

**О ВОЗМОЖНОСТЯХ ИЗУЧЕНИЯ ДИФФУЗИОННОГО ТРАНСПОРТА
КРУПНЫХ ЧАСТИЦ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ ПУТЕМ
ИЗМЕРЕНИЯ КИНЕТИКИ ТРИПТИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ
ХИМОТРИПСИНОГЕНА**

Егоров В. В., Зубов В. П., Кабанов В. А.

В ряде работ, посвященных иммобилизованным ферментам, значительное место отводится проблеме влияния носителя на ферментативную активность [1]. Различают два вида подобного влияния: ингибирующее действие матрицы и появление в ней диффузионных затруднений для протекания ферментативной реакции. Так, в работе [2] было обнаружено, что реакция двух белков (трипсина с химотрипсиногеном) в водном полиакриламидном геле (5% спшивки) наблюдается лишь до определенной концентрации полимера; при дальнейшем ее увеличении скорость реакции падает практически до нуля. Авторы объясняют такое падение тем, что размер пор в геле становится сравнимым с размером белковых глобул (40–70 Å). Иными словами, уменьшение степени набухания геля до некоторой определенной величины влечет за собой резкое замедление диффузии молекул белка. Обнаруженное явление, таким образом, дает в руки исследователей новый метод «прощупывания» структуры полимерных растворов и гелей, основанный на измерении кинетики реакции между парами белков.

Целью настоящей работы было исследование возможности применения реакции триптической активации химотрипсиногена для изучения влияния концентрации полимера и степени спшивания на структуру полиакриламидного геля.

В настоящей работе был использован трипсин – препарат производства Ленинградского мясокомбината им. С. М. Кирова, химотрипсоген фирмы «Reanal» и акриламид Харьковского завода химреактивов.

Гидрогель соответствующей концентрации получали фотоинициированной полимеризацией акриламида (0–5% спшивателя – бисакриламида) при 7° в присутствии всех компонентов ферментативной системы в термостатируемой кювете, толщиной 0,5 см, в которую помещали 1 мл смеси. Смесь готовили в соответствии с методикой, приведенной в работе [1]. Конечные концентрации в рабочем растворе: трипсин – $6 \cdot 10^{-7}$ моль/л, химотрипсиноген – $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, нитрофенилтритметилапетат – 10^{-4} моль/л, триоксиметиламинометан (трис) – $(3-6) \cdot 10^{-2}$ моль/л, акриламид (n % бисакриламида) – 10–40%, рибофлавин – 33 мг/л, CaCl_2 – 1,5–3 моль/л.

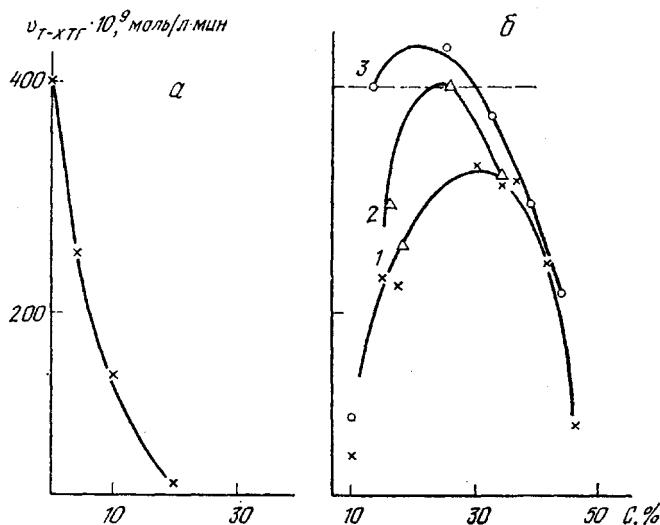
Фотосенсибилизатором полимеризации служил рибофлавин (освещение обычной лампой 300 Вт). За ходом полимеризации следили по понижению уровня вазелинового затвора в кювете. Полимеризацию проводили до того момента, когда уровень затвора практически переставал смещаться (~90% конверсии). Конверсию и соответственно количество мономера в конечном образце определяли из соответствующего градуировочного графика.

За реакцией двух белков (рН 8,3; *трис*-буфер), в результате которой образуется активный химотрипсин, следили на спектрофотометре «Specord UV-VIS» по выделению нитрофенолята-иона ($\lambda = 400$ нм), который образуется в результате реакции химотрипсина с нитрофениловым эфирем триметилуксусной кислоты. Из полученной скорости вычитали фон (смещение в отсутствие трипсина). Поскольку акриламид является ингибитором реакции триптической активации химотрипсиногена (рисунок, а), вводили поправку на остаточный мономер.

Результаты исследования зависимости скорости триптической активации химотрипсиногена от концентрации полиакриламида при различных степенях спшивания представлены на рисунке, б. Как следует из рисунка, все три зависимости описываются кривыми с максимумом.

Причины пониженных значений скорости активации в области малых концентраций полиакриламида неясны. Этот эффект предположительно можно связать с ингибирующим действием концов или отдельных фрагмен-

тов полимерной цепочки на ферментативную реакцию. Это действие тем меньше, чем выше концентрация геля (в пределах участка возрастания) и при данной концентрации уменьшается с увеличением степени спшивания, что, вероятно, можно объяснить понижением подвижности ингибирующих фрагментов полиакриламида. Существенно, однако, что в области промежуточных значений содержания полимера в системе достигается скорость реакции, близкая к наблюдаемой в воде, и что последующее падение скорости триптической активации химотрипсингена с увеличением



Зависимость скорости триптической активации химотрипсингена от концентрации акриламида (α) и полиакриламида для различных степеней спшивания (β); 1 – без бисакриламида, 2 – 2% бисакриламида, 3 – 5% бисакриламида

содержания полиакриламида, по всей вероятности, связано с появлением диффузионных затруднений в матрице, препятствующих взаимной диффузии белков. Как видно из рисунка, β, реакция становится диффузионно контролируемой лишь при концентрациях полимера 30–40 %. Зная константу скорости ферментативной реакции ($k \sim 3 \cdot 10^3 \text{ л/моль·сек}$), можно оценить, исходя из уравнений Стокса-Эйнштейна и Смолуховского [3], вязкость среды, при которой данный процесс будет контролироваться диффузией. Для молекул, радиусы которых близки, можно записать с учетом равновесного расстояния взаимодействия [4]

$$\eta = \frac{8RTG}{300kr},$$

где η – вязкость среды, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, G – равновесное расстояние взаимодействия (5 Å), r – радиус белковой глобулы. Тогда для температуры, равной 300° К, получим $\eta = 8 \cdot 3 \cdot 10^7 \cdot 300 \cdot 5 / 3000 \cdot 3 \cdot 10^3 \cdot 50 = 2 \cdot 10^3 \text{ пас}$.

Очевидно, что вычисленное таким путем значение вязкости несоизмеримо ниже макроскопической вязкости полимерных растворов и гелей указанных концентраций. Более того, из рисунка, β видно, что ветвь падения практически одинакова для всех изученных концентраций спивающего агента. Отсюда можно сделать вывод, что диффузионное торможение, обусловленное присутствием полимера, мало зависит от наличия или отсутствия спивателя (в изученных концентрационных пределах).

Полученные данные позволяют сделать некоторые заключения о структуре поликарбамидного геля. Они указывают, что в полимерном геле (или растворе) вплоть до значительных концентраций (30–40%) существуют области с пониженной вязкостью («поры»), в которых происходит свободная поступательная диффузия значительных по размеру белковых глобул (40–70 Å). Число и размеры «пор» мало зависят от густоты химической спивки (в данных концентрационных пределах) и определяются в основном собственной структурой концентрированного раствора, а спиватель лишь закрепляет естественным образом возникающие ассоциативные образования.

Авторы выражают благодарность К. Мартинеку за полезные советы и обсуждение результатов настоящей работы.

Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
3 III 1978

ЛИТЕРАТУРА

1. I. V. Berezin, A. M. Klibanov, K. Martinek, Biochim. et biophys. acta, 193, 364, 1974.
2. И. В. Березин, А. М. Клибанов, К. Мартинек, Успехи химии, 44, 17, 1975.
3. В. А. Попов, Г. П. Гладышев, Радикальная полимеризация на глубоких степенях превращения, «Наука», 1974.
4. И. В. Березин, А. А. Клесов, Практический курс химической и ферментативной кинетики, МГУ, 1976.

УДК 541.64:547.241

ДЕСТРУКЦИЯ ПОЛИПРОПИЛЕНА В ПРИСУТСТВИИ ТРИЛАУРИЛТРИТИОФОСФИТА

Калофоров Н. Я.

Трилауритритиоfosфит (ТЛТФ) является важным компонентом высокоеффективных стабилизирующих композиций, используемых для предупреждения термоокислительной деструкции ПП. Несмотря на это, почти отсутствуют данные по его использованию в качестве катализатора деструкции. Нет также данных о механизме деструкции ПП в присутствии этого катализатора. В нашей работе сделана попытка выяснить некоторые вопросы деструкции ПП в присутствии ТЛТФ.

Был исследован ПП типа «Мостен 55212» (Чехословакия). Полимер имел индекс плавления 1,40 г/10 мин при 230°, содержание изотактической фракции 97,14%, содержание летучих фракций 0,01%, золы 0,06%. В качестве пигмента был использован «Титан Байер РКВ-2» в количестве 0,2 вес.% на волокно. ТЛТФ («Дайхачи Хемикл Индастриз», Япония) имел т. пл. 20°, содержание фосфора 4,9%. Стеарат кальция содержал 6,93% кальция, 0,60% несвязанных жирных кислот и имел иодное число 5,79. Содержание стеарата кальция в товарном волокне составляло 0,4%.

Смесь из ПП и ТЛТФ была приготовлена механическим перемешиванием. Формование проводили в экструдере с диаметром шнека 53 мм: использовали четыре образца, содержание ТЛТФ 0,15–0,20 вес.%, производительность подачи 68,5–79,5 кг/час, температура 292±3°, содержание пигмента «Титан Байер, РКВ-2» 0,2 вес.%, индекс плавления при 230° деструктированного ПП, г/10 мин – 11–18.

Из деструктированного ПП получали волокно при помощи формования и вытяжки. Полученные результаты, особенно перерабатываемость (производственная мощность, количество отхода) деструктированного ПП «Мостен 55212», были удовлетворительными. В большинстве случаев в