

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ СОРБЦИИ БЕЛКОВ НА КАРБОКСИЛЬНЫХ КАТИОНИТАХ ЖЕСТКОЙ СТРУКТУРЫ

*Л. К. Шатаева, О. В. Орлиевская, Ц. Н. Джмухадзе,
Г. В. Самсонов*

При связывании ионов сложных физиологически активных веществ с полиэлектролитами наблюдается более сложная картина межмолекулярных взаимодействий, чем при классическом ионном обмене. Как известно, особенность взаимодействия белков с полиэлектролитами обусловлена существованием положительных и отрицательных зарядов на глобуле белка. Детальное исследование механизма связывания белков с полиэлектролитами позволяет выявить общие закономерности взаимодействия полифункциональных молекул с ионитами. В данной работе исследовали сорбцию различных белков на кационите КМТ [1].

В работе использовали сплитый пористый полиэлектролит КМТ, условно названный «биосорб» [2]; зернение сорбента 0,08–0,125 мм. Кислотно-щелочную обработку и потенциометрическое титрование сорбента проводили общепринятыми методами. Исследовали рибонуклеазу (РНК) панкреатическую — товарный препарат, выпускаемый Ленинградским мясокомбинатом, дополнительно очищенный от низкомолекулярных примесей гель-хроматографией на биогеле Р-4; химотрипсиноген (ХТГ) фирмы «Реанал», дополнительно очищенный на сефадексе G-75; сывороточный альбумин (СА) человеческий кристаллический (фирмы «Шухардт» ФРГ); терриллитин — нейтральная протеаза, выделенная и идентифицированная нами ранее [3–5], $M=26\,800$, изоэлектрическая точка при pH 4,6; термофильная нейтральная протеаза (*Micromonospora vulgaris*), выделенная нами из препарата термолизин, полученного из Института микробиологии АН СССР. Молекулярная масса этого фермента, оцененная методом гель-хроматографии, составляет 21 000, изоэлектрическая точка этого фермента определена методом электрофореза на бумаге $pI=5$, ферментативные и биохимические характеристики описаны ранее [6].

Сорбцию белков проводили в статических условиях при непрерывном перемешивании из 0,1 M растворов фосфатного буфера при pH 4,6–8,3. Сорбент использовали в водородной форме, в процессе сорбции в некоторых случаях происходило некоторое закисление равновесного раствора. В равновесном растворе определяли значение pH и концентрацию белка [7, 8]. Продолжительность установления равновесия контролировали в каждом случае особо; она составляла 3–4 часа при 47°, 6–7 час. при 20° и 20–25 час. при 4°.

Исходную и равновесную концентрации ХТГ, СА, РНК определяли методом Лоури [7], а также по оптической плотности раствора при $\lambda=280$ нм. Исходные и равновесные концентрации протеаз терриллитина и термолизина определяли, измеряя протеолитическую активность методом Ансона [8] (для терриллитина — при 37° и для термолизина — при 63°), выражая ее в условных протеолитических единицах (ПЕ). Кроме того, концентрацию этих белков определяли методом Лоури, используя калибровочную кривую, построенную для ХТГ. Обратимость сорбции белков проверяли по сохранению ферментативной активности терриллитина и термолизина при десорбции, которая составляла 100%.

Предварительно проведенное потенциометрическое титрование сплитого полиэлектролита биосорб-42 показало, что в отношении $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ -обмена он практически не отличается от обычных карбоксильных кационитов на основе метакриловой кислоты: имеет емкость сорбции по ионам Na^+ 9,2 мг-экв/г и $pK_{\text{хар}}$ 6,5.

Для исследования роли электростатических взаимодействий при сорбции белков на этом сорбенте изучали зависимость емкости сорбции белков с различными изоэлектрическими точками от pH равновесного раствора при 20°. Исходная концентрация белка была одинакова для различных pH. Как видно из рис. 1, сорбция белков на биосорб-42 зависит от pH равновесного раствора, причем эта зависимость для всех белков имеет колоколообразный вид, хотя наклон кривых и значение pH максимума сорбции различны для разных белков. Белки с изоэлектрической точкой pI в кислой и нейтральной областях (точнее, с $pI < pK_{\text{хар}}$), термолизин, терриллитин, СА

максимально сорбируются при $\text{pH} = \text{pI}$, в то время как при $\text{pH} \gg \text{pK}_{\text{карб}}$ не сорбируются вовсе. ХТГ и РНК, имеющие изоэлектрические точки в щелочной области ($\text{pI} 9$ и $9,5$ соответственно), сорбируются максимально в области $\text{pH} 6,2-6,4$, т. е. в области, близкой к $\text{pK}_{\text{карб}}$ карбоксильных групп сорбента. Такой характер зависимости емкости сорбции от pH раствора свидетельствует о большой роли электростатических взаимодействий белковых молекул со связанным карбоксильным полиэлектролитом в процессе

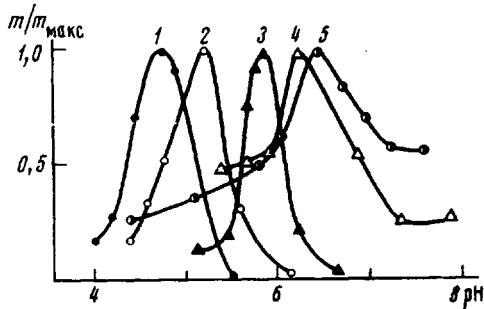


Рис. 1. Зависимость относительной емкости сорбции белков на биосорб-42 от pH равновесного раствора:

1 — террилитин, 2 — термолизин, 3 — СА, 4 — ХТГ;
5 — РНК;

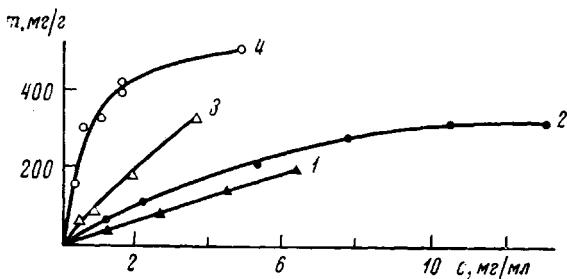


Рис. 2. Изотермы сорбции белков на биосорб-42 при оптимальных значениях pH равновесного раствора:

1 — РНК, 2 — СА, 3 — ХТГ, 4 — термолизин (24°)

сорбции. В этом смысле сорбция белков может быть описана как ионный обмен сложных амфолитов, который сопровождается локальным изменением степени ионизации заряженных групп белка, о чём уже сообщалось ранее [9].

Можно предполагать, что правые спадающие ветви кривых зависимости сорбции от pH определяются возрастанием суммарного отрицательного заряда молекул белков и матрицы полимера и соответствующим увеличением сил отталкивания между белком и полимером по мере возрастания pH раствора. Левые спадающие ветви могут быть интерпретированы как результат постепенной деионизации катионита при понижении pH раствора, однако следует отметить, что даже при достаточно низком $\text{pH} 2,5-4,5$ нам нигде не удалось наблюдать полного отсутствия сорбции белка. При понижении pH раствора возрастает эффективный положительный заряд молекул белка. При этом остается открытym вопрос о протон-акцепторной способности азота, находящегося в триазиновой связке.

При описании равновесия в таких сложных системах перезарядка молекулы белка и степень ионизации ионита определяются условиями минимума электрохимического потенциала системы. При этом нужно учитывать

Значения термодинамических функций процесса сорбции белков

Белок	T, °К	ln k _{изб}	ΔG	ΔH	ΔS, э. ед.
			ккал/моль		
СА	279	6,2	-4,3	5,4	32,0
	297	6,9			
	310	7,1			
РНК	279	5,8	-3,3	-2,0	4,3
	297	5,0			
	310	5,4			
	328	5,2			
Термолизин	279	10,3	-5,4	-12,9	-24,0
	310	8,8			
	319	7,5			
	336	6,8			
Террилитин	279	9,0	-5,5	0	17,0
	310	9,0			

сравнительно слабую кислотность карбоксильных групп сорбента и еще большее ее понижение при сорбции органических ионов (белков). Ранее нами отмечалось, что при сорбции даже однозарядных катионов (макролидов) возможна локальная деионизация нескольких групп щитой поликислоты, т. е. эффективное увеличение рK_{изб} карбоксильных групп полизеялролита [10, 11]. Можно предполагать, что при сорбции белков смещение Na⁺—H⁺-равновесия происходит в неменьшей степени, чем при сорбции антибиотиков.

Для получения изотерм сорбции белков снимали зависимость емкости сорбции от концентрации в растворе при pH, оптимальном для данного белка. На рис. 2 приведены изотермы сорбции белков на биосорб-42 при 24°. Эффективный коэффициент избирательности сорбции можно определить из этих данных, используя относительную емкость сорбции при каждом значении равновесной концентрации белка в растворе и при постоянной концентрации в растворе иона-конкурента 0,1 мг-экв/мл Na⁺. Полученные значения константы избирательности k_{изб} для сорбции изученных белков при трех различных температурах, рассчитаны по формуле

$$k_{изб} = m_6 c_{Na^+} / (M_6 - m_6) c_6 \quad (1)$$

где m₆ и M₆ — соответственно емкость и предельная емкость сорбции данного белка при данной температуре и оптимальном pH; c₆ — концентрация белка в растворе (равновесном), моль/л.

Рассчитанная по уравнению (1) эффективная избирательность сорбции белка может быть использована для оценки термодинамической константы избирательности сорбции по Боннеру и Аргерингеру [12], если предположить, что ионообменная конкуренция белка и Na⁺ близки по характеру к эквивалентному обмену (1 : 1).

По температурным зависимостям константы избирательности сорбции белков можно обычным приемом оценить термодинамические параметры процесса сорбции по уравнению Вант-Гоффа

$$\Delta H = -R \frac{d(\ln k_{изб})}{d(1/T)} \quad (2)$$

и соответственно

$$\Delta\Phi = -RT \ln k_a \quad (3)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta\Phi}{T} \quad (4)$$

В таблице приведены рассчитанные значения термодинамических функций сорбции белков различной структуры на карбоксильном спирите полиэлектролите биосорб-42. Из таблицы видно, что изменение термодинамических функций системы в процессе сорбции белка полиэлектролитом характеризуется компенсационной зависимостью между ΔH и ΔS . При этом следует отметить, что сорбция СА, белка с достаточно гибкой конформацией молекулы, сопровождается максимальным положительным изменением энтропии, тогда как термолизин, характеризующийся высокой жесткостью молекулы (по-видимому, это и определяет его термостабильность), сорбируется с понижением энтропии системы. Можно предполагать, что изменение термодинамических функций при связывании белков с полиэлектролитом существенно зависит от структурной жесткости молекулы белка.

Институт высокомолекулярных
соединений АН СССР

Поступила в редакцию
4 III 1974

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. Н. Кузнецова, К. М. Генендер, Г. В. Самсонов, А. А. Селезнева, Авт. свид. 322332, Бюлл. изобретений, 1971, № 36.
2. Ю. С. Надежин, Л. К. Шатаева, Н. Н. Кузнецова, А. В. Сидорович, Г. В. Самсонов, Высокомолек. соед., A17, 448, 1975.
3. Л. К. Шатаева, А. А. Селезнева, О. В. Орлиевская, О. В. Островский, В. В. Коршунов, Р. Б. Пономарева, Н. Н. Кузнецова, К. П. Папукова, Г. В. Самсонов, Сб. Синтез, структура и свойства полимеров, «Наука», 1970, стр. 225.
4. О. В. Орлиевская, Л. К. Шатаева, Г. В. Самсонов, Прикл. биохим. и микробиол., 7, 355, 1971.
5. Г. В. Самсонов, Л. К. Шатаева, О. В. Орлиевская, Докл. АН СССР, 206, 497, 1972.
6. Н. Г. Нестерова, Ю. М. Хохлова, Л. Г. Логинова, Ф. Ю. Рышук, Микробиол. пром-сть, 2, 1, 1970.
7. O. H. Lowry, J. N. Resembrough, A. L. Furr, J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
8. M. Anson, J. Gen. Physiol., 22, 79, 1938.
9. Г. В. Самсонов, Р. Б. Пономарева, Л. П. Шандалова, Биохимия, 31, 8, 1966.
10. Л. К. Шатаева, Г. В. Самсонов, Сб. Термодинамика ионного обмена, «Наука и техника», 1968, стр. 193.
11. С. Ф. Клих, Г. В. Самсонов, Хим.-фармакол. ж., 9, 45, 1972.
12. O. D. Bonner, W. J. Argersinger, A. W. Davidson, J. Amer. Chem. Soc., 74, 1044, 1952.

УДК 541.64:547 (313+341)

ОСОБЕННОСТИ ТЕРМООКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ γ -ОБЛУЧЕННЫХ СОПОЛИМЕРОВ ЭТИЛЕНА С ЭФИРАМИ ВИНИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТЫ

**Н. С. Соболева, С. С. Лещенко, С. М. Самойлов,
С. Д. Янкова, Р. А. Тертерян, В. Л. Карпов**

Изучению термоокислительной деструкции ПЭ посвящено большое количество работ [1-7]. Особенности термической и термоокислительной деструкции облученного ПЭ, связанные с изменением молекулярной структуры полимера при облучении, рассмотрены в работах [8, 9]. Данная