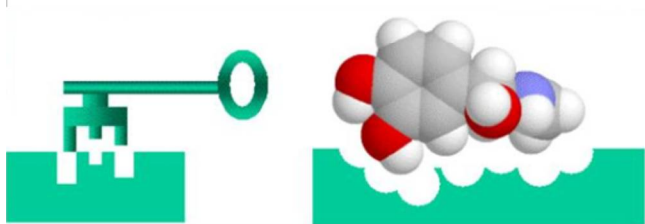

Ферментативный катализ в синтезе полимеров



Доклад подготовили
магистранты 1-ого курса
Института Химии СПбГУ
Дмитрий Карцев
Владислав Соколов
Вук Опанчина

Приветствую вас уважаемые коллеги. Сегодня мы рады представить вам свой доклад на тему: “Ферментативный катализ в синтезе полимеров”.

Ферменты или энзимы являются веществами белковой природы, которые используются живыми организмами для катализа биохимических реакций. [1]



Источником фермента может служить любой живой объект.

1. S. Shoda, H. Yuama, J. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi, Chem.Rev., 116 (2016), 2307

Ферменты - это катализаторы, используемые живыми организмами для ускорения биохимических реакций. Сила ферментов была известна людям на протяжении веков, прежде всего в производстве алкогольных напитков. Тем не менее, работа ферментов не была понята в то время. Для поддержания жизнедеятельности живым организмом необходим синтез чрезвычайно сложных молекул при крайне строгих значениях pH и температуре, при том без образования побочных веществ. И эволюция справилась с этой задачей великолепно: Бактерии, живущие на корневищах бобовых растений способны фиксировать азот из воздуха, а в лабораториях это можно осуществить только в очень жёстких условиях; да и процесс репликации ДНК - воспроизведение сложнейших молекул осуществляется практически безошибочно.

Большинство ферментов считаются особым классом белков, которые являются природными полимерами и выполняют многочисленные функции в организмах. С точки зрения макроструктуры ферментативные полимеры рассматриваются как обычные белки. Таким образом выделяют четыре уровня их строения.

Можно выделить два типа ферментативной полимеризации: *in vivo* и *in vitro*. Примеры ферментативной полимеризации *in vivo* включают образование ДНК и белков. Для производства этих полимеров обычно необходим сложный метаболизм, который часто приводит к очень чистым и четко определенным материалам. Напротив, ферменты могут быть

выделены из живых организмов, таких как бактерии, и применены для стимулирования специфических реакций без потребности всей клетки в организме. Этот ферментативный процесс упоминается как *in vitro* катализ [1].

Для классификации всего огромного массива ферментов было предложено разделение их на 6 групп в соответствии с характером их активности. Стоит заметить, что чаще всего в процессах *in vitro* используются ферменты лишь из трёх упомянутых групп [1].

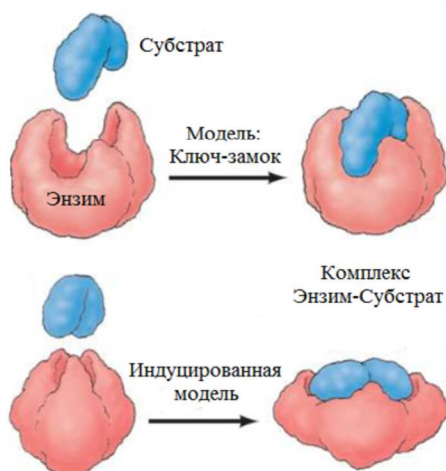


Рисунок 1. Примеры различных структур активных центров

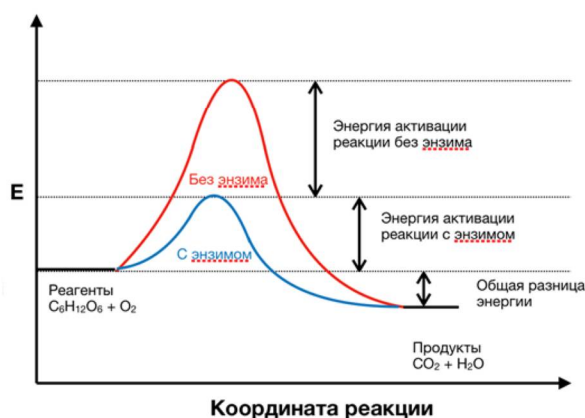


Рисунок 2. Графическое представление ферментативной реакции

1. S. Shoda, H. Yuama, J. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi, Chem.Rev., 116 (2016), 2307

Ферменты являются замечательными катализаторами, осуществляющими с большой скоростью и 100%-м выходом химические реакции, порой неосуществимые в мягких условиях в присутствии классических катализаторов.

Главной особенностью ферментативной реакции является то, что она протекает в составе активного комплекса, образованного в результате связывания субстрата с определённым участком молекулы фермента (**активным центром или центром связывания**), к которому субстрат обладает специфическим сродством. Взаимодействие между ферментом и субстратом обычно осуществляется с помощью нековалентных связей, например, электростатических и гидрофобных сил, водородных связей и т.д. Активный центр является, следовательно, весьма сложной структурой, которая может составлять существенную часть молекулы фермента. Часто он имеет форму щели, в которой размещается субстрат. Поскольку фрагменты субстрата связываются с конкретными участками активного центра фермента, субстрат фиксируется на ферменте, принимая определённую конфигурацию. Чтобы различные группы субстрата, участвующие в связывании, могли взаимодействовать с соответствующими группами фермента, должно произойти некоторое изменение как субстрата, так и фермента; масштаб этих изменений зависит от жёсткости химических структур молекул фермента и субстрата. Связывание субстрата с активным центром фермента должно быть достаточно легко обратимым, в противном случае активный центр окажется заблокированным первой же

присоединившейся молекулой субстрата, и каталитический цикл не сможет осуществиться.

Механизмы химического и ферментативного катализа сходны. Доминирующей концепцией в современной науке является теория переходного состояния. Данная теория рассматривает два состояния реагентов – исходное (основное) и переходную структуру наименее стабильную, которой соответствует максимум энергии. Скорость любой химической реакции пропорциональна концентрации молекул, находящихся в переходном состоянии. Но переходного состояния может достичь только та часть молекул исходного вещества, которая обладает достаточной энергией для преодоления энергетического барьера. Основная функция любого катализатора, в том числе фермента - снижение энергетического барьера реакции. Катализатор ускоряет химическую реакцию через образование фермент-субстратного комплекса, которого соответствует более низкая энергия активации. Таким образом, в присутствии катализатора (фермента), значительная часть молекул данного субстрата вступает в реакцию в единицу времени.

Сходства с неорганическими катализаторами

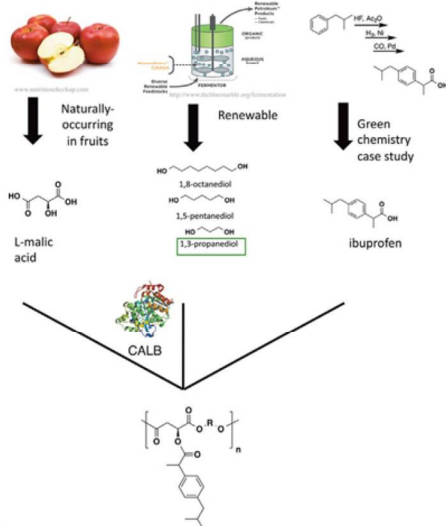
- Энзимы не входят в состав конечных продуктов реакции;
- Такого рода катализаторы не смещают положения равновесия;
- Ферменты не могут возбудить реакции, протекание которых противоречит законам термодинамики, они ускоряют только те реакции, которые могут протекать и без них.

Специфические свойства ферментов

- По своей природе ферменты являются белками;
- Ферменты обладают узкой специфичностью;
- Большинство катализируемых ферментами реакций высокоэффективны, они протекают в $10^8 - 10^{14}$ раз быстрее, чем некатализируемые реакции.
- Конформационная лабильность;
- Активность ферментов может регулироваться.

На следующем слайде представлен обобщённый вывод по свойствам ферментов и ферментативных реакций. По принципу действия ферменты имеют сходства с классическими катализаторами, однако, обладают и своими особенностями, позволяющими более селективный синтез в мягких условиях. Стоит сказать, что использование ферментов бывает осложнено ограничениями по условиям синтеза, ведь структура их активного центра зависит от матрицы в которую помещён фермент. Также стоит отметить, что в настоящий момент возможен только биологический синтез ферментов, что несколько ограничивает мощности их производства.

1) Полимеры - носители биологически активных веществ



Преимущества ферментативного катализа:

- 1) замена экологически опасных химических веществ более безопасными материалами;
- 2) биоразложение продуктов;
- 3) использование возобновляемых ресурсов;
- 4) удаление растворителей.

Рисунок 3. Ферментативный синтез полимера содержащего ибупрофен [2]

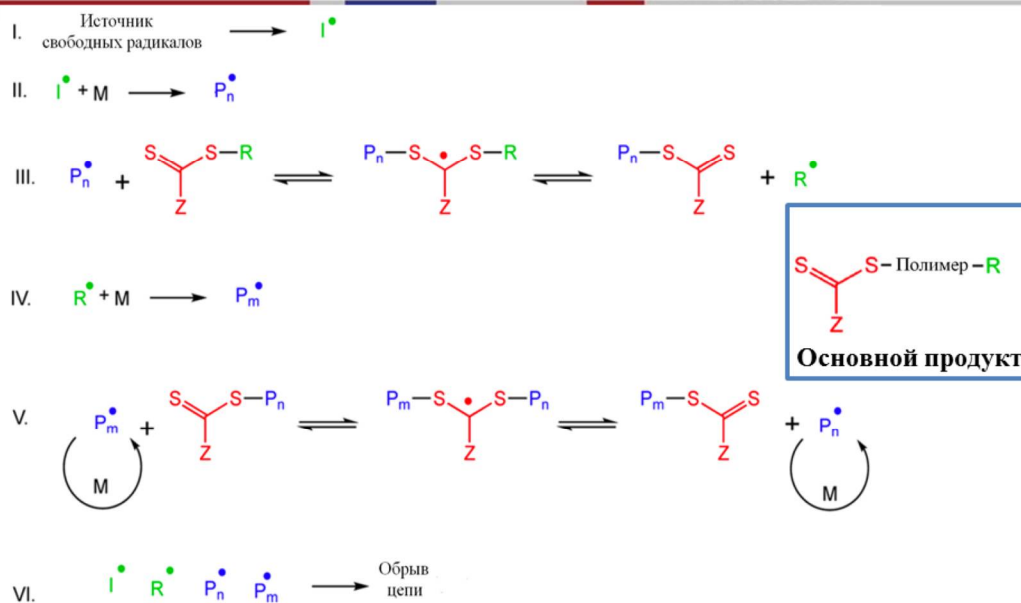
2. D.N. Stebbins, W. Yu, K.E. Uhrich, *Macromol. Biosci.*, 15 (2015), 1115

Перейдём к примерам исследований ферментативного катализа в синтезе полимеров. В настоящее время наблюдается неуклонный рост интереса к ферментативному получению органических соединений *in vitro*. Это обусловлено тем, что многие ферменты можно использовать не только для преобразования их природных субстратов, но и для модификации широкого диапазона искусственных соединений, что позволяет получать на их основе различные новые соединения и материалы.

Использование полимеров для доставки биоактивных веществ, таких как лекарственные средства, широко изучалось, однако, большинство исследований было сосредоточено на физическом включении лекарств в полимеры или химической модификацией готовых полимеров. В системах, где лекарственное средство химически включено в полимер, часто, результирующие полимеры не являются биоразлагаемыми, что приводит к потенциальным неблагоприятным эффектам при использовании *in vivo*. Метод модифицирования полимерных структур включением лекарственных мономеров допускает более высокую загрузку лекарственного средства и возможность изменения скоростей высвобождения и других свойств полимера. Получение подобных полимеров с заданными параметрами содержания активного вещества удобно при использовании ферментов в процессе полимеризации. В данной работе авторами описана разработка полимерного лекарственного средства, мономер которого содержит структуру ибупрофена. Фермент (N435) использовался для получения трех различных сложных полиэфигов на основе ибупрофена и яблочной кислоты

с использованием диолов в качестве сомономеров.

Эта работа направлена на: (1) замену экологически опасных химических веществ более безопасными материалами, (2) удаление растворителей, (3) биоразложение продуктов, (4) использование ферментов и (5) использование возобновляемых ресурсов [2]. Исследование клеточной совместимости и скорости высвобождения активного вещества *in-vitro* показали положительные результаты.



4. S. Perrier, *Macromolecules*, 50 (2017), 19, 7433

Пожалуй, о теме следующего слайда можно делать отдельную презентацию. Однако, в нашем случае мы собираемся лишь ознакомить слушателей с предметом RAFT-полимеризации для успешного восприятия дальнейшей информации. Со времени первых сообщений в 1998 году [3][4], была признана эффективность методики RAFT-полимеризации для синтеза комплексных полимерных структур с заданными характеристиками. По сути RAFT или RDRP – полимеризация является методикой контролируемой (живой) радикальной полимеризации.

Специфика методики подразумевает сведение к минимуму процессов обрыва цепи. Таким образом рост цепи происходит постепенно, а дисперсия продуктов по размеру полимерной цепи минимальна. Схема процесса представлена на слайде. RAFT – полимеризация характеризуется особым RAFT – агентом, представляющим из себя тиокарбонилтио компонент, а также наличием источника радикалов, представляющего из себя радикальный инициатор. Сам процесс имеет набор характерных стадий включающий: стадию инициации, стадию обрыва цепи, а также ряд стадий последовательного роста цепи, достигаемого обменом между активными и неактивными участками полимеров. Получение основного продукта, указанного на слайде, достигается при достижении полной конверсии мономера.

RAFT процесс характеризуется высокой степенью дисперсии продуктов по размеру цепи, а также широким выбором возможных мономеров. Самым важным в рамках нашего доклада является возможность тонкой настройки данного процесса варьированием RAFT-агента и радикального инициатора [4].

Ферментативный катализ в RAFT - полимеризации 7

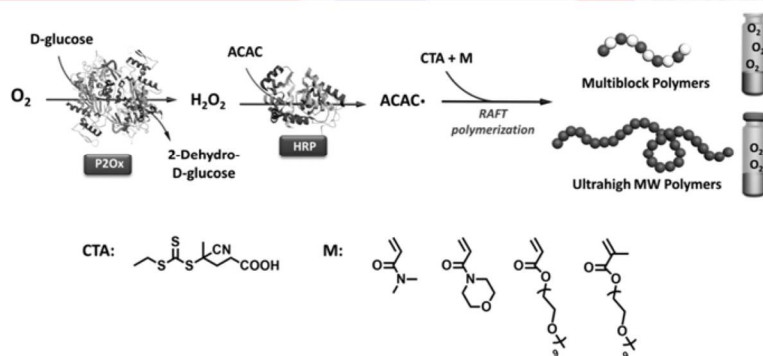


Рисунок 4. Реакция полимеризации [5]

Указанный метод имеет несколько ключевых преимуществ, включая:

- 1) Возможность проведения RAFT полимеризации в присутствии кислорода
- 2) Проведение реакции в мягких условиях
- 3) Высокая эффективность процесса (Скорость реакции, степень конверсии мономера)
- 4) Экологически чистый процесс

Применение полученных полимеров:

- 1) биораспознавание;
- 2) катализ;
- 3) упорядоченные материалы;
- 4) хранения информации

5. Z. Liu, Y. Lv, Z. An, *Angew. Chem.*, 56 (2017), 13852

На следующем слайде представлен пример каскадного ферментативного катализа реакции RAFT – полимеризации. Ферментативный катализ уже давно используется для “зеленого” синтеза полимеров, но только недавно ферменты стали использовать для инициации RAFT полимеризации для синтеза многоблочных полимеров. Синтез четко определенных мультимблочных и сверхвысокомолекулярных полимеров является ощутимой проблемой для контролируемой радикальной полимеризации (RDRP). Еще более сложной задачей является синтез этих экстремальных полимеров в присутствии кислорода. Авторами следующей статьи разработана новая методика, включающая ферментативный каскадный катализ, для синтеза многоблочных полимеров в открытых сосудах с прямым воздействием воздуха и сверхвысокомолекулярных полимеров в закрытых сосудах без предварительной дегазации. Успех этой методики основан на исключительной способности к деоксигенации пиранозооксидазы (P2Ox) и мягкой, но эффективной генерации радикалов пероксидазой хрена (HRP) [5].

Предложенный метод каскадного ферментативного катализа представляет собой значительный прогресс в RDRP полимеризации, обладая внушительными достоинствами. Таким образом была показана возможность проведения реакции получения моно- и мультимблочных полимеров определенной структуры в RAFT-полимеризации в мягких условиях. При этом, процесс проводился в присутствии кислорода, а использование катализаторов биологического происхождения

подразумевает экологичность процесса.

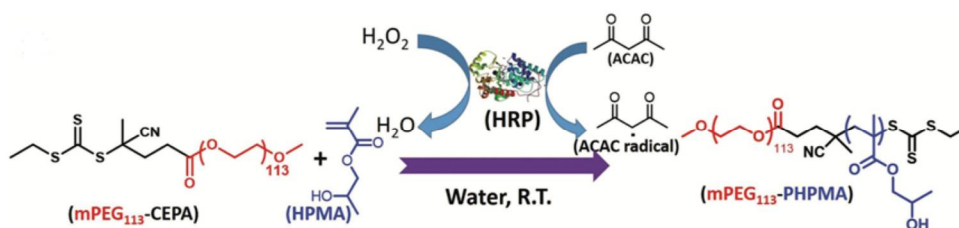


Рисунок 5. Ферментативно-катализируемая RAFT-полимеризация [6]

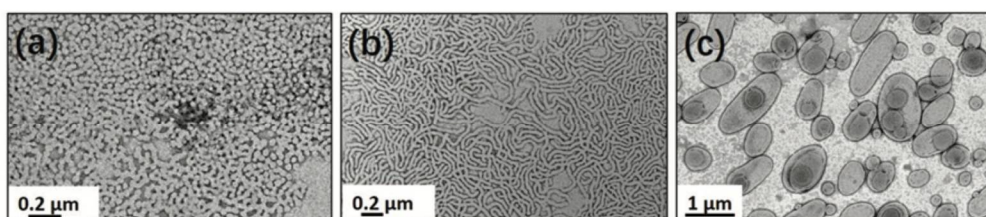


Рисунок 6. Полимерные нано-объекты из диблок сополимеров: а – сферы, б – черви, с – везикулы [6]

6. J. Tan, Q. Xu, X. Li, J. He, Y. Zhang, X. Dai, L. Yu, R. Zeng, L. Zhang, *Macromol. Rapid Commun.*, 39 (2018), 1700871

Синтез многоблочных сополимеров в процессе RAFT полимеризации был использован в следующем исследовании для получения полимерных нано-объектов различной морфологии. Последние имеют множественные приложения в катализе, доставке лекарств, а так же в качестве нанореакторов. Согласованное саморазвитие блок сополимеров является действенным методом в синтезе полимерных сфер, везикул и других нано-объектов. В то же время ферментативный катализ продемонстрировал свои преимущества при селективном синтезе широкого спектра блок сополимеров в водной среде в процессах RAFT-полимеризации. В изученной работе авторы предложили методику RAFT полимеризации 2-гидроксипропил метакрилата с использованием катализаторов биологического происхождения.

В соответствии с иллюстрацией на слайде для проведения процесса был использован RAFT-агент на основе монометокси поли(этилен гликоля) $m\text{PEG}_{113}$ маско-СТА. Свободные радикалы генерировались окислением ацетил-ацетона (ACAC) пероксидом водорода под действием пероксидазы хрена (HRP). Как можно заметить, в ходе синтеза полимерная цепь расширяется с включением 2-гидроксипропил метакрилата и образованием диблок сополимеров. При достижении критической длины диблок претерпевает саморазвитие с образованием различных полимерных нано-объектов, морфология которых в случае данного процесса регулируется концентрацией мономера. 99-процентная конверсия манометра была достигнута за 20 минут, что значительно быстрее показателей похожих

процессов с использованием классических катализаторов [6][8].

- ✓ Ферменты представляют из себя белки, а их активность обусловлена структурой белковой молекулы. Субстраты обладают сродством к активному центру фермента. Взаимодействие субстрата с ферментом приводит к образованию комплекса.
- ✓ Полимеризация может проводиться в мягких условиях с учетом давления, температуры и pH, что делает реакции ферментации очень энергоэффективными;
- ✓ Селективность работы ферментов открывает новые направления к точному синтезу полимеров;
- ✓ Ферменты считаются «зелеными», нетоксичными катализаторами, которые могут удовлетворить растущие требования в отношении коммерческих организаций;
- ✓ Показатели эффективности реакций с участием ферментов зачастую выше чем в случае использования классических катализаторов
- ✓ Ферментативный катализ в синтезе полимеров является современным направлением исследований. Широко изученными являются аспекты использования ферментов в контролируемых радикальных полимеризациях, в процессах поликонденсации, а также в реакциях модификации полимерной цепи.

На слайде представлены основные выводы по докладу. В первую очередь, ферменты являются катализаторами биохимических реакций, обеспечивающих обмен веществ живых организмов, однако, также возможно использовать их в лабораторных и промышленных синтезах. Изучив весь список представленных в докладе источников я могу сказать, что ферментативный катализ в синтезе полимеров является перспективным направлением исследований. Не говоря об очевидных преимуществах использования ферментов в синтезе, включающих экологичность и высокие показатели эффективности, специфика активности ферментов позволяет протекание привычных процессов полимеризации с большей селективностью.

Список литературы:

1. S. Shoda, H. Yuama, J. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi, *Chem.Rev.*, 116 (2016), 2307; **IF 54.301**
 2. D.N. Stebbins, W. Yu, K.E. Uhrich, *Macromol. Biosci.*, 15 (2015), 1115; **IF 2.895**
 3. J. Chiefari, Y.K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T.P.T. Roshan, T.A. Mayadunne, G.F. Meijs, C.L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S.H. Thang, *Macromolecules*, 31 (1998), 5559; **IF 5.914**
 4. S. Perrier, *Macromolecules*, 50 (2017), 19, 7433; **IF 5.914**
 5. Z. Liu, Y. Lv, Z. An, *Angew. Chem.*, 56 (2017), 13852; **IF 12.257**
 6. J. Tan, Q. Xu, X. Li, J. He, Y. Zhang, X. Dai, L. Yu, R. Zeng, L. Zhang, *Macromol. Rapid Commun.*, 39 (2018), 1700871; **IF 4.078**
 7. L. Tang, L.A. Navarro, J.A. Chilcote, S. Zauscher, *Angew. Chem.* 56 (2017), 6778; **IF 12.257**
 8. G. Gody, T. Maschmeyer, P.B. Zutterlund, S. Perrier, *Macromolecules*, 47(2014), 3451; **IF 5.914**
-

На следующем слайде представлен список литературы для более подробного ознакомления.

Спасибо за внимание!

Спасибо за внимание!