

0722636-1

КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ



На правах рукописи

ЗИГАНШИН МАРАТ АХМЕДОВИЧ

**ТЕРМОДИНАМИКА СОРБЦИИ ПАРОВ
ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ТВЕРДЫМИ
БЕЛКАМИ**

02.00.04 – физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

КАЗАНЬ – 2001

Работа выполнена на кафедре физической химии Казанского государственного университета

Научные руководители: доктор химических наук,
профессор Б.Н. СОЛОМОНОВ
кандидат химических наук,
доцент В.В. ГОРБАЧУК

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор Н.А. БУЛЬЕНКОВ
кандидат физико-
математических наук старший
научный сотрудник ЗУЕВ Ю.Ф.

Ведущая организация: Институт органической и физической химии
им. А.Е. Арбузова Казанского научного
центра Российской академии наук

Защита состоится “ 7 ” июня 2001 г. в 14
часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.03 в Казанском
государственном университете (г. Казань, ул. Кремлевская, 18, НИХИ
им. А.М. Бутлерова, Бутлеровская аудитория).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им.
Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Отзыв на автореферат направлять по адресу: 420008, г. Казань, ул.
Кремлевская, 18, КГУ, научная часть.

Автореферат разослан “ ___ ” _____

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000115627

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук

И.В. Коновалова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Применение в биотехнологии ферментативных реакций и использование биосенсоров на основе антител в неводных средах сделало актуальным изучение межмолекулярных взаимодействий белок - органический растворитель. Данная проблема имеет и более общий характер, в связи с тем, что многие органические соединения способны быть не только растворителями для ферментативных реакций, но и выступать в качестве субстратов или ингибиторов различных ферментативных реакций, субстратов транспортных белков, связываться антителами в качестве антигенов. О межмолекулярных взаимодействиях в подобных системах судят в основном по кинетическим данным для ферментативных реакций в неводных средах, а также по рентгеноструктурным данным для кристаллов белков, насыщенных органическими растворителями. Сложность интерпретации имеющихся литературных данных о влиянии среды на кинетические параметры ферментативных реакций, а также термодинамические параметры взаимодействий белок – субстрат и белок – органический растворитель в суспензиях и в водных растворах обуславливает необходимость изучения термодинамики межмолекулярных взаимодействий в наиболее простых системах: твердый белок + парообразный сорбат. Для такого типа систем, к настоящему времени, имеется лишь ограниченное число данных (изотермы сорбции паров воды, азота, кислорода и некоторых других неполярных газов).

Цель работы. Настоящая работа посвящена выяснению критериев связывания белками летучих органических соединений, различающихся по групповому составу, размеру и форме молекул. Цель исследования состоит в изучении влияния особенностей молекулярной структуры твердых белков, влияния воды или второго органического компонента на селективность и прочность связывания паров органических соединений.

Научная новизна.

• Впервые определены изотермы сорбции твердыми белками паров органических соединений различных типов, применяемых в качестве растворителей в биотехнологии.

• Впервые охарактеризована фрактальность высушенных белков: сывороточного альбумина человека, коллагена из бычьих сухожилий, казеина из козьего молока и инвертазы из пекарских дрожжей по данным о сорбции алифатических спиртов, принадлежащих одному гомологическому ряду.

• Впервые изучено влияние третичной структуры белка, гидратации и второго органического компонента на характер молекуляр-

ного распознавания паров органических соединений для перечисленных выше белков.

• Впервые для твердого препарата белка (трипсина из поджелудочной железы свиньи) обнаружен гомотропный кооперативный эффект при связывании паров органических соединений. Для него впервые зафиксировано образование устойчивых соединений включения.

Практическая значимость работы. Полученные результаты представляются полезными для прогнозирования влияния неводных растворителей на свойства белков в биотехнологических процессах, осуществляемых в отсутствие или при низком содержании воды. Кроме того, полученные данные можно использовать в качестве основы для стандартизации белковых продуктов по их сорбционным свойствам.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы докладывались на Всероссийской конференции по теоретической химии (Казань, 1997 г.), на итоговой конференции КГУ (Казань, 1997 г.), на 1^{ой} Международной конференции по супрамолекулярной науке и технологии (Закопане, Польша, 1998 г.), на итоговой конференции КГУ (Казань, 1998 г.), на X симпозиуме по межмолекулярному взаимодействию и конформации молекул (Казань, 1999 г.), на итоговой конференции КГУ (Казань, 1999 г.), на международной конференции “Биокатализ-2000: основы и применение” (Москва, 2000 г.), на I Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета “Материалы и технологии XXI века” (Казань, 2000 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и тезисы 4 докладов.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста и содержит 52 рисунка и 17 таблиц. Диссертация состоит из введения, трех глав, выводов, списка литературы из 111 наименований и приложения.

В первой главе обсуждаются литературные данные, относящиеся к межмолекулярным взаимодействиям твердых белковых препаратов с органическими и некоторыми неорганическими соединениями из паровой фазы и из растворов. Кроме того, приводятся литературные данные о влиянии органических растворителей и воды на реакции ферментативного катализа. Анализируются современные модельные представления о сорбции на твердых белках. Во второй главе описаны экспериментальные методики и объекты исследования. В третьей главе обсуждаются полученные экспериментальные данные. Проводится анализ влияния размера, формы и группового

состава молекул органических соединений на их параметры сорбции высушенными белками различной природы. На примере фибриллярного коллагена и изученных глобулярных белков обсуждается влияние третичной структуры белка на его сорбционные свойства. Анализируется влияние воды и второго органического компонента в трехкомпонентных системах на сорбционные свойства изученных белков. Обсуждается гомотропный кооперативный эффект, обнаруженный для твердого трипсина, а также гетеротропные кооперативные эффекты воды и второго органического компонента, обнаруженные для тройных систем с участием твердых белков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты исследования и метод измерения.

В качестве объектов исследования были выбраны твердые глобулярные белки: сывороточный альбумин человека (САЧ) (“Reanal”) и приобретенные в “Sigma” инвертаза из пекарских дрожжей, казеин из козьего молока, трипсин из поджелудочной железы свиньи, а также фибриллярный коллаген из бычьих сухожилий, которые различаются по своему функциональному назначению. Белковые препараты использовались “как есть” без дальнейшей очистки.

Для САЧ был проведен анализ содержания в нем жирных кислот. С этой целью образец альбумина экстрагировали в смеси хлороформ – метанол (2:1), экстракт промывали водой, обрабатывали диазометаном в диэтиловом эфире и растворяли в гексане. Содержание жирных кислот (C₁₂-C₂₂) в сывороточном альбумине человека, определенное газожидкостной хроматографией составило 0.18 % по весу.

В роли сорбатов использовались органические соединения, отличающиеся размером, формой и групповым составом молекул. Все органические растворители имели чистоту > 99 % и были осушены по стандартной методике перед экспериментом.

В настоящей работе при помощи статического метода парового газохроматографического анализа были изучены двухкомпонентные (твердый белок + пары органического компонента) и трехкомпонентные (твердый белок + пары органического компонента + пары воды или второго органического компонента) системы.

Преимуществами используемого метода является его высокая чувствительность и селективность, а также возможность изучения систем, где сорбционное равновесие устанавливается достаточно медленно. Время термостатирования образцов при 298 К составляло 72 часа для легкокипящих веществ (с давлением насыщенного пара

$P_0 > 5$ кПа), 3-5 дней для веществ с $P_0 > 1$ кПа и до 7-10 дней для высококипящих соединений ($P_0 < 1$ кПа). Активность сорбата определялась как отношение высоты хроматографического пика для паровой фазы над белком к высоте пика над чистым растворителем.

Содержание воды на белке определялось методом термогравиметрии по убыли веса препарата при температуре 298 К и давлении 0.1 Па на микротермоанализаторе MGDТD-17S (Setaram). Погрешность определения влажности белкового препарата составляла 0.002 г H_2O / г белка (0.002 h).

Соответствие полученных сорбционных данных равновесным условиям подтверждается результатами оценки кинетики сорбции для каждого из изученных белков, а также данными об отсутствии существенного гистерезиса сорбции-десорбции для белкового препарата (коллагена) с наибольшим сорбционным сродством к изученным органическим сорбатам.

2. Влияние структуры белка и сорбата на параметры изотерм сорбции паров органических соединений.

Полученные изотермы сорбции для высушенных белков представляют собой зависимость состава твердой белковой фазы (V_s , мкл/г) от термодинамической активности сорбата (P/P_0) при нормальных условиях, рис. 1.

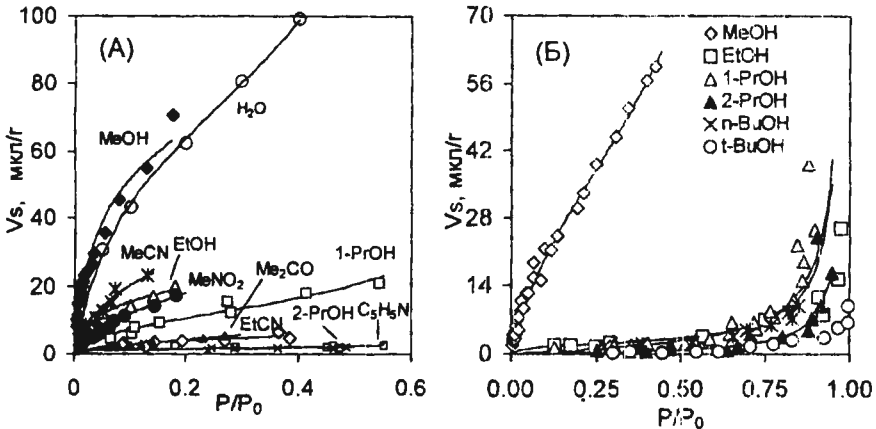


Рис. 1. Изотермы сорбции паров органических соединений на САЧ 0.01 h (А), инвертазе 0.01 h (Б), ($1h = 1g H_2O / 1g$ белка).

Отличительной особенностью процесса сорбции на осушенных белках является их высокая селективность к размеру моно

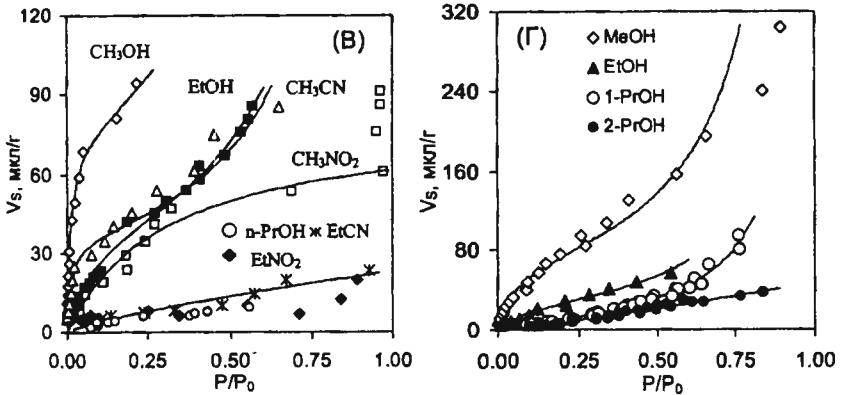


Рис. 1. (продолжение) Изотермы сорбции паров органических соединений на казеине 0.05 h (B) и коллагене 0.04 h (Г).

функциональных органических соединений. Как видно из графиков, для всех изученных белков наблюдается значительная сорбция метанола близкая к той, что получена в литературе для воды (рис. 1А). При переходе к сорбатам с большим размером молекул, для глобулярных альбумина, казеина и инвертазы наблюдается уменьшение сорбции органических соединений, поэтому эти белки практически не связывают другие монофункциональные соединения или углеводороды с мольной рефракцией (MR_D) больше $20 \text{ cm}^3/\text{моль}$ без значительной гидратации.

Фибриллярный коллаген проявляет рецепторные свойства не только к малым монофункциональным молекулам, но и к соединениям с относительно крупным размером молекул (табл. 1).

Кроме того, было обнаружено, что изученные белки проявляют селективность к форме молекулы сорбата, лучше связывая 1-пропанол, чем 2-пропанол (рис. 1).

На графике зависимости логарифма величины начального наклона изотермы сорбции от мольной рефракции органических сорбатов (рис. 2) видно, что для глобулярных белков имеет место падение сорбционного сродства белка с увеличением молекулярных размеров сорбатов.

Для фибриллярного коллагена же сродство белка к сорбату с ростом его молекулярных размеров сначала падает, а затем после достижения минимума при мольной рефракции $22 \text{ cm}^3/\text{моль}$ начинает расти. Особые сорбционные свойства коллагена, по-видимому, объясняются его особым аминокислотным составом. Коллаген содержит большое количество остатков 4-гидроксипролина, которые в

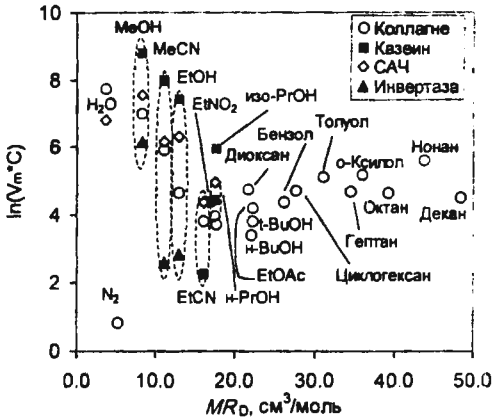


Рис. 2. Зависимость логарифма величины начального наклона изотермы сорбции $\ln(V_m \cdot C)$ от мольной рефракции MR_D органического сорбата.

структурном плане возможно способны частично заменять воду, активируя сорбцию гидрофобных молекул.

Высокая селективность изученных белков к размеру молекул сорбатов показывает, что сорбция органических соединений идет не на поверхности раздела фаз твердый белок – газ, а в объеме твердой фазы.

Аналогичное заключение может быть сделано при анализе эффективной фрактальности поверхности белка. В ряду сорбатов с близкой природой, количество молей адсорбированного субстрата n связано с площадью, занимаемой одной молекулой σ , соотношением: $n \sim \sigma^{-D/2}$, где D – фрактальная размерность поверхности. Отсюда следует ожидать, что эффективная фрактальность D поверхности сорбента может быть рассчитана по зависимости эффективного объема “монослоя” (БЭТ) V_m от молярного объема сорбата V_M для гомологического ряда сорбатов: $V_m \sim V_M^{1-D/3}$. При расчете эффективной фрактальности по параметру V_m для изотерм сорбции ряда алифатических спиртов (метанол, этанол, 1-пропанол, 1-бутанол) были получены следующие значения: для САЧ, коллагена, казеина и инвертазы 11.9, 7.2, 15.7, 12.9, соответственно. Полученные величины D существенно больше 3 – максимально возможного значения фрактальности для сорбции на фиксированной поверхности, существующей до контакта с сорбатом.

Подобное заключение о том, что сорбция происходит в объеме твердой фазы белка, было сделано другими авторами при изучении сорбции воды на коллагене и кератине и при рентгеноструктурном анализе шитых кристаллов ферментов, промытых “сухими” органическими растворителями.

Табл. 1. Термодинамические параметры сорбции паров органических соединений твердыми белками, при 298 К.^a

| Сорбат | Коллаген | | | Казеин | | САЧ | | Инвертаза | |
|-------------------------------|-------------------------------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|------------------|------|
| | MR_{D_2} см ³ /моль | V_m мкл/г | C | V_m мкл/г | C | V_m мкл/г | C | V_m мкл/г | C |
| H ₂ O ^b | 3.7 | 96.0 | 23.6 | | | 66 | 14.0 | | |
| N ₂ ^c | 5.2 | 0.8 | 3.0 | | | | | | |
| 1 MeOH | 8.3 | 76.7 | 14.4 | 74.8 | 89.0 | 60.0 | 32.0 | 30.6 | 15.6 |
| 2 MeCN | 11.1 | 31.6 | 11.7 | 35.0 | 82.8 | 28.0 | 16.8 | 9.4 | 1.4 |
| 3 EtOH | 12.9 | 90.9 | 1.1 | 38.9 | 27.5 | 17.7 | 31.3 | 1.6 | 10.5 |
| 4 EtCN | 16.0 | 17.1 | 2.6 | 6.4 | 17.5 | 3.6 | 22.0 | 0.2 ^f | |
| 5 EtNO ₂ | 17.1 | 29.8 | 2.7 | d | d | d | d | 0.4 ^f | |
| 6 1-PrOH | 17.5 | 22.3 | 2.3 | 4.6 | 18.2 | 11.1 | 12.9 | 1.2 ^f | |
| 7 2-PrOH | 17.6 | 13.3 | 3.1 | g | | 1.1 | | 0.4 ^f | |
| 8 Диоксан | 21.7 | 41.4 | 2.7 | | | | | 0.4 ^f | |
| 9 n-BuOH | 22.1 | 28.4 | 1.1 | | | | | 1.2 ^f | |
| 10 t-BuOH | 22.2 | 18.8 | 2.4 | | | | | 0.2 ^f | |
| 11 EtOAc | 22.2 | 51.1 | 1.3 | | | | | | |
| 12 Бензол | 26.2 | 89.9 | 0.9 | | | | | | |
| 13 Цикло- гексан | 27.7 | 59.4 | 1.8 | | | | | | |
| 14 Толуол | 31.1 | 71.0 | 2.4 | | | | | | |
| 15 Гептан | 34.5 | 42.4 | 2.5 | | | | | | |
| 16 о-Ксилол | 35.9 | 70.1 | 2.5 | | | | | | |
| 17 Октан | 39.2 | 41.7 | 2.5 | | | | | | |
| 18 Нонан | 43.8 | 65.0 | 4.2 | | | | | | |
| 19 Декан | 48.4 | 29.4 | 3.1 | | | | | | |

^a – параметры (V_m – эффективный объем монослоя и C – эффективная константа сорбции²) получены с помощью уравнения БЭТ; ^b, ^c – литературные данные; для N₂ были получены при 77.4 К; ^d – параметры не определены из-за низкой сорбции; ^e – параметры получены с помощью уравнения Лэнгмюра; ^f – C не определена, V_m был рассчитан при условии $C = \infty$; ^g сорбция не превышает 2 мкл/г.

3. Клатратообразование в системе: твердый белок – органический компонент.

Полученные изотермы сорбции паров органических соединений на твердом препарате трипсина существенно отличаются по форме от изотерм сорбции, полученных для других белков. Изотермы сорбции паров изученных сорбатов имеют порог связывания по активности сорбата и, в ряде случаев, - участок насыщения белкового препарата (рис.3). Известно, что подобный сигмоидальный вид

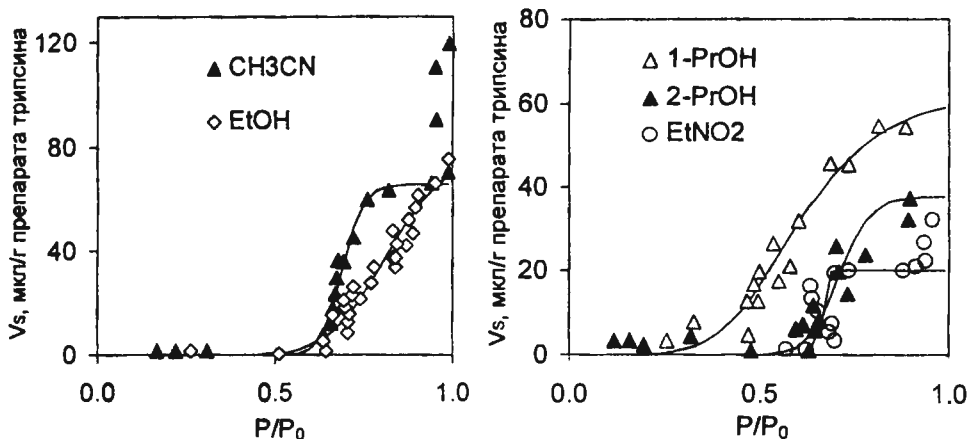


Рис. 3. Изотермы сорбции паров органических соединений на препарате трипсина 0.05 h, при 298 K.

изотерм сорбции свидетельствует о наличии кооперативного перехода в системе. Ранее сигмоидальные изотермы сорбции органических соединений на твердых белках не наблюдались. Особенностью изученного препарата трипсина является наличие в нем лактозы, которая в чистом виде изученные сорбаты не связывает. Лактоза, как и некоторые другие сахара, согласно литературным данным, способна стабилизировать вторичную структуру белка при лиофилизации.

Вид полученных изотерм сорбции органических соединений на изученном препарате трипсина позволяет выбрать термодинамический механизм процесса сорбции. Наличие участков насыщения на изотермах сорбции свидетельствует об образовании устойчивых соединений включения (клатратов) с парами органических растворителей. Кооперативный переход, наблюдаемый выше пороговой активности сорбата, согласно правилу фаз Гиббса может быть фазовым переходом между фазой исходного препарата трипсина, не содержащего сорбат, и кристаллической фазой клатрата. Полученные сигмоидальные изотермы сорбции были аппроксимированы с помощью уравнения Хилла:

$$YS = \frac{SC\left(\frac{P}{P_0}\right)^N}{1 + C\left(\frac{P}{P_0}\right)^N} \quad (\text{урав. 1})$$

В табл. 2 приведены полученные аппроксимационные параметры: значения пороговой активности (a_{thr}), состава насыщенного соединения включения (S , мкл сорбата / г белка), параметра кооперативности или константы Хилла (N) и величины, представляющей собой отношение логарифма константы сорбции к константе Хилла, $(\ln C)/N$. Стоит отметить, что максимальная величина кооперативности для процесса связывания кислорода твердым гемоглобином, описанного в литературе равна 1.5. Величина a_{thr} была взята как активность сорбата, рассчитанная по уравнению Хилла (урав. 1) при составе твердой фазы равной $0.25 \cdot S$. Использование параметра $(\ln C)/N$ обусловлено значительно меньшей зависимостью его от ошибок эксперимента, чем для величин C и N . Ошибка определения

Табл. 2. Параметры изотерм сорбции паров органических соединений на твердом препарате трипсина (0.05 h), при 298 К.^a

| Сорбат | a_{thr} | S , мкл/г | N | $(\ln C)/N$ | δ^b | ΔG_C^c | ΔG_{trans}^c |
|--------------------|-----------|----------------|----------------|-------------|------------|----------------|----------------------|
| | | | | | | кДж/моль | кДж/моль |
| CH ₃ CN | 0.66 | 65.2 | 25 | 0.37 | 0.01 | -0.92 | -4.5 |
| EtOH | 0.76 | 77.9 | 9.6 | 0.19 | 0.03 | -0.46 | -7.5 |
| EtCN | 0.70 | 35.2 | $3 \cdot 10^2$ | 0.34 | 0.06 | -0.84 | -3.5 |
| EtNO ₂ | 0.67 | 19.9 | 10^5 | 0.42 | 0.04 | -1.03 | -3.1 |
| 1-PrOH | 0.50 | 62.9 | 5.6 | 0.50 | 0.04 | -1.24 | -8.1 |
| 2-PrOH | 0.66 | 37.7 | 11 | 0.31 | 0.06 | -0.76 | -7.1 |

^a – ошибка определения a_{thr} и S составила 5 %; ^b δ стандартное отклонение изотерм сорбции, аппроксимированных уравнением Хилла; δ была рассчитана при активности сорбата в интервале 0-0.95 для этанола и в интервале 0-0.90 для остальных сорбатов; ^c – ошибка определения ΔG_C и ΔG_{trans} составила 0.15 и 0.4 кДж/моль, соответственно.

$(\ln C)/N$ для изученных систем составляла ± 0.07 . Константа кооперативности - N и константа сорбции C определялись с большей экспериментальной ошибкой, особенно для тех изотерм, форма которых более вертикальна вблизи порогового значения активности сорбата. Анализ экспериментальных данных показал, что состав насыщенного соединения включения S клатратов больше для малых молекул и уменьшается с ростом молекулярных размеров сорбата. Константы Хилла N для спиртов значительно меньше, чем для соединений, не содержащих гидроксильные группы. Возможно, это обусловлено двойственным поведением алифатических спиртов: (1) структурообразующая роль спиртов аналогична воде; (2) спирты способны выступать в качестве субстратов при клатратообразовании. Насыщение изотерм сорбции позволяет рассчитать свободную энергию клатра-

тообразования путем интегрирования изотерм сорбции по степени насыщения клатрата. Если изотерма сорбции аппроксимируется по уравнению Хилла, то свободная энергия клатратообразования или включения ΔG_C может быть представлена как функция параметров уравнения Хилла:

$$\Delta G_C = RT \int_0^1 \ln(P/P_0) dY = -RT(\ln C)/N$$

Свободная энергия клатратообразования соответствует свободной энергии переноса 1 моля сорбата из состояния чистой жидкости в насыщенный твердый клатрат с трипсином. Поскольку межмолекулярные взаимодействия в чистой жидкости для молекул с разными функциональными группами не эквивалентны, более удобно использовать в качестве стандартного состояния бесконечно разбавленный раствор сорбата в подходящем растворителе. В качестве стандартного растворителя был выбран толуол. Свободная энергия переноса сорбата из бесконечно разбавленного раствора в толуоле в твердый насыщенный клатрат ΔG_{trans} была рассчитана по уравнению:

$$\Delta G_{trans} = \Delta G_C - RT \ln \gamma^\infty$$

где γ^∞ коэффициент активности изученного сорбата в толуоле. Значения ΔG_{trans} приведены в табл. 2. Величины ΔG_{trans} характеризуют особенности межмолекулярных взаимодействий в твердой фазе препарата трипсина по сравнению с взаимодействиями в стандартном растворителе. Анализ полученных величин ΔG_{trans} (табл. 2) показывает, что препарат трипсина лучше связывает изученные протонодонорные сорбаты (алифатические спирты), чем апротонные соединения (нитроэтан, ацетонитрил и пропионитрил).

Полученные величины свободной энергии включения растворителя (ΔG_C), рассчитанные на моль сорбата, слишком малы для существенного ингибирования активности фермента по механизму замещения ("пинг-понг"). Высокая кооперативность процесса связывания молекул растворителя, дает возможность предположить, что наряду с гомотропным кооперативным эффектом возможно и гетеротропное кооперативное влияние растворителя на взаимодействия белка с субстратом. Этот эффект может осуществляться в виде аллостерического влияния молекул растворителя, находящихся вне активного центра.

4. Влияние воды на сорбционную способность твердых белков в тройных системах: белок + вода + органический компонент.

Для изучения влияния воды на сорбцию белками органических соединений нами были изучены тройные системы: твердый белок + вода + органический растворитель. Изотермы сорбции, полученные для тройных систем, представлены как зависимости сорбционного сродства белка к сорбату ($V_s/(P/P_0)$, мкл/г) от гидратации белкового препарата (h , г H_2O / г белка) (рис. 4, 5).

В изученных тройных системах органический компонент добавлялся в количестве 6 об. % от количества воды. Выбор концентрации органического соединения был обусловлен, необходимостью уменьшить его влияние на сорбцию воды с одной стороны, и необходимостью получения относительно больших активностей органического компонента с другой. Было обнаружено, что размер молекулы сорбата является существенным фактором, от которого зависит, каким образом гидратация оказывает влияние на сорбцию органического соединения. Так сорбционная способность (величина сорбции на грамм белка, приведенная к единичной активности сорбата, $V_s/(P/P_0)$, мкл/г) альбумина, казеина и коллагена к ацетонитрилу и этанолу, имеющих относительно малый размер молекулы, уменьшается с ростом гидратации белка (рис. 4А, 4Б).

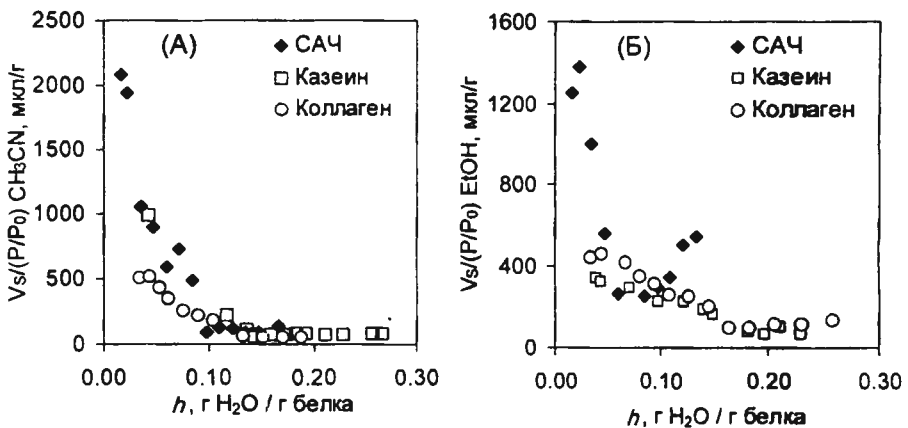


Рис. 4. Изотермы сорбции паров CH_3CN (А), $EtOH$ (Б) на твердых белках из смеси 6 об. % органического компонента + 94 об. % воды, при 298 К.

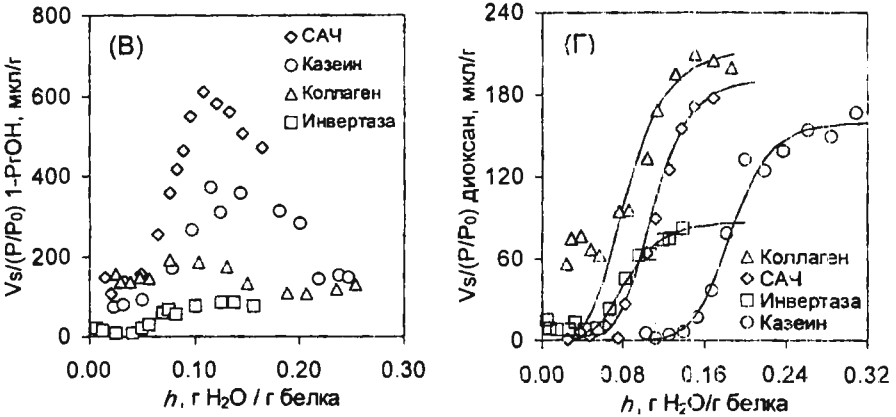


Рис. 4 (продолжение). Изотермы сорбции паров 1-PrOH (B) и диоксана (Г) на твердых белках из смеси б об. % органического компонента + 94 об. % воды, при 298 К.

Подобное влияние гидратации наблюдается для всех сорбентов с фиксированной поверхностью. В данном случае имеет место конкуренция воды и сорбата за места связывания. Для молекул с большим числом метиленовых групп, например для нормального пропанола, влияние гидратации белка проявляется в другой форме (рис. 4B). Для него сорбционное сродство альбумина, казеина, коллагена и инвертазы увеличивается, начиная с определенной величины гидратации, достигая максимального значения, и уменьшается при последующем увлажнении белка. Сорбционное сродство к гидрофобным соединениям с относительно крупными молекулами, которые не связываются осушенными альбуминсом, инвертазой и казеином, кооперативно увеличивается с увлажнением белка и достигает насыщения при высоких значениях гидратации (рис. 4Г, 5).

Для бензола сорбционное сродство альбумина в области насыщения примерно равно величине, полученной другими авторами для раствора альбумина в воде (рис. 5). Для коллагена, имеющего высокое сорбционное сродство к углеводородам при малом содержании воды, гидратация не оказывает существенного влияния (рис. 5).

Возможным объяснением наблюдаемых экспериментальных фактов является образование клатратов: белок + вода + органический компонент, в изученных системах. Влияние гидратации на сорбционное сродство изученных белков к нейтральным органическим соединениям имеет тот же характер, что и влияние гидратации

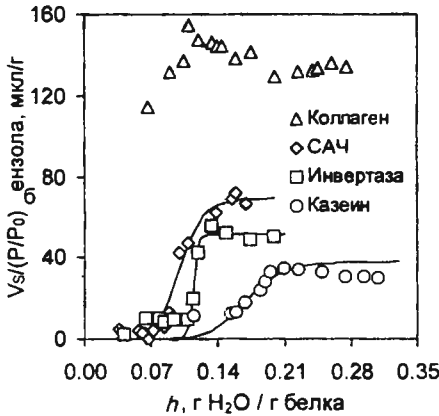


Рис. 5. Изотермы сорбции паров бензола на твердых белках из смеси 6 об. % органического компонента + 94 об. % воды, при 298 К.

на скорость ферментативных реакций в газофазных и твердофазных реакторах, а также в неводных растворителях, описанное в литературе. Похожая форма влияния гидратации в обоих случаях предполагает одинаковый механизм межмолекулярных взаимодействий в твердой фазе между белком и связанным растворителем с одной стороны и ферментом и субстратом с другой.

В литературе существуют модельные представления и экспериментальные наблюдения клатратообразования методом РСА. Наши данные являются первым экспериментальным термодинамическим подтверждением представлений о кооперативном образовании клатратов при взаимодействии влажных белков с органическими соединениями.

5. Влияние “водоподобных” органических соединений на сорбционную способность твердого САЧ.

В литературе приводятся данные о способности органических растворителей частично заменять воду в процессах ферментативного катализа и оказывать влияние на селективность реакции.

В настоящей работе было изучено влияние “водоподобных” растворителей: протондонорного этанола и протонакцепторного ацетонитрила, способных связываться осушенным белком, на сорбцию крупных гидрофобных органических растворителей, не сорбирующихся белком при низком содержании воды (рис. 6, 7).

Было обнаружено, что имеет место не только кооперативное увеличение сорбции относительно крупных гидрофобных молекул таких как бензол и диоксан в присутствии этанола и ацетонитрила (рис. 6). Но и для малых молекул наблюдается двукратное увеличение сорбции в присутствии незначительного количества бензола и

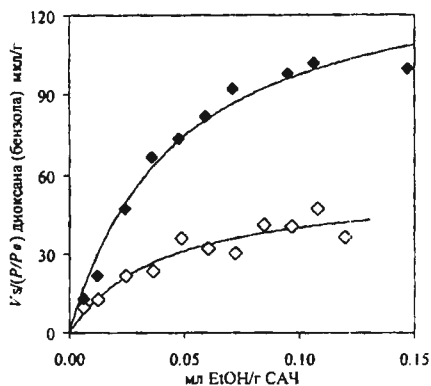


Рис. 6. Изотермы сорбции паров диоксана и бензола на твердом САЧ (0.0) 1 h из смеси 6 об. % диоксана + 94 об. % этанола, 4 об. % бензола + 96 об. % этанола, при 298 К.

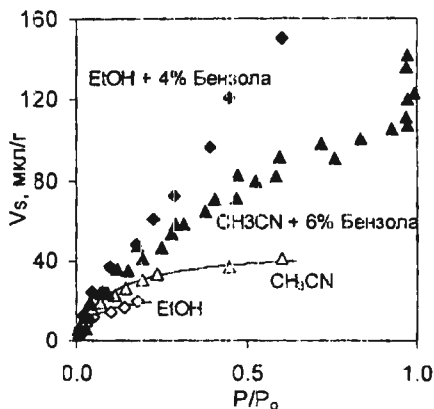


Рис. 7. Изотермы сорбции паров EtOH и CH_3CN на САЧ (0.01 h) в отсутствие и в присутствии бензола, при 298 К.

диоксана (рис. 7), по сравнению с сорбцией на осушенном белке в отсутствие второго органического компонента. Аналогичное влияние органического компонента (диоксан, бутанол-1, пропанол-1) на сорбцию воды сывороточным альбумином человека было обнаружено другими авторами при изучении суспензий САЧ в водно-органических смесях.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Анализ эффективной фрактальной размерности поверхности изученных белков по полученным данным об изотермах сорбции гомологического ряда алифатических спиртов дает основание полагать, что сорбция изученных органических соединений происходит в объем твердой фазы белка.
2. Впервые для твердого препарата белка (трипсина) обнаружен гомотропный кооперативный эффект при связывании паров органических соединений. В этих системах зафиксировано образование устойчивых соединений включения.
3. Показано, что форма изотерм сорбции в системах: твердый белок + вода + органический сорбат, существенно зависит от размера молекулы сорбата.

4. С ростом гидратации изученных белков наблюдается кооперативное повышение сорбционного сродства глобулярных белков к парам относительно гидрофобных органических соединений (1-пропанол, 2-пропанол, этилацетат, диоксан и бензол), что позволило сделать вывод об образовании клатратов "твердый белок + вода + органический сорбат" в изученных системах.

5. С ростом молекулярных размеров сорбатов имеет место падение сорбции на глобулярных белках (альбумине, инвертазе, казеине и трипсине). Для фибриллярного коллагена эта зависимость имеет более сложную нелинейную форму.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ ИЗЛОЖЕНЫ В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ:

- 1 Gorbatchuk V.V., Ziganshin M.A., Solomonov B.N., and Borisover M.D. Vapor sorption of organic compounds on human serum albumin // *J. Phys. Org. Chem.* – 1997. – V.10. – P.901-907.
- 2 Gorbatchuk V.V., Ziganshin M.A., Solomonov B.N. Supramolecular interactions of solid human serum albumin with binary mixtures of solvent vapors // *B.oph. Chem.* – 1999. – V.81. – P.107-123.
- 3 Gorbatchuk V.V., Ziganshin M.A., Mironov N.A., Solomonov B.N. Homotropic cooperative binding of organic solvent vapors by solid trypsin // *Biochim. Biophys. Acta* – 2001. – V.1545. – P.326-338.
- 4 Горбачук В.В., Зиганшин М.А., Соломонов Б.Н. Влияние влажности на способность твердого человеческого сывороточного альбумина к селективному связыванию паров органических соединений // Всероссийская конференция по теоретической химии: тез. докл. – Казань, 6-9 октября 1997. – С.52.
- 5 Gorbatchuk V.V., Ziganshin M.A., Solomonov B.N. Supramolecular interactions of human serum albumin with volatile of organic substances // 1st Международная конференция по супрамолекулярной науке и технологии: тез. докл. – Закопане, Польша, 27 сентября – 3 октября 1998. – С.196.
- 6 Gorbatchuk V.V., Ziganshin M.A., Mironov N.A., Solomonov B.N. Thermodynamics of enzyme-organic solvent interaction in solid phase // Международная конференция "Биокатализ-2000: основы и применение": тез. докл. – Москва, 10 – 15 июня 2000. – С.28.
- 7 Зиганшин М.А., Горбачук В.В., Миронов Н.А., Соломонов Б.Н. Супрамолекулярные свойства твердых белковых препаратов // I Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века": тез. докл. – Казань, 20-21 октября 2000. – С.107-108.



Издательство «Экоцентр»
Лицензия Минпечати РТ № 0307 от 8.06.2000
Без объявления – 2001

Отпечатано с готового оригинал-макета. Печать RISO
Бумага офсет № 1. Формат 60*84 1/16
Объем 1,1 п.л. Тираж 100 экз. Заказ АР-5

Отпечатано на полиграфическом участке издательства «Экоцентр»
г. Казань, ул. К. Маркса, 10

