

УДК 678.01:53+668.317

**ВЛИЯНИЕ ИОНОГЕННЫХ ГРУПП МОЛЕКУЛ ЖЕЛАТИНЫ  
НА КИНЕТИКУ ОБРАЗОВАНИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ СПИРАЛЬНЫХ  
КОЛЛАГЕНОПОДОБНЫХ СТРУКТУР В ЕЕ РАСТВОРАХ**

***В. П. Мерзлов, В. А. Пчелин, В. М. Гуревич***

Как известно, желатина является продуктом денатурации коллагена. Молекула нативного коллагена образована тремя полипептидными цепями, спирально закрученными друг относительно друга, каждая из которых также свернута в спираль типа поли-*L*-пролина II [1]. Денатурация коллагена в растворе сопровождается распадом его молекулы с образованием желатины.

Способность желатины при определенных условиях частично восстанавливать высокоупорядоченную коллагеноподобную спиральную структуру в растворе делает ее одним из наиболее интересных объектов изучения конформационных переходов типа спираль — клубок в белках. Эти переходы легко проследить, например, по изменению оптического вращения. Для системы коллаген — желатина упорядоченное состояние соответствует более высоким отрицательным значениям оптического вращения, тогда как неупорядоченное характеризуется значительно меньшим левовращением. В последнем случае оптическое вращение обусловлено только наличием в молекуле асимметрических атомов углерода и мало зависит от pH и ионной силы раствора [2].

При охлаждении растворов желатины наблюдается значительное изменение их физико-химических свойств. Удельное левовращение возрастает до 60—80% значений, характерных для растворов нативного коллагена [3]. Рентгенограммы студней и пленок желатины, полученных на холода, аналогичны рентгенограммам нативного коллагена [4]. Сходство желатины в холодном растворе с коллагеном подтверждается также спектроскопическими исследованиями [5]. Кривые плавления упорядоченной структуры в растворах нативного коллагена и желатины, прослеживаемые по изменению вязкости и оптического вращения, имеют аналогичный вид [6]. Все эти факты говорят о том, что при охлаждении растворов желатины ее молекулы способны частично восстанавливать «кристаллическое» состояние нативного коллагена. Это мнение хорошо подтверждается электронно-микроскопическими исследованиями. Охлаждение желатины в растворе при контролируемых условиях приводит к восстановлению ряда надмолекулярных структур нативного коллагена [7]. Образование спиральных конформаций, их устойчивость в растворах желатины и переход в конформацию статистического клубка определяются такими факторами как pH раствора, температура, присутствие электролитов и др. [8].

В данной работе рассмотрены возможные причины, препятствующие спиралеобразованию в охлажденных растворах желатины в кислой области

pH, и изучена кинетика спиралеобразования в зависимости от концентрации хлоридов натрия и бария и сульфата аммония.

В качестве объекта исследования в работе использована была фотожелатина. Очистка и приведение ее в изоэлектрическое состояние, а также методика приготовления растворов описаны ранее в [9]. Исследовали растворы желатины с концентрацией  $c = 0,25 \text{ г}/100 \text{ мл}$  раствора.

Для изучения спиралеобразования в растворах желатины использовали метод оптического вращения. Измерения оптического вращения проводили на поляриметре фирмы Zeiss с точностью отсчета до  $0,01^\circ$  в монохроматическом свете ( $\lambda = 546 \text{ мкм}$ ). Для работы использовали терmostатируемые поляриметрические кюветы длиной  $2,0 \text{ дм}$ . Терmostатирование производилось с точностью до  $\pm 0,05^\circ$ .

Зависимость удельного оптического вращения от pH раствора и кинетику спиралеобразования изучали как в водных растворах, так и в присутствии различных количеств хлоридов натрия и бария и сульфата аммония при  $5^\circ$  после быстрого охлаждения до данной температуры от  $40^\circ$ . pH растворов желатины измеряли при помощи потенциометра ЛПУ-0,1. pH исследуемых при  $5^\circ$  растворов обычно доводили до необходимых значений предварительно при комнатной температуре, кроме специальных опытов, когда требуемые значения pH получали добавлением охлажденного раствора соляной кислоты к растворам желатины, предварительно выдержаным на холода в течение 150 час.

### Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано [2], что более низкие значения удельного левовращения в растворах желатины, выдержанных на холода длительное время при pH = 3, по сравнению со значениями в изоэлектрической точке и при pH = 1, объясняются значительными затруднениями спиралеобразования в этой области pH из-за наиболее неблагоприятных условий электростатического взаимодействия зарядов на полипептидных цепях желатины. Добавление хлористого натрия до  $1,0 M$  нивелировало разницу в величинах оптического вращения при различных значениях pH растворов, что позволило говорить об экранировании зарядов на цепи.

В целях более систематического изучения экранирующего действия электролита на способность молекул желатины в растворе при разных pH восстанавливать спиральные коллагеноподобные конформации, мы измеряли зависимость удельного вращения от pH при различных концентрациях хлористого натрия после длительного выдерживания таких растворов на холода (рис. 1). Как видно из кривых 1—3, рис. 1, глубокий максимум на кривой оптического вращения при pH = 3 постепенно уменьшается при увеличении концентрации соли и в  $0,1 M \text{ NaCl}$  практически исчезает.

Присутствие в растворе малых количеств NaCl, хотя и недостаточных для полного экранирования зарядов на цепи, значительно облегчает образование спиральных структур, что хорошо заметно по изменению конечных величин оптического вращения (конечными мы называем величины удельного оптического левовращения растворов желатины, выдержанных при фиксированной температуре в течение времени, когда изменение вращения практически прекращается). Постепенное увеличение конечных величин вращения с увеличением концентрации NaCl при pH = 3 подтверждает предположение об экранирующем действии NaCl. В случае  $0,1 M \text{ NaCl}$  электролита, очевидно, достаточно, чтобы за время, когда обычно завершаются основные процессы спиралеобразования в растворах желатины с концентрацией  $0,25 \text{ г}/100 \text{ мл}$  раствора при  $5^\circ$ , образовалась максимально упорядоченная в данных условиях структура. Величины удельного вращения в этом случае достигают значений, характерных для изоэлектрической точки. Полученные результаты показывают, что конечные величины вращения при pH = 1, совпадающие с таковыми для изоточки, обусловлены увеличением концентрации экранирующего аниона сильной кислоты при уменьшении pH.

Интересно было исследовать, принципиально ли невозможно достижение высоких степеней спирализации в области pH = 3 или же это связано

с существенным уменьшением скорости спиралеобразования в этом случае. Чтобы проверить возможность появления подобного эффекта, мы изменили pH растворов желатины в условиях, предполагающих достаточно полное восстановление коллагеноподобных спиральных структур, обусловливающих в основном высокое левовращение растворов коллагена и желатины. Охлажденную соляную кислоту добавляли в растворы желатины, предвари-

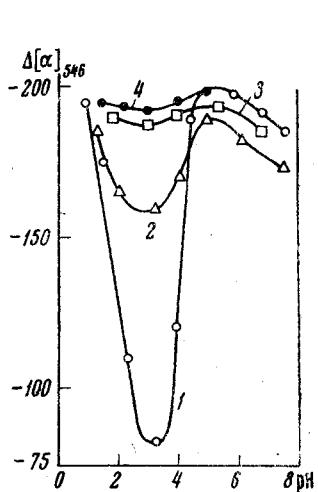


Рис. 1

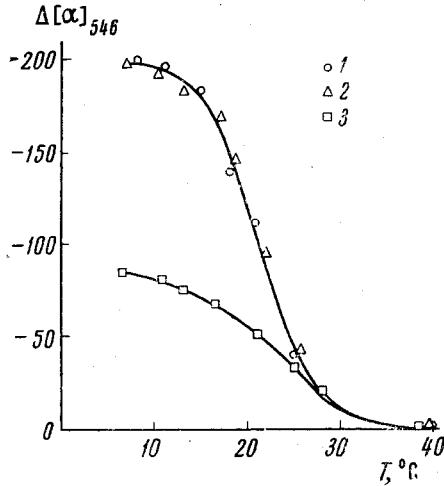


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость удельного оптического вращения растворов желатины от pH при  $5^\circ$  в присутствии различных количеств NaCl (после 150 час. выдерживания растворов на холода):  
1, 4 — в водном растворе; 2 — в  $0,025 \text{ M}$  NaCl; 3 — в  $0,1 \text{ M}$  NaCl; 1—3 — pH доводили перед выдерживанием раствора на холода; 4 — pH доводили после выдерживания раствора на холода

Рис. 2. Плавление спиральных структур в растворах желатины после 150 час. выдерживания их на холода при  $5^\circ$ :

1 — изоэлектрическая точка ( $\text{pH} = 4,9$ ); 2 —  $\text{pH} = 2,9$ , требуемое значение pH получали добавлением охлажденной соляной кислоты к холодному раствору желатины после выдерживания его при  $5^\circ$  в течение 150 часов; 3 —  $\text{pH} = 2,3$ , требуемое значение pH получали перед выдерживанием раствора на холода

тельно выдержаные на холода в течение 150 час.— время, достаточное для прохождения основных процессов ренатурации [2], и измеряли оптическое вращение полученных растворов. Результаты этих опытов (рис. 1, кривая 4) показывают, что изменение pH растворов после ренатурации в кислую от изоточки область не вызывает существенных изменений оптического вращения и, следовательно, спиральной структуры (в отличие от растворов, pH которых доводили до нужных значений при комнатной температуре перед длительным выдерживанием на холода (рис. 1, кривая 1). Величина удельного левовращения в этом случае при  $\text{pH} = 3$  очень мало уменьшается по сравнению с вращением в изоэлектрической точке (примерно на  $5-10^\circ$ ) и остается постоянной при последующем выдерживании раствора на холода в течение 40 дней. Изучение процесса плавления спиральной структуры, образовавшейся в таком растворе, показывает, что ее устойчивость не отличается от устойчивости коллагеноподобной спирали, получающейся при ренатурации белка в изоэлектрическом состоянии. Кривые, отражающие зависимость удельного оптического вращения от температуры, в обоих случаях совпадают (рис. 2). Для сравнения на рис. 2 приведена также подобная кривая для раствора, требуемое значение pH которого получено перед охлаждением. Таким образом, возникновение глубокого минимума при  $\text{pH}-3$  на кривой зависимости удельного вращения от pH действительно связано с кинетикой спиралеобразования.

Полученный результат может быть хорошо объяснен исходя из недавно предложенных нами представлений о механизме образования коллагено-подобных структур в охлажденных растворах желатины [10]. Было высказано предположение, что скорость образования тройной коллагено-подобной

спирали связана с вероятностью эффективных столкновений сегментов различных молекул, приводящих к образованию коллагено-подобных участков. Наличие в боковых цепях аминокислотных остатков свободных зарядов приводит к значительному затруднению сближения цепей, имеющих конформацию статистического клубка, т. е. к затруднению образования коллагено-подобной спирали. Однако, если спираль уже образована, то последующее возникновение зарядов в боковых цепях, вероятно, не имеет существенного значения для устойчивости спиральной конформации, так как, во-первых, число ионизируемых групп в желатине относительно невелико; во-вторых, даже если они лежат в одной плоскости, перпендикулярной оси спирали, то из-за того, что эти группы принадлежат трем различным цепям, они все равно должны быть достаточно удалены друг от друга; и в-третьих, предполагают, что основные группы (которые, по-видимому, ответственны за эффекты в кислой области pH) распределены статистически вдоль цепи [11] и находятся друг от друга на значительном расстоянии вдоль индивидуальной полипептидной цепи, так как количество их относительно невелико.

Рис. 3. Изменение удельного вращения в растворах желатины в зависимости от образования спиральных структур со временем; pH = 4,9, t = 5°:

1 — в 0,5 M NaCl; 2 — в 1,0 M NaCl; 3 — в 2,0 M NaCl

В щелочной области, где основную роль в электростатических взаимодействиях должны играть кислые группы, понижение левовращения значительно менее существенно, чем в кислой [2, 12]. На первый взгляд это может показаться странным, так как хорошо известно, что кислых аминокислотных остатков в молекуле желатины несколько больше, чем основных. Наблюдаемая картина, вероятно, может быть объяснена на основе предположения о более локализованном распределении кислых остатков вдоль цепи желатины по сравнению с основными [11]. Локальное расположение групп отрицательно заряженных остатков в индивидуальной полипептидной цепи будет, очевидно, меньше препятствовать сближению цепей в щелочной области pH, в отличие от статистического распределения положительных зарядов в кислой области. Тогда, в связи с предложенным механизмом спиралеобразования [10], большая вероятность встречи цепи в щелочной области, по сравнению с кислой, повлечет за собой более частое возникновение спиральных коллагено-подобных участков, что, в конечном счете, будет приводить к большим конечным значениям удельного левовращения.

Известно также, что более низкие значения конечных величин удельного левовращения наблюдаются при добавлении значительных количеств нейтральных солей в растворы желатины [2, 13]. Это явление связывают с замедлением кинетики спиралеобразования при всех значениях pH, исследуемых растворов желатины [13]. В связи с этим было важно исследовать кинетику спиралеобразования при различных значениях pH в зависимости от концентрации добавленной соли. Изучали начальные скорости спиралеобразования по изменению оптического вращения исследуемых растворов после быстрого охлаждения от 40 до 5°. Значения начальных скоростей изменения вращения во всех случаях получены при помощи графической экстраполяции на основании кривых «накопления», типичный пример которых приведен на рис. 3.

Графики, отражающие влияние хлоридов натрия и бария на начальную скорость мутаротации при  $\text{pH} < 3$ , представлены на рис. 4. Как видно из рис. 4, кривые изменения начальной скорости мутаротации при  $\text{pH} = 2,9$  в случаях хлоридов натрия и бария и при  $\text{pH} = 1$  в случае хлористого натрия проходят через максимум при увеличении концентрации соли в исходном растворе.

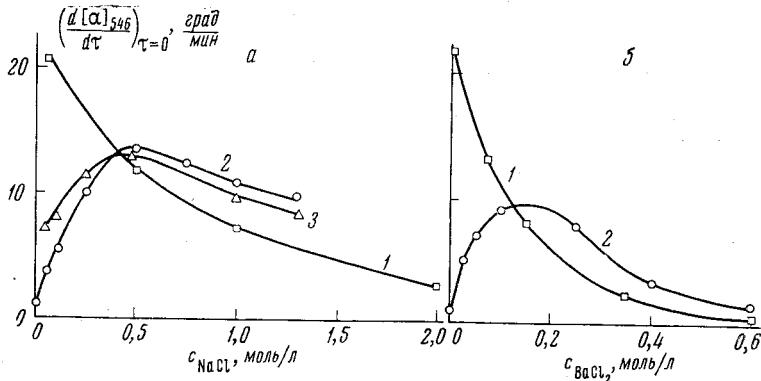


Рис. 4. Зависимость начальной скорости мутаротации от концентрации  $\text{NaCl}$  (а) и  $\text{BaCl}_2$  (б) в растворах желатины при различных  $\text{pH}$ ;  $t = 5^\circ$ :

1 —  $\text{pH} = 4,9$ ; 2 —  $\text{pH} = 2,9$ ; 3 —  $\text{pH} = 1$

При значениях  $\text{pH} < 3$  диссоциация карбоксильных групп остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот почти полностью подавлена, и молекула желатины обладает свободным положительным зарядом, что, как уже говорилось, приводит к значительному затруднению спиралеобразования. Добавление в раствор при  $\text{pH} = 3$  даже сравнительно небольших ко-

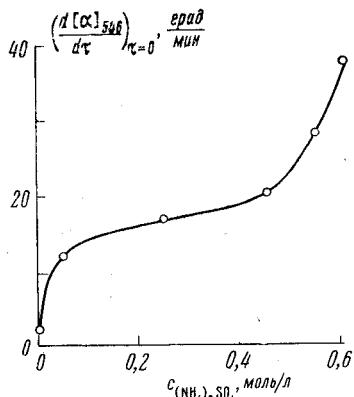


Рис. 5

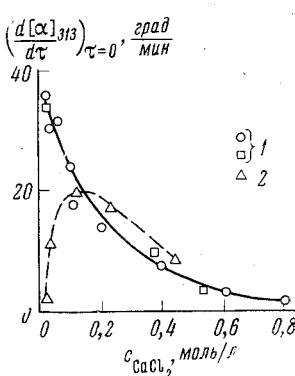


Рис. 6

Рис. 5. Зависимость начальной скорости мутаротации от концентрации  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в растворах желатины при  $\text{pH} = 2,9$ ;  $t = 5^\circ$

Рис. 6. Зависимость начальной скорости мутаротации от концентрации  $\text{CaCl}_2$  в растворах желатины ( $c = 1,56$  мг/мл) при различных  $\text{pH}$ ;  $t = 4^\circ$  (по данным [13]):

1 —  $\text{pH} = 7,0$  и  $10,5$ ; 2 —  $\text{pH} = 2,5$  (кривая 2 проведена нами)

личество соли экранирует заряды полипептидных цепей. Тем самым увеличивается вероятность эффективных столкновений, приводящих к образованию коллагеноидных структур, и процесс мутаротации резко ускоряется (рис. 4, кривые 2). При  $\text{pH} = 1$ , когда заряды в значительной мере уже экранированы, наблюдаемый эффект возрастания скорости мута-

ротации при добавлении в раствор электролита, естественно, выражен менее резко (рис. 4, а, кривая 3).

В растворах при  $\text{pH} = 2,9$  и 1, начиная с некоторых концентраций добавленных солей, процесс мутаротации замедляется, как это имеет место в изоэлектрической точке для всех концентраций солей (рис. 4, кривая 1). Предполагают, что взаимодействие электролита с полипептидной цепью белка в изоэлектрическом состоянии определяется природой катиона [14, 15]. Можно думать, что в рассматриваемом случае подобное взаимодействие имеет такую же природу. Поэтому более высокие значения начальных скоростей мутаротации при этих концентрациях добавленных солей в кислых растворах могут быть объяснены затруднением взаимодействия катиона с полипептидной цепью, несущей в этом случае положительный заряд.

Очевидно, результаты изучения скорости спиралеобразования в растворах желатины при  $\text{pH} < 3$  в присутствии сильных электролитов следует рассматривать как наложение двух эффектов. С одной стороны, это взаимодействие полипептидной цепи с катионом, затрудняющее в большинстве случаев образование спирали, а с другой — экранирующее действие аниона, облегчающее сближение цепей, что, в свою очередь, приводит к резкому увеличению скорости спиралеобразования.

Изучение влияния  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  на скорость спиралеобразования в растворе желатины при  $\text{pH} = 2,9$  также подтверждает сделанное предположение. Известно, что присутствие  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  увеличивает скорость спиралеобразования в изоэлектрическом растворе [13]. На полученной нами кривой зависимости начальной скорости мутаротации от концентрации сернокислого аммония при  $\text{pH} = 2,9$  (рис. 5) имеется точка перегиба и можно выделить два участка. Сначала скорость спиралеобразования увеличивается в основном за счет экранирования зарядов на цепи, а затем уже в силу специфики присутствующего электролита.

Полученные результаты противоречат утверждению Хиппеля и Уонга [13], которые на основании данных, представленных на рис. 6, сделали вывод, что изменение  $\text{pH}$  в растворах желатины с любой данной концентрацией соли не влияет на начальную скорость спиралеобразования. Однако на рис. 6 (кривая 2 проведена нами по экспериментальным точкам работы [13]) изменение начальной скорости мутаротации при  $\text{pH} = 2,5$  имеет вид, аналогичный полученному нами (рис. 4, кривые 2). Авторы [13], по-видимому, не обратили на этот факт должного внимания.

Таким образом, характер влияния электролитов на скорость спиралеобразования в растворах желатины при значениях  $\text{pH}$ , не соответствующих изоэлектрическому состоянию белка, значительно усложняется за счет возникновения свободных зарядов на его молекуле.

## Выводы

1. Возникновение глубокого минимума на кривой зависимости удельного оптического вращения от  $\text{pH}$  растворов желатины в области  $\text{pH} = 3$  обусловлено кинетическим эффектом. Значительное замедление скорости спиралеобразования в этом случае объясняется уменьшением вероятности эффективных столкновений сегментов различных цепей, из-за электростатического отталкивания одноименных зарядов на этих цепях. Возникновение свободных зарядов на полипептидной цепи желатины после образования тройной коллагеноподобной спирали существенно не влияет на ее устойчивость.

2. Присутствие в растворе при  $\text{pH} = 3$  (в кислой по сравнению с изоточной области  $\text{pH}$ ) небольших количеств нейтральных солей облегчает столкновение цепей белка, вследствие экранирования зарядов, и приводит к увеличению начальной скорости спиралеобразования. При повышении концентрации электролита выше определенного уровня, зависящего от

выбранной соли, скорость спиралеобразования меняется в соответствии со спецификой данной соли, как это имеет место в изоэлектрической точке.

3. При рассмотрении действия сильных электролитов на процессы спиралеобразования в растворах желатины при значениях рН, не соответствующих изоэлектрическому состоянию белка, следует учитывать не только специфику данного электролита, но и наличие на полипептидной цепи желатины свободных зарядов и экранирующее влияние электролитов на эти заряды.

Московский государственный  
университет им. М. В. Ломоносова

Поступила в редакцию  
19 X 1965

#### ЛИТЕРАТУРА

1. A. Rich, F. H. C. Crick. J. Mol. Biol., 3, 483, 1961.
2. B. П. Мерзлов, В. А. Пчелин. Докл. АН СССР, 156, 666, 1964.
3. C. Cohen. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1, 203, 1955.
4. J. B. Katz. Rec. Trav. Chim., 51, 835, 1932.
5. C. H. Robinson, J. J. Bott. Nature, 168, 325, 1951.
6. W. F. Harrington, P. H. von Hippel. Advances Protein Chem., 16, 1, 1961.
7. A. Veis, J. Cohen. Nature, 186, 84, 1960.
8. A. Veis. The Macromolecular chemistry of gelatin, AP, N. Y., 1964, p. 138.
9. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, В. П. Мерзлов. Высокомолек. соед., 5, 1429, 1963.
10. В. П. Мерзлов, В. А. Пчелин. Докл. АН СССР, 163, 447, 1965.
11. W. Graßmann, A. Nordwig, H. Hörmann. J. Phys. Chem., 323, 48, 1961.
12. O. E. Kramer, J. R. Fanselow. J. Phys. Chem., 32, 894, 1928.
13. P. H. von Hippel, K. Y. Wong. Biochemistry, 1, 664, 1962.
14. P. H. von Hippel, K. Y. Wong. Biochemistry, 2, 1387, 1963.
15. L. Mandelkern, W. E. Stewart. Biochemistry, 3, 1135, 1964.

#### THE EFFECT OF IONOGENIC GROUPS IN GELATINE MOLECULE ON KINETICS OF FORMATION AND STABILITY OF HELICAL COLLAGEN-LIKE STRUCTURES IN THE SOLUTIONS

V. P. Merzlov, V. A. Pchelin, V. M. Gurevich

#### Summary

On the basis of the data on the dependence of specific optical rotation in gelatine solutions on concentration of neutral salts, pH and renaturation conditions it has been shown that when treating the action of strong electrolytes on helix formation processes at pH values not corresponding to the isoelectric point of the protein one has to take into account not only the specificity of the electrolyte but the presence of free charges on the chain and the screening effect of electrolytes on these charges. The deep minimum on the curve of the dependence of the specific rotation on pH of gelatine solutions in the region at pH = 3 is related to the kinetic effect. The decrease of the rate of helix formation in this case is explained with decrease of probability of the effective collisions of segments of different chains due to electrostatic repulsions of the same charges. After rising of triple collagen-like helix the free charges on the polypeptide chain considerably affect its stability. It has been studied the dependence of the helix formation kinetics in gelatine solutions on concentration of some neutral salts in the more acid comparing to the isopoint region of pH values.