Доклады Академии Наук СССР
1947. Том LVII, № 1

БИОХИМИЯ

С. Е. БРЕСЛЕР и М. В. ГЛИКИНА

ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ПОЛИПЕПТИДОВ ПОД ДАВЛЕНИЕМ

(Представлено академиком А. Ф. Иоффе 23 IV 1947)

В нашем сообщении (1) приведены результаты первых опытов по синтезу пептидных связей под действием трипсина и крахмала под действием амилазы. В настоящее время примененный нами принцип смещения химического равновесия внешним давлением от гидролиза к синтезу оправдал себя на ряде разнообразных примеров.

Методика опытов. Ампула с тонкой капиллярной шейкой заполнялась раствором белкового гидролизата (ее емкость составляла 3 мл) и вкладывалась в резиновый мешочек, заполненный тем же раствором. Резиновый мешочек помещался в стальную толстостенную бомбу и заливался снаружи дестиллированной водой. Давление создавалось с помощью гидравлического пресса, действующего на закаленный поршень, вставленный в бомбу.

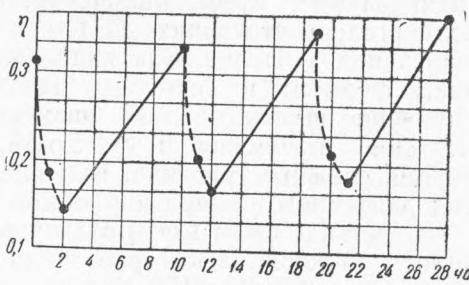

Рис. 1. Многократный гидролиз и ресинтез, система желатина — трипсин. ····· при атмосферном давлении ——— при давлении в 6000 атм.

Результаты опытов. Бо́льшая часть данных получена нами на триптических гидролизатах. В качестве субстратов мы воспользовались желатиной, сывороточным глобулином и яичным альбумином, концентрации субстрата колебались в пределах 1—4%, соотношение трипсина к субстрату бралось 1:30, среда — 0,1 *N* боратный буфер по Сёренсену, pH = 8,5—9,15.

На рис. 1 схематически изображен процесс многократного гидролиза и ресинтеза желатины трипсином во времени (по оси ординат отложена вязкость η в условных единицах, по оси абсцисс — время). Как видно из рис. 1, можно один и тот же раствор желатины (ничего к нему не добавляя) многократно гидролизовать (при атмосферном давлении) и ресинтезировать (под давлением) под действием трипсина.

При этом каждый раз при ресинтезе получается квазибелок, весьма напоминающий по своим свойствам исходную желатину. Так, например, последующий ферментативный гидролиз ресинтезированной желатины происходит практически с той же скоростью, что и первоначальной.

Качественно растворы желатины после ресинтеза чрезвычайно похожи на первоначальные. Так, после ферментативного гидролиза желатина разжижается и становится неспособной к желатинированию; после ресинтеза раствор квазибелка, оставшийся прозрачным и бес-

цветным, неизменно желатинировался, будучи охлажден до комнатной температуры.

Был поставлен целый ряд контрольных опытов для того, чтобы убедиться, что наблюдаемое явление не связано с какими-либо тривиальными обстоятельствами и что оно, действительно, имеет ферментативную природу.

Во-первых, мы провели определение свободного аммиака в продукте гидролиза и ресинтеза по Парнасу, чтобы убедиться в том, что наблюдаемое нами уменьшение аминогрупп при ресинтезе не связано

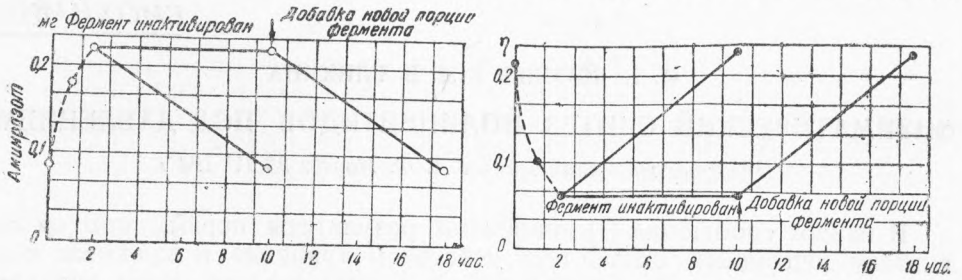

Рис. 2. Опыты с инактивированным ферментом, система желатина — трипсин. Условные обозначения кривых те же, что на рис. 1

с дезаминированием. Опыт показал нулевое содержание свободного аммиака в исследованных растворах.

Во-вторых, был поставлен контрольный опыт с ферментом, инактивированным путем кипячения. После гидролиза желатины раствор подвергался нагреванию до 100° в течение 15 мин., после чего помещался под давление. Как видно из рис. 2, инактивированный кипячением фермент не способен вести ресинтез. Чтобы убедиться, что кипячение вызвало только инактивацию фермента, но не какие-либо глубокие изменения в субстрате, к гидролизату была добавлена порция свежего трипсина. Как видно из рис. 2, после этого ресинтез под давлением прошел как обычно.

В-третьих, были взяты различные кислотные гидролизаты желатины вплоть до таких, в которых процесс гидролиза проводился в мягких условиях в 0,01 *N* HCl при температуре 37°. Подобные кислотные гидролизаты ставились под давление как без фермента, так и с добавкой фермента. В последних случаях они предварительно нейтрализовались, и pH в них доводился до характерного для данного фермента. Никаких намеков на реакцию ресинтеза при этом не обнаруживалось. Тем самым ферментативная природа процесса нам представляется доказанной.

На рис. 3 изображены кривые кинетики ресинтеза желатины под действием трипсина. Каждая точка на этих кривых представляет собой отдельный опыт; все они ставились с одним и тем же исходным веществом (белковым гидролизатом) в абсолютно идентичных условиях, но прерывались через различные промежутки времени. Мы видим, что процесс ресинтеза идет неравномерно во времени: вначале он ускоряется, затем скорость его падает, и весь процесс практически завершается в течение 4 час. (при данной глубине распада желатины в исходном гидролизате). Сопоставление обеих кривых рис. 3 показывает полноту восстановления status quo по обоим показателям: аминоазоту и вязкости. Из этих двух величин аминоазот связан непосредственно со степенью полимеризации аминокислот в квазибелке, а вязкость — с морфологией белковой макромолекулы.

На рис. 4 изображена серия опытов, проведенных при одинаковом давлении и времени опыта, но различной глубине распада желатины

при гидролизе. Мы видим, что за принятое нами время опыта (14 час.) продукты глубокого гидролиза желатины не успевают подвергнуться ресинтезу столь же глубокому, как в опытах, о которых шла речь выше.

Гидролиз и ресинтез желатины при pH = 2 в солянокислом буфере также был нами осуществлен на опыте.

В табл. 1 собраны результаты по ресинтезу глобулярных белков под действием трипсина, пепсина и папаина. Измерялись аминоазот по Ван-Слайку и неосаждаемый трихлоруксусной кислотой общий азот по Кьельдалю. Мы видим, что для глобулярного белка восстановление первоначального состояния происходит также с достаточной полнотой.

Следует отметить, что ресинтезированный квазибелок дает такие же невязкие растворы, без всяких намеков на структурную вязкость, как и нативный. Отсюда можно заключить, что ресинтезированный квазибелок имеет также глобулярную природу (исключение составляет γ-глобулин, дающий после ресинтеза твердый гель).

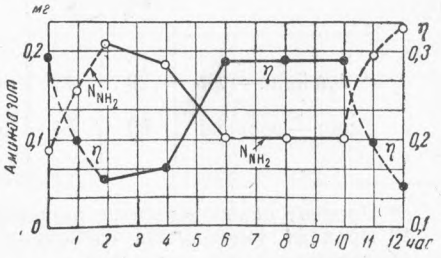

Рис. 3. Кинетика ресинтеза, система желатина — трипсин. Условные обозначения кривых те же, что на рис. 1

Реакция с пепсином проводилась при 40° С, pH = 2, в солянокислом буфере при концентрации субстрата 3% и концентрации фермента 0,3% (фермент — коммерческий препарат Кальбаум). Реакция с

Таблица 1

Исследованная система	Время гидролиза в час.	Время ресинтеза в час.	Аминоазот в мг/мл			Отношение $\frac{N_{NH_2}}{N_{общ}} \cdot 100$			Остаточного азота после осаждения белка мг/мл		
			исходн. р-р	после гидролиза	после ресинтеза	исходн. р-р	после гидролиза	после ресинтеза	исходн. р-р	после гидролиза	после ресинтеза
Овальбумин — трипсин	20	24	0,01	0,13	0,03	2,5	32,5	7,5	0,016	0,25	0,072
Гемоглобин — папаин	19	8	0,098	1,09	0,179	4,6	48,5	8,5	—	—	—
Серум глобулин — трипсин	2	8	0,48	0,76	0,2	8,2	13,2	3,6	—	—	—
Серум глобулин — пепсин	22	23	0,27	0,39	0,32	8,9	13	10,5	0,26	1,3	0,73

папаином проводилась при 40° С, pH = 5,0 в ацетатном буфере при концентрации гемоглобина 2%, фермента 0,2%. Предварительно папаин активировался по Берзину и Логеману (2) 0,2% пировиноградной кислотой в ацетатном буфере pH = 5 при 40° С в течение 2 час.

В табл. 2 приведены первые результаты, полученные по синтетической реакции на простейшем субстрате *d, l*-лейцилглицине. В качестве фермента была взята смесь пептидаз из глицеринового экстракта тонких кишек кошки. 0,5 мл подобного экстракта добавлялось к раствору 70 мг дипептида в 12 мл фосфатного буфера, pH = 7,8. При 37° фермент весьма активно разлагал дипептид, как это видно из табл. 2. Через различные промежутки времени после начала гидролиза мы прерывали реакцию гидролиза и ставили раствор на ресин-

тез под давлением 6000 атм. Из табл. 2 видно, что ресинтез протекал на 50—60%.

Таким образом, экспериментально показана инверсия действия различных протеолитических ферментов в условиях высокого давления.

Таблица 2

Исследованная система	Время гидролиза в мин.	Время ресинтеза в час.	Аминоазот в мг			% гидролиза *	% ресинтеза **
			исходн. р-р	после гидролиза	после ресинтеза		
d, l-лейцил—глицин — эрепсин	20	48	0,241	0,307	0,271	27,8	55,3
	60	54	0,322	0,514	0,427	60,6	44,8

* Процент освободившихся аминогрупп по отношению к теоретическому.
** Процент уменьшения свободных аминогрупп по отношению к количеству, освободившемуся при гидролизе.

Протеолитические ферменты—трипсин, пепсин, эрепсин, папаин ресинтезируют под давлением в несколько тысяч атмосфер из белковых

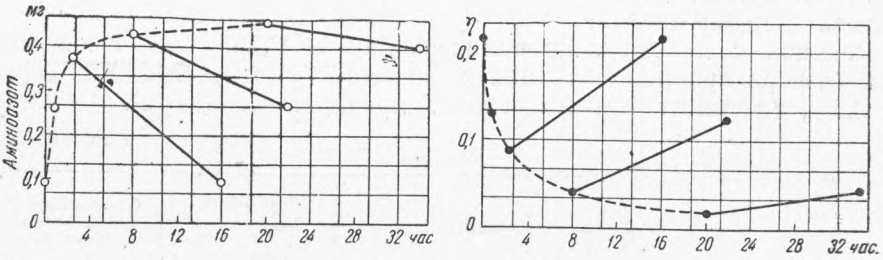

Рис. 4. Влияние глубины гидролиза на ресинтез, система желатина — трипсин. Условные обозначения кривых те же, что на рис. 1

гидролизатов продукты — квазибелки, напоминающие исходные протеины по своим физико-химическим свойствам. Под действием эрепсина происходит синтез пептидных связей в простых субстратах — аминокислотах и дипептидах.

В заключение приносим благодарность Н. А. Селезневой, участвовавшей в наших экспериментах.

Физико-технический институт
Академии Наук СССР,
г. Ленинград

Поступило
23 IV 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] С. Е. Бреслер, ДАН, **55**, 145 (1947). [2] T. Bersin u. W. Logeman, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **220**, 209 (1933).