



УДК 541.128.1 + 577.150.2

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКИХ СМЕСЯХ :
КРИТЕРИЙ ДЛЯ ВЫБОРА ОПТИМАЛЬНОГО ОРГАНИЧЕСКОГО
РАСТВОРИТЕЛЯ***Клибанов А. М., Семенов А. Н., Саложин Г. П.,
Мартинек К.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

На основании представлений о доминирующей роли гидрофобных взаимодействий для поддержания нативной структуры белков и литературных данных по мицеллообразованию поверхностно-активных веществ в различных растворителях выбраны органические растворители, в которых денатурация белков должна идти в минимальной степени. Оптимальными в этом смысле представляются глицерин, а также этиленгликоль, аминоэтанол, формамид и др. Сформулированная закономерность подтверждена экспериментально: глицерин гораздо слабее инактивирует кислую фосфатазу, чем этанол или диметилформамид. При переходе от воды как среды реакции к водно-органической смеси степень снижения скорости ферментативного процесса зависит от природы субстрата (и тем меньше, чем менее реакционноспособен субстрат в воде). Полученные результаты использованы для проведения препаративного ферментативного синтеза в водно-органической смеси. Найдено, что в то время как в воде выход глицерофосфата с участием кислой фосфатазы ничтожно мал ($\sim 0,01\%$), в 95%* глицерине он составляет 35%, причем процесс протекает с высокой скоростью и является термодинамически равновесным.

Вследствие высокой каталитической активности и уникальной субстратной специфичности ферменты находят и будут находить весьма широкое применение как катализаторы в препаративном органическом синтезе [1].

Однако имеются моменты, ограничивающие практическое использование ферментов. Одним из наиболее существенных является следующий. Положение равновесия многих важных процессов, таких, как полимеризация сахаров, нуклеотидов, аминокислот, реакции дегидратации и др., при их проведении в воде, как правило, сдвинуто в сторону исходных реагентов вследствие высокой концентрации в системе одного из продуктов — воды. Естественный выход из такого положения — замена воды как среды реакции на неводный растворитель, но такая замена должна привести к денатурации (с потерей активности и специфичности) биологического катализатора [2, 3]. В принципе возможны два решения этой проблемы: 1) использование двухфазных водно-органических систем (смесей воды с не смешивающимися с ней растворителями) [4, 5]; 2) подбор органического компонента, в наименьшей степени денатурирующего фермент. Это

* Здесь и в дальнейшем концентрации органических растворителей в смесях выражены в объемных процентах.

помимо практической значимости могло бы оказаться важным для энзимологии вообще, например при изучении влияния концентрации воды на ферментативные реакции.

Для проведения ферментативных процессов в неводных или водно-органических средах с высоким содержанием неводного компонента, как правило, используют такие органические растворители, как диметилсульфоксид [6—13], формамид [11, 14], диметилформамид [11, 15—17], диоксан [18—22], этиленгликоль [20, 23], глицерин [23, 24], одноатомные спирты [13, 20, 25—28], ацетон [13, 22]. Выбор того или иного растворителя при этом чаще всего случаен, научно не обоснован, поскольку отсутствует общий критерий для подбора оптимального (с точки зрения влияния на фермент) растворителя.

Попробуем выработать такой критерий, исходя из общих представлений об относительной роли сил, поддерживающих нативную структуру белковых молекул в водных растворах; подчеркнем, что доминирующую роль в этом играют гидрофобные взаимодействия [29]. Следовательно, «хороший» для белка неводный растворитель должен максимально обеспечить такие взаимодействия. Какие же растворители обладают этим свойством?

Для ответа на этот вопрос обратимся к данным, полученным для модельного процесса мицеллообразования поверхностно-активных веществ в различных растворителях. Рэй [30] пришел к выводу, что гидрофобные взаимодействия являются частным случаем сольвофобных взаимодействий. По способности к реализации сольвофобных взаимодействий все растворители можно разделить на три класса: 1) вода, глицерин, этиленгликоль, аминоэтанол, формамид и др.; 2) метилформамид и диметилформамид; 3) метанол, этанол, толуол. В наибольшей степени сольвофобные взаимодействия реализуются в растворителях, относящихся к первому классу (так, было найдено [30], что мицеллы детергента образуются только в них); в значительно меньшей степени сольвофобные взаимодействия могут осуществляться в растворителях второго класса и практически отсутствуют в растворителях третьего класса. Такое различие обусловлено, по мнению Рэя, тем, что молекулы растворителей первого класса содержат по крайней мере 2 или 3 фрагмента, способных к образованию водородных связей. В результате межмолекулярных взаимодействий водородные связи образуют жесткие, термодинамически невыгодные каркасные структуры растворителя вокруг сольвофобных растворенных молекул. Это и 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 эта способность существенно ниже.

Изложенные данные позволяют сформулировать критерий для выбора оптимального растворителя. Этот критерий должен быть универсальным, поскольку эффективность сольвофобных (так же как и гидрофобных [31]) взаимодействий *определяется не природой взаимодействующих молекул, а прежде всего природой растворителя*. Поэтому, если полагать, что основная роль в поддержании структуры белковых молекул принадлежит гидрофобным взаимодействиям [29], то следует признать, что наилучшими растворителями для проведения ферментативных реакций будут растворители первого класса, а среди них вода (которую использует природа) и глицерин. В этой связи заметим, что в большинстве работ авторами использовались растворители, относящиеся ко второй или даже третьей группам (см. выше), т. е. растворители, как мы можем теперь сказать, самые неудачные. Наряду с этим в некоторых работах было экспериментально найдено [20, 28, 32, 33], что растворители, относящиеся к первому классу (особенно глицерин и в меньшей степени этиленгликоль), гораздо слабее денатурируют белки, чем прочие. В свете упомянутых фактов [30] этот эмпиризм находит свое физико-химическое объяснение.

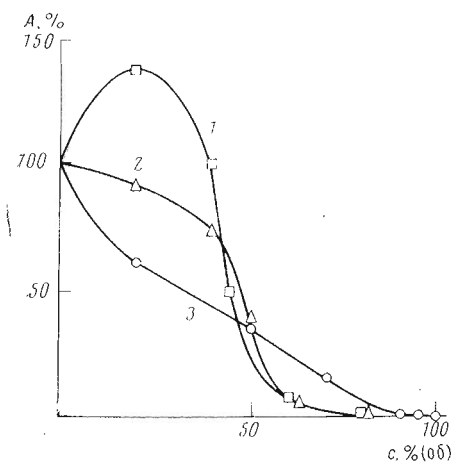


Рис. 1. Зависимость относительной каталитической активности (А) кислой фосфатазы при сольволизе *n*-нитрофенилфосфата в водно-органических смесях с различными концентрациями этанола (1), диметилформамида (2) или глицерина (3)

рациях органического растворителя (что может быть объяснено, например, увеличением гибкости при разрыхлении структуры молекул фермента [20]) наступает резкая инактивация фосфатазы при более высоких концентрациях спирта; в 63% этаноле остаточная активность фермента составляет лишь 5% уровня активности в воде. В диметилформамиде такой уровень достигается в 62% растворителе и зависимость в целом напоминает зависимость, полученную для этанола. В то же время в водно-глицериновых смесях активность кислой фосфатазы при повышении содержания органического компонента падает довольно плавно: 5% уровень активности фермента наблюдается лишь при высокой концентрации глицерина (86%). Если иметь в виду уменьшение концентрации воды в системе (что важно для сдвига равновесия реакций в препаративном ферментативном синтезе), то 5% уровень активности кислой фосфатазы в случае этанола достигается при 37% воды, в случае диметилформамида — при 38% воды, а в случае глицерина — при содержании, в 3 раза меньшем (рис. 1). Аналогичные закономерности наблюдаются и при более высоких концентрациях органических растворителей.

Таким образом, глицерин в гораздо меньшей степени инактивирует кислую фосфатазу, чем этанол или диметилформамид. Этот факт хорошо соотносится с развиваемой нами в свете работы [30] концепцией, согласно которой нативная структура белковых молекул (а следовательно, их каталитическая активность) поддерживается в растворителях, способных к сольвофобным взаимодействиям: глицерин — это растворитель первого класса, где сольвофобные взаимодействия реализуются, в то время как в диметилформамиде и этаноле они должны практически отсутствовать (это растворители второго и третьего класса соответственно). Вместе с тем следует отметить, что трехмерная структура белковых молекул поддерживается не только гидрофобными взаимодействиями, но и другими видами взаимодействий — электростатическими, с помощью водородных связей и т. д. [29]; поэтому замена воды на другой растворитель не может пройти для белка полностью незамеченной (этим и объясняется, вероятно, снижение активности при слишком высокой концентрации глицерина, см. рис. 1, 3). Тем не менее развитые в данной работе представления позволяют подобрать оптимальный (в наименьшей степени денатурирующий белки) растворитель.

В настоящем исследовании мы аэробировали и применили сделанные выводы для проведения в водно-органических средах реакций, катализируемых кислой фосфатазой (КФ 3.1.3.2). Выбор фермента обусловлен тем, что его можно использовать как катализатор для синтеза различных фосфатов, многие из которых, как, например, глицерофосфат (синтезированный в данной работе), широко применяются в качестве лекарственных препаратов [34].

Катализируемые кислой фосфатазой реакции сольволиза различных субстратов в водно-органических смесях. При рассмотрении зависимости скорости гидролиза *n*-нитрофенилфосфата кислой фосфатазой от концентрации различных растворителей (рис. 1) видно, что в случае этанола после некоторой стимуляции ферментативной активности при низких концен-

Как с теоретической, так и с практической точки зрения существенный интерес вызывает вопрос: в какой мере фермент сохраняет в ходе инактивации свою специфичность? Иными словами, зависит ли процент сохраняемой ферментом в водно-органической смеси активности от природы субстрата. С этой целью мы исследовали катализируемый кислой фосфатазой сольволиз трех субстратов — *n*-нитрофенилфосфата, β -глицерофосфата и α -глицерофосфата, — протекающий в 95% глицерине. Оказалось, что по сравнению с активностью в воде активность фермента в 95% глицерине по отношению к первому субстрату составляла 1%, по отношению ко второму субстрату — 36%, а по отношению к третьему — 74%. Выявлена общая закономерность: чем менее реакционноспособен субстрат (по отношению к ферменту) в воде, тем меньше падает скорость его ферментативного превращения при переходе от воды как среды реакции к водно-органической смеси. Так, в воде кислая фосфатаза при использованных нами условиях гидролизует *n*-нитрофенилфосфат в 12 раз быстрее, чем β -глицерофосфат, в то время как в 95% глицерине второй субстрат расщепляется ферментом в 3 раза быстрее, чем первый. Следовательно, при переходе от воды к водно-органическим средам происходит изменение специфичности фермента; это, во-первых, может быть использовано в некоторых случаях для препаративного ферментативного синтеза и, во-вторых, для выяснения механизма специфичности действия ферментов.

Итак, найдено, что в 95% глицерине кислая фосфатаза весьма эффективно катализирует сольволиз глицерофосфатов: скорость реакций составляет несколько десятков процентов от уровня, характерного для водного раствора.

Это позволяло надеяться на успешное осуществление катализируемого кислой фосфатазой синтеза глицерофосфата в среде с высокой концентрацией глицерина.

Ферментативный синтез глицерофосфата в водно-органической среде. В воде (при pH 5) константа равновесия не благоприятствует синтезу глицерофосфата [35]. Так, например, при 2 мМ концентрации глицерина и неорганического фосфата выход глицерофосфата составит лишь $\sim 0,01\%$. Очевидно, что такой низкий выход с практической точки зрения неприемлем. Для его повышения можно воспользоваться двумя методами. Во-первых, введением неводного компонента можно уменьшить в системе концентрацию воды; поскольку вода — продукт реакции, это приведет к увеличению выхода глицерофосфата. При выборе неводного компонента естественно остановиться на одном из растворителей первого класса. Во-вторых, повышение концентрации одного из исходных реагентов (фосфата или глицерина) должно привести к повышению степени конверсии второго. Для данной реакции можно одновременно использовать оба метода, поскольку один из субстратов, глицерин, является в то же время неводным растворителем первого класса.

Это и было нами проделано: мы перешли от воды как среды ферментативной реакции к 95% глицерину. И если в воде, в согласии с расчетом, выход глицерофосфата в катализируемой кислой фосфатазой реакции был практически равен нулю, то в 95% глицерине он составил 35%, что вполне приемлемо для препаративных целей. (В отдельном эксперименте мы показали, что реакции синтеза и гидролиза глицерофосфата в отсутствие фермента ни в воде, ни в 95% глицерине при pH 5 и 25° практически не протекают.)

Сравнение кинетики накопления глицерофосфата при его ферментативном синтезе из глицерина и фосфата (рис. 2, 1) и ферментативного сольволиза β -глицерофосфата (рис. 2, 2) или α -глицерофосфата (рис. 2, 3) указывает на то, что достигаемый уровень глицерофосфата в системе с 95% глицерином является истинно термодинамически равновесным (и не ограничивается, например, инактивацией фермента в водно-органической смеси).

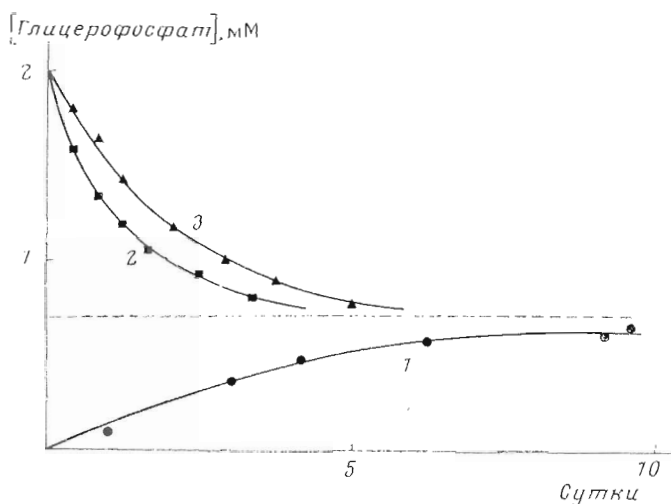


Рис. 2. Кинетические кривые катализируемого кислой фосфатазой в 95% глицерине синтеза глицерофосфата (1) и сольволиза β -глицерофосфата (2) или α -глицерофосфата (3). Пунктирная горизонтальная прямая соответствует равновесной концентрации глицерофосфата в системе

На основании экспериментальных данных, приведенных на рис. 2, можно вычислить константу равновесия для реакции синтеза глицерофосфата из глицерина и фосфата, протекающей в 95% глицерине. Указанная константа оказалась равной $2,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ (при выражении концентрации воды в молярных долях). Полагая, что константа равновесия рассматриваемой реакции практически не зависит от pH, можно сравнить найденную нами константу с константой равновесия для этого процесса в воде, найденной в работе [35]. Такое сопоставление показало, что при переходе от воды как среды реакции к 95% глицерину константа равновесия реакции образования глицерофосфата и воды из глицерина и неорганического фосфата падает в 13 раз.

В результате подбора органического растворителя нам удалось поднять выход глицерофосфата в ферментативном синтезе из глицерина и фосфата с ничтожно малого до препаративного уровня. Этой же цели удалось достичь ранее и другим путем — при переходе от воды к двухфазной водно-органической системе [5]. Эти два подхода являются, по-видимому, общими для ферментативных процессов вообще и могут быть использованы для синтеза многих практически нужных химических соединений.

Экспериментальная часть

В работе использованы: кислая фосфатаза (КФ 3.1.3.2) из проростков пшеницы (Reanal, Венгрия) без очистки, уд. акт. 0,1 мкмоль гидролизуемого *n*-нитрофенилфосфата в 1 мин на 1 мг белка (20°, pH 5,0); субстраты кислой фосфатазы *n*-нитрофенилфосфат (Calbiochem, США), α -глицерофосфат (Fluka, Швейцария), β -глицерофосфат (Koch-Light Labs, Великобритания); органические растворители, неорганические соли и кислоты — препараты «Союзреактив», ос. ч. или ч.д.а.

За скоростью катализируемого кислой фосфатазой сольволиза *n*-нитрофенилфосфата в воде и водно-органических смесях следили по выделению *n*-нитрофенола при 25°. Для этой цели фермент в концентрации 10 мг/мл растворяли в 1 M CH_3COONa (pH 5,0); в таком же буфере отдельно растворяли $2 \cdot 10^{-2}$ M *n*-нитрофенилфосфат. Затем оба раствора добавляли к соответствующей водно-глицериновой смеси так, чтобы конечная концентрация кислой фосфатазы была 0,25 мг/мл, субстрата — $5 \cdot 10^{-4}$ M,

CH_3COONa — 0,05 М. Через определенные промежутки времени из такой реакционной смеси отбирали 1 мл, добавляли к нему 2 мл 0,1 М боратного буфера (рН 9,4) и определяли оптическую плотность при 400 нм с помощью двухлучевого спектрофотометра «Hitachi EPS-3» (Япония). Как нами было специально показано, коэффициент экстинкции *m*-нитрофенолят-иона при 400 нм практически не изменяется в присутствии этанола или глицерина в их концентрации до 30%.

За скоростью катализируемых кислой фосфатазой процессов сольволиза или синтеза субстратов следили также по изменению концентрации неорганического фосфата в системе. Эта методика, основанная на известном методе [36], была аналогична описанной в работе [5]. Чтобы исключить влияние глицерина на определение фосфата, пробы разбавляли так, что конечная концентрация глицерина в них не превышала 12%.

Для обоих методов воспроизводимость измерений была не хуже 10%.

Выражаем благодарность чл.-корр. АН СССР И. В. Березину за постоянный интерес к работе и полезные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry (1976) Jones J. B., Sih C. J., Perlman D., eds., J. Wiley and Sons, N. Y.
2. Singer S. J. (1962) *Advances Protein Chem.*, **17**, 1—68.
3. Tanford C. (1968) *Advances Protein Chem.*, **23**, 121—282.
4. Klibanov A. M., Samokhin G. P., Martinek K., Berezin I. V. (1977) *Biotechnol. and Bioeng.*, **19**, in press.
5. Мартинек К., Клибанов А. М., Самохин Г. П., Семенов А. Н., Березин И. В. (1977) *Биоорганич. химия*, **3**, 696—702.
6. Bettelheim F. A., Lukton A. (1963) *Nature*, **198**, 357—359.
7. Bettelheim F. A., Senatore P. (1964) *J. chim. phys. et phys.-chim. biol.*, **61**, 105—110.
8. Rammner D. H. (1971) in *Dimethyl Sulfoxide* (Jacob S. W., Rosenbaum E. E., Wood D. C., eds.), vol. 1, pp. 189—206, Marcel Dekker, Inc., N. Y.
9. Азизов Ю. М., Зверинская И. Б., Никитина А. Н., Росляков В. Я., Хургин Ю. И. (1968) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, № 12, 2843.
10. Klyosov A. A., Viet N. V., Berezin I. V. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **59**, 3—7.
11. Hutton J. R., Wetmur J. G. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **66**, 942—948.
12. Lachman L. B., Handschumacher R. E. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **73**, 1094—1100.
13. Weetall H. H., Vann W. P. (1976) *Biotechnol. and Bioeng.*, **18**, 105—118.
14. Case S. I., Baker R. F. (1975) *Anal. Biochem.*, **64**, 477—488.
15. Elödi P. (1961) *Acta physiol. Acad. sci. hung.*, **20**, 311—323.
16. Barth T., Jošt K., Rychlík I. (1973) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **38**, 2011—2015.
17. Horvath C. (1974) *Biochim. et biophys. acta*, **358**, 164—177.
18. Inagami T., Sturtevant J. M. (1960) *Biochim. et biophys. acta*, **38**, 64—69.
19. Мосолов В. В., Афанасьев П. В., Долгих М. С., Лушников Е. В. (1968) *Биохимия*, **33**, 1030—1038.
20. Tan K. H., Lovrien R. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 3278—3285.
21. Tanizawa K., Bender M. L. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 2130—2134.
22. Wan H., Horvath C. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **410**, 135—144.
23. Myers J. S., Jakoby W. B. (1973) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **51**, 631—636.
24. Hussain Q. Z., Newcomb T. F. (1963) *Proc. Soc. Exptl Biol. and Med.*, **115**, 301—306.
25. Castaneda-Agullo M., Del Castillo L. M. (1959) *J. Gen. Physiol.*, **42**, 617—634.
26. Bielski B. H. J., Freed S. (1964) *Biochim. et biophys. acta*, **89**, 314—323.
27. Tosa T., Mori T., Chibata I. (1971) *Enzymologia*, **40**, 49—63.
28. Ingalls R. G., Squires R. G., Butler L. G. (1975) *Biotechnol. and Bioeng.*, **17**, 1627—1637.
29. Kauzmann W. (1959) *Advances Protein Chem.*, **14**, 1—63.
30. Ray A. (1971) *Nature*, **231**, 313—314.
31. Tanford C. (1973) *The Hydrophobic Effect*, Wiley-Interscience, N. Y.
32. Tanford C., Buckley C. E., De P. K., Lively E. P. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 1168—1171.

33. Herskovits T. T., Gadegbeku B., Jäillet H. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 2588—2598.
34. Машковский М. Д. (1967) Лекарственные средства, «Медицина», М.
35. Гинодман Л. М. (1954) *Биохимия*, 19, 666—675.
36. Weil-Melherble H., Green K. (1951) *Biochem. Z.*, 49, 286—291.

Поступила в редакцию
26.V.1977

ENZYMATIC REACTIONS IN WATER-ORGANIC MIXTURES: A CRITERION FOR CHOOSING AN OPTIMAL ORGANIC SOLVENT

KLIBANOV A. M., SEMENOV A. N., SAMOKHIN G. P., MARTINEK K.

*A. N. Belozersky Laboratory of Bioorganic Chemistry and Molecular
Biology, M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Based on the concept about the prevailing role of hydrophobic interactions for maintenance of the native structure of proteins and the literature data on micelle formation by surfactants in various solutions, organic solvents were selected in which proteins denaturation should be minimal. These are glycerol, ethylene glycol, aminoethanol, formamide etc. This regularity was supported by the experimental evidence; e. g. glycerol was shown to produce a weaker inactivation effect on acid phosphatase than ethanol or dimethylformamide. If water as a reaction medium is replaced by water-organic mixtures, the degree of the decrease in the rate of the enzymatic process proves to depend on the nature of the substrate (it is the lower, the lower is the reactivity of the substrate in water); for example, in 95% (*v/v*) glycerol the reaction rate of acid phosphatase with *p*-nitrophenylphosphate is 1 per cent of that in water, with β -glycerophosphate 36% and with α -glycerophosphate 74%. The results were used to carry out preparative enzymatic synthesis in a water-organic mixture. It is found that in water (at pH 5; 25° and the reagents concentration 2 mM) the yield of glycerophosphate in the reaction of glycerol and phosphate catalyzed by acid phosphatase is negligibly low ($\sim 0.01\%$) whereas in 95% (*v/v*) glycerol it amounts to 35% (the process has a sufficiently high rate). It is shown that the level of glycerophosphate in the system corresponds to thermodynamic equilibrium.
