Том (А) XII ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ 1970 № 1

УДК 541.64:678.6

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМЕРНЫЕ АНАЛОГИ ФЕРМЕНТОВ, ОБЛАДАЮЩИЕ ЭСТЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Ю. Э. Кирш, С. К. Плужнов, Т. С. Шомина, В. А. Кабанов, В. А. Каргин

Ранее сообщалось [1, 2], что поли-4-винилпиридины (поли-4-ВП), частично алкилированные 2-(2′-хлорэтил)пиридином или бензилхлоридом, проявляют высокую каталитическую активность при гидролизе сложноэфирной связи, на 2,5—3,5 порядка превосходящую каталитическую активность низкомолекулярных аналогов.

Мы объяснили это возникновением в макромолекулярных клубках полимерных катализаторов (ПК) — локальных полостей, каждая из которых включает нуклеофил (неалкилированное пиридиновое кольцо) и окружена гидрофобными группами, обладающими повышенным сродством к субстрату.

В настоящем сообщении приведены результаты детальных исследований закономерностей механизма действия ПК подобного типа, содержащих заместители различного строения: метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, изоамил. Некоторые из этих заместителей, как известно, входят в состав α-аминокислот (валина, аланина, лейцина) и часто располагаются в непосредственной близости от активных групп ферментов.

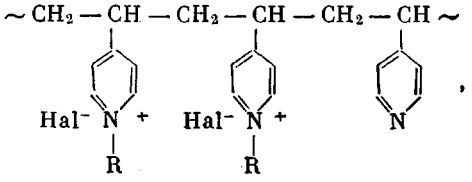
Экспериментальная часть

4-Винилпиридин (4-ВП) перегоняли на колонке высотой 40 *см*, т. кип. 65°/15 *мм*, n_D^{20} 1,5520. Метанол и нитрометан сушили BaO и перегоняли при 65 и 101° соответственно. Очистку алкилгалогенидов осуществляли на хроматографической окиси алюминия; использованные алкилгалогениды имели следующие значения n_D^{20}: метилиодид 1,5293; этилбромид 1,4239; пропилбромид 1,4341; изопропилбромид 1,4285; бутилбромид 1,4398; изобутилбромид 1,4351; изоамилбромид 1,4433; бензилхлорид 1,5415.

Поли-4-ВП получали радикальной полимеризацией 4-ВП в нитрометане с 40%-ной концентрацией мономера в отсутствие воздуха при 60° с использованием в качестве инициатора азоизобутиронитрила. Путем изменения концентрации инициатора были получены поли-4-ВП с различными значениями средних молекулярных весов. Фракционирование поли-4-ВП производили дробным осаждением при комнатной температуре, растворитель — метанол, осадитель — этилацетат. Молекулярные веса определяли вискозиметрически в 92%-ном этаноле [3].

Алкилирование проводили в смеси нитрометана с метанолом (10 : 1) при 60—70° в течение 30—100 час. в запаянных ампулах. В тех случаях, когда использовали бензилхлорид, реакционную смесь предварительно вымораживали в вакууме 10^{-3}—10^{-4} *мм*.

Строение продукта неполного алкилирования поли-4-ВП можно представить следующей формулой:

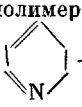


где R — CH_3 — [сополимер 4-винил-N-метилпиридиний иодида с 4-винилпиридином (ПВ-метил-П)], C_2H_5 — [сополимер 4-винил-N-этилпиридиний бромида с 4-винилпиридином (ПВ-этил-П-)], *н*-C_3H_7 — [сополимер 4-винил-N-пропилпиридиний бромида с 4-винилпиридином (ПВ-пропил-П)], *изо*-C_3H_7 — [сополимер 4-винил-N-изопропилпиридиний бромида с 4-винилпиридином (ПВ-изопропил-П)], *н*-C_4H_9 — [сополимер 4-винил-N-бутилпиридиний бромида с 4-винилпиридином (ПВ-бутил-П)], втор.-C_4H_9 — [сополимер 4-винил-N-изобутилпиридиний бромида с 4-винилпиридином (ПВ-изобутил-П)],

Таблица 1

Значения ε_2 в воде при $\lambda = 257$ *ммк*

Полимерная четвертичная соль 4-винилпиридина и галоидного соединения	ε_2, *моль*$^{-1}\cdot$*см*$^{-1}$	Полимерная четвертичная соль 4-винилпиридина и галоидного соединения	ε_2, *моль*$^{-1}\cdot$*см*$^{-1}$
Метилиодид	4300	Бутилбромид	4800
Этилбромид	3550	Изобутилбромид	4200
Пропилбромид	3300	Изоамилбромид	3700
Изопропилбромид	3000	Бензилхлорид	5200

втор.-C_5H_{10} — [сополимер 4-винил-N-изоамилпиридиний бромида с 4-винилпиридином (ПВ-изоамил-П)], C_6H_5 — CH_2 — [сополимер 4-винил-N-бензилпиридиний хлорида с 4-винилпиридином (ПВ-бензил-П)],  — CH_2 — CH_2 — {сополимер-4-винил-N-2-(2′-пиридил)этилпиридиний хлорида с 4-винилпиридином [ПВ-(пиридил)этил-П]}.

Полностью замещенные четвертичные полимерные соли синтезировали по способу, предложенному ранее [4]. Относительное содержание непрореагировавших пиридиновых колец определяли сравнением УФ-спектров сополимеров в нейтральном и сильнокислом водных растворах. Определение основано на различии коэффициентов экстинкции протонированных и непротонированных поливинилпиридиновых звеньев при 257 *мк* (последний в 2,4 раза ниже) [5, 6]. Расчет проводили по формуле

$$\alpha,\ \% = \frac{(D_2 - D_1)\cdot\varepsilon_2\cdot 100}{\varepsilon_1(2{,}4\cdot D_1 - D_2) + \varepsilon_2(D_2 - D_1)},$$

где D_1 и D_2 — оптические плотности сополимеров в нейтральном и кислом растворах, $\varepsilon_1 = 1400$ *л·моль*$^{-1}\cdot$*см*$^{-1}$ и ε_2 (табл. 1) — соответственно коэффициенты экстинкции поли-4-ВП (в 50%-ном водном метаноле) и полностью алкилированного полимера в воде.

Таблица 2

Элементарный анализ

Субстраты	Брутто-формула	Вычислено, %		Найдено, %	
		C	H	C	H
НФТМА	$C_{11}H_{13}O_4$	59,3	5,83	58,0	5,20
НФБ	$C_8H_7O_4$	53,0	3,86	54,5	3,55
НФЦ	$C_{15}H_{11}O_4$	67,0	4,08	66,3	3,88

п-Нитрофенилацетат (НФА) получали из *п*-нитрофенола и уксусного ангидрида по обычной методике; т. пл. 75—78°. *п*-Нитрофенилтриметилацетат (НФТМА), *п*-нитрофенилбензоат (НФБ) и *п*-нитрофенилциннамат (НФЦ) синтезировали из *п*-нитрофенола и хлорангидридов триметилуксусной, бензойной и коричной кислот в пиридине (табл. 2).

Гидролиз субстратов изучали в водном растворе полимерного катализатора (ПК) в присутствии 10^{-2} *М* буфера из *трис*-(оксиметил)аминометана (ТРИС) и HCl. Ионную силу раствора (10^{-2} *М*) поддерживали NaCl. Субстраты в реакционную систему вводили в виде растворов в ацетонитриле. Общая концентрация ацетонитрила составляла обычно 0,2—0,5 об.%.

Скорость гидролиза определяли по выделению *п*-нитрофенола, за образованием которого следили по нарастанию оптической плотности раствора при $\lambda = 400$ *ммк*, если опыты проводили в области pH = 7 и выше, или при $\lambda = 320$ *ммк*, если опыты проводили при pH ниже 7. Оптическую плотность измеряли с помощью двухлучевого спектрофотометра Hitachi EPS-03 с использованием для сравнения соответствующего

раствора субстрата, не содержащего катализатора. Кюветы термостатировали с точностью ±0,1°. Для определения термодинамических характеристик ПК опыты проводили в области температур от 5 до 35°.

Определение приведенной вязкости растворов исходных поли-4-ВП в 92%-ном этаноле проводили в вискозиметре Уббелоде при 25 ± 0,05°. В некоторых случаях представляли интерес значения вязкостей водных растворов алкилированных поли-4-ВП в области концентраций, близких к тем, которые использовали при кинетических измерениях. Типичные результаты измерений вязкости растворов ПВ-бензил-П с разным содержанием неалкилированных пиридинов (молекулярный вес исходного поли-4-ВП 250 000) приведены ниже τ_{H_2O} = 148 ± 0,1 сек.):

α, %	13,5		12,3		11,7		11,0	
c, *г/дл*	0,0079	0,00395	0,0102	0,0051	0,0108	0,0054	0,0075	0,00375
Время истечения раствора τ, сек.	177,0	161,7	172,3	161,5	163,0	157,4	174,4	160,0
	176,6	161,6	172,5	161,6	163,5	157,2	174,5	160,1
	176,8	—	172,4	—	—	157,3	—	160,0
$\tau_{ср}$, сек.	176,7	161,6	172,4	161,6	163,3	157,3	174,4	160,0
$\tau_{ср} - \tau_{H_2O}$, сек.	28,7	13,6	24,4	13,6	15,3	9,3	26,4	12,0
$\frac{\eta_{уд}}{c}$, *дл/г*	24,6	23,5	16,0	18,0	9,6	11,5	24,0	21,6

Видно, что различия во временах истечения существенно превышают ошибки измерения. Следовательно, наблюдаемые вариации в $\eta_{уд}/c$ лежат за пределом ошибок опыта.

Результаты и их обсуждение

Общие кинетические закономерности. На рис. 1 изображены типичные экспериментальные кинетические кривые гидролиза НФА при 25° в присутствии ПВ-бутил-П, ПВ-изобутил-П, ПВ-изоамил-П, ПВ-бензил-П, ПВ-этил-П, ПВ-изопропил-П, ПВ-пропил-П. Для сравнения

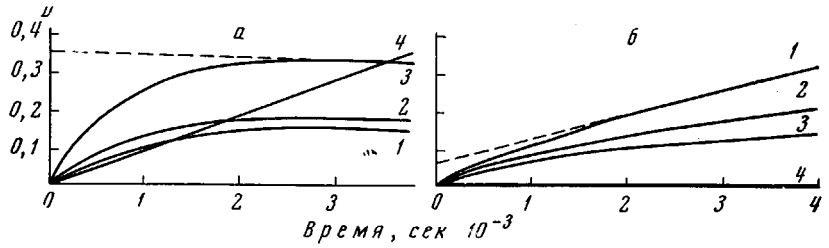


Рис. 1. Кинетические кривые гидролиза *п*-нитрофенилацетата (НФА) полимерными катализаторами (ПК). Условия реакции: 25°, pH = 8,0; концентрация буфера ТРИС—HCl 10^{-2} *моль/л*, ионная сила 10^{-2} *моль/л*, [ацетонитрил] — 0,2 об.%, [НФА] — $4{,}6 \cdot 10^{-5}$ (*а*) и $2 \cdot 10^{-4}$ (*б*) *моль/л*, кювета 4 *см*:

а: *1* — ПВ-бутил-П, α = 27,3%; *2* — ПВ-изобутил-П, α = 16,2%; *3* — ПВ-изоамил-П, α = 13,1%; *4* — 4-этилпиридин (4-ЭП); *б*: *1* — ПВ-этил-П, α = 5,3%; *2* — ПВ-пропил-П, α = 9,0%; *3* — ПВ-изопропил-П, α = 10,0%; *4* — ПВ-метил-П, α = 4,0%. Концентрации ПК (*осново-моль/л* · 10^{-4}): *а*: *1* — 6,8; *2* — 4,5; *3* — 4,3; *4* — 36; *б*: *1* — 3,7; *2* — 6,2; *3* — 6,2; *4* — 7,0

приведена кинетическая кривая гидролиза НФА в присутствии 4-этилпиридина (4-ЭП). Оказалось, что при определенных степенях алкилирования, меньших 100%, сополимеры обладают исключительно высокой каталитической активностью. Исчерпывающе алкилированные полимеры, а также полимеры, частично алкилированные метилиодидом, практически не активны.

Изученные ПК по их кинетическому поведению в условиях гидролиза при 25° можно разделить на две группы.

К первой группе относятся ПВ-бутил-П, ПВ-изобутил-П, ПВ-изоамил-П. Для них характерно прекращение реакции задолго до исчерпания субстрата, что указывает на «отравление» каталитических центров в ходе реакции. Такая кинетика, как известно, отличает ферментативные процессы, при которых активные центры прочно блокируются одним из

продуктов реакции, и описывается следующей схемой:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} ES' + P, \qquad (1)$$

где E — активный центр катализатора, S — субстрат, ES — комплекс активного центра с субстратом, обратимо образующийся и распадающийся с константами скоростей k_1 и k_{-1} соответственно; P — один из продуктов гидролиза (*п*-нитрофенол), образующийся с константой скорости k_2.

Термин «катализ» неприменим к процессу, описываемому схемой (1), так как в ходе реакции активные центры не регенерируются, а это по определению должно быть присуще всякому каталитическому процессу. Однако мы будем все же условно пользоваться этим термином, ибо механизм реакции (I) совершенно аналогичен механизму истинного каталитического процесса за вычетом последней стадии.

Уравнение, описывающее кинетические кривые, получается из схемы (1) в стационарном приближении при условии, что начальная концентрация субстрата $[S]_0$ гораздо выше начальной концентрации активных центров $[E]_0$, и может быть записано в виде

$$\ln \frac{[E]_0}{[E]_0 - [P]} = k't, \qquad (2)$$

где

$$k' = \frac{k_2 [S]_0}{K_M + [S]_0} \qquad (3)$$

Выражение (3) — это уравнение Михаэлиса — Ментен, а K_M — константа Михаэлиса, практически характеризующая способность катализатора связывать субстрат

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

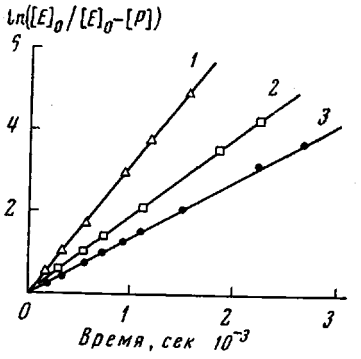


Рис. 2. Кинетические кривые гидролиза НФА, построенные в координатах уравнения первого порядка:

1 — ПВ-изобутил-П, $\alpha = 24{,}4\%$, $7{,}0 \cdot 10^{-4}$ *моль/л*; *2* — ПВ-бутил-П, $\alpha = 14{,}3\%$, $7{,}5 \cdot 10^{-4}$ *моль/л*; *3* — ПВ-изоамил-П, $\alpha = 13{,}1\%$, $4{,}3 \cdot 10^{-3}$ *моль/л*; $[НФА] \cdot 10^{-4}$ *моль/л*: *1* — 1,8; *2* — 1,3; *3* — 0,46. Здесь и на рис. 3, 4 условия реакции приведены в подписи к рис. 1

На рис. 2 приведены кинетические кривые гидролиза НФА для разных ПК, спрямленные в координатах уравнения (2), а на рис. 3, *а* — зависимость величин k', вычисленных по данным рис. 2, от начальной концентрации субстрата. В соответствии с уравнением Михаэлиса — Ментен k' стремится к пределу при высоких значениях $[S]_0$, что соответствует насыщению активных центров субстратом. Количественное подчинение этой зависимости уравнению (3) демонстрируется прямыми рис. 3, *в*, построенными в координатах Лайнуивера — Берка $1 / k' - 1 / [S]_0$ [7].

Из уравнения (2) следует, что начальная концентрация активных центров равна предельной концентрации выделившегося *п*-нитрофенола $[P]_\infty$. Определив из кинетических кривых (рис. 1) $[P]_\infty$ и зная концентрацию ПК в *моль/л*, можно подсчитать долю звеньев ПК (γ), которые образуют активные центры. Из спектрофотометрических измерений получаем общую концентрацию неалкилированных пиридинов в полимере (α). Отношение γ к α показывает, какая доля (ν) от общего числа неалкилированных пиридинов, присутствующих в ПК, образует активные центры. Эта величина может служить характеристикой каталитической эффективности ПК.

В табл. 3 приведены константы k_2 и K_M и значения каталитической эффективности ν ПК первой группы для некоторых α. В таблице также приведена константа скорости второго порядка в присутствии 4-ЭП.

Из табл. 3 видно, что неалкилированное пиридиновое звено в ПК первой группы более чем на три порядка активнее низкомолекулярного аналога — 4-этилпиридина. В то же время оказалось, что не все неалкилированные пиридиновые кольца, присутствующие в ПК, участвуют в образовании активных центров ($\nu < 100\%$).

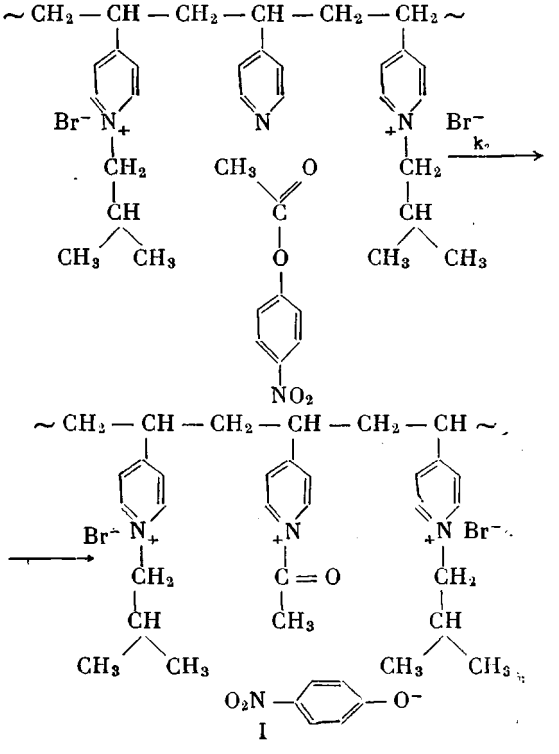
Таблица 3

Величины k_2, K_M и ν для ПК первой группы *

ПК	α, %	ν, %	$k_2 \cdot 10^3$, *сек*$^{-1}$	$K_M \cdot 10^4$, *моль/л*	$k'' = k_2/K_M$, *л·моль · сек*$^{-1}$
ПВ-бутил-П	14,3	6	5,5	3,1	17,8
	23,1	7,8	11,0	4,0	27,5
	27,3	1,8	5,6	3,1	18,0
	67,6	0,7	6,0	2,9	20,5
ПВ-изобутил-П	16,2	5,7	5,5	2,5	22,0
	24,4	9,6	5,2	1,0	52,0
	27,5	11,1	11,0	4,0	27,5
	29,2	6,9	11,0	4,0	27,5
ПВ-изоамил-П	13,1	15,4	5,5	1,6	34,5
	23,4	13,2	17,0	6,5	26,0
	30,7	16,7	16,0	2,5	64,0
4-этилпиридин	—	—	—	—	$1{,}6 \cdot 10^{-2}$

* Условия гидролиза: pH = 8,0; 25°; [ТРИС] — 10^{-2} *моль/л*; μ — 10^{-2} *моль/л*; [ацетонитрил] — 0,2—0,5 об. %. Ошибка в измерении K_M и $k_2 \pm 5\%$, а в определении $\alpha \pm 1\%$. Молекулярный вес нефракционированного поли-4-ВП — 50000. Значение для 4-ЭП близко к данным [8].

Причиной поразительно высокой каталитической активности ПК по сравнению с 4-ЭП может быть возникновение в макромолекулярном клубке ПК активных полостей, образованных гидрофобными заместителями первой группы. Молекулы субстрата благодаря гидрофобному взаимодействию экстрагируются в активные полости и быстро претерпевают каталитическое превращение в соответствии с реакцией (I):



I

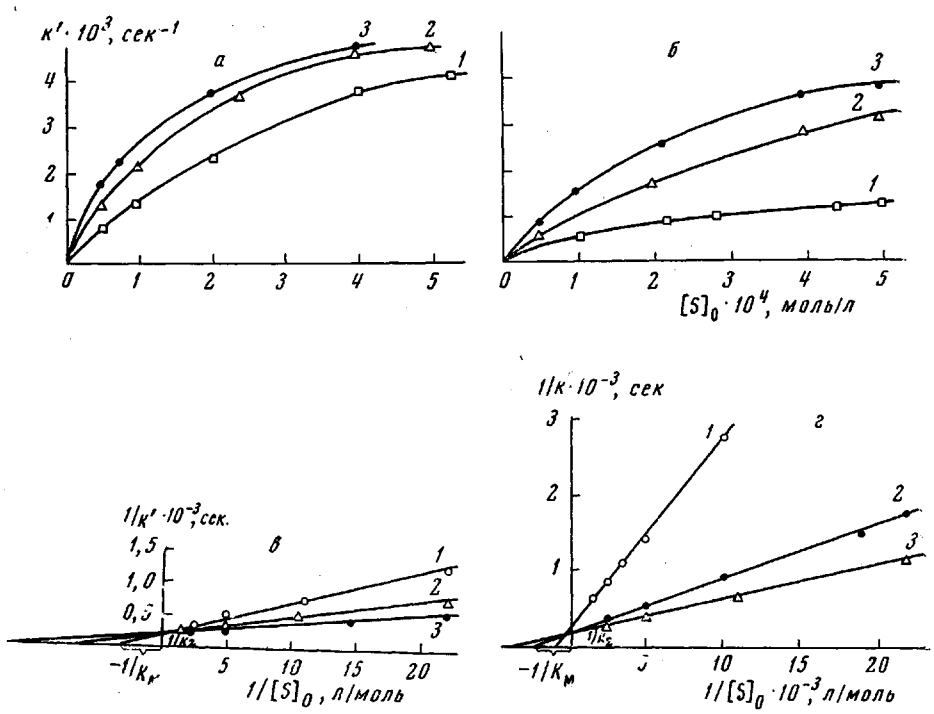
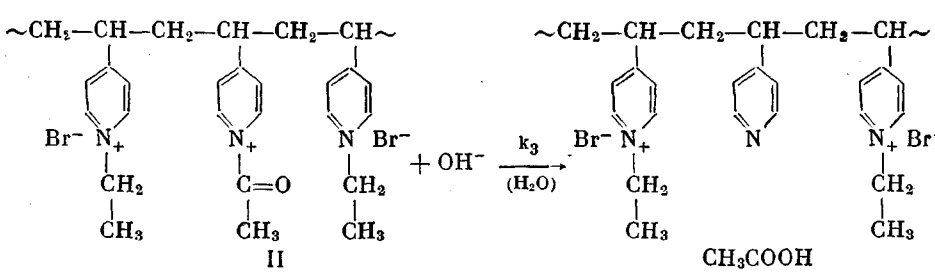


Рис. 3. Зависимость эффективной константы скорости ($k' = v_0 / [E]_0$) от концентрации субстрата $[S]_0$ в обычных координатах (*а*, *б*) и в координатах Лайнуивера — Бэрка (*в*, *г*) в присутствии различных ПК:

а, *в*: *1* — ПВ-бутил-П, α = 27,8; *2* — ПВ-изоамил-П, α = 13,1%; *3* — ПВ-изобутил-П, α = 24,4%; *б*, *г*: *1* — ПВ-этил-П, α = 5,3%; *2* — ПВ-пропил-П, α = 7,0%; *3* — ПВ-изопропил-П, α = 10,0%

Ингибирование ПК в данном случае, вероятно, происходит потому, что молекулы воды не могут проникнуть к образовавшемуся N-ацетилпиридинию [9], окруженному объемными гидрофобными радикалами, и осуществить его гидролиз, который необходим для регенерации активного центра.

В случае катализаторов второй группы, в которых нуклеофилы окружены этильными, пропильными, изопропильными или бензильными радикалами, молекулы воды в указанных условиях, по-видимому, достигают N-ацилированных центров и реагируют с ними по реакции (II)



поэтому ингибирование не наблюдается. Гидролиз НФА в присутствии ПВ-этил-П, ПВ-пропил-П, ПВ-изопропил-П или ПВ-бензил-П характеризуется относительно быстрой начальной стадией. Вслед за ней устанавливается постоянная стационарная скорость выделения нитрофенола. Иными словами, на кинетических кривых гидролиза обнаруживается два участка: предстационарный и стационарный. Такая кинетика, как известно, характерна для ряда ферментативных реакций, в частности, для гидроли-

за сложных эфиров в присутствии α-химотрипсина [10]:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \overset{k_2}{\rightarrow} ES' + P \overset{k_3}{\rightarrow} E + P + P', \qquad (4)$$

где ES — комплекс активного центра с субстратом, ES' — ацетилполимер, P и P' — продукты реакции: спирт и кислота. Процесс, описываемый схемой (4), в отличие от процесса (1), может быть определен как катализ.

Обработка реакции (4) в предположении о стационарности по ES для случая, когда $[S]_0 \gg [E]_0$, приводит к следующему уравнению, описывающему накопление P (n-нитрофенола):

$$[P] = \frac{k'[E]_0}{k' + k_3}\left\{k_3 t + \frac{k'}{k + k_3}(1 - e^{-(k'+k_3)t})\right\}, \qquad (5)$$

где $k' = \frac{k_2[S]_0}{[S]_0 + K_M}$, $K_M = \frac{k_1 + k_2}{k_1}$ (константа Михаэлиса), $[S]_0$ и $[E]_0$ — начальные концентрации субстрата (НФА) и активных центров соответственно. Можно показать, что начальная скорость

$$\left(\frac{d[P]}{dt}\right)_{t \to 0} = k'[E]_0 \qquad (6)$$

При больших t

$$P = \frac{k'[E]_0 k_3}{k' + k_3} t + \frac{k^2[E]_0}{(k' + k_3)^2} \qquad (7)$$

Из экспериментальной кинетической кривой, пользуясь уравнениями (6) и (7), можно найти $[E]_0$, k_3 и k'. Далее, определив значения k' из кинетических кривых для разных $[S]_0$ (рис. 3, *б*), построив зависимость $1/k'$ от $1/[S]_0$ (рис. 3, *г*), находим величины k_2 и K_M. Результаты измерений сведены в табл. 4.

Примечательно, что в присутствии ПК второй группы происходят все три стадии гидролиза, характерные для ферментов.

Таблица 4

Величины k_2, K_M и ν для ПК второй группы *

ПК	α, %	ν, %	$k_2 \cdot 10^3$, *сек*$^{-1}$	$K_M \cdot 10^4$, *моль/л*	$k'' = \frac{k'}{K_M}$, *л·моль · сек*$^{-1}$	$k_3 \cdot 10^4$, *сек*$^{-1}$
ПВ-этил-П	5,3	40,0	5,0	11,0	4.5	3,2
	10,0	5,4	2,8	1,6	17.5	1,5
	12,2	1,7	5,0	11,0	4,5	3,2
	15,0	40,0	5,0	11,0	4.5	3,2
ПВ-пропил-П	7,0	6,0	5,5	4,5	12.2	3,2
	9,0	2,0	3,6	3,1	11 6	3,2
	11,2	1,4	5,5	3,0	18 4	3,2
	17,0	15,0	11,0	3,4	32,0	3,2
ПВ-изопропил-П	10,0	8,3	5,2	2,9	18,0	1,3
	24,2	2,7	5,5	2,2	25,0	1,3
	26,0	15,2	5,0	4,5	12 2	1,3
ПВ-бензил-П **	4,0	50	1,6	2,2	7,3	4,0

* Условия гидролиза приведены в табл. 3. Ошибка в измерении $k_3 \pm 10\%$. Молекулярный вес нефракционного поли-4-ВП — 50 000.

** Молекулярный вес нефракционированного поли-4-ВП — 20 000.

Основность активных центров. Для выяснения природы центров ПК, ответственных за катализ, важно знать их константы основности (кислотности). С этой целью была изучена кинетика гидролиза НФА в присутствии представителей ПК первой (ПВ-изоамил-П, α 23,4%) и второй (ПВ-этил-П, α 5,3%) групп в широком интервале pH. Из рис. 4 вид-

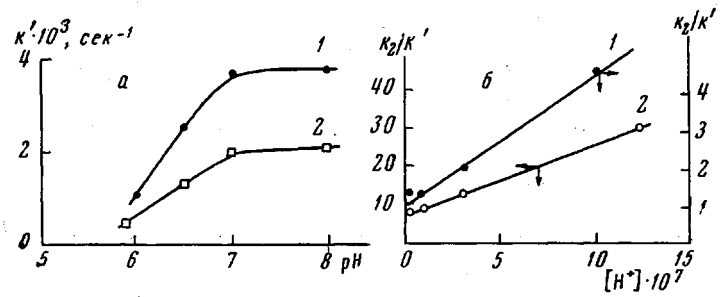


Рис. 4. Зависимость эффективной скорости k' от pH (*а*) и k_2 / k' от концентрации ионов водорода $[H^+]$ (*б*) для ПК:

1 — ПВ-этил-П, α = 5,3%, $6{,}6 \cdot 10^{-4}$ *моль/л*; *2* — ПВ-изоамил-П, α = 23,4%, $6{,}3 \cdot 10^{-4}$ *моль/л*; [НФА] = $9{,}7 \cdot 10^{-5}$ *моль/л*

но, что при уменьшении pH скорость гидролиза сильно понижается. Наблюдаемый эффект можно объяснить блокированием нуклеофильных активных центров ПК ионами водорода. Чтобы учесть это явление количественно, приведенные кинетические схемы необходимо дополнить, включив в них стадию обратимого протонирования активного центра и комплекса Михаэлиса:

$$EH^+ \overset{K_a}{\rightleftarrows} E + H^+ \quad ESH^+ \overset{K_a'}{\rightleftarrows} ES + H^+ \tag{8}$$

Решение системы кинетических уравнений в предположении, что константы диссоциации функциональной группы активного центра ПК и комплекса активного центра с субстратом мало отличаются по величине (для ряда ферментов $pK_a \simeq pK_a'$ [11]), приводит к выражению (9):

$$k' = \frac{k_2 [S]_0}{(K_M + [S]_0)\left(1 + \frac{[H^+]}{K_a}\right)}$$

$$\text{или} \quad \frac{k_2}{k'} = \frac{K_M}{[S]_0} + 1 + \frac{[H^+]}{K_a}\left(\frac{K_M}{[S]_0} + 1\right) \tag{9}$$

Определив k' при различных pH (рис. 4, *а*) и строя зависимость k_2 / k' от $[H^+]$ (рис. 4, *б*), находим pK_a активных центров. Полученные значения приведены в табл. 5.

Таблица 5

Значения pK_a активных центров

Катализатор	α, %	ν, %	pK_a
ПВ-этил-П	5,3	40,0	6,3
ПВ-изоамил-П	23,4	13,2	5,6
ПВ-бензил-П	4,0	50,0	6,07 [1]
ПВ-(пиридил)-этил-П	4,0	37,0	6,5 [2]
4-этилпиридин	—	—	6,02 [12]

Как видно, pK_a активных центров близки к pK_a 4-ЭП, хотя и несколько зависят от строения заместителей, окружающих нуклеофил. Существенно отметить, что это относится и к ПВ-(пиридил)-этил-П, в макромолекуле которого кроме неалкилированных пиридиновых колец содержится значительное число пиридинов, входящих в состав заместителей. Спектрофотометрическое титрование ПВ-(пиридил)-этил-П показывает, что

Таблица 6

Состав синтезированных сополимеров и их коэффициенты полимеризации

Молекулярный вес исходного поли-4-ВП	Коэффициент полимеризации, $\bar{P}$	α незамещенных пиридинов в синтезированных сополимерах, мол. %													
~4 000	~39	15	4	2,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
34 000	320	55	37	25,5	13,0	8,0	6,7	5,8	3,7	—	—	—	—	—	—
45 500	430	30	11	8,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
250 000	2400	69	60	54	52	48	31	26	17	13,5	12,3	11,7	11,0	9,0	8,0

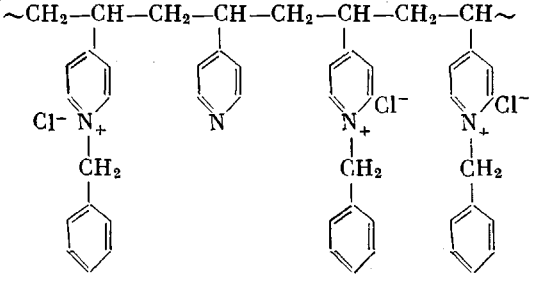
pK_a этих групп, связанных с полимерной цепью, лежит значительно ниже (3,78, по данным [2]). Следовательно, во всех случаях активные центры ПК образуются с участием неалкилированных пиридиновых колец основной цепи, окруженных гидрофобными радикалами.

Влияние формы макромолекул и молекулярного веса ПК. Все приведенные выше результаты относятся к ПК, полученным из нефракционированного поли-4-ВП со средним молекулярным весом 50 000, характеризующимся относительно широким молекулярно-весовым распределением. Естественно было предположить, что длина макромолекул ПК может влиять на их кинетическое поведение.

Поэтому дальнейшие исследования проводили с использованием ПК, приготовленных путем алкилирования предварительно фракционированных препаратов поли-4-ВП. Каждую из фракций обрабатывали в течение определенного времени бензилхлоридом до достижения требуемой степени алкилирования. Сополимеры с низким молекулярным весом ($\bar{P} \simeq 39$) приготовляли, несколько изменив методику [13], специфической полимеризацией 4-ВП в метаноле в присутствии бензилхлорида и различных количеств HCl.

В результате был получен ряд сополимеров с разным содержанием незамещенных пиридиновых колец, т. е. различающихся значениями α (табл. 6).

Строение сополимеров можно представить общей формулой:



Путем кинетических измерений для каждого из сополимеров были найдены значения каталитической эффективности ν. Зависимости ν от α приведены на рис. 5. Обращает внимание ярко выраженный экстремальный характер этих зависимостей. Для каждой фракции при некотором опреде-

ленном α, зависящем от коэффициента полимеризации, наблюдается острый максимум каталитической активности. Другими словами, каждому молекулярному весу свойственна некоторая критическая величина $\alpha_{кр}$, которой соответствует оптимум каталитической эффективности сополимеров. Чем выше коэффициент полимеризации исходного поли-4-ВП, тем больше $\alpha_{кр}$.

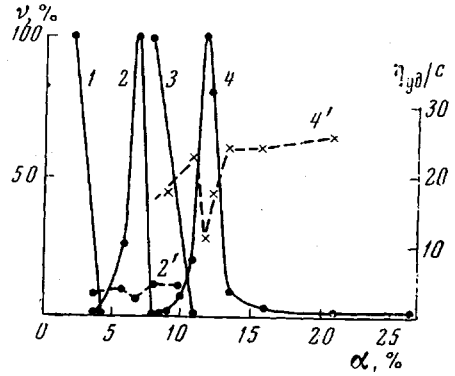


Рис. 5. Зависимость каталитической эффективности ν сополимеров ПВ-бензил-П от относительного содержания неалкилированных пиридиновых колец α для исходного поли-4-ВП с молекулярным весом 4000 (*1*), 34 000 (*2*), 45 500 (*3*) и 250 000 (*4*). Пунктиром (кривые *2'* и *4'*) показаны зависимости приведенной вязкости соответствующих фракций ПК от α

Для выяснения природы этого удивительного явления была изучена зависимость приведенной вязкости фракции поли-4-ВП от α. Определение приведенной вязкости водного раствора в отсутствие соли проводили с концентрацией полимера, близкой к концентрации, используемой при кинетических измерениях. Полученные результаты представлены на рис. 6. Видно, что с изменением α вязкость меняется немонотонно. Вначале с повышением степени алкилирования она растет. Это указывает на увеличение размеров макромолекулярных клубков, по-видимому, обусловленное повышением гидрофильности макромолекулы и появлением в цепи положительных зарядов. Однако при дальнейшем накоплении в макромолекуле бензильных заместителей наблюдается падение вязкости, которое свидетельствует о том, что увеличивается роль взаимодействий, оказывающих противоположный эффект на размеры макромолекулярных клубков. По всей вероятности, это гидрофобные взаимодействия бензильных групп. При сопоставлении зависимостей каталитической эффективности ν и приведенной водности от α видно (рис. 5 и 6), что острый максимум каталитической эффективности совпадает с острым минимумом приведенной вязкости. Причина столь резких переходов при малых вариациях α пока не ясна. Однако совершенно очевидно, что оптимальные условия для осуществления каталитического действия неалкилированных пиридиновых колец (т. е. для образования активных гидрофобных полостей) создаются при определенных оптимальных конформациях макромолекулярных клубков, которые возникают при достижении $\alpha_{кр}$. Каждому коэффициенту полимеризации соответствует свое значение $\alpha_{кр}$. При достижении $\alpha_{кр}$ практически все незамещенные пиридиновые кольца в ПВ-бензол-П оказываются каталитически активными (рис. 5). На первый взгляд этот факт противоречит ранее высказанному утверждению, что в активном центре находится одно пиридиновое кольцо, окруженное бензильными заместителями, так как при равной вероятности замещения всегда существует вероятность нахождения неалкилированных звеньев рядом друг с другом.

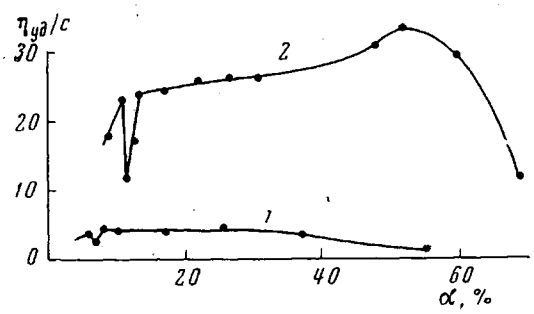


Рис. 6. Зависимость приведенной вязкости ПВ-бензил-П от относительного содержания неалкилированных колец α. Молекулярные веса исходного поли-4-ВП 34 000 (*1*) и 250 000 (*2*)

Легко показать, однако, что при высоких степенях замещения, соответствующих $\alpha_{кр}$, эта вероятность не превышает единиц процентов. Кроме того, из работ Фуосса [14] следует, что константа скорости алкилирования звеньев поли-4-ВП, окруженных уже алкилированными и, следовательно, положительно заряженными соседями, из-за электростатического взаимодействия одноименных зарядов примерно в 10 раз меньше константы

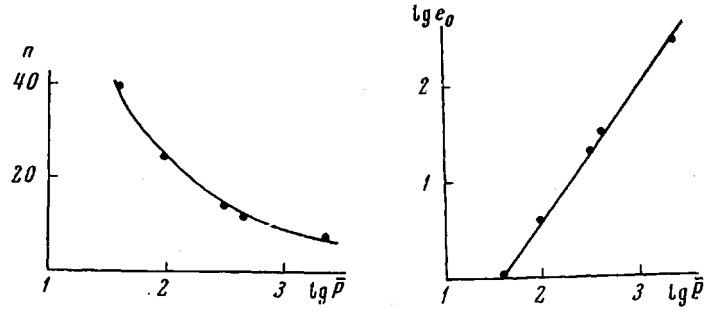


Рис. 7 Рис. 8

Рис. 7. Зависимость среднего числа алкилированных пиридиновых групп n в ПВ-бензил-П, приходящихся на одно неалкилированное звено (активный центр), от коэффициента полимеризации $\bar{P}$ при $\alpha_{кр}$

Рис. 8. Зависимость среднего числа активных центров (e_0), приходящихся на одну макромолекулу, от коэффициента полимеризации $\bar{P}$ для ПВ-бензил-П при $\alpha_{кр}$

скорости алкилирования звеньев, окруженных незамещенными пиридиновыми кольцами. В случае объемистых бензильных заместителей эффект еще более усугубится из-за дополнительных стерических трудностей.

Интересно отметить, что из нефракционированных образцов поли-4-ВП не удается получить ПК с высокой эффективностью ν (табл. 4).

Используя критические значения $\alpha_{кр}$ для разных фракций поли-4-ВП, можно вычислить среднее число алкилированных звеньев (n) в макромолекуле, приходящихся на один активный центр (одно неалкилированное звено) в максимуме каталитической эффективности (рис. 7). Отметим,

Таблица 7

Значения констант K_1 K_M, k_3 в присутствии ПВ-бензил-П разного молекулярного веса

Коэффициент полимеризации ПВ-бензил-П, $\bar{P}$	$\alpha_{кр}$, %	$k_2 \cdot 10^3$, *сек*$^{-1}$	$K_M \cdot 10^4$, *моль/л*	$k_2 \cdot 10^4$, *сек*$^{-1}$
95 *	3,5	2,5	3,5	1,5
320	6,7	1,4	2,3	0,6
430	8,0	0,9	1,1	0,5
2400	11,7	0,85	1,1	~0

* Условия гидролиза приведены в табл. 3; ошибка в измерении $k_3 \pm 10\%$.

что зависимость числа активных центров (e_0) в одной макромолекуле от коэффициента полимеризации ($\bar{P}$) спрямляется в логарифмических координатах $\lg e_0$ от $\lg \bar{P}$ (рис. 8) и описывается уравнением $\lg e_0 = \lg 6{,}3 \cdot 10^{-3} + 1{,}4 \lg \bar{P}$ (10). Из рис. 7 и 8 видно, что чем больше длина цепи ПК, тем больше в ней образуется активных центров и тем меньшая доля алкилированных звеньев оказывается достаточной для создания оптимальной конформации. Из рис. 8 следует также, что должен существовать некото-

рый минимальный коэффициент полимеризации, ниже которого поли-4-ВП неспособны образовывать эффективные ПК.

В табл. 7 представлены значения констант, характеризующие элементарные стадии гидролиза НФА в присутствии ПК, полученных из фракций поли-4-ВП разного молекулярного веса, при $\alpha_{кр}$.

Видно, что увеличение коэффициента полимеризации исходного поли-4-ВП сопровождается уменьшением $K_М$. Это указывает на усиление связывания субстрата в комплекс Михаэлиса. Константа k_2, которая характеризует скорость расщепления сложноэфирной связи в молекуле субстрата, адсорбированной активной полостью, также несколько уменьшается с ростом коэффициента полимеризации. Выше уже упоминалось, что для регенерации активного центра ПК необходимо проникновение воды к N-ацильному промежуточному продукту гидролиза. Этот процесс характеризует константа скорости k_3. С увеличением молекулярного веса клубка k_3 заметно понижается. При $\bar{P} = 2400$ она неизмеримо мала, т. е. проникновение молекул воды в гидрофобный активный центр оказывается практически невозможным.

Таким образом, приведенное выше деление ПК на две группы в известной мере условно. Даже при одинаковой природе N-алкильного заместителя в зависимости от коэффициента полимеризации ПК можно попасть либо в первую, либо во вторую группу.

Химическая специфичность ПК. Хорошо известно, что одно из наиболее характерных свойств ферментов — их высокая химическая специфичность. Действие каждого фермента, как правило, распространяется строго на одно вещество или на небольшое число веществ близкого строения. Представляло интерес выяснить, в какой мере подобная специфичность характерна для исследуемых синтетических ПК. С этой целью

Таблица 8

Кинетика гидролиза различных субстратов в присутствии ПВ-бензил-П *

Субстрат	Кислотная группа субстрата	ν, %	$k_2 \cdot 10^4$, *сек*$^{-1}$	$K_М \cdot 10^4$, *моль/л*	$k'' = \frac{k_2}{K_М}$, *л·моль·сек*$^{-1}$	$K_{ЭП}$, *л·моль*$^{-1}$·*сек*$^{-1}$	$k''/K_{ЭП}$	$k_3 \cdot 10^4$, *сек*$^{-1}$
НФА	$-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH_3$	100	9,0	1,15	8,0	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^2$	0,6
НФБ	$-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-C_6H_5$	~0	~0	?	~0	—	—	—
НФЦ	$-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH=CH-C_6H_5$	~0	~0	?	~0	$3,0 \cdot 10^{-3}$	~0	—
НФТМА	$-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-C-(CH_3)_3$	4	6,0	0,22	27	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$7,7 \cdot 10^4$	—

* Условия гидролиза указаны в табл. 3.

был изучен гидролиз различных субстратов в присутствии ПВ-бензил-П ($\bar{P} = 430$, $\alpha_{кр} = 8,0\%$). Все субстраты включали общий спиртовый радикал и различные кислотные остатки.

Результаты кинетических измерений сведены в табл. 8. В ней также представлены данные по кинетике гидролиза соответствующих субстратов в присутствии 4-ЭП ($K_{ЭП}$) в аналогичных условиях.

Из табл. 8 видно, что ПК активен только при гидролизе НФА и НФТМА. Другие исследованные субстраты практически не гидролизуются ПК, хотя низкомолекулярный аналог (4-ЭП) довольно заметно катали-

зирует гидролиз НФЦ. Исключительно высокая селективность ПВ-бензил-П обнаруживается при сравнении эффективных констант скоростей расщепления сложноэфирной связи ПК ($k'' = k_2 / K_м$) с константами скоростей второго порядка ($K_{эп}$), характеризующими гидролиз этих же субстратов в присутствии 4-ЭП в аналогичных условиях.

Из табл. 8 видно, что отношение $k'' / K_{эп}$ изменяется от ~ 0 (в случае НФЦ) до $7{,}7 \cdot 10^4$ (в случае НФТМА). Поскольку химическая природа и основность нуклеофильных групп ПК и 4-ЭП одинаковы, эти различия не могут быть объяснены тривиальными химическими причинами. По-видимому, они связаны со степенью структурного соответствия активных полостей ПК и кислотного остатка субстрата. Характерно, что ПК практически неактивны по отношению к субстратам с объемными кислотными остатками, содержащими фенильные кольца. Обращает также внимание факт, что при переходе от НФА к НФТМА резко уменьшается каталитическая эффективность, т. е. доля свободных пиридиновых колец, принимающих участие в образовании активных центров ПК. Вместе с тем, константа Михаэлиса, характеризующая действующие центры, оказывается существенно ниже, а константа скорости k_3 заметно возрастает по сравнению с наблюдаемыми для НФА. Этот эффект пока трудно интерпретировать однозначно. Не исключено, однако, что его можно рассматривать как некоторое свидетельство индуцирующего влияния субстрата. Полученные результаты позволяют надеяться, что, варьируя природу заместителей в ПК на основе поли-4-ВП, удастся получить эффективные катализаторы, обладающие широким спектром специфичности по отношению к субстратам различного строения.

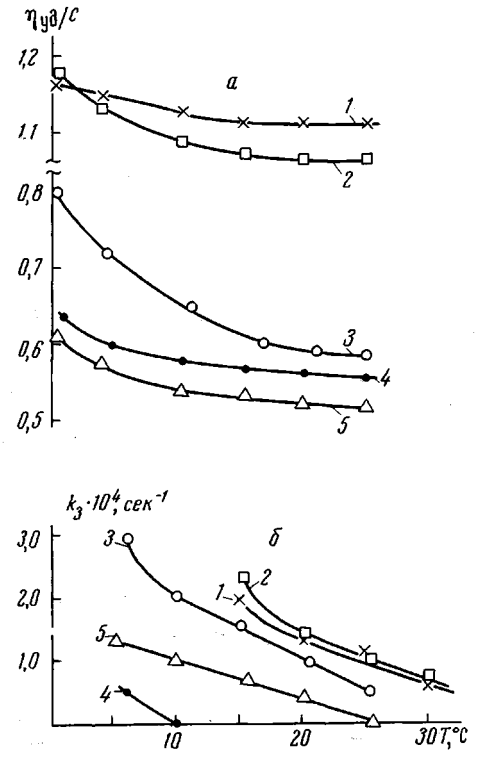


Рис. 9. Зависимость приведенной вязкости водных растворов ПК (*а*) и константы скорости деацилирования (*б*) от температуры:

1 — ПВ-этил-П, $\alpha = 12{,}8\%$, $c = 0{,}1$ *г/дл*; *2* — ПВ-пропил-П, $\alpha = 10{,}9\%$, $c = 0{,}1$ *г/дл*; *3* — ПВ-бензил-П, $\alpha = 5{,}2\%$; $c = 0{,}2$ *г/дл*; *4* — ПВ-изопропил-П, $\alpha = 23\%$, $c = 0{,}1$ *г/дл*; *5* — ПВ-изоамил-П, $\alpha = 13\%$; $c = 0{,}1$ *г/дл*; (*c* — концентрация полимеров, при которых измерена приведенная вязкость)

Термодинамические характеристики элементарных стадий гидролиза в присутствии полимерных катализаторов. Для более глубокого понимания механизма действия ПК в реакции гидролиза сложноэфирной связи необходимо знать термодинамические величины, характеризующие отдельные элементарные стадии. С этой целью мы изучили температурную зависимость скорости гидролиза НФА в присутствии ПК, полученного из фракции поли-4-ВП (коэффициент полимеризации 260) и различных углеводородных заместителей (табл. 9).

Чтобы оценить влияние температуры на форму макромолекул ПК, было изучено изменение приведенной вязкости ПК в воде в том же интервале температур, в котором изучали кинетику гидролиза НФА. Установлено, что приведенная вязкость для всех ПК с повышением темпера-

Таблица 9

ПК, использованные для изучения температурной зависимости скорости гидролиза НФА *

ПК	ПВ-бензил-П	ПВ-пропил-П	ПВ-этил-П	ПВ-изо-амил-П	ПВ-изо-пропил-П	ПВ-изо-бутил-П
α, %	5,2	10,9	12,8	13,0	23	49,8
ν, %	76,5	2,8	1,4	2,5	4,4	0,5

* Условия гидролиза НФА: 25°, pH = 7,7; [ТРИС] — 10^{-2} *моль/л*, ионная сила 10^{-2} *моль/л*, [НФА] —0,7—$4\cdot10^{-4}$ *моль/л*, кювета 4 *см*.

Таблица 10

Термодинамические величины образования комплекса Михаэлиса и активированного комплекса в реакции расщепления сложноэфирной связи *

ПК	ΔF_M	ΔH_M	ΔS_M	ΔF_2	ΔH_2	ΔS_2
ПВ-бензил-П	—4,8	—7,4	—8,7	21,6	8,4	—44,3
ПВ-изопропил-П	—4,3	—10,8	—22	20,3	13,9	—21,4
ПВ-изобутил-П	—4,6	—6,8	—7,4	20,5	13,9	—20,2
ПВ-изоамил-П	—4,7	—8,3	—12	20,1	12,5	—25,3
ПВ-этил-П	—4,9	—7,5	—8,6	21,2	12,7	—28,7
ПВ-пропил-П	—4,9	—7,4	—8,0	21,2	11,4	—32,8
4-этилпиридин **	—	—	—	20,2	11,9	—27,7

* Условия приведены в табл. 3.
** Термодинамические величины вычислены из температурной зависимости константы скорости второго порядка при гидролизе НФА 4-ЭП.

туры уменьшается (рис. 9). Эти результаты указывают на сворачивание макромолекул в более плотные клубки и согласуются с предположением об образовании гидрофобных связей между звеньями, так как известно, что именно гидрофобные связи могут упрочняться при повышении температуры [15].

С повышением температуры для всех ПК наблюдается возрастание K_M, определяющей (при $k_{-1} / k_1 \gg k_2 / k_1$) прочность связывания субстрата у активного центра ПК, т. е. связывание субстрата ухудшается. Из температурной зависимости K_M вычислены эффективные термодинамические величины образования комплекса Михаэлиса (табл. 10). Для расчета ΔF_M использовали уравнение

$$\Delta F_M = -RT \ln K_p, \qquad (11)$$

где $K_p = \frac{1}{K_s} \simeq \frac{1}{K_M}$ имеет смысл константы равновесия образования полимерсубстратного комплекса (K_s — истинная константа диссоциации комплекса ES).

Тогда $-RT \ln\left(\frac{1}{K_s}\right) = \Delta F_M = \Delta H_M - T\Delta S_M$, где ΔF_M — свободная энергия образования субстрат-полимерного комплекса, ΔH_M — изменения теплоты, ΔS_M — изменение энтропии при образовании комплекса Михаэлиса.

При обсуждении этих величин, однако, необходимо учитывать, что они в какой-то степени характеризуют температурный ход изменения формы макромолекул ПК, которая также влияет на способность ПК адсорбировать субстрат.

Из табл. 10 следует, что экспериментальные значения свободной энергии ΔF_M образования комплекса Михаэлиса для всех ПК близки и мало отличаются от величин ΔF_M, наблюдаемых для тех ферментов (α-химо-

трипсин, пепсин, трипсин), которые связывают соответствующие субстраты в результате гидрофобного взаимодействия [16]. Энтропии ($\Delta S_М$) и энтальпии ($\Delta H_М$) связывания молекул НФА изученными ПК также близки друг к другу. Исключение составляет ПВ-изопропил-П, у которого $\Delta S_М$ и $\Delta H_М$ аномально понижены. Рассмотрение объемных моделей показывает, что как раз в случае ПК, содержащего изопропильные радикалы, размещение субстрата в активной полости возможно лишь при определенной взаимной ориентации изопропильных групп соседних звеньев макромолекулы; для других ПК требования к ориентации алкильных групп значительно менее жестки. Зато именно в комплексе ПВ-изопропил-П и НФА достигается наибольшее число контактов между углеводородными участками активной полости и молекулой субстрата.

Константа скорости (k_2) расщепления молекул НФА, адсорбированных активной полостью, для всех ПК растет с повышением температуры. Как известно, эта константа связана с термодинамическими параметрами следующим выражением:

$$k_2 = \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta F_2^*}{kT}} = \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta H_2^* - T\Delta S_2^*}{kT}},$$

где k_2 — константа скорости реакции, h — постоянная Планка ($6{,}6 \cdot 10^{-27}$ *эрг·сек*), k — постоянная Больцмана ($1{,}4 \cdot 10^{-16}$ *эрг·град*$^{-1}$), T — абсолютная температура, ΔF_2^* — свободная энергия образования активированного состояния, через которое комплекс должен пройти перед распадом, ΔH_2^* — теплота активации, ΔS_2^* — энтропия активации.

По-видимому, экспериментально определенные значения указанных термодинамических параметров, характеризующих эту стадию (табл. 10), ближе всего соответствуют истинным значениям.

Из табл. 10 видно, что значения ΔF_2^* расщепления сложноэфирной связи НФА изученными ПК и 4-ЭП (низкомолекулярный аналог активного центра) близки. Отсюда следует важный вывод: ускорение гидролиза НФА ПК в основном обусловлено образованием комплексов Михаэлиса, т. е. «экстракцией» субстрата в активные полости ПК. Что же касается самих элементарных актов каталитического превращения НФА, то они и в случае ПК, и в случае 4-ЭП, по всей вероятности, аналогичны. Последнее представляется вполне естественным, так как природа нуклеофильных групп в ПК и 4-ЭП одна и та же.

Величина k_3 характеризует скорость вытеснения уксусной кислоты из активного центра, которое, по-видимому, происходит в результате проникновения воды в гидрофобные полости ПК и гидролиза промежуточного N-ацетильного продукта. Из рис. 9 видно, что k_3 с повышением температуры уменьшается симбатно понижению приведенной вязкости и для некоторых ПК в пределах ошибки эксперимента становится равной нулю. Эти результаты еще раз показывают, что деление ПК на две группы условно. Аномальный температурный ход изменения k_3 обусловлен уплотнением макромолекулярных глобул, затрудняющим диффузию в них молекул воды.

В заключение этого раздела полезно сопоставить некоторые характеристики типичных ПК с характеристиками одного из наиболее изученных ферментов — α-химотрипсина. Соответствующие данные приведены в табл. 11. Там же приведены константы скорости гидролиза ($k_{НА}$) субстратов в присутствии 4-ЭП и имидазола. Первый моделирует нуклеофильный центр ПК, второй входит в состав гистидина — α-аминокислоты, звено которой, как известно, участвует в образовании активного центра α-химотрипсина.

Для сопоставления свойств ПК и фермента полезно воспользоваться отношением эффективной константы скорости k'' к константе скорости гидролиза $k_{НА}$ того же субстрата в присутствии соответствующего низкомолекулярного аналога (4-ЭП — в случае ПК и имидазола — в случае

α-химотрипсина) в аналогичных или близких условиях. Это отношение, в известной мере, характеризует вклад специфической структуры макромолекулярного катализатора в интенсификацию каталитического процесса. Из табл. 11 следует, что значения $k'' / k_{НА}$ для наиболее активных синтетических катализаторов по порядку величины совпадают и даже

Таблица 11

Кинетика гидролиза в присутствии ПК и α-химотрипсина

Катализатор	Субстрат	α, %	ν, %	$k_2 \cdot 10^3$, $сек^{-1} \cdot 10^3$	$K_M \cdot 10^4$, *моль/л*	$k'' = \frac{k_2}{K_M}$, или $k_{НА}$ *л·моль/сек*$^{-1}$	$\frac{k''}{k_{НА}}$	$k_3 \cdot 10^4$, $сек^{-1}$
ПВ-изоамил-П	НФА	30,7	16,7	16,0	2,5	64	4000	0
ПВ-пропил-П	То же	17,0	15,0	11,0	3,4	32	2000	3,2
ПВ-бензил-П	» »	8,0	100	0,9	1,15	8,0	500	0,6
ПВ-бензил-П	НФТМА	8,0	4,0	0,6	0,22	27,0	7,7 10^4	3,5
α-Химотрипсин [17]	НФТМА	—	—	370	16	230	—	1,5
То же [18]	НФА	—	—	4000	12	3320	6640**	80
» » [19]	НФАТр*	—	—	$3,83 \cdot 10^7$	0,02	$1,91 \cdot 10^{10}$	$\sim 3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^5$
4-ЭП	НФА	—	—	—	—	1,6 10^{-2}	—	—
4-ЭП	НФТМА	—	—	—	—	3,5 10^{-4}	—	—
Имидазол [20]	НФА	—	—	—	—	0,5	—	—

* НФАТр — нитрофениловый эфир N-ацетил-L-триптофана.
** Получено из сравнения констант второго порядка реакции гидролиза НФАТр и НФА в присутствии OH^- [18].

превосходят таковое для фермента в том случае, когда последний действует на неспецифический для него субстрат (НФА). Этот факт, по-видимому, означает, что основная причина высокой каталитической активности фермента по отношению к неспецифическому субстрату та же, что и причина высокой каталитической активности синтетических ПК, описанных в этой работе. В основном она заключается в образовании фермент-субстратных и полимер-субстратных комплексов. Из табл. 11 видно, что прочность комплексов субстратов с активными центрами синтетических ПК, характеризуемая значениями константы Михаэлиса, даже несколько выше, чем прочность комплексов неспецифических субстратов (НФА, НФТМА) с активным центром α-химотрипсина. Таким образом, совокупность приведенных данных, вероятно, служит достаточным основанием, чтобы утверждать, что между механизмом действия синтетических ПК существует весьма глубокая принципиальная аналогия. Совершенно иначе обстоит дело, если эталоном выбрать кинетические характеристики гидролиза α-химотрипсином специфического для него субстрата (*n*-нитрофенилового эфира N-ацетил-L-триптофана). В этом процессе можно считать, что отношение $k'' / k_{НА}$ оказывается приблизительно на 6 порядков выше (табл. 11). Возрастание обусловлено и огромным увеличением константы скорости k_2 и значительным (на два порядка) уменьшением K_M, т. е. улучшением связывания субстрата в активной полости фермента. Характерно, что константа скорости k_3 деацилирования активного центра фермента при гидролизе специфического субстрата также возрастает на несколько порядков. Очевидно, что в последнем случае начинают действовать особые дополнительные механизмы, которые фермент «не может эффективно использовать» при действии на неспецифические субстраты и которые еще пока не удается моделировать синтетическими ПК.

Влияние спиртов на кинетическое поведение ПК. Известно, что гидрофобное взаимодействие является одним из наиболее

важных факторов, обеспечивающих стабильность нативной конфигурации глобулярных белков [21]. Изучение взаимодействия таких белков с различными веществами, способными воздействовать на гидрофобные связи, например, органическими растворителями, становится одним из важных путей изучения структуры белковых молекул [22]. Форма макромолекул N-алкилированного поли-4-ВП в растворе определяется, по крайней мере,

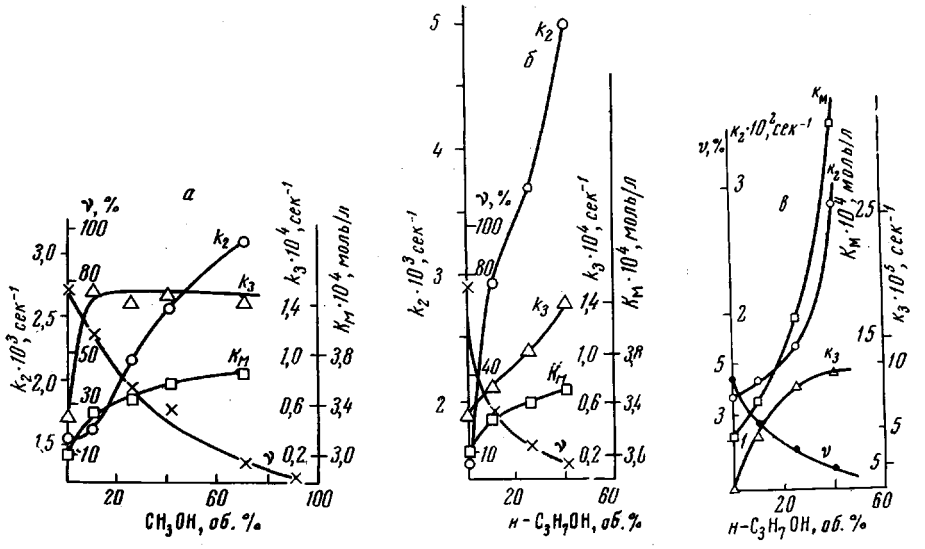


Рис. 10. Зависимость кинетических параметров гидролиза *п*-нитрофенилацетата от состава растворителя в смесях вода — метанол (*а*) и вода — пропанол (*б*, *в*): *а*, *б* — в присутствии ПВ-бензил-П ($\alpha = 5{,}2\%$); *в* — ПВ-изопропил-П ($\alpha = 23{,}0\%$). Условия гидролиза приведены в табл. 4

двумя типами взаимодействий: электростатическими и гидрофобными. Можно ожидать, что введение в систему растворителя с гидрофобными группами, например метанола или *н*-пропанола, приведет к изменению относительных вкладов этих взаимодействий и, следовательно, к нарушению формы ПК, устанавливающейся в чистой воде. Изучение кинетики гидролиза НФА в присутствии ПК в растворах, содержащих различные количества спирта, может дать интересную информацию о роли гидрофобных связей в построении активных центров и их влиянии на форму ПК.

Мы изучили кинетику гидролиза НФА в присутствии ПВ-бензил-П ($\bar{P} = 260$, α 5,2%) в растворах, содержащих различное количество метанола (рис. 10, *а*) и *н*-пропанола (рис. 10, *б*), а также ПВ-изопропил-П ($\bar{P} = 260$, α 23%) в смеси пропанола с водой (рис. 10, *в*). Первое, что обращает на себя внимание,— уменьшение в обоих рассматриваемых случаях количества активных центров с увеличением концентрации спиртов (рис. 10). Активные центры выводятся из строя вследствие разрушения гидрофобных связей в макромолекулярных глобулах ПК. Последнее следует и из того, что добавление NaCl, который, как известно, в основном влияет на электростатическое взаимодействие в полиэлектролите, приводит к разрушению активных центров в значительно меньшей степени [2]. Как и следовало ожидать, эффект *н*-пропанола оказывается сильнее, чем эффект менее гидрофобного метанола.

Резкое возрастание k_3 (рис. 10) объясняется либо тем, что разрушение гидрофобных связей в ПК увеличивает проницаемость глобул для молекул воды и облегчает диффузию последних к еще «неиспорченным» активным центрам ПК, либо участием спирта в регенерации (деацилировании) активных центров, приводящей к образованию соответствующего

сложного эфира. Возрастание K_M (рис. 10) показывает, что связывание субстрата у активного центра становится менее эффективным, вероятно, из-за того, что молекулы спирта проникают в гидрофобные области к сохранившимся активным центрам и несколько ухудшают сорбционные свойства активных полостей по отношению к гидрофобному субстрату. Об изменении свойств каталитических центров в присутствии спиртов свидетельствует также наблюдаемое на опыте возрастание константы k_2 (рис. 10).

Таким образом, изменение констант скорости отдельных стадий гидролиза НФА в присутствии различных ПК с изменением температуры и природы среды находит удовлетворительное объяснение из предположения о роли гидрофобных взаимодействий в образовании активных центров ПК.

Выводы

1. Получены полимерные катализаторы на основе поли-4-винилпиридина, частично N-алкилированные различными алкилгалогенидами, обладающие высокой каталитической активностью и избирательностью в реакции гидролиза сложных эфиров.

2. Показано, что активными центрами служат незамещенные пиридиновые кольца, окруженные N-алкилированными. Каталитическая активность неалкилированного звена на 2,5—3,5 порядка превышает каталитическую активность низкомолекулярного аналога — 4-этилпиридина.

3. Изучена кинетика гидролиза *n*-нитрофенилацетата полимерными катализаторами, содержащими органические радикалы различного строения (этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, изоамил, бензил). Показано, что кинетическое поведение синтезированных катализаторов полностью имитирует кинетическое поведение α-химотрипсина.

4. Определены кинетические параметры, характеризующие отдельные элементарные стадии гидролиза и установлена их зависимость от природы заместителей и размеров макромолекул полимерных катализаторов.

5. Установлено, что высокая эффективность катализатора полимера, обработанного бензилхлоридом, наблюдается лишь при определенных степенях замещения в макромолекуле.

6. Показано, что каталитическая активность полимерных катализаторов связана с формой макромолекулы в растворе и с природой среды. Найдены термодинамические характеристики элементарных стадий гидролиза в присутствии полимерных катализаторов.

7. Высокая каталитическая активность объяснена возникновением в макромолекуле локальных гидрофобных полостей, каждая из которых включает нуклеофильную группу (пиридиновое кольцо) и окружена гидрофобными заместителями.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Институт нефтехимического
синтеза им. А. В. Топчиева
АН СССР

Поступила в редакцию
17 I 1969

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Э. Кирш, В. А. Кабанов, В. А. Каргин, Докл. АН СССР, **177**, 112, 1967.
2. Ю. Э. Кирш, В. А. Кабанов, В. А. Каргин, Высокомолек. соед., **A10**, 349, 1968.
3. A. G. Boyes, U. P. Strauss, J. Polymer Sci., **22**, 463, 1956.
4. В. А. Каргин, В. А. Кабанов и др. Докл. АН СССР, **160**, 604, 1965.
5. J. A. Moede, C. Curran, J. Amer. Chem. Soc., **71**, 852, 1949.
6. R. L. Letsinger, T. J. Savereide, J. Amer. Chem. Soc., **84**, 3122, 1962.
7. H. Linewidver, D. Burk, J. Amer. Chem. Soc., **56**, 658, 1934.
8. W. P. Jencks, M. Gilchrist, J. Amer. Chem. Soc., **90**, 2622, 1968.
9. A. Kirkien-Konasiewicz, A. M. Gude, M. McGrow, M. Knight, Chem. Ind., 1967, № 36, 1527.

10. H. Gutfreund, J. M. Sturtevant, Proc. Nat. Acad. Sci., 42, 719, 1956; T. Spenser, J. M. Sturtevant, J. Amer. Chem. Soc., 81, 1874, 1959.
11. K. Laidler, The Chemical kinetics of Enzyme Action, Oxford, 1958.
12. Физические методы в химии гетероциклических соединений, под ред. А. Р. Катрицкого, изд-во «Химия», 1966.
13. В. А. Кабанов, К. В. Алиев, В. А. Каргин, Высокомолек. соед., A10, 1618, 1968.
14. B. D. Coleman, R. M. Fuoss, J. Amer. Chem. Soc., 77, 5472, 1955; R. M. Fuoss, W. Watanabe, B. D. Coleman., Международный симпозиум по макромолекулярной химии, Москва, 1960 г., секция 3.
15. G. Nemethy, H. A. Seheraga, J. Phys. Chem., 66, 1773, 1962.
16. The Enzymes, vol. 1, под ред. P. Boyer, R. H. Sardy, K. Myrbäck, Acad. Press. N. Y., 1959, p. 178.
17. M. L. Bender, B. Zerner, G. R. Schenbaum, J. Amer. Chem. Soc., 84, 2062, 2570, 1962.
18. M. L. Bender, F. J. Kezdy, G. R. Gunter, J. Amer. Chem. Soc., 86, 3714, 1964; Г. Я. Коломийцева, Диссертация, 1967.
19. B. Zerner, R. P. M. Bond, M. L. Bender, J. Amer. Chem. Soc., 86, 3674, 1964.
20. M. L. Bender, B. M. Turnquest, J. Amer. Chem. Soc., 79, 1656, 1957.
21. W. Kauzman, Advances in Protein Chem., 14, 1, 1959; H. F. Fisher, Proc. Nat., Acad. Sci., 51, 1285, 1964; C. C. Bigelow, J. Theoret. Biol., 16, 187, 1967.
22. А. А. Вазина, В. В. Леднев, Б. К. Лемажихин, Биохимия, 31, 720, 1966; В. В. Мосолов, П. В. Афанасьев, М. С. Долгих, Е. В. Лушникова, Биохимия, 33, 1030, 1968.

SYNTHETIC POLYMERIC ANALOGS OF ENZIMES WITH ESTERASE ACTIVITY

Yu. E. Kirsh, S. K. Pluzhnov, T. S. Shomina, V. A. Kabanov, V. A. Kargin

Summary

Poly-4-vinylpyridines partially alkylated by alkylhalides of different structure (ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, isoamyl) show high catalytic activity in hydrolysis of *p*-nitrophenylacetate which exceeds the activity of the low molecular analog (4-ethylpyridine) by 2.5—3.5 orders. Similarities between the polymer catalyst and enzime α-chemotripsyn in the kinetic behavior, high chemical specificity and role of the medium have been established. Enhancement of activity of the polymer is shown to be the result of hydrophobic interaction between the active cavity and substrate.