

УДК 547.96:66-971

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ СОВМЕСТИМОСТЬ ЖЕЛАТИНЫ
И ДЕКСТРАНА В ВОДНОЙ СРЕДЕ*В. Я. Гринберг, В. Б. Толстогузов, Г. Л. Слонимский*

Проблема термодинамической совместимости, структуры и физико-химических свойств растворов и студней белков и полисахаридов имеет большое научное и практическое значение, в частности в разработке искусственных продуктов питания, комплексных заменителей крови и т. д. [1, 2]. Было показано [2], что системы изоэлектрическая желатина — поли-D-глюкан — вода нестабильны и расслаиваются. Однако при pH 4 эти системы стабильны и переход от гетерогенного к гомогенному состоянию полностью обратим.

Нами было детально исследовано стабилизирующее действие кислот на систему желатина (Ж) — декстрана (Д) — вода методом нефелометрического титрования.

Экспериментальная часть

В работе использовали желатину марки «Фото» (изоэлектрическая точка 4,9), очищенную по Лебу, и декстран фирмы «Серва» с молекулярным весом 64 900, определенным методом светорассеяния. Вещества растворяли в дистиллированной воде. Свежеприготовленные растворы центрифугировали в течение 2 час. при 2000 об./мин и 40°, после чего исчерпывающе электродиализовали при 1000 в в многокамерном электродиализаторе. Нефелометрическое титрование проводили на установке, состоящей из линейного дозатора типа СНП-9090, снабженного микрошипцами «Радиометр», автоматического титровального устройства АБУ-1б «Радиометр» и фотозелектрического спектроколориметра «Спекол» фирмы Цейс с приставкой для измерения рассеяния монохроматического света под углом 90°. Изменения мутности (I_{90}) в ходе эксперимента регистрировали через универсальный усилитель спектроколориметра с помощью самописца типа Ез-2, что позволило расширить интервал измерения до пяти порядков единиц мутности. Все нефелометрические измерения производили при длине волн 546 мкм и 40° для исключения желирования растворов и эффекта изменения мутности желатины в кислой среде. Рассеяние чистого растворителя не учитывали, так как оно пренебрежимо мало по сравнению с мутностью исследуемых систем. Перед измерением соответствующие количества растворов желатины и декстрана определенной концентрации помещали в кювету спектроколориметра и термостатировали в ней в течение 1 часа при 40°. Перемешивание осуществляли магнитной мешалкой специальной конструкции. В этих условиях практически заканчивалось понижение мутности желатины, обусловленное ее дезагрегацией. Затем в кювету спектроколориметра со строго постоянной скоростью вводили титрант. Скорость введения титранта составляла от 0,37 до 3,7 мл/час. Для периодического введения титранта очень малыми и строго одинаковыми порциями (0,01 мл) использовали устройство АБУ-1б. В работе использовали только свежеприготовленные растворы и кислоты высокой степени чистоты. Стабильность системы на различных стадиях титрования контролировали по ее расслоению на две фазы, которое ускоряли центрифугированием при 2000 об./мин и температуре 40°.

Результаты измерений

Типичная кривая нефелометрического титрования (КНТ) кислотой системы Ж — Д — H₂O схематически представлена на рис. 1 жирной линией. Она может быть условно разбита на две области: область нестабильного, микрогетерогенного состояния ($c_k < c_k^{kp}$) и область гомогенного,

стабильного состояния системы ($c_k \geq c_{k\text{кр}}$). Критическая концентрация совмещения $c_{k\text{кр}}$ является точкой бинодали на фазовой диаграмме рассматриваемой системы, соответствующей данному составу.

Следует отметить, что при введении титранта в систему очень малыми порциями (например, 0,01 мл в объем раствора 10–20 мл) кривая титрования принимает пилообразный вид. После каждой порции титранта мутность системы быстро возрастает, а затем медленно, в течение нескольких минут падает и достигает некоторого постоянного значения. Начальное возрастание мутности является следствием высокой вязкости, которая способствует возникновению в системе областей с локальной концентрацией кис-

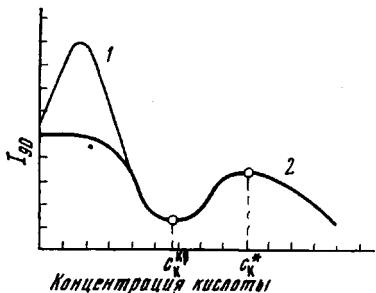


Рис. 1

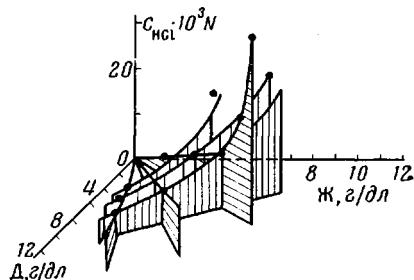


Рис. 2

Рис. 1. Схематическая кривая нефелометрического титрования кислотой системы Ж – Д – H_2O :

1 — кривая титрования при непрерывном введении титранта в систему; 2 — квазиравновесная кривая титрования при периодическом введении титранта

Рис. 2. Фазовая диаграмма системы Ж – Д – H_2O при $T = \text{const}$. Область нестабильности заштрихована

лоты выше $c_{k\text{кр}}$. В результате образуется новая фаза, представляющая собой гомогенный раствор желатины и декстрана. Образование новой фазы естественно, увеличивает неоднородность системы и ее мутность. По мере рассасывания флюктуаций концентрации кислот зародыши новой фазы исчезают и мутность системы уменьшается до некоторого постоянного значения, которое является квазиравновесным, поскольку макрорасслоение на фазы происходит чрезвычайно медленно. Кривая, проведенная через точки постоянной мутности, является, следовательно, квазиравновесной КНТ (рис. 1, кривая 2). Увеличение мутности в области, граничащей с $c_{k\text{кр}}$ слева (рис. 1, кривая 1), является, таким образом, следствием чисто кинетических причин. В области стабильного состояния системы ($c_k \geq c_{k\text{кр}}$) обе кривые совпадают. О кинетической природе первого максимума свидетельствует также его возрастание с увеличением концентраций полимеров и титранта.

Другой отличительной особенностью КНТ системы Ж – Д – H_2O является наличие четкого максимума (рис. 1, c_k^*) в области стабильного состояния. Положение и интенсивность этого максимума, в отличие от первого, являются вполне равновесными характеристиками и не зависят от концентрации титранта и скорости титрования при заданном составе системы.

Представлялось интересным выяснить влияние природы кислоты на эффективность стабилизации системы Ж – Д – H_2O . Для этого сопоставляли КНТ такой системы тремя различными кислотами, а именно HCl , CCl_3COOH , CH_3COOH при постоянных концентрациях полимеров. В указанном ряду критическая концентрация совмещения $c_{k\text{кр}}$ меняется в соотв-

тствии с силой кислот, т. е. следующим образом: $c_{\text{HCl}}^{\text{кр}} \sim c_{\text{CCl}_3\text{CO}_2\text{H}}^{\text{кр}} \ll c_{\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}}^{\text{кр}}$

Во всех дальнейших опытах использовали только соляную кислоту, так как она не уступает трихлоруксусной кислоте по своей эффективности.

На рис. 2 представлена зависимость $c_{\text{HCl}}^{\text{kp}}$ от состава системы Ж — Д — H_2O , т. е. фазовая диаграмма этой системы при постоянной температуре. Из рис. 2 видно, что $c_{\text{HCl}}^{\text{kp}}$ сильно повышается с увеличением концентрации желатины при постоянном соотношении компонентов или при постоянной суммарной их концентрации *.

Стабильность системы, по-видимому, достигается при некотором избыточном заряде молекулы желатины. С увеличением ее концентрации бу-

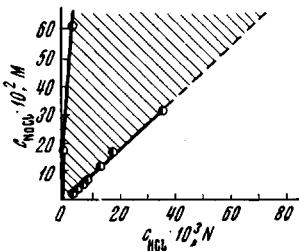


Рис. 3

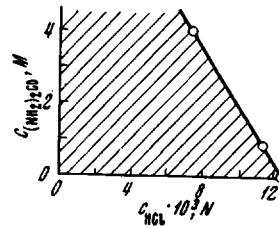


Рис. 4

Рис. 3. Фазовая диаграмма системы Ж — Д — H_2O при постоянном составе ($\text{Ж} = 1,6$; $\text{Д} = 6,4\%$) и $T = \text{const}$ как функция концентрации HCl и NaCl . Область нестабильности заштрихована

Рис. 4. Фазовая диаграмма системы Ж — Д — H_2O при $T = \text{const}$, $\text{Д} = \text{const}$ и $\text{Ж} = \text{const}$ как функция концентраций HCl и мочевины. Область нестабильности заштрихована

ферная емкость системы увеличивается, и для достижения указанного заряда требуется большая концентрация кислоты. При приближении к плоскости $\text{Ж} = 0$ поверхность, отделяющая область совместимости желатины и декстрана от области их несовместимости, изгибаются вверх, по-видимому, тем больше, чем выше суммарная концентрация полимеров. Это свидетельствует о пренебрежимо малой растворимости декстрана в водном растворе желатины, начиная с довольно больших ее концентраций, при $c_{\text{HCl}} = 0$.

Фазовая диаграмма системы Ж — Д — H_2O при постоянном составе ($\text{Ж} = 1,6$; $\text{Д} = 6,4\%$) как функция концентраций кислоты и поваренной соли представлена на рис. 3. Заштрихованная область соответствует гетерогенному равновесному состоянию системы. Следует отметить, что при концентрации соли выше $0,15 \text{ M}$ система стабильна даже при $c_{\text{HCl}} = 0$. Однако уже очень слабое подкисление такой стабильной системы вызывает ее расложение. Система вновь становится стабильной только при существенно большей концентрации кислоты. Стабилизирующее действие соли, таким образом, компенсируется действием кислоты, и, наоборот, стабилизирующее действие кислоты подавляется солью. Мочевина вплоть до 4 M концентрации не в состоянии стабилизировать систему в отсутствие кислоты. В кислой среде, однако, мочевина вызывает смещение бинодали системы к меньшим концентрациям кислоты, т. е. в отличие от соли способствует совместимости желатины и декстрана в кислой среде (рис. 4).

* Заметим, что геометрическое место точек, соответствующих заданному отношению концентраций желатины и декстрана, т. е. $\text{Д}/\text{Ж} = \text{const}$, является плоскостью, перпендикулярной плоскости, в которой лежат оси ОД и ОЖ, и проходящей через ось c_{HCl} . Геометрическим местом точек, соответствующих постоянному значению суммы концентраций Д и Ж, является плоскость, перпендикулярная плоскости, в которой лежат оси ОД и ОЖ, и пересекающая их на равных расстояниях от начала координат.

Как отмечалось выше, мутность стабильной системы Ж—Д— H_2O своеобразно зависит от концентрации кислоты (рис. 1). По мере удаления от $c_{\text{HCl}}^{\text{kp}}$ вправо мутность заметно нарастает, проходит через максимум и понижается в сильнокислой среде. Наблюдаемое уменьшение мутности во много раз больше возможного ее уменьшения в результате разбавления системы при титровании. Мутность «индивидуальных» растворов желатины и декстрана, в отличие от мутности их стабильной смеси, практически не зависит от концентрации кислоты в условиях эксперимента. Неконтролируемое многократное рассеяние очень мутных систем [3] сильно затрудняет точную интерпретацию наблюдаемой аномалии мутности термодинамически стабильной системы. Однако даже качественное рассмотрение этого явления позволяет высказать ряд предположений о его природе. Оно

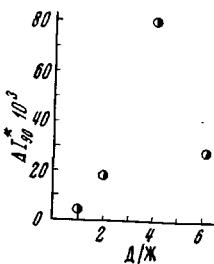


Рис. 5

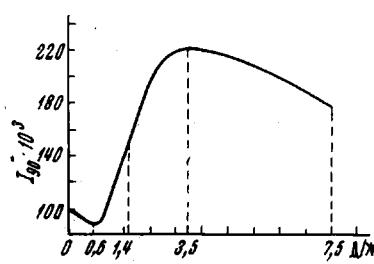


Рис. 6

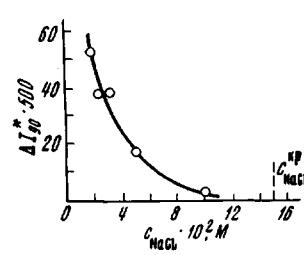


Рис. 7

Рис. 5. Зависимость интенсивности второго максимума КНТ системы Ж—Д— H_2O от соотношения концентраций полимеров

Рис. 6. Зависимость мутности стабильной системы Ж—Д— H_2O при $c_{\text{HCl}} = c_{\text{HCl}}^{*}$ от соотношения концентраций желатины и декстрана. Шкала отношения концентраций D/J нелинейна

Рис. 7. Зависимость интенсивности второго максимума КНТ системы Ж—Д— H_2O от концентрации NaCl . $c_{\text{NaCl}}^{\text{kp}}$ — минимальная концентрация NaCl , вызывающая расщепление системы при данных концентрациях полимеров и HCl

может быть объяснено, например, высокой избирательной адсорбцией каким-либо макромолекулярным компонентом сильно преломляющего компонента растворителя [4], в частности сорбцией ионов хлора молекулами желатины. Это объяснение, однако, нам не кажется убедительным, так как трудно представить, чтобы электронейтральный декстран мог существенно повлиять на распределение ионов в растворе. Более вероятным объяснением наблюдаемой аномалии мутности стабильной системы Ж—Д— H_2O , по нашему мнению, может быть ассоциация желатины и декстрана в определенном интервале рН, что хорошо согласуется с результатами исследования осаждаемости систем желатина — поли-*D*-глюкан подкисленным этанолом [5].

Интенсивность второго максимума КНТ (рис. 1, c_{K}^*) относительно начальной мутности стабильного состояния, т. е. $\Delta I_{90}^* = I_{90}(c_{\text{K}}^*) - I_{90}(c_{\text{K}}^{\text{kp}})$, была выбрана в качестве критерия взаимодействия белок — полисахарид. Предположение о природе аномалии рассеяния как ассоциации декстрана и желатины в определенном интервале рН дополнительно подтверждается (рис. 5) очевидной зависимостью интенсивности второго максимума КНТ от соотношения этих полимеров. Интересно, что судя по данным рис. 5 указанная ассоциация максимальна при отношении желатины к декстрану, равном примерно 1 : 4. Для проверки стехиометрического соотношения желатины и декстрана было проведено прямое нефелометрическое титрование 2,1 %-ного раствора желатины концентрированным раствором декстрагена. Концентрация кислоты в обоих растворах соответствовала c_{HCl} стабильной системы, содержащей 1,6 % желатины. Такая концентрация достига-

лась при $\text{Ж} / \text{Д} = 1 : 4$. При изменении концентрации желатины от 2,1% до 1,6% c_{HCl} практически постоянна. Обращает на себя внимание (рис. 6) довольно резкое изменение мутности при $\text{Д} / \text{Ж} = 0,6 - 3,5$. Максимальное рассеяние наблюдается при $\text{Д} / \text{Ж} = 3,5$, которое, следовательно, соответствует оптимальному составу желатино-декстрановых комплексов. Уменьшение мутности с увеличением концентрации декстрана при $\text{Д} / \text{Ж} < 0,6$ и $\text{Д} / \text{Ж} > 3,5$ является следствием разбавления желатины декстраном.

Для выяснения природы взаимодействия желатины и декстрана в кислой среде было изучено влияние низкомолекулярного электролита и мочевины на интенсивность второго максимума КНТ. Как видно из рис. 7, NaCl прогрессивно уменьшает интенсивность второго максимума, и при $c_{\text{NaCl}} = 0,11 - 0,12 M$ взаимодействие практически полностью подавляется.

Существенно, однако, что в отсутствие указанного взаимодействия система остается стабильной. При данной концентрации кислоты система расслаивается только при $c_{\text{NaCl}} =$

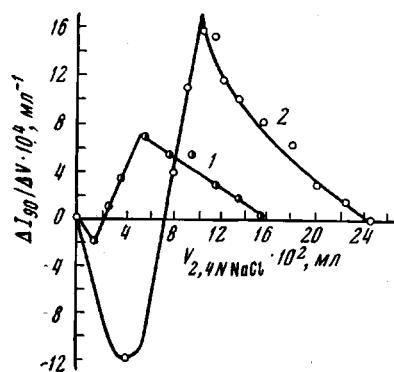


Рис. 8

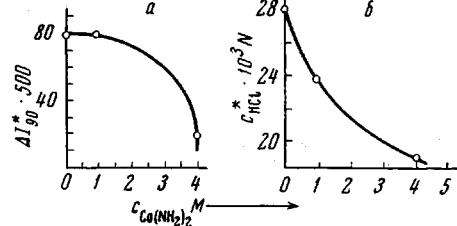


Рис. 9

Рис. 8. Дифференциальная кривая нефелометрического титрования стабильной системы $\text{Ж} - \text{Д} - \text{H}_2\text{O}$ 2,4 N NaCl :

1 — соответствует минимальному взаимодействию белок — полисахарид ($c_{\text{HCl}} \sim c_{\text{HCl}}^{\text{kp}}$)

2 — соответствует максимальному взаимодействию белок — полисахарид ($c_{\text{HCl}} \sim c_{\text{HCl}}^*$)

Рис. 9. Зависимость интенсивности второго максимума КНТ (а) и c_{HCl}^* (б) системы $\text{Ж} - \text{Д} - \text{H}_2\text{O}$ от концентрации мочевины

$= 0,15 M$ (см. рис. 3). Подавление ассоциации желатины и декстрана предшествует, таким образом, расслоению системы под действием соли. Этот вывод подтверждается дифференциальным нефелометрическим титрованием солью $\text{Ж} - \text{Д} - \text{H}_2\text{O}$ с различным содержанием кислоты (рис. 8). Мутность системы с минимальным взаимодействием белок — полисахарид ($c_{\text{HCl}} \sim c_{\text{HCl}}^{\text{kp}}$) нарастает сразу после добавления небольших количеств соли (рис. 8, кривая 1), что указывает на начало расслоения. Расслоение заканчивается при концентрации соли, соответствующей максимуму дифференциальной кривой. Увеличению мутности, сопровождающему расслоение системы с максимальным взаимодействием белок — полисахарид ($c_{\text{HCl}} \sim c_{\text{HCl}}^*$) предшествует ее заметное уменьшение, указывающее на диссоциацию белковополисахаридных комплексов (рис. 8, кривая 2). Интересно, что наблюдаемое при диссоциации комплексов уменьшение мутности проходит с измеримой скоростью, в то время как при расслоении мутность нарастает практически мгновенно. Взаимодействие белок — полисахарид частично подавляется в сильнощелочной среде, но добавление небольших количеств соли ($c_{\text{NaCl}} < c_{\text{HCl}}^{\text{kp}}$) стабилизирует это взаимодействие. Это следует из того, что убывание мутности с повышением концентрации HCl при $c_{\text{HCl}} > c_{\text{HCl}}^*$ намного меньше в присутствии NaCl .

Зависимость ΔI_{90}^* от концентрации мочевины (рис. 9, а) показывает, что мочевина, как и соль, подавляет взаимодействие белок — полисахарид при довольно высоких концентрациях. Но в отличие от соли она понижает значение c_{HCl}^* (рис. 9, б). Чувствительность взаимодействия желатина — декстран к соли и мочевине позволяет высказать предположение о природе этого взаимодействия. Оно осуществляется, по всей видимости, посредством водородных связей, при этом существенное значение имеет ионизация некоторых функциональных групп желатины.

Наличие желатины, растворенной в воде, естественно, затрудняет растворимость декстрана, поскольку второй вириальный коэффициент у декстрана, как известно, ниже, чем у желатины [6, 7]. Совместимости декстрана и желатины в воде при pH, соответствующем изоэлектрической точке желатины, также препятствует значительная ассоциация макромолекул желатины вследствие наличия на них электрических зарядов обоих знаков. При введении в такой раствор ($\text{Ж} - \text{Д} - \text{H}_2\text{O}$) порознь кислоты или соли происходит уменьшение ассоциации макромолекул желатины и этим улучшается их подвижность и способность к образованию совместного раствора с декстраном. Все это вместе взятое приводит при добавлении HCl к появлению совместимости растворенных в воде желатины и декстрана, а при дальнейшем понижении pH — к образованию комплексов желатины с декстраном (рис. 1, c_k^*), что еще более способствует их совместимости.

Однако следует заметить, что гомогенная система $\text{Ж} - \text{Д} - \text{H}_2\text{O}$, содержащая, например кислоту, становится гетерогенной, если в нее добавить достаточное количество соли. То же самое происходит и в случае системы, гомогенизированной солью, при добавлении к ней еще и кислоты. Механизм взаимодействия макромолекул желатины и декстрана при одновременном присутствии в водном растворе кислоты и соли очень сложен. Можно предположить, что большую роль играет гибкость макромолекул желатины в условиях изменения их заряда и свойств окружающей среды. Для выяснения этого необходимы дальнейшие исследования, далеко выходящие за рамки поставленной нами задачи.

Выводы

1. Эффективность гомогенизирующего действия кислот на систему желатина (Ж) — декстрран (Д) — H_2O убывает в ряду $\text{HCl}, \text{CCl}_3\text{COOH}, \text{CH}_3\text{COOH}$ в соответствии с силой кислот.
2. Совместимость желатины и декстрана в кислой среде, а также в среде с высокой ионной силой ($0,15 M \text{ NaCl}$) обусловлена подавлением ассоциации макромолекул желатины в этих условиях.
3. Обнаружено, что гомогенизирующее действие кислоты и соли подавляется при одновременном присутствии их в системе $\text{Ж} - \text{Д} - \text{H}_2\text{O}$.
4. В области гомогенности системы $\text{Ж} - \text{Д} - \text{H}_2\text{O}$ при дальнейшем повышении концентрации кислоты наблюдается аномальная повышенная мутность системы, обусловленная образованием комплексов белок — полисахарид.
5. Ассоциация желатины и декстрана осуществляется, по-видимому, посредством водородных связей, при этом существенное значение имеет ионизация некоторых функциональных групп желатины.
6. Полученные данные о совместимости водных растворов желатины и декстрана (в присутствии кислот и солей) открывают ряд возможностей для разработки приемов образования смесей белков с полисахаридами предназначенных для приготовления новых форм искусственной пищи.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Н. Несмеянов, В. М. Беликов, С. В. Рогожин, Г. Л. Слонимский, Р. В. Головня, В. Б. Толстогузов, Вестник АН СССР, 1969, № 1, 27.
 2. В. Б. Толстогузов, В. Я. Гринберг, Л. И. Федотова, Изв. АН СССР, серия химич., 1969, 2839.
 3. A. Weissberger, Physical Methods of Organic Chemistry, III Ed., part III p. 2123. Interscience Publishers, Inc., N. Y., 1960.
 4. В. Н. Цветков, В. Е. Эскин, С. Я. Френкель, Структура макромолекул в растворах, изд-во «Наука», 1964, стр. 221.
 5. E. E. Woodside, G. E. Trott, R. J. Doyle, C. W. Fisher, Arch. Biochem. Biophys., 117, 125, 1966.
 6. H. Boedtker, P. Doty, J. Phys. Chem., 58, 968, 1954.
 7. A. Ciferri, M. Maraghini, J. Polymer Sci., 18, 303, 1955.
-

THERMODYNAMIC COMPATIBILITY OF GELATIN AND DEXTRAN IN AQUEOUS MEDIUM

V. Ya. Grinberg, V. B. Tolstoguzov, G. L. Slonimskii

Summary

Stabilizing effect of some acids, NaCl and urea on system gelatin (G) — dextran (D) — H₂O has been studied by method of nephelometric titration. At pH of G isoelectric point the system is stable only at high enough ionic strength (0.15 M NaCl). Urea up to 4 M does not stabilize the system at the isoelectric conditions, but in acidic medium considerably decreases critical compatibility concentrations ($c_{\text{HCl}}^{\text{Cr}}$). Stabilizing effect of acids decreases in series HCl, CCl₃COOH, CH₃COOH. Phase diagramm of the system G — D — H₂O which is dependence of $c_{\text{HCl}}^{\text{Cr}}$ on composition at constant temperature has been drawn. Anomalous high lightscattering of the stable system G — D — H₂O in certain interval of acid concentration, which depends on ratio of the polymers and is maximum at D/G = 4, has been observed. The anomaly is accounted to rising of gelatine-dextrane complexes. The association is suppressed with the salt and urea. The importance of these studies for development of the techniques of preparation of the new forms of artificial food is shown.
