

УДК 541.64:539.199

**ВЛИЯНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ЖИДКОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО  
ПОРЯДКА НА ПАРАМЕТРЫ КОНФОРМАЦИОННОГО ПЕРЕХОДА  
СПИРАЛЬ — КЛУБОК В ПОЛИ- $\gamma$ -БЕНЗИЛ-L-ГЛУТАМАТЕ**

Волчек Б. З., Медведева Д. А., Пуркина А. В.,  
Овсянникова Л. А., Власов Г. П.

Методом ИК-спектроскопии показано, что образование жидкокристаллического порядка в концентрированных растворах поли- $\gamma$ -бензил-L-глутамата в смешанном растворителе не приводит к дополнительной стабилизации спиральной структуры полипептидной цепи и к увеличению степени кооперативности инвертированного конформационного перехода спираль — клубок.

Вопрос о конформационном строении полужестких макромолекул в ЖК-состоянии рассмотрен в ряде теоретических работ [1, 2]. Показано, что в полимерах такого типа упорядочение макромолекул в ЖК-растворах или расплавах может осуществляться либо на уровне отдельных фрагментов макромолекулы [2], либо на уровне макромолекулы в целом. В последнем случае возможно увеличение жесткости полимерной цепи [1]. Реализация того или иного способа упорядочения макромолекул в ЖК-состоянии определяется конкретным механизмом гибкости макромолекул и особенностями их химического строения [3].

В реальных полимерных системах всегда возможно сочетание различных механизмов гибкости, что затрудняет корректное сопоставление экспериментальных и теоретических результатов. В последнее время появились теоретические работы, рассматривающие влияние образования ЖК-порядка на параметры конформационного перехода спираль — клубок в полипептидах в смешанном растворителе [4—6] при понижении температуры. В приближении среднего поля [4] и решеточной модели [5] теоретически показана возможность стабилизации спиральной конформации и увеличения кооперативности этого перехода в ЖК-состоянии, образованном такими полимерами, по сравнению с аналогичными характеристиками в изотропных растворах. Экспериментальная проверка теоретических предсказаний кроме частного интереса, относящегося к данному типу полимеров, имеет и более общее значение, поскольку позволяет проанализировать правильность теоретических подходов к вопросу о влиянии ЖК-состояния на конформационное строение полужестких макромолекул, в частности макромолекул с персистентным механизмом гибкости.

В настоящей работе предпринята попытка рассмотреть влияние образования ЖК-порядка на параметры температурного перехода спираль — клубок в растворах поли- $\gamma$ -бензил-L-глутамата (ПБГ) в смешанном растворителе дихлоруксусная кислота (ДХК) — хлороформ при изменении температуры раствора. Известно, что для указанных систем характерен инвертированный переход [7], т. е. спиральная конформация ПБГ стабилизируется при повышении температуры, а клубкообразная — при понижении.

Стабильность спиральной конформации полипептидной цепи определяется разностью свободных энергий мономера в спиральной и клубкообразной конформациях [8]. Если конформационный переход обусловлен изменением температуры, обычно характеристикой стабильности спирали является температура  $T_n$ , соответствующая середине перехода, т. е. 50%-ной степени спиральности.

Кооперативность перехода спираль – клубок характеризуется параметром  $\sigma$  – статистическим весом концевых единиц в спиральной последовательности [8]. Влияние ЖК-состояния на конформационную стабильность может проявиться на характере температурной зависимости плавления спиралей [4], которая в изотропных растворах имеет S-образный характер. Однако прямое сопоставление указанных характеристик перехода в изотропных и ЖК-растворах (при комнатной температуре) в смешанном растворителе является недостаточно корректным и может привести к неправильным выводам [9] из-за зависимости  $T_n$  и  $\sigma$  от концентрации полимера при фиксированном составе растворителя, наблюдаемой даже в изотропных растворах ПБГ [10, 11]. Поэтому более правильным является сравнение изменений этих параметров в широком диапазоне концентраций полимера в растворе до и после перехода полимера в ЖК-состояние.

Исследовали образцы ПБГ, полученные полимеризацией соответствующего N-карбоксиангидрида с триэтиламином в качестве инициатора. Молекулярные массы исследованных образцов по данным вискозиметрических измерений составляли  $1,3 \cdot 10^5$  и  $3,2 \cdot 10^5$ . Отсутствие следов воды в ДХК контролировали методом ЯМР. Во всех экспериментах состав растворителя был постоянным: 60% ДХК – 40% хлороформа (по объему). Изменения степени спиральности молекул ПБГ с температурой фиксировали методом ИК-спектроскопии (прибор Perkin – Elmer-580 B). В отличие от обычно применяемых для таких измерений методов дисперсии оптического вращения (ДОВ) и кругового дихроизма метод ИК-спектроскопии позволил достаточно просто исследовать плавление спиралей ПБГ в широком диапазоне концентраций полимера. Для температурных исследований использовали термостатируемую кювету. Точность измерения температуры составляла  $1-2^\circ$ . Для количественной оценки степени спиральности образца при заданной температуре использовали отношение оптических плотностей  $D_i$  полосы Амид I на частоте  $1655 \text{ cm}^{-1}$ , соответствующей спиральной конформации ПБГ при данной температуре, к оптической плотности  $D_{t_k}$  этой полосы в спектре раствора при комнатной температуре, когда степень спиральности молекул ПБГ при указанном составе смешанного растворителя составляет 100%. При этом значение  $D_{t_k}$  принимали за единицу. Значения  $D_i$  изменили в разностном спектре, полученному вычитанием с помощью компьютера (Data Station-3500) спектра растворителя, записанного при той же температуре. Учитывали также вклад в поглощение на частоте  $1655 \text{ cm}^{-1}$  поглощения с максимумом на  $1620 \text{ cm}^{-1}$ , соответствующего водородной связи  $\text{C}=\text{O}$  амидных групп полипептидной цепи с ОН-группами ДХК [12] и поглощения с максимумом на  $1635 \text{ cm}^{-1}$ , соответствующего появляющейся при охлаждении спиральных растворов ПБГ клубкообразной конформации [12]. Отметим, что в отсутствие конформационных изменений температурных изменений интенсивностей полос в спектре ПБГ не наблюдалось. Криевые плавления спиралей ПБГ, полученные указанным выше способом и методом ДОВ для разбавленных растворов, подобны.

Образование ЖК-порядка в растворе фиксировали методом поляризационной микроскопии (поляризационный микроскоп РМНК-05). Растворение ПБГ происходило в течение 3–10 сут в запаянных ампулах для достижения равновесия в растворах при больших концентрациях. При температурных измерениях образцы выдерживали в кювете при заданной температуре не менее 10 мин.

На рис. 1 и 2 представлены температурные зависимости перехода спираль – клубок при различных концентрациях ПБГ в растворе для  $M = 1,3 \cdot 10^5$  и  $3,2 \cdot 10^5$ . Видно, что зависимости имеют S-образный характер независимо от фазово-агрегатного состояния раствора при комнатной температуре и сохраняют симметрию относительно значения температуры, соответствующего середине перехода. Это свидетельствует о том, что в пределах ошибки измерений стабильность спирали ПБГ не связана с фазово-агрегатным состоянием раствора. В противном случае в соответствии с работой [4] на кривых плавления спиралей ПБГ в случае ЖК-растворов (при комнатной температуре) должны быть отступления от S-образности. С другой стороны, как и ожидалось по аналогии с изотропными растворами, наблюдается значительная зависимость  $T_n$  от концентрации ПБГ ( $M=1,3 \cdot 10^5$ ).

ПБГ, %	7	10	16	21	23	27	31	35
	2	-1	-5	-13	-14	-17	-20	-33

Это формально свидетельствует о повышении стабильности спирали при увеличении концентрации полимера в растворе.

Вопрос о зависимости  $T_n$  от концентрации ПБГ в смешанном растворителе в случае изотропных растворов рассмотрен в ряде работ [10, 11].

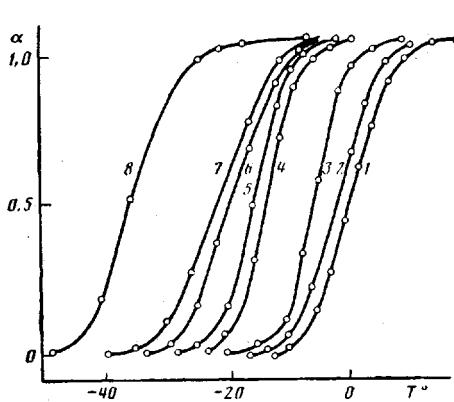


Рис. 1

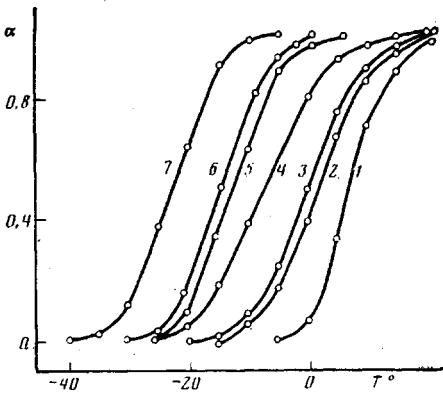


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость степени спиральности  $\alpha$  молекул ПБГ с  $M=1,3 \cdot 10^5$  от температуры раствора при  $[ПБГ]=7$  (1), 10 (2), 16 (3), 21 (4), 23 (5), 27 (6), 31 (7) и 35 вес/об.% (8)

Рис. 2. Зависимость степени спиральности  $\alpha$  молекул ПБГ с  $M=3,2 \cdot 10^5$  от температуры раствора при  $[ПБГ]=7$  (1), 10 (2), 14 (3), 18 (4), 21 (5), 23 (6) и 27 вес/об.% (7)

Существование такой зависимости может быть объяснено сложным характером взаимодействия в системе полипептид – ДХК и ДХК – ДХК и изменением соответствующих равновесий при изменении концентрации полимера в растворе. Как было показано в работе [10], для изотропных растворов в значительном диапазоне концентраций ПБГ при постоянном составе растворителя наблюдается линейная зависимость  $T_n$  от мольной доли кислоты в растворе с учетом ее изменения за счет изменения концентрации полимера.

Можно было полагать, что влияние ЖК-состояния на конформационную стабильность ПБГ проявится в отступлении значений  $T_n$  в случае ЖК-растворов (при комнатной температуре) от указанной прямолинейной зависимости. Как видно из рис. 3, для исследованных молекулярных масс в пределах ошибки измерений  $T_n$  ( $1-2^\circ$ ) не наблюдается отступлений  $T_n$  от линейной зависимости во всем диапазоне исследованных концентраций ПБГ независимо от фазово-агрегатного состояния раствора. Это свидетельствует о том, что ЖК-состояние не оказывает специфического влияния на стабилизацию спиральной структуры ПБГ. Отметим, что по приближенной оценке для образцов с  $M=1,3 \cdot 10^5$  и концентрацией ПБГ в растворе 22% при температуре, соответствующей 50% спиральности полипептида, объем ЖК-фазы составляет  $\sim 30\%$ .

Образование ЖК-порядка в рассмотренных системах происходит не на уровне отдельных макромолекул ПБГ, а на уровне их агрегатов, имеющих большую асимметрию. Это следует из того факта, что для исследованных молекулярных масс I и II критические концентрации ПБГ в растворе (соответствующие границам двухфазной области на фазовых диаграммах) в случае безагрегатных условий для  $M=3,2 \cdot 10^5$  составляют 22–24 и 28–30% соответственно, а для  $M=1,3 \cdot 10^5$  равно 30–32 и 40–42% [13]. В исследованных нами растворах образование однофазных ЖК-систем, т. е. достижение второй границы двухфазной области наблюдали уже при концентрации ПБГ в растворе 21% (для  $M=3,2 \cdot 10^5$ ) и 23% – для  $M=1,3 \cdot 10^5$ . Можно было предположить, что при понижении температуры раствора могут измениться условия агрегации. Однако даже в случае разрушения агрегатов при понижении температуры исследованный диапазон концентраций ПБГ перекрывает значения, соответствующие первой границе для безагрегатных условий в случае обеих исследованных молекулярных масс. Поэтому возможно сопоставление теоретических предсказаний [4, 5] с экспериментальными результатами.

Наблюдаемая прямолинейная зависимость  $T_n$  от мольной доли кислоты в растворе свидетельствует о том, что возможное изменение агрегации

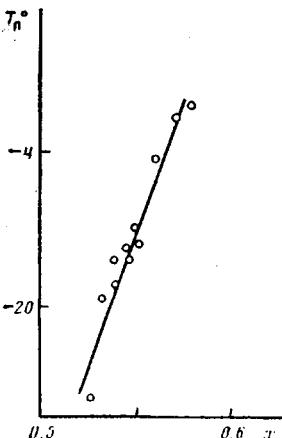


Рис. 3

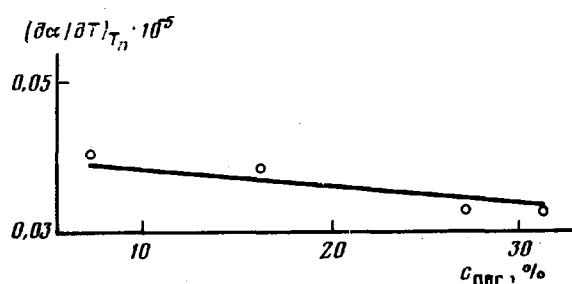


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость температуры полуперехода от мольной доли кислоты в растворе  $x$ . Молекулярная масса ПБГ  $1,3 \cdot 10^5$

Рис. 4. Зависимость  $(\partial\alpha/\partial T)_{T_g}$  от концентрации ПБГ в растворе. Молекулярная масса ПБГ  $1,3 \cdot 10^5$

макромолекул ПБГ при изменении температуры не сказывается на скорости плавления спиралей ПБГ.

Значение параметра кооперативности конформационного перехода  $\sigma$  может быть рассчитано из выражения  $\Delta H_{van't Hoff} = \Delta H/\sigma^{th}$   $\Delta \bar{H}_{van't Hoff} = = \left( \frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{T_g}$ , где  $\Delta H_{van't Hoff}$  — теплота перехода спираль — клубок

кооперативного участка,  $\Delta H$  — теплота перехода спираль — клубок в расчете на мономер. Значение  $\Delta H_{van't Hoff}$  может быть получено из наклона касательной к кривой плавления в середине конформационного перехода;  $\Delta H$  определяется калориметрически. Как следует из данных работы [11], значения  $\Delta H_{van't Hoff}$ ,  $\Delta H$  в растворах ПБГ в смешанном растворителе при данном его составе линейно уменьшаются с увеличением концентрации ПБГ в случае изотропных растворов. На рис. 4 приведены зависимости значений  $(\partial\alpha/\partial T)_{T_g}$  от концентрации ПБГ, рассчитанные на основании данных рис. 1 и 2. Видно, что во всем диапазоне концентраций независимо от фазово-агрегатного состояния раствора указанная зависимость имеет прямолинейный характер. Это означает, что скачкообразного изменения степени кооперативности конформационного перехода спираль — клубок в ЖК-состоянии по сравнению с изотропным раствором не происходит.

На рис. 5 а, б представлены фазовые диаграммы исследованных систем в координатах концентрация — температура. Видно, что с началом плавления спирали (при содержании клубокообразной конформации не более 5%) система из однофазной жидкокристаллической переходит в двухфазную. Двухфазность системы сохраняется (в пределах возможности ее фиксации с помощью поляризационного микроскопа) до  $\sim 20\%$  содержания спиральной конформации ПБГ в растворе. Тот факт, что с первым появлением клубокообразной конформации система становится двухфазной, свидетельствует о том, что макромолекулы с нарушениями в спиральной структуре вытесняются из ЖК-фазы.

Прямое измерение конформационного состава ПБГ в изотропной и ЖК-фазах двухфазного раствора в исследованных системах не проводили из-за невозможности разделения фаз в исследованных системах даже при центрифугировании растворов. Это обусловлено большой вязкостью концентрированных растворов при низких температурах. Однако при исследовании растворов, в которых плавление спиралей ПБГ было вызвано не изменением температуры, а изменением состава смешанного растворителя (увеличением содержания кислоты) разделение двухфаз-

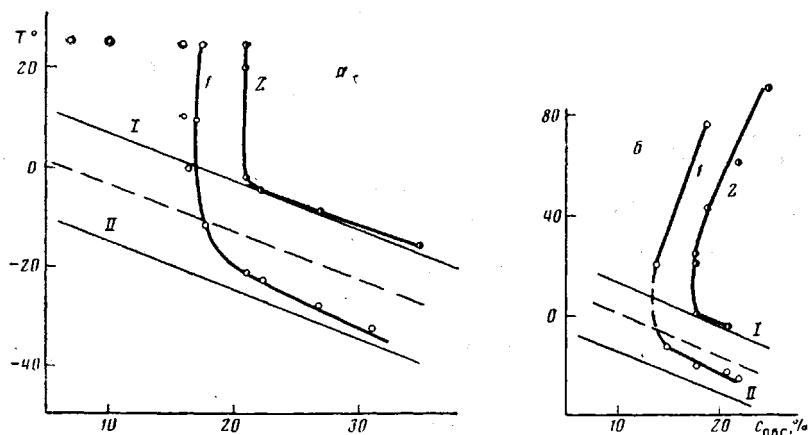


Рис. 5. Фазовые диаграммы растворов ПБГ — смешанный растворитель при молекулярной массе ПБГ  $1.3 \cdot 10^5$  (а) и  $3.2 \cdot 10^5$  (б). 1, 2 — границы двухфазной области. Прямые I и II соответствуют 100%-ной спиральной и клубкообразной конформациям соответственно. Штриховая линия —  $T_n$

ных растворов было проведено. Оказалось, что изотропная фаза содержала макромолекулы ПБГ с нарушенной спиральной конформацией, а в ЖК-фазе находились полностью спиральные макромолекулы. Отметим, что ширина двухфазной области в исследованных системах, содержащих клубкообразную конформацию, значительно больше аналогичной, наблюдавшейся для ЖК-растворов ПБГ, образованных полностью спиральными молекулами при соответствующих концентрациях раствора. Такое расширение двухфазной области, по-видимому, объясняется тем, что при конформационном переходе спираль-клубок в растворе присутствуют макромолекулы со статистическим распределением клубкообразных включений вдоль цепи, что обуславливает присутствие в растворе макромолекул с сильно различающимися значениями асимметрии жесткого участка.

Теоретическое предсказание изменения характеристик спиральной конформации полипептидов в ЖК-состоянии [4] основывается на предположении об энергетической выгодности образования ЖК-состояния спиральными молекулами. Экспериментально наблюдаемая независимость параметров перехода спираль — клубок от фазово-агрегатного состояния в реальных системах, вероятно, может быть объяснена недостаточной кооперативностью таких систем и возможностью реализации ЖК-состояния путем отбора макромолекул с ненарушенными спиральями в ЖК-фазу. Экспериментальное рассмотрение систем с большей степенью кооперативности или повышение концентрации ЖК-растворов, по-видимому, может привести к реализации предполагаемого теоретически повышения конформационной стабильности таких полимеров в ЖК-состоянии [14].

#### ЛИТЕРАТУРА

- Khoklov A. // J. Phys. A. 1983. V. 15. P. 1361.
- Бирштейн Т. М., Колегов Б. И. // Высокомолек. соед. А. 1983. Т. 25. № 12. С. 2519.
- Семенов А. Н., Хохлов А. Р. // Тез. докл. I Всесоюз. симпоз. по жидкокристаллическим полимерам. Сузdal', 1982. С. 88.
- Rajan V. T., Woo C. W. // Phys. Rev. A. 1980. V. 21. № 3. P. 990.
- Matheson R. H. // Biopolymers. 1983. V. 22. № 1. P. 43.
- Pincus P., DeGennes P. G. // J. Polymer Sci. Polymer Symp. 1978. V. 65. P. 85.
- Doty P., Yang J. T. // J. Amer. Chem. Soc. 1956. V. 78. P. 498.
- Бирштейн Т. М., Птицын О. Б. Конформации макромолекул. М., 1964.
- Subramanian R., Wittebort R. W., DuPre D. // J. Chem. Phys. 1982. V. 77. № 9. P. 4694.
- Puett D., Chifferri A. // Biopolymers. 1971. V. 10. № 4. P. 547.
- Ackerman T., Neumann E. // Biopolymers. 1967. V. 5. № 7. P. 649.
- Волчек Б. З., Пуркина А. В. // Высокомолек. соед. А. 1967. Т. 9. № 6. С. 1257.

13. Волчек Б. З., Пуркина А. В., Лебедев Г. А., Власов Г. П., Овсянникова Л. А. // Высокомолек. соед. Б. 1980. Т. 22. № 4. С. 25.  
14. Бирштейн Т. М. // Тез. I Всесоюз. симпоз. по жидкокристаллическим полимерам. Сузdalь, 1982. С. 71.

Институт высокомолекулярных  
соединений АН СССР

Поступила в редакцию  
9.I.1986

**INFLUENCE OF LIQUID CRYSTALLINE ORDER FORMATION  
ON PARAMETERS OF HELIX — COIL CONFORMATIONAL TRANSITION  
IN POLY- $\gamma$ -BENZYL-L-GLUTAMATE**

Volchek B. Z., Medvedeva D. A., Pуркина A. V.,  
Ovsyannikova L. A., Vlasov G. P.

**S u m m a r y**

It has been shown by IR-spectroscopy method that the formation of the liquid crystalline order in concentrated solutions of poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate in mixed solvent does not result in additive stabilization of the helix structure of the polypeptide chain and in increasing of the cooperativity degree of the inverted helix — coil conformational transition.