

ХИМИЯ

В. А. ВИЛЕНСКИЙ и А. Я. КОРОЛЕВ

**СОЛЬВАТАЦИЯ БЕЛКОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ СЛАБЫХ КИСЛОТ
И ОСНОВАНИЙ**

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАЗЕИНА С ВОДНЫМИ РАСТВОРАМИ УКСУСНОЙ, МОЛОЧНОЙ И ЛИМОННОЙ КИСЛОТ

(Представлено академиком Н. Д. Зелинским 10 V 1939)

подавляющее большинство работ, посвященных исследованию сольватации белков, касается того частного случая явления сольватации, когда растворителем служит вода (гидратация) (1). Интересный и важный вопрос о взаимодействии белков с другими растворителями изучен пока очень скудно.

Виленский и Павлова (2), изучая растворимость фенола, анилина и т. п. веществ в зольях казеина, нашли, что указанные вещества способны наряду с водой принимать участие в сольватации казеина. Это обстоятельство дало повод предполагать, что в водных растворах слабых органических кислот и оснований взаимодействие белков с последними не ограничивается одним солеобразованием, как это принималось до последнего времени, а имеет своим следствием связывание молекул слабого электролита.

В отношении уксусной кислоты, пиридина и т. п. веществ известны факты, косвенно подтверждающие высказанное предположение. Так например, Киари (3) наблюдал увеличенное набухание желатины в растворах уксусной кислоты, пиридина и других органических веществ по сравнению с растворами HCl и NaOH, если сравнение проводилось при одинаковых активностях H⁺-ионов. Объясняя этот факт для случая уксусной кислоты, Леб (4) считает, что причиной явления служит понижение сил сцепления между частицами геля под влиянием присутствующей в большом количестве недиссоциированной органической кислоты. Кюнцель (5) высказал мысль о том, что это уменьшение сил сцепления может быть обусловлено связыванием молекул кислоты белком.

Целью настоящей работы являлось изучение взаимодействия казеина с бинарными растворителями вода—органическая кислота. При этом мы имели в виду найти экспериментальное доказательство двух типов связывания органических кислот казеином: обычного химического связывания кислоты (образование белковой соли) и сорбции молекул органической кислоты, которая представляет повидимому процесс сольватации протеина.

Методом исследования был избран равновесный диализ (6). Внутрь ячейки загружался золь казеина, а снаружи находился раствор органической кислоты, употреблявшийся для растворения казеина. Исходная

аналитическая концентрация кислоты равнялась C_0 . В процессе установления диализационного равновесия часть кислоты из наружной жидкости мигрировала в белковый золь вследствие поглощения ее казеином. При этом происходило уменьшение аналитической концентрации кислоты в наружной жидкости ΔC , которое определялось нами с помощью интерферометра Цейсса. Этот эффект мог быть обусловлен, во-первых, взаимодействием H^+ -ионов кислоты с основными группами протеина (образование белковой соли); эту часть ΔC обозначим через ΔC_S . Во-вторых, изменение концентрации кислоты в наружной жидкости в сторону ее уменьшения могло быть также результатом молекулярного связывания кислоты. Допустим, что этот тип связывания вызвал уменьшение концентрации кислоты, равное ΔC_M . Тогда

$$\Delta C = \Delta C_S + \Delta C_M. \quad (1)$$

Так как целью работы являлось в конце концов обнаружение и количественное определение молекулярного связывания органических кислот казеином, выведем выражение для этого типа связывания.

Из уравнения (1)

$$\Delta C_M = \Delta C - \Delta C_S. \quad (2)$$

Для определения ΔC_M необходимо знать уменьшение концентрации кислоты в наружной жидкости, вызванное солеобразным связыванием ее белком ΔC_S . Эту величину можно определить следующим образом. Измерение активностей H^+ -ионов по обе стороны мембраны после диализа дает возможность рассчитать величины концентраций анионов кислоты в золе и в наружной жидкости C_A^I и C_A^{II} . Согласно закону мембранного равновесия

$$a_A^I = \frac{a_H^{II} a_A^{II}}{a_H^I}, \quad (3)$$

где a_H^I и a_A^I — активности H^+ -ионов и анионов кислоты внутри мембраны, а a_H^{II} и a_A^{II} — снаружи.

Если допустить (7), что коэффициент активности обоих ионов во внешней жидкости одинаков, то

$$a_A^I = \frac{(a_H^{II})^2}{a_H^I}. \quad (4)$$

Принимая вместе с другими авторами коэффициент активности H^+ -ионов в белковом золе равным коэффициенту активности в наружной жидкости, мы можем в последнем уравнении от активностей перейти к концентрациям:

$$C_A^I = \frac{(a_H^{II})^2}{a_H^I f_H}. \quad (5)$$

Соответственно

$$C_A^{II} = \frac{a_H^{II}}{f_H}. \quad (6)$$

Зная концентрации анионов кислоты в золе и во внешней жидкости C_A^I и C_A^{II} и объемы раствора кислоты, взятого для растворения белка и помещенного снаружи мембраны, v_1 и v_2 , можно написать выражение для той части изменения концентрации кислоты в наружной жидкости,

которая обусловлена солеобразным связыванием и доннановским распределением, т. е. для ΔC_S :

$$\Delta C_S = \frac{C_A^I v_1 - C_A^{II} v_2}{v_1 + v_2}. \quad (7)$$

Подставляя выражение для ΔC_S из (7) в (2), получаем значение величины ΔC_M

$$\Delta C_M = \Delta C - \frac{C_A^I v_1 - C_A^{II} v_2}{v_1 + v_2}. \quad (8)$$

Молекулярная сорбция органической кислоты белком M в мол/г очевидно равна:

$$M = \frac{\Delta C_M (v_1 + v_2)}{g v_2}, \quad (9)$$

где g —концентрация белка в г/л.

Вычисления молекулярной сорбции кислоты казеином производились по уравнению (9).

В качестве объекта исследования употреблялся воздушно-сухой казеин, приготовленный по методу Гаммарстена. Опыты по равновесному диализу ставились с уксусной, молочной и лимонной кислотами. Перед опытом диализационные ячейки, сделанные из коллодия, приводились в равновесие с раствором кислоты данной концентрации, для чего они оставались в растворе кислоты на 3 суток в закрытом сосуде. Затем часть этого раствора кислоты употреблялась для растворения в ней казеина, а другая часть была использована в качестве наружной жидкости. Объемы золь и внешней жидкости в опытах с диализом были равны друг другу (8).

Следует заметить, что происходящая одновременно гидратация белка снижает измеряемый на интерферометре эффект изменения концентрации кислоты ΔC , вследствие чего вычисленные величины несколько преуменьшены по сравнению с истинными значениями сорбции органической кислоты в виде недиссоциированных молекул.

В таблице даны основные результаты опытов по равновесному диализу казеиновых золь в водных растворах уксусной, молочной и лимонной кислот. Помимо величин M даются также вычисленные значения истинного связывания кислоты белком S , сопровождающегося образованием белковой соли.

$$g = 38.8 \text{ г/л}; \quad v_1 = 4.84 \text{ см}^3; \quad v_2 = 5 \text{ см}^3$$

Кислота	Концентрация к-ты C_0	ΔC м/л	a_H^I м/л	a_H^{II} м/л	f_H	C_A^I м/л	C_A^{II} м/л	ΔC_S м/л	ΔC_M м/л	M м/г 10^3	S м/г 10^2
Уксусная	1.00	0.0127	0.0013	0.0038	0.931	0.0119	0.0041	0.00377	0.00893	0.45	0.27
»	2.00	0.0204	0.0020	0.0065	0.91	0.0232	0.0071	0.00779	0.0126	0.64	0.54
Молочная	0.25	0.0134	0.0032	0.0060	0.912	0.0123	0.0066	0.0027	0.0107	0.54	0.23
»	0.50	0.0187	0.0049	0.0087	0.896	0.0172	0.0097	0.00352	0.0152	0.77	0.30
»	0.90	0.0210	0.0062	0.0107	0.875	0.0211	0.0122	0.00416	0.0168	0.85	0.36
Лимонная	0.15	0.0113	0.0066	0.0102	0.885	0.0178	0.0115	0.0029	0.0084	0.42	0.27
»	0.52	0.0144	0.0129	0.0204	0.846	0.0381	0.0241	0.00648	0.0079	0.40	0.59

Из приведенного экспериментального материала видно, что слабые органические кислоты действительно связываются казеином двояко: во-первых, происходит обычное химическое связывание кислоты свободными NH_2 -группами белка (солеобразное связывание); во-вторых, имеет место

поглощение изученных кислот казеином, не связанное с образованием соли протеина. Этот тип сорбции органических кислот белком ранее не принимался во внимание.

Механизм подобного связывания кислоты в настоящее время не может считаться окончательно выясненным. По нашему мнению, в данном случае происходит сорбция недиссоциированных молекул органических кислот казеином. Эта сорбция находится по видимому в связи с явлением большего набухания и лучшей растворимости ряда протеинов в водных растворах слабых органических кислот по сравнению с растворами минеральных кислот, если сравнение проводится при одинаковой активной концентрации H^+ -ионов.

В принципе верное заключение Леба (4) об ослаблении сил сцепления в геле при действии на него слабодиссоциированных кислот нашло себе в настоящем исследовании экспериментальное подтверждение. Пептизирующее влияние слабых кислот заключается в том, что частицы протеина наряду со связыванием H^+ -ионов сорбируют недиссоциированные молекулы кислоты, что и вызывает более интенсивное набухание, а при известных концентрациях кислоты—растворение протеина.

Связывание недиссоциированных молекул уксусной, молочной и лимонной кислот казеином мы рассматриваем, как сольватацию нашего белка органическими кислотами. В пользу этой точки зрения говорят различные факты. Так например, известна способность ледяной уксусной кислоты растворять, а следовательно и сольватировать казеин. Последний растворим также в высококонцентрированной молочной кислоте (98%). Об этом же свидетельствует лучшая растворимость казеина в водных растворах слабых органических кислот по сравнению с сильными минеральными.

Лаборатория коллоидной химии Химсектора
Всесоюзного института экспериментальной медицины.
Москва.

Поступило
15 V 1939.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Паули и Валько, Коллоидная химия белковых веществ (1936).
² Виленский и Павлова, Koll. Zeit., **76**, 188 (1936). ³ Chiari, Biochem. Zeit., **33**, 167 (1911). ⁴ Леб, Белки и теория коллоидных явлений (1933). ⁵ A. Kuntzel, Biochem. Zeit., **209**, 326 (1929). ⁶ Osborne, Journ. of Physiol., **34**, 84 (1906); Polanyi, Biochem. Zeit., **104**, 237 (1920); Ausberger, Erg. der Physiol., **24**, 618 (1925). ⁷ Ronau-Weber, Biochem. Zeit., **203**, 429 (1928). ⁸ А. Я. Королев, Сольватация белков в многокомпонентных растворителях (диссертация) (1938).