

УДК 541.64:547.538.141

**ГАЛОИДАЦЕТИЛПРОИЗВОДНЫЕ СОПОЛИМЕРОВ СТИРОЛА
И ДИВИНИЛБЕНЗОЛА — НОСИТЕЛИ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ
ФЕРМЕНТОВ**

*Макарова С. Б., Грязнов Г. В., Литвак Ж. М.,
Просветова Н. К., Мендельсон Е. А., Шабанова Н. В.,
Ким Г. И.*

На основе сополимеров стирола и дивинилбензола различной структуры синтезированы соединения с подвижными атомами галоида: бромиды и иодоацетилпроизводные, которые использованы в качестве полимерных носителей для иммобилизации глюкоамилазы и пепсина. Изучено влияние макромолекулярной структуры сополимеров и содержания галоида на процесс иммобилизации глюкоамилазы и пепсина. Показано, что для иммобилизации этих ферментов наиболее пригодны иодоацетилпроизводные сополимеры стирола и дивинилбензола макропористой структуры с высоким содержанием иода.

При решении проблемы создания иммобилизованных ферментов подбор подходящего полимерного носителя является актуальной задачей. В работе [1] приведены требования, предъявляемые к материалам для иммобилизации ферментов.

Применяемые в настоящее время природные носители с галоидацетильными группами на основе целлюлозы [2] характеризуются низкой механической прочностью и весьма невысокой проницаемостью по отношению к крупным макромолекулам. В связи с этим значительный интерес представляют синтетические полимерные материалы, которые характеризуются высокой механической прочностью и регулируемыми пределами проницаемости полимерного каркаса.

Настоящая работа посвящена синтезу и исследованию галоидацетилпроизводных сополимеров стирола и дивинилбензола с целью использования их в качестве носителей для иммобилизации ферментов.

Известно, что в зависимости от условий синтеза можно получить сополимеры стирола и дивинилбензола различной проницаемости [3].

Введение функциональных групп в полимерную матрицу осуществляли прямым галоидацетилированием сополимеров стирола по реакции Фриделя — Крафтса.

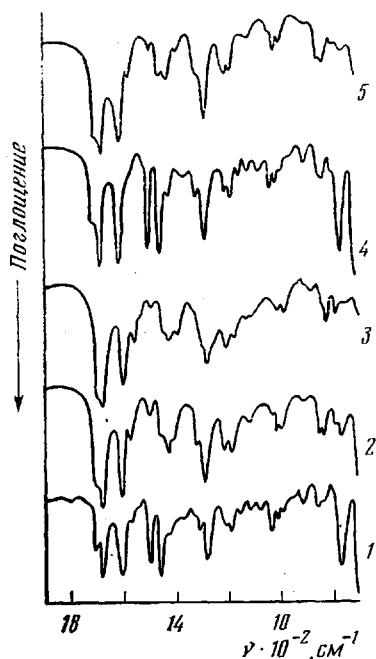
Бромацетилирование проводили бромацетилбромидом в присутствии хлористого алюминия при различном соотношении ацетилирующего агента и сополимера в течение 3 час при 80°. Количество катализатора взято из расчета 1—2 моля на 1 моль галоидацетилирующего агента. Бромацетилпроизводные сополимеров промывали спиртом от избытка бромацетилбромида и катализатора.

Полноту прохождения реакции бромацетилирования сополимеров стирола и дивинилбензола контролировали элементным анализом и методом ИК-спектроскопии.

Влияние соотношения реагирующих компонентов и макромолекулярной структуры сополимеров стирола и дивинилбензола на степень бромацетилирования представлено в табл. 1.

Увеличение количества катализатора и галоидациетилирующего агента до соотношения 2:1 заметно интенсифицирует процесс бромацетилирования и дает возможность добиться почти теоретического содержания брома в модифицированном сополимере.

Исследование влияния макромолекулярной структуры сополимера на процесс бромацетилирования показало, что реакция Фриделя – Крафтса проходит довольно легко в полимерных сетках любой степени спшивания. Это подтверждено сравнением ИК-спектров исследованных бромацетил-производных сополимеров различной макромолекулярной структуры, которое показало, что интенсивность полос поглощения карбонильной группы не зависит от содержания спивающего агента в сополимере и обусловлена лишь количеством бромацетилирующего агента в реакционной смеси (рисунок), а также небольшими значениями эффективной энергии активации, приведенными в работе [4].



ИК-спектры бромацетилпроизводных сополимеров стирола и дивинилбензола:

1–3 — гелевая структура с содержанием брома 17,28 и 35 вес.% соответственно; 4 — макропористая структура с удельной поверхностью 40 м²/г и 15 вес.% брома; 5 — макропористая структура с удельной поверхностью 280 м²/г и 30 вес.% брома

иодистым калием в среде этилового спирта синтезированы иодацетилпроизводные сополимеров. Реакцию проводили при 70° в течение 6 час. Полноту реакции контролировали элементным анализом.

В результате проведенных исследований было установлено, что реакция замещения проходит полностью и содержание иода в иодацетилпроизводных сополимеров составляет от 30 до 60% в зависимости от содержания брома в исходных соединениях (табл. 1).

Синтезированные бром- и иодацетилпроизводные сополимеры стирола и дивинилбензола различной структуры были использованы в качестве носителей для иммобилизации глюкоамилазы и пепсина, pH-оптимум которых лежит в пределах 5,0–6,0. Для таких ферментов применение носителей с аминогруппами не позволяет получить препараты с высоким содержанием активного белка [6].

Иммобилизацию глюкоамилазы на галоидациетилпроизводных сополимеров проводили в присутствии и в отсутствие крахмала. В отсутствие крах-

мата ИК-спектроскопия было исследовано положение бромацетильной группы в модифицированном сополимере и влияние соотношения реагирующих компонентов на степень бромацетилирования.

Установлено (рисунок), что бромацетильная группа CH_2BrCO — находится в *пара*-положении к винильной группе (полоса поглощения при 830 cm^{-1} [5]). Наличие в ИК-спектрах исследованных соединений полос поглощения при 1680 и 1280 cm^{-1} свидетельствует о присутствии в них карбонильной группы $-\text{C=O}$. Появление на полосе поглощения при 1680 cm^{-1} плеча с максимумом при 1700 cm^{-1} обусловлено присутствием брома в α -положении к карбонильной группе [5]. О степени бромацетилирования можно также судить по интенсивности полос поглощения при 700 и 760 cm^{-1} , характеризующих свободные стирольные ядра.

Замещением брома на иод реакцией бромацетилпроизводных сополимеров с иодистым калием в этиловом спирте синтезированы иодацетилпроизводные сополимеры. Реакцию проводили при 70° в течение 6 час. Полноту реакции контролировали элементным анализом.

Таблица 1

Синтез галоидацетилпроизводных сополимеров стирола и дивинилбензола

Дивинилбензол, %	Тип матрицы	Удельная поверхность, м ² /г	Соотношение [BrCOCH ₂ Br] / [сополимер], моль/моль	Содержание AlCl ₃ , моли	Содержание брома, вес.%	Содержание иода, вес.%
2	Гелевый	До 1	1 : 2	1	14–19	27–30
			1 : 1	2	27–28	45–48
			2 : 1	3	33–34	60–64
10	Макропористый	До 40	1 : 2	1	14–15	30–32
			2 : 1	3	33–34	37–40
40	То же	До 300				

Таблица 2

Иммобилизация глюкоамилазы на иод- и бромацетилпроизводных сополимеров стирола и дивинилбензола

Тип полимерного носителя	Содержание галоида, вес.%	Источник фермента	Количество связавшегося белка, % от исходного	Активность сухого препарата, ед/г
Иодацетилпроизводный сополимера	64	Фирма «Koch-Light» Культура Endomysse specie 20–9	26	900–1300
	64		21	360–1200
Бромацетилпроизводный сополимера	35	Фирма «Rapidase»	18	240–320

мала на иод- и бромацетилпроизводных сополимеров гелевой структуры с пределом проницаемости 10⁶ связывалось до 30% глюкоамилазы от внесенного в реакционную смесь препарата фермента. Активность фермента, связанного с иодацетилпроизводным, была очень низкой и составляла 36 ед/г влажного препарата. В случае бромацетилполистирола активность иммобилизованного фермента равнялась нулю.

Результаты иммобилизации глюкоамилазы в присутствии крахмала приведены в табл. 2.

Для установления величины максимально возможной активности получаемых нерастворимых производных глюкоамилазы брали большой избыток фермента. В связи с этим процент связывания с матрицей низкий (18–26%). На бромацетилсополимере иммобилизация проходит хуже, чем на иодацетилпроизводных, возможно, из-за более низкого содержания брома в полимере по сравнению с иодом.

Активность полученных препаратов иммобилизованной глюкоамилазы довольно высока (1000–1300 ед/г сухого препарата). Однако стабильность препаратов иммобилизованного фермента невысокая. Через 3 суток при комнатной температуре сохраняется 26–30% исходной активности фермента.

При иммобилизации пепсина на бромацетилпроизводных сополимерах были получены неактивные препараты фермента, вероятно, вследствие инактивирующего действия брома на пепсин.

Результаты по иммобилизации пепсина на иодацетилпроизводных сополимеров различной структуры представлены в табл. 3.

Данные табл. 3 показывают, что наилучший выход реакции иммобилизации наблюдается при использовании макропористого сополимера

Таблица 3

Иммобилизация пепсина на иодацетилпроизводных сополимеров стирола и дивинилбензола

Тип полимерной матрицы	Верхний предел проницаемости полимерной матрицы	Удельная поверхность, м ² /г	Содержание иода, %	Содержание белка, мг/г носителя	Удельная активность иммобилизованного пепсина, ед/г носителя	Выход активности реакции иммобилизации *, %
Гелевая	10 ⁶	До 1 До 1	30 64	33,0 38,0	0,45 3,1	3,0 20,0
Макропористая	—	До 20	32	65,4	2,0	13,3
	10 ⁵	До 300	36	84,7	10,2	68,0

* Рассчитывали по уравнению, приведенному в работе [7].

($S_{уд}$ ~ до 300 м²/г). Этот факт можно объяснить тем, что высокий предел проницаемости и большая развернутая поверхность полимерной матрицы уменьшают диффузационные затруднения как при иммобилизации фермента, так и при расщеплении иммобилизованным препаратом высокомолекулярного субстрата — гемоглобина [8]. Полученные препараты иммобилизованного пепсина довольно стабильны: через месяц хранения при комнатной температуре в 0,1 M ацетатном буфере (рН 5,0) сохраняется от 30 до 40% первоначальной активности, а при хранении в холодильнике (4–6°) в том же буфере — 100% активности.

ИК-спектры образцов записывали на приборе UR-20 в области 400–2000 см⁻¹. Образцы готовили в виде таблеток, запрессованных с KBr (5 мг на 500 мг KBr).

В работе использовали ферментные препараты глюкоамилазы фирм «Koch-Light» (Англия) и «Rapidase» (Франция) и из дрожжеподобных грибков *Endomyces species* 20–9 (Московский технологический институт пищевой промышленности); пепсин Олайнского завода химреактивов.

Иммобилизацию глюкоамилазы на галоидациетилпроизводных сополимеров стирола и дивинилбензола проводили в отсутствие и в присутствии крахмала. В отсутствие крахмала к 0,1 г носителя во влажном состоянии приливали 0,5 мл 0,1 M Na-фосфатного буфера (рН 7,0 для бромацетилпроизводного или pH 6,0 для иодацетилпроизводного), присыпали 20–30 мг фермента (удельная активность 30 000–50 000 ед/г), смесь перемешивали и оставляли на 16 час в холодильнике. Затем промывали 30 мл 1 M Na-ацетатного буфера (рН 5,0), 50 мл 1 M раствора NaCl и водой.

В присутствии крахмала к 0,1 г носителя приливали 0,3 мл 6%-ного оклейстерилизованного картофельного крахмала и 0,45 мл 1 M Na-фосфатного буфера и присыпали 30–50 мг фермента (удельная активность 20 000–30 000 ед/г).

Активность глюкоамилазы определяли по методу Грачевой и др. [9]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое освобождает из 1%-ного крахмального раствора 1 мг глюкозы за 1 час при 50°.

Для иммобилизации пепсина к 0,5 г носителя, суспендированного в 10 мл 0,1 M ацетатного буфера (рН 5,0), добавляли 10 мл раствора фермента (концентрация 10 мг в 1 мл). Смесь оставляли на ночь в холодильнике при слабом перемешивании магнитной мешалкой. Затем продукт промывали порциями по 30–50 мл последовательно 0,1 M ацетатным буфером (рН 5,0), 0,02 M раствором HCl, еще раз буфером и водой.

Иммобилизованный препарат пепсина хранили в 0,1 M ацетатном буфере (рН 5,0) в холодильнике.

Активность нативного и связанного пепсина определяли с гемоглобином по методу, описанному в работе [10].

Всесоюзный научно-исследовательский
институт химических реактивов
и особы чистых химических веществ

Поступила в редакцию
31 X 1978

ЛИТЕРАТУРА

1. G. J. H. Melrose, Rev. Pure Appl. Chem., 21, 83, 1971.
2. T. Sato, T. Mori, T. Tosa, I. Chibata, Arch. Biochem. Biophys., 147, 788, 1971.
3. С. Б. Макарова, Е. В. Егоров, Химич. пром-сть, 1972, № 1, 24.
4. Б. Н. Трушин, В. К. Тюриков, Высокомолек. соед., Б16, 823, 1974.
5. Л. Беллами, Инфракрасные спектры сложных молекул, Изд-во иностр. лит., 1963.
6. В. П. Торчилин, Ж. М. Литвак, Г. Н. Есина, С. Б. Макарова, Г. В. Грязнов, Биоорганич. химия, 1, 1231, 1975.
7. М. И. Креэн, А. И. Кестнер, К. А. Каск, Труды Таллинского политехнического ин-та, А300, 21, 1971.
8. И. В. Березин, А. М. Клибанов, К. Мартинек, Успехи химии, 46, 17, 1975.
9. И. М. Грачева, А. И. Садова, Э. В. Колыцова, В. М. Илюшкина, Прикл. биохимия и микробиология, 6, 602, 1970.
10. M. L. Anson, J. Gen. Physiol., 22, 79, 1938.

ACETYL HALIDE DERIVATIVES OF STYRENE-DIVINYLBENZENE COPOLYMERS AS CARRIERS FOR ENZYMES IMMOBILIZATION

Makarova S. B., Gryaznov G. V., Litvak Zh. M., Prosvetova N. K.,
Mendel'son Ye. A., Shabanova N. V., Kim G. I.

Summary

The derivatives with mobile halide atoms, acetyl bromine and acetyl iodine derivatives have been synthesized from styrene-divinylbenzene copolymers of various structure. The substances obtained are used as polymeric carriers for glucoamylase and pepsine immobilization. The influence of copolymers macromolecular structure and halide content on the immobilization process was studied. It was shown that acetyl iodine copolymers of macroporomeric structure with high content of iodine are the most suitable for the immobilization of these enzymes.
