

род, гелий и аргон. Продукты превращения *n*-пентана анализировали методом газо-жидкостной хроматографии [1]. Мощность разряда варьировали от 140 до 340 мА по анодному току ВЧ-генератора, при этом каждый опыт повторяли три раза. Полученные результаты приведены на рис. 1 и 2.

По этим данным с увеличением мощности разряда степень превращения *n*-пентана в плазме ВЧ-тлеющего разряда увеличивается на 71% (рис. 1). Кроме того, выяснилось, что на степень превращения *n*-пентана в тлеющем разряде влияет и природа газа-носителя. Оказалось, что гелий и водород близки по своему действию. Аргон в некоторой степени отличается от них, что, в частности, наблюдалось при мощности разряда выше 300 мА. На это указывается в [4]. С увеличением мощности разряда, т. е. с увеличением степени превращения *n*-пентана, увеличивается в основном выход фракции углеводородов  $C_1-C_4$  (рис. 2). Анализ этой фракции показал, что повышается главным образом содержание пропана, этилена и ацетилена. Увеличение выхода углеводородов  $C_3$  и  $C_2$  во фракции  $C_1-C_4$  позволяет предположить, что разрыв связи C—C происходит, вероятно, ближе к центру молекулы  $C_5$ . Последнее, в свою очередь, свидетельствует о сходстве плазмо-химической реакции с пиролизом [4].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кауп Ю., Таур К., Эйзен О., Изв. АН ЭССР, Хим. Геол., 26 (1977).
2. Janzen, G., Staub, W., Kruppa, G., Schucker, U., Suhr, H., Ber. Bunsen. Ges. Phys. Chem., 78, 44 (1974).
3. Pedrow Yii-Wen-Hsu. Symposium on Plasma Chemistry, Kiel, 6—10 sept. 1973.
4. Suhr, H., Pure and Appl. Chem., 39, 395—414 (1974).

Институт химии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
22/1 1976

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

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

УДК 577.155.002.257

В. ФЕДОСЕЕВ, Марет ПАНК, Х. ХЕЙНЛО,  
А. МУРЕЛЬ, О. КИРРЕТ

### ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ СВЯЗЫВАНИЯ И СВОЙСТВА ПРЕПАРАТОВ ТРИПСИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА СЕФАДЕКСЕ С ПОМОЩЬЮ АМИНОЦИАНУРХЛОРИДА

V. FEDOSSEJEV, Maret PANK, H. HEINLO, A. MUREL, O. KIRRET. AMINOTSÜANUURKLORIIDI ABIL SEFADEKSILE IMMOBILISEERITUD TRÜPSIINIPREPARAATIDE OMADUSED JA OPTIMAALSED SIDUMISTINGIMUSED

V. FEDOSEYEV, Maret PANK, H. HEINLO, A. MUREL, O. KIRRET. OPTIMAL BOUNDING CONDITIONS AND PROPERTIES OF TRYPSIN SAMPLES IMMOBILIZED ON SEPHADEX BY 2-AMINO-4,6-DICHLORO-S-TRIAZINE.

Изучалось влияние рН среды, продолжительности связывания и количества взятого фермента на активность препаратов трипсина, иммобилизованного на сефадексе G-200 с помощью аминокцианурхлорида. Иссле-

дованы рН-зависимость эстеразной и протеазной активности, а также стабильность полученных препаратов при хранении и в ходе проведения гидролиза растворов казеина.

Использование иммобилизованных протеаз для проведения гидролиза белков и афинной хроматографической очистки их природных ингибиторов требует оптимальных условий связывания ферментов и применения получаемых препаратов. Нами проведено соответствующее исследование на трипсине. В качестве связывающего реагента и носителя выбраны аминоксанурхлорид и сефадекс G-200. Выбор их связан с тем, что цианурхлорид является отечественным легко доступным препаратом, а сефадекс — технологически приемлемым носителем (производство первых образцов подобных сефадексу материалов в нашей стране уже начато).

### Экспериментальная часть

**Реактивы.** Трипсин — лиофилизированный препарат производства Олайнского завода химреактивов (ЛатвССР) активностью по этиловому эфиру- $\alpha$ -N-бензоил-L-аргину (БАЭЭ) — 23 мкмоль/мин на 1 мг препарата. БАЭЭ·НСl и казеин по Хаммарстену — препараты фирмы «Реанал» (Венгрия). Сефадекс G-200 (fine) — препарат фирмы «Pharmacia» (Швеция). Аминоксанурхлорид синтезировали из цианурхлорида по методике [1]. Все остальные реактивы — отечественные препараты х. ч. и ч. д. а.

**Методика измерения ферментативной активности.** Эстеразная активность трипсина измерялась рН-статически при рН 8,0, температуре 25 °С, концентрации БАЭЭ  $3,7 \cdot 10^{-3}$  М в растворе, содержащем 0,02 М CaCl<sub>2</sub> и 0,1 М KCl. Протеиназная активность измерялась также рН-статически в растворе 6%-ного казеина при температуре 25° и соответствующем значении рН (8,5). Использовался рН-стат, сконструированный в нашей лаборатории на основе отечественного комплекта титровального оборудования «Т-106» путем незначительной переделки последнего.

**Иммобилизация трипсина.** Связывание трипсина осуществлялось в 0,2 М H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> буфере, составленном по прописи [2], при температуре 25°. Активирование и подготовка сефадекса к связыванию проводилась по методике, описанной в [3]. На 1 г влажной навески сефадекса приходилось 1,3—1,5 мл буферного раствора. Реакция связывания прерывалась быстрым подкислением проб до рН 2,5—3,0, с последующим 8-кратным промыванием их раствором 1 М KCl в 0,001 М HCl.

### Результаты и обсуждение

Не ссылаясь конкретно на какую-либо работу, ввиду чрезвычайно большого числа их, можно, однако, отметить, что продолжительность этапа связывания, по данным различных авторов, варьирует в очень больших пределах. Результаты проведенного нами исследования зависимости активности получаемых препаратов иммобилизованного трипсина от продолжительности периода связывания (рис. 1, А), показывают, что 90—95% максимальной активности достигается через 210—240 мин. Из этого следует, что высокоактивные препараты получают в течение 3,5—4,0 ч связывания.

Реакция цианурхлорида с аминогруппами лизиновых остатков фермента протекает лучше в той области рН, где эти группы депротонированы, т. е. при рН 10,5—11,0. Однако в этой же области рН имеют место деактивирование носителя вследствие реакции гидролиза и инак-

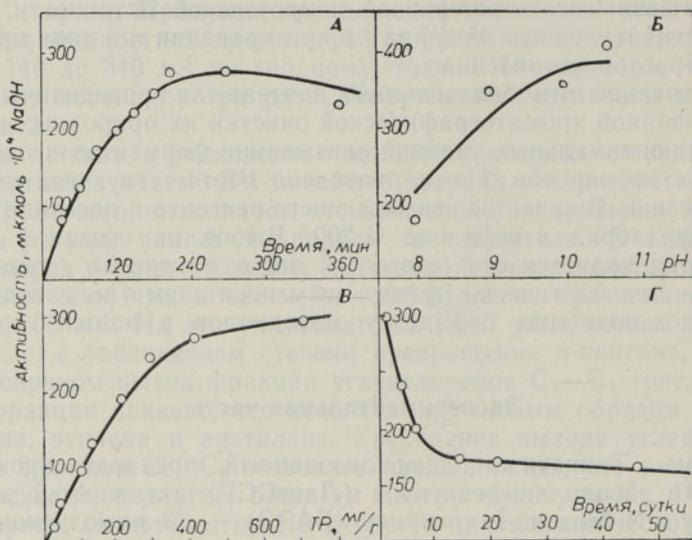


Рис. 1. Зависимость активности препаратов иммобилизованного трипсина: А — от времени связывания, Б — от рН среды, В — от количества фермента, приходящегося на 1 г сухого носителя, Г — от времени хранения в 0,001 М НСl при температуре 10 °С.

тивация трипсина из-за денатурации его. Поэтому рН среды связывания обычно выбирается в диапазоне 8,0—9,0. В целях оценки влияния высоких значений рН на ход связывания нами проведено соответствующее исследование, результаты которого представлены на рис. 1, Б. Выясняется, что активность получаемых препаратов наибольшая при рН 10,0—10,5.

Существенным в оптимизации процесса связывания является вопрос о соотношении используемых количеств фермента и активированного носителя. Из полученных нами экспериментальных данных (рис. 1, В) следует, что нецелесообразно брать трипсина более 400 мг на 1 г сухого носителя.

При хранении полученных препаратов при 10° в 0,001 М НСl, т. е. в среде, используемой обычно для хранения исходных растворов свободного трипсина, найдено (рис. 1, Г), что активность их быстро уменьшается в течение первых 10 дней, а затем устанавливается на определенном уровне. Такой характер изменения активности, согласно литературным данным [3], обусловлен тем, что стабильность препаратов ковалентно связанного фермента обеспечивается теми молекулами его, которые связаны с матрицей более чем двумя связями.

Изучение рН-зависимости скорости гидролиза БАЭЭ и растворов (термически обработанной и отфильтрованной суспензии) 6%-ного казеина показало, что оптимум активности для полученных нами препаратов в обоих случаях находится при рН 10,0. Аналогичное явление отмечалось авторами [4] и при иммобилизации химотрипсина на сефадексе G-200 бромциановым методом.

Важной характеристикой любого иммобилизованного фермента является стабильность его препаратов в ходе применения в конкретном технологическом процессе. В качестве модели последнего мы использовали гидролиз 10 мл раствора 6%-ного казеина 1 г влажного препарата

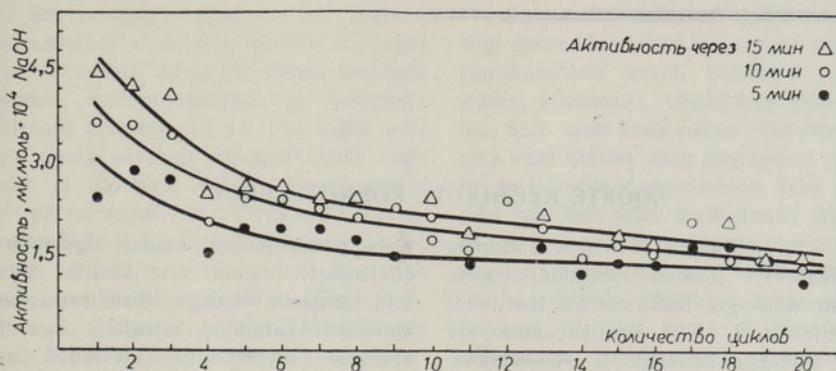


Рис. 2. Зависимость протеазной активности препарата связанного трипсина от числа циклов гидролиза 6%-ного казеина.

сефадекс—трипсин. Гидролиз проводился в кювете рН-стата при температуре  $25^\circ$  и рН 10,0 в течение 20 мин. Глубина протекания реакции за этот промежуток времени достигала приблизительно 90%, о чем свидетельствует расход щелочи на поддержание заданной рН. После прекращения перемешивания, отстаивания, двукратного промывания и осторожного декантирования пробы в кювету вносили новые 10 мл казеина и цикл повторяли. Как видно из рис. 2, активность препарата быстро снижается (примерно на 50%) в течение первых 4—5 циклов и остается на уровне 50—30% в течение последующих 15 циклов соответственно расходу щелочи («активности») через 5, 10 и 15 мин. За это время объем осадка сефадекса, несмотря на осторожность и тщательность проведения декантирования, уменьшился приблизительно на  $\frac{1}{5}$ — $\frac{1}{6}$  часть. Это свидетельствует об износе и измельчении материала носителя.

### Выводы

1. Оптимальные условия связывания трипсина на сефадексе G-200 с помощью аминокянурихлорида являются следующими: рН среды 10,0, длительность периода связывания 3,5 ч, количество фермента 350 мг на 1 г активированного носителя.
2. Значение рН-оптимума эстеразной и протеазной активности полученных препаратов по сравнению со значением его для свободного трипсина увеличено на два порядка (равно 10,0).
3. Стабильность полученных препаратов иммобилизованного трипсина можно считать достаточной для использования их при проведении гидролиза растворов белков.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Kay, G., Lilly, M. D., Biochem. Biophys. Acta, **198**, 276—285 (1970).
2. Rauen, H. M. (herausgeb. von), Biochemisches Taschenbuch, Bd. II. Berlin, 1964, S. 100.
3. Суrowцев В. И., Козлов Л. В., Антонов В. К., ДАН СССР, **195**, 1483—1485 (1970).
4. Axen, R., Ernback, S., Eur. J. Biochem., **18**, 351—360 (1971).

Институт химии  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
12/IX 1976