



УДК 577.152.341 : 543.544

БИОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ОЧИСТКИ
АМИНОПЕПТИДАЗ

Люблинская Л. А., Ваганова Т. Я., Иванова Н. М.,
Юсупова М. П., Оксенойт Е. С., Якушева Л. Д.,
Степанов В. М.

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Описан синтез биоспецифических сорбентов аминокептидаз на основе агарозы, содержащих в качестве лиганда трипептид Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-OH, присоединенный к носителю через диаминь. Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-*n*-фенилендиамин-сефароза 4В, полученная присоединением пептида-ингибитора Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-OH с незащищенной аминокруппой треонина к *n*-фенилендиамин-сефарозе 4В с помощью водорастворимого карбодимида при рН 6,1, содержала 0,4 мкмоль пептида на 1 мл сорбента. Н-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-гексаметилендиамин-сефароза 4В была получена присоединением (Glu-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-OH методом активированных эфиров к гексаметилендиамин-сефарозе 4В с последующим удалением остатка пироглутаминовой кислоты пироглутамиламинопептидазой при рН 8,1 и содержала 4,3 мкмоль пептида на 1 мл. Показана применимость полученных сорбентов для очистки аминокептидаз из *Asp. oryzae* и *Bac. thuringiensis*.

При выделении аминокептидаз микроорганизмов [1, 2] высокая степень очистки, как правило, не может быть достигнута без использования аффинных сорбентов, имеющих высокое сродство к данному типу ферментов. Первоначально, следуя обычной схеме построения аффинных сорбентов, мы полагали, что для избирательной хроматографии аминокептидаз в качестве лиганда может быть использован *D*-лейцин. Однако такой сорбент, полученный присоединением к активированной бромцианом сефарозе N,N'-бис-*D*-лейцил-гексаметилендиаминна — Н-*D*-Leu-NH-(CH₂)₆-NH-*D*-Leu-сефароза 4В, оказался неэффективным: при хроматографии на нем удельная активность лейциламинопептидазы из *Asp. oryzae* возрастала только в 1,4 раза, а по данным электрофореза в полиакриламидном геле полученный препарат фермента содержал значительное количество примесных белков. Туркова и сотр. [3] достигли несколько более высокой степени очистки аминокептидазы *Asp. flavus*, используя аналогичный сорбент, представляющий собой нерастворимый носитель на основе полиметакрилата, ковалентно связанный с гексаметилендиаминном, к которому присоединен *D*-лейцин. Исследования специфичности аминокептидаз из *Asp. oryzae* [1] и *Aeromonas proteolytica* [4] показали, что фермент имеет протяженный гидрофобный участок связывания с субстратом, причем по крайней мере два аминокислотных остатка с аминного конца пептидного субстрата участвуют в образовании комплекса с ферментом. Наличие в дипептиде *D*-энантисмера в любом положении исключает гидролиз субстрата. Кроме того, оказалось, что *D*-лейцинамид не ингибирует гидролиз *L*-лейцинамида аминокептидазой *Aeromonas proteolytica* [4]. Видимо, фермент не только не расщепляет, но и практически не связывает производных *D*-аминокислот. Следовательно, обычный прием введения в лиганд *D*-изомера (с целью обеспечить его устойчивость к гидролизу ферментами) непригоден при конструировании биоспецифических сорбентов для очистки

Использованы сокращения аминокислот, предложенные комиссией IUPAC-IUB по биохимической номенклатуре. (Glu — пироглутаминовая кислота, рNA — *n*-нитроанилид, DMF — диметилформамид, DCC — N,N'-дициклогексилкарбодимид. Все аминокислоты кроме указанных особо, *L*-ряда.

аминопептидаз. Более продуктивным оказалось использование в качестве лиганда пептидных ингибиторов аминопептидаз или аналогов *L*-аминокислот. Так, Прескотт и сотр. синтезировали аффинный сорбент, используя в качестве лиганда отдаленный аналог *L*-лейцина-N-(3-амино-5-метил-2-оксогексил)-янтарную кислоту [5]. Умегава и сотр. [6] использовали для очистки аминопептидазы А из почек свиньи аффинный сорбент, в котором лигандом служит природный ингибитор амастатин.

Основываясь на данных о специфичности лейцинаминопептидазы из *Asp. oryzae*, мы решили синтезировать аффинный сорбент, используя в качестве лиганда пептидный ингибитор лейцинаминопептидазы, обнаруженный Цюбером [7]. Ингибитор представляет собой трипептид, образованный из *L*-аминокислот, N-концевое положение в котором занято объемным остатком *O*-*трет*-бутил-треонина — $\text{H-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-OH}$. Он ингибирует лейцинаминопептидазу по конкурентному типу с $k_i \cdot 10^{-5}$ M, по-видимому, связываясь с ферментом, но не расщепляясь из-за пространственных затруднений, создаваемых *O*-*трет*-бутильной группой.

Для получения аффинного сорбента в качестве носителя использовали АН-сефарозу 4В (продукт присоединения гексаметилендиамина к сефарозе, содержащий алифатическую аминогруппу), а в качестве лиганда — трипептид (*O*-*трет*-бутил)-треонил-фенилаланил-пролин, синтез которого описан в литературе [8]. При этом мы столкнулись с проблемой защиты свободной аминогруппы треонина на стадии присоединения пептида к аминированной сефарозе. Обычные защитные группы, применяемые в пептидном синтезе, для этого непригодны, поскольку их отщепление после синтеза трудно провести так, чтобы сохранить *O*-*трет*-бутильную группировку и избежать гидролиза агарозной матрицы.

Поставленная задача была решена двумя путями. В первом случае к аминированной сефарозе с помощью водорастворимого карбодиимида при рН 6,1 присоединяли пептид-ингибитор с незащищенной аминогруппой треонина. В литературе описано присоединение незащищенных пептидов к аминированному полистиролу для проведения ступенчатого расщепления по Эдману [9]. В нашем случае наблюдалось присоединение пептида к аминированной сефарозе с очень низким выходом: степень включения пептида в сорбент не превышала 0,19 мкмоль пептида на 1 мл влажной сефарозы. Столь низкая эффективность присоединения лиганда обусловлена, видимо, высокой основностью аминогруппы гексаметилендиамин-сефарозы. Аминогруппа носителя остается протонированной во всем интервале рН (4,5—6,0), обычно используемом для синтеза с водорастворимыми карбодиимидами, что затрудняет амиолиз образующейся *O*-ацилизо мочевины. Была предпринята попытка использовать в качестве «вставки» между пептидом и носителем *n*-фенилендиамин, аминогруппа которого при рН 6 практически не протонирована. При этом был получен биоспецифический сорбент $\text{H-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-}n\text{-фенилендиамин-сефароза 4В}$, содержащий 0,36—0,40 мкмоль пептида на 1 мл влажной сефарозы. Этот способ присоединения лиганда позволяет получить сорбент с относительно невысоким содержанием присоединенного пептида. Тем не менее такой сорбент может быть успешно использован для выделения ферментов (таблица).

Другое решение поставленной задачи состояло в защите аминогруппы присоединяемого пептида пироглутаминовой кислотой, которую можно удалить после синтеза в мягких условиях при рН 8,1 с помощью фермента пироглутамиламинопептидазы [10].

Для синтеза использовали АН-сефарозу 4В, к которой методом *N*-оксисукцинимидных эфиров присоединяли тетрапептид — $\langle \text{Glu-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-OH}$, полученный конденсацией *N*-оксисукцинимидного эфира пироглутаминовой кислоты и $\text{H-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-OH}$. Полученный по этой схеме сорбент, $\langle \text{Glu-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-гексаметилендиамин-сефароза 4В}$, содержал, по данным аминокислотного анализа, 4,3 мкмоль пептида на 1 мл сефарозы. Для удаления остатка пироглутаминовой кислоты сорбент обрабатывали раствором пироглутамиламинопептидазы из *B. subtilis* в 0,1 M калийфосфатном буфере, рН 8,1, в присутствии β -меркаптоэтанола и EDTA. Неожиданно оказалось, что в указанных условиях отщепление не идет,

Очистка аминопептидаз *Asp. oryzae* и *B. thuringiensis* на Н-Thr (Bu¹)-Phe-Pro-*n*-фенилэтилдиамин-сефарозе 4В и Н-Thr (Bu¹)Phe-Pro-гексаметилендиамин-сефарозе 4В

Образец	Условия элюции	Исходный препарат				Очищенный препарат				Выход, %		Степень очистки
		Белок, ОБ ₂₈₀	Активность			Белок, ОБ ₂₈₀	Активность			Белок	Актив-ность	
			общая, мкмоль/мин	удельная, мкмоль/мин А ₃₈₀	удельная, мкмоль/мин А ₃₈₀		общая, мкмоль/мин	удельная, мкмоль/мин А ₃₈₀	удельная, мкмоль/мин А ₃₈₀			
Колонка с Н-Thr (Bu ¹)-Phe-Pro- <i>n</i> -фенилэтилдиамин-сефарозой 4В												
Аминопептидаза	0,35 М NaCl, рН 7,4	7,68	3,1	0,40	0,42	1,74	4,1	5,5	56	10,0		
<i>Asp. oryzae</i>	Градиент NaCl 0,2 → 1 М, рН 0,8	82,0	23,8	0,29	3,12	14,8	4,7	3,8	62,2	10,2		
»	0,04 М L-лейцинамид, рН 8,0	8,4	2,8	0,33	0,46	1,5	3,3	5,5	53,5	10,0		
»	0,3 М NaCl, рН 8,8	466	105	0,225	9,0	103	11,5	4,9	98	51		
»	0,3 М NaCl, рН 8,8	25,6	184	7,2	4,1	96	23,7	16,0	52	3,3		
Колонка с Н-Thr (Bu ¹)-Phe-Pro-гексаметилендиамин-сефарозой 4В												
Аминопептидаза <i>Asp. oryzae</i>	0,4 М NaCl, рН 7,4	6,3	3,0	0,47	0,51	2,2	4,3	7,1	73	9,1		
Диализованная культуральная жидкость <i>B. thuringiensis</i>	20% изопропанол, рН 7,4	264	52,0	0,2	4,05	13,2	3,2	1,5	25,3	16,0		

хотя при проведении реакции со свободным $\langle \text{Glu-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-OH}$ остаток пироглутаминовой кислоты отщепляется полностью. Мы предполагаем, что одной из причин этого может быть связывание фермента за счет электростатических взаимодействий с протонированными аминогруппами сорбента, которое можно снять повышением ионной силы раствора. Действительно, при проведении реакции в присутствии 1,0 М КСl удалось отщепить, судя по данным аминокислотного анализа, 75–80% остатков пироглутаминовой кислоты. Повторная обработка ферментом и увеличение времени гидролиза не привели к полному удалению остатков пироглутаминовой кислоты. Видимо, некоторая часть молекул лиганда недоступна для пироглутамиламинопептидазы. Тем не менее этот способ присоединения лиганда к агарозной матрице дает возможность получить сорбент с достаточно высоким содержанием пептида и существенно увеличить его емкость.

В таблице представлены данные по очистке лейцинаминопептидазы из *Asp. oryzae* с помощью $\text{H-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-}n$ -фенилендиамин-сефарозы 4В при рН 7,4; 8,0 и 8,8. Этот сорбент позволяет очищать фермент в 3–51 раз (в зависимости от чистоты исходного препарата) с выходом фермента 52–98%. Избирательность сорбента обеспечивает значительный эффект уже при одностадийной очистке. Повторная хроматография на том же сорбенте позволяет достичь удельной активности лейцинаминопептидазы, равной 23,7 мкмоль/мин A_{280} , чего не удавалось получить ионообменной хроматографией и гель-фильтрацией [1].

Гомогенный, по данным электрофореза в полиакриламидном геле, препарат лейцинаминопептидазы с уд. акт. 45,7 мкмоль/мин A_{280} удалось получить, сочетая метод биоспецифической хроматографии с обычными методами очистки ферментов [11].

Лейцинаминопептидаза из *Asp. oryzae*, сорбированная $\text{H-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-}n$ -фенилендиамин-сефарозой 4В при рН 8,0, может быть элюирована не только повышением концентрации хлористого натрия, но и добавлением к исходному буферному раствору 0,04 М субстрата лейцинаминопептидазы — *L*-лейцинамида (таблица). При этом удельная активность фермента по *n*-нитроанилиду *L*-лейцина после концентрирования фермента и удаления *L*-лейцинамида диализом увеличивалась в 10 раз. Это свидетельствует о специфическом взаимодействии между лигандом сорбента и ферментом. Колонка с $\text{H-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-}n$ -фенилендиамин-сефарозой 4В может быть использована многократно — не менее 10 раз — в диапазоне рН 7,4–8,8, отдавая при этом наибольшую стабильности аминокислотидазы.

Аналогично можно хроматографировать лейцинаминопептидазу *Asp. oryzae* и на колонке с $\text{H-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-}$ гексаметилендиаминсефарозой 4В, например, при рН 7,4 (таблица). На обоих сорбентах достигается примерно одинаковая степень очистки фермента; следовательно, основной вклад во взаимодействие фермента с сорбентом вносит лиганд, являющийся конкурентным ингибитором лейцинаминопептидаз, а гидрофобная вставка не играет существенной роли.

Высокомолекулярная внеклеточная аминокислотидазы из *B. thuringiensis* была очищена на данном биоспецифическом сорбенте в 16 раз (таблица). Снижение выхода в этом случае обусловлено особенностями строения фермента, очень склонного к агрегации, так что его очистка обычным многостадийным путем затруднена [12].

Колонка с $\text{H-Thr}(\text{Bu}')\text{-Phe-Pro-}$ гексаметилендиамин-сефарозой 4В может работать в диапазоне рН 7,4–8,8 и была использована многократно в течение 2 лет. Стабильность сорбента показывает, что трипептид, используемый в качестве лиганда, устойчив к действию протеолитических ферментов, в частности аминокислотидаз. В то же время мы наблюдали некоторое связывание сорбентом нейтральной протеиназы *B. thuringiensis*.

Таким образом, как видно из таблицы, сорбенты, полученные предлагаемым способом, дают хорошие результаты как при очистке грибных, так и бактериальных аминокислотидаз — ферментов различной природы. Мы полагаем, что они могут быть применены для очистки и ряда других аминокислотидаз.

В работе использовали предварительно очищенную активированным углем и хроматографией на DEAE-сефадексе А-50 лейцинаминопептидазу плесневого гриба *Asp. oryzae* и диализованную культуральную жидкость, полученную выращиванием *B. thuringiensis* var. *finitimus*. Пироглутамиламинопептидаза (КФ 3.4.11.8) выделена из *B. subtilis* шт. 163 по методу Шевчука и Мульчика [10], 1,16 ОЕ₂₈₀/мл, уд. акт. по <Glu-pNA — 10,4 ед. акт./ОЕ₂₈₀.

Активность лейцинаминопептидазы определяли по расщеплению *n*-нитроанилида *L*-лейцина [1].

Трипептид H-Thr(Bu')-Phe-Pro-OH, который использовался в качестве лиганда, синтезировали по описанной методике [8].

Гомогенность полученных пептидов подтверждали с помощью ТСХ на пластинках марки Silufol (Kavalier, ЧССР) в системе *n*-бутанол — пиридин — вода — уксусная кислота (10:15:12:3), обнаружение пептидов осуществляли нингидрином и KI.

Кислотный гидролиз проводили 5,7 н. HCl при 110°С 24 ч, гидролизат анализировали на автоматическом аминокислотном анализаторе Durrum D-500 (США) и Bio-Cal BC-200 (ФРГ).

<Glu-Thr(Bu')-Phe-Pro-OH. К раствору 2,58 г (20 ммоль) пироглутаминовой кислоты и 2,30 г (20 ммоль) *N*-оксисукцинимида в 200 мл сухого этилацетата при перемешивании и охлаждении до 0°С прибавляли 4,12 г (20 ммоль) DCC. Перемешивали 1 ч при этой температуре и 18 ч при 4°С. Осадок дициклогексимочевины отфильтровывали, промывали этилацетатом, объединенные фильтраты упаривали в вакууме. Оставшееся масло использовали без дальнейшей очистки. К раствору 4,19 г (10 ммоль) H-Thr(Bu')-Phe-Pro-OH и 1,68 г (20 ммоль) NaHCO₃ в 40 мл смеси диоксан — вода (1:2) прибавляли раствор <Gly-OSu в 20 мл диоксана и перемешивали реакционную смесь в течение 2 сут. Осадок отфильтровывали, промывали водным диоксаном, объединенные фильтраты упаривали в вакууме. Оставшееся масло растворяли в 60 мл 25% водного этанола и очищали хроматографией на сефадексе LH-20 (Sephadex, Швеция), уравновешенном 25% водным этанолом. Элюировали той же системой со скоростью 15 мл/ч, собирая фракции по 5 мл. За ходом элюции следили по данным ТСХ. Фракции, содержащие тетрапептид, объединяли и упаривали в вакууме. Выход 2,07 г (80,5%). Аминокислотный анализ: Glu (1,08), Thr (1,00), Pro (0,94), Phe (1,10).

H-Thr(Bu')-Phe-Pro-гексаметилендиамин-сефароза 4B. <Glu-Thr(Bu')-Phe-Pro-OSu синтезировали аналогично <Glu-OSu. В реакцию вводили 0,530 г (1 ммоль) <Glu-Thr(Bu')-Phe-Pro-OH, 0,230 г (2 ммоль) *N*-оксисукцинимида и 0,206 г (1 ммоль) DCC в 5 мл сухого этилацетата. Полученное масло использовали для присоединения к аминированной сефарозе без дальнейшей очистки.

3 г сухой АН-сефарозы 4В (Pharmacia, Швеция), набухшей в воде, отмытой 0,5 М NaCl и водой, уравновешивали 50% водным DMF, доведенным до pH 8,8 прибавлением триэтиламина, и к ней добавляли раствор <Glu-Thr(Bu')-Phe-Pro-OSu в 3 мл того же DMF, перемешивали при 25°С 48 ч. Гель промывали на фильтре 50% водным DMF (100 мл) и водой (100 мл). Содержание лиганда, по данным аминокислотного анализа, — 4,3 мкмоль/мл влажной сефарозы. <Glu-Thr(Bu')-Phe-Pro-гексаметилендиамин-сефарозу 4В уравновешивали 0,1 М калийфосфатным буфером, pH 8,1, содержащим 10 мМ EDTA, 10 мМ β-меркаптоэтанол и 1 М KCl, прибавляли 2 мл раствора пироглутамиламинопептидазы и выдерживали 18 ч при периодическом перемешивании при 37°С. После 6 ч инкубации повторно добавляли фермент. Гель промывали на фильтре 0,2 М боратным буфером, pH 8,0, содержащим 2 М NaCl (100 мл), затем водой до отрицательной реакции на Cl⁻. Аминокислотный анализ: Glu (0,23), Thr (1,00), Pro (0,92), Phe (1,10).

*H-Thr(Bu')-Phe-Pro-*n*-фенилендиамин-сефароза 4B.* 100 мл сефарозы 4В (Pharmacia, Швеция) суспендировали в 100 мл 5 М фосфатного буфера, pH 11,8, и активировали 33 г бромциана, растворенного в 100 мл ацето-

нитрила, в течение 20 мин при 5° С по методу Пората и сотр. [13]. Затем сефарозу быстро промывали на фильтре охлажденной водой (до pH 8,0), 0,1 М NaHCO₃ (400 мл) и 50% раствором DMF в 0,1 М NaHCO₃. Активированную сефарозу переносили в стакан и прибавляли 24 г (220 ммоль) свежеперегнанного *n*-фенилендиамина, растворенного в смеси 83 мл DMF и 17 мл 0,1 М NaHCO₃, pH 10,0. Смесь перемешивали 18 ч при 5° С, затем сефарозу промывали последовательно 50% раствором DMF в 0,1 М NaHCO₃, водой, 50% водным диоксаном. 1,01 г (2,4 ммоль) H-Thr(Bu')-Phe-Pro-OH растворяли в 30 мл смеси диоксан — вода (1 : 2), охлаждали и прибавляли 3,06 г (7,2 ммоль) метил-*n*-толуолсульфоната *N*-циклогексил-*N'*-[2-(4-морфолинил)-этил]-карбодимида (Fluka, Швейцария) в течение 4 мин. Реакционную смесь выдерживали 15 мин при охлаждении при pH 6,1. В стакан с суспензией сефарозы прибавляли 5 мл 50% водного диоксана и вносили при перемешивании активированный пептид. Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 18° С и 22 ч при 5° С. Гель отфильтровывали, промывали последовательно 50% водным диоксаном, водой, а перед опытом всеми растворителями, которые предполагалось использовать для элюции. Содержание пептида, по данным аминокислотного анализа, — 0,36—0,40 мкмоль пептида на 1 мл влажной сефарозы.

Хроматография лейцинаминопептидазы Asp. oryzae на колонке с H-Thr(Bu')-Phe-Pro-n-фенилендиамин-сефарозой 4B. На колонку емкостью 7,5 мл (0,8×15 см), уравновешенную 0,05 М NaCl в 0,05 М боратном буфере, pH 7,4, наносили 10 мг лейцинаминопептидазы *Asp. oryzae* в 8 мл того же буферного раствора. Колонку промывали исходным буферным раствором, затем 0,2 М NaCl в 0,05 М боратном буфере, pH 7,4, до исчезновения поглощения в элюате. Активный фермент элюировали повышением концентрации хлористого натрия до 0,35 М в том же буфере. Концентрацию бска в фракциях определяли по поглощению при 280 нм, активность лейцинаминопептидазы измеряли по расщеплению H-Leu-pNA. Аналогично проводили хроматографию при pH 8,0 и 8,8. В случае хроматографии фермента при pH 8,0 элюцию лейцинаминопептидазы осуществляли либо 0,04 М *L*-лейцинамидом в 0,15 М NaCl и 0,05 М боратном буфере, pH 8,0, либо используя градиент концентрации хлористого натрия 0,2—1,0 М в исходном буфере.

Хроматография лейцинаминопептидазы Asp. oryzae на колонке с H-Thr(Bu')-Phe-Pro-гексаметилендиамин-сефарозой 4B. На колонку емкостью 8,2 мл (1×10,5 см), уравновешенную 0,05 М боратным буфером, pH 7,4, наносили 10 мг лейцинаминопептидазы *Asp. oryzae* в 5 мл того же буфера. Колонку промывали исходным буфером, затем 0,2 М NaCl в 0,05 М боратном буфере, pH 7,4, до исчезновения поглощения в элюате. Фермент элюировали 0,4 М NaCl в том же буфере.

Хроматография аминопептидазы B. thuringiensis на колонке с H-Thr(Bu')-Phe-Pro-гексаметилендиамин-сефарозой 4B. На колонку, содержащую 88 мл (4×7 см) сорбента, уравновешенную 1,0 М NaCl в 0,05 М боратном буфере, pH 7,4, и 10⁻⁵ М CoCl₂, наносили 330 мл диализованной культуральной жидкости *B. thuringiensis*. Колонку промывали исходным буферным раствором до исчезновения поглощения в элюате. Фермент элюировали 20% раствором изопропанола в исходном буфере.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова Н. М., Ваганова Т. И., Стронгин А. Я., Степанов В. М. Биохимия, 1977, т. 42, № 5, с. 843—849.
2. Люблинская Л. А., Ваганова Т. И., Оксенойт Е. С., Баландина Г. Н., Филиппова И. Ю., Степанов В. М. Тез. докл. Всесоюзный симпозиум «Методы получения высокоочищенных ферментов», 1978, Вильнюс, с. 84.
3. Turkova J., Valenlova O., Coupek J. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 420, № 2, p. 309—315.
4. Wagner F. W., Wilkes S. H., Prescott J. M. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 4, p. 1208—1210.
5. Kettner C., Rodriguez-Absi J., Glover G. I., Prescott J. M. Arch. Biochem. and Biophys., 1974, v. 162, № 1, p. 56—63.
6. Tode H., Kojima F., Aoyagi T., Umezawa H. Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 613, № 2, p. 459—468.

7. Jost R., Masson A., Zuber H. FEBS Lett., 1972, v. 23, № 2, p. 211–214.
8. Fittkau S., Schunck W.-H., Mqotsi S. Acta biol. et med. Germ., 1976, v. 35, № 3–4, p. 365–378.
9. Mech C., Jeschkeit H., Schellenberger A. Eur. J. Biochem., 1976, v. 66, № 1, p. 133–138.
10. Szewczuk A., Mulczyk M. Eur. J. Biochem., 1969, v. 8, № 1, p. 63–67.
11. Ваганова Т. И., Люблинская Л. А., Иванова Н. М., Юсупова М. П. II Всесоюзный симпозиум по химии протеолитических ферментов, Углич, 1979, с. 64–65.
12. Люблинская Л. А., Ваганова Т. И., Иванова Н. М., Юсупова М. П., Оксенойт Е. С., Клепикова Ф. С. Всесоюзная конференция по перспективам использования биоспецифической хроматографии в технологии производства высокоочищенных ферментов, г. Игналина, 1982, с. 53.
13. Porath J., Aspborg K., Drevin H., Axen R. J. Chromatogr., 1973, v. 86, № 1, p. 53–56.

Поступила в редакцию
13.VII.1983

BIOSPECIFIC SORBENTS FOR PURIFICATION OF AMINOPEPTIDASES

LYUBLINSKAYA L. A., VAGANOVA T. I., IVANOVA N. M., YUSUPOVA M. P.,
OKSENOIT E. S., YAKUSHEVA L. D., STEPANOV V. M.

*Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,
Moscow*

A synthesis of two biospecific sorbents for aminopeptidases has been reported which utilizes as a ligand the tripeptide H-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-OH attached to agarose via diamines. H-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-*p*-phenylenediamine-Sepharose 4B, prepared by coupling of the respective free peptide to the sorbent at pH 6,1 in the presence of water-soluble carbodiimide contained 0,4 mole peptide/ml sorbent. H-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-hexamethylenediamine-Sepharose 4B was a product of hexamethylenediamine-Sepharose 4B coupling with <Glu-Thr(Bu^t)-Phe-Pro-OH via active esters with subsequent removal of the pyroglutamyl residue by the pyroglutamyl aminopeptidase action at pH 8,1, the sorbent had the capacity of 4,3 μmole peptide/ml. The prepared sorbents were shown to be useful for purification of aminopeptidases from *Asp. oryzae* and *B. thuringiensis*.