



УДК 577.112.6:577.152.344

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ В ДВУХФАЗНЫХ
ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

V. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ В ПРЕПАРАТИВНОМ СИНТЕЗЕ ПЕПТИДА

*Хмельницкий Ю. Л., Мартинек Б.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Найдены оптимальные условия для проведения ферментативного (катализируемого α -химотрипсином) синтеза дипептида N-ацетил-L-триптофил-L-лейцинамида в двухфазной системе вода — этилацетат. Оптимизация проводилась по таким параметрам, как соотношение объемов органической и водной фаз, pH и концентрация исходных реагентов. Найденные оптимальные условия были использованы для осуществления препаративного синтеза дипептида. Выход продукта достигает практически 100%.

Применение ферментов в тонком органическом синтезе весьма перспективно благодаря их исключительной субстратной специфичности и возможности проведения реакции в мягких условиях. В частности, достигнуты определенные успехи при использовании ферментов для синтеза пептидов, как это отражено в обзорах [1—7]. Существует тем не менее одно обстоятельство, ограничивающее более широкое применение ферментов в препаративном органическом синтезе, в том числе в синтезе пептидов. Дело в том, что ферменты сохраняют свои уникальные каталитические свойства лишь в довольно узком диапазоне условий, а именно в водных растворах при близких к нейтральным значениям pH и при не слишком высоких температурах. Однако равновесие реакций пептидного синтеза в этих условиях часто оказывается сдвинутым в сторону исходных реагентов.

Это противоречие может быть успешно разрешено путем использования двухфазных систем типа «вода — не смешивающийся с водой органический растворитель», создание которых [8—11] положило начало новому этапу в развитии ферментативного синтеза пептидов [4]. О перспективности этого подхода свидетельствуют результаты уже первых попыток применения двухфазных систем для ферментативного пептидного синтеза [12—14], в которых удалось достичь высоких выходов целевого продукта в мягких условиях.

Тем не менее возможность именно 100% выхода продукта при ферментативном синтезе в двухфазных системах недавно была поставлена под сомнение [15]. Мы, однако, считаем, что такая цель вполне достижима при оптимизации условий синтеза. Пока это было показано экспериментально лишь для реакции получения сложных эфиров [16, 17]. В настоящей работе проведена оптимизация условий пептидного синтеза на примере реакции образования N-ацетил-L-триптофил-L-лейцинамида:



катализируемой α -химотрипсином в двухфазной системе вода — этилацетат. Принципиальная возможность ферментативной реакции (1) была показана ранее [18].

Кинетика накопления продукта и стабильность α -химотрипсина в ходе реакции. При обычно используемой концентрации α -химотрипсина в водной фазе, равной 20 мг/мл, равновесие реакции синтеза дипептида достигалось во всех случаях через 6—7 сут. В качестве примера на рис. 1 показаны кинетические кривые накопления продукта реакции (1) при раз-

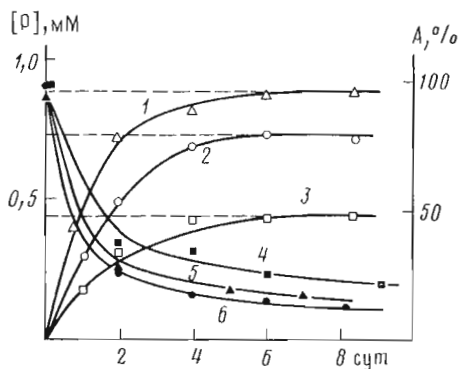


Рис. 1

Рис. 1. Кинетические кривые накопления продукта реакции (1) $\text{Ac-Trp-Leu-NH}_2(\text{P})$ (1-3) и инактивации α -химотрипсина (E) в ходе реакции (4-6) при pH 5 (3, 4), 7 (1, 5), 10 (2, 6). Условия: $V_{\text{орг}}/V_{\text{водн}}=50$, $[\text{Ac-Trp}]=[\text{Leu-NH}_2]=1$ мМ, $[\text{E}]=20$ (1, 2, 4-6) и 40 мг/мл водной фазы (3, 4)

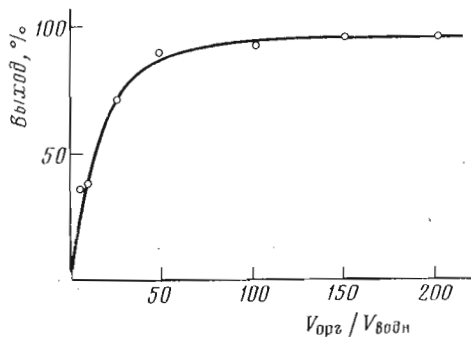


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость выхода продукта реакции (1) от соотношения объемов органической и водной фаз реакционной смеси. Условия — см. подпись к рис. 1; pH 7

личных значениях pH, использованных в дальнейших исследованиях (кривые 1-3). Пунктиром на этом рисунке обозначены концентрации, соответствующие выходу продукта реакции.

Указанное время реакции соответствует проведению синтеза в наиболее простой двухфазной системе, состоящей из двух слоев жидкости. Время синтеза можно изменять, варьируя концентрацию катализатора, скорость перемешивания, величину поверхности раздела фаз. Для увеличения поверхности раздела фаз реакцию следует проводить в эмульсии. В этих условиях, однако, фермент быстро инактивируется (в результате адсорбции на поверхности раздела фаз), и поэтому его нужно ковалентно иммобилизовать на (или в) носителе (см., например, [17]).

При определении выхода продукта реакции необходимо быть уверенным в том, что выход кинетической кривой на горизонтальный участок соответствует именно достижению равновесия реакции (1), а не обусловлен ее прекращением вследствие инактивации фермента. Чтобы убедиться в том, что ферментативная активность сохраняется до конца реакции, мы изучили стабильность фермента в ходе реакции при различных значениях pH водной фазы. Результаты представлены на рис. 1 в виде зависимости относительной активности α -химотрипсина в реакции гидролиза *n*-нитроанилида *N*-3-карбоксипропионил-*L*-фенилаланина от времени инкубации реакционной смеси (кривые 4-6). Видно, что фермент еще сохраняет каталитическую активность после выхода кривой накопления продукта (кривые 1-3 рис. 1) на горизонтальный участок. Более того, добавление в этот момент свежей порции фермента в водную фазу не приводит к изменению содержания продукта реакции. Таким образом, горизонтальный участок на кривых 1-3 действительно соответствует положению равновесия реакций (1).

Влияние на выход продукта соотношения объемов органической и водной фаз. Из рис. 2 видно, что зависимость выхода продукта реакции (1) от соотношения объемов органической и водной фаз реакционной смеси имеет вид кривой с насыщением, причем выход достигает почти 100%. Увеличение выхода продукта с ростом $V_{\text{орг}}/V_{\text{водн}}$ объясняется различиями в коэффициентах распределения исходных веществ и продуктов реакции между органической и водной фазами [18], а именно растворимость в воде продукта реакции намного меньше растворимости исходных реагентов. Поэтому образующийся в ходе реакции синтеза дипептид выводится из сферы протекания реакции, т. е. из водной фазы, путем экстракции в фазу органического растворителя. Вследствие этого равновесие реакции смещается в сторону образования продукта, причем тем сильнее, чем полнее проходит экстракция, т. е. чем больше соотношение объемов органической и водной фаз.

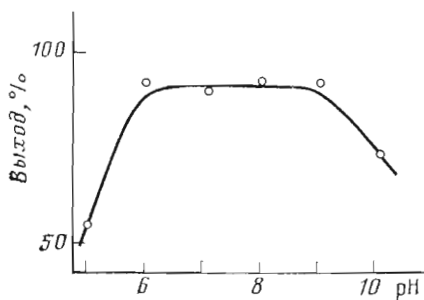


Рис. 3

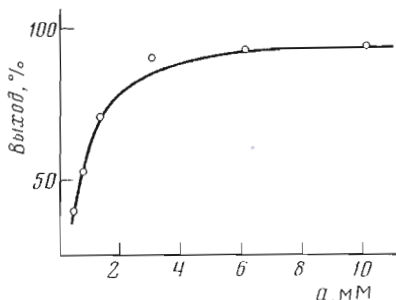


Рис. 4

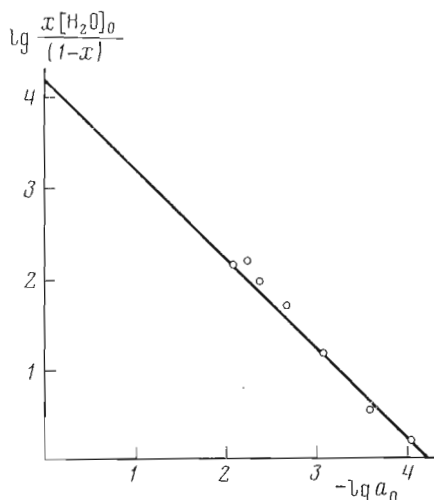


Рис. 5

Рис. 3. Зависимость выхода продукта реакции (1) от pH водной фазы. Условия — см. подпись к рис. 1

Рис. 4. Зависимость выхода продукта реакции (1) от начальной концентрации (a) исходных реагентов. Точками показаны данные эксперимента, сплошная кривая рассчитана по уравнению (3) с использованием найденного (см. рис. 5) значения $K=2,8 \cdot 10^4$. Условия: $V_{\text{орг}}/V_{\text{водн}}=25$, pH 7, $[E]=20$ мг/мл водной фазы

Рис. 5. Линейзация экспериментальных данных рис. 4 для определения константы равновесия реакции (1)

Влияние на выход продукта pH водной фазы. Из рис. 3 видно, что зависимость выхода дипептида от pH водной фазы имеет вид кривой с широким максимумом, т. е. выход продукта реакции достигает наибольшего значения, приближающегося к 100%, если pH водной фазы лежит в пределах 6–9. Этот результат согласуется с литературными данными [18] и объясняется сдвигом значений pK кислотного и аминного компонентов реакции (1) при переходе к двухфазной водно-органической системе [11, 18].

Влияние на выход продукта реакции (1) начальной концентрации исходных реагентов *N*-ацетил-*L*-триптофана и *L*-лейцинамида показано на рис. 4, из которого видно, что выход дипептида увеличивается при возрастании концентрации исходных реагентов и при высоких ее значениях достигает насыщающего уровня, близкого к 100%.

Анализ этой зависимости позволяет определить величину константы равновесия реакции (1), определяемой соотношением

$$K = \frac{p_{\text{равн}} [\text{H}_2\text{O}]_{\text{равн}}}{a_{\text{равн}}^2} \approx \frac{p_{\text{равн}} [\text{H}_2\text{O}]_0}{(a_0 - p_{\text{равн}})^2}, \quad (2)$$

где $a = [\text{Ac-Trp}] = [\text{Leu-NH}_2]$, $p = [\text{Ac-Trp-Leu-NH}_2]$, индексы «0» и «равн» относятся к начальным и равновесным величинам. Приближенное равенство $[\text{H}_2\text{O}]_{\text{равн}} \approx [\text{H}_2\text{O}]_0$ справедливо, так как $[\text{H}_2\text{O}]_0 \gg p_{\text{равн}}$, и изменением концентрации воды в результате протекания реакции можно пренебречь. Выражение (2) можно преобразовать к виду

$$\lg \frac{x [\text{H}_2\text{O}]_0}{(1-x)^2} = \lg K + \lg a_0, \quad (3)$$

где $x = p_{\text{равн}}/a_0$ — выход реакции. Согласно уравнению (3), прямая в координатах $\lg [x [\text{H}_2\text{O}]_0 / (1-x)^2] \div \lg a_0$ отсекает на оси ординат отрезок, равный

lg K . График этой зависимости показан на рис. 5. Значение константы равновесия, определенное таким путем, составляет $2,8 \cdot 10^4$, что по порядку величины согласуется с литературными данными [11, 18]. Рассчитанная с использованием найденного значения K по уравнению (4) кривая зависимости выхода от начальной концентрации исходных реагентов показана на рис. 4 сплошной линией.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных (рис. 1–4) можно указать условия, оптимальные для достижения najwyżшего выхода продукта реакции (1) при проведении ее в двухфазной системе вода – этилацетат: соотношение объемов органической и водной фаз $V_{\text{орг}}/V_{\text{водн}} > 50$, значение pH водной фазы от 6 до 9, начальные концентрации исходных реагентов больше $3 \cdot 10^{-3}$ М (в расчете на объем всей системы). В этих условиях выход продукта реакции (1) достигает почти 100%, в то время как в воде эта величина составляет всего 0,1% [19].

Препаративный ферментативный синтез N-ацетил-L-триптофил-L-лейцинамида в двухфазной системе вода – этилацетат. Используя найденные оптимальные условия проведения реакции (1), мы осуществили препаративный ферментативный синтез N-ацетил-L-триптофил-L-лейцинамида в двухфазной системе вода – этилацетат. Согласно данным тонкослойной хроматографии (см. «Экспер. часть»), выход продукта реакции ферментативного синтеза (1), проведенной в оптимальных условиях, составил практически 100%. Кроме того, на хроматографической пластинке пятна, соответствующие исходным веществам, в конце реакции не детектируются. Аналогичный результат был получен при весовом анализе: из органической фазы было выделено 274 мг дипептида, что в пределах ошибки совпадает с теоретическим выходом. Полнота превращения исходных веществ была подтверждена нами также путем элементного анализа полученного дипептида.

Экспериментальная часть

В работе использовали α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1) из поджелудочной железы крупного рогатого скота производства НПО «Биохимреактив» (г. Олайне). Содержание активного фермента в этом препарате, определенное по методике [20], составило 66%. N-Ацетил-L-триптофан и L-лейцинамид солянокислый – препараты фирмы Reanal (Венгрия). ТСХ проводили на пластинках Silufol (ЧССР). Для спектрофотометрических измерений использовали прибор Beckman-25 (США). Все эксперименты выполнены при 20° С.

Приготовление растворов. Для проведения реакции готовили раствор, содержащий N-ацетил-L-триптофан и солянокислый L-лейцинамид в эквимолярных концентрациях ($6 \cdot 10^{-4}$ –2 М) и 20–40 мг/мл α -химотрипсина в «тройном» буфере: 0,1 М NaCH_3COO – 0,1 М NaH_2PO_4 – 0,1 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 7. После растворения реагентов pH раствора каждый раз доводили до требуемого значения.

Проведение реакции и определение выхода дипептида. Приготовленный раствор реагентов в буфере с доведенным значением pH помещали в колбу и добавляли предварительно насыщенный водой этилацетат в количестве, необходимом для достижения требуемого соотношения объемов органической и водной фаз. Реакционную смесь осторожно перемешивали на лабораторной качалке так, чтобы не допустить образования эмульсии. Через определенные промежутки времени отбирали пробы органической фазы для определения содержания продукта реакции.

При определении выхода продукта реакции пробу органической фазы (0,05–4,5 мл) наносили на пластинку для ТСХ размером 5×15 см и помещали в камеру с элюирующим раствором (пропиловый спирт – аммиак, 7:3). При хроматографировании применяли метод восходящего элюирования. В качестве свидетеля использовали препарат N-ацетил-L-триптофил-L-лейцинамида (Reanal, Венгрия). После окончания хроматографирования пластинку высунивали и вырезали из нее полоску размером 2×5 см на уровне, соответствующем подвижности продукта реакции (R_f 0,87). Полоску разрезали на мелкие части и помещали их в 4 мл дистиллиро-

ванной воды для отмывания продукта. Через 1 сут водный раствор отделяли центрифугированием и определяли в нем содержание продукта по поглощению при 280 нм (ϵ $6,5 \cdot 10^3$ М⁻¹·см⁻¹ [15]). После этого, зная объем исходной пробы органической фазы, рассчитывали концентрацию продукта в реакционной смеси.

Исходные вещества — *N*-ацетил-*L*-триптофан и *L*-лейцинамид — также детектируются на хроматограмме. Убыль этих соединений в ходе реакции подтверждается уменьшением интенсивности соответствующих пятен на хроматограмме.

Выход продукта реакции принимали равным отношению (выраженному в процентах) концентрации продукта в системе после достижения равновесия реакции к начальной концентрации любого из исходных реагентов (начальные концентрации исходных реагентов одинаковы).

Следует подчеркнуть, что концентрации исходных реагентов и продукта реакции везде рассчитаны на весь объем системы с учетом как водной, так и органической фаз.

Определение активности α -химотрипсина в ходе реакции. Через определенные промежутки времени из водной фазы реакционной смеси отбирали пробы объемом 0,01–0,1 мл и помещали их для определения активности α -химотрипсина в кювету спектрофотометра, содержащую 2 мл «тройного» буфера при pH 7 и 0,02 мл $1,3 \cdot 10^{-2}$ М раствора *n*-нитроанилида *N*-3-карбоксихпропионил-*L*-фенилаланина в смеси ацетонитрил — диоксан, 1 : 1. Реакцию гидролиза этого специфического субстрата, катализируемого α -химотрипсином, регистрировали на длине волны 380 нм по поглощению выделяющегося *n*-нитроанилипа.

Препаративный синтез N-ацетил-L-триптофил-L-лейцинамида проводили в двухфазной системе, состоящей из 1 мл «тройного» буфера и 100 мл этилацетата, насыщенного водой. Водная фаза содержала 0,01 М *N*-ацетил-*L*-триптофан, солянокислый *L*-лейцинамид и 20 мг/мл α -химотрипсина, pH 7. Синтез проводили в течение 7 сут при осторожном перемешивании реакционной смеси на лабораторной качалке. После завершения реакции органическую фазу отделили и этилацетат упарили, полученный дипептид сушили в вакуумном эксикаторе над P₂O₅ при 20° С в течение 3 сут.

Авторы выражают глубокую благодарность Фам Хыу Диену за выполнение экспериментальных исследований, а также чл.-кор. АН СССР И. В. Березину за инициативные предположения и обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мартинек К., Семенов А. Н. Успехи химии, 1981, т. 50, № 8, с. 1376–1406.
2. Martinek K., Semenov A. N. J. Appl. Biochem., 1981, v. 3, № 2, p. 93–126.
3. Chaiken I. M., Komoriya A., Ohno M., Widmer F. Appl. Biochem. and Biotechnol., 1982, v. 7, № 5, p. 385–399.
4. Jakubke H. D., Kühl P., Könnecke A., Döring G., Walpuski J., Wilsdorf A., Zapevalova N. P. In: Proceedings of 17th European Peptide Symposium, August 29 – September 3, 1982/Eds Blaha K., Malon P.
5. Cao Q. P., Cui D. F., Zhang Y. S. Nature, 1981, v. 292, № 5825, p. 774–775.
6. Zhang Y. S. Trends Biochem. Sci., 1983, v. 8, № 1, p. 16–17.
7. Koporinska D., Muzalewski F. Mol. Cell. Biochem., 1983, v. 51, № 2, p. 165–175.
8. Klibanov A. M., Samokhin G. P., Martinek K., Berezin I. V. Biotechnol. and Bioeng., 1977, v. 19, № 9, p. 1351–1361.
9. Мартинек К., Клибанов А. М., Самохин Г. П., Семенов А. Н., Березин И. В. Био-орган. химия, 1977, т. 3, № 5, с. 696–702.
10. Martinek K., Semenov A. N., Berezin I. V., Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 658, № 1, p. 76–89.
11. Martinek K., Semenov A. N. Biochim. et biophys. acta, 1981, v. 658, № 1, p. 90–101.
12. Kühl P., Könnecke A., Döring G., Daumer H., Jakubke H. D. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 10, p. 893–896.
13. Семенов А. Н., Мартинек К., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1980, т. 252, № 2, с. 394–398.
14. Semenov A. N., Martinek K., Berezin I. V. Biotechnol. and Bioeng., 1981, v. 23, № 2, p. 355–360.

15. *Tarquis D., Monsan P., Durand G.* Bull. Soc. chim. France, 1980, № 1-2, p. 76-80.
16. *Семенов А. Н., Громов А. И., Мартинек К.* Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 6, с. 867-875.
17. *Vidalus J. L., Baboulene M., Speziale V., Monsan P.* Tetrahedron, 1983, v. 39, № 3, p. 269-274.
18. *Семенов А. Н., Мартинек К.* Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 10, с. 1559-1571.
19. *Дьяченко Е. Д., Козлов Л. В., Антонов В. К.* Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 1, с. 99-104.
20. *Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L.* J. Biol. Chem., 1961, v. 236, № 11, p. 2930-2935.

Поступила в редакцию
19.X.1983

ENZYMATIC SYNTHESIS IN BIPHASIC WATER-ORGANIC SYSTEMS.
V. OPTIMIZATION OF PREPARATIVE SYNTHESIS OF A PEPTIDE

КНМЕЛ'НИТСКИЙ Ю. Л., МАРТИНЕК К.

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

Some aspects of α -chymotrypsin-catalyzed synthesis of N-acetyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide in a biphasic water - ethylacetate system were analyzed. The influence of various parameters, i. e. organic phase/aqueous phase volume ratio, aqueous phase pH, and reagent concentrations, on the yield of the dipeptide was studied. The following optimal conditions for enzymatic synthesis were chosen: ethylacetate/water volume ratio 50, aqueous phase pH 6-9, initial concentrations of N-acetyl-L-tryptophan and L-leucine amide hydrochloride over $3 \cdot 10^{-3}$ M (referring to the total volume of the reaction system). Under optimal conditions the desired product was obtained in practically 100% yield.