

УДК 668.317.533.77

**СОЛЮБИЛИЗИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ЖЕЛАТИНЫ
В СВЯЗИ С КОНФОРМАЦИОННЫМ СОСТОЯНИЕМ
МАКРОМОЛЕКУЛ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ**

Г. П. Ямпольская, В. Н. Измайлова, В. А. Пчелин

В настоящее время известно, что белки, структура которых в водных растворах в значительной степени определяется гидрофобными взаимодействиями, обладают способностью связывать неполярные вещества, в частности углеводороды [1—6]. Совокупность результатов, полученных при изучении закономерностей взаимодействия белок — углеводород, позволяет предположить, что местами связывания служат неполярные области пространственной структуры белков. Отсюда понятно, что способность связывать углеводороды должна определяться особенностями пространственной укладки макромолекул. Одним из первых указаний на то, что солюбилизирующая способность макромолекул белков зависит от их конформационного состояния явился результат [1, 2], показывающий, что солюбилизирующая способность глобулярных белков уменьшается с увеличением вязкости растворов и увеличением удельного оптического вращения при значениях рН, далеких от изоэлектрических точек.

При изучении взаимодействия желатины с предельными и ароматическими углеводородами обнаружено, что солюбилизация максимальна при $pH = 4,9$, т. е. в изоэлектрическом состоянии желатины, и резко уменьшается при добавлении кислоты или щелочи. При этом эффект максимального связывания углеводородов при изоэлектрическом значении рН проявляется в случае желатины гораздо отчетливее, чем для глобулярных белков [7—9].

Известно, что желатина обладает способностью при определенных условиях восстанавливать высокоупорядоченную коллагеноподобную структуру типа спирали поли-*L*-пролина II. Обратимый конформационный переход молекул желатины при нагревании в настоящее время изучен в ряде работ [10—13]. В водных растворах желатина может существовать в различных конформационных состояниях (спираль при низких температурах и клубок выше 35°). Это делает желатину чрезвычайно интересным объектом для установления корреляции солюбилизирующей способности белка с конформационным состоянием его макромолекул.

Представлялось целесообразным исследовать изменение конформации макромолекул и солюбилизацию бензола в водных растворах желатины при изменении температуры, так как замена растворителя, добавление мочевины и других влияющих на конформацию белка воздействий, могут привести к существенным изменениям истинной растворимости бензола в воде и затруднить оценку связывания углеводорода белком.

В работе использовали желатину марки «Фото», очищенную по методике Леба [14], и бензол, очищенный по специальной методике, описанный ранее [1].

Растворимость бензола в растворах желатины определяли рефрактометрическим методом [15, 16]. Показатели преломления растворов измеряли на рефрактометре

ИРФ-23. Растворимость углеводорода рассчитывали из правила аддитивности удельной рефракции

$$P \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d} = \sum_i \frac{n_i^2 - 1}{n_i^2 + 2} \cdot \frac{1}{d_i} P_i$$

Величины с индексом i соответствуют компонентам смеси, P — весовое содержание компонента, d — плотность. Водный раствор белка принято считать за один компонент, тогда раствор углеводорода в водном растворе белка представляет собой «двойную смесь», для которой справедливо выражение

$$P_p \frac{n_p^2 - 1}{n_p^2 + 2} \cdot \frac{1}{d_p} = \frac{n_a^2 - 1}{n_a^2 + 2} \cdot \frac{1}{d_a} P_a + \frac{n_y^2 - 1}{n_y^2 + 2} \cdot \frac{1}{d_y} P_y$$

Заменяя $P_i \frac{1}{d_p} = V_i$, $\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} = \Pi_i$, получим

$$V_p \Pi_p = V_a \Pi_a + V_y \Pi_y,$$

где индексы а, р, у — относятся соответственно к раствору желатины, к раствору желатины, насыщенному углеводородом, к чистому углеводороду. Пренебрегая отклонениями от аддитивности объемов, считаем, что объем раствора равен объему компонентов, т. е. $V_p = V_a + V_y$, тогда $V_y (\Pi_y - \Pi_p) = V_a (\Pi_p - \Pi_a)$, а искомая величина V_y равна

$$V_y = \frac{\Pi_p - \Pi_a}{\Pi_y - \Pi_p} V_a$$

Обычно растворимость углеводорода — S рассчитывали в граммах на 100 мл раствора белка

$$S = \frac{\Pi_p - \Pi_a}{\Pi_y - \Pi_p} d_y 100$$

Специальными опыты было установлено, что при 7° растворы желатины насыщаются бензолом через 4 часа, а при 40° — через 30 мин. Для расчета растворимости бензола при всех температурах (7, 20, 40 и 55°) использовали равновесные значения показателей преломления растворов. Для контроля определены растворимости бензола при тех же температурах в воде.

Растворимости бензола при разных концентрациях желатины и указанных температурах представлены в табл. 1. При увеличении концентрации желатины более 1 г/100 мл при 7 и 20° наступает гелеобразование, поэтому при низких температурах солюбилизацию бензола исследовали при концентрациях не выше 1,5 г/100 мл. Растворимость бензола в растворах желатины при низких температурах мало отличается от растворимости бензола в воде при тех же температурах. При 40 и 55° наблюдается резкое увеличение растворимости бензола в растворах желатины.

Таблица 1

Растворимость бензола в растворах желатины при разных температурах и концентрациях желатины, pH = 4,9

Temperatur- pa, °C	Концентрация желатины, г/100 мл					
	0	0,25	0,50	1,00	5,00	10,00
Растворимость бензола, г/100 мл						
7	0,16	0,20	0,20	0,17	—	—
20	0,17	0,20	0,25	0,27	—	—
40	0,21	0,23	0,24	0,30	0,57	0,81
55	0,23	—	—	0,60	0,84	0,95

На рис. 1 представлена зависимость связывания бензола желатиной в растворе желатины ($c = 1$ г/100 мл) и зависимость удельного оптического вращения макромолекул желатины от температуры. Видно, что когда желатина находится в состоянии коллагеноподобной спирали (этой

конформации отвечают высокие значения удельного оптического вращения), молекулы желатины обладают малой солюбилизирующей способностью. При 7° растворимость бензола в растворе желатины практически не отличается от растворимости бензола в воде и составляет 0,16 г/100 мл. При повышении температуры происходит плавление спиралей, которое обнаруживается по снижению удельного оптического вращения (кривая 2, рис. 1), одновременно можно обнаружить увеличение связывания бензола

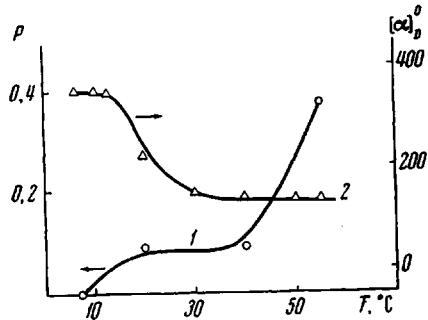


Рис. 1. Зависимость связывания P бензола желатиной (1 г/1 г желатины) (1) и удельного оптического вращения желатины (2) от температуры

Рис. 2. Зависимость логарифма константы распределения бензола между желатиной и водой от обратной температуры

молекулами желатины. Макромолекулы желатины обладают наибольшей солюбилизирующей способностью по отношению к бензолу в состоянии статистического клубка. Растворимость бензола в растворе желатины при концентрации последней 1 г/100 мл при 40° составляет около 0,30 г/100 мл, а при 55° — 0,60 г/100 мл.

Плавление спиралей и образование клубков способствует увеличению растворимости бензола в растворах желатины. Этот факт весьма существен для обсуждения механизма повышения растворимости углеводородов в растворах белков. Некоторые исследователи считают, что молекулы белка и углеводорода не контактируют непосредственно, а лишь через проливную воду, структуру которой существенно изменяют неполярные группы белка, лежащие на поверхности молекулы и контактирующие с водой, обеспечивая условия для дополнительного растворения углеводорода в воде [17, 19]. Другие предполагают возникновение непосредственного контакта между молекулами белка и углеводорода [1—6]. В литературе уже появились работы, показывающие несостоятельность первой точки зрения [20—22]. Результаты данной работы также свидетельствуют в пользу второго механизма. Действительно, при низких температурах поверхность контакта неполярных боковых групп желатины с водой выше (и больше должно быть влияние на структуру прилежащего слоя воды), чем после плавления упорядоченных структур и возникновения гидрофобных взаимодействий, что приводит к резкому возрастанию растворимости бензола в водном растворе. Естественно предположить поэтому, что при низких температурах молекулы желатины не образуют мест связывания углеводородов, а при нагревании растворов выше 40° они возникают.

Если исходить из изложенного механизма, то из данных по растворимости бензола в воде и в водных растворах желатины можно рассчитать константу распределения K бензола между белком и водой и оценить изменение свободной энергии связывания углеводорода белком. Изменение свободной энергии рассчитывали по формуле

$$\Delta F = -RT \ln \frac{c_1}{c_2},$$

где c_1 — концентрация бензола в желатине, c_2 — концентрация бензола в воде (моль/л).

На рис. 2 представлена зависимость логарифма константы распределения бензола между желатиной и водой от обратной температуры, наклон этой прямой равен изменению энталпии при взаимодействии бензола с желатиной. Величина ΔH равна примерно 4,5 ккал/моль, изменение энтропии в процессе связывания бензола положительно и равно 20 кал/моль·град. Термодинамические характеристики процесса связывания бензола молекулами желатины приведены в табл. 2. Полученные значения термодинамических характеристик (малые отрицательные ΔF , малые положительные ΔH и положительные ΔS) соответствуют переносу неполярного вещества из среды полярной в неполярную (теория гидрофобных взаимодействий Немети и Шерага [23—25]) и не совпадают со значениями, характерными для процессов растворения углеводорода в структурированном слое воды (такой процесс сопровождается отрицательным изменением энталпии, равным 16 ккал/моль).

Таблица 2

Термодинамические характеристики процесса связывания бензола макромолекулами желатины

Температура, °К	К	ΔF		ΔS , кал/моль·град	N^*
		ккал/моль	ΔH		
280	6	-1,1	4,5	20	14
293	47	-2,5	4,5	24	70
313	48	-2,5	4,5	22	90
328	204	-3,2	4,5	23	360

* N — число молей бензола, связанных с 1 молем желатины. Молекулярный вес желатины — 70 000.

Проведенная оценка термодинамических характеристик процесса связывания бензола желатиной позволяет предположить, что повышение растворимости бензола в водном растворе желатины происходит за счет проникновения углеводорода в более неполярные (по сравнению с водным окружением) области, образованные сцеплением боковых пролиновых и оксипролиновых аминокислотных остатков желатины.

Выводы

1. Исследована растворимость бензола в растворах желатины при 7, 20, 40 и 55°. Показано, что происходит резкое увеличение растворимости бензола в растворах желатины при температурах выше 35°; показана связь изменения солюбилизирующей способности желатины с изменением конформации макромолекул желатины: в состоянии статистического клубка молекулы желатины обладают большей солюбилизирующей способностью, чем в упорядоченном состоянии коллагеноподобной спиралы.

2. Вычислены термодинамические параметры связывания бензола макромолекулами желатины. Показано, что существенную роль в процессе связывания бензола желатиной играет положительное изменение энтропии, равное 20 кал/моль·град. Изменение термодинамических параметров соответствует переносу углеводорода из воды в менее полярные области, которые, очевидно, возникают при сцеплении неполярных боковых групп желатины.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, Л. Е. Боброва, Высокомолек. соед., 3, 847, 1961.
2. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, Л. В. Митюхина, Докл. АН СССР, 149, 888, 1963.
3. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, Г. П. Ямпольская, Докл. АН СССР, 148, 850, 1962; Высокомолек. соед., 4, 938, 1962.
4. В. Н. Измайлова, Г. П. Ямпольская, А. В. Волынская, В. А. Пчелин, Докл. АН СССР, 169, 143, 1966.
5. D. Wetlauffer, R. Lovrien, J. Biol. Chem., 239, 596, 1964.
6. A. Wishnia, T. Pinder, Biochemistry, 3, 1377, 1964; 5, 1534, 1966.
7. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, К. Т. Очуррова, Докл. АН СССР, 123, 505, 1958.
8. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, Н. И. Серая, Высокомолек. соед., 1, 1617, 1959.
9. Г. П. Ямпольская, В. Н. Измайлова, В. А. Пчелин, А. В. Волынская, Высокомолек. соед., 7, 1956, 1965.
10. C. Cohen, Nature, 175, 129, 1955; J. Biophys. and Biochem. Cytol., 1, 203, 1955.
11. W. J. Harrington, Nature, 14, 997, 1958; W. F. Harrington, P. Hoppel, Arch. Biochem. and Biophys., 92, 100, 1961.
12. P. H. Hoppel, Kwock-J-Wong, J. Biochem., 4, 664, 1962; 5, 1387, 1399, 1963.
13. В. А. Пчелин, В. Н. Измайлова, В. П. Мерзлов, Высокомолек. соед., 5, 1429, 1963; Докл. АН СССР, 150, 1307, 1963.
14. Ж. Леб, Белки и теории коллоидных явлений, Гизлэгпром, 1933, стр. 52.
15. А. И. Юрженко, Ж. общ. химии, 16, 1171, 1946.
16. Л. Е. Перегудова, С. С. Вуюцкий, Коллоидн. ж., 10, 309, 1948.
17. J. M. Klotz, Brookhaven symp. Biology, 13, 25, 1965.
18. J. M. Klotz, Federat. Proc., 24, 24, 1965.
19. M. R. V. Sahlin, Life sci., 5, 961, 1966.
20. W. H. Bishop, F. M. Richards, J. Mol. Biol., 38, 315, 1968.
21. R. G. Shorenstein, T. E. Wagner, J. Amer. Chem. Soc., 22, 6199, 1968.
22. R. Franke, Biochim. et biophys. acta, 160, 378, 1967.
23. J. Nemethy, H. Scheraga, J. Chem. Phys., 36, 3382, 1962.
24. J. Nemethy, H. Scheraga, J. Chem. Phys., 36, 3401, 1962.
25. J. Nemethy, H. Scheraga, J. Phys. Chem., 65, 1071, 1961; 66, 1773, 1962.

STABILIZING BEHAVIOR OF GELATINE AND CONFORMATION OF THE MACROMOLECULES IN AQUEOUS SOLUTION

G. P. Yampol'skaya, V. N. Izmailova, V. A. Pchelin

Summary

Solubility of benzene in aqueous gelatine solutions has been studied at 7, 20, 40 and 55° C. At the lower temperatures when gelatine molecules have helical conformation similar to poly-L-prolin solubility of benzene is not increased. Bounding of benzene is suddenly increased after conformational transition at 35° C. Thermodynamical parameters of bounding of benzene with gelatine have been estimated. The values enable to propose that increase of benzene solubility in gelatine solution is due to the hydrocarbon sorption with apolar regions formed with the apolar side groups in the aminoacid units of gelatine.
