

УДК 541.64:547.96

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУР ПЕРЕХОДА В ВЯЗКОТЕКУЧЕЕ СОСТОЯНИЕ, ДЕНАТУРАЦИИ И НАЧАЛА ИНТЕНСИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ БЕЛКОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ХИМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ

© 1997 г. Ю. И. Матвеев

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук
117813 Москва, ул. Вавилова, 28

Поступила в редакцию 27.05.96 г.

Принята в печать 01.07.96 г.

На основании аддитивных схем вычислены температуры перехода в вязкотекучее состояние, денатурации и деструкции 32 белков. Уточнены вклады сильных взаимодействий (диполь-дипольных взаимодействий и водородных связей) в парциальные вклады характерных температур аминокислотных остатков (в том числе в температуру стеклования). Полученные результаты находятся в согласии с известными экспериментальными данными.

ВВЕДЕНИЕ

При определении температурных режимов процессов переработки биополимеров и их смесей важно знать такие характерные температуры их компонентов (в первую очередь белков и полисахаридов) как температуру перехода в стеклообразное состояние (T_g), перехода в вязкотекучее состояние (T_f), денатурации (T_{dn}) и начала интенсивной деструкции (T_{des}). Зная эти характеристики, можно определить температурный диапазон воздействия на биополимеры и их смеси, в котором они могут быть переведены в различные физические состояния, но при этом не претерпевать нежелательных химических превращений.

Перечисленные выше температуры могут быть найдены экспериментальным путем с привлечением методов, которые используются при исследованиях синтетических полимеров. К сожалению, из большого количества биополимеров (белков и полисахаридов), лишь незначительная их часть исследована экспериментально в твердом состоянии (в случае белков – это желатин, коллаген, эластин, некоторые белки сои и гемоглобин). Последнее связано с экспериментальными трудностями, возникающими при исследованиях биополимеров и приводящими к большим погрешностям при определении характерных температур. В этом отношении очень показательна табл. 1, приведенная в работе [1], которая иллюстрирует, как происходило уточнение T_g желатина с 1958 по 1980 гг. (T_g “повысилась” на 122°C).

Однако наряду с экспериментальными методами определения характерных температур полиме-

ров существуют расчетные методы их вычисления, основанные на аддитивных схемах, которые позволяют с высокой точностью рассчитывать характерные температуры полимеров в зависимости от их химического строения. Ранее в работе [2] были выполнены расчеты T_g ряда белков, которые дали хорошее совпадение с имеющимися экспериментальными данными.

В настоящей статье на основании подходов, развитых в работах [3–5], вычислены T_f , T_{dn} и T_{des} белков. С целью уточнения T_g белков и лучшего согласия результатов расчетов T_g с экспериментальными данными учтено влияние химического строения боковых цепей аминокислотных остатков на их вклад в сильные взаимодействия (диполь-дипольные взаимодействия и водородные связи).

Следует заметить, что проблема структуро-свойство применительно к природным полимерам имеет свою специфику, связанную с тем, что здесь особую роль играет точность расчета соответствующих свойств биополимеров, которая очень важна при оценке совместимости биополимеров различного типа, учете влияния химической модификации биополимеров на изменение их свойств и т.д.

УТОЧНЕНИЕ АДДИТИВНОЙ СХЕМЫ ДЛЯ ВЫЧИСЛЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ СТЕКЛОВАНИЯ БЕЛКОВ

Ранее в работе [2] при определении парциального вклада в температуру стеклования i -го

аминокислотного остатка $T_{g,i}$ было использовано выражение

$$T_{g,i} = \left[\sum_k \Delta V_k / \sum_k (a_k \Delta V_k + b_k) \right]_i, \quad (1)$$

где a_k – вклад k -го атома в слабое взаимодействие, b_k – вклад группы атомов аминокислотного остатка в сильное взаимодействие (диполь-дипольное взаимодействие, водородную связь). При этом вклад группы атомов в водородную связь, согласно работе [3], оценивали одним инкрементом b_h , а в диполь-дипольные взаимодействия – инкрементом b_d . В зависимости от того, сколько водородных связей или диполей могли образовать атомы, входящие в повторяющееся звено, величины b_h или b_d умножали на соответствующее число водородных связей n_h или число диполей n_d . Кроме того, вводили определенную иерархию при учете сильных взаимодействий. Если атомы образовывали водородные связи и диполи, то учитывали только водородные связи, т.е. инкременты водородной связи одновременно включали в себя диполь-дипольное взаимодействие. При отсутствии водородных связей учитывали только диполь-дипольные взаимодействия. Принятое допущение приводило к некоторой погрешности определения T_g полимеров с водородными связями, так как при этом нивелировался вклад диполь-дипольных взаимодействий в суммарный инкремент водородной связи.

В белках разница между аминокислотными остатками возникает из-за боковых цепей, которые образуют большое разнообразие водородных связей [6] и имеют разные дипольные моменты. Именно по этой причине $T_{g,i}$ изменяются в широких пределах. Чтобы корректно оценить вклад сильных взаимодействий в $T_{g,i}$, следовательно, уточнить расчетные значения T_g белков в рамках аддитивных схем, при вычислении b_h и b_d будем учитывать влияние химического строения групп атомов, вносящих вклад в данный тип взаимодействия следующим образом:

$$b_h = -\kappa_h \sum_i \Delta V_{lh}, \quad (2)$$

$$b_d = -\kappa_d \sum_i \Delta V_{ld}, \quad (3)$$

где ΔV_{lh} , ΔV_{ld} – ван-дер-ваальсовы объемы атомов, вносящих вклад в данный тип сильного взаимодействия; κ_h и κ_d – некоторые коэффициенты, определяемые по результатам обработки экспериментальных данных для синтетических полимеров.

Выражения (2), (3) следуют из общей записи рассматриваемых типов взаимодействий [7], если перейти от интегралов к суммам. В рассматрива-

емом подходе каждый из типов сильного взаимодействия учитывается отдельно и, если присутствует оба взаимодействия, то их вклад суммируется.

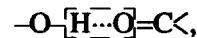
Обработка экспериментальных данных по T_g синтетических полимеров дает такие значения параметров, входящих в выражения (2) и (3): $\kappa_h = 8.6 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1} \text{ \AA}^{-3}$, $\kappa_d = 0.72 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1} \text{ \AA}^{-3}$. Кроме того, выражение (3) можно записать как

$$b_d = -\kappa_d \left(\Delta V_{\max} - \sum_l \Delta V_{ld} \right), \quad (4)$$

где $\Delta V_{\max} = 125.1 \text{ \AA}^3$. При $\Delta V_{\max} - \sum_l \Delta V_{ld} \leq 0$, $b_d = 0$.

При вычислении b_h и b_d по формулам (2) и (4) в качестве суммарного объема атомов, образующих тот или иной тип взаимодействия, берут следующее.

1. В случае водородной связи, образованной атомами, входящими, например, в гидроксил-карбонильную группу



$$\sum_l \Delta V_{lh} = \Delta V_H + \Delta V_O = 10.55 \text{ \AA}^3,$$

или в амид-карбонильную группу



$\sum_l \Delta V_{ld} = \Delta V_H + \Delta V_O = 9.35 \text{ \AA}^3$. Здесь, согласно работе [3], штриховой линией обозначены атомы, образующие водородную связь, причем их ван-дер-ваальсовые объемы, в данном случае H и O, зависят от атомов, с которыми они химически связаны.

2. В случае диполь-дипольного взаимодействия

$$\sum_l \Delta V_{ld} = \Delta V_i - 45.6 \text{ \AA}^3,$$

где ΔV_i – объем i -го аминокислотного остатка, 45.6 \AA^3 – объем глицина без одного атома водорода (атомов, образующих основную цепь молекулы белка).

Особенность поведения аминокислотных остатков в белках по сравнению с соответствующей полиаминокислотой заключается в том, что некоторые аминокислотные остатки содержат в боковых цепях отдельные группы атомов (например, гидроксильную или амидную), которые при определенной последовательности этих остатков в нативном состоянии или при сворачивании полипептидной цепи в клубок в аморфном состоянии могут образовать дополнительные водородные связи. В качестве типичного примера можно рассмотреть случай, когда метионин, имеющий атом серы S в боковой цепи, располагается рядом с аргинином, содержащим амидную группу в

боковой цепи. В этом случае образуется водородная связь типа



Кроме того, у белков группы атомов основной цепи могут взаимодействовать с группами атомов боковой цепи, с которыми образуют водородную связь. По этой причине парциальные вклады аминокислотных остатков в температуру стеклования белка отличаются от вкладов в температуру стеклования соответствующих полиаминокислот (они будут больше, чем у полиаминокислот).

При расчете парциальных вкладов аминокислотных остатков в T_g белка выражение (1) можно записать следующим образом:

$$T_{g,i} = \left[\sum_k \Delta V_k / \left(A + \sum_k (a_k \Delta V_k + b_k) \right) \right], \quad (5)$$

где A – вклад в $T_{g,i}$ атомов аминокислотного остатка, образующих основную цепь, $\sum_k (a_k \Delta V_k + b_k)$ – вклад в $T_{g,i}$ атомов боковой цепи. Величина A для всех аминокислотных остатков постоянная. Отличие $T_{g,i}$ проявляется только через \sum_k и $\sum \Delta V_k$.

Оценим значение A . Так как вклад слабых взаимодействий атомов в A в аддитивных схемах учитывается как среднее по всевозможному окружению данного атома другими атомами в полимере, задача сводится к правильному определению вклада сильных взаимодействий (в основном водородных связей). Ввиду отмеченных выше причин амидные и карбонильные группы, входящие в основную цепь аминокислотного остатка, могут образовывать различные виды водородных связей. Поэтому при вычислении b_i эта величина рассматривается как средняя по всевозможным вариантам водородных связей, а найденная таким образом величина $A = 22$.

При определении вкладов водородных связей, образованных группами атомов боковых цепей, будем руководствоваться следующими соображениями. Если группы атомов, образующие водородную связь, целиком входят в боковую цепь, то добавляется еще одна водородная связь, а ее вклад определяется как среднее по всевозможным водородным связям, которые могут образовывать группы данного типа. Если одна группа атомов, образующая водородную связь, входит в боковую цепь одного аминокислотного остатка, а другая группа атомов входит в другой аминокислотный остаток, то используем вклад половины энергии водородной связи, а ее величина также определяется как среднее по всевозможным видам водородных связей.

В табл. 1 приведены значения парциальных вкладов в температуру стеклования аминокислотных остатков $T_{g,i}$ и число водородных связей

n_h , приходящихся на один аминокислотный остаток, найденные исходя из приведенных выше соображений. Кроме того, в табл. 1 даны уточненные значения объемов аминокислотных остатков ΔV_i [8]. Если сравнивать значения $T_{g,i}$ с соответствующими значениями в работах [2, 8], то существенное уточнение претерпели данные по глицину, аланину и цистеину. Были также скорректированы значения $T_{g,i}$ других аминокислотных остатков. Сравнение $T_{g,i}$ с экспериментальными данными по полиаминокислотам [9, 10] (T_g можно найти из температурных зависимостей теплоемкостей, измеренных в интервале 230–390 К) дает сопоставимые значения для лейцина (изолейцина), лизина, аргинина.

В табл. 2 представлены результаты расчетов T_g для пищевых белков, рассмотренных в работе [2]. У одних белков значения T_g понизились, а у других повысились по сравнению со значениями, приведенными в работе [2]. Однако все тенденции, отмеченные в статье [2], сохранились. Осталась классификация белков, только сместились средние температуры и температурные интервалы классов стали постоянными: $T_g = 150 \pm 11$, 174 ± 11 , $198 \pm 11^\circ\text{C}$ соответственно. Расчетные и экспериментальные значения T_g , приведенные в работе [2], сблизились. Последнее означает, что расчетная схема правильно отражает влияние химического строения аминокислотных остатков на T_g , так как существенная коррекция $T_{g,i}$ некоторых аминокислотных остатков оказалась скомпенсирована изменением $T_{g,i}$ других аминокислотных остатков.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЕРЕХОДА БЕЛКОВ В ВЯЗКОТЕКУЧЕЕ СОСТОЯНИЕ

Согласно работе [4], выражение для расчета температуры перехода в вязкотекучее состояние полимеров T_f можно записать следующим образом:

$$T_g/T_f = 1 - \\ - 0.0385 \ln [B^{-1} x^{1.5} ((Ax)^{0.5} - 1)^3 + 1/3)], \quad (6)$$

где $A = N_c/N_e$, $B = (Ax)^{0.5} + 1/3$, $X = N/N_c$, $N_c = 0.21 T_g (N_A \sum \Delta V_i)^{1/3}$, T_g – температура стеклования белка, $\sum \Delta V_i = \sum N_i \Delta V_i / \sum N_i$ – средний вандер-ваальсов объем повторяющегося звена молекулы белка, $N_e^{-1} = 0.023 \times (1 - (1 - 0.414 T_g/T_f)^{0.5})$ для белков, согласно работе [5].

В табл. 2 приведены значения T_f и N_c , вычисленные для некоторых типов пищевых белков при значении $A = 2.4$, которое реализуется для большинства синтетических полимеров [11]. Расчеты показывают, что у основной части белков

Таблица 1. Парциальные температуры $T_{g,i}$, $T_{dn,i}$, $T_{des,i}$, ван-дер-ваальсовы объемы ΔV_i и число водородных связей $n_{h,i}$ аминокислот

Аминокислота	$T_{g,i}$, К	$T_{dn,i}$, К	$T_{des,i}$, К	ΔV_i , \AA^3	$n_{h,i}$
Глицин	768	898	531	47.6	1
Аланин	985	1141	533	64.7	1
Валин	395	410	561	98.8	1
Лейцин	338	347	569	115.9	1
Изолейцин	338	347	569	115.9	1
Фенилаланин	502	519	549	140.4	1
Пролин	432	452	611	87.2	1
Триптофан	422	432	537	170.1	1
Серин	593	667	489	72.1	1.5
Тreonин	419	447	462	89.1	1.5
Метионин	497	527	367	117.1	1.5
Аспарагин	474	521	478	94.8	2
Глутамин	383	408	495	111.9	2
Цистеин	965	1147	322	82.2	1.5
Аспарагиновая кислота	701	814	454	90.7	2
Глутаминовая кислота	486	529	474	107.8	2
Тирозин	439	457	524	147	1.5
Гистидин	609	670	469	119.5	2
Лизин	274	282	576	127.4	1.5
Аргинин	266	277	521	146.6	2.5

$T_f < T_g$. Исключение составляют лишь некоторые белки яиц, мяса, кукурузы и крови, имеющих $T_f > T_g$ (таких белков только 9 из 32). По классификации стекол, предложенной в работе [5], большинство белков можно отнести к стеклам типа Эдвардса-Дои, существенный вклад в свойства которых вносят рептационные движения, но отсутствует высокоэластическое состояние, так как степень полимеризации $N < N_c$, причем критическая степень полимеризации N_c меняется в ограниченных пределах: $340 < N_c < 379$.

Реально при определении T_f необходимо решать уравнение (6) относительно T_g/T_f , так как $N_e = f(T_g/T_f)$. Вычисления показывают, что $1.5 < N_c/N_e < 2$, причем $N_c/N_e \rightarrow 2$ характерны для белков и синтетических полимеров, у которых $T_f > T_g$, а $N_c/N_e \rightarrow 1.5$ имеют белки с $T_g > T_f$. При этом $T_f \rightarrow T_g$ у белков, относящихся к стеклам Эдвардса-Дои, а у белков, образующих "истинные" полимеры (т.е. имеющих плато высокоэластического состояния и $T_f > T_g$), T_f уменьшается на $\sim 15^\circ\text{C}$ по сравнению со значением, найденным при $A = 2.4$. Так как T_f зависит от N , следует особо отметить роль дисульфидных мостиков, которые могут привести к увеличению N молекулы и к переводу ее в область высокоэластического состояния.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ДЕНАТУРАЦИИ БЕЛКОВ

При определении температуры денатурации белков T_{dn} можно воспользоваться аддитивной схемой, аналогичной использовавшейся для расчета температуры стеклования [2]. Только необходимо найти парциальные вклады в температуру денатурации аминокислотных остатков $T_{dn,i}$. Значения $T_{dn,i}$ определим из следующих соображений. При переходе молекулы белка из нативного состояния в денатурированное наибольшее изменение претерпевают инкременты сильных взаимодействий, так как они отвечают за образование нативных структур. Тогда $T_{dn,i}$ можно записать как

$$T_{dn,i} = \left[\sum_k \Delta V_k / \sum_k (a_k \Delta V_k + b_{dn,k}) \right]_i, \quad (7)$$

где a_k – инкремент слабого взаимодействия, который в нативном состоянии принимается таким же, как в аморфном состоянии; $b_{dn,k}$ – инкремент сильного взаимодействия в нативном состоянии, отличающийся от инкремента сильного взаимодействия в аморфном состоянии $b_{a,k}$ на величину Δb_c , т.е.

$$b_{dn,k} = b_{a,k} + \Delta b_c. \quad (8)$$

Таблица 2. Вычисленные значения T_g , T_f , T_{dn} , T_{des} и N_c некоторых белков

Тип белка	T_g , °C	T_f , °C	T_{dn} , °C	T_{des} , °C	N_c
Белки молока и яиц					
α-Казеин	152	132	176	242	354
β-Казеин	148	130	171	248	350
κ-Казеин	156	132	180	244	354
α-Лактальбумин	159	128	184	227	360
β-Лактоглобулин	146	122	169	237	348
Овальбумин	157	161	182	235	356
Лизоцим	165	134	192	224	359
Белки мяса и соединительных тканей					
L-Меромиозин	134	185	157	237	340
T-Меромиозин	150	283	174	238	350
Актин	157	158	182	234	354
Миоглобин	149	122	172	246	348
Коллаген	197	281	230	262	358
Желатин	207	311	243	255	363
Эластин	208	248	239	279	361
Белки зерен и семян					
Глютенин	189	152	220	241	371
Глиадин	179	164	208	227	379
Зеин	165	179	189	244	365
2S-Глобулин сои	173	168	201	244	357
2S-Глобулин люпина	186	178	219	211	375
7S-Глобулин сои	151	145	175	244	351
7S-Глобулин люпина	139	136	164	235	348
Белки семян					
7S-Глобулин фасоли	160	154	185	241	358
7S-Глобулин гороха	149	144	174	241	349
7S-Глобулин кормовых бобов	146	142	170	240	348
11S-Глобулин сои	187	179	218	235	369
11S-Глобулин фасоли	166	160	193	243	353
11S-Глобулин гороха	172	163	201	237	359
11S-Глобулин кормовых бобов	171	164	200	240	358
11S-Глобулин подсолнечника	189	181	220	232	372
Белки крови					
Бычий сывороточный альбумин	152	180	177	231	353
Фибриноген	159	178	186	231	354
Гемоглобин	169	139	195	245	362

Примечание. Аминокислотный состав белков был взят из работы [2].

Подставляя формулу (8) в соотношение (7) и учитывая, что

$$[\sum \Delta V_k / \sum (a_k \Delta V_k + b_{a,k})]_i = T_{g,i},$$

согласно работе [2], получим выражение для $T_{dn,i}$

$$T_{g,i} / T_{dn,i} = 1 - T_{g,i} \Delta b_c / (\sum \Delta V_k)_i \quad (9)$$

Здесь $\sum \Delta V_k$ – ван-дер-ваальсов объем аминокислотного остатка.

Исследования отношений T_g/T_m (T_m – температура плавления) у синтетических полимеров [12] показали, что T_g/T_m могут изменяться в широких пределах от 0.25 до 0.97, причем это отношение

бывает больше 0.8 только у несимметричных полимеров.

Обработка экспериментальных данных для синтетических полимеров дает

$$\Delta b_c = (84 + 25s) \times 10^{-3}, \text{ K}^{-1}$$

($s = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, 4$ в зависимости от типа образующейся кристаллической структуры). Так как $s = 0$ соответствует наиболее распространенному типу кристаллической структуры, согласно правилу Бимена, соответствует $T_g/T_m = 2/3$, у несимметричных полимеров, к которым относятся белки, $s < 0$. Имеющийся небольшой экспериментальный материал по ряду белков (коллагену, желатину, гемоглобину и 11S-глицинину) дает значения $T_g/T_{dn} > 0.9$. Такие значения T_g/T_{dn} могут быть получены только при $s = -3$ и $\Delta b_c = 9 \times 10^{-3}, \text{ K}^{-1}$.

Поскольку нативные структуры белков образованы водородными связями, а аминокислотные остатки могут образовывать разное число водородных связей $n_{h,i}$, последнее может быть учтено в выражении (9) следующим образом:

$$T_{g,i}/T_{dn,i} = 1 - T_{g,i} n_{h,i} \Delta b_h / (\sum \Delta V_k), \quad (10)$$

где $\Delta b_h = \Delta b_c = 9 \times 10^{-3}, \text{ K}^{-1}$.

В табл. 1 приведены парциальные вклады в температуру денатурации $T_{dn,i}$, вычисленные для различных аминокислотных остатков. Как видно, значения $T_{d,i}/T_{dn,i}$ меняются в пределах от 0.85 до 0.98.

Расчет температур денатурации T_{dn} некоторых пищевых белков (табл. 2) показывает, что T_{dn} может изменяться от 157 (L-меромиозин) до 243°C (желатин). Заметим, что вычисления T_{dn} были выполнены с помощью выражения

$$T_{dn}^{-1} = \sum \Phi_i T_{dn,i}^{-1} \quad (11)$$

Здесь $\Phi_i = n_i \Delta V_i / \sum n_i \Delta V_i$, ΔV_i – ван-дер-ваальсов объем i -го аминокислотного остатка, n_i – число аминокислотных остатков i -го типа на 1 моль белка. Найденные расчетные значения T_{dn} дают неплохое совпадение с экспериментальными данными [1, 13] (погрешность менее 3%).

При определении T_{dn} белков предполагали, что в них реализуется наиболее распространенная для белков α -спираль (последнее учитывается через $\Delta b_h = 9 \times 10^{-3}$). Однако наряду с α -спиралью в белках, особенно в глобулинах, часто встречаются β -структуры [6], которые могут быть учтены через $\Delta b_h = 34 \times 10^{-3}, \text{ K}^{-1}$ (при $s = -2$). Появление β -структур связано с образованием дополнительных, более мощных, чем в случае α -спирали, водородных связей при определенной последовательности некоторых аминокислотных остатков. Таких аминокислотных остатков семь: метионин (M), цистеин (C), которые содержат в

общем случае незадействованный в водородной связи атом серы S, и триптофан (W), аргинин (R), лизин (K), которые содержат амидную группу NH (аспаргин и глутамин тоже входят в эту группу, но в рассмотренных пищевых белках они отсутствуют). Приведенные аминокислотные остатки при определенной последовательности могут образовать водородные связи типа



С помощью выражения (2) оценим вклад величин $\Delta b_{h\alpha}$ и $\Delta b_{h\beta}$, появляющихся при α -спирале и β -структуре. Так как вклад водородных связей в характерные температуры пропорционален ван-дер-ваальсову объему атомов, образующих водородную связь,

$$\frac{\Delta b_{h\beta}}{\Delta b_{h\alpha}} = \frac{\Delta V_H + \Delta V_S}{\Delta V_H + \Delta V_O}$$

Оценки дают $\Delta b_{h\beta}/\Delta b_{h\alpha} \sim 2.5$, что примерно соответствует отношению значений Δb_h , взятых при $s = -2$ и $s = -3$.

Чтобы вычислить температуру денатурации β -структуры, необходимо для перечисленных выше пяти аминокислотных остатков найти $T_{dn,i}$ при $\Delta b_h = 34 \times 10^{-3}$. Тогда при определении T_{dn} белка необходимо брать у всех оставшихся аминокислотных остатков $T_{dn,i}$, соответствующее $\Delta b_h = 9 \times 10^{-3}$, а у M, C, K, W и R – соответствующее $\Delta b_h = 34 \times 10^{-3}$. Температура денатурации белков, содержащих α -спиралю и β -структуре, будет равна

$$T_{dn}^{-1} = (1 - C_\beta) T_{dn,\alpha}^{-1} + C_\beta T_{dn,\beta}^{-1},$$

где $T_{dn,\alpha}$ и $T_{dn,\beta}$ – температура денатурации α -спиралю и β -структуре соответственно, C_β – доля аминокислотных остатков, образующих β -структуре. Величина C_β определяется числом взаимодействующих пар перечисленных выше аминокислотных остатков и может быть заранее вычислена по данным о последовательности аминокислотных остатков в молекуле белка, если известна длина линейной группы между взаимодействующими аминокислотными остатками. Согласно работе [6], в случае β -структуре линейная группа образована двумя аминокислотными остатками.

Обычно в молекулах белка сумма чисел аминокислотных остатков $n_M + n_C < n_K + n_W + n_R$ и почти все M и C задействованы в водородной связи амид–серы. Поэтому при оценке C_β воспользуемся соотношением

$$C_\beta = 2(n_M + n_C)/N,$$

где N – степень полимеризации молекулы белка. Исключение составляют три белка (глиадин, зеин, 2S-глобулин люпина), у которых $n_M + n_C > n_K + n_W + n_R$ и

$$C_\beta = 2(n_K + n_W + n_R)/N$$

Таблица 3. Расчетные значения долей β -структур (C_β) в белках

Тип белка	$n_M + n_C$	$n_W + n_R + n_K$	N	$C_\beta, \%$
α -Казеин	5	22	199	5
β -Казеин	6	16	209	5.8
κ -Казеин	4	14	169	4.8
α -Лактальбумин	9	17	123	14.6
β -Лактоглобулин	9	20	162	11
Овальбумин	21	42	386	10.8
Лизоцим	10	23	139	14.4
L -Меромиозин	18	135	762	4.8
T -Меромиозин	69	264	1962	7
Актин	18	42	362	10
Миоглобин	2	22	143	2.8
Коллаген	7	85	1065	1.32
Желатин	6	109	1298	0.94
Эластин	0	6	643	0
Глютенин	1	4	110	1.8
Глиадин	10	9	259	7
Зеин	13	7	474	3
2S-Глобулин сои	7	25	321	4.4
2S-Глобулин люпина	29	18	318	11.4
7S-Глобулин сои	4	53	451	1.78
7S-Глобулин люпина	9	69	470	3.8
7S-Глобулин фасоли	5	46	466	2.2
7S-Глобулин гороха	5	59	466	2.2
7S-Глобулин кормовых бобов	4	65	467	1.6
11S-Глобулин сои	7	22	311	4.6
11S-Глобулин фасоли	6	31	313	3.8
11S-Глобулин гороха	3	29	294	2
11S-Глобулин кормовых бобов	3	30	306	2
11S-Глобулин подсолнечника	12	21	312	7.6
Бычий сывороточный альбумин	39	59	559	14
Фибронген	23	59	503	9.2
Гемоглобин	2	13	132	3

Примечание. n_M, n_C, n_W, n_R, n_K – число аминокислотных остатков (метионина, цистеина, триптофана, аргинина, лизина соответственно) в полипептидной цепи, N – степень полимеризации полипептидной цепи.

вычисленные значения C_β изменяются в пределах $0 \leq C_\beta \leq 14.6\%$ (табл. 3). Среднее значение $\langle C_\beta \rangle = 6\%$. Ввиду того, что содержание β -структур мало, они дают слабый сдвиг T_{dn} .

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НАЧАЛА ИНТЕНСИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ

Как было показано в работе [3], температура начала интенсивной деструкции белка T_{des} может быть найдена с помощью выражения, аналогичного (11), путем замены T_{dn} на T_{des} и $T_{dn, i}$ на $T_{des, i}$.

Поэтому вычисление T_{des} фактически сводится к определению парциальных вкладов в температуру деструкции аминокислотных остатков $T_{des, i}$. Выражение для вычисления $T_{des, i}$ будет аналогично выражению (1) для $T_{g, i}$, только смысл и значения инкрементов a_k и b_k будут иными: a_k (обозначим c_k) – вклад k -го атома в химическое взаимодействие, b_k (обозначим d_k) – вклад k -го атома в сильное взаимодействие, причем в случае $T_{des, i}$ величина $d_k > 0$, согласно работе [3]. Последнее означает, что сильные взаимодействия приводят к дополнительному нагружению химических

связей и, следовательно, к понижению T_{des} (напомним, что в случае T_g сильные взаимодействия вызывают увеличение T_g).

При расчете парциальных вкладов аминокислотных остатков в T_{des} белка выражение для $T_{des,i}$ можно записать следующим образом:

$$T_{des,i} = \left[\sum_k \Delta V_k / \left(B + \sum_k (c_k \Delta V_k + d_k) \right) \right], \quad (12)$$

где B – вклад в $T_{des,i}$ атомов аминокислотных остатков, образующих основную цепь, $\sum_k (c_k \Delta V_k + d_k)$ – вклад в $T_{des,i}$ атомов боковой цепи. Величина B для всех аминокислотных остатков постоянная. Отличие $T_{des,i}$ будет проявляться только через \sum_k и $\sum_k \Delta V_k$.

При оценке B будем руководствоваться теми же самыми соображениями, что и при оценке A в выражении (5) для $T_{g,i}$. Найденная таким образом величина $B = 85$. Вклад сильных взаимодействий в $T_{des,i}$ учитывается так же, как при расчете $T_{g,i}$.

В табл. 1 даны значения $T_{des,i}$, вычисленные по формуле (12), и значения инкрементов c_k и d_k , приведенным в работе [3]. Сравнивая значения $T_{g,i}$ и $T_{des,i}$, можно видеть, что не у всех полиаминокислот можно экспериментально измерить $T_{g,i}$ (из 20 аминокислот только 11 имеют $T_{g,i} < T_{des,i}$), так как у 9 полиаминокислот раньше наступает деструкция, чем переход в высокоэластическое или вязкотекучее состояния. Последнее происходит из-за сильных взаимодействий вследствие перегрузки химических связей. Этот факт хорошо известен в случае синтетических полимеров [3].

Расчет T_{des} белков (табл. 2) показывает, что T_{des} , подобно T_g , меняется в пределах 68° (максимальная $T_{des} = 279^\circ\text{C}$ у желатина, минимальная $T_{des} = 211^\circ\text{C}$ у 2S-глобулина люпина), но распределение T_{des} в зависимости от типа белков иное, чем в случае T_g . Найденные значения T_{des} белков накладывают определенные ограничения на реализуемые T_f белков. В случае белков мяса и соединительных тканей (T -меромиозин, коллаген, желатин) верхняя граница T_f будет определяться T_{des} этих белков.

Вычисленные значения T_{des} соответствуют температурам термодеструкции белков, измеренным в среде инертных газов (например, в аргоне). В реальных технологических процессах существует воздух, вода, растворенные в ней кислоты, поэтому раньше наступает термоокислительная и гидролитическая деструкции [14, 15]. Так, в работе [17] было показано, что температуры, при которых происходят изменения цвета глютена в зависимости от содержания воды, ложатся на аналогичную зависимость температуры стекловав-

ния. В этом плане найденные значения T_{des} можно рассматривать как предельные, определяющие верхнюю границу разложения белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненные расчеты позволяют определить основные характерные температуры белков, представляющие интерес в различных технологических процессах, связанных с переработкой биополимеров и их смесей. Аналогично (с помощью аддитивных схем) могут быть рассчитаны характерные температуры полисахаридов. Найденные характерные температуры получены для белков, находящихся в твердом состоянии (белковые стекла, кристаллы) при отсутствии воды (основного пластификатора биополимеров) и различных добавок (соляй, кислот, спиртов, липидов и т.д.). Однако все эти факторы можно учесть в рамках аддитивных схем через функцию пластификации $P(c) = T_c(c)/T_c(0)$, где c – объемная или массовая доля чистого или модифицированного (солями, кислотами, спиртами и т.д.) пластификатора, $T_c(c)$ и $T_c(0)$ – характерные температуры белка при $c \neq 0$ и $c = 0$ [8].

В процессе переработки реальных биополимеров и их смесей очень важно знать границы теплового и механического воздействий на них. Известно [14, 15], что при термоокислительной и гидролитической деструкциях воздействие на полимеры (биополимеры) начинается через неупорядоченные области. Зная температуры стеклования и денатурации, по данным калориметрии можно определить содержание неупорядоченных областей и тем самым уточнить границы устойчивости белков и полисахаридов по отношению к внешним воздействиям (температуре, давлению или напряжению) и их длительности.

Аддитивные схемы имеют очень высокую точность определения характерных температур (погрешность расчета для синтетических полимеров менее 5% по абсолютной шкале температур). В той связи они могут быть широко использованы для анализа смесей биополимеров (например, выявления различных примесей, вызывающих нежелательные отклонения характерных температур), для предварительной оценки физических свойств различных белковых систем (совместимости компонентов, вязкоупругих свойств и т.д.), а в случае, если имеются математические модели различных технологических процессов, могут быть введены в эти модели для автоматического управления процессами.

Автор благодарит А.Я. Машкевича за помощь в выполнении расчетов характерных температур на ЭВМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Marschall A.S., Petrie S.E.* // *J. Photograph. Sci.* 1980. V. 28. P. 128.
2. *Matveev Yu.I., Grinberg V.Ya., Sochava I.V., Tolstogusov V.B.* // *Food Hydrocolloids* (in press).
3. *Аскадский А.А., Матвеев Ю.И.* Химическое строение и физические свойства полимеров. М.: Химия, 1983.
4. *Матвеев Ю.И., Аскадский А.А.* // Высокомолек. соед. А. 1993. Т. 35. № 1. С. 63.
5. *Матвеев Ю.И., Аскадский А.А.* // Высокомолек. соед. Б. 1994. Т. 36. № 10. С. 1750.
6. *Shultz G.E., Schirmer R.H.* Principles of Protein Structure. New York; Heidelberg; Berlin: Springer-Verlag, 1979.
7. *Каплан И.Г.* Введение в теорию межмолекулярных взаимодействий. М.: Наука, 1982.
8. *Matveev Yu.I.* Food Macromolecules and Colloids. Oxford: Univ. Press, 1995. P. 552.
9. *Roles K.A., Wunderlich B.* // *Biopolymers*. 1991. V. 31. № 5. P. 477.
10. *Roles K.A., Xenopoulos A., Wunderlich B.* // *Biopolymers*. 1993. V. 33. P. 753.
11. *Lin Y.-H.* // *Macromolecules*. 1991. V. 24. № 19. P. 5346.
12. *Lee W.A., Knight G.J.* // *Brit. Polym. J.* 1970. V. 2. № 1/2. P. 73.
13. *Batzer H., Kreiblich U.* // *Polym. Bull.* 1981. V. 5. P. 585.
14. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. Химическая физика молекулярного разрушения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1988.
15. *Mouseev Ю.В., Зайков Г.Е.* Химическая стойкость полимеров в агрессивных средах. М.: Химия, 1979.
16. *Hoseney R.C., Zeleznak K., Lai C.S.* // *Cereal Chem.* 1986. V. 63. № 3. P. 285.
17. *Fujio Y.G., Lim J.-K.* // *Cereal Chem.* 1989. V. 66. № 4. P. 268.

**Determination of the Temperatures of the Transition
into the Viscoelastic State, Denaturation, and the Onset
of Intensive Destruction of Proteins with Various Structures**

Yu. I. Matveev

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 28, Moscow, 117813 Russia*

Abstract—The temperatures of the transition into the viscoelastic state, denaturation, and the onset of intensive destruction were calculated by additive schemes for 32 proteins. Contributions of strong interactions (dipole-dipole contacts and hydrogen bonds) into the partial contributions of the characteristic temperatures of amino acid residues (including the glass transition temperature) were refined. The calculated results agree with available experimental data.