

FINSKA SUOMEN
KEMISTSAMFUNDETS KEMISTISEURAN
MEDDELANDEN TIEDONANTOJA

REDAKTÖR — TOIMITTAJA

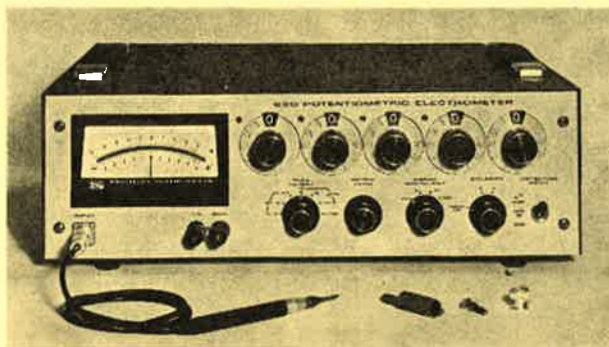
Tor-Magnus Enari

INNEHÅLL — SISÄLTÖ

Bertil Gelotte: Några biokemiska tillämpningar av gelfiltrering ..	25
Gösta Brunow: Gelfiltrering av några lågmolekylära aromatiska substanser	33
Kaj Forss: Lignosulfonihappojen geelisuodatus	37
Martti Nummi: Eräiden viljan entsyymien eksklusiokromatografia	46

KEITHLEY

Potentiometrinen Elektrometri Malli 630
sähkö- ja fysikokemiallisiin mittauksiin.

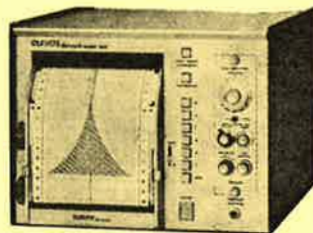


- Tarkkuus 0,01 % lukemasta
- Sisäänmenovastus 10^{15} ohmia

brush

piirturi mark 250

- Piirtoleveys 4 1/2"
- 10 Hz laidasta laitaa
- 12 paperinnopeutta painonapein
- 21 vaihdettavaa etuvahvistinta
- Painemustepiirto



Päädustaja

Puh. 11 123

Box 10153



FINSKA SUOMEN KEMISTSAMFUNDETS KEMISTISEURAN MEDDELANDEN TIEDONANTOJA

76 årg.

1967 N:o 2

76 vuosik.

Utgiven av — Julkaisija

Finska Kemistsamfundet — Suomen Kemistiseura
Postbox 10476 Postilokero
Helsingfors — Helsinki

Styrelse — Hallitus

NILS-ERIK SARIS — TOR-MAGNUS ENARI — TERJE ENKVIST — KAJ FORSS — JARL
JOHAN LINDBERG — KARIN SANDELIN — JACOBUS SUNDMAN — VERONICA SUNDMAN

Sekreterare — Sihteeri

ÖRN WAHLROOS, Universitetets Näringskemiska inst. — Yliopiston Ravintokemian laitos
tel 75 70 11, 46 46 81 puh. Vlk — Viikki

Kassör — Rahastonhoitaja

GÖRAN SUNDHOLM, Tekniska Högskolans Kemiska avd. — Teknillisen Korkeakoulun Kemian os.
Olnäs — Otaniemi tel. 46 01 44/771 puh.

Arkivarie — Arkistonhoitaja

ANNA GRÖNVIK, S. Hesperlag, 4 E. Hesperlank. tel. 46 04 11, 44 73 99 puh.

Redaktör — Toimittaja

TOR-MAGNUS ENARI, Morsviksvägen 1 Maamonlahdentie tel. 65 50 22, 67 48 24 puh.
Drumsö — Lauttasaari

Några biokemiska tillämpningar av gelfiltrering*

Bertil Gelotte

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

På några få år har gelfiltrering blivit accepterad som en fundamental kromatografisk metod vid fraktionering och rening av biologiskt material (1), och av de tusentals artiklar, som publicerats om gelfiltrering i medicinsk och biokemisk facklitteratur, får man lätt det intrycket att gelfiltrering är en rent biokemisk separationsmetod. Orsaken till detta är nog snarast, att biokemister alltid är intresserade av nya metodologiska utvecklingar och snabbt redo att pröva dem. De har ofta symnerligen

* Föredrag vid Kemidagarnas gelfiltreringssymposium i Helsingfors den 2.11.66.

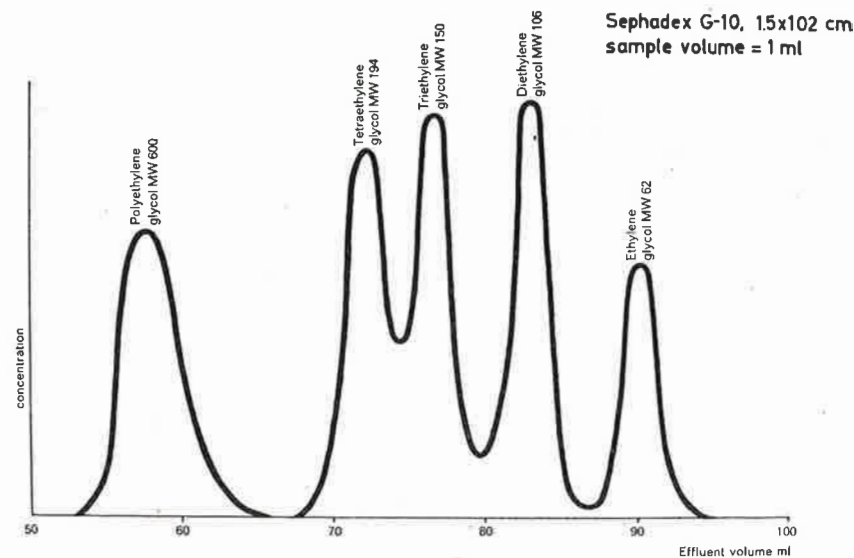
komplexerade system att studera, de arbetar med mycket labila ämnen, som inte tål så drastiska behandlingsmetoder som eterextraktion, torkning eller destillation, de är hänvisade till mycket milda separationsmetoder och är i de flesta fall begränsade till att använda endast vatten som lösningsmedel.

Även om många intressanta tillämpningar av gelfiltreringsmetoden har kommit fram inom det biokemiska området, råder det ingen tvekan om att metodiken kan finna talrika tillämpningar inom andra grenar av kemin och den kemiska teknologien. I det följande kommer jag emellertid helt att begränsa min beskrivning till hydrofila geler användbara endast i vattenhaltiga system, och då speciellt till Sephadex^R, de dextran-geler, som utvecklats av Pharmacia Fine Chemicals i Uppsala.

Den mest välkända effekten vid gelfiltrering, eller som det ibland också kallas, molekylsiktning, är en fraktionering av ämnen efter molekylstorlek. Detta åskådliggörs bäst vid försök med homologa serier av polymerer. Figur 1 visar separationen av en serie polyetylenglykoler på en bädd av Sephadex G-10, och figur 2 en fraktionering av monomer och polymerer av serumalbumin. Monomeren har här en molekylvikt av ungefär 70 000, och försöket är gjort på Sephadex G-150 (2).

I de här båda fallen har man en entydig kromatografisk uppdelning av de enskilda polymererna efter fallande molekylvikt, vilket visar att gelfiltrering inte bara är en enkel metod för preparativ fraktionering av polymerer utan också bör lämpa sig analytiskt för bestämning av molekylviktsdistributionen hos en polymerblandning. En ganska noggrann uppskattning av molekylvikter borde också vara möjlig genom mätning av ämnens relativa vandringshastigheter i ett gelfiltreringsförsök. En sådan metod för bestämning av molekylvikter för äggviteämnen har också föreslagits av P. Andrews. I försök med Sephadex G-75, G-100 och G-200 fann han ett linjärt förhållande mellan elutionsvolymen och logaritmen för molekylvikterna (3, 4).

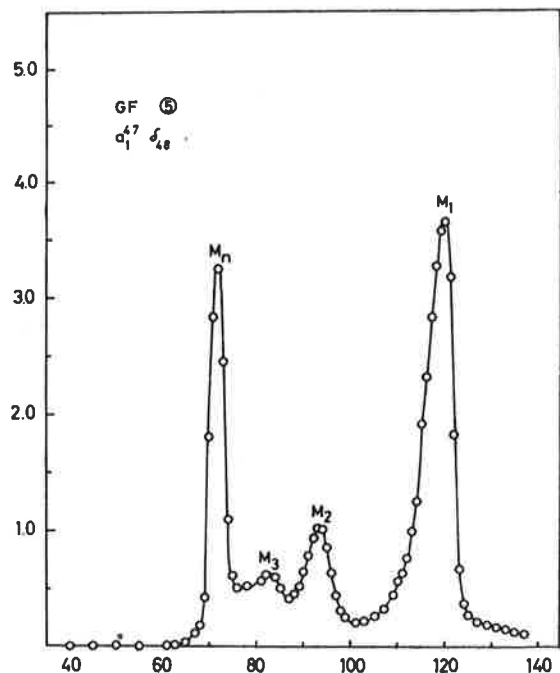
Figur 3 visar dr Andrews resultat med Sephadex G-75 och G-100. Genom att kalibrera en Sephadexpelare med homogena proteiner av känd molekylvikt var det möjligt att uppskatta molekylvikten av ett okänt protein genom att bestämma elutionsvolymen på samma pelare. Den här metoden har senare använts av många forskare, och den måste ju sägas vara mycket enkel och kräva lite kostnader jämfört med andra metoder som t.ex. ultracentrifugering. Det har också hävdats att den skulle ge en 10 %-ig noggrannhet. Detta kan nog vara sant, men bara i vissa fall. Ju mera man studerar gelfiltrering desto mera uppenbart blir det, att det inte är molekylvikten av ett ämne utan molekylens storlek och form som bestämmer dess fördelnings-



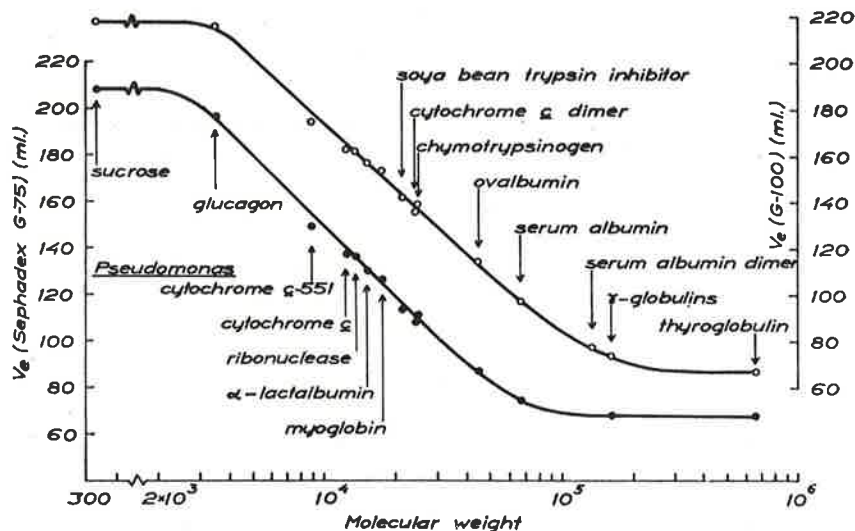
Figur 1. Fraktionering av oligomerer av etylenglykol på en bädd (1,5 × 102 cm) av Sephadex G-10.

koefficient och därmed dess relativa elutionshastighet på en pelare. Detta kan lätt ge upphov till feltolkning av gelfiltreringsresultat. En osymmetrisk molekyl vandrar nämligen snabbare genom en pelare än en sfärisk molekyl av samma molekylvikt. Det är därför nödvändigt att framhålla att de relationer, som dr Andrews funnit endast gäller för molekyler med likartad form. För proteiner kan det vara lämpligt att inskränka metodens användning till endast globulära proteiner, och för andra polymerer endast till homologa serier.

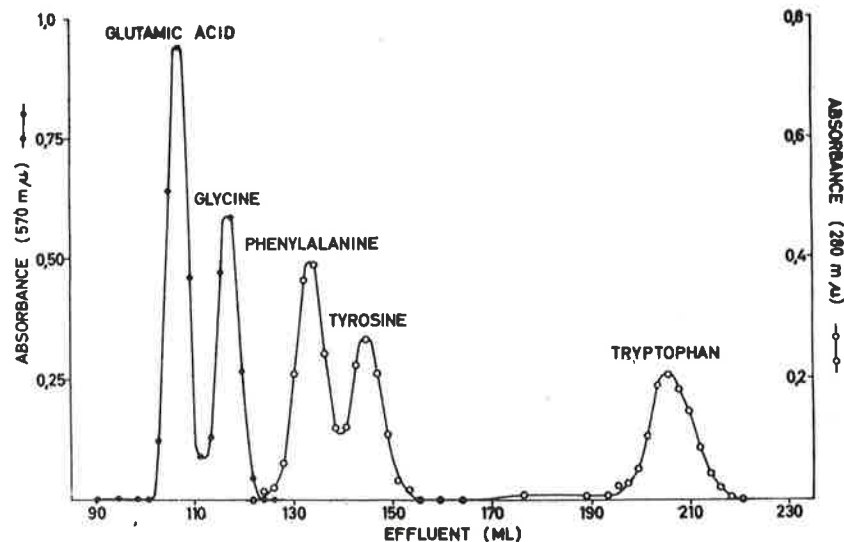
Ytterligare störande effekter, som bör påkalla försiktighet vid tolkning av resultat är ibland förekommande, växelverkande sorptionseffekter mellan lösta ämnen och gel-matrisen. Sorption av proteiner och andra högmolekylära ämnen förekommer ytterst sällan och har bara konstaterats i några enstaka fall, t.ex. för α -amylas och dextranas. Vanligare är det då med sorption av lågmolekylära ämnen. Speciellt gäller detta för aromatiska ämnen, som undantagslöst retarderas i viss utsträckning på alla tillgängliga bäddmaterial. Figur 4 visar ett exempel på separation av aminosyror på Sephadex G-25 till följd av aromatisk sorption (5). Ett annat utnyttjande av sorptions-effekten har Mach och Tatum (6) visat vid separationen av de cykliska decapeptiderna tyrocidin A, B och C (Figur 5) på Sephadex G-25. Peptiderna skiljer sig endast genom olika mängd



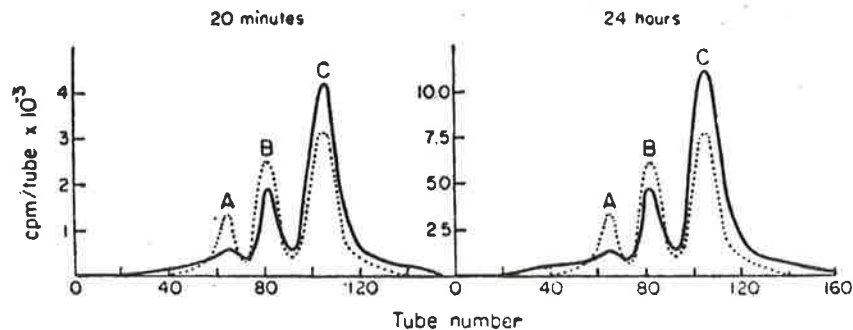
Figur 2. Fraktionering av bovint serumalbumin på Sephadex G-150. M_1 = monomer; M_2 = dimer; M_3 = trimer; M_n = polymerer (Ref. 2).



Figur 3. Kalibreringskurva för bäddar av Sephadex G-75 respektive G-100 (Ref. 3).



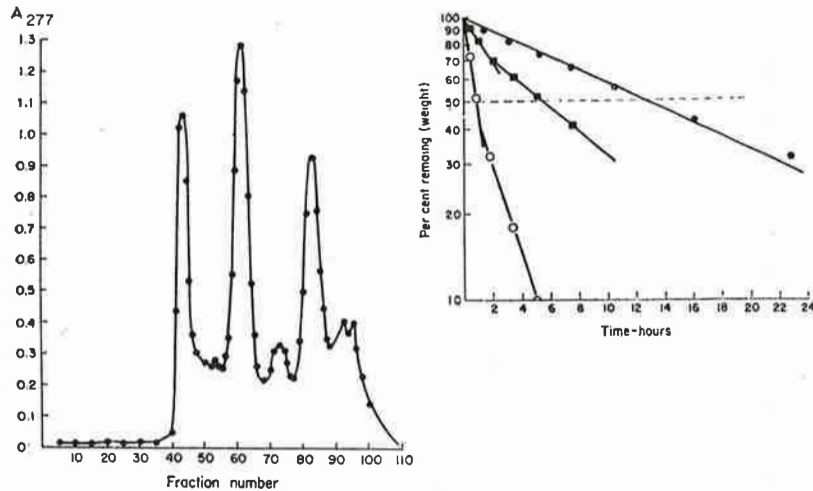
Figur 4. Separation av alifatiska och aromatiska aminosyror på Sephadex G-25.



Figur 5. Fraktionering av tyrocidin A, B och C på Sephadex G-25 (Ref. 6).

tryptofan. C har två tryptofanenheter, B har en och A innehåller ingen tryptofan.

En intressant publikation av Rasmussen och Craig (7) visar dels gelfiltrerings möjligheter och dels ytterligare effekter, som kan inträda och eventuellt försvåra tolkningen av resultat. Genom motströmsfördelning i en stor »Craig-maskin» hade författarna isolerat ett till synes homogent preparat av parathyroidhormon. Då preparatet underkastades gelfiltrering på en bädd av Sephadex G-25 erhöi man emellertid en uppdelning i flera komponenter, som visade att preparatet var långt ifrån homogent (Figur 6). Förvånansvärt nog fick man också olika

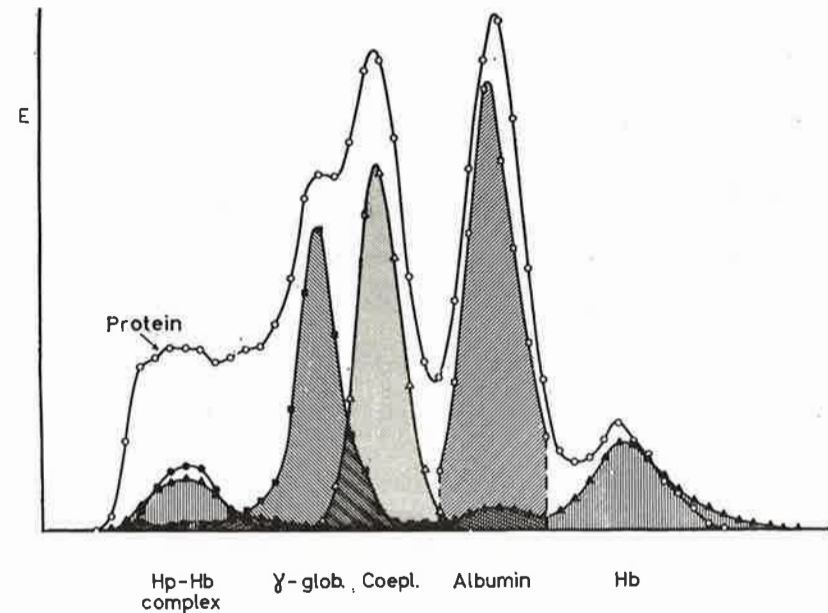


Figur 6. Till vänster: Elutionsdiagram av partiellt renat parathyroid-extract erhållet på en 2,5 × 210 cm bädd av Sephadex G-50 med en 0,2 M ammoniumacetatbuffer pH 4,8.

Till höger: Dialyseshastigheten för parathyroidhormon genom en cellofanmembran (Visking No 20/32) i 0,2 M ammoniumacetat pH 4,73, ●—●, 0,2 M ättiksyra, ■—■ och 0,01 M ättiksyra, ○—○ (Ref. 7).

elutionsdiagram om elutionsmedlet ändrades från 0,2 M ättiksyra till 0,2 M ammoniumacetat. Genom mätningar av det aktiva hormonets diffusionshastighet genom cellulosamembran i olika bufferlösningar kunde man konstatera, att skillnader i elutionsförhållande vid olika pH sannolikt berodde på en förändring av hormonets molekylform.

Ett område, där gelfiltrering kommit till stor användning är för separation av serumproteiner. Många av Er känner sannolikt redan till det elutionsdiagram med tre toppar, som man får vid experiment med Sephadex G-200. Figur 7 visar ett försök, utfört av docent Johan Killander i Uppsala (8). Till ett normalt humanserum sattes ceruloplasmin och hemoglobin, och efter gelfiltrering på Sephadex G-200 vid pH 8,0 i 0,1 M tris-HCl innehållande 1 M NaCl identifierades några komponenter med specifika metoder. Liknande försök har gjorts i mikrogramskala med tunnskikt-kromatografi på Sephadex G-200. Nyligen har också tvådimensionell kromatografi utförts på tunnskikt med gelfiltrering i en riktning och elektrofores i vinkelrät riktning (9). Kombinationen gelfiltrering — elektrofores eller gelfiltrering — jonbyteskromatografi (10) har studerats och på flera håll i världen pågår arbeten för att efter dessa linjer preparera serumproteiner i ganska stor skala.



Figur 7. Gelfiltrering på Sephadex G-200 (4,2 × 73,5 cm) av 3,2 ml humant serum blandat med 3 ml 5 % ceruloplasmin och 1 ml 5,3 % hemoglobin. Elutionsmedel är 0,1 M Tris-HCl + 1 M NaCl, pH 8,0. (Ref. 8.)

Den ojämförligt enklaste tillämpningen av gelfiltrering är separationen av lågmolekylärt material från högmolekylärt. Inom biokemien är det liktydligt med avsättning av proteiner, polysackarider eller nukleinsyror. Detta är ett vanligt förekommande problem i biokemiskt preparativt arbete, som tidigare lösts med dialys genom semipermeabla membraner. Gelfiltrering med Sephadex G-25 ger i många fall en möjlighet att genomföra avsättningar snabbare och i betydligt större skala än med dialys. Ett led i den pågående vidareutvecklingen av gelfiltreringsmetoden är därför arbeten syftande till att uppförstora metodens användbarhet långt över laboratorieskala. Det är ett ganska tidsödande arbete, men vi har ändå kommit därefter, att det finns funktionsdugliga kolonner på hundratals liter och upp till tusen liter. För exempelvis avsättning av en proteinlösning har en apparatenshet på 100 liter en kapacitet av 50—100 liter per timme. Det finns därför anledning att tro, att gelfiltrering skall visa sig ekonomisk och väl användbar även i industriell skala.

Litteratur

1. *B. Gelotte, J. Porath*, Kapitel 14 i »Chromatography», E. Heftmann, 2nd Ed., Reinhold New York 1966.
2. *K. O. Pedersen*, Arch. Biochem. Biophys. Suppl. **1** (1962) 157.
3. *P. Andrews*, Biochem. J. **91** (1964) 222.
4. *P. Andrews*, Biochem. J. **96** (1965) 595.
5. *B. Gelotte, J. Chromatog.* **3** (1960) 330.
6. *B. Mach, E. L. Tatum*, Proc. Nat. Acad. Sci. **52** (1964) 876.
7. *H. Rasmussen, L. C. Craig*, J. Biol. Chem. **236** (1961) 759.
8. *J. Killander*, Biochim. Biophys. Acta **93** (1964) 1.
9. *L. Å. Hanson, B. G. Johansson, L. Rymo*, Clin. Chim. Acta **14** (1966) 391.
10. *B. Gelotte, P. Flodin, J. Killander*, Arch. Biochem. Biophys. Suppl. **1** (1962) 319.

Gelfiltrering av några lågmolekylära aromatiska substanser*

Gösta Brunow

Kemiska Institutet, Helsingfors Universitet

Gelfiltrering av makromolekylära substanser är numera en väl etablerad teknik, speciellt i biokemi och polymerkemi. Däremot finns det relativt få arbeten som behandlar fraktionering av lågmolekylära substanser som är av intresse inom vanlig organisk kemi.

Den renodlade gelfiltreringen separerar substanser efter molekylstorlek, men vid filtrering på Sephadex dextrangel tillkommer ofta adsorptionseffekter som ofta gör att man kan separera substanser med nästan samma molekylstorlek från varandra. Dessa effekter för ett stort antal substanser har undersökts av Gelotte (1). I det följande skall jag relatera några försöksresultat som har erhållits med Sephadex G-10. Det är det tätaste av de dextrangel som finns i handeln och det uppvisar därför de starkaste adsorptionseffekterna.

Innan jag fortsätter skall jag kort definiera några begrepp som jag kommer att använda längre fram.

I en packad gelpelare har man två olika vätskefaser, en inne i gelpartiklarna och en i utrymmet som omger dessa. Vätskevolymen inne i partiklarna brukar betecknas V_i och den omgivande vätskevolymen V_o eller void volume. En substans vars molekylstorlek hindrar den från att överhuvudtaget tränga in i gelpartiklarna elueras med den omgivande vätskevolymen och dess elutionsvolym, V_e , är lika med V_o . En substans med en liten molekyl som obehindrat förmår tränga in i gelpartiklarna fördelar sig jämnt i volymerna V_i och V_o varför dess elutionsvolym $V_e = V_o + V_i$. Man kan karaktärisera substansens förhållande vid gelfiltrering genom K_d -värdet. Detta definieras som den bråkdel av volymen V_i som är tillgänglig för den

* Föredrag vid Kemidagarnas gelfiltreringssymposium i Helsingfors den 2.11.66.

filtrerade substansens molekyler. V_e är då $V_o + K_d V_i$ varur för K_d fås uttrycket

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

En substans som inte alls tränger in i gelpartiklarna har K_d -värdet 0 och en substans som fullständigt tränger in i gelpartiklarna har K_d -värdet 1. Vid normal gelfiltrering rör sig således K_d -värdet mellan 0 och 1. Om K_d är större än 1 är det ett tecken på att substansen i fråga adsorberas till gelets kolhydratskelett. I det citerade arbetet av Gelotte visade det sig att speciellt aromatiska och heterocycliska ämnen på G-25 hade K_d -värden som översteg 1 och som således adsorberades.

I mitt arbete förelåg problemet att separera benzenkarbonsyror med 4, 5 och 6 karboxylgrupper. Substanserna är lättlösliga i vatten och besvärliga att separera med vanliga metoder. I ett första försök löstes benzenhexa- och pentakarbonyra och tetrakarbonyra pyromellitsyra, 20–30 mg av var, i vatten och sattes på en Sephadex G-10 pelare med dimensionerna $1,5 \times 25$ cm. Elutionsmedlet var destillerat vatten och med en automatisk fraktionssamlare togs 3,5 ml:s fraktioner vars absorbans uppmättes i ultraviolett ljus av våglängden 290 m μ . Bild 1 visar resultatet.

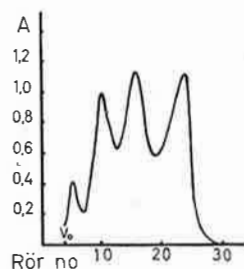


Bild 1.

En viss separation av substanserna var tydlig, överraskande var att antalet elutionsmaxima var fyra. Den första lilla toppen visade sig innehålla alla tre syror och de följande hexakarbonyra, pentakarbonyra och pyromellitsyra i nu nämnd ordning. Den extra toppen som kom före de andra ur pelaren bestod möjligen av syroras anjoner. Om vattenlösningen av de tre syror neutraliserades med kaliumhydroxid innan den sattes på pelaren, kom samtliga syror ut med samma elutionsvolym som den extra toppen i det första försöket. Adsorptionen av dessa substanser är alltså mycket starkt beroende av pH. Detta illustreras av diagrammen i bild 2 och 3.

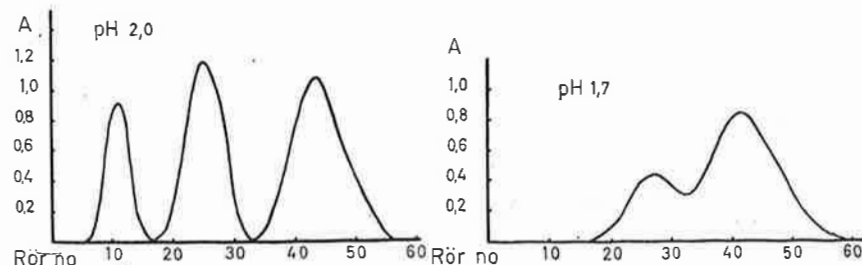


Bild 2.

Bild 3.

Syrorna har i dessa senare fall eluerats med en HCl–KCl buffertlösning. I pH-området 2,0–2,5 fick optimal separation, vid lägre pH växer elutionsvolymerna kraftigt och separationen försämras. K_d -värdena var vid t.ex. pH 2,4: benzenhexakarbonyra 1,5, pentakarbonyra 4,0 och pyromellitsyra 8,9. Ur min synpunkt var problemet härmed löst, elutionskurvorna är symmetriska och tillräckligt väl åtskilda för en kvantitativ bestämning. Bild 4 visar några kalibreringskurvor för benzenpentakarbonyra, kurvan förblir symmetrisk över ett rätt stort koncentrationsområde. För identifiering isoleras den rena syran ur eluatet och jämförs med autentiskt material. För min undersökning var det av värde att syror, som isolerats i form av bariumsalter, efter upplösning i utspädd saltsyra direkt kunde överföras på pelaren. Bariumkloriden kom ut före det organiska materialet med ett K_d -värde på cirka 0,8.

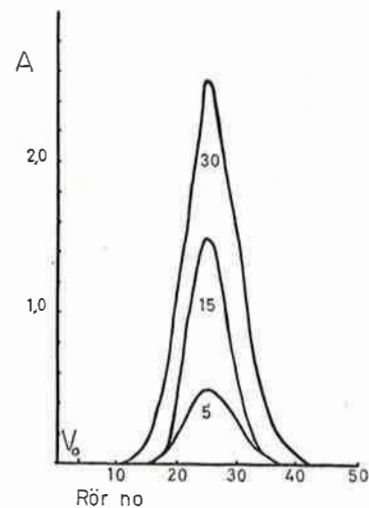


Bild 4.

Antalet teoretiska bottnar, beräknade enligt Glueckauf (2), varierar beroende på hur pelaren packats mellan 38 och 55. Detta ger för en 25 cm:s pelare värdet 0,46—0,63 cm för EHTP (equivalent height of a theoretical plate). Elutionshastigheten var 72 ml/timme vilket delvis torde förklara det relativt låga antalet bottnar.

Andra gelpreparat uppvisar betydligt svagare adsorption. Vid pH 2,0 är K_a för benzenpentakarbonsyra 5,9 på G-10 men endast 1,5 på G-25 och 1,1 på G-50. På dessa senare separeras syrorna inte.

Ett gelpreparat som också undersöktes är Bio-Gel P 2, ett material på polyakrylamidbas. Även på detta material uteblev separationen. På samma sätt som hos dextrangelerna ökade elutionsvolymerna med sjunkande pH (bild 5).

Något enkelt samband mellan syrornas struktur och deras K_a -värden har inte kunnat påvisas, dels är försöksmaterialet för litet, dels är syrornas protolysförhållanden rätt komplicerade. I allmänhet elueras syrorna i surhetsordning (efter pK_1), med den starkaste syran först. Men till exempel hos de tre isomera tetrakarbonyrorna, som också separeras, är elutionsföljden en annan, vilket tyder på att också andra effekter spelar roll vid separationen.

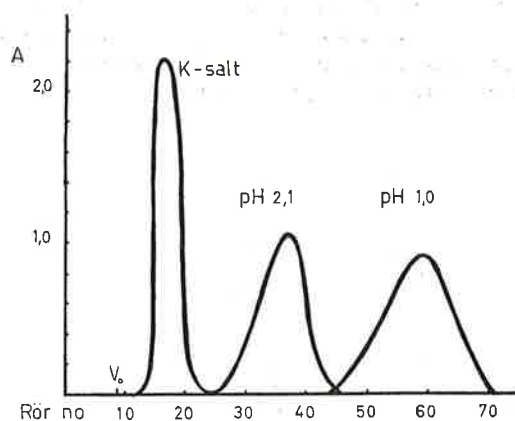


Bild 5.

Litteratur

1. B. Gelotte, J. Chromatog. 3 (1960) 330.
2. P. Flodin, Dissertation AB Pharmacia Uppsala, 1962.

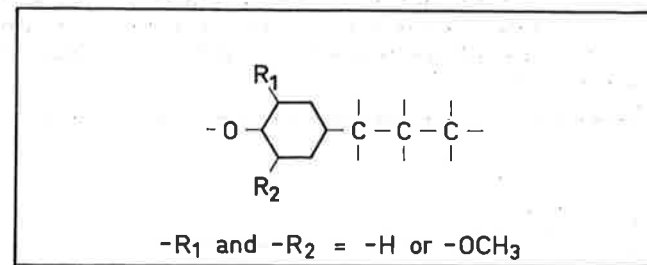
Lignosulfonihappojen geelisuodatus*

Kaj Forss

Oy Keskuslaboratorio — Centrallaboratorium Ab

Kuten tunnettua lignosulfonihapot ovat ligniinien johdannaisia ja sulfittiprosessin pääreaktiotuotteita. Tämän prosessin yhteydessä syntyy Suomessa tätä nykyä noin miljoona tonnia lignosulfonaatteja vuodessa. Lienee myös kaikille tuttua, että ligniinin kemia on vielä suureksi osaksi selvittämättä ja että emme esimerkiksi tiedä, onko ligniini yhtenäinen aine vai ainoastaan samankaltaisten aineiden yhteisnimitys. Kuusipuussa tämän aineen tai ainesosien määrä nousee 29 %:iin kuivan puun painosta.

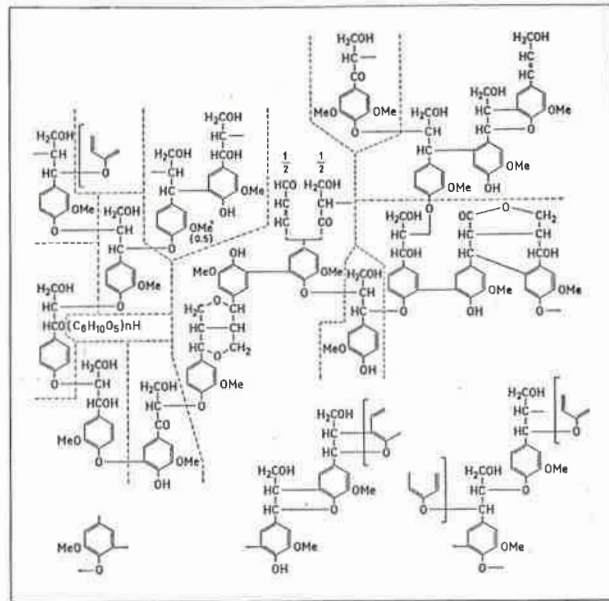
Ligniinin ominaispiirteinä voidaan pitää sitä seikkaa, että se on koostunut eri tavoin yhteen liittyneistä fenyylipropani-yksiköistä (kuva 1).



Kuva 1. Fenyylipropani-yksikkö.

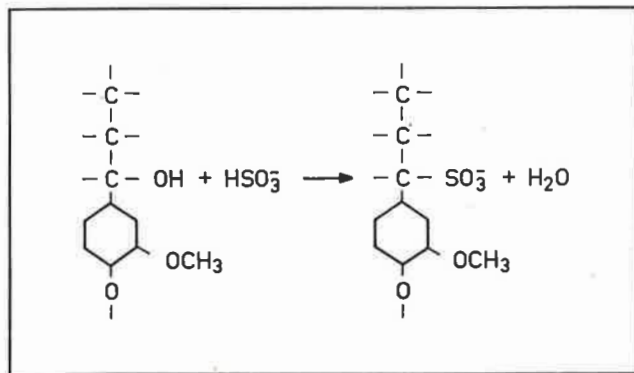
Fenyylipropani-yksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa eetteri- ja hiili-hiili-sidoksilla. Yleisen käsityksen mukaan on tällä tavoin muodostunut kolmiulotteinen makromolekyyli. Koska fenyylipropani-yksiköiden katsotaan olevan täysin sattumanvaraisesti toisiinsa liittyneitä, ei ligniinille voida kirjoittaa tarkkaa rakennekaavaa, vaan ainoastaan eräänlaisen periaatekaavion kuten kuvassa 2 esitetty Freudenbergin (1) laatima rakennekaavio.

* Perustuu Kemian päivien geelisuodatussymposiumissa Helsingissä 2.11.66 pidettyyn esitelmaan.



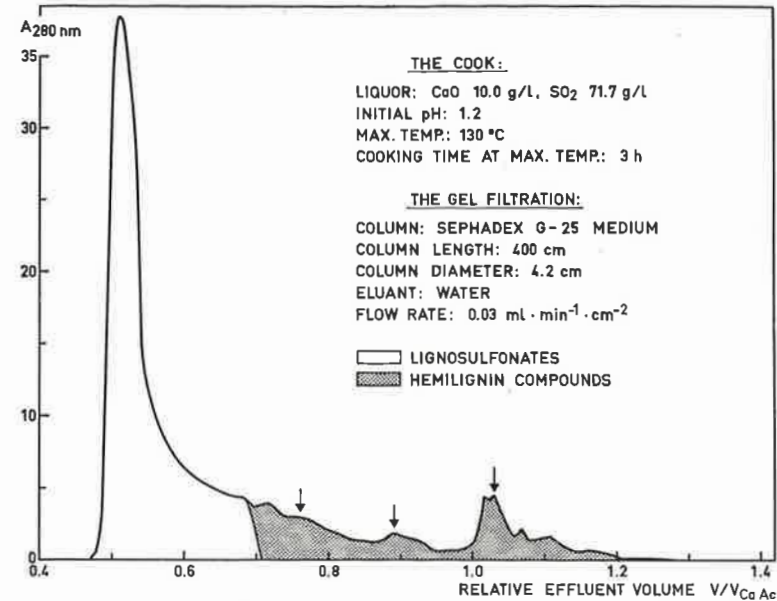
Kuva 2. Freudenbergin käsitys ligniinin rakenteesta.

Sulfiittikeitossa hydrolysoituu osa eetterisidoksista, jotka yhdistävät fenyylipropaaniyksiköjä, ja ligniinimolekyyli hajoaa siten erikokoisiksi kappaleiksi. Samanaikaisesti hydrolyysin kanssa tapahtuu sulfonoituminen sivuketjussa esimerkiksi kuvassa 3 esitetyllä tavalla.

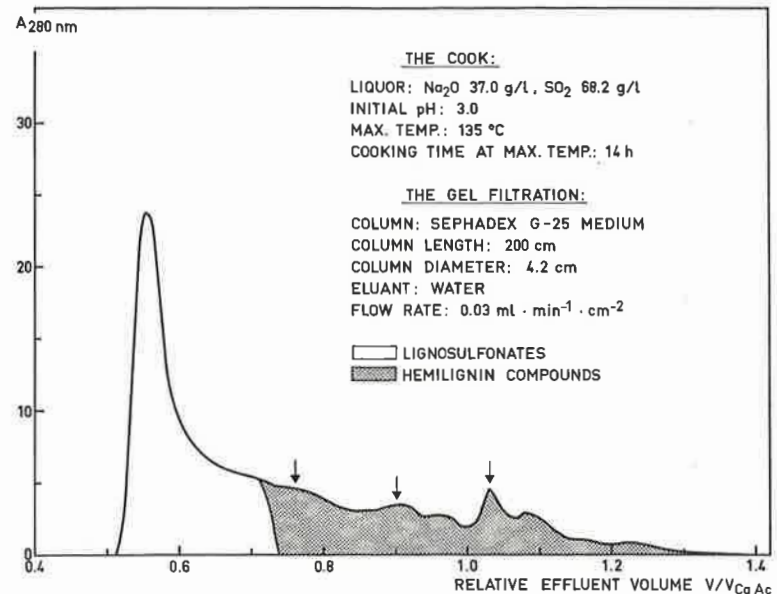


Kuva 3. Fenyylipropaaniyksikön sulfonoituminen.

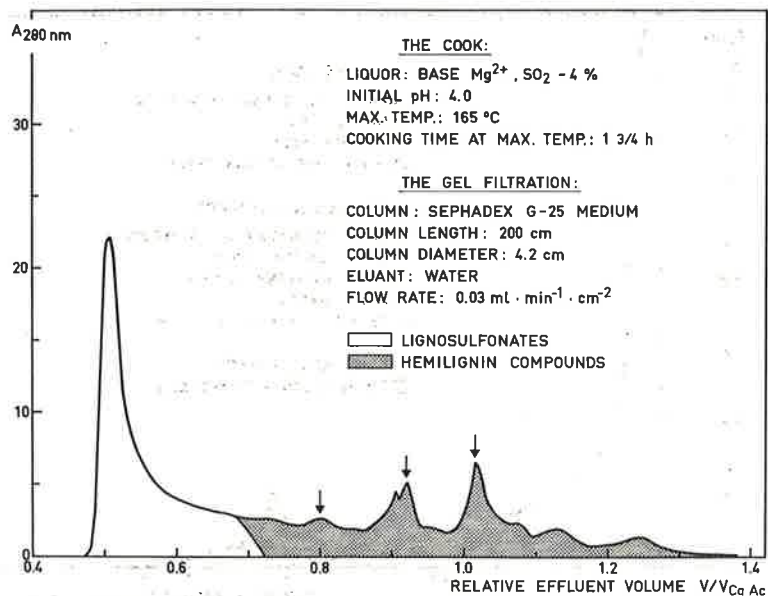
Ligniiniestä hydrolyysin kautta lohjenneet osat muodostavat tällä tavoin hyvin suuren määrän erirakenteisia vesiliukoisia lignosulfonihappoja.



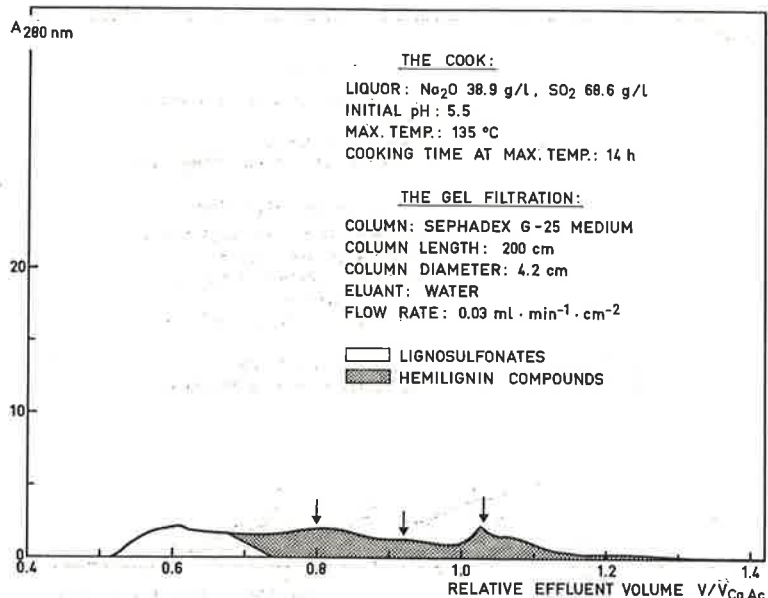
Kuva 4 a. Yhdestä kuusipuukilosta happamassa kalsiumbisulfiittikeitossa liuenneiden lignosulfonihappojen ja hemiligniiniyhdisteiden fraktiointi geelisuodatuksella.



Kuva 4 b. Yhdestä kuusipuukilosta natriumbisulfiittikeitossa (pH 3.0) liuenneiden lignosulfonihappojen ja hemiligniiniyhdisteiden fraktiointi geelisuodatuksella.



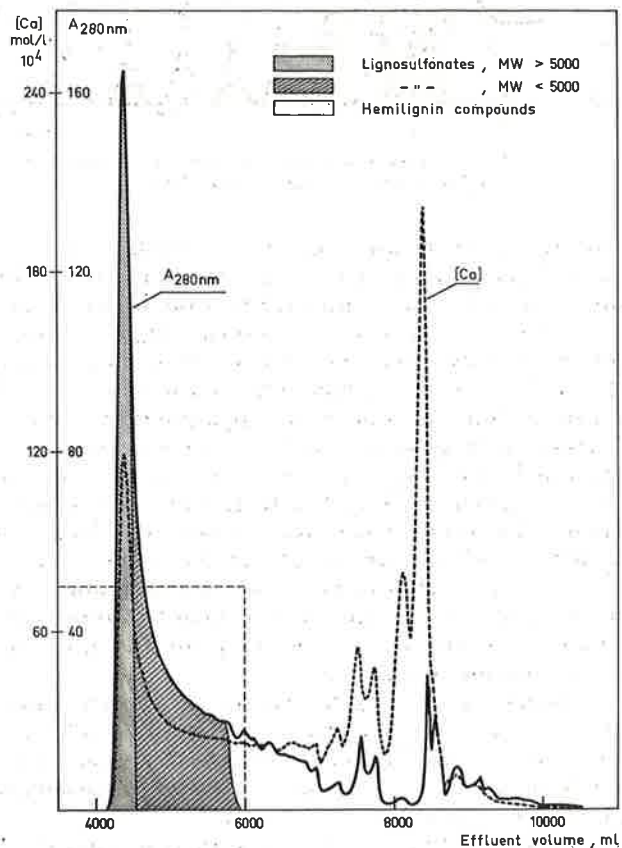
Kuva 4 c. Yhdestä kuusipuukilosta magnesiumibisulfiittikeitossa (pH 4,0) liuenneiden lignosulfonihappojen ja hemiligniinjohdannaisten fraktiointi geelisuodatuksella.



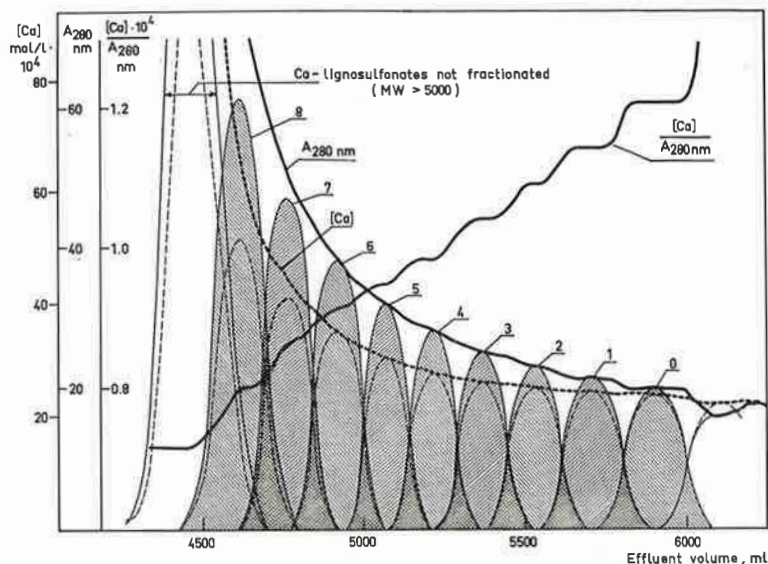
Kuva 4 d. Yhdestä kuusipuukilosta natriumbisulfiittikeitossa (pH 5,5) liuenneiden lignosulfonihappojen ja hemiligniinjohdannaisten fraktiointi geelisuodatuksella.

Fraktioimalla geelisuodatuksen avulla erilaisissa sulfiittikeittoloissa muodostuneita liuenneita aineita olemme tutkineet, kuinka tämä hydrolyysi ja sulfonoituminen tapahtuvat (2).

Kuva 4 esittää siten neljän jäteliuoksen fraktiointia geelisuodatuksella Sephadex G-25:n avulla. Nämä neljä jäteliuosta olivat peräisin keitoista, jotka poikkesivat toisistaan mm. keittonesteen happamuuden suhteen. Kuvasta näkyy kaksi ilmeistä lainmukaisuutta. Ensimmäinen tärkeä lainmukaisuus on se, että lignosulfonihappojen muodostus ja liukeneminen keitossa riippuvat suuresti keittonesteen happamuudesta. Hapanta kalsiumbisulfiittikeittoa kuvaavan eluutiokaavion alkupäässä on korkea huippu, joka kuvaa liuoksen lignosulfonihappopitoisuutta. Kuten kuvasta ilmenee, tämä huippu pienenee huomattavasti keitettäessä vähemmän happamalla keittones-



Kuva 5. Hapamassa bisulfiittikeitossa liuenneiden lignosulfonihappojen ja hemiligniiniaineiden fraktiointi Sephadex G-25:n avulla.

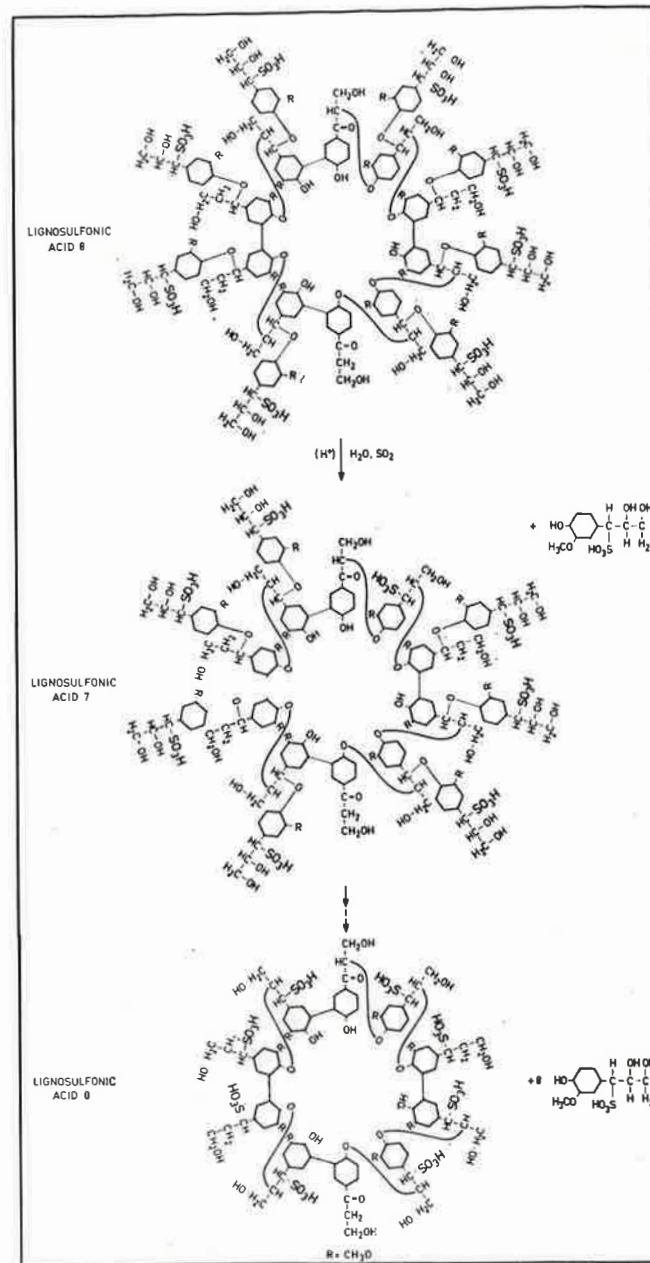


Kuva 6. Pienmolekyylisten kalsiumlignosulfonaattien jakautuminen fraktioitaessa 7,5 m pitkällä Sephadex G-25-kolonilla.

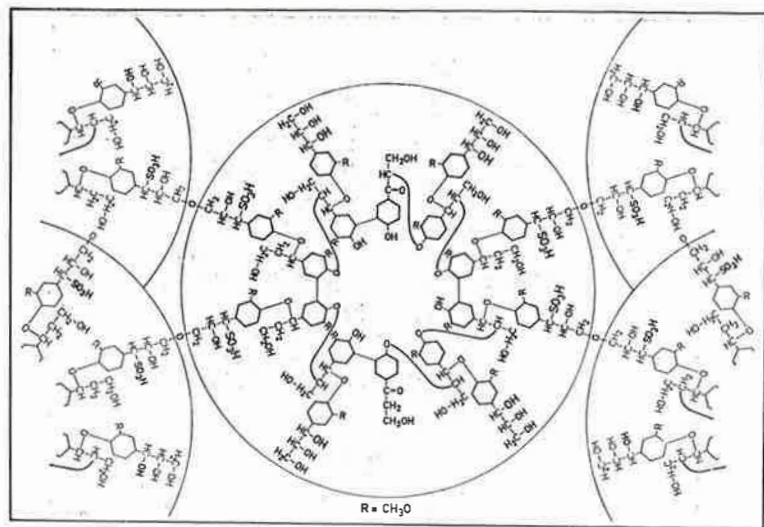
teellä. Keitettäessä bisulfiittiliuoksella, jonka pH oli 5,5, ei varsinaisia lignosulfonihappoja muodostunut liuokseen juuri lainkaan. Toinen tärkeä laimmukaisuus on se, että geelisuodatuksessa lignosulfonihappoja seuraavat lignosulfonihappojen kaltaiset pienmolekyyliset aineet muodostuivat kaikissa keitoissa suunnilleen yhtä paljon. Näiden aineiden muodostus ja liukeneminen ei siten riipu keittonesteen happamuudesta. Mielestämme onkin tarkoituksenmukaista lähteä siitä olettamuksesta, että näillä pienmolekyylisillä aineilla ei ole sama alkuperä kuin varsinaisilla lignosulfonihapoilla. Kuten kuvasta 4 lisäksi ilmenee, pienmolekyyliset aineet ovat koostuneet hyvin monesta komponentista, joiden rakenteesta emme tiedä enempää, kuin että ne ovat metoksyylipitoisia ja sulfonoituvat sulfiittikeitoissa. Kutsumme niitä yhteisnimityksellä hemiligniiniaineiksi välttääksemme sekaannusta varsinaisen ligniinin ja siitä muodostuneiden lignosulfonihappojen kanssa.

Fraktioimalla hyvin pitkällä Sephadex G-25-kolonilla voidaan myös hyvin pienmolekyyliset lignosulfonihapot eristää toisistaan. Näitä fraktioiteja varten käytämme jopa 10 m pitkiä kolonneja. Kuva 5 esittää kalsiumlignosulfonaattien fraktiointia 7,5 m pitkällä kolonnilla (3).

Eluutiokaavion alkupäässä oleva korkea huippu esittää kalsiumlignosulfonaatteja, joiden molekyylipaino ylittää 4 000 ja jotka siten eluoituvat fraktioimattomina. Suurmolekyylisten



Kuva 7. Lignosulfonihappojen 0–8 koostumus.



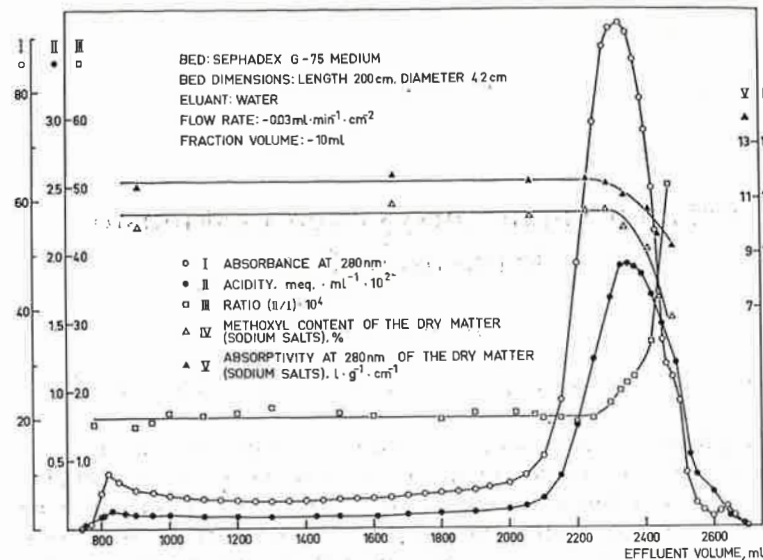
Kuva 8. Kullgrenin lignosulfonihappo.

lignosulfonaattien jälkeen eluotuvat pienmolekyyliset kalsiumlignosulfonaatit ja näiden jälkeen lopuksi hemiligniiniaineet. Kuten kaaviosta ilmenee, pienmolekyyliset lignosulfonaatit eivät ole erottuneet toisistaan, niin että erilliset kalsiumlignosulfonaatit ilmenisivät kaaviosta erillisinä huippuina, mutta vertailemalla fraktioiden absorbanssia ja kalsiumpitoisuutta voidaan päätellä, kuinka nämä lignosulfonaatit ovat jakautuneet. Pienmolekyylisten kalsiumlignosulfonaattien jakaumat ilmenevät kuvasta 6, joka on osasuurennus kuvasta 5.

Happamessa bisulfiittikeitossa muodostuu siten yhdeksän pienmolekyylistä lignosulfonihappoa, joiden koostumus ja riippuvuus toisistaan analyysiemme mukaan voidaan esittää kuvassa 7 esitettyllä kaavalla.

Kuvasta 7 ilmenee, että lignosulfonihapot 0-8 muodostavat polymeerihomologisarjan ja eroavat toisistaan yhdellä guajasyyliglyseroliyksiköllä. Liittämällä eetterisidoksin yhteen useita lignosulfonihappo-8:n yksiköitä saadaan täysin sulfonoidun suurmolekyylisen lignosulfonihapon kaava. Kuvassa 8 esitetään kaava, joka pätee lignosulfonihapon suhteen, joka on ainoastaan puoleksi sulfonoitu ja joka kirjallisuudessa tunnetaan nimellä Kullgrenin lignosulfonihappo.

Varsinainen ligniini on siten käsityksemme mukaan järjestäytynyt polymeeri, jonka toistuva yksikkö kuvassa 8 on merkitty ympyrällä. Sulfonyhmien määrä lignosulfonihapoissa riippuu keittotavasta ja se voi olla korkeintaan kahdeksan jokaisessa toistuvassa yksikössä. Kaavasta ilmenee, että samasta keitosta



Kuva 9. Happamessa kalsiumbisulfiittikeitossa muodostuneiden lignosulfonihappojen fraktiointi Sephadex G-75:n avulla.

eristetyt suurmolekyyliset lignosulfonihapot eroavat toisistaan lähinnä vain molekyylipainon suhteen. Tämä seikka ilmenee fraktioitaessa suurmolekyylisiä lignosulfonihappoja esimerkiksi Sephadex G-75:n avulla (kuva 9).

Eluutiokaavion alkupäässä nähdään lignosulfonaatit, joiden molekyylipaino ylittää 40 000 ja jotka tämän vuoksi eluotuvat fraktioimattomina. Näiden jälkeen seuraavat näitä pienemmät lignosulfonaattimolekyylit fraktioituina. Pienmolekyyliset lignosulfonaatit eivät fraktioitu Sephadex G-75:n avulla ja ne muodostavat siten eluutiokaavion loppupäässä näkyvän suuren huipun. Kuten kuvasta 9 lisäksi ilmenee, osoittavat metoksyyliriikki- ja absorptiviteettimittaukset, että suurmolekyylisillä lignosulfonihapoilla on yhtenäinen koostumus, ja elementaari-analyysit osoittavat lisäksi, että tämä koostumus on sopu-soinnussa ligniini-kaavamme kanssa.

Kirjallisuus

1. Freudenberg, K.: *Holzforschung* **18** (1964): H 1/2,3-9.
2. Forss, K. ja Fremer, K.-E.: *Tappi* **47** (1964): 8, 485-493.
3. Forss, K., Fremer, K.-E. ja Stenlund, B.: *Paperi ja Puu-Papper och Trä* **48** (1966): 9, 565-574, 48 (1966): 11, 669-676.

Eräiden viljan entsyymien ekskluusiokromatografia*

Martti Nummi

Bioteknillinen laboratorio, Valtion teknillinen tutkimuslaitos, Helsinki

Ekskluusiokromatografia on osoittautunut erittäin käyttökelpoiseksi ja käteväksi menetelmäksi analysoitaessa ja puhdistettaessa entsyymejä. Laboratoriossamme on tätä menetelmää käytetty hyväksi esifraktioitaessa ja edelleen tutkittaessa kahta bioteknillisesti tärkeitä entsyymiryhmää: amylaaseja ja proteolyttisiä entsyymejä. Tutkimuskohteena on ollut viljan, lähinnä ohran, k.o. entsyymit.

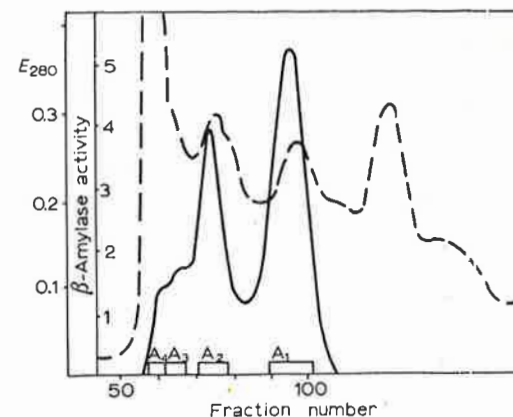
Amylolyttisistä entsyymeistä α -amylaasi osoittautui ekskluusiokromatografiassa käyttäytyvän homogeenisen proteiinin tavoin vaikka todisteita sen heterogeenisyydestä onkin esitetty. β -amylaasi taas osoittautui isotsyymiluontoiseksi molekyylikokoonsa nähden, omaten useita eri molekyylikokoja. Myöhemmissä immunokemiallisissa tutkimuksissa ne osoittautuivat identtisiksi, joten on oletettavissa, että k.o. entsyymi esiintyy useissa eri aggregaatiomuodoissa.

Proteolyttisen aktiivisuuden määrittäminen ohrautteista ekskluusiokromatografian jälkeen osoitti, että proteolyttistä aktiivisuutta esiintyy lähes kaikilla molekyylipainoalueilla, joten on luonnollisesti odotettavissa erittäin suurta heterogeenisyyttä myös tämän entsyymiryhmän kohdalla. Erästä näistä proteolyttisistä entsyymeistä, nim. arginylendopeptidaasia on tutkittu tarkemmin. Tämä entsyymi osoittautui ekskluusiokromatografiassa homogeeniseksi.

Kuten tunnettua, ohra sisältää kahdenlaista β -amylaasia:
1) Vapaata β -amylaasia joka liukenee veteen ja suolaliuoksiin.
2) Sidottua β -amylaasia, joka vapautuu solukosta vain pelkistimillä mutta on pelkistymisensä jälkeen liukoinen veteen ja suolaliuoksiin.

Näiden molempien β -amylaasien, vapaan ja sidotun, rakenteellinen tutkimus ja keskinäinen vertailu on ollut tutkimus-

* Esitelmä Kemian päivien geelisuodatussymposiumissa Helsingissä 2.11.66.



Kuva 1. Ohran neutraalien ja happamien albumiinien elutio Sephadex G-100 pylvästä 10 mM fosfaattipuskurissa, pH 7,5. Pylvään koko: 4 × 65 cm. Fraktiot: 5 ml.

— = β -amylaasiaktiivisuus
- - - = proteiinkonsentraatio

temme lähtökohta. Ilman ekskluusiokromatografian kehittymistä tämänsuuntainen tutkimus tuskin olisi ollut laboratoriossamme mahdollista.

Amylaasit

Amylaasitutkimuksemme aloitimme ohran vapaalla, t.s. veteen ja suolaliuoksiin liukenevalla β -amylaasilla. Tätä tarkoitusta varten ohra jauhettiin ja lipidit poistettiin asetonipesulla kylmässä. Jauhoa uutettiin muutaman tunnin ajan ja saadun uutteen annettiin seistä kylmässä 2 vuorokauden ajan. Tänä aikana suurimolekyyliset, uutteen korkean viskositeetin aiheuttavat polysakkaridit hydrolysoituivat uutteen omien entsyymien vaikutuksesta.¹

Saadusta uutteesta poistettiin ioninvaihtajilla emäksiset proteiinit, jotka eivät sisällä amylaasiaktiivisuutta.² Näin saatu, happamat ja neutraalit proteiinit sisältävä liuos lyofilisoitiin ja kuivaa raakapreparaattia on käytetty seuraavissa analyttisissä töissä.

Kuvassa 1 nähdään ohran neutraalien ja happamien proteiinien sekä vapaan β -amylaasin elutio³ Sephadex G-100:sta. β -amylaasi jakautuu neljäksi fraktioksi, jotka on merkitty kuvassa A_4 , A_3 , A_2 ja A_1 suurimmasta molekyylikoosta pienimpään. Kaksi ensimmäistä fraktiota esiintyen tosin vain olkapää A_2 :n frontin puolella. Ohran vapaa β -amylaasi osoittautui siis olevan molekyylikooltaan erittäin heterodisperssi.

Rekromatografoitaessa eri molekyylikoon omaavat fraktiot, eluotivat ne alkuperäisillä paikoillaan, joten fraktioiden täytyy olla todellisia. Tässä yhteydessä on muistettava, että nämä proteiinit oli esikäsitelty t.s. huomattavasti puhdistettu ennen ajoa Sephadex G-100:lla. Eluutiokuva ei kuitenkaan muutu, β -amylaasin kohdalla jos kromatografoidaan välittömästi proteiinien uuton jälkeen. Fraktioiden preparatiivinen luonne vaan kärsii huomattavasti t.s. kapasiteetti pienenee ja tällä on tietenkin erittäin suuri merkitys ajateltaessa eri fraktioiden edelleen tutkimista.

Ajoliuksen pH:lla ei ollut ratkaisevaa merkitystä β -amylaasin eluotumisessa, edellytyksellä, että ei käytetä ekstreemejä pH arvoja jolloin tapahtuu jo proteiinien denaturoitumista. pH arvoilla 6–8 työskenneltäessä β -amylaasin eluutiokäyrä oli aina samanlainen.

Kokeilimme myös pitempiä Sephadex G-100 pylväitä täydellisemmän erotumisen aikaansaamiseksi. Tuloksena oli kuitenkin vain tässä kuvassa näkyvien fraktioiden leviäminen. Mitään oleellista parannusta ei ainakaan tässä yhteydessä havaittu. Pylvään koko (4 × 65 cm) osoittautui siis ideaaliseksi.

Myöhemmin kauppaan tullut Sephadex G-200 ei myöskään parantanut suurempien β -amylaasin fraktioitumista. Ilmeisesti G-100:n ja G-200:n ominaisuudet ovat todellisuudessa suhteellisen lähellä toisiaan, mutta jonkun muun makromolekyyliarjan analysoinnissa tämä pienikin ero voi olla ratkaiseva.

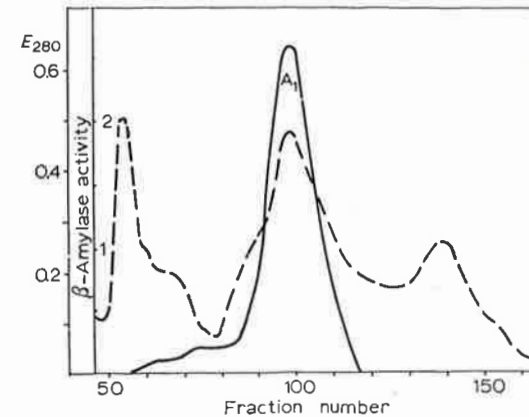
Sephadex G-75 taasen fraktioi odotusten mukaisesti edelleen pienimolekyyllisintä β -amylaasia.

Tämä kuvassa 1 näkyvä β -amylaasin heterogeenisyys saattaa olla seuraus pienimmän komponentin A_1 aggregoitumisesta. Suurimmat β -amylaasikomponentit A_2 , A_3 ja A_4 olisivat tällöin muodostuneet pienimmästä A_1 -komponentista mahdollisesti β -amylaasin sisältämien sulfydryyliryhmien avulla. Tämä oletamus tuntui erittäin todennäköiseltä jo β -amylaasin rikkipitoisuuden perusteella. Toisaalta, sidottu β -amylaasi, joka toiminnaltaan on vapaan β -amylaasin kaltainen, on vapautettavissa vain pelkistävillä agensseilla. Voidaan olettaa sidotun β -amylaasin muodostuneen erittäin moninkertaisesta pienimmän komponentin A_1 aggregaateista, jotka eivät suuren kokonsa vuoksi enää ole liukoisia.

Seurataksemme tätä olettamusten linjaa pelkistettiin ja hapetettiin koko preparoitu albumiifraktio nähdäksemme mahdolliset molekyylikoon muutokset.

Tässä tarkoituksessa suoritimme ensin β -amylaasin pelkistuksen tioglykolihapolla. Pelkistetty uute kromatografoidiin Sephadex G-100:lla ja tulos nähdään kuvasta 2.

Ajo on tehty muuten täsmälleen samalla tavalla kuin edellisenkin ainoastaan tioglykolihapoa on lisätty pylvääseen mahdollis-



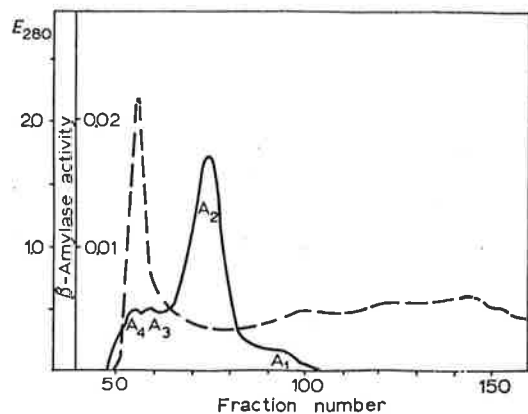
Kuva 2. Pelkistettyjen albumiinien elutio Sephadex G-100 pylväästä, jossa oli 0,3 % tioglykolihapoa. Muut olosuhteet kuten kuvassa 1.

— = β -amylaasiaktiivisuus
 - - - = proteiinkonsentraatio

ten hapettumisen ehkäisemiseksi. Kuten havaitaan, alkuperäinen heterodisperssi β -amylaasi on pelkistyksessä pilkkoutunut pienimolekyyllisimmäksi fraktiokseen A_1 eluotuen erittäin homogeenisena fraktiona. On huomattava, että pelkistykseen aikana ei kokonaisaktiivisuudessa tapahtunut aktiivisuuden vähenemistä. Päinvastoin joissakin tapauksissa oli jopa lievää aktiivisuuden nousuakin. Proteiinin kohdalla on havaittavissa suuria muutoksia. Huomattava osa proteiinista on denaturoitunut ja osa proteiineista jää pilkkoutumatta. Tässä vaiheessa olettamuksemme β -amylaasin aggregaatiomuodoista näytti pitävän paikkansa.

Seuraava vaihe oli tietenkin e.m. preparaatin hapettaminen toivossa, että saisimme aikaan suurimolekyyllisten fraktioiden lisääntymisen. Kokeiltaessa erilaisia hapettimia havaittiin heti totaaliaktiivisuutta seurattaessa, että β -amylaasiaktiivisuudessa tapahtui huomattavaa vähenemistä käytettäessä voimakkaita hapettamia. Lievä hapetus taasen kuten ilmastus ei vaikuttanut oleellisesti. Sopivimmaksi hapettimeksi kokeiltujen joukosta havaittiin pH 7:ään puskuroitu suolaliuos joka oli 5 M urean ja 0,5 M ferrisyanidin suhteen. Hapetettua proteiinia kromatografoidiin jälleen kuvan 1 esittämissä olosuhteissa ja eluutiokäyrä nähdään seuraavasta kuvasta 3.

Kuvasta havaitaan A_2 fraktion suhteellinen kasvu ja pienimmän fraktion A_1 katoaminen. Suurimmat fraktiot A_4 ja A_3 esiintyvät A_2 :een nähden suhteellisesti samassa konsentraatiossa kuin alkuperäisessäkin proteiinissa. Mutta kuten aikaisemmin jo tuli mainittua n. 95 %:n häviö kokonaisaktiivisuudessa



Kuva 3. Hapettujen albumiinien eluutio Sephadex G-100 pylväästä. Ajo kuten kuvassa 1.

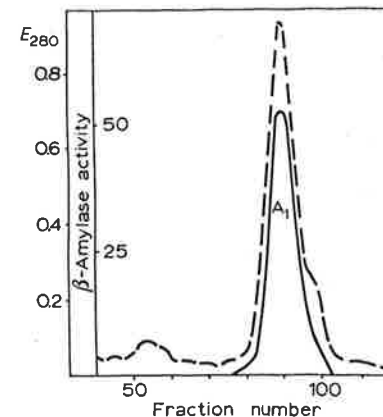
— = β -amylaasiaktiivisuus
 - - - = proteiinkonsentraatio

hapetuksen aikana on aika huomattava vaikka molekyylikoon kasvua onkin havaittavissa. T.s. dissosioituminen pelkistettäessä on mutta assosioituminen näissä hapetusoloissa ainakaan ei ole läheskään tyydyttävää luokkaa. Reaktio on siis irreversiibeli ainakin näissä olosuhteissa.

Oli luonnollista, että tässä vaiheessa halusimme seurata, mitä tapahtuu näille β -amylaasin eri molekyylihuodoille ohran itäessä t.s. mallastuksessa. Tällöin havaittiin, että itämisen aikana jolloin jyvien β -amylaasin kokonaisaktiivisuus kasvaa ja sidotun β -amylaasin määrä vähenee, suurimolekyyliset komponentit häviävät ja idätetyssä ohrassa t.s. maltaassa on vain pienimolekyylisintä komponenttia A_1 . Ilmiö on siis täysin analoginen ohran entsyymin pelkistykseen kanssa. Huolimatta mallastuksen erittäin hapettavista ulkonaisista olosuhteista viljan omat entsyymisysteemit toimivat siis ilmeisesti pelkistävään suuntaan pilkkoen tämäntyyppisiä proteiineja liukoisempaan muotoon.

Sidottu β -amylaasi, joka uutettiin ohrasta tioglykolihapolla useiden kymmenien suolaliuoshuuhdelujen jälkeen eluutui myös homogeenisenä pienimolekyylisimpänä fraktiona A_1 . Eluutio käyrä nähdään seuraavasta kuvasta 4.

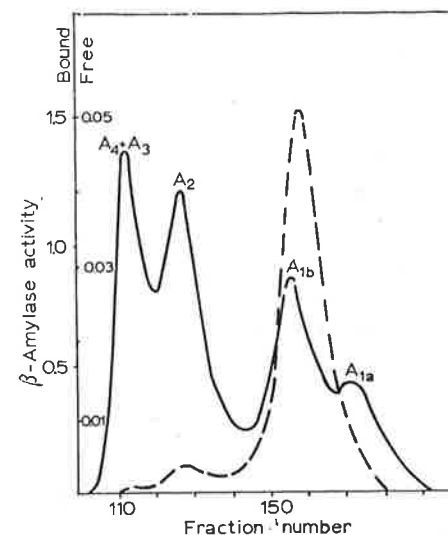
α -Amylaasi, joka syntetisoituu ohrassa vasta itämisen aikana eluutuu Sephadexista samoin kuin sidottu β -amylaasikin ja samalla volyyminä t.s. pienimmän β -amylaasin kohdalla ja homogeenisenä. α -Amylaasi siis ei muodosta mitään polymeeri-sarjaa, joka onkin näissä puitteissa ymmärrettävää koska se ei sisällä aktiivisia sulfydryyliryhmiä.



Kuva 4. Sidotun β -amylaasin eluutio Sephadex G-100 pylväästä. Olosuhteet samat kuin kuvassa 1.

— = β -amylaasiaktiivisuus
 - - - = proteiinkonsentraatio

Tämä eluutiokäyrä (Kuva 4) Sephadex G-100:sta voisi molekyylikoon osalta siis esittää 1) pelkistettyä ohran β -amylaasia 2) sidottua β -amylaasia 3) α -amylaasia 4) maltaan β -amylaasia.



Kuva 5. β -amylaasin eluutio Sephadex G-75 pylväästä. Pylvään koko: 4×130 cm. Puskuri: 10 mM fosfaattipuskuri, pH 7,5. Fraktiot: 5 ml.

— = vapaa β -amylaasi
 - - - = sidottu β -amylaasi

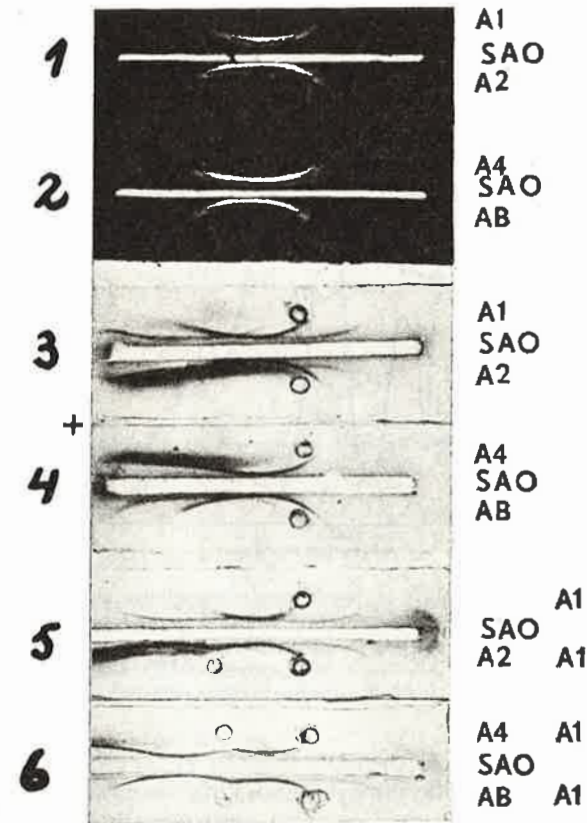
Kuva 5 esittää ohran vapaan ja sidotun β -amylaasin fraktioitumista Sephadex G-75:llä.⁴ Pylvään pituus oli 130 cm muut olosuhteet samat kuin edellä. Sephadex G-100:lla saatu homogeeninen pienimolekyylisin fraktio osoittautui G-75:llä jakautuvan edelleen kahdeksi molekyylikooltaan vain hieman toisistaan poikkeavaksi fraktioiksi A_{1a} ja A_{1b} . Sidottu β -amylaasi eluoi suuren perusyksikön A_{1b} kohdalla. Maltaan β -amylaasi taas eluoi pienemmän peruskomponentin A_{1a} kohdalla. Tämä osoittaa, että ohralla on oma entsyymisysteemi joka pystyy pilkkomaan suurimolekyylisiä entsyymiaggregaatteja pitemmälle kuin pelkkä pelkistys.

Eristettyjen eri β -amylaasifraktioiden ultrasentrifugointi⁵ sen enempää kuin eluotiovolyymistä mitatut molekyylipainoarvot eivät tue yksinkertaista aggregaatiohypoteesiä, jossa suurimolekyylisimmät olisivat yhden tai kahden molekyylipainoltaan toisiaan lähellä olevien perusyksiköiden kerrannaisia. A_{1a} :n molekyylipainoksi saadaan n. 48000, A_{1b} :n n. 55000, A_2 :n noin 75000. A_3 ja A_4 eluotuvat jo niin lähellä Sephadexin kuollutta volyyymiä, että niiden separoiminen ja eristäminen yksinomaan eksklusiokromatografialla on toivoton tehtävä haluttaessa edes suhteellisen luotettavia tuloksia.

Immunologialla menetelmillä⁶ (kuva 6) toivoimme saavamme lisäselvitystä näiden erisuurten β -amylaasin luonteeseen. Tulokset osoittivat kaikkien eristämiemme β -amylaasifraktioiden suurimmasta pienimpään omaavan identtisen immunologisen rakenteen. T.s. kaikki eksklusiokromatografialla saadut erisuuret saman entsyymin fraktiot olivat immunologisesti samanlaisia. β -Amylaasilla kysymyksessä on siis todennäköisesti kysymys isotsyymisysteemistä jossa isotsyymien muodostukseen osallistuu joku, immunologisesti inertti siis ei aktiivinen komponentti tai komponenttiryhmä joka kaiken todennäköisyyden mukaan ei voi olla proteiini immunologisen indefferenttisuutensa vuoksi. Koska immunologiset menetelmät, identifioimiskyvyltään herkimmat tunnetut menetelmät eivät pysty näyttämään eroja erikokoisten saman entsyymien eri muotojen kanssa lienee syytä korostaa eksklusiokromatografian amutlaatuisia etuja tämän tyyppisessä tutkimuksessa.

Proteolyttiset entsyymit

Tämän entsyymiryhmän biokemiallinen monimuotoisuus paikoitti meidät heti tutkimuksemme alussa rajoittamaan tutkittavien proteolyttisten entsyymien skaalaa. Tämän vuoksi jo yksinomaan työmäärän säästämiseksi valitsimme viskositeettimääritykset yleiseksi proteolyttistä aktiivisuutta ilmoittavaksi mittaumenetelmäksi. Gelatiiniliuoksen viskositeetin aleneminen on verrannollinen todellisten proteinaasien, endopeptidaasien aktiivisuuteen. Tämä proteolyttinen entsyymiryhmä on



Kuva 6. Fraktioiden A_1 , A_2 , A_4 ja AB immunoelektroforeettinen analyysi.

SAO = anti-ohra seerumi

AB = sidottu β -amylaasi

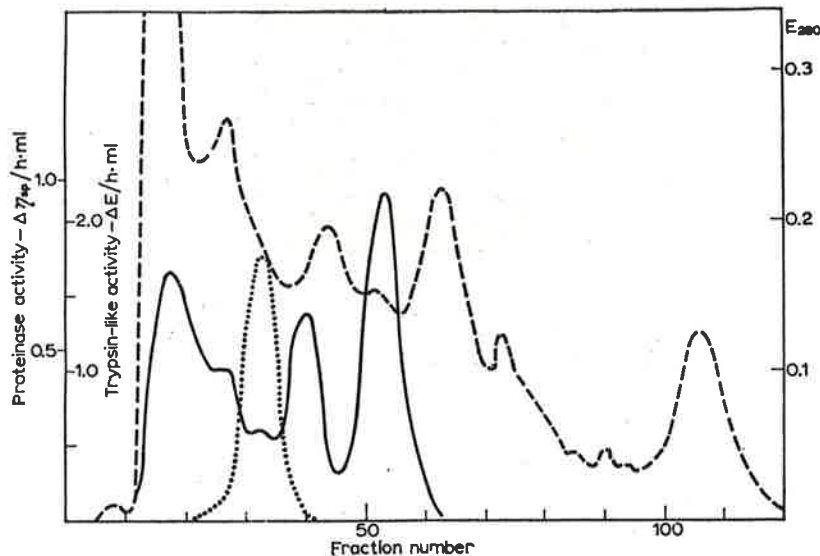
1-2 β -amylaasin osoitus

3-4 fraktioiden värjäys amidomustalla

5-6 Eri fraktioiden immunologisen identtisuuden vertailu. Värjäys amidomustalla.

toisaalta mielenkiintoisempi määrättyssä mielessä kuin eksopeptidaasit koska proteolyttinen toiminta alkanee endopeptidaasien avulla ja ajatellen viljan itämistä t.s. mallastusta endopeptidaasien mobilisoiva toiminta voi olla aivan ratkaisevaa laatua.

Kokonaisendopeptidaasiaktiivisuuden analysoimiseksi kromatografoitiin happamat ja neutraalit albumiinit edellä jo esitettyllä tavalla Sephadex G-100:lla.⁷ Eluaatista mitattiin endopeptidaasiaktiivisuus viskositeetti-mittauksella. Kromatogrammin näemme kuvasta 7.



Kuva 7. Ohran neutraalien ja happamien albumiinien elutio Sephadex G-100:sta. Olosuhteet kuten kuvassa 1.

--- = proteiinkonsentraatio
 ——— = tot. proteolyttinen aktiivisuus
 = arginylendopeptidaasi-aktiivisuus

Tilanne kuitenkin proteolyttisten entsyymien kohdalla ei ole samanlainen isotsyymisysteemi kuin esimerkiksi β -amylaasilla vaan kysymyksessä on mitä suurimmalla todennäköisyydellä erilaisten spesifisten endopeptidaasien summakäyrä, joskaan ei voida sulkea pois jonkun proteolyttisen entsyymin isotsyymimahdollisuutta, näiden entsyymien yleisen sulfhydryyli-sisällön vuoksi. Kokonaisendopeptidaasiaktiivisuus jakautui viiteen fraktioon hyvin laajalle molekyylipainoalueelle noin 20000:sta G-100:n kuolleen volyymin rajalle eli noin 140 000:een. On huomattava, että kromatografisilla menetelmillä ei ennen eksklusiokromatografiaa ole onnistuttu fraktioimaan k.o. entsyymejä, joten tämä menetelmä on tuonut ratkaisevan parannuksen tässäkin probleemassa.

Gelatiinin lisäksi, jota käytettiin substraattina määrittäessä totaaliendopeptidaasiaktiivisuutta, käytimme erästä spesifistä substraattia nim. bentsoyl-arginiini-p-nitroanilidia (BAPA).⁸ Tätä substraattia eivät eksopeptidaasit hydrolysoi, vaan ainoastaan endopeptidaasit jotka hydrolysoivat arginylpeptidejä. T.s. entsyymiä joka hydrolysoi ko. substraattia voidaan kutsua arginylendopeptidaasiksi.

On hyvinkin todennäköistä, että kemiallisen teollisuuden

kehittäessä spesifisiä substraatteja proteolyttisille entsyymeille voidaan joskus tulevaisuudessa esittää eksklusiokromatografian avulla sekä endo- että eksopeptidaasien kartta kaikista biologisista materiaaleista molekyylikoon funktiona.

Eksklusiokromatografia on tuonut viljojen proteiinitutkimukseen aivan uuden vaiheen, vaiheen jossa tämän menetelmän avulla voidaan entistä paremmin puhdistaa, kartoittaa ja karakterisoida tähän asti kohtalaisen tuntemattomia proteiineja ja proteiiniryhmiä, ja on se erittäin tehokas menetelmä tutkittaessa kaikkien uutettavien proteiinien kemiaa molekyyli-
 tasolla.

Kirjallisuus

1. Mikola, J., Nummi, M. ja Enari, T.-M. *Nature*, **195** (1962) 808.
2. Enari, T.-M., Mikola, J. ja Nummi, M. *Brauwissenschaft*, **16** (1963) 189.
3. Nummi, M., Vilhunen Raili ja Enari, T.-M. *European Brewery Conv. Proc. 10th Congr. Stockholm, 1965*, 52.
4. Nummi, M., Vilhunen, Raili ja Enari, T.-M. *Acta Chem. Scand.*, **19** (1965) 1793.
5. Nummi, M., Seppälä, P., Vilhunen, Raili ja Enari, T.-M. *Acta Chem. Scand.*, **19** (1965) 2003.
6. Daussant, J., Grabar, P. ja Nummi, M. *European Brewery Conv. Proc. 10th Congr. Stockholm, 1965*, 62.
7. Enari, T.-M., Puputti, E. ja Mikola, J. *European Brewery Conv. Proc. 9th Congr. Brussels, 1963*, 37.
8. Suolinna, Else-Maj, Mikola, J. ja Enari, T.-M. *J. Inst. Brewing*, **71** (1965) 519.

Litteratur

P. J. Antikainen: Kemiallisen analysin alkeet. WSOY, Borgå—Helsingfors 1966. 215 sid. Inb. mk 14,—.

Prof. Antikainen är författaren till våra i detta nu mest använda grundkursböcker i oorganisk kemi och kvalitativ analys. Han har med förliggande lilla verk försökt avhjälpa bristen på en kortfattad inhemsk lärobok i kvalitativ och kvantitativ oorganisk och organisk analys för agroförstuderande.

Boken inledes med en kort översikt av arbetsredskap och metoder vid kemisk analys. Härpå följer kapitel rörande materiens struktur, samt lösningars och oorganiska joners kemiska och fysikaliska egenskaper. Analys-schemat vid den kvalitativa analysen, som omfattar de vanligaste kat- och anjonerna, genomföres i halvmikroskala och utgör en förkortad version av framställningen i författarens mera omfattande lärobok, »Epäorgaaninen kvalitatiivinen analyysi» (1964). Den kromatografiska analysens metoder ägnas även ett relativt utförligt kapitel.

I avsnittet rörande kvantitativ oorganisk analys behandlas förutom de vanliga gravimetriska och volymetriska metodernas teori och praktik, komplexometrisk titrering, fällningsanalys samt fotometrisk analys. Kapitlet avslutas med en samling räkneuppgifter jämte svar.

Boken omfattar även tabeller över grundämnenas atomvikter och elektronstruktur, löslighet och löslighetsprodukter, protolyskonstanter, syra-basindikatorer, normalpotentialer, nödiga reagenslösningar samt en alfabetisk innehållsförteckning.

På grund av författarens medvetna strävan till korthet och lättfattlighet har behandlingen av teoretiska frågor ibland förenklats mer än vad kanske vore nödigt. Sålunda skulle man gärna ha sett att Paulis princip nämnts då Hundts regel givits. Vidare borde definitionen av pH ha ingått, då boken behandlar utförligt olika slag av protolysjämvikter. Det föråldrade hydrolysbegreppet har även medtagits, men mycket riktigt karakteriserats som ett specialfall av vanlig protolys. Definitionen av orbitaler och behandlingen av komplexometrisk analys kunde även ha gjorts mera exakt. Vidare saknar man ett avsnitt rörande analysnoggrannhet och analysfel. Ett fatalt tryckfel har även insmugit sig i samband med Mohrs titrering. Indikatorn är inte kaliumdikromat utan kaliumkromat. Flerstädes förekommer även formen absorbtio i stället för absorptio.

Trots att man sålunda kan rikta en del anmärkningar mot speciella partier i boken måste den såsom helhet betraktad anses uppfylla sitt ändamål som en kortfattad kursbok i oorganisk och organisk analys för högskolestuderande för vilka kemien är ett biämne. Vidare kan den rekommenderas för kemikurserna vid tekniska läroverk och laborantskolor.

Bokens typografiska utstyrelse är värdad och inbindningen mycket god.

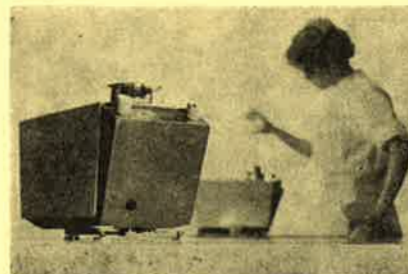
J. Johan Lindberg.

Sephadex

- geler och
- kolonner

säljes i Finland endast av

G. W. Berg & Co



METTLER

**P—SERIEN
6 PIGGA BRÖDER
UTE I VIDA VÄRLDEN**

Nyttig tabell i fickformat

Modell	P 120	P 1200	P 1000	P 3	P 6	P 10
Högsta belastning	130 g	1300 g	1300 g	5 kg	7.5 kg	13 kg
— tarering	10 g	100 g	300 g	2 kg	1,5 kg	3 kg
Optiskt område	10 g	100 g	1000 g	3 kg	6 kg	10 kg
Noggrannhet ±	0.003 g	0.01 g	0.1 g	0.2 g	0.25 g	1 g

METTLER

SOM ANDRA FÖLJER



G. W. BERG & Co

Fabiansgatan 14 — H:fors 13 — tel. 11541

Sauter- Toppan fuktmätarvåg MPR 160/100



Vågen torkar och väger i samma arbetsskede. Fuktminskningen framgår direkt i procent och eliminerar således fel­möjligheterna. Övergång från gramskala till procentskala och tillbaka sker behändigt endast genom att vrida på ett handtag. Med Toppanvågen kan man mäta fuktig­heten i tyg, fiber, vätskor, mjöl, gryn, jordprover, livsmedel osv. Toppan fuktmätarvågen kan lätt flyttas från plats till plats. Den är lättskött — också nybörjare kan hantera den.

**Gör förfrågningar.
Begär broschyr.**

Importör och ensamrepresentant

oy apta ab

**Nilsägatan 6-8, Helsingfors 51
Tel. 70 877**

**August Sauter KG.
747 Ebingen Württ.**