

УДК 541.128:577.151.42

## БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ОКИСИ УГЛЕРОДА В ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКОЙ СРЕДЕ

Ф. К. Мухитова\*, М. Н. Давыдова, Е. В. Каширина, Ю. Ф. Зуев, Н. Н. Вылегжанина

(Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН, 420503, Татарстан, Россия,  
Казань, а/я 30)

**Изучено влияние органических растворителей различной природы на ферментативную активность экстрактов клеток *D. desulfuricans* B-1388. Проведено ферментативное восстановление гексена-1 в присутствии различных ПАВ в атмосфере СО/Н<sub>2</sub> – буфер – октан. Показано, что на направление процесса и выход продуктов влияет природа поверхностно-активного вещества. Динамическая структура реакционной среды была охарактеризована с помощью ЯМР-<sup>1</sup>Н и ЭПР-спектроскопии.**

Известно, что ферменты являются активными и высокоселективными катализаторами многих химических реакций, и их использование для целей тонкого органического синтеза весьма перспективно [1, 2]. Однако уникальные свойства ферментов сохраняются, как правило, в водном растворе, в узком диапазоне рН и температур, в то время как термодинамические условия наибольшего выхода продуктов в катализируемой реакции могут не совпадать с условиями сохранения ферментативной активности. Общим решением вопроса может служить равновесный подход, т.е. такой подход, который позволяет увеличить выход целевого продукта в термодинамически неблагоприятной реакции за счет сдвига химического равновесия. С этой целью используют водно-органические среды для перевода водонерастворимых продуктов в органическую фазу и поверхностно-активные вещества для создания условий функционирования ферментов без потери операционной активности [3]. В задачу данного исследо-

вания входило изучение ферментативного восстановления окиси углерода при катализе экстрактами клеток сульфатредуцирующих бактерий в рамках стабильной реакционной системы.

### Методы исследования

В работе использовали бактерию *Desulfo-vibrio desulfuricans* B-1388 из коллекции ВКМ. Экстракты клеток получали в соответствии с методикой [4], СО-дегидрогеназную активность экстрактов клеток определяли, как описано в [4], гидрогеназную активность регистрировали спектрофотометрически по [5]. Для определения влияния органических растворителей экстракты клеток инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с органическим растворителем, а затем определяли СО-дегидрогеназную и гидрогеназную активность. Ферментативный синтез проводили в герметично закрытых пенициллиновых флаконах, предварительно прокачанных

\*Адресат для переписки.

необходимой газовой смесью, куда вводили по 5 мл реакционной смеси, состоящей из 3,5 мл буфера (pH 8,0), 0,5 мл органического растворителя, 0,5 мл соответствующего ПАВ, 0,5 мл экстракта клеток (10–15 мг белка). Реакционную смесь перед началом реакции «озвучивали» с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т (22 кГц, 30 с).

Продукты реакции анализировали методом ГЖХ по [6]. Выход продуктов реакции – углеводов (УВ) и кислородсодержащих соединений (КС) определяли как сумму концентраций отдельных продуктов, умноженную на число атомов углерода в молекуле каждого продукта (это так называемый выход по углероду). Общий выход определяли как сумму УВ и КС.

В работе использовали органические реактивы (*Serva*, Швейцария и *Fluka*, Германия), неорганические соли для приготовления буферных растворов «х.ч.» отечественного производства.

### Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано, что экстракты клеток *Desulfovibrio desulfuricans B-1388* катализируют восстановление окиси углерода молекулярным водородом [7]. Реакция проходит при комнатной температуре в нейтральных буферных растворах. Продуктами реакции являются парафиновые углеводороды от C8 до C24, нерастворимые в воде. Выходы продуктов в этом процессе невысоки, и существенно увеличить их, изменяя физико-химические параметры (температура, давление, концентрации реагентов и пр.) не удастся. Реакционная среда при этом представляет собой сложную гетерогенную двухфазную систему, где одна фаза – газ (окись углерода и водород), другая – жидкость (экстракт клеток сульфатредуцирующих бактерий в буферном растворе). В такой системе кинетика гетерогенной реакции определяется как скоростью самого ферментативного превращения, так и процессами переноса (диффузией), необходимыми для восполнения расхода реагирующих веществ и удаления из реакционной зоны продуктов реакции. При введении органического растворителя, не смешивающегося с водой, но растворяющего парафины, можно вывести продукты из сферы реакции. Необходимым условием при этом является сохранение каталитической активности ферментного комплекса. Определяющим же условием для осуществления процесса является наличие в каталитическом комплексе ферментов, специфичных к окиси углерода и водороду – СО-дегидрогеназы и гидрогеназы соответственно – и являющихся ключевыми в процессах трансформации окислов углерода. Как было показано ранее [8], используемая в экспериментах культура *Desulfovibrio desulfuricans* обладает мощным биохимическим потенциалом и экстракты клеток содержат активные СО-дегидрогеназу и гидрогеназы. Было изучено влияние органических растворителей разной природы, не смешивающихся с водой (хлороформ, четыреххлористый углерод, бензол, диэтиловый эфир, октан) на ферментативную активность экстрактов клеток (табл. 1). Ферментативная (гидрогеназная и СО-дегидрогеназная) активность полностью подавляется в присутствии хлороформа и четыреххлористого углерода и практически

сохраняется в присутствии октана. При проведении ферментативного синтеза в системе (СО + Н<sub>2</sub>) – буферный раствор – октан необходимым становится введение поверхностно-активных веществ, снижающих поверхностное натяжение на границах раздела фаз газ – жидкость и жидкость – жидкость. Кроме того, поверхностно-активные вещества должны стабилизировать ферментную глобулу, обеспечивая сохранность ферментативной активности. При добавлении ПАВ в концентрации более 10% образуются устойчивые эмульсии октана в воде (1:10), время жизни которых составляет несколько недель. При снижении концентрации ПАВ в среде до 0,1% по окончании реакции эмульсию можно разрушить добавлением соли (NaCl) и проанализировать продукты реакции в каждой из фаз методом ГЖХ. Было установлено, что катионогенные ПАВ, содержащие галогенид-ионы в качестве противоионов, например цетилпиридиний бромид, необратимо инактивируют ферментный комплекс экстрактов и не могут быть использованы для стабилизации системы. Было изучено влияние различных ПАВ (табл. 2) на направление и выход ферментативного восстановления в водно-октановой среде неопределенного углеводорода гексена-1 смесью СО – Н<sub>2</sub> (1:1) и чистой окисью углерода. В присутствии диоктилсульфосукцината натрия (АОТ) как в атмосфере 100% СО, так и в атмосфере СО и водорода (1:1) происходит только димеризация гексена в додекан. При этом степень конверсии гексена составляет 20%. В присутствии ПАВ другой природы (неионогенного ПАВ) полиоксиэтиленсорбитана моноолеата (Твин-80) направление реакции становится совершенно иным. Происходит восстановительное карбонилирование гексена, а также синтезируются насыщенные углеводороды, степень конверсии гексена в этом случае существенно выше (более 40%), содержание насыщенных углеводородов, построенных, по-видимому, за счет гомологизации гексена, в продуктах реакции составляет 53,2%. Немного меньшую долю (42,2%) составляют карбонильные соединения – продукты присоединения окиси углерода по двойной связи гексена. Кроме того, происходит гидрирование гексена в гексан, доля гексана составляет 4,6%.

Направление ферментативного процесса, очевидно, зависит не только от природы, но и от строения ПАВ. Нами было показано, что в ряду аналогичных ПАВ (Tween-20, Tween-65, Tween-80, Tween-85) отличаются не только степень конверсии субстрата, но и выход продуктов. Можно

Т а б л и ц а 1

### Влияние органических растворителей на ферментативную активность экстрактов клеток *D. desulfuricans* um. B-1388

Условия опыта	СО–ДГ-активность, %	ГГ-активность, %
Без растворителя	100	100
Хлороформ	0	0
Четыреххлористый углерод	0	0
Бензол	90	90
Диэтиловый эфир	80	85
Октан	100	100

Т а б л и ц а 2

## Общий выход и состав продуктов ферментативного восстановления гексена-1

ПАВ	Степень конверсии гексена-1, %	Общий выход, %			
		УВ	КС	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>
АОТ	20,0	–	–	–	100
Tween-20	42,8	47,8	50,0	2,2	–
Tween-65	42,2	49,1	46,6	4,3	–
Tween-80	40,0	53,2	42,2	4,6	–
Tween-85	42,7	63,9	31,7	4,4	–

УВ – углеводороды, КС – кислородсодержащие продукты карбонилирования гексена.

предположить, что строение и размеры углеводородного радикала в молекуле ПАВ определяют форму и подвижность ассоциатов ПАВ с органической компонентой реакционной среды, а это, в свою очередь, влияет на активность ферментного комплекса и определяет в конечном итоге направление и эффективность процесса. Динамическая структура реакционной среды на примере системы Tween-80 – октан – вода была охарактеризована с помощью физических методов (<sup>1</sup>H ЯМР с Фурье-преобразованием импульсным градиентом магнитного поля и ЭПР). Коэффициенты самодиффузии, полученные для всех компонент реакционной среды, позволили предположить для нее следующую наиболее вероятную структурную модель. Органические компоненты смеси (гексен и октан) существуют в виде микрокапель с радиусом в не-

сколько сотен ангстрем, окруженных монослоем ПАВ (Tween-80). Эти микрокапли суспендированы в водной среде. Данные ЭПР, полученные с использованием 7-доксил-стеариновых кислот в качестве парамагнитного зонда, не противоречат предложенной структуре реакционной среды. Спектры ЭПР имеют пятикомпонентную форму, что свидетельствует об ограниченной подвижности молекулы 7-доксил-стеариновой кислоты. Этот факт свидетельствует о плотности упаковки молекул ПАВ в монослое, окружающем микрокапли, куда встраиваются парамагнитные зонды. Дальнейшее моделирование реакционной среды для ферментативной конверсии СО будет продолжено в направлении поиска оптимальных ПАВ, органической фазы, условий проведения синтеза, а также изучения динамической структуры системы.

Данная работа была поддержана РФФИ. Проект № 99-03-32036.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гладылин А.К., Левашов А.В. // Успехи биол. химии. 1996. **36**. С. 141.
2. Klibanov A.M. // Accounts Chem. Res. 1990. **23**. P. 114.
3. Хмельницкий Ю.Л., Левашов А.В., Клячко Н.Л., Мартинек К. // Биотехнология. 1988. **4**. С. 292.
4. Тарасова Н.Б., Мухитова Ф.К., Рязанцева И.Н., Беляева М.И. // Биохимия. 1985. **50**. С. 454.
5. Кияшко С.В., Мухитова Ф.К., Рябцева О.А. // Биохимия. 1994. **59**. С. 220.
6. Беляева М.И., Мухитова Ф.К., Золотухина Л.М., Багаева Т.В., Карпилова И.Ю. // Микробиология. 1992. **61**. С. 194.
7. Lapidus A.L., Grobovenko S.Y., Mukhitova F.K., Kiyashko S.V. // J. Mol. Cat. 1989. **56**. P. 260.
8. Мухитова Ф.К., Кияшко С.В., Лapidус А.Л. // Прикл. биохим. микробиол. 1999. **35**. С. 308.

Поступила в редакцию 20.06.00