

УДК 541.64:577.156

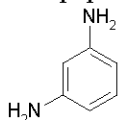
ВИВЧЕННЯ ПРОЦЕСУ ОДНОЧАСНОГО СТРУКТУРУВАННЯ ТА ІММОБІЛІЗАЦІЇ СИСТЕМИ ФЕРМЕНТ - ПОЛІМЕРНИЙ НОСІЙ

В роботі [1] нами досліджена ковалентна іммобілізація ферментного препарату "ліполактину" (ЛП) на полімерному носії – співполімері стиролу з малеїновим ангідридом (стиромалі (СМА)) і вивчені властивості одержаних фермент-полімерних комплексів (ФПК).

Для поліпшення експлуатаційних властивостей ФПК, як біокатализаторів, перш за все механічної міцності, а також для вивчення структури ФПК нами проведено дослідження процесів одночасного структурування стиромало зшиваючим агентом м-фенілендіаміном (м-ФДА) та прищеплення до СМА фрагментів ліполактину в трикомпонентній системі: СМА – ЛП – м-ФДА.

Експериментальна частина

Об'єктом досліджень був вибраний ферментний препарат ліпази ліполактин, одержаний за методикою [1]. В якості полімерного носія використовували СМА з $M_n \sim 110\,000$, а зшиваючого агента - м-ФДА наступної формули:



який є біфункціональною сполукою, здатною вступати в реакцію ацилювання по двох аміногрупах з утворенням поперечних зв'язків між макромолекулами полімеру.

Процес іммобілізації ліполактину [1] та структурування полімерної матриці м-фенілендіаміном проводили при температурі 20-25°C і різному часі протікання реакції. Вміст білка в іммобілізованих препаратах оцінювали по різниці між взятим в реакцію білком, знайденим в маточному розчині та промивних водах за методом Лоурі [2].

Ступінь структурування ФПК вивчали методом рівноважного набухання [3,4]. Рівноважну ступінь набухання ($Q_{рсн}$) визначали ваговим методом [3] при кімнатній температурі 20°C після витримки взірців полімеру на протязі 48 год. в диметилформаміді (ДМФА) та розраховували за рівнянням [3]:

$$Q_{рсн} = \frac{\rho_n}{\rho_p} \cdot \frac{\rho_{наб} - \rho_{сух}}{\rho_{сух}}, \text{ де}$$

ρ_n і ρ_p – густина, відповідно, полімеру та розчинника;

$\rho_{наб}$, $\rho_{сух}$ - маса, відповідно набухлого та висушеного взірців полімеру.

Мірою кількісної характеристики тривимірної сітки зшитого полімеру [5] є середньо числова молекулярна маса відрізка полімерного ланцюгу між сусідніми вузлами (M_c), а його зворотна величина ($\nu = 1/M_c$) визначає концентрацію активних ланцюгів в одиниці об'єму зшитого полімеру або концентрацію поперечних зв'язків (N_c) між макромолекулами полімеру $N_c = A \cdot \rho_n / 2 M_c$, де А-число Авогадро.

Розрахунок структурних параметрів просторової сітки проводили за рівнянням Флорі-Ренера [4,5]:

$$\frac{1}{M_c} = \frac{\ln(1-V_r) + V_r + \mu V_r^2}{V_0 \rho (V_r^{1/3} - V_r / 2)}; \quad V_r = \frac{1}{1 + Q_{рсн}}, \text{ де}$$

V_r - об'ємна доля зшитого полімеру в набухломому гелі; μ - параметр Хагінса; V_0 - молярний об'єм розчинника.

В зв'язку з тим, що константа (μ) для досліджуваної нами системи невідома, ми її розраховували за рівнянням: $\mu = 1,1 - \alpha$ [6], де α - константа в рівнянні Марка - Хувінка ($[\eta] = K \cdot M^\alpha$). Константа α для СМА в розчині ДМФА знайдена і складає: $\alpha = 0,67$ та $0,75$ [6],

тобто в середньому $\alpha = 0,71$, що співпадає з літературними даними [7] для СМА в ацетоні ($\alpha = 0,71$). Тоді константа Хаггінса для СМА в ДМФА буде становити $\mu = 1,1 - 0,71 = 0,39$.

Результати та їх обговорення

Для надання структурі ФПК достатньої жорсткості та стійкості до набухання у воді та органічних розчинниках, проводили одночасно процеси іммобілізації ліполактину та зшивання макромолекул СМА м-фенілендіаміном при різній його концентрації ($C_{\text{м-ФДА}}=2,5; 5,0$ і $10,0$ %) та постійній концентрації ЛП ($C_{\text{ЛП}}=10\%$) (рис. 1).

Як видно із рис. 1 ступінь зшивання ($1/Q_{\text{рси}}$) суттєво залежить від концентрації м-ФДА і зростає із її збільшенням. При цьому спостерігається лінійна залежність між концентрацією зшиваючого агента і ступенем зшивання (рис. 2).

Залежність $1/Q_{\text{рси}}$ від часу протікання процесу (рис. 1) носить екстремальний характер і здатність до цього зростає із збільшенням концентрації м-ФДА. Таким чином, при утворенні тривимірної сітки на початковій стадії процесу протікає реакція ацилювання по ангідридних групах СМА, а на кінцевій стадії процесу - реакція деацилювання. В результаті концентрація активних ланцюгів (ν) і концентрація поперечних зв'язків між макромолекулами полімеру (N_c) досягає максимального значення за 90-120 хв. (рис. 1) та складає (при $C_{\text{м-ФДА}}=10\%$) відповідно: $\nu = 12,64 \cdot 10^{-4}$ моль/см³, а $N_c = 39,3 \cdot 10^{19}$ см⁻³ (рис. 3).

Молекулярна маса відрізка полімерного ланцюга між сусідніми вузлами зшивки (M_c) зменшується при зростанні концентрації м-ФДА і часу протікання реакції структурування та складає $M_c \approx 800-850$ (при $C_{\text{м-ФДА}}=10\%$) (табл. 1).

Для вивчення впливу концентрації ліполактину на ступінь зшивання макромолекул СМА були проведені досліді з одночасним структуруванням та іммобілізацією ЛП при $C_{\text{ЛП}} = 5, 10, 20, 40$ % та постійній концентрації $C_{\text{м-ФДА}} = 10\%$ (рис. 4,5).

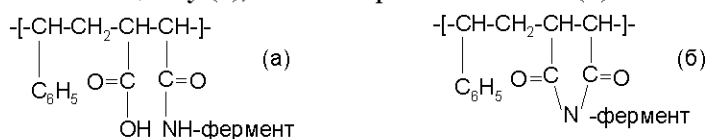
Як видно з одержаних даних (рис. 4), залежність $1/Q_{\text{рси}}$ від часу протікання процесу (τ) має також екстремальний характер як і в попередніх дослідіах (рис. 1). При цьому ступінь структурування ($1/Q_{\text{рси}}$) не змінюється із зростанням концентрації ЛП та описується кривою, яка паралельна осі абсцис (рис. 5).

Таким чином, ступінь структурування системи не залежить від $C_{\text{ЛП}}$ і визначається виключно $C_{\text{м-ФДА}}$ (рис. 1). Це вказує на те, що при протіканні двох конкуруючих реакцій, швидкість реакції ацилювання стиромалем м-фенілендіаміну значно вища ніж ліполактину, тобто м-ФДА є більш активним субстратом по відношенню до ангідридних груп СМА, ніж ЛП, що можна пояснити наявністю в молекулі м-ФДА двох електронодонорних аміногруп.

В подальшому була вивчена залежність вмісту прищепленого білка в полімері (B_p) від концентрації ЛП у вихідній реакційній суміші ($C_{\text{ЛП}}=5, 10, 20, 40\%$) при незмінній концентрації $C_{\text{м-ФДА}} = 10\%$ та результати досліджень наведені на рис. 6.

Одержані дані свідчать про те, що кількість білка в полімері зростає із збільшенням його концентрації у вихідній реакційній суміші і при $C_{\text{ЛП}} = 40\%$ досягає 92%. Це вказує на те, що подальше збільшення $C_{\text{ЛП}}$ не доцільне внаслідок того, що при цьому майже всі ангідридні групи СМА вступають в реакцію з аміногрупами м-ФДА та ЛП.

В процесі утворення КПЗ між макромолекулою СМА та ліполактином виникає сорбційно-ковалентний тип зв'язку. По мірі протікання реакції ацилювання останній руйнується та поступово зростає кількість ковалентних зв'язків між полімерною матрицею та ферментом. В результаті утворюються ФПК наступної структури: з руйнуванням ангідридного п'ятичленного циклу (а), або із збереженням його (б):



Таблиця 1

Параметри просторової сітки стиромало, модифікованого ліполактином ($C_{\text{лп}}=10\%$) та м-фенілендіаміном (м-ФДА)

№ п/п	Вміст м-ФДА, %	Час структурирування, τ , хв.	Ступінь зшивання, $1/Q_{\text{реш}}$	Об'ємна доля полімеру в набухлому гелі, V_r	Концентрація активних ланцюгів в одиниці об'єму, $\nu \cdot 10^{-4}$ моль/см ³	Концентрація поперечних зв'язків, $N_c \cdot 10^{19}$ см ⁻³	Молекулярна маса ланцюга між сусідніми зшивками, M_c
1	10,0	24	0,269	0,228	2,14	8,34	3785
2	10,0	40	0,419	0,295	5,04	15,90	1985
3	10,0	60	0,593	0,372	8,97	28,35	1115
4	10,0	70	0,693	0,409	11,72	37,20	850
5	10,0	125	0,726	0,419	12,64	39,30	793
6	5,0	30	0,151	0,131	0,76	2,40	13150
7	5,0	60	0,261	0,207	2,07	6,57	4850
8	5,0	125	0,276	0,216	2,19	6,93	4562
9	5,0	225	0,324	0,244	3,12	9,86	3206
10	5,0	300	0,354	0,261	3,75	11,82	2676
11	2,5	60	0,222	0,181	1,65	5,22	6060
12	2,5	120	0,260	0,206	2,06	6,51	4854
13	2,5	210	0,296	0,230	2,63	8,32	3802
14	2,5	375	0,316	0,240	2,92	9,23	3425

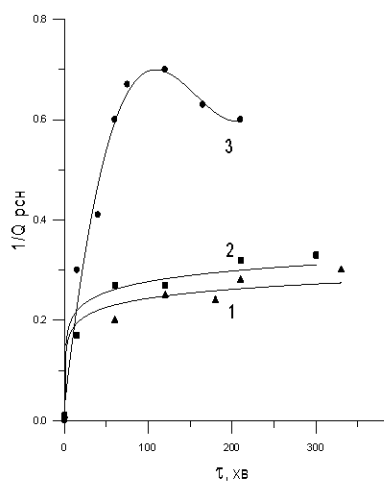


рис. 1

Рис.1. Залежність ступеня зшивання ФПК від часу структурирування при

$C_{\text{м-ФДА}}$, % = 2,5 - 1; 5,0 - 2; 10,0 - 3; $C_{\text{лп}} = 10\%$, $T=20^\circ\text{C}$.

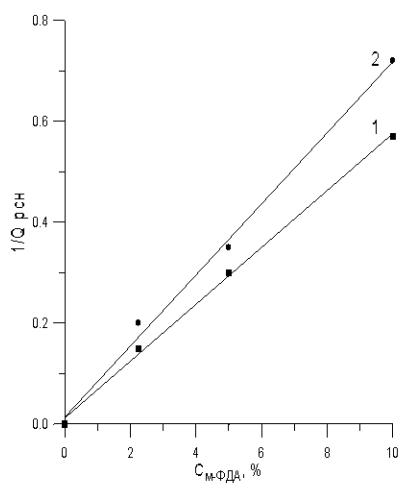


рис. 2

Рис.2. Залежність ступеня зшивання ФПК від концентрації м-фенілендіаміну при часі структурирування, хв.: 1 - 60; та 2 - 120; $C_{\text{лп}} = 10\%$.

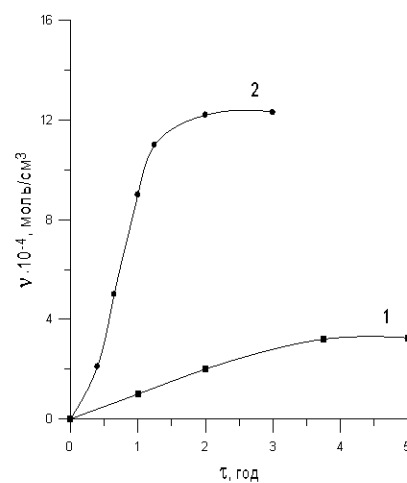


рис. 3

Рис.3. Залежність кількості активних ланцюгів від часу структурирування при

$C_{\text{м-ФДА}}$, % = 5 - 1; 10 - 2; при $C_{\text{лп}} = 10\%$.

Як відомо, співполімер стиролу (С) з малеїновим ангідридом (МА) співполімеризується у співвідношенні С:МА (1:1). Тому сегмент полімерного ланцюгу буде мати брутто-формулу $C_{12}O_3H_{11}$, а отже $MM = 203$. Причому сегмент містить одну ангідридну групу, яка здатна вступати в реакцію ацилювання, тому для того, щоб мав місце процес чергування (зшивання – прищеплення - зшивання), необхідно 3-4 сегменти, тобто відстань між двома сусідніми зшивками, а отже і MM , з певним припущенням буде складати $M_c \approx 609-812$.

Як видно, розраховані значення M_c досить близькі до експериментально знайдених нами методом набухання максимальних значень M_c для досліджуваної системи з 10% м-ФДА, які приведені в табл. 1 ($M_c = 800-850$). Таким чином, з кожними двома ангідридними групами СМА, при $C_{m-фДА} = 10\%$, проходить один акт прищеплення ферменту до макромолекули СМА та один акт зшивки полімерних ланцюгів м-фенілендіаміном. Із зменшенням концентрації м-ФДА до 2,5 - 5,0%, M_c відповідно збільшується (табл. 1), тобто утворюється більш рідка просторова сітка. Тому 10% концентрація м-ФДА вихідної суміші є оптимальною. В процесі прищеплення ферменту до полімерного ланцюгу, при зростанні концентрації ЛП у вихідній реакційній суміші (від 10 до 40%) кількість актів прищеплення буде збільшуватись при незмінній концентрації поперечних зв'язків (N_c), оскільки концентрація ЛП, як було показано раніше (рис. 4,5), не впливає на реакцію структурування.

Таким чином, вивчений процес одночасного структурування та іммобілізації системи СМА – ЛП – м-ФДА та структура тривимірної просторової сітки, яка при цьому виникає. В результаті одержані структуровані ФПК, які містять в полімерній матриці прищеплені фрагменти ліполактину. Синтезовані ФПК мають поліпшену механічну міцність і пролонговану дію та активність, яка достатня для їх практичного застосування як біокатализаторів процесів гідролізу відходів оліежирової промисловості.

РЕЗЮМЕ

Дана робота присвячена вивченню процесу одночасного структурування та іммобілізації трикомпонентної системи: стиромаль - ліполактин - м-фенілендіамін, а також дослідженню властивостей одержаних структурованих фермент-полімерних комплексів (ФПК), які містять в макромолекулах полімеру фрагменти ліполактину.

РЕЗЮМЕ

Данная работа посвящена изучению процесса одновременного структурирования и иммобилизации трехкомпонентной системы: стиромаль - липолактин - м-фенилендиамин, а также исследованию свойств структурированных фермент - полимерных комплексов (ФПК), которые содержат в макромолекулах полимера фрагменты липолактоина.

SUMMARY

The given paper is devoted to study the process of simultaneous structuring and immobilization of the three-component system: stiomal - lipolactyn - m-phenylendiamine, and also research the features of structured enzyme -polymer complexes (EPC) including in macromolecules of polymer lipolactyn fragments.

ЛІТЕРАТУРА

1. Чуйко Л.С., Краюткіна О.М., Мартинюк Н. Б. Ковалентна іммобілізація ферментного препарату ліполактину на співполімері стиролу з малеїновим ангідридом // Наукові записки Тернопільського державного педуніверситету ім. В.Гнатюка. Серія: Хімія. 1998. 2(6). С.63-68.
2. Lowry O.H., Rosenberg N.J., Farr A.L., Randal R. B. // J. Biol. Chem. 1951. P. 193-265.
3. Шварц А.Г.// Каучук и резина. 1957. №7. С.31-34.
4. Flory J., Rehner// J.Chem. Phys. 1943. Vol.11. P.521.
5. Догадкин Б.А. Химия эластомеров. М.: Химия, 1972. 341 с.
6. Ван-Кревелин Д.В. Свойства и химическое строение полимеров. М.: Химия, 1976. 414 с.
7. Рзаев З.М. Полимеры и сополимеры малеинового ангидрида. Баку.: Элм., 1984. 160 с.