

СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ И ОПТИЧЕСКОЕ ВРАЩЕНИЕ В РАСТВОРАХ ЯЙЧНОГО АЛЬБУМИНА

В. Н. Измайлова, В. А. Пчелин, Л. Е. Боброва

Биологические функции белковых веществ в животных и растительных организмах зависят от ряда факторов, определяемых свойствами окружающей среды. Наиболее существенными из них являются: влияние концентрации и природы электролитов (минеральных и органических), а также присутствие неполярных органических соединений. Эти факторы приводят к существенным изменениям структуры белковой молекулы и вместе с тем дают в руки исследователя методические пути для изучения строения протеинов и их жизненных функций. Частным примером является эффект солюбилизации — повышение растворимости неполярных соединений в растворах белковых веществ. Впервые это явление было установлено Талмудом и Бреслером [1]. Ранее [2] уже указывалось на большое биологическое значение эффекта солюбилизации.

В последнее время Элвортி [3] была изучена обратная солюбилизация двуосновных жирных кислот растворами лецитина в бензоле. Автор указывал на возможное биологическое значение солюбилизации на примере опытов Финеана [3], сделавшего попытку установления связи между эффектом солюбилизации и обменом веществ в нервных тканях. Демченко [4] изучал солюбилизацию воды в углеводородных растворах лецитина. Им было высказано предположение о том, что методом солюбилизации воды в углеводородных растворах различных по природе и строению поверхностно-активных веществ, можно характеризовать степень их взаимодействия с водой.

Наши предыдущие работы [2] были посвящены изучению эффекта солюбилизации на типичном фибрillярном белке — желатине. Целью данной работы явилось изучение солюбилизации белковыми веществами на примере типичного глобулярного белка — яичного альбумина и попытка выяснения связи между строением белковых молекул и их способностью солюбилизировать малорастворимые вещества, в частности, бензол.

Объекты исследования и методика

Яичный альбумин — типичный полиамфолит, хорошо растворимый в воде и обладающий ярко выраженной поверхностью активностью [5].

Кристаллический яичный альбумин был выделен из свежих яиц по стандартному методу Зёренса и Хойрупа [6] и методу, использованному в лаборатории Уорнера [6].

Яичный альбумин подвергали тщательной очистке путем простого диализа через целлофановую мембрану в течение 3 суток в холодильнике при 8° и высоковольтного пятикамерного электродиализа по методике, разработанной Каргиным и Матвеевой [7]. Очистку вели при напряжении на средней камере 300—500 в, на боковых 100 в. Температуру во время очистки поддерживали 15—20°. Очистку растворов яичного альбумина длилась в среднем 10—15 час. Чистоту полученного продукта контролировали по показанию силы тока в приборе. Сила тока в конце очистки составляла 10 μ A.

При повышении напряжения на среднюю камеру до 700 в наблюдалась денатурация и осаждение белка на катоде.

Чистота и однородность яичного альбумина подтверждалась методом электрофореза на бумаге. Электрофорез давал одну белковую границу в широком интервале рН. Кроме того, чистота полученного яичного альбумина подтверждалась по определению удельного оптического вращения, величина которого совпадала с литературными данными [8].

В качестве растворимого вещества был выбран бензол, который тщательно очищали по общепринятой методике [9]. Для приготовления белковых растворов всегда применяли дважды перегнанную воду. Количество эффекта солюбилизации измеряли рефрактометрическим методом, предложенным и разработанным Юрженко [10]. Этот метод основан на том, что с введением углеводорода в раствор поверхностно-активного вещества показатель преломления раствора обычно возрастает до насыщения его углеводородом и затем становится постоянным. Далее Воюцким [11] было показано, что растворимость жидкостей может быть определена на основе правила аддитивности удельной рефракции. Для определения показателя преломления использовали рефрактометр типа Пульфириха.

Результаты и их обсуждение

Конформация молекул белка в растворе зависит прежде всего от рН среды, поэтому этот фактор был изучен в первую очередь. рН среды создавали добавлением 0,1 н. и 1 н. HCl и KOH и измеряли стеклянным электродом [12]. Ценным качеством стеклянного электрода является его нечувствительность к присутствию в измеряемой жидкости поверхностно-активных веществ, делающих невозможными измерения другими методами.

Для исследования влияния рН среды на солюбилизацию бензола готовили растворы яичного альбумина с рН от 2,5 до 11,5. При прибавлении кислоты и щелочи яичный альбумин частично подвергался денатурации и мутнел, поэтому растворы перед измерениями фильтровали и затем определяли их концентрацию.

Растворимость бензола определяли следующим образом. Вначале измеряли показатели преломления растворов яичного альбумина, затем добавляли бензол, и после установления равновесия, измеряли показатель преломления водного слоя. Как показали специальные опыты, представленные на рис. 1, для установления равновесия необходимо 40 час., но большая часть бензола солюбилизируется примерно за 30 мин. Из данных показателей преломления до и после солюбилизации получали величину растворимости бензола в г на 100 мл раствора яичного альбумина. Результаты измерений зависимости солюбилизации бензола от рН среды при 20° представлены на рис. 2.

Из этих данных видно, что в присутствии яичного альбумина растворимость бензола увеличивается в 3—5 раз и мало изменяется от рН среды, что, по-видимому, связано с достаточной устойчивостью глобул яичного альбумина в широком интервале рН.

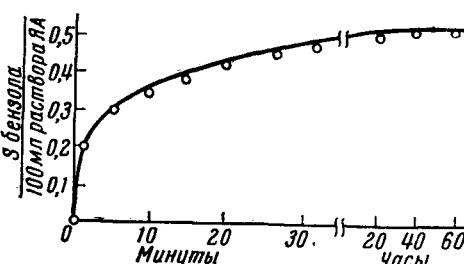
Интересно было узнать причину повышения растворимости бензола в растворах яичного альбумина и, в частности, с каким типом структуры белка связано явление солюбилизации.

Метод оптического вращения позволяет изучать вторичную структуру белка [13—16].

Растворы всех белков вызывают вращение плоскости поляризации при прохождении через них поляризованного света. Исследования показывают, что

Рис. 1. Кинетика солюбилизации бензола в растворе яичного альбумина: $c = 2,00\%$, $t = 20^\circ$

знак и величина вращения плоскости поляризации зависит не только от состава, т. е. от типа атомов или групп атомов, связанных с асимметрическим атомом углерода в молекуле, но и от взаимодействия



асимметрическими атомом углерода между собой. Кроме того, вращение плоскости поляризации очень чувствительно к любым изменениям при взаимодействии боковых групп со средой. Поэтому любые изменения в конфигурации молекул, сопровождающиеся изменением внутренней энергии, проявляются и в изменении вращения плоскости поляризации. Поэтому оптическое вращение может быть очень чувствительной характеристикой состояния белковой молекулы.

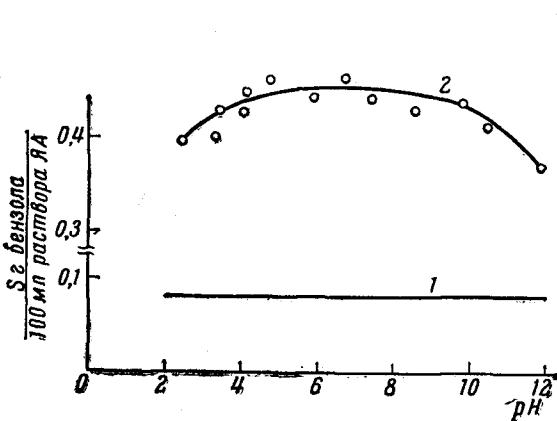


Рис. 2

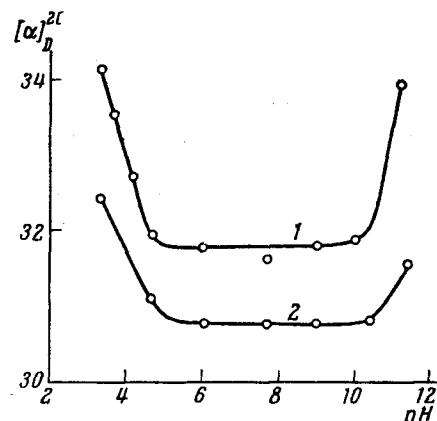


Рис. 3

Рис. 2. Солюбилизация бензола в растворах яичного альбумина при разных pH-среды; $c = 2,140\%$, $t = 20^\circ$

Растворимость бензола; 1 — в 100 мл воды; 2 — в 100 мл раствора яичного альбумина

Рис. 3. Зависимость удельного оптического вращения растворов яичного альбумина от pH-среды

1 — до солюбилизации; 2 — после солюбилизации

По представлениям Френкеля, Бреслера, Кушнера [15] и Доти [14], оптическое вращение может являться мерой α -спиральности белковой молекулы.

В работе было измерено и подсчитано удельное оптическое вращение растворов яичного альбумина до и после солюбилизации бензола (при $\lambda = 589,3 \text{ \AA}$). Эти данные представлены на рис. 3. Как видно из этого рисунка, удельное оптическое вращение растворов яичного альбумина до солюбилизации (кривая 1) постоянно в интервале pH 4,5—10,5, что хорошо согласуется с данными Эдсала [8] и говорит о неизменности вторичной структуры молекул яичного альбумина.

После солюбилизации удельное оптическое вращение растворов яичного альбумина при тех же pH уменьшается и в интервале pH 4,5—10,5 остается постоянным. Это свидетельствует об изменении в конформации молекул яичного альбумина, которое сопровождается уменьшением внутренней энергии.

Так как вторичная и третичная структуры неразрывно связаны друг с другом, то изменения во вторичной структуре белка, вызванные солюбилизацией бензола, должны проявиться и в третичной структуре.

Известно, что одним из методов, позволяющих определить конформацию белковой макромолекулы (ее третичной структуры) является измерение вязкости растворов и определение отношения полуосей v/a молекулы [17].

Нами измерялась вязкость разбавленных растворов яичного альбумина на вискозиметре Убеллоде при разных значениях pH. Результаты этих опытов показали, что отношение v/a в широком интервале pH (от 4,5 до 10,5) было одинаково и равно 6 (данные были получены без учета гидратации молекул яичного альбумина). Величина гидратации колеблется от

20 до 30% для различных белков и вся поправка на гидратацию не превышает 26% от величины v/a [15]. Поэтому поправка на гидратацию качественно не меняет зависимости v/a от pH, но, по-видимому, уменьшает абсолютную величину отношения v/a .

Таким образом, опыты по вязкости показали, что в широкой области pH третичная (глобулярная) структура молекул яичного альбумина при pH от 4,5 до 10,5 не претерпевает значительных изменений.

Опыты по измерению вязкости после солюбилизации показали, что вязкость уменьшается и понижается асимметрия молекул, отношение v/a становится равным 4. Это говорит о том, что глобула яичного альбумина после солюбилизации становится более компактной.

Механизм солюбилизации бензола растворами яичного альбумина можно представить следующим образом: бензол взаимодействует с неполярными участками спирали; развитие неполярных участков в свою очередь содействует сильному взаимодействию отдельных участков спирали, что приводит (как было сказано раньше) к образованию более компактной глобулы.

В сильно кислой и щелочной средах кривые на рис. 3 резко поднимаются вверх, что свидетельствует о том, что в этих областях макромолекула яичного альбумина претерпевает резкие изменения в структуре. Эти изменения приводят к тому, что в сильно кислой среде увеличивается со временем вязкость и образуется студень [18].

Важным показателем солюбилизации является приведенная солюбилизация. Это повышение растворимости бензола, связанное с присутствием яичного альбумина за вычетом растворимости бензола в воде. Наибольшая приведенная солюбилизация бензола, т. е. число молей бензола на 1 моль яичного альбумина равна 97 молей бензола на 1 моль яичного альбумина.

Ниже приводятся цифровые данные о зависимости приведенной солюбилизации от pH растворов яичного альбумина ($c = 2,145$, $t = 20^\circ$):

pH	2,5	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	11,5	12
Моль бензола												
Моль яичного альбумина	30	89	94	97	97	96	94	91	87	82	70	40

Интересно было сравнить число молей бензола, приходящееся на 1 моль белка, полученных из опытных данных, с теоретическими расчетами.

Объем молекулы альбумина, по данным Нейрата [8] $39\ 000 \text{ \AA}^3$. По данным Пчелина [19], в молекуле яичного альбумина 94 неполярных групп и 110 полярных групп. Если предположить, что гидрофобные неполярные группы занимают $\frac{1}{3}$ объема молекулы [20], то на долю неполярных групп придется $13\ 000 \text{ \AA}^3$. Молекулярный объем бензола 90 \AA^3 . Следовательно, в одну молекулу яичного альбумина теоретически может войти примерно 144—145 молекул бензола в предположении, что сами углеводородные группы молекулы яичного альбумина не занимают объема. Из опытов по солюбилизации мы получили, что на 1 молекулу яичного альбумина приходится 95 молекул бензола и, очевидно, больше войти не может, так как сами углеводородные цепи молекулы яичного альбумина занимают объем 4300 \AA^3 .

Выводы

1. Исследована солюбилизация бензола в растворах яичного альбумина.
2. Показано, что растворимость бензола в растворах яичного альбумина увеличивается в 3—5 раз.
3. Конформация молекул яичного альбумина изучалась методом солюбилизации, вязкости и оптического вращения.

4. В зависимости от pH среды растворимость бензола, удельное оптическое вращение и вязкость растворов яичного альбумина мало изменяются, что связано с достаточной устойчивостью конформации в виде глобул яичного альбумина в широком интервале pH (от 4,5 до 10,5).

5. Предполагаемый механизм солюбилизации сводится к тому, что бензол взаимодействует с неполярными участками спирали молекулы. Развитие неполярных участков в свою очередь содействует более сильному взаимодействию отдельных участков спирали, что приводит к образованию более компактной глобулы.

Московский государственный
университет
им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию
26 VII 1960

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. Л. Талмуд, Ж. физ. химии, 15, 532, 1941; С. Е. Бреслер, Д. Л. Талмуд, Докл. АН СССР, 43, 326, 367, 1944; С. Е. Бреслер, Биохимия, 14, 180, 1949.
2. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, К. Т. Очуррова, Докл. АН СССР, 123, 505, 1958; В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, Н. И. Серпая, Высокомолек. соед., 1, 1617, 1959.
3. Р. Н. Elworthу, J. Chem. Soc., 1, 139, 1960.
4. П. А. Демченко, Коллоидн. ж., 22, 297, 1960.
5. В. Клейтон, Эмульсии, Изд. ин. лит., 1950, стр. 93.
6. Белки, т. III. Под редакцией Г. Нейрата и К. Бэйли, Изд. ин. лит., 1956, гл. XI, стр. 740, 742, 747.
7. В. А. Каргин, Т. А. Матвеева, Докл. АН СССР, 105, 294, 1955.
8. Белки т. II. Под редакцией Г. Нейрата и К. Бэйли, Изд. ин. лит., 1956, стр. 364, 378, гл. 1, стр. 161, гл. IV, стр. 462; I. T. Edsall, I. F. Foster, J. Amer. Chem. Soc., 70, 1860, 1948.
9. К. Вейганд, Методы эксперимента в органической химии, М., 1951, гл. 1, стр. 28.
10. А. И. Юрченко, Доклад на 3-й конференции по высокомолекулярным соединениям АН СССР, 1945. Докторская диссертация, Львов, 1947.
11. Л. Е. Перегудова, С. С. Вуюцкий, Коллоидн. ж., 10, 309, 1948.
12. В. А. Пчелин, Измерение активности водородных ионов, Гизлэгпром, 1955.
13. S. L. Lach, Rev. of pure app. Chem., 9, 35, 1959.
14. P. Doty, F. Jang, J. Amer. Chem. Soc., 78, 498, 1956; F. Jang, P. Doty, J. Amer. Chem. Soc., 79, 761, 1957.
15. С. Е. Бреслер, В. М. Кушнер, С. Я. Френкель, Биохимия, 24, 685, 1959.
16. L. Pauling, R. B. Согеу, Proc. nat. Acad. Sci. USA, 37, 205, 1951.
17. А. Г. Пасынский, Успехи химии, 5, 519, 1941.
18. И. Н. Буланкин, О. П. Силин, Биохимия, 6, 487, 1941.
19. В. А. Пчелин, Поверхностные свойства белковых веществ, Гизлэгпром, 1951.
20. Д. Л. Талмуд, Коллоидн. ж., 84, 247, 1946.

SOLUBILIZATION AND OPTICAL ROTATION IN SOLUTIONS OF EGG ALBUMIN

V. N. Izmailova, V. A. Pchelin, L. E. Bobrova

Summary

The solubilization of benzene in egg albumin solutions of various pH was investigated. The solubility of benzene is increased by 3—5 times in these solutions. The conformation of the egg albumin molecules was studied with the aid of solubilization, viscosity and optical rotation methods. The conformation was shown to be quite stable at pH values from 4.5 to 10.5. The proposed mechanism of solubilization is based on the interaction of benzene with the non-polar sites of the egg albumin helix. The development of non-polar sites, in turn, facilitates interaction between individual portions of the helix, leading to a more compact globule.