поскольку в выражение для предельного сдвига $K_{\text{эфф}}/K_{\text{в}} = P_{\text{c}}P_{\text{d}}/P_{\text{a}}P_{\text{b}}$ при ($\alpha \rightarrow +\infty$) входит большее число коэффициентов распределения. Однако более важная особенность химических равновесий, содержащих реакции второго порядка, заключается в том, что зависимость $K_{\text{эфф}}$ от α при определенных соотношениях коэффициентов распределения может иметь экстремум (см. рис. 6). Иными словами, в системе двух несмешивающихся растворителей эффективная константа равновесия может быть больше (или соответственно меньше) предельных значений, характеризующих равновесие в каждой из фаз. Это обстоятельство необходимо учитывать при выборе оптимальных условий для проведения химического синтеза (более подробно см. ниже).

Физико-химическую сущность этого явления (наличие экстремума) можно вскрыть весьма наглядно на следующем примере. Допустим, что исходные реагенты распределены между фазами так, что один из них (A) находится полностью в одной из фаз (вода), а второй реагент (B) — полностью в другой фазе (органический растворитель). Тогда в двухфазной системе равновесие реакции полностью будет сдвинуто влево ($K_{\text{эфф}} = 0$), какими бы ни были константы равновесия в каждой из фаз в отдельности. Причина, очевидно, в том, что реагенты A и B, будучи пространственно разделенными, не могут взаимодействовать друг с другом. С другой стороны, равновесие будет полностью смещено вправо ($K_{\text{эфф}} \rightarrow \infty$ независимо от конечных значений констант равновесия в той или другой фазе), если окажутся полностью отделенными друг от друга конечные продукты, т. е. если один из продуктов (например C) полностью будет находиться в воде, в то время как второй продукт (D) уйдет в органический растворитель.

Экстремальный характер равновесия в двухфазной системе удалось наблюдать экспериментально (варьируя соотношение объемов водной и органической фаз) на примере катализируемой α -химотрипсином реакции синтеза этилового эфира N-бензоил-L-фенилаланина (из этанола и соответствующей кислоты) [100—102]. В воде выход сложного эфира ничтожно мал [106, 107]. В то же время в двухфазной системе (при оптимальном отношении объемов воды и органического растворителя) выход составил 80, 64, 62 и 26% для хлороформа, бензола, четыреххлористого углерода и диэтилового эфира соответственно [100—102]. Таким образом, в результате применения двухфазных систем удалось под-

нять выход сложного эфира практически с нуля до препаративного уровня.

Уменьшение концентрации водного реагента. В таких реакциях, как синтез простых и сложных эфиров, амидов, пептидов и т. п., типа $A + B \rightleftharpoons C + H_2O$, одним из продуктов является вода. Поэтому в водном растворе их равновесие смещено в сторону исходных реагентов вследствие высокой концентрации в системе воды ($55,5 M$). При переходе к двухфазным системам происходит уменьшение содержания воды; за счет этого выход продукта С должен в принципе увеличиваться.

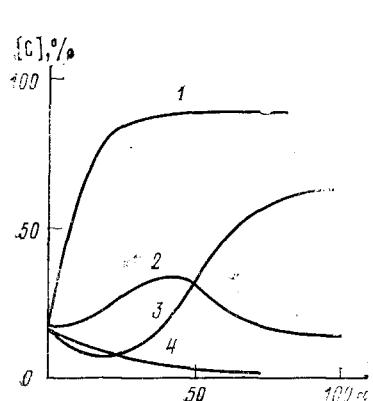


Рис. 7

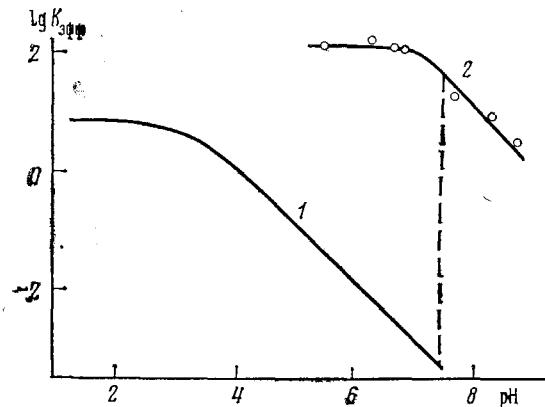


Рис. 8

Рис. 7. Зависимость выхода продукта С в реакции типа $A + B \rightleftharpoons C + H_2O$ в двухфазной системе вода — органический растворитель от α при следующих значениях 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 $K_b = 10$ (из работы [102])

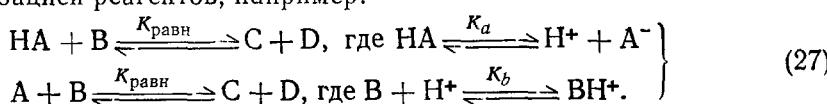
Рис. 8. pH-Зависимость константы равновесия реакции синтеза этилового эфира N-бензоил-L-фенилаланина в воде (1) и в двухфазной системе хлороформ — 5 об.% воды (2) [108, 112]

Однако следует учесть, что в двухфазной системе выход продукта С зависит от концентрации воды двояко: не только по закону действующих масс, т. е. $[C]_{\text{общ}} = K_{\text{эфф}} [A]_{\text{общ}} [B]_{\text{общ}} / [H_2O]_{\text{общ}}$, но также через константу равновесия, определяемую функцией типа (25) и, следовательно, зависящую от α . В итоге имеем [100—102]:

$$[C] = K_{\text{эфф}} \frac{[A][B]}{[H_2O]} = K_b \frac{[A][B](1 + \alpha P_C)(1 + \alpha)}{55,5(1 + \alpha P_A)(1 + \alpha P_B)}. \quad (26)$$

Согласно этому уравнению, зависимость [C] от α может иметь весьма сложный вид (рис. 7). В частности, при некоторых соотношениях коэффициентов распределения происходит даже уменьшение выхода продукта С при уменьшении концентрации в системе второго продукта — воды. Это обусловлено тем, что при увеличении α эффективная константа равновесия уменьшается сильнее, чем общая концентрация воды в системе (см. уравнение (26)).

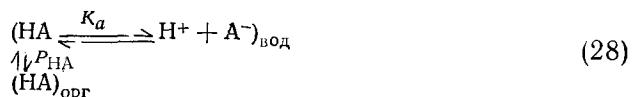
Сдвиг ионных равновесий. Протекание многих реакций сопровождается ионизацией реагентов, например:



При переходе от воды к двухфазным системам следует ожидать, что изменится константа равновесия не только собственно химической реакции ($K_{\text{равн.}}$), но также процессов ионизации (K_a или K_b). В результате сдвиг равновесия суммарного процесса будет, очевидно, определяться изменениями всех констант и, следовательно, зависеть от рН.

В данном разделе мы проанализируем физико-химические причины изменения констант ионных равновесий в двухфазных водноорганических системах по сравнению с водными растворами, а также рассмотрим возможности, которые открываются здесь для увеличения выхода продуктов в катализируемых ферментами термодинамически неблагоприятных синтетических реакциях.

Рассмотрим процесс ионизации, например, кислоты, в двухфазной водноорганической системе [108, 109]:



При этом будем полагать, что в органической фазе растворяется практически только незаряженная форма кислоты или основания. Это предположение, как правило, справедливо (см., например, [103]). Исключение составляют лишь сильно полярные растворители, которые способны экстрагировать из воды заряженные соединения в виде ионных пар [110].

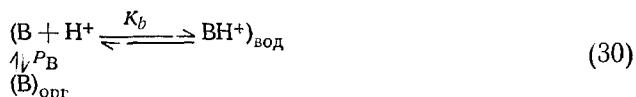
Константу ионизации кислоты в двухфазной системе определим обычным способом согласно уравнению Хендersona — Хассельбаха:

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

где $[A^-]_{\text{общ}}$ и $[HA]_{\text{общ}}$ — общие концентрации ионизированной и неионизированной форм кислоты соответственно, рассчитанные на объем всей двухфазной системы; pH характеризует водную fazу. Тогда имеем [108, 109]:

$$(pK_a)_{\text{эфф}} = pK_a + \lg (1 + \alpha P_{HA}). \quad (29)$$

Аналогично для процесса протонизации основания B в двухфазной системе



получим [108, 109] следующее выражение для эффективной константы равновесия:

$$(pK_b)_{\text{эфф}} = pK_b - \lg (1 + \alpha P_B). \quad (31)$$

Таким образом, в двухфазных водноорганических системах наблюдается увеличение pK_a кислоты на величину $\lg (1 + \alpha P_{HA})$ и соответственно уменьшение pK_b основания на величину $\lg (1 + \alpha P_B)$. Коэффициенты распределения органических кислот и оснований могут достигать [103, 104] величин 10^2 — 10^4 . Следовательно, в системе, содержащей, например, 1 об. % воды ($\alpha = 100$), сдвиг эффективного значения pK может составить 4—6 единиц pH.

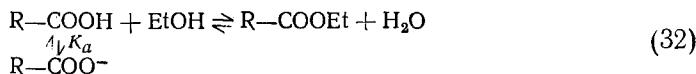
В работе [108] изучены равновесия ионизации модельных соединений 2,4-динитрофенилтриптофана (кислота) и нейтрального красного (основание) в двухфазных водноорганических системах. Показано, во-первых, что эффективное значение pK в таких системах действительно

сдвигается по сравнению с водными растворами, причем экспериментальная величина сдвига достигает пяти и более единиц рН. Во-вторых, экспериментальные зависимости $pK_{b, \text{двухфаз}}$ нейтрального красного от α удовлетворительно описываются теоретической кривой, построенной по уравнению (31) с использованием коэффициента распределения P_b , найденного в независимом опыте.

Рассмотрим теперь, как эти сдвиги pK реагентов могут влиять на равновесие химических реакций, протекающих в двухфазных водноорганических системах, и какие возможности здесь заложены для увеличения выхода целевого продукта.

Совмещение pH-оптимумов эффективности катализатора и равновесия катализируемой реакции. Нередко возникает ситуация, когда pH-оптимум стабильности и каталитической активности фермента существенно удален от тех значений pH, которые термодинамически благоприятствуют синтезу данного продукта. В качестве примера можно указать на процессы получения β -лактамных антибиотиков (термодинамический pH-оптимум лежит в интервале значений pH 3—5) [88], *n*-нитроанилидов (pH-оптимум 2—3) и сложных эфиров N-замещенных аминокислот, благоприятными для синтеза которых являются значения pH ниже 3 [106, 107, 111]. В то же время большинство ферментов, способных катализировать эти синтетические реакции (пенициллинамида, трипсин, α -химотрипсин и другие протеазы), активны и стабильны лишь при нейтральных (или близких к нейтральным) значениях pH. Разрешить данное противоречие возможно, используя в качестве среды реакции не воду, а двухфазные водноорганические системы.

В качестве примера рассмотрим синтез этилового эфира N-бензоил-L-фенилаланина, катализируемый α -химотрипсином:

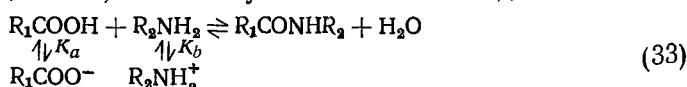


На рис. 8 показана pH-зависимость константы равновесия этой реакции в воде (кривая 1) [106]. Видно, что благоприятными для синтеза являются лишь значения pH < 3, в то время как при нейтральных или близких к нейтральным значениях pH (т. е. в условиях функционирования α -химотрипсина) равновесие смещено практически нацело в сторону исходных веществ; существенную роль в этом играет то обстоятельство, что один из реагентов (кислота) в данных условиях диссоциирован. Таким образом, в воде ферментативная реакция не может иметь промышленного значения.

При переходе к двухфазным водноорганическим системам [108, 112, 113] эффективное значение pK_a кислоты увеличивается (см. уравнение (29)); следовательно, pH-зависимость константы равновесия смещается в сторону нейтральных или щелочных значений pH. На рис. 8 показана pH-зависимость константы равновесия реакции (32) в двухфазной системе хлороформ + 5 об. % воды (кривая 2). Видно, что по сравнению с водными растворами значение pK кислоты возросло более чем на 3 единицы (см. смещение кривой 2 по оси абсцисс вправо по сравнению с кривой 1). В результате удалось совместить значения pH, термодинамически благоприятные для синтеза, с pH-оптимумом каталитической активности и стабильности α -химотрипсина (см. пунктир, pH 7,5). Кроме того, возросло также (более чем на порядок) предельное, т. е. pH-независимое значение константы равновесия (см. смещение кривой 2 вверх по оси ординат). Причина в том, что продукт (сложный

эфир) преимущественно экстрагируется из воды в органическую фазу. В итоге суммарное изменение константы равновесия при pH 7,5 (пунктир на рис. 8) составляет ~ 5 порядков. Именно поэтому стало возможным при нейтральных значениях pH обратить реакцию гидролиза практически нацело в сторону синтеза. Так, выход сложного эфира в данной системе составляет 80—100% (в зависимости от концентраций реагентов), в то время как в воде он не превышает 0,01%.

Пептидный синтез. Примером реакции, протекающей с участием двухионогенных соединений, может служить синтез пептидной связи:



Значения pK_a карбоновых кислот лежат обычно в интервале 3—4, а pK_b аминов — 8—10 [50, 107, 114]. Следовательно, в воде во всем интервале значений pH хотя бы один из исходных реагентов находится практически полностью в заряженной форме. В результате равновесие

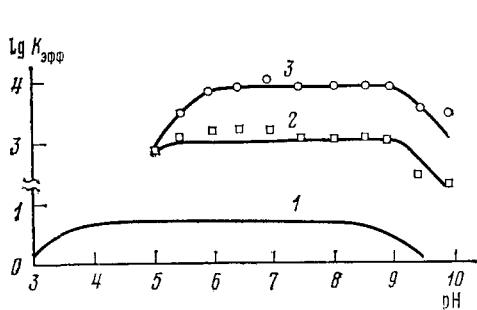


Рис. 9

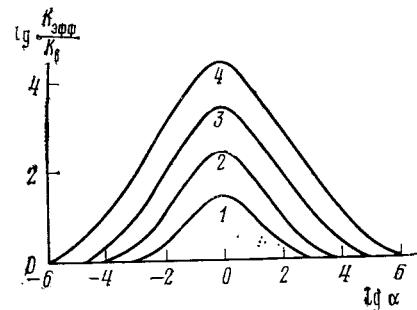


Рис. 10

Рис. 9. pH-Зависимость константы равновесия реакции синтеза N-ацетил-L-триптофанил-L-лейцинамида в воде (1) и в двухфазной системе этилацетат — вода с содержанием воды 17 (2) и 2 об. % (3) [108, 115]

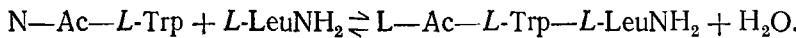
Рис. 10. Экстремальный характер зависимости $K_{\text{эфф}}$ реакции типа $A+B=C+D$ в двухфазной системе вода — органический растворитель от соотношения объемов фаз (α) при следующих значениях коэффициентов распределения: $P_A=P_B=1$; $P_C=10^2$, $P_D=10^{-2}$ (1); $P_C=10^3$, $P_D=10^{-3}$ (2); $P_C=10^4$, $P_D=10^{-4}$ (3); $P_C=10^5$, $P_D=10^{-5}$ (4) (из работы [102])

суммарной реакции практически нацело сдвинуто влево, в сторону гидролиза [107].

При переходе к двухфазным водоорганическим системам эффективное значение pK_a кислоты, как правило, увеличивается, а pK_b основания уменьшается (см. выше). Это означает, что при нейтральных значениях pH в той или иной степени повышается доля незаряженных форм как кислоты, так и амина [108, 109]. Следовательно, равновесие реакции (33) должно сдвигаться вправо, в сторону синтеза. Второй источник сдвига равновесия состоит в том, что пептид, как правило, экстрагируется из воды в органический растворитель лучше, чем исходные реагенты. И, наконец, в третьих, равновесный выход продукта реакции (33) в двухфазной водоорганической системе должен возрасти также за счет уменьшения содержания воды.

Этот подход апробирован нами [108, 109, 115, 116] на примере катализируемой α -химотрипсином реакции синтеза N-ацетил-L-трипто-

фенил-*L*-лейцинамида:



При переходе от воды к двухфазной системе этилацетат + 2 об. % воды константа равновесия синтеза возросла более чем на три порядка (ср. кривые 1 и 3 на рис. 9). В результате равновесие реакции значительно сдвинулось вправо, что позволило осуществить синтез дипептида практически количественно; в воде при прочих равных условиях выход не превышает 0,1 %.

Синтез ионных продуктов. Казалось бы, что двухфазный подход к проведению препаративного органического синтеза не применим к реакциям, где продукты — ионы, поскольку они не будут переходить из воды в органическую fazу и, следовательно, распределяться по всей системе. Однако эту трудность можно преодолеть, подбирая для ионных реагентов гидрофобные противоионы, как это принято, например, в химии нуклеотидов [117] и оказалось также полезным в аналитическом радиоактивном методе [118]. Нами этот подход испытан на примере синтеза глицерофосфата из неорганического фосфата и глицерина [67]. Реакцию катализировали с помощью щелочной фосфатазы, используя тетрабутиламмоний в качестве гидрофобного противоиона к фосфатам. В двухфазной системе хлороформ — вода выход глицерофосфата составил более 30% [67], в то время как в воде (в отсутствие органической фазы, но при прочих равных условиях) выход ничтожно мал [83].

Ферментативный двухфазный метод применен также и для других практически важных процессов с ионными продуктами, таких как модификация антибиотиков [119], синтез дипептида из свободных аминокислот [120] и разделение рацемической смеси свободных аминокислот [121].

Общие замечания по выбору экспериментальных условий. Теоретическое рассмотрение [100—102] равновесия химических реакций в двухфазных водноорганических системах позволяет сделать следующий вывод: 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. Следовательно, зная уравнение, которое описывает равновесие реакций в двухфазной системе, и коэффициенты распределения (из литературы или из независимых экспериментов), можно вычислить значение $K_{\text{эфф}}$ и, следовательно, выход продуктов реакции (см., например, уравнения (22), (25) и (26)). К сожалению, в настоящее время в литературе опубликовано пока недостаточное количество сведений о коэффициентах распределения различных веществ, а имеющиеся сведения не всегда надежны [103, 104]. Кроме того, необходимо учитывать, что при высоких концентрациях реагентов они сами могут изменять реакционную среду, и поэтому в распределении реагентов (и, следовательно, в эффективном равновесии химической реакции) будут наблюдаться отклонения от простой (идеальной) модели [122].

Предсказывать направление и величину изменения равновесия в двухфазной системе по сравнению с водой важно потому, что зависимость величины $K_{\text{эфф}}$ (и выхода продуктов химической реакции) в двухфазной системе от соотношения объемов фаз (α) может иметь довольно сложный вид. Следовательно, это может затруднить выбор экспериментальных условий для проведения синтеза. В этой связи обратим внимание на два момента.

1. При определенных соотношениях коэффициентов распределения значение $K_{\text{эфф}}$ для реакции (4), наблюдаемое в двухфазной системе, может быть существенно больше (см. рис. 6, кривые 2—4) или соответственно меньше (рис. 6, кривые 2'—4'), чем константы равновесия этой же реакции в каждой из фаз. Проанализируем данное явление более подробно (количественно) на примере двухфазной системы, где $K_b = K_o$, т. е. будем полагать, что в том и другом несмешивающемся растворителе константа равновесия принимает одно и то же значение. Значения коэффициентов распределения будем варьировать в пределах наиболее разумных значений от 10^{-5} до 10^5 , (ср. [103]).

На рис. 10 показано, как изменяется в том или другом случае эффективное значение $K_{\text{эфф}}$ в зависимости от соотношения объемов фаз

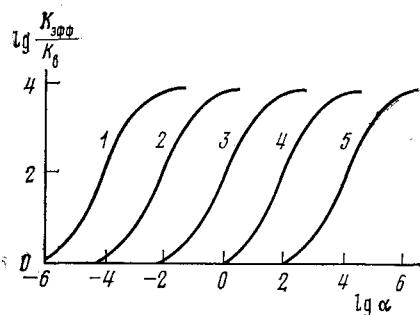


Рис. 11. Примеры S-образной зависимости $K_{\text{эфф}}$ реакции типа $A+B \rightleftharpoons C+D$ в двухфазной водно-органической системе от α при следующих значениях коэффициентов распределения: 1 — $P_A=P_B=10^3$, $P_C=P_D=10^5$; 2 — $P_A=P_B=10$, $P_C=P_D=10^3$; 3 — $P_A=P_B=-0,1$, $P_C=P_D=10$; 4 — $P_A=P_B=10^{-3}$, $P_C=P_D=0,1$; 5 — $P_A=P_B=10^{-5}$, $P_C=P_D=10^{-3}$
(из работы [102])

(α). Видно, что максимальное значение эффективной константы равновесия, наблюдаемое для реакции типа $A+B \rightleftharpoons C+D$ в двухфазной системе, может в 10^4 и более раз превышать соответствующие константы равновесия этой же реакции в каждой из фаз. Следовательно, применение двухфазных систем в качестве реакционной среды может оказаться особенно полезным для увеличения выхода целевого продукта в таких реакциях (не обязательно ферментативных), где равновесие ни в одном из доступных и пригодных для протекания данной реакции растворителей не сдвинуто в достаточной степени в желаемую сторону.

2. При выборе условий для проведения синтеза следует также учитывать, что зависимость $K_{\text{эфф}}$ от α может быть S-образной (даже в нелогарифмических координатах) [102], т. е. в некотором интервале значений α равновесие реакции как бы нечувствительно к изменению среды. Это видно из рис. 11, где нами проанализирован случай, когда $10^4 K_b = K_o$. Видно, что в зависимости от коэффициентов распределения (которые мы варьировали в интервале разумных значений от 10^{-5} до 10^5 [103]) сдвиг химического равновесия наблюдается как при ничтожно малом содержании органической фазы ($\alpha = V_o/V_b \approx 10^{-5}$, кривая 1), так и при сравнимых количествах фаз ($\alpha \approx 1$, кривая 3), или же, наконец, почти в отсутствие воды в системе ($\alpha \approx 10^5$, кривая 5). В каждом из этих случаев для создания двухфазной системы удобно применять разные методические приемы. Так, двухфазные системы можно создавать следующим образом.

а) Для систем с малым содержанием органической фазы ($\alpha \ll 1$) это может быть, например, водный раствор поверхностью-активного вещества, образующего мицеллы¹; внутренняя (гидрофобная) область мицелл будет служить органической фазой (см. [123]).

¹ В случае мицеллярных систем можно лишь условно говорить о наличии двух фаз, поскольку отсутствует видимая граница раздела. Поэтому более уместным будет говорить о «псеводвухфазных» системах [123]. Тем не менее все рассмотренные выше закономерности сдвига будут здесь иметь место (см., например, [124, 125]).

б) Для систем с малым содержанием воды ($\alpha \gg 1$) фермент, по-видимому, следует включить в «обращенные» мицеллы поверхностно-активных веществ в органическом растворителе [16, 98, 125].

в) Системы, содержащие сравнимые количества органической и водной фаз, могут быть созданы, как уже упоминалось выше (см. гл. I), в виде эмульсии водного раствора фермента в органическом растворителе или как суспензия в этом растворителе пористых частиц, пропитанных водным раствором фермента. При использовании эмульсии весьма важным является вопрос об удельной поверхности раздела фаз: чем больше эта поверхность, тем быстрее протекает диффузия реагентов через границу раздела фаз, что благоприятно влияет на кинетику реакции; с другой стороны, при этом может ускориться инактивация катализатора (фермента) в результате адсорбции его на границе раздела фаз [126]. В таком случае можно использовать простую двухслойную систему.

Вообще говоря, в качестве «органической» фазы можно использовать любое вещество, способное образовывать с водой двухфазную (или псеводвухфазную) систему. Например, им может быть нерастворимый в воде полимер [127, 128].

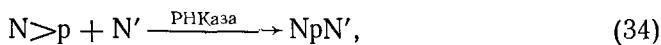
V. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ВНEDРЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА В ОРГАНИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ

Из приведенного обзора видно, что ферменты удалось весьма успешно применить без дополнительной их стабилизации (по отношению к денатурирующим воздействиям реакционной среды) в целом ряде синтетических реакций. Этому способствовала прежде всего разработка физико-химических подходов, позволивших увеличить выход продукта непосредственно в условиях, благоприятных (оптимальных) для биокатализа.

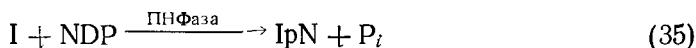
Как следует из данных, приведенных в настоящем обзоре, для целей органического синтеза уже оказались полезными около пятидесяти ферментов, главным образом в следующих процессах (ссылки приведены лишь на обзоры и последние обобщающие статьи).

1. Синтез олиго- и полинуклеотидов

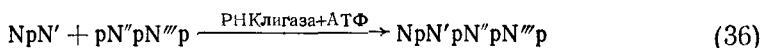
Методы химического синтеза межнуклеотидной связи в настоящее время разработаны еще недостаточно, а осуществить синтез полинуклеотида, содержащего несколько десятков звеньев, чисто химическим способом практически невозможно [129]. Поэтому в литературе уделяют большое внимание ферментативным методам синтеза олиго- и полинуклеотидов. Для синтеза олигорибо- и олигодезоксирибонуклеотидов используют рибонуклеазу [24, 129—132]:



полинуклеотидфосфорилазу [24, 129, 130, 133]:



или РНКлигазу [129, 134]:



Здесь $N > p$ — это нуклеозид-3',5'-циклофосфат, N — нуклеозид,

NDP — нуклеозиддифосфат, NpN' — динуклеозидмонофосфат, I — молекула инициатора (праймера) (обычно динуклеотид).

Для реакции (34) в качестве катализатора предпочитают использовать неспецифические рибонуклеазы. Это позволяет синтезировать олигонуклеотиды, содержащие самые различные, в том числе и не встречающиеся в природе, нуклеозиды. В реакции (35) может протекать весьма нежелательный процесс полимеризации; для его подавления разработано несколько подходов [24]. Реакция (36) открыта сравнительно недавно и пока практически не используется.

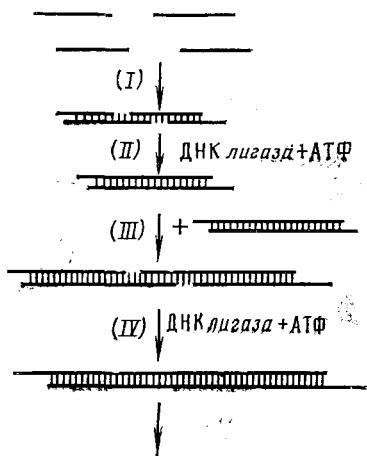


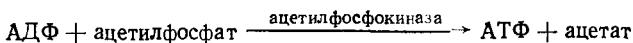
Рис. 12. Иллюстрация «Метода липких концов». Горизонтальные линии — последовательность нуклеотидов, соединенных ковалентными связями, вертикальные черточки — комплементарные нековалентные (водородные) связи

Для синтеза двухцепочечных полинуклеотидов определенной последовательности Корана и сотр. [135, 136] разработали метод, который получил название «метод липких концов». Его идея понятна из рис. 12. Согласно этому методу, на первой стадии исходные олигонуклеотиды (длиной 5—15 звеньев) образуют двухцепочный комплекс за счет комплементарных нековалентных взаимодействий (стадия I). Далее в полученном комплексе пространственно сближенные 3'- и 5'-концы соединяются ковалентными связями под действием ДНКлигазы (стадия II). Таким способом синтезируют все фрагменты, из которых должен состоять конечный полинуклеотид, и соединяют их между собой сначала за счет комплементарных нековалентных взаимодействий (стадия III), а затем и ковалентными связями (стадия IV). По этой схеме Корана и сотр. осуществили синтез структурного гена тРНК аланина [135] и полного гена супрессорной тРНК тирозина [136].

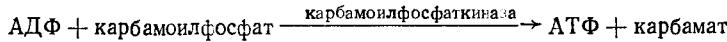
2. Регенерация АТФ

Аденозин-5'-трифосфат (АТФ) является субстратом многих ферментативных реакций и широко используется в научно-исследовательской практике, а в последние годы — и в ферментативном органическом синтезе. Именно в связи с последним обстоятельством возникла проблема регенерации АТФ из АДФ и (или) АМФ.

Среди довольно большого числа систем, предложенных для этой цели, в настоящее время наиболее пригодными следует признать две реакции, катализируемые либо ацетилфосфокиназой [137—139]



либо карбамоилфосфаткиназой [140]:



Если в качестве исходного реагента используют АМФ, то в систему необходимо ввести также фермент аденилаткиназу [137]:



На основе ацетилфосфокиназы и аденилаткиназы, иммобилизованных на сепарозе, и карбамоилфосфокиназы, иммобилизованной на стекле, созданы лабораторные установки регенерации АТФ [138, 140].

3. Синтез мечевых соединений

Соединения, содержащие в определенных положениях своих молекул тяжелые или радиоактивные атомы, находят широкое применение в химии и биологии для изучения механизмов химических и ферментативных реакций, путей метаболизма, строения молекул и т. д. Для синтеза таких соединений в последние годы все шире начинают использовать ферменты. Применение ферментов имеет следующие основные преимущества.

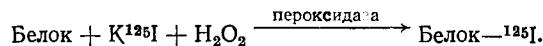
Во-первых, *специфичность*. При синтезе меченых соединений весьма важно ввести метку в строго определенное положение молекулы. Уникальная специфичность ферментов, как правило, позволяет сделать это. Помимо высокой чистоты целевого продукта в ферментативном синтезе дорогостоящий радиоактивный материал не расходуется на побочные реакции.

Во-вторых, высокая скорость. В настоящее время весьма перспективным представляется использовать в качестве меток так называемые короткоживущие изотопы, например, ^{14}C (время полураспада $T_{1/2} = 20,3$ мин), ^{13}N ($T_{1/2} = 10$ мин), ^{15}O ($T_{1/2} = 2$ мин) и др. Однако вследствие высокой скорости распада таких изотопов чисто химические методы синтеза часто оказывались неэффективными. Получение соединений, содержащих короткоживущие изотопы, стало возможным благодаря использованию ферментов [141].

В-третьих, мягкие условия. Ферментативные реакции протекают в мягких, как правило, физиологических условиях. Это является существенным, например, при синтезе меченых аминокислот (отсутствует рацемизация) или белков (отсутствует денатурация).

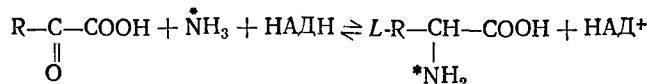
К настоящему времени в литературе описаны десятки примеров успешного применения ферментов для синтеза различных меченных соединений.

Белки. Для получения меченых производных белков обычно используют систему [142—144]:



Фермент используют в растворимом или, что предпочтительнее, в иммобилизованном [144] виде.

Аминокислоты. Исходными реагентами для получения меченых аминокислот служат α -кетокислоты и $\overset{*}{\text{NH}_3}$ [141, 145—149]:



Реакцию катализирует глутаматдегидрогеназа, полученная из сердца быка, которая (в отличие от фермента из других источников) имеет широкую субстратную специфичность.

Нуклеозидтрифосфаты. При помощи ферментов удалось решить проблему получения нуклеозидтрифосфатов, содержащих ^{32}P только в α -, β - или γ -положении [150—153].

Сахара. Ферменты использованы для получения некоторых коммерчески недоступных сахаров из продажных препаратов меченой глюкозы [47, 154].

4. Синтез олигопептидов

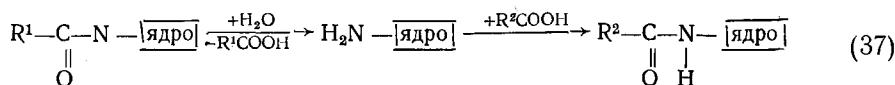
В 30-х годах в работах Бергмана было впервые показано, что протеолитические ферменты могут осуществлять не только гидролиз, но и синтез пептидов. В последние годы количество публикаций на эту тему резко возросло, так как ферментативные или комбинированные (ферментативные + химические) методы стали рассматривать как серьезную альтернативу чисто химическим методам синтеза пептидной связи. К преимуществам ферментативного метода следует отнести: а) отсутствие рацемизации; б) мягкие условия реакции, исключающие деструкцию лабильных соединений; в) отсутствие необходимости защищать функциональные группы в боковых цепях аминокислот; г) отсутствие необходимости активировать реагирующие группы.

Помимо большого количества модельных олигопептидов [29, 30, 34—42, 57, 58, 64, 65, 89—92] при помощи ферментов синтезированы такие важные биологически активные соединения, как анготензин [39], энкефалины [42, 155], инсулин человека [64, 65].

Существенно расширился круг используемых ферментов: если до 1970 г. в качестве катализаторов использовали только папаин и химотрипсин, то к настоящему времени нашли применение также трипсин, пепсин, субтилизин, фицин, бромелайн, карбоксипептидаза (для удаления защитных групп [156]), термолизин и бактериальные металлопротеиназы.

5. Синтез и модификация β -лактамных антибиотиков

Весьма перспективным представляется широко разрабатываемый в последние годы способ ферментативной модификации β -лактамных антибиотиков с целью улучшения их свойств. Согласно этому способу [5, 15], на первой стадии проводят катализируемый пенициллинамидацой гидролиз природных β -лактамных антибиотиков для получения так называемого ядра антибиотика: 6-аминопенициллановой кислоты (в случае пенициллинов) или 7-аминоцефалоспорановой кислоты (в случае цефалоспоринов). На второй стадии ядро антибиотика ацилируют (катализатор — пенициллинамидаза):



На второй стадии ацилирования выход продукта можно увеличить, проводя реакцию в слабокислой среде (оптимальными для синтеза являются в большинстве случаев значения pH 4,5—5,0) или используя в качестве ацилирующего агента не свободную кислоту, а ее активированные производные.

Варьируя ацильный радикал R^2 , можно целенаправленно улучшать свойства антибиотиков — расширять спектр их действия, повышать

устойчивость в организме, снижать аллергентность. Насчитывается уже несколько десятков полученных таким способом («полусинтетических») антибиотиков [5, 15, 87, 88, 157].

6. Модификация стероидов

Ферменты, клетки или неочищенные экстракты используют также для модификации стероидов [158—164].

7. Промышленные процессы

Наряду с рассмотренными выше лабораторными разработками в настоящее время создан ряд технологических (промышленных) процессов с применением иммобилизованных ферментов: а) синтез *L*-аспартагиновой кислоты с использованием иммобилизованных микробных клеток, содержащих аспартазу [14]; б) синтез *L*-яблочной кислоты с использованием иммобилизованных микробных клеток, содержащих фумаразу [15]; в) получение 6-аминопенициллановой кислоты с использованием иммобилизованной пенициллинамидазы [15]; г) разделение с помощью иммобилизованной аминоацилазы рацемических смесей аминокислот (полученных химически, неферментативным путем) [15, 19]; д) получение производных *D*-аминокислот с использованием иммобилизованной гидантоиназы [15].

Существуют также крупномасштабные промышленные процессы, которые выходят за классические рамки органического синтеза и относятся скорее к производству пищевых продуктов: е) получение глюкозофруктозных сиропов с использованием иммобилизованной глюкозоизомеразы [165, 166]; ж) разложение лактозы (получение безлактозного молока) с использованием лактазы [15].

Некоторые процессы отработаны пока лишь на пилотных установках: з) получение глюкозы из частичных гидролизатов крахмала с использованием иммобилизованной глюкоамилазы [167]; и) получение глюкозы и(или) этанола из целлюлозы с использованием целлюлазы [168]; к) получение глюкозо-фруктозных сиропов из сахарозы с использованием иммобилизованной инвертазы [15].

В таблице, взятой нами из [14] и дополненной данными Клесова [169], приведен список организаций, которые создали эти промышленные (или пилотные) процессы.

Может показаться удивительным, что в обзор по органическому синтезу мы включили также и «пищевые» процессы (е—к). Необходимость такого комплексного подхода к анализу современного состояния проблемы (внедрение ферментов в промышленные процессы) частично обусловлена тем, что ферментные катализаторы уже давно применяются в пищевой промышленности и поэтому в настоящее время (1976—1979 гг.) пищевая промышленность — это главный потребитель производимых ферментов [13]. Однако главные причины, которые побудили нас рассмотреть как можно более полную картину технологических процессов, катализируемых ферментами, заключаются в следующем. Во-первых, применение ферментов начинает раздвигать привычные рамки органического синтеза. Во-вторых, якобы пищевой ферментативный процесс (и) открывает, возможно, новые перспективы в крупномасштабном получении сырья для химической технологии, а именно этанола (а возможно, и глюкозы). И наконец, на основании уже реализованных процессов легче прогнозировать некоторые экономические факторы. Видно, что современная микробиологическая промышленность уже

Использование иммобилизованных ферментов на крупномасштабных (промышленных) (К) и «пилотных» установках (π)

Фирма	Процесс *										
	а	б	в	г	д	е	ж	з	и	к	
ANHEUSER BUSCH (BRD)	—	—	—	—	—	K	—	—	—	—	
CLINTON CORN (USA)	—	—	—	—	—	K	—	—	—	—	
CAR MI (USA)	—	—	—	π	—	K	—	π	—	π	
CORNING GLASS (USA)	—	—	—	π	—	K	—	π	—	π	
US ARMY NATICK CENTER (USA)	—	—	—	—	—	—	—	—	π	—	
DENKI KAGAKU (Japan)	—	—	—	—	—	π	—	—	—	—	
DIAMOND SHAMROCK (USA)	—	—	—	—	—	—	π	—	—	—	
GIST BROCADES (Netherlands)	—	—	—	—	—	K	π	π	—	π	
GULF OIL (USA)	—	—	—	—	—	—	—	—	π	—	
HAMEEN PERUNA (Finland)	—	—	—	—	—	K	—	—	—	—	
ICI (England, USA)	—	—	—	—	—	K	—	—	—	—	
LE HIGH UNIVER- SITY (USA)	—	—	—	—	—	—	π	—	—	—	
NOVO (Denmark)	—	—	—	—	—	K	—	—	—	—	
SANMATSU (Japan)	—	—	—	—	—	K	—	—	—	—	
SNAM PROGETTI (Italy)	—	π	K	π	K	π	—	π	π	—	
TANABE SELYAKU (Japan)	K	K	K	K	—	—	—	—	—	—	
VALIO (Finland)	—	—	—	—	—	—	π	—	—	—	

* Классификацию процессов см. стр. 1401.

сейчас (1976 г.) в состоянии обеспечить производство ферментов в количестве сотен тонн в год (стоимостью ~150 миллионов долларов) [13]. В свою очередь вклад фермента в общую стоимость продукта в ряде случаев незначителен [13, 14].

Для более широкого внедрения биокатализа в промышленные процессы (в которых экономические факторы играют решающую роль) необходимо, конечно, и в дальнейшем совершенствовать процессы микробиологического синтеза и выделения ферментов, методы получения носителей и иммобилизации на них ферментов, совершенствовать ферментные реакторы и т. д. Однако ключевые вопросы на данном этапе — это стабилизация ферментов, см., например, [170], далее регенерация кофакторов, применение полиферментных систем и иммобилизация микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1977.
2. Berezin I. V., Klyosov A. A., Martinek K. In: Chemistry Reviews, Section B, v. 1, Ed. Volpin, Chur (Schweiz): Harwood Acad. Publ., 1979, p. 205.
3. Fersht A. Enzyme Structures and Mechanism. San Francisco: Freeman W. H. and Co., 1977.
4. Walsh Ch. Enzymatic Reaction Mechanism. San Francisco: Freeman W. H. and Co., 1979.
5. Иммобилизованные ферменты. Т. 1 и 2. Ред. Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К. М.: Изд. МГУ, 1976.

6. Methods in Enzymology. v. 44 (Immobilized Enzymes). Ed. Mosbach K. N. Y.: Acad. Press, 1976.
7. Березин И. В., Клибанов А. М., Мартинек К. Успехи химии, 1976, т. 44, с. 17.
8. Мартинек К. В кн.: Успехи биоорганического катализа. Ред. Березин И. В., Мартинек К. М.: Изд. МГУ, 1979, с. 105.
9. Martinek K., Berezin I. V. J. Solid-Phase Biochem., 1978, v. 2, p. 343.
10. Torchilin V. P., Martinek K. Enzyme Microb. Technol., 1979, v. 1, p. 74.
11. Martinek K., Mozhaev V. V., Berezin I. V. In: Future Directions for Enzyme Engineering, Ed. Wingard L. B. (Jr.), Berezin I. V., Klyosov A. A. N. Y.: Plenum Press, 1980, p. 3.
12. Lilly M. D. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, v. 2. Enzyme Technology. Ed. Wingard L. B. (Jr.), Katchatlski-Katzir E., Goldstein L. N. N. Y.: Acad. Press, 1979, p. 1.
13. Aunstrup K. Ibid, 1979, p. 28.
14. Sweigart R. Dale. Ibid., 1979, p. 209.
15. Marconi D., Morisi F. Ibid, 1979, p. 219.
16. Martinek K., Levashov A. V., Klyachko N. L., Berezin I. V. Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 657, p. 277.
17. Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry. V. 1, 2. Ed. Jones J. B., Sih C. J., Perlman D. N. Y.: John Wiley and Sons, 1976.
18. Suckling K. E. Chem. Soc. Rev., 1974, c. 3, p. 387.
19. Synthetic Production and Utilization of Amino Acids. Ed. Kaneko T., Izumi Y., Chibata I., Itoh T. Tokyo: Kodansha; N. Y.: John Wiley and Sons, 1974.
20. Ishikawa T., Nishimura T. Yukagaku, 1975, v. 24, p. 845.
21. Stuart K. L. Heterocycles, 1976, v. 5, p. 701.
22. Chibata I. Pure and Appl. Chem., 1978, v. 50, p. 667.
23. Khorana H. G. Biorg. Chem., 1978, v. 7, p. 351.
24. Женодарова С. М. Успехи химии, 1970, т. 39, с. 1479.
25. Скрябин Г. К., Головлева Л. А. Использование микроорганизмов в органическом синтезе. М.: Наука, 1976.
26. Успехи науки и техники. Сер. Биологическая химия, т. 12, Ред. Кретович В. Л., Березин И. В. М.: ВИНИТИ, 1978.
27. Future Directions for Enzyme Engineering. Ed. Wingard L. B., Berezin I. V., Klyosov A. A. N. Y.: Acad. Press, 1980.
28. Bergmann M., Fraenkel-Conrat M. J. Biol. Chem., 1937, v. 119, p. 707.
29. Behrens O. K., Bergmann M. Ibid., 1939, v. 129, p. 587.
30. Kimmel G. R., Smith E. L. In: Advances in Enzymology, v. 19, Ed. Nord F. F., New York: Interscience Publ., 1957, p. 308.
31. Mohring J. R., Shapiro S. M. J. Chem. Educ., 1976, v. 53, p. 586.
32. Bennet F. L., Niemann C. J. Am. Chem. Soc., 1950, v. 72, p. 1798.
33. Shuller W. N., Niemann C. Ibid., 1951, v. 73, p. 1644.
34. Bergmann M., Fraenkel-Conrat M. J. Biol. Chem., 1938, v. 124, p. 1.
35. Bergmann M., Fruton J. S. Ibid., 1938, v. 124, p. 321.
36. Luisi P. L., Saltman R., Vlach D., Guaraccia R. J. Mol. Catal., 1977, v. 2, p. 133.
37. Saltman R., Vlach D., Luisi P. L. Biopolymers, 1977, v. 16, p. 631.
38. Isowa Y., Ohmori M., Ichikawa T., Kurita H., Sato M., Mori K. Bull. Chem. Soc. Japan, 1977, v. 50, p. 2762.
39. Isowa Y., Ohmori M., Sato M., Mori K. Ibid., 1977, v. 50, p. 2766.
40. Isowa Y., Ichikawa T., Ohmori M. Ibid., 1978, v. 51, p. 271.
41. Oka T., Moruhara K. J. Biochem., 1978, v. 84, p. 1277.
42. Wong C.-H., Chen S.-T., Wang K.-T. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 576, p. 247.
43. Kullman W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, v. 81, p. 693.
44. Wood H. G. Fed. Proc., 1977, v. 36, p. 2197.
45. Rawls J. M., Jr. Anal. Biochem., 1978, v. 86, p. 107.
46. Traub A., Kaufmann E., Tetz Y. Ibid., 1969, v. 28, p. 469.
47. Wals P. A., Golden S., Rognstad R., Katz J., Ebner K. E. Ibid., 1976, v. 73, p. 247.
48. Peller L. Biochemistry, 1977, v. 16, p. 387.
49. Heptinstall J., Ward P. J., Hahcock I. C. Anal. Biochem., 1978, v. 91, p. 158.
50. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1976.
51. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1966.
52. Cremonesi P., Carrea G., Ferrara L., Antonini E. Europ. J. Biochem., 1974, v. 44, p. 401.
53. Cremonesi P., Carrea G., Ferrara L., Antonini E. Biotechnol. Bioceng., 1975, v. 17, p. 1101.
54. Sealock R. W., Laskowski M., Jr. Biochemistry, 1969, v. 8, p. 3703.
55. Butler L. G. Enzyme Microb. Technol., 1979, v. 1, p. 253.
56. Reichardt Ch. Lösungsmittel-Effekte in der organischen Chemie. Berlin: Verlag Chemie, 1969.

57. Homandberg G. A., Mattis J. A., Laskowski M., Jr. Biochemistry, 1978, v. 17, p. 5220.
58. Homandberg G. A., Laskowski M., Jr. Ibid., 1979, v. 18, p. 586.
59. Ingalis R. G., Squires R. G., Butler L. G. Biotechnol. Bioeng., 1975, v. 17, p. 1627.
60. Butler L. G., Reithel F. J. Arch. Biochem. Biophys., 1977, v. 178, p. 43.
61. Клибанов А. М., Семенов А. Н., Самохин Г. П., Мартинек К. Биоорган. химия, т. 4, с. 82.
62. Tsujisaka Y., Okumura S., Iwai M. Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 389, p. 415.
63. Okumura S., Iwai M., Tsujisaka Y. Ibid., 1979, v. 575, p. 156.
64. Inouye K., Watanabe K., Morihara K., Tochino Y., Kanaya T., Emura J., Sakakibara S. J. Am. Chem. Soc., 1979, v. 101, p. 751.
65. Morihara K., Oka T., Tsuzuki H. Nature, 1979, v. 280, p. 412.
66. Kelly S. J., Butler L. G., Squires R. G. Enzyme Technol. Digest, 1976, v. 5, p. 107.
67. Мартинек К., Клибанов А. М., Сахомин Г. П., Семенов А. Н., Березин И. В. Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 696.
68. Klibanov A. M., Samokhin G. P., Martinek K., Berezin I. V. Biotechnol. Bioeng., 1977, v. 19, p. 1351.
69. Kauzmann W. In: Advances in the Protein Chemistry, v. 14. Ed. Anfinsen C. B., Jr., Anson M. L., Baily K., Edsall J. T., New York: Acad. Press, 1959, p. 1.
70. Tanford C. Science, 1978, v. 200, p. 1012.
71. Hildebrand J. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 194.
72. Cramer R. D. J. Am. Chem. Soc., 1977, v. 99, p. 5408.
73. Ray A. Nature, 1971, v. 231, p. 313.
74. Tanford C. The Hydrophobic Effect. New York: Wiley Intersci., 1973.
75. Семенов А. Н., Мартинек К. В кн.: Новое в биоорганическом катализе. Ред. Березин И. В., Мартинек К. М.: Изд. МГУ, 1981, с. 00.
76. Tanford C., Buckley C. E., De P. K., Lively E. P. J. Biol. Chem., 1962, v. 237, p. 1168.
77. Herskovitz T. T., Laskowski M., Jr. Ibid., 1962, v. 237, p. 2481.
78. Herskovitz T. T., Jaillet H. Ibid., 1970, v. 245, p. 2588.
79. Tan K. H., Lovrien R. Ibid., 1972, v. 247, p. 3278.
80. Gerlsma S. Y. Europ. J. Biochem., 1970, v. 14, p. 150.
81. Bull H. F., Breese K. Biopolymers, 1978, v. 17, p. 2121.
82. Minato S., Hirai A. J. Biochem., 1979, v. 85, p. 327.
83. Гинодман Л. М. Биохимия, 1954, т. 19, с. 666.
84. Эмануэль Н. М., Кнопре Д. Г. Курс химической кинетики. М.: Высшая школа, 1974.
85. Laidler K. J., Bunting P. S. The Chemical Kinetics of Enzyme Action. Oxford: Clarendon Press, 1973.
86. Martinek K., Klyosov A. A., Berezin I. V. Int. J. Chem. Kinetics, 1974, v. 6, p. 801.
87. Марголин А. Л. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1979, 148 с.
88. Margolin A. L., Svedas V. K., Berezin I. V. In: Future Directions for Enzyme Engineering. Ed. Wingard L. B., Jr., Berezin I. V., Klyosov A. A., New York: Plenum Press, 1980, p. 257.
89. Ботвинник М. М., Остославская В. И., Иванов Л. И., Горшенина Г. К. Ж. общ. химии, 1961, т. 31, с. 3234.
90. Остославская В. И. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1960.
91. Morihara K., Oka T. Biochem. J., 1977, v. 163, p. 531.
92. Oka T., Morihara K. J. Biochem., 1977, v. 82, p. 1055.
93. Fujii T., Matsunoto K., Watanabe T. Process Biochem., 1976, v. 11, № 8, p. 21.
94. Comfurius P., Zwaal R. F. A. Biochim. Biophys. Acta, 1977, v. 488, p. 36.
95. Молотковский Ю. Г., Унковский В. И., Берегельсон Л. Д. Биоорган. химия, 1980, т. 6, с. 144.
96. Karpine A., Kasche I. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, v. 80, p. 955.
97. Nakamoto Y., Karube I., Kobayashi I., Nishida M., Suzuko S. Arch. Biochem. Biophys., 1979, v. 193, p. 117.
98. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1977, т. 236, с. 920.
99. May S. W., Lee N. N. In: Enzyme Engineering, v. 2, Ed. Pye E. K., Wingard L. B., Jr., New York, Plenum Press, 1974, p. 77.
100. Семенов А. Н., Мартинек К., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1980, т. 252, с. 394.
101. Семенов А. Н., Мартинек К., Березин И. В. Биоорган. химия, 1980, т. 6, с. 600.
102. Martinek K., Semenov A. N., Berezin I. V. Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 658, p. 76.
103. Leo A., Hansch C., Elkins D. Chem. Rev., 1971, v. 71, p. 525.
104. Коренман И. М. Константы распределения органических веществ между двумя жидкими фазами. Горький: Изд. Горьковского гос. ун-та, 1975—1979, вып. 1—5.
105. Лениндже А. Биохимия. М.: Мир, 1976, с. 433.
106. Козлов Л. В., Гинодман Л. М. Биохимия, 1965, т. 30, с. 1051.
107. Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К. Биоорган. химия, 1977, т. 3, с. 99.

108. Семенов А. Н., Мартинек К. Там же, 1980, т. 6, с. 1559.
109. Martinek K., Semenov A. N. Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 658, p. 89.
110. Ионы и ионные пары в органических реакциях. Ред. Шварц М., М.: Мир, 1975.
111. Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К., Биохимия, 1871, т. 36, с. 981.
112. Мартинек К., Семенов А. Н., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1980, т. 253, с. 358.
113. Martinek K., Semenov A. N., Berezin I. V. Biotechnol. Bioeng., 1981, v. 23, № 4.
114. Hay R. W., Porter L. J., Morris P. J. Austral. J. Chem., 1966, v. 19, p. 1197.
115. Семенов А. Н., Мартинек К., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1980, т. 254, с. 121.
116. Semenov A. N., Martinek K., Berezin I. V. Biotechnol. Bioeng., 1981, v. 25, p. 355.
117. Rajbhandary V. Z., Young R. J., Khorana H. G., J. Biol. Chem., 1964, v. 239, p. 3875.
118. Sterri S. H., Fonnem F. Europ. J. Biochem., 1978, v. 91, p. 215.
119. Семенов А. Н., Мартинек К., Марголин А. Л., Швядас В. К., Березин И. В. Докл. АН СССР, в печати.
120. Семенов А. Н., Мартинек К., Березин И. В. Материалы III Советско-шведского симпозиума по физико-химической биологии. Тбилиси, 1981.
121. Семенов А. Н. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1981.
122. Семенов А. Н., Громов А. И., Мартинек К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 6.
123. Martinek K., Yatsimirski A. K., Levashov A. V., Berezin I. V. In: Micellization, Solubilization and Microemulsions, v. 2, Ed. Mittal K. New York: Plenum Press, 1977, p. 489.
124. Martinek K., Yatsimirski A. K., Osipov A. P., Berezin I. V. Tetrahedron, 1973, v. 29, p. 963; 1975, v. 31, p. 709.
125. Мартинек К., Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Семенов А. Н., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1981, т. 256, с. 1423.
126. Лапина Г. П. Дис. на соискание уч. ст. канд. хим. наук. М.: МГУ, 1977, 159 с.
127. Pollak A., Whitesides G. M. J. Am. Chem. Soc., 1976, v. 98, p. 289.
128. Kula M.-R. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, v. 2. Enzyme Technology. Ed. Wingard L. B., Jr., Katchalski-Katzir E., Goldstein L., New York: Acad. Press, 1972, p. 71.
129. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия нуклеиновых кислот и их компонентов. М.: Химия, 1978.
130. Хабарова М. И., Сморянина О. А., Багданов А. С., Коваленко М. И., Женодарова С. М. Биоорган. химия, 1978, т. 4, с. 740.
131. Köster H., Hoppe-Seylers T. phys. Chem. 1978, v. 359, p. 1579.
132. Женодарова С. М., Клягина В. П., Поротикова В. А., Жданов Р. И. Биоорган. химия, 1979, т. 5, с. 1341.
133. Kikuchi Y., Hirai K., Sakaguchi K. J. Biochem., 1979, v. 86, p. 1427.
134. Hinton D. M., Baez J. A., Gumpert R. T. Biochemistry, 1978, v. 17, p. 5091.
135. Khorana H. G. J. Mol. Biol., 1972, v. 72, p. 209 (см. также последующие статьи этого же автора в этом же журнале).
136. Khorana H. G. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, p. 565 (см. также последующие статьи этого же автора в этом же журнале).
137. Gardner C. R., Colton C. K., Langer R. S., Hamilton B. K., Archer M. C., Whintesides G. M. In: Enzyme Engineering, v. 2. Ed. Pye E. K., Wingard L. B., Jr. New York: Plenum Press, 1974, p. 209.
138. Whintesides G. M., Chmurny A., Garrett P., Lamotte A., Colton C. K. Ibid., p. 217.
139. Nemet M. I., Solomon B. A., Lauger R. S., Colton C. K. In: Enzyme Engineering, v. 3. Ed. Pye E. K., Weetall H. H. New York: Plenum Press, 1978, p. 95.
140. Marshall D. L. In: Enzyme Engineering. v. 2. Ed. Pye E. K., Wingard L. B., Jr. New York: Plenum Press, 1974, p. 223.
141. Straatman N. G., Weich M. J. Radiation Research, 1973, v. 56, p. 48.
142. Marchalons J. J. Biochem., 1969, v. 113, p. 299.
143. Karonen S.-L., Mörsky P., Siren M., Seudderling U. Anal. Biochem., 1975, v. 67, p. 1.
144. David G. S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1972, v. 48, p. 464.
145. Cohen M. B., Spolter L., Chang C. C. J. Nucl. Med., 1974, v. 15, p. 1192.
146. Greenaway W., Whatley F. R. J. Label. Comp., 1975, v. 11, p. 395.
147. Greenaway W., Whatley F. R. FEBS Letters, 1977, v. 75, p. 41.
148. Greenaway W., Whatley F. R., Ward S. Ibid., 1977, v. 81, p. 286.
149. Lembares N., Dinwoodie R., Gloria I., Harper P., Lathrop K. J. Nucl. Res., 1972, v. 13, p. 786.
150. Symon R. H. In: Methods in Enzymology, v. 29. Ed. Grossman L., Moldave K. New York: Acad. Press, 1974, part E., p. 102.
151. Reeve A. E., Huahg R. C. C. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, p. 81.
152. Abraham K. A. Biochem. J., 1977, v. 161, p. 615.
153. Schendel P. F., Wells R. D. J. Biol. Chem., 1973, v. 248, p. 8319.
154. Hudson B. G., McKenzie L., Ebner K. E. Anal. Biochem., 1972, v. 48, p. 524.
155. Kullman W. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, v. 91, p. 693.

156. Royer G. P., Anantharmaiah G. N. J. Am. Chem. Soc., 1979, v. 101, p. 3394.
157. Березин И. В., Марголин А. Л., Швабас В. К. Докл. АН СССР, 1977, т. 235, с. 961.
158. Cremonesi P., Carrea G., Sportoletti G., Antonini E. Arch. Biochem. Biophys., 1973, v. 159, p. 7.
159. Lungaro G., Carrea G., Casselato M. M., Antonini E. Ibid., 1973, v. 159, p. 1.
160. Buckland B. C., Dunnill P., Lilly M. D. Biotechnol. Bioeng., 1975, v. 17, p. 815.
161. Ohlson S., Larsen P. O., Mosbach K. Ibid., 1978, v. 20, p. 1267.
162. Carrea G., Colombi F., Mazzola G., Cremonesi P., Antonini E. Ibid., 1979, v. 21, p. 39.
163. Yamane T. Ibid., 1979, v. 21, p. 2133.
164. Larsson P.-O., Ohlson S., Mosbach K. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, v. 2. Enzyme Technology. Ed. Wingard L. B., Jr., Katchalski-Katzir E., Goldstein L. New York: Acad. Press, 1979, p. 291.
165. Antrim R. L., Colilla W., Schnyder B. J. Ibid., 1979, p. 98.
166. Hemmingsen S. H. Ibid., 1979, p. 157.
167. Reilly P. J. Ibid., 1979, p. 185.
168. Клесов А. А. В кн.: Новое в биоорганическом катализе. Ред. Березин И. В., Мартинек К. М.: Изд. МГУ, 1981, (в печати).
169. Клесов А. А. В кн.: Введение в прикладную энзимологию. Ред. Березин И. В., Мартинек К. М.: Изд. МГУ, 1981, (в печати).
170. Мартинек К., Березин И. В. Успехи химии, 1980, т. 49, с. 737.

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