

ЭФФЕКТ СОЛЮБИЛИЗАЦИИ И КОНФИГУРАЦИЯ МОЛЕКУЛ БЕЛКА В РАСТВОРЕ

В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, Н. И. Серая

Термином «солюбилизация» принято называть самопроизвольное повышение растворимости мало или практически нерастворимых веществ в данном растворителе под влиянием небольших добавок поверхностноактивных веществ.

Впервые эффект солюбилизации наблюдался в водных растворах мыл и затем систематически изучался в ряде работ [1—7]. В настоящее время основные закономерности этого явления установлены.

Согласно представлениям Ребиндера [5], при растворении углеводорода в растворе мыла он поглощается углеводородным ядром мицеллы, вызывая набухание ядра последней. При этом часть углеводорода, проникшего внутрь мицелл, связывается силами Ван-дер-Ваальса с неполярными группами молекул мыла и надстраивает их, образуя комплексы типа сольватов. Такие комплексы являются как бы молекулами высшего гомолога, на что указывает повышение поверхностной активности водных растворов мыл с растворенным в них маслом.

Характерной особенностью мыл и белковых веществ с точки зрения структуры их первичных частиц молекул и макромолекул (соответственно) является наличие у тех и других неполярных олеофильных групп, расположенных асимметрично по отношению к полярным гидрофильным группам.

Эта асимметрия приводит, в свою очередь, к их ярко выраженной поверхностной активности.

Однако белковые вещества высокомолекулярны, чем принципиально отличаются от мыл. Они способны образовывать истинные растворы в воде, в отличие от мыл, образующих коллоидные растворы. Молекула белка имеет значительно более высокий молекулярный вес первичной частицы, варьирующей от нескольких тысяч до нескольких миллионов, обладает большим количеством ионогенных групп, несущих электрические заряды противоположного знака, в то время как в молекулах мыла содержатся лишь отрицательные карбоксильные группы. В водном растворе молекулы белка, в зависимости от условий, могут иметь форму вытянутых цепей или глобул (клубка); строение глобулы напоминает структуру мицеллы мыла. Так, мицелла мыла и макромолекула белка на своей поверхности несут полярные группы, а неполярные радикалы направлены внутрь.

Таким образом, можно предполагать, что белки должны проявлять солюбилизирующее действие, что и было установлено Талмудом в 1941 г. [8].

Бреслер [9] показал, что 2 %-ный раствор эдестина в 10 %-ном растворе хлористого натрия поглощает около 50 % по весу пентана, что составляет 2000 молекул на молекулу эдестина. Им же [10] установлено прямыми опытами в ультрацентрифуге, что белковая молекула набухает, увеличиваясь в объеме, если в окружающей среде находится углеводород. Однако набухание глобулярного ядра ограничено, так как участки

глобулы соединены друг с другом водородными связями, образуя более или менее жесткий каркас.

Особенно любопытные результаты получились при исследовании взаимодействия белков (серумальбумина) с солями жирных кислот. Оказалось, что мыла чрезвычайно сильно поглощаются белковой глобулой [11]. Это явление настолько похоже на адсорбцию поверхностно-активных веществ на поверхности углеводородных эмульсий, что его можно считать одним из наиболее прямых экспериментальных подтверждений теории углеводородного ядра.

Дебориным [12] было показано, что введение в молекулу глобулярного белка (яичного и сывороточного альбуминов) гидрофобного красителя (судана III) приводит к удвоению молекулярного веса белка, определяемого по кривым площадь — давление двумерной газовой пленки белка на поверхности раздела вода — воздух. Им было также установлено полутора-двукратное увеличение площади, занимаемой молекулой белка в мономолекулярном слое, при введении красителя судана III. Аналогичные данные были получены для трипсина.

Клотц с сотрудниками [13] также изучали взаимодействие глобулярных белков сывороточного и яичного альбумина с нерастворимыми красителями — производными аминоазобензола. Эти авторы нашли, что в 0,2%-ном растворе сывороточного альбумина связывается краситель в отношении 1 : 1 (моль красителя на моль альбумина). Катионная форма красителя взаимодействует с белком при рН выше изоэлектрической точки на 2—3 единицы рН, начиная от рН 7,0.

Анионная форма красителя взаимодействует с белком при рН, равном изоэлектрической точке и ниже. Это связывание красителя с белком они объясняли электростатическим взаимодействием.

Мы рассмотрели основные работы по солюбилизации глобулярными белками. В отличие от солюбилизации растворами мыл, для которых известны многие закономерности, это явление в белковых системах почти совершенно не изучено. Между тем солюбилизация белковыми веществами имеет большое теоретическое и практическое значение. Так, результаты исследований этого эффекта позволяют получить новые данные о строении молекулы и о механизме ряда важнейших биологических процессов, к которым относится прежде всего перенос и обмен веществ в организме.

Ранее нами [14] была изучена солюбилизация бензола в растворах желатины в зависимости от рН среды и концентрации. При этом было показано, что величина солюбилизации проходит через максимум в изоэлектрической точке (при 20°). Обнаруженный максимум солюбилизирующего действия в изоэлектрической точке — новый факт, характеризующий изоэлектрическое состояние белка.

Целью данной работы было — продолжить изучение солюбилизации белковыми веществами, выяснить связь между состоянием (конформацией) белковых макромолекул в растворе и их способностью солюбилизировать малорастворимые вещества, в частности углеводороды.

Объекты исследования и методика

В качестве белкового компонента была взята желатина. Желатина — типичный полиамфолит, хорошо растворимый в воде и обладающий ярко выраженной поверхностной активностью. Кроме того, желатина в определенных условиях обладает способностью обратимо переходить из фибриллярной формы в глобулярную [15]. Желатину предварительно подвергали очистке при помощи высоковольтного многокамерного электрофореза по методике, разработанной Каргиним и Матвеевой [16]. Очистка 2%-ного раствора желатины, при напряжении в средней камере, равном 1500 в (во вспомогательных камерах 400 в), длилась в среднем 30—40 часов. При таком большом напряжении температура раствора сильно по-

вышается — вплоть до 100° . Чтобы избежать нагревания, совершенно недопустимого для белков, где температура не должна превышать 30° , в среднюю и боковые камеры электродиализатора вводили холодильники. Температуру во время очистки поддерживали $20—25^\circ$. Чистоту полученного продукта контролировали, наблюдая за силой тока в приборе. Последняя в конце очистки составляла примерно $8—10\text{ мА}$, что соответствует электропроводности бидистиллата. Кроме того, чистоту продукта проверяли определением зольности. После очистки зольность равнялась нулю в четвертом знаке. Полуколичественный спектральный анализ показывал только следы натрия.

Следует отметить, что при высоковольтном электродиализе наблюдается прохождение в катодную камеру через целлофановую мембранны низкомолекулярной фракции желатины, примерно 5 % от общей навески. Очевидно, этим следует объяснить то, что подвергнутая электродиализу желатина обладает высокой устойчивостью к действию микроорганизмов и долго (до двух-трех месяцев) не загнивает.

Растворяемым веществом служил нитробензол, так как он плохо растворим в воде и, в отличие от бензола, имеет полярную группу NO_2 . Интересно было выяснить, оказывает ли влияние полярная группа на механизм солюбилизации. Предварительно нитробензол тщательно очищали по общепринятой методике [17]. Чистый нитробензол имел n_D^{20} 1,5529, т. кип. $210—211^\circ / 760\text{ мм}$ и т. кип. $85^\circ / 9\text{ мм}$, что соответствует литературным данным. Для приготовления белковых растворов всегда применяли воду, дважды перегнанную с перманганатом. Количественно эффект солюбилизации измеряли рефрактометрическим методом, предложенным и разработанным Юрженко [18]. Этот метод основан на том, что с введением углеводорода в раствор поверхности-активного вещества показатель преломления раствора обычно возрастает до насыщения его углеводородом и затем становится постоянным. Далее Воюцким [19] было показано, что растворимость жидкостей может быть определена на основе правила аддитивности удельной рефракции. На результатах опытов не сказывалось присутствие капель эмульгированного избытка углеводорода. Для определения показателя преломления пользовались рефрактометром типа Аббе.

Результаты и их обсуждение

Состояние молекул белка в растворе зависит прежде всего от pH среды, поэтому этот фактор был изучен в первую очередь. pH среды изменяли, добавляя HCl или NaOH в интервале от pH 2,5 до pH 11. Изоэлектрическую точку диализованной желатины устанавливали по максимуму мутности и минимуму вязкости при 20° . Оказалось, что изоэлектрическая точка диализованной желатины лежит при pH 5,2, что согласуется с данными Вебера [20].

Растворимость нитробензола определяли следующим образом. Вначале измеряли показатели преломления растворов желатины с различными значениями pH и при различной концентрации желатины; затем добавляли в избыток нитробензол и после установления равновесия (~ 24 часа) снова измеряли показатели преломления водного слоя. После соответствующих расчетов получали величину растворимости нитробензола в граммах на 100 мл раствора желатины.

Из результатов этих опытов, представленных на рис. 1, видно, что наибольшая солюбилизация нитробензола наблюдается в изоэлектрической точке для всех изученных концентраций. Появление максимума солюбилизации можно объяснить, так же как и в случае бензола [14], свертыванием разветвленных цепочек желатины в изоэлектрической точке, приводящих к образованию глобул, характерная особенность ко-

торых (как и у глобулярных белков и у мицелл мыла) — наличие гидрофобного ядра, вызывающего эффект солюбилизации.

В кислой и щелочной средах взаимное отталкивание одноименно заряженных функциональных групп приводит к выпрямлению цепей, и солюбилизация падает. То, что солюбилизация при крайних значениях рН полностью не исчезает, вероятно, объясняется сорбцией молекул нитробензола на неполярных участках (боковых цепях) макромолекул.

В связи с высказанными соображениями интересно было выяснить изменение вязкости растворов желатины после солюбилизации в них нитробензола. Вязкость измеряли на эласто-вискозиметре ротационного типа новой конструкции, разработанной одним из нас совместно с Алексиным [21]. Основная особенность прибора та, что в нем использован воздушный подшипник, обеспечивающий практически полное отсутствие трения при вра-

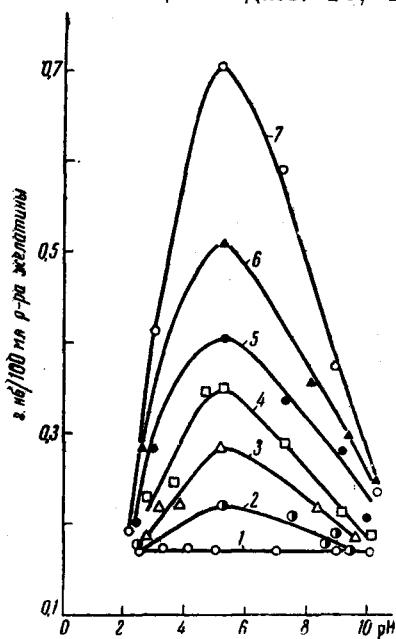


Рис. 1. Зависимость солюбилизации нитробензола от pH среды в растворах желатины различной концентрации (c , вес. %).

1 — 0,000, 2 — 0,125, 3 — 0,250, 4 — 0,400, 5 — 0,500, 6 — 1,000, 7 — 2,000

щении внутреннего цилиндра. Вязкость рассчитывали по формуле, предложенной Чумаковой-Ивановой и Ребиндером [22]:

$$\eta = \frac{Mb}{4\pi^2 hn r^3},$$

где $r = (r_1 + r_2)/2$; r_1 — радиус внутреннего цилиндра (см), r_2 — радиус внешнего цилиндра (см), M — крутящий момент (дин/см), n — число оборотов в секунду, h — высота внутреннего цилиндра (см), b — расстояние между цилиндрами, η — вязкость в пузах.

На рис. 2 приведены данные для 0,5%-ного раствора желатины при 20° до и после солюбилизации нитробензола.

Как видно из рис. 2, а, при pH 5,2 вязкость в изоэлектрической точке после солюбилизации обнаруживает небольшое увеличение. По-видимому, это связано с тем, что в изоэлектрической точке глобулы желатины имеют достаточно рыхлую структуру, и бензол, проникая в глобулу, лишь незначительно увеличивает ее размеры.

В кислой и щелочной областях от изоэлектрической точки (рис. 2, б, в) после растворения нитробензола наблюдается резкое понижение вязкости. Можно предположить, что «укрупнение» гидрофобных участков за счет сорбированного бензола приводит к частичному свертыванию молекул вследствие взаимного притяжения неполярных участков цепей ван-дер-ваальсовыми силами [23]. Та же закономерность наблюдается и при других изученных концентрациях желатины.

Данные о солюбилизации нитробензола растворами желатины при разных рН среды хорошо согласуются с данными, полученными ранее для солюбилизации бензола [14]. Очевидно, механизм взаимодействия нитробензола с желатиной такой же, как и у бензола, несмотря на наличие у первого полярной группы, а именно: углеводород входит в глобулы

белка, если таковые имеются в растворе, и тогда наблюдается значительное повышение его растворимости. Таким образом, измерение эффекта солюбилизации может служить методом определения конфигурации белковых молекул в растворе. Это предположение мы проверили при изучении зависимости солюбилизации от концентрации.

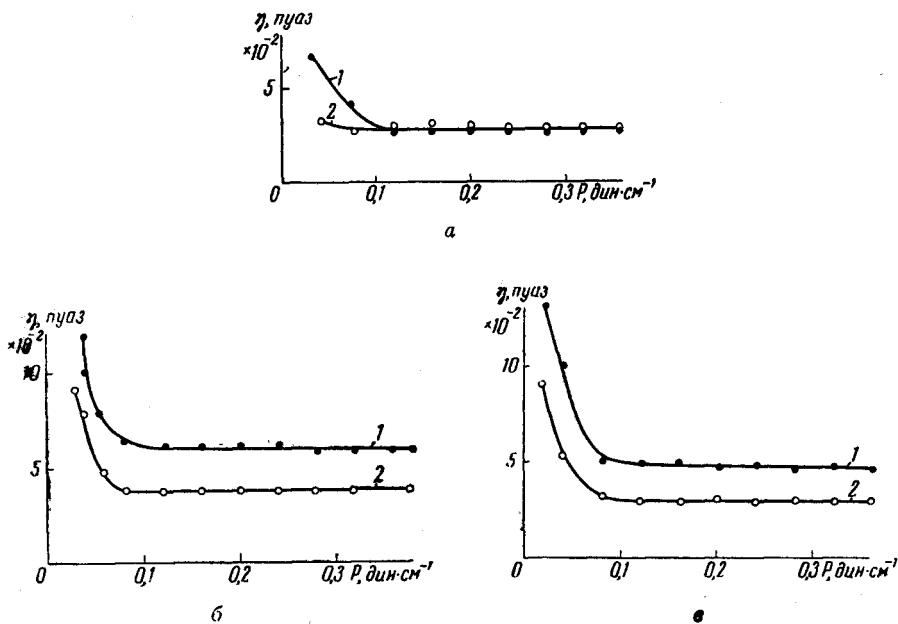


Рис. 2. Зависимость вязкости от напряжения сдвига для 0,5%-ного раствора желатины: а — при рН 5,2; б — при рН 3,0; в — при рН 9,0
1 — до солюбилизации, 2 — после солюбилизации

На рис. 3 (кривая 1) изображена зависимость солюбилизации нитробензола от концентрации желатины при рН 5,2 (в изоэлектрическом состоянии).

Из этих данных видно, что до концентрации желатины, равной 0,5%, наблюдается прямолинейное нарастание растворимости нитробензола. Интересно было сопоставить данные по солюбилизации со структурно-механическими свойствами растворов желатины этих же концентраций.

Из литературы [15] известно, что начиная примерно с 0,5%-ного раствора желатины образуется структура студня; следовательно, как только образуется структура студня желатины, так солюбилизация нитробензола с этого момента уменьшается. Особенно хорошо это видно из рис. 3 (кривая 2), на котором изображена солюбилизация нитробензола. На оси ординат отложено количество молей нитробензола, связавшегося с одним молем желатины (мол. вес желатины приняли равным 70 000). Эти же данные свидетельствуют, что в разбавленных растворах приведенная солюбилизация наибольшая и постоянная; последнее связано с тем, что в разбавленных растворах желатины глобулярная форма наиболее вероятна.

Вообще в растворах желатины образование связей может происходить как между различными цепями, так и между полярными группами в пределах одной молекулы. Количество связей одного и другого типа (межмолекулярных и внутримолекулярных) определяется лишь вероятностью встречи полярных групп, находящихся в разных и одних и тех же цепях. Вероятность образования межмолекулярных связей быстро убывает

с уменьшением концентрации раствора. В разбавленных растворах вместо межмолекулярного взаимодействия, наблюдающегося при образовании сетки «студня», должно иметь место лишь внутримолекулярное взаимодействие, т. е. образование глобул. Поэтому приведенная растворимость нитробензола в разбавленных растворах больше, чем в концентрированных.

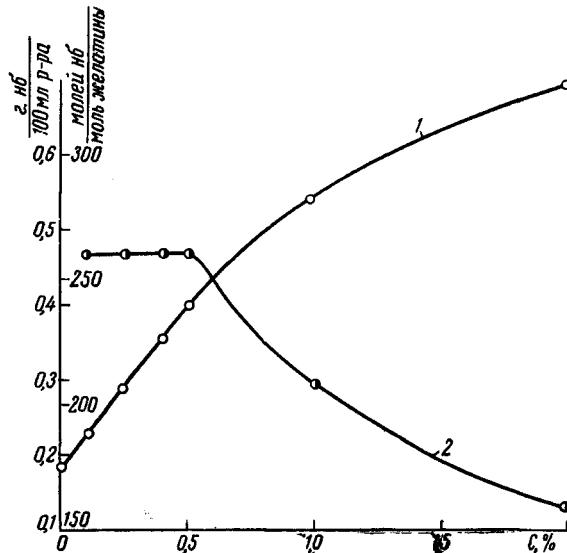


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость солюбилизации нитробензола от концентрации желатины:
1 — растворимость нитробензола выражена в г нитробензола на 100 мл раствора, 2 — в молях на моль желатины

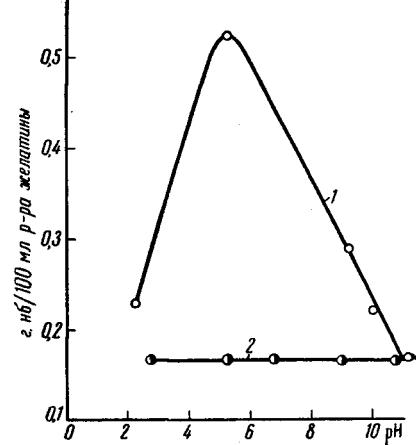


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость растворимости нитробензола от pH среды:
1 — при 20°, 2 — при 30° С

Данные исследования влияния концентрации на солюбилизацию нитробензола в растворах желатины приводят нас еще раз к выводу, что повышение растворимости нитробензола следует объяснить входлением молекул нитробензола внутрь такой глобулы.

Нами измерялась растворимость бензола и нитробензола при 30° в зависимости от концентрации и pH среды. Опыты проводились тем же способом, как и при 20°. Они показали, что растворимость бензола и нитробензола не повышается ни при каких концентрациях желатины. Кроме того, при 30° (рис. 4) исчезает характерный максимум солюбилизации в изоэлектрической точке, наблюдаемый в растворах желатины в том же интервале концентраций при 20°.

Исследования вязкости при 30° (рис. 5) обнаружили, что вязкость в зависимости от pH мало изменяется. Это, очевидно, связано с тем, что состояние молекул желатины в растворе идентично в различных областях pH. В подтверждение этого предположения была исследована мутность раствора желатины при разных pH и температурах. Данные о мутности представлены на рис. 6. Видно, что с увеличением температуры максимум на кривой зависимости мутности от pH постепенно вырождается. При 30° мутность раствора желатины от pH среды почти не зависит. Отсутствие при 30° экстремальных значений солюбилизации, вязкости, мутности свидетельствует о том, что при этой температуре в изоэлектрическом состоянии глобулы не образуются. Эти данные хорошо согласуются с литературными [15].

Далее мы попытались выяснить, как влияет длина цепи молекул желатины на солюбилизацию бензола и нитробензола. Для этого желатину

подвергли 80-часовому термолизу при 100°. Из термолизованной желатины готовили растворы с различной концентрацией и pH среды и измеряли растворимость бензола и нитробензола при 20°. Опыты показали, что в присутствии термолизованной желатины растворимость нитробензола и бензола не повышалась ни при каких значениях pH и концентра-

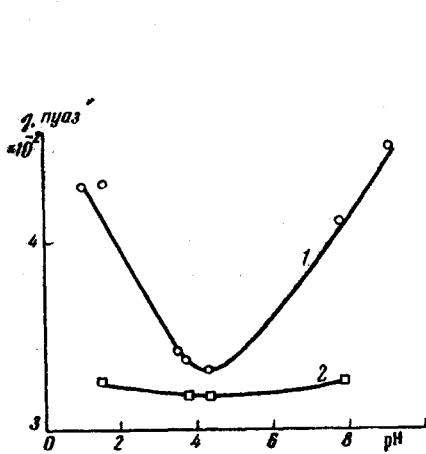


Рис. 5

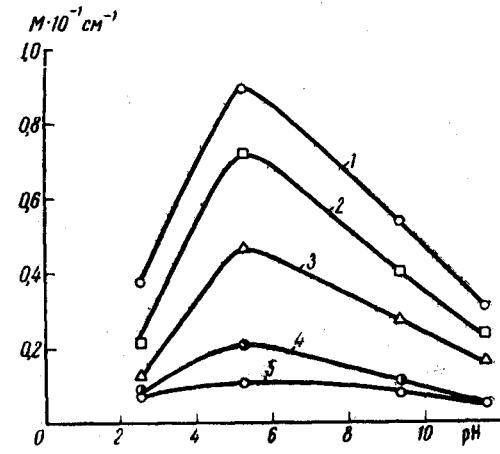


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость вязкости предельно разрушенной системы от pH среды в 0,45%-ном растворе желатины:
1 — при 20, 2 — при 30°С

Рис. 6. Зависимость абсолютной мутности от pH среды в 0,45%-ном растворе желатины при разных температурах:
1 — 15, 2 — 20, 3 — 25, 4 — 30, 5 — 35°С

ции. Отсутствие эффекта солюбилизации растворами желатины связано с тем, что в этих растворах не образуется глобул. Очевидно, термолизованная желатина, которая состоит из молекул меньшего размера, не способна образовывать глобулы.

Выводы

1. Исследована солюбилизация нитробензола растворами желатины.
2. Показано, что при 20° величина солюбилизации в зависимости от pH среды проходит через максимум в изоэлектрической точке.
3. Установлено, что солюбилизация обусловлена глобулярным состоянием желатины в растворе.
4. В разбавленных растворах величина солюбилизации наибольшая и равна 260 молей нитробензола на моль желатины; с увеличением концентрации желатины приведенная растворимость нитробензола резко уменьшается, что связано с уменьшением вероятности глобулообразования, вследствие развития объемного структурирования системы.
5. Изучено влияние повышенной температуры на солюбилизацию бензола и нитробензола в растворах желатины. При 30° отсутствует характерная зависимость солюбилизации от pH среды.
6. Изучена солюбилизация в растворах термолизованной желатины. Солюбилизация в этих растворах отсутствует.
7. Полученный в работе экспериментальный материал показывает, что измерение эффекта солюбилизации может служить методом для определения конформации белковых молекул в растворе и для наблюдения за ее изменениями в различных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. S. Lawrence, Trans. Faraday Soc., 33, 325, 815, 1937; 34, 660, 1938.
2. McBain, Solubilization and Related Phenomena, N. Y., 1955.
3. R. S. Stearns, H. Orrenheiser, E. Simon, W. D. Harkins, J. Phys. Chem., 15, 296, 1947.
4. H. B. Kleevens, Chem. Revs., 47, 1, 1950.
5. К. А. Постелова, П. А. Ребиндер, Acta physiochimica URSS, 16, 71, 1942; П. А. Ребиндер, Коллоидн. ж., 8, 157, 1946; К. А. Постелова, З. Н. Маркина, Труды 2-й Всес. конф. по коллоидн. химии, Киев, 1952; П. А. Ребиндер, К. А. Постелова, Вступительная статья в книге Клейтон «Эмульсии», Изд. ин. лит. 1950; З. Н. Маркина, К. А. Постелова, П. А. Ребиндер, Докл. АН СССР, 99, 121, 1954; Коллоидн. ж., 16, 366, 1954; Труды 3-й Всес. конф. по коллоидн. химии, 1956, стр. 410; З. Н. Маркина, П. А. Ребиндер, Докл. АН СССР, 109, 1156, 1956.
6. А. И. Юрченко, Ж. общ. химии, 16, 1171, 1946.
7. Л. Е. Перегудова, С. С. Вьюцкий, Коллоидн. ж., 10, 309, 1948.
8. Д. Л. Талмуд, Ж. физ. химии, 15, 532, 1941.
9. С. Е. Бреслер, Д. Л. Талмуд, Докл. АН СССР, 43, 326, 367, 1944.
10. С. Е. Бреслер, Биохимия, 14, 180, 1949.
11. Б. А. Талмуд, Докл. АН СССР, 79, 643, 1951.
12. Г. А. Деборин, Докл. АН СССР, 67, 889, 1949; Г. А. Деборин, Л. Б. Горбачев, Докл. АН СССР, 82, 943, 1952.
13. И. М. Клотц, Disc. Faraday Soc., 13, 189, 1953.
14. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, К. Т. Очуррова, Докл. АН СССР, 123, 505, 1958.
15. П. И. Зубов, З. Н. Журкина, В. А. Каргин, Докл. АН СССР, 67, 659, 1949.
16. В. А. Каргин, Т. А. Матвеева, Докл. АН СССР, 105, 294, 1955.
17. К. Вейланд, Методы эксперимента органической химии, 67, 162, 1951.
18. А. И. Юрченко, Доклад 3-й конференции по высокомолекул. соед., Изд. АН СССР, 1945.
19. С. С. Вьюцкий, М. А. Зайцева, Успехи химии, 16, 69, 1947.
20. В. Паули, Э. Валько, Коллоидная химия белковых веществ, ОНТИ, 1936, стр. 70.
21. В. А. Пчелин, Н. Я. Соломченко, Тезисы докладов IV Всес. конф. по коллоидн. химии, 1958, стр. 262.
22. Л. В. Иванова-Чумакова, П. А. Ребиндер, Коллоидн. ж., 18, 429, 1956.
23. З. Н. Маркина, П. А. Ребиндер, Докл. АН СССР, 109, 1156, 1956.

THE SOLUBILIZATION EFFECT AND THE CONFIGURATION OF PROTEIN MOLECULES IN SOLUTION

V. A. Pchelin, V. N. Izmailova, N. I. Seraya

Summary

The solubilization of nitrobenzene by gelatine solutions has been studied at different pH values of the medium, concentrations and temperatures. The solubilization-pH correlation at 20° C has a maximum at the isoelectric point, owing to the globular state of the gelatin in solution. There is no solubilization in solutions of thermolysed gelatin even at 30° C. The experimental material obtained shows that the solubilization effect may serve the basis for determining the configuration of protein molecules in solution and for observing changes in the configuration under various conditions.