

EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED 26. KOIDE
KEEMIA * GEOLOGIA 1977, Nr. 4

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ 26
ХИМИЯ * ГЕОЛОГИЯ. 1977, № 4

УДК 577.155.002.237

В. ФЕДОСЕЕВ, М. МАНДЕЛЬ, А. КЕСТНЕР

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ХИМОТРИПСИНА И БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗЫ НА ПОРИСТОМ КРЕМНЕЗЕМЕ С ПОМОЩЬЮ ДИАЗИДА АДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ

V. FEDOSSEJEV, M. MANDEL, A. KÖSTNER. KÖMOTRÜPSIINI JA PENITSILLIINAMIDAASI
IMMOBILISEERIMINE ADIPIINHAPPEDIASIIDI ABIL KROMOSORB P PINNALE

V. FEDOSEYEV, M. MANDEL, A. KÖSTNER. IMMOBILIZATION OF CHYMOTRYPSIN AND
PENICILLINAMIDASE ON CHROMOSORB P WITH THE HELP OF ADIPIC ACID DIAZIDE

В настоящее время для ковалентной иммобилизации ферментов используется исключительно большое число самых различных носителей и сшивающих бифункциональных реагентов [1-3]. Несмотря на значительную изученность данного вопроса, нами был найден, синтезирован и использован для иммобилизации химотрипсина (ХТ) и бензилпенициллинамидазы (БПА) ранее не применявшийся для этой цели бифункциональный реагент — диазид адипиновой кислоты (ДАК). Выбор данного реагента обусловлен простотой его синтеза и тем, что производится он из легко доступного отечественного препарата диметилового эфира адипиновой кислоты. Используемый в качестве бифункционального сшивающего реагента ДАК участвует в реакциях связывания фактически как гексаметилдиизоцианат. В качестве одного из носителей служил ранее никем не испытанный крупнопористый диатомит хромосорб Р. Пористые диатомиты — дешевый и доступный материал и по содержанию окиси кремния близки к обыкновенному стеклу, т. е. содержат примерно 90% SiO₂.

Экспериментальная часть

Использованные реактивы и препараты. Хромосорб Р — препарат фирмы «John Manville» (США) (размер частиц 100—120 меш., диаметр пор 1000—10 000 Å, удельная поверхность — 1 м²/г, химический состав — 90% SiO₂, 4% Al₂O₃, 1,5% Fe₂O₃, 0,62% TiO₂, 0,5% CaO, 0,5% MgO).

α-химотрипсин — кристаллический препарат фирмы «Реанал» (Венгрия) активностью по АТЭЭ 240 Е/мг.

БПА — раствор ферментного препарата из *E. coli* в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,5) производства Рижского завода медицинских препаратов активностью 9000 Е/мл и с содержанием белка 250 мг/мл.

Этиловый эфир α-N-ацетил-L-тирозина (АТЭЭ) — препарат фирмы «Реанал» (Венгрия).

Калиевая соль бензилпенициллина (БП) — производство Саранского завода медицинских препаратов.

Гидразингидрат — реактив Московского химического завода им. П. Л. Войкова.

Диметилловый эфир адипиновой кислоты — реактив Харьковского завода химических реактивов.

γ -аминопропилтриэтоксисилан — препарат АГМ-9.

Все реактивы использовались без дополнительной очистки.

Активность ферментов определялась рН-статически при 25 (в случае ХТ) и 40°C (в случае БПА). Измерения производились путем введения проб свободного или связанного ферментов в реакционный сосуд, содержащий в случае ХТ 15 мл 0,01 М АТЭЭ в 0,02 М трис/НСl-буфере рН 8,0) с растворенными в нем 0,2 М КСl и 0,01 М АТЭЭ и в случае БПА 10 мл $1,7 \times 10^{-2}$ М БП (рН 7,5). Ферментативная активность определялась по начальной скорости гидролиза АТЭЭ или БП, измеряемой как расход за минуту (час) NaOH, используемой для нейтрализации АТЭЭ или фенилуксусной кислоты, выделяющихся в ходе гидролиза.

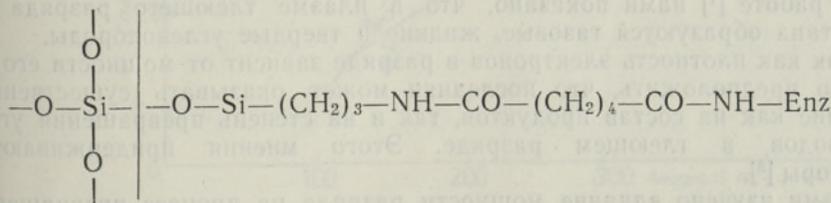
Синтез ДАК проводили по методике аналогичной [4], используемой для синтеза азида фенилуксусной кислоты из ее этилового эфира. Чистый ДАК — маслянистая жидкость, затвердевающая при 0° и взрывающаяся при трении или нагревании ее растворов [5].

Силанизация хромосорба проводилась по методике [6].

Связывание ферментов с носителем. Перед связыванием ферментов с носителем последний активируют бифункциональным реагентом, для чего хромосорб *P*, активированный γ -аминопропилтриэтоксисиланом, вносят в эфирный раствор ДАК и оставляют в нем на 10—12 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Затем носитель отделяют от раствора, промывают этиловым эфиром и осушают под вакуумом. Связывание ХТ с носителем осуществлялось внесением навески активированного хромосорба в раствор фермента в 0,10 М фосфатном буфере (рН 7,1), причем соблюдались следующие соотношения: 2 мл буфера и 10 мг фермента на 1 г носителя. В случае БПА на 1 г хромосорба бралось 10 мл раствора фермента в 0,1 М фосфатном буфере активность 9000 Е/мл. Взвесь носителя в ферментном растворе оставляют в холодильнике (4—6°) при постоянном перемешивании на 24 ч, после чего носитель отделяют от раствора, промывают сперва буферным раствором (рН 5,0—6,5), затем 1 М раствором NaCl в 0,001 М НСl и, наконец, 0,001 М НСl в случае ХТ и водой в случае БПА. Препараты хранятся во влажном состоянии в герметичном сосуде при температуре 4—6°.

Результаты и обсуждение

Ковалентно связанные на хромосорбе *P* (активность 100 Е и 960 Е на 1 г влажного препарата) ХТ и БПА характеризуются наличием 12-членного связывающего мостика, строение которого показано ниже.



Вследствие выраженной крупнопористости носителя препараты отличаются хрупкостью и пониженным диффузионным сопротивлением и

могут быть использованы в колоночном режиме. Температурный оптимум иммобилизованных ХТ и БПА равен 50°, что выше оптимума свободных ферментов. рН-оптимум иммобилизованной БПА равен 8,0 и смещен в щелочную сторону по сравнению с рН-оптимумом свободного фермента, у которого он равен 7,5. рН-оптимум ХТ по сравнению с рН-оптимумом свободного фермента смещен в щелочную сторону на одну единицу и равен 9,0.

Иммобилизованные ферменты стабильны при хранении их во влажном состоянии при температуре 4—6° в 0,001 М НСІ. Препарат иммобилизованного ХТ после пятидесятилетнего хранения сохранил 64% первоначальной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Orth, H. D., Brümmer, H., *Angew. Chem.*, **84**, 319 (1972).
2. Grysckiewicz, J., *Folia biol.*, **49**, 119 (1971).
3. Кёстнер А. И., Крезн М. И., Производство и применение иммобилизованных ферментов. Обзорная информация ЭстНИИ научно-технич. информ. и техн.-экон. иссл., Таллин, 1973.
4. Органические синтезы, **3**, М., 1954, с. 3.
5. Beilstein, S., *Handbuch der Organischen Chemie*, Bd. II, 1929, S. 278.
6. Weetall, H. H., Hersh, L. S., *Biochim. Biophys. Acta*, **185**, 464 (1969).

Институт химии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
18/XII 1975

EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED 26. KÕIDE
KEEMIA * GEOLOOGIA 1977, Nr. 4

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР, ТОМ 26
ХИМИЯ * ГЕОЛОГИЯ. 1977, № 4

УДК 546.13

Ю. КАУП, К. ТАЮР, О. ЭЙЗЕН

ВЛИЯНИЕ МОЩНОСТИ РАЗРЯДА НА ПРЕВРАЩЕНИЕ n-ПЕНТАНА В ПЛАЗМЕ ВЧ-ТЛЕЮЩЕГО РАЗРЯДА

J. KAUP, K. TAJUR, O. EISEN. HUUMLAHENDUSE VOIMSUSE MÕJUST n-PENTAANI MUUNDUMISELE

J. KAUP, K. TAJUR, O. EISEN. INVESTIGATION OF THE DEPENDENCE OF THE POWER LEVEL OF GLOW DISCHARGE ON THE DECOMPOSITION OF n-PENTANE

В работе [1] нами показано, что в плазме тлеющего разряда из n-пентана образуются газовые, жидкие и твердые углеводороды.

Так как плотность электронов в разряде зависит от мощности его [2], можно предположить, что последняя может оказывать существенное влияние как на состав продуктов, так и на степень превращения углеводородов в тлеющем разряде. Этому мнению придерживаются и авторы [3].

Нами изучено влияние мощности разряда на процесс превращения n-пентана в плазме ВЧ-тлеющего разряда. Использовали аппаратуру, аналогичную описанной в работе [1]. Газами-носителями служили водо-