

К ХАРАКТЕРИСТИКЕ ТЕПЛОВОГО РАСШИРЕНИЯ БЕЛКОВЫХ СТУДНЕЙ И РАСТВОРОВ

P. Э. Нейман

Медленные изотермические изменения объема представляют собой характерную особенность теплового расширения белковых студней, хотя имеющиеся в литературе толкования этой особенности противоречивы [1—5]. Вместе с тем исследование кинетики установления равновесных объемов при тепловом расширении студней желатины позволило сделать определенные выводы о характере межмолекулярных взаимодействий в студнях и изменениях, наблюдавшихся в этом отношении, при переходе студень — раствор [2, 4]. Приводимые ниже новые данные представляют собой дальнейшее развитие этого исследования и, в частности, касаются концентрированных студней, свойства которых изучены недостаточно.

Методика исследования

В описанную ранее [6] методику дилатометрических измерений были внесены некоторые улучшения. Применили дилатометры емкостью от 30 до 100 мл. Уровень измерительной жидкости (ртути) в капиллярах дилатометров определяли при помощи отсчетного микроскопа с ценой деления шкалы 0,1 мм. Капилляры (с радиусами 0,03—0,05 см) предварительно калибровали. Температуру термостата поддерживали постоянной в пределах $\pm 0,01^\circ$ и контролировали термометром Бекмана с ценой деления шкалы 0,01°. Вследствие быстрой смены температурных циклов термостата и большой емкости дилатометров колебания температуры объекта в дилатометре были заметно меньшими, чем колебания температуры термостатной жидкости. При загрузке дилатометров исследуемые объекты и ртуть взвешивали. Коэффициент расширения стекла дилатометров определяли экспериментально путем получения кривых теплового расширения ртути. Из этих данных вычисляли поправки на тепловое расширение ртути и стекла, учтенные в представленных ниже данных. При работе с дилатометрами большой емкости количество ртути регулировали таким образом, чтобы компенсировать эти две поправки. Опыты проводили в интервале от 12—15°до 60—65°. Исследовали тепловое расширение студней, приготовленных из образца фотожелатины (зольность 0,3%), а также растворов сывороточного альбумина крови человека (использовали катафоретически гомогенизированный и высушенный на холода в вакууме препарат с изоэлектрической точкой 4,7) и казеина, приготовленного по Гаммарстену.

Результаты и их обсуждение

Термическая предыстория образцов студней желатины и изменение скорости их нагревания и охлаждения оказывают существенное влияние на форму кривых теплового расширения. Результаты опытов, представленные на рис. 1, позволяют проследить характер изменений, претерпеваемых кривыми теплового расширения 60%-ного студня по мере приближения к обратимости. Кривая 1 снята при быстром ведении процесса. До первого нагревания студень в течение многих суток выдерживали при начальной температуре. Ниже 40° эта кривая характеризуется резко выраженной необратимостью. Если вслед за первым циклом нагревания и охлаждения немедленно провести второй, то значения объемов, получаемые при повторном нагреве, выше, чем при первом, а охлаждение протекает по той же кривой, что и первое. Немедленно проведенный с той же

скоростью третий цикл практически совпадает со вторым. Однако, если перед опытом вновь длительно выдержать студень при начальной температуре и затем провести с той же скоростью циклы нагревания и охлаждения, то полностью воспроизводится первоначальная картина. Эти особенности несомненно связаны с медленным установлением равновесных объемов в студне ниже $40-45^{\circ}$. Если только что охлажденный студень не выдержать длительное время перед повторным нагреванием, то возврат его к равновесному состоянию при исходной температуре не произойдет. Поэтому кривая немедленного повторного нагрева проходит выше первой, которой предшествовало длительное выдерживание студня. В то же время

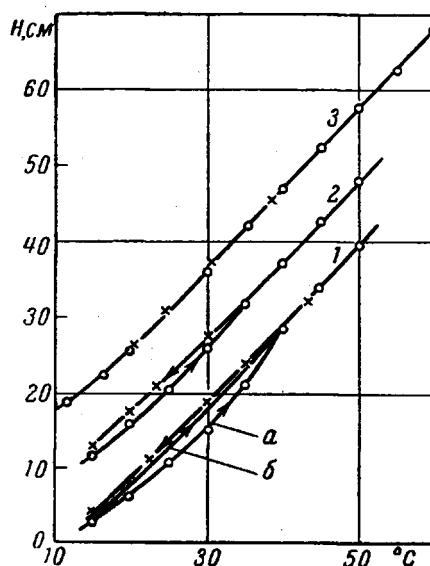


Рис. 1

Рис. 1. Тепловое расширение 60%-ного студня желатины. Длительность выдерживания при каждой температуре:

1 — 30 мин.; 2 — 6-7 час.; 3 — до достижения равновесия. \circ — нагревание; \times — охлаждение. H — уровень ртути в капилляре дилатометра. Масштаб для всех кривых одинаков, ордината показана для кривой 1.

Рис. 2. Температурная релаксация объема 60%-ного студня (ордината для кривой при 30°)

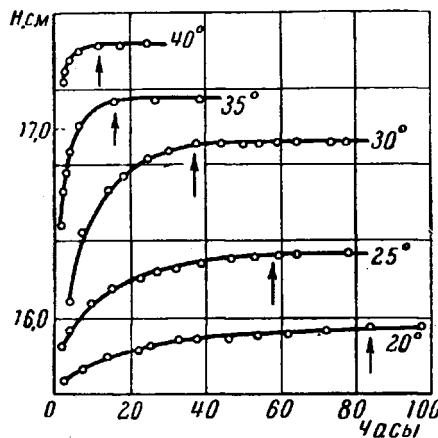


Рис. 2

при температурах, близких к 50° , объемное равновесие в растворе устанавливается достаточно быстро, и поэтому повторные кривые охлаждения при одинаковой скорости их проведения практически совпадают.

Роль кинетических факторов особенно ясно обнаруживается в изменении формы кривых теплового расширения, наблюдаемом при все более медленном проведении нагревания и охлаждения. Так, при снятии кривой 2 не были получены равновесные значения объемов. Однако, как и следовало ожидать, необратимость в этом случае является менее резкой и исчезает при более низкой температуре.

При новой попытке достичь равновесных состояний (кривая 3) производили еще более длительное выдерживание студня при каждой температуре, продолжавшееся до тех пор, пока в течение последних 12-16 час. уже не замечалось дальнейшего изотермического изменения объема. Лишь после этого студень нагревали до следующей температуры (с интервалами $4-5^{\circ}$), при которой его также длительно выдерживали. Аналогичным способом проводили и охлаждение. Относившиеся к этому опыту кривые изотермического изменения (релаксации) объема представлены на рис. 2. Изменения эти протекают весьма медленно. Так, для достижения равновесного объема при 20° потребовалось более 80 час. С повышением температуры периоды релаксации объема спадают, но все же и после разжижения студня требуется несколько часов для установления равновес-

ного объема раствора. Релаксация объема практически исчезает вблизи 50°. Но даже и при столь медленном ведении опыта не удалось при 25° достичь полной обратимости. Правда, необратимость уже очень мала и практически не может быть зафиксирована в масштабах, использованных на рис. 1.

На рис. 3 представлена температурная зависимость коэффициента расширения студня. Значения последнего были определены из экспериментальных данных для каждой из снимавшихся (в сторону нагревания) кривых. Номера кривых на рис. 1 и 3 соответствуют друг другу. При замедлении процесса нагревания наблюдается сдвиг максимума коэффициен-

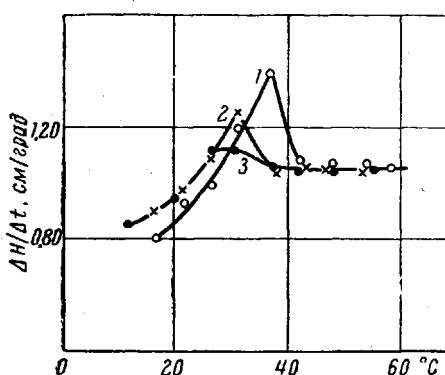


Рис. 3

Рис. 3. Температурная зависимость коэффициента расширения 60%-ного студня.

$\Delta H / \Delta t$ — изменение уровня ртути в капилляре дилатометра. Номера кривых — см. рис. 1

Рис. 4. Тепловое расширение воздушно-сухой желатины:

1 (а, б) — быстрый опыт; 2 (а, б) — медленный опыт (обратимая кривая). а — зависимость $H - t^\circ$; б — зависимость $(\Delta H / \Delta t) - t^\circ$

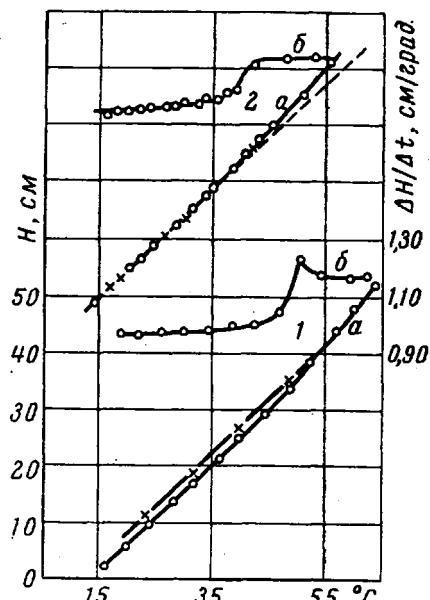


Рис. 4

та расширения в сторону более низких температур, что указывает на релаксационное происхождение этого максимума.

Приведенные на рис. 2 кривые релаксации объема 60%-ного студня показывают, что при исследовании теплового расширения концентрированных студней желатины выдерживание при температурах, близких к комнатной, в течение, например, 5—6 час. [7] отнюдь не обеспечивает достижения равновесных состояний. С полной наглядностью это может быть обнаружено лишь при снятии кривой $v - t^\circ$ как в сторону нагревания, так, вслед за этим, и в сторону охлаждения. При этом отклонения от обратимости при каждой температуре сравнительно мало заметны. Однако, накапливаясь, они оказывают сильное влияние на форму кривой теплового расширения в целом. Так, далекая от обратимости кривая 1 (ее ветвь нагревания) напоминает соответствующие кривые $v - t^\circ$ частично кристаллических полимеров, характеризующиеся объемным эффектом плавления кристаллической фазы. Но это лишь внешнее сходство, и особенности этой кривой определяются ее необратимостью.

Естественно, что неравновесные кривые не могут служить основанием для заключений о наличии или отсутствии при нагревании студня и его разжижении каких-либо термодинамических превращений (фазовых переходов). В то же время кривая 3 рис. 1 показывает, на наш взгляд, что

изменения в состоянии упорядоченности макромолекул и их пачечных образований (или в их взаимном расположении), происходящие при нагревании и охлаждении студней желатины и при термообратимом превращении раствор \rightleftharpoons студень, нельзя рассматривать как фазовый переход первого рода. Тем не менее эта кривая характеризуется наличием двух температурных зон, граница между которыми лежит около 35° . По-видимому, вблизи этой температуры имеет место обратимое превращение, непосредственно не связанное с разжижением студня*. Последнее можно видеть также из опытов с образцами воздушно-сухой желатины. В этих опытах было прослежено влияние скорости нагревания — охлаждения на форму кривых теплового расширения (рис. 4). При быстром ведении процесса кривая теплового расширения воздушно-сухой желатины необратима. Верхняя граница области необратимости, лежащая в данном случае несколько выше 50° , совпадает с максимумом коэффициента расширения, релаксационное происхождение которого очевидно. Для получения обратимой кривой требуется длительное выдерживание образца (от нескольких часов вблизи 50° до десятков часов при 30°). При 20° и ниже равновесный объем устанавливается несколько быстрее. Вероятно, вследствие наличия большого числа прочных межмолекулярных связей релаксационные перегруппировки в подавляющей своей части при этих температурах не могут осуществляться и выключаются.

Обратимая кривая теплового расширения образца воздушно-сухой желатины имеет две зоны. Граница между ними лежит в промежутке $35—40^\circ$ и характеризуется скачкообразным изменением коэффициента расширения. Нижняя и верхняя зоны кривой близки к линейности, что видно и из слабой зависимости коэффициента расширения в соответствующих областях от температуры.

Таким образом, тепловое расширение концентрированных студней желатины характеризуется двумя особенностями: а) весьма медленными изотермическими изменениями объема, вследствие чего для достижения равновесных объемов могут требоваться десятки часов; б) наличием около 35° обратимого превращения, не относящегося к числу фазовых переходов первого рода и непосредственно не связанного с переходом от студня к раствору.

а) Закономерности изотермического изменения (релаксации) объема представляют интерес для характеристики межмолекулярных взаимодействий в студнях и растворах желатины. Гейман [1] относил эти изменения за счет объемного эффекта студнеобразования. В действительности, как было показано в [3], эти явления не свидетельствуют о наличии объемного эффекта при застудневании; они наблюдаются и в студнях, и в растворах желатины независимо от того, имеет ли место переход студень \rightleftharpoons раствор. Флори и Гаррет [5] при изучении взаимодействия желатины и коллагена с гликолем и водой связывают изотермические изменения объема с кристаллизационными процессами. Эти авторы отметили замедленное установление объема в студнях желатины лишь при температурах на 10° ниже точки плавления. Последнее едва ли правильно, и во всяком случае, может относиться лишь к весьма разбавленным студням. Как было показано здесь и ранее [2—4], релаксация объема имеет место и в растворах желатины до температур, на $8—10^\circ$ превышающих точку разжижения студня. Этот факт, а также форма обратимых кривых теплового расширения студней дают, на наш взгляд, достаточные основания рассматривать изотермические изменения объема как релаксационный процесс, не связанный с фазовым превращением. Вместе с тем, релаксационные перегруппировки характеризуют определенные изменения в состоянии упорядоченности совокупности макромолекул и образуемых ими вторичных структур.

* Последнее в данном случае происходило в интервале $37—39^\circ$.

Из температурной зависимости периодов релаксации объема можно определить обычными приемами энергию активации этого процесса. Представленная на рис. 5 кривая $\lg \tau = 1/T$ для 60%-ного студня вполне аналогична подобным кривым, полученным ранее [2, 4] для более разбавленных студней. Скачкообразное изменение наклона этих кривых связано с переходом студня в растворы и указывает на различие в молекулярном механизме температурной релаксации объема студней и растворов. Как отмечалось в [2, 4], это различие может быть объяснено тем, что изотермические изменения объема студней связаны с перегруппировками звеньев и отдельных участков цепей, тогда как в растворах они должны быть обусловлены взаимными перемещениями цепных макромолекул в целом. Эту точку зрения можно развить с учетом сформулированных Каргином, Китайгородским и Слонимским [8] и в дальнейших работах Каргина с сотрудниками

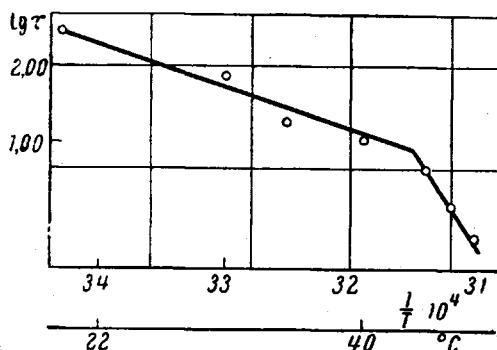


Рис. 5. Зависимость $\lg \tau = (1/T)$ для 60%-ного студня (τ — периоды релаксации объема)

[9—13] представлений о пачечной структуре аморфных полимеров.

Расчет показывает, что ниже точки плавления студней энергия активации релаксации объема составляет около 20 ккал/моль, выше нее — 55—60 ккал/моль. Эти величины примерно на порядок превышают известные из различных данных молярные энергии связей между неполярными группами или соответственно водородных связей. Последнее обстоятельство показывает, что при межмолекулярных взаимодействиях в студнях и растворах желатины (при их тепловом расширении) роль самостоятельных кинетических единиц играют группы из 10—12 связей между цепями. Это представляется более вероятным именно в случае взаимодействия не между отдельными макромолекулами, а либо внутри пачек цепей (студень), либо между пачками (раствор). Таким образом, сегментальный характер межмолекулярных взаимодействий и релаксационных процессов, возникающих при тепловом расширении, должен быть тесно связан с существованием в растворах и студнях желатины вторичных пачечных структур. При этом релаксация объема студней должна быть связана, по-видимому, с внутрипачечными перегруппировками, затрагивающими преимущественно более слабые связи между отдельными цепями. После распада структурной сетки студня, образованной более прочными связями между пачками цепей, эти последние связи включаются в релаксационный процесс. Соответственно, релаксация объема растворов может быть обусловлена взаимными перемещениями пачек и преодолением более прочных связей между ними или обратимыми процессами распада и формирования самих пачечных структур. Таким образом, релаксационные данные (величины энергии активации) показывают, между прочим, что формирование структурной сетки студней происходит за счет более прочных (полярных или водородных) связей между пачками макромолекул.

Переход от одного молекулярного механизма релаксации объема к другому непосредственно связан с термообратимым превращением студень \rightleftharpoons раствор и характеризует последнее с молекулярно-кинетической стороны. После разжижения студня происходит более быстрое уменьшение периодов релаксации объема с дальнейшим ростом температуры. Именно поэтому рассмотренное выше влияние незавершенности релаксационных процессов на форму кривых $v - t^\circ$ более всего сказывается как раз при температурах, близких к области разжижения студня.

б) Характеристика теплового расширения студней желатины осложняется сочетанием двух присущих ему независимых особенностей: релаксации объема и обратимого превращения, происходящего вблизи 35° и обнаруживаемого по изменению температурной зависимости коэффициента расширения. Оно наблюдается и в воздушно-сухой желатине и в белковых растворах, не образующих студней. Последнее можно иллюстрировать

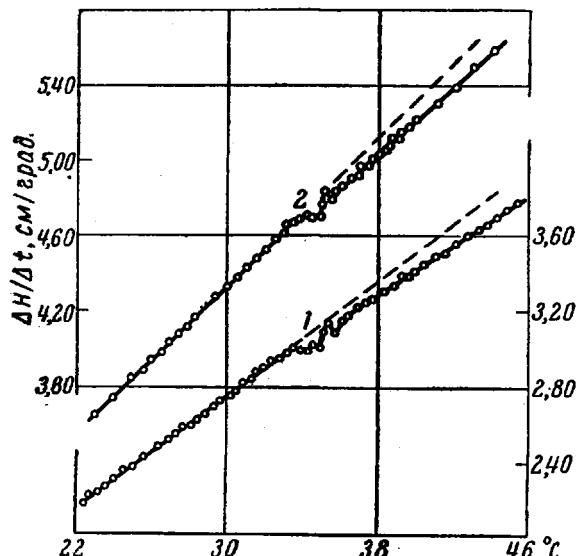


Рис. 6. Температурная зависимость коэффициента расширения:

1 — 5%-ный раствор сывороточного альбумина крови человека;
2 — 5%-ный раствор казеина (в 2 н. NH_4OH)

результатами наших опытов с некоторыми другими белками. В растворах этих белков релаксационные особенности теплового расширения отсутствуют, и объемное равновесие устанавливается одновременно с тепловым. Кривые рис. 6 показывают, что аномальная зона находится в интервале $33-37^{\circ}$ и максимуму коэффициента расширения предшествует горизонтальная площадка кривой со стороны более низких температур. Эти детали могли быть замечены лишь с применением дилатометров большой емкости и при снятии экспериментальных точек через каждые $0,3-0,5^{\circ}$. Эта же картина сохраняется и после тепловой денатурации белка.

Представляется затруднительным указать здесь молекулярный механизм этого превращения; по-видимому, оно является специфической особенностью белковых макромолекул. Так, тепловое расширение растворов низкомолекулярных веществ (гликокола, мочевины, формамида, сахара), молекулы которых содержат функциональные группы, входящие в состав белковых макромолекул, не обладает какими-либо специфическими особенностями.

Можно предположить, что между этим термообратимым превращением и студнеобразованием имеется все же определенная взаимосвязь; изменение в состоянии белковых макромолекул способствует формированию либо пространственной структурной сетки, либо глобулярных микростудневых структур *. К сожалению, дилатометрические данные не содержат оснований для более определенных суждений по этому поводу.

* В обоих случаях структурообразование определяется взаимодействием одних и тех же (полярных) групп, входящих в состав макромолекул белка [14].

Выводы

1. Изучена температурная релаксация объема концентрированных студней желатины. Величины энергии активации релаксационного процесса указывают на изменение молекулярного механизма релаксации объема при термообратимом превращении студень \rightleftharpoons раствор.

Сегментальные особенности межмолекулярных взаимодействий в студнях и растворах желатины, характеризуемые релаксационными данными, рассмотрены с учетом представлений о формировании вторичных пачечных структур.

2. Эволюция формы кривых теплового расширения студней по мере приближения их к обратимости свидетельствует в пользу той точки зрения, что термообратимые превращения студень \rightleftharpoons раствор (как и явления релаксации объема) не связаны с фазовым переходом первого рода.

3. Помимо релаксационных особенностей, при тепловом расширении белковых растворов имеет место обратимое превращение. Последнее характеризуется изменением температурной зависимости коэффициента расширения, локализованном в интервале 33—37°. Молекулярный механизм этого превращения не может быть распознан с помощью дилатометрических данных.

Воронежский государственный
университет

Поступила в редакцию
19 VI 1961

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Нейтапп, Trans. Faraday Soc., 32, 462, 1936.
2. Р. Э. Нейман, Коллоидн. ж., 16, 280, 1954.
3. Р. Э. Нейман, Коллоидн. ж., 18, 731, 1956.
4. Р. Э. Нейман, Труды воронежск. отд. ВХО им. Менделеева, 1, 203, 1957.
5. Р. J. Flory, R. R. Gagge, J. Amer. Chem. Soc., 80, 4836, 1958.
6. Р. Э. Нейман, Коллоидн. ж., 14, 107, 1952.
7. С. И. Мерсон, Н. Н. Пучкова, Коллоидн. ж., 21, 613, 1959.
8. В. А. Каргин, А. И. Китайгородский, Г. Л. Слонимский, Коллоидн. ж., 19, 131, 1957.
9. В. А. Каргин, Н. Ф. Бакеев, Коллоидн. ж., 19, 133, 1957.
10. В. А. Каргин, Н. Ф. Бакеев, Х. Вергин, Докл. АН СССР, 122, 97, 1958.
11. В. А. Каргин, J. Polymer Sci., 30, 247, 1958.
12. В. А. Каргин, Н. Ф. Бакеев, В. Б. Рыжов, Высокомолек. соед., 1, 182, 1959.
13. Н. Ф. Бакеев, В. С. Пшежецкий, В. А. Каргин, Высокомолек. соед., 1, 1812, 1959.
14. П. И. Зубов, З. Н. Журкина, В. А. Каргин, Коллоидн. ж., 9, 109, 367, 1947; 16, 109, 1954.

CHARACTERISTICS OF THE THERMAL EXPANSION OF PROTEIN SOLS AND GELS

R. E. Neiman

Summary

The volume relaxation of concentrated gelatin gels with respect to temperature has been investigated. The magnitude of the activation energy of the relaxation process points out to a segmental character of molecular interaction in gels. This may be associated with the existence of secondary packet structures. The reversible thermal conversion gel \rightleftharpoons solution is accompanied by change in the molecular mechanism of volume relaxation. Such change may be interpreted as a transition from intrapacket to interpacket rearrangements. The kinetic conditions exert a strong effect on the shape of the thermal expansion curves of gels. Evolution of the shape of these curves on approaching reversibility lends support to the opinion that the thermally reversible gel \rightleftharpoons sol transition (as well as volume relaxation) is not associated with first order phase transitions. In addition to relaxation effects a reversible transition takes place in the process of thermal expansion of protein sols, characterized by change in the temperature dependence of the expansion coefficient (in the range 33—37°) and not directly connected with gelatinization.