

С.П. Оляньська, канд. техн. наук
В.М. Клімович, канд. хім. наук
В.В. Манк, д-р хім. наук
І.В. Кузнєцова

ДОСЛІДЖЕННЯ КОНФОРМАЦІЇ ПЕПТИДІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ІЧ-СПЕКТРОСКОПІЇ

Білкові речовини і продукти їх розкладу — пептиди мають суттєвий вплив на колоїдно-хімічні та адсорбційні процеси при вапняно-вуглекислотному очищенні дифузійного соку і на наступних стадіях технологічного процесу. Залежно від складу нецукрів дифузійного соку на попередній дефекації коагулює 70...90 % білкових

речовин. Однак при високій лужності проведення основної дефекації під впливом іонів кальцію за наявності цукрози спостерігається пептизація від 7 до 18,2 % скоагульованих білків залежно від температури проведення переддефекації [1]. Продукти деструкції білка видаляються на стадіях очищення лише на 50...60 %. Наявність ренатурованого білка в соку зменшує ефекти адсорбції на І сатурації, особливо в схемах очищення соку

з гарячою дефекацією. Розщеплений до пептидів білок у процесі очищення вступає в реакцію з продуктами розкладу інвертного цукру. На основі досліджень авторів праці [2] стало можливо розкрити суть пептизації осадів коагуляту на дефекації.

Структуроутворення в білкових системах, коагуляція та осадження в процесі очищення соку, згідно з працями [3, 4] пов'язані з конформаційними змінами макромолекули. Рівноважна конформація значною мірою залежить від типу різних залишків у макромолекулі та їх послідовностей, а також від природи розчинника, який оточує макромолекулу. Кількість факторів, які визначають конформаційну стійкість білків, дуже велика [4]. Для макромолекул, як і для невеликих молекул, термін "конформаційна зміна" описує будь-які зміни геометрії молекул, до яких не належать руйнування пептидного ланцюга і створення первинних зв'язків. Вважають, що всі процеси взаємодії білка з іншими білками чи з невеликими молекулами, до яких білок проявляє певну специфічність, включають конформаційні зміни.

Мета цієї роботи — вивчення змін конформації пептидів (продуктів розкладу білкових речовин) у процесі попередньої дефекації. Це дасть можливість уточнити точку введення суспензії CaCO_3 , пояснити наявність зон мінімальної в'язкості на цій стадії технологічного процесу, що було виявлено в праці [5]. Для вивчення конформації пептидів у лужному середовищі ми зупинились на методі інфрачервоної спектроскопії, яка дає змогу отримати різнобічну інформацію для біополімерів. Коливальні частоти багатоатомних молекул визначаються масами атомів, які входять до складу молекули, геометрією молекули та міжатомними силами, що виникають у разі порушення рівноважної конфігурації молекули.

Готували розчини пептиду Glucyl-DL-Valine (молекулярна маса 174,2) з різними значеннями pH. Спектри були записані в діапазонах коливань $3600 \dots 2800 \text{ см}^{-1}$ і $1800 \dots 700 \text{ см}^{-1}$ на лазерному Раман-спектрометрі. В інфрачервоних спектрах пептидів (рис. 1 і 2) простежуються кілька відносно сильних характеристичних смуг поглинання в областях $1700 \dots 700 \text{ см}^{-1}$ та $3120 \dots 3320 \text{ см}^{-1}$. Чітко простежуються зміни інтенсивності та положення максимумів смуг поглинання при збільшенні pH розчину, які можна використати для дослідження структури і конформації пептиду.

Характеристичні смуги групи CONH в поліпептидних ланцюгах подібні до смуг поглинання, властивих вторинним амідам. Вони дістали назву амід I, амід II і т. д. Загалом відомо дев'ять таких смуг, які називають амід А, амід Б, амід І — амід VII у напрямку зменшення частоти коливань [6].

Ізольована (гіпотетично) група CONH має п'ять плоских (A') і одне неплоске (A'') нормальне коливання.

Ці коливання можна описати в термінах таких внутрішніх координат: 1) плоскі координати: валентна $\text{C}=\text{O}$, валентна $\text{C}-\text{N}$, валентна $\text{N}-\text{H}$, деформаційна OCN, деформаційна CNH; 2) неплоскі координати: крутильна $\text{C}-\text{N}$.

Розглянемо детальніше спектри вихідного розчину пептиду Glucyl-DL-Valine (рис. 1, крива 1, pH 5,1) і зміни, які виникають залежно від зміни pH в межах від 8 до 11. У спектрі вихідного розчину пептиду з pH 5,1 в діапазоні $3600 \dots 2800 \text{ см}^{-1}$ спостерігається чітка смуга з максимумом при 3460 см^{-1} , широка розмита смуга в діапазоні $3330 \dots 3220 \text{ см}^{-1}$ з максимумом при 3260 см^{-1} та смуга з трьома максимумами в діапазоні $3180 \dots 3100 \text{ см}^{-1}$. Смуга з максимумом при 3460 см^{-1} зумовлена "вільним" валентним коливанням групи $\text{N}-\text{H}$ [7], а смуги з коливанням при 3260 та 3120 см^{-1} — коливаннями груп амід А та амід Б відповідно. Слід зазначити, що в діапазоні частот $3100 \dots 3600 \text{ см}^{-1}$ також спостерігаються смуги коливання груп OH, які перекриваються із зазначеними вище смугами і дещо ускладнюють інтерпретацію ІЧ-спектрів.

У діапазоні $1700 \dots 1600 \text{ см}^{-1}$ вихідного розчину пептиду (рис. 1, крива 1) спостерігається смуга з трьома максимумами при 1700 , 1660 та 1610 см^{-1} , що характерно для вторинних амідів, поліпептидів і білка. Вона зветься амід І. Смуга амід І пов'язана головним чином з валентним коливанням $\text{C}=\text{O}$. Енергетично валентне коливання $\text{C}-\text{N}$ і деформаційне коливання $\text{N}-\text{H}$ дають внесок у коливання амід І менше ніж 10 % кожне. Проте амплітуда деформаційного коливання $\text{N}-\text{H}$ вагоміша. Коливання амід І чутливе до утворення водневих зв'язків і конформаційних змін у макромолекулах [7].

Смуга амід II в діапазоні $1500 \dots 1575 \text{ см}^{-1}$ зумовлена переважно валентним коливанням $\text{C}-\text{N}$ і деформаційним коливанням $\text{N}-\text{H}$.

Коливання амід III ($1214 \dots 1300 \text{ см}^{-1}$) — це суміш плоских коливань валентного $\text{C}-\text{C}$, валентного $\text{C}=\text{O}$, валентного $\text{C}-\text{N}$ і деформаційного $\text{N}-\text{H}$ коливань.

Із збільшенням pH розчину Glucyl-DL-Valine до 8 (рис. 2, крива 1) в спектрі дипептиду спостерігаються такі зміни: в зоні валентних коливань $\nu(\text{OH})$ груп спостерігається зменшення інтенсивності смуг з частотами при 3358 см^{-1} і збільшення інтенсивності при 3221 см^{-1} (зона коливань $\nu(\text{N}-\text{H})$ груп). Це свідчить про підсилення водневих зв'язків у системі. В області валентних коливань $\nu(\text{CH})$, $\nu(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{CH}_3)$ груп ($3050 \dots 2800 \text{ см}^{-1}$) спостерігаються значне падіння інтенсивності, зміна форми і положення контуру смуг. Ці факти свідчать про зміну ступеня гідратації в системі внаслідок зміни іонної рівноваги при переході від слабкого до слаболужного середовища. В інтервалі валентних коливань карбоксильних і пептидних груп амід І і амід II ($1700 \dots 1510 \text{ см}^{-1}$) також спостерігаються зміна положення смуг і деяке зменшення частот коливань та інтенсивності смуг (рис. 2, крива 1).

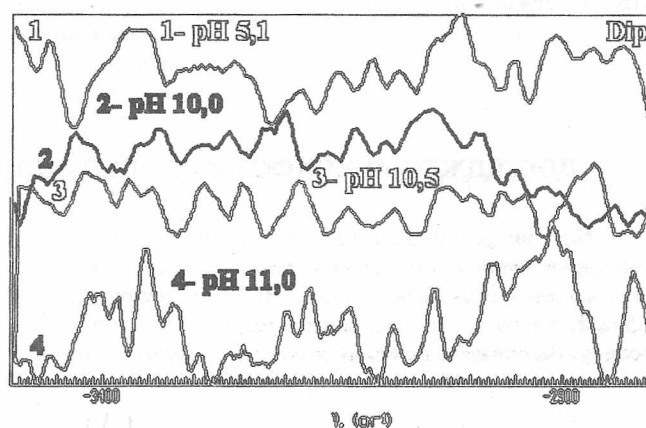
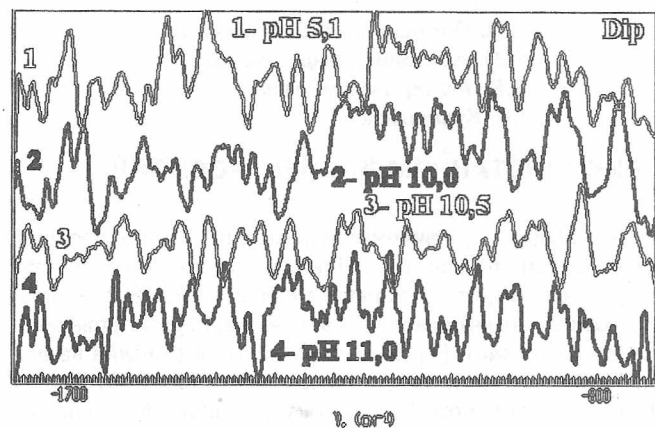


Рис. 1

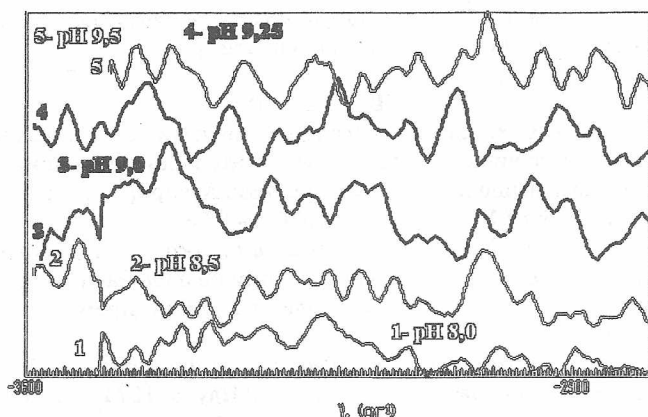
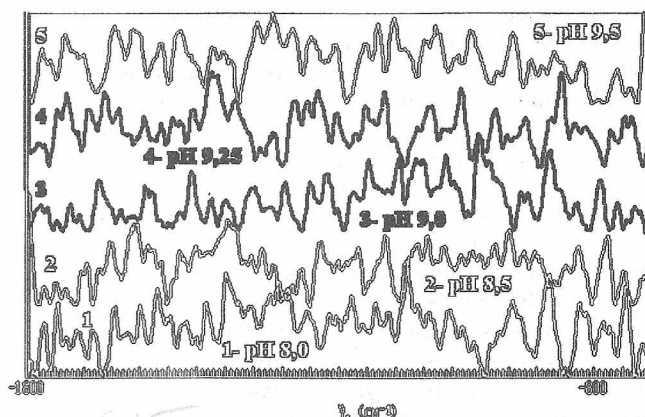
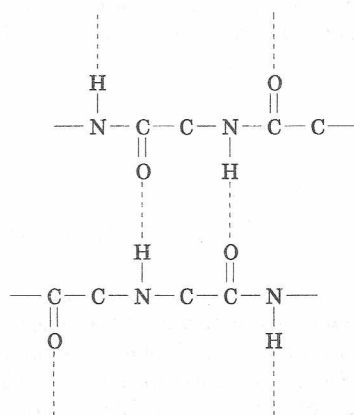


Рис. 2



(рис. 2, криві 3, 4) в більш низькочастотну зону [7]. Внаслідок специфічної взаємодії між сусідніми пептидними групами смуга амід I при 1670 см^{-1} (характерна для вільних груп $\text{C}=\text{O}$ вторинних амідів) розщеплюється на декілька складових з різними частотами та інтенсивностями при 1685 , 1658 і 1646 см^{-1} (pH 9,25). Смуга при 1646 см^{-1} характерна для α -спіралі, а при 1685 см^{-1} — для антипаралельного складчастого шару поліпептидного ланцюга [4]. Важливо зауважити, що ці зміщення зумовлені переважно зміною геометрії і вторинної структури молекули. Коливання амід I дуже чутливі до утворення водневих зв'язків і конформаційних змін у макромолекулі.

Для α -спіралі водневі зв'язки утворюються між кожною третьою пептидною групою, а для антипаралельного складчастого шару характерна комірка з чотирьох пептидних груп [4]. Конформація антипаралельного складчастого шару приблизно відповідає схемі



В елементарну комірку, яка складається із сегментів двох ланцюгів, входять чотири пептидні групи.

Смуга амід II зумовлена в основному валентним коливанням $\text{C}-\text{N}$ і деформаційним коливанням $\text{N}-\text{H}$, причому останнє переважає. Коливання амід II складніші. Їхня інтенсивність зростає із збільшенням pH розчину пептиду від 9,0 до 9,25 (рис. 2, криві 3, 4), що свідчить про утворення водневих зв'язків у системі [8]. Це, мабуть, можна пояснити впливом деформаційних коливань $\text{N}-\text{H}$. Спостерігається також розщеплення смуги амід II на кілька складових частин. Зміни смуги коливань амід II разом зі змінами коливань смуги амід I, що розглянуті вище, свідчать про конформаційні зміни в макромолекулі пептиду Glycyl-DL-Valine при pH 9,25.

Зміни кількості смуг валентних коливань груп $\nu(\text{CH})$, $\nu(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{CH}_3)$, положення їх і форми із збільшенням pH 9,25 свідчать про зміни симетрії силового поля.

Із збільшенням pH розчину пептиду від 8,5 до 9,0 у спектрі дипептиду спостерігаються такі зміни. Збільшується інтенсивність, змінюються положення і форма контурів смуг у діапазоні від 3600 до 2800 см^{-1} . З'являються широка смуга з максимумом при 3420 см^{-1} (pH 9,0), що зумовлена валентним коливанням $\nu(\text{OH})$ груп, і дублетна дуже інтенсивна смуга в діапазоні $2960\text{...}2917\text{ см}^{-1}$, що зумовлена $\nu(\text{CH}_2)$ групами (рис. 2, криві 2, 3).

В інтервалі частот коливань $1800\text{...}900\text{ см}^{-1}$ спостерігаються зміни положення форми контуру та інтенсивності деяких смуг. У першу чергу це стосується смуг коливань карбоксильної групи та амід I, амід II.

Коли pH розчину досягає значення 9,25 (рис. 2, крива 4), значно змінюються положення, форма і суттєво збільшується інтенсивність більшості смуг спектра. Зростає інтенсивність смуг валентних коливань $\nu(\text{OH})$ груп і зміщується їх максимум у бік смуг меншої довжини, зміщуються смуги амід I та амід II в більш низькочастотну зону, що дає змогу говорити про підсилення водневих зв'язків у системі [4].

Відомо, що при коливаннях, характерних для амід A, B, I та II, спостерігаються значні зсуви коливань валентних зв'язків $\text{C}=\text{O}$ і $\text{N}-\text{H}$. Тому такі коливання мають бути чутливими до утворення водневих зв'язків. Смуги амід A та амід B утворюються внаслідок резонансу Фермі між основним валентним коливанням $\text{N}-\text{H}$ і першим обертоном коливання амід II [9], що беруть участь в утворенні водневих зв'язків. Оскільки конформаційні зміни супроводжуються змінами в пептид-пептидних водневих зв'язках, коливання амід A, B, I та II мають відбивати зміни у вторинній структурі макромолекул поліпептидного типу.

Порівняльний аналіз спектральних кривих розчину дипептиду Glycyl-DL-Valine при pH 9,0 і pH 9,25 (рис. 2, криві 3, 4) показує, що зі збільшенням лужності розчину відбуваються значні зсуви частот коливань і їх інтенсивності в діапазоні $3050\text{...}3500\text{ см}^{-1}$, де спостерігаються валентні коливання груп $\nu(\text{OH})$ та $\nu(\text{NH})$. Згідно з працею [7] зсуви смуг, пов'язаних з групами, які є донорами протонів, такими як OH і NH, звичайно більші, ніж зсуви смуг, пов'язаних з такими групами, як $\text{C}=\text{O}$, що є акцепторами протонів.

У спектрі розчину пептиду Glycyl-DL-Valine (якщо немає водневого зв'язку між молекулами) в зоні pH 9,0 спостерігається чітка інтенсивна смуга при 3420 см^{-1} , яку можна віднести до чисто валентних коливань групи $\text{N}-\text{H}$ [7]. Внаслідок утворення водневого зв'язку (pH 9,25) ця смуга зміщується в зону $3210\text{...}3340\text{ см}^{-1}$. Крім того, з'являється нова смуга поблизу 3100 см^{-1} з максимумом 3120 см^{-1} , що характерно для груп NH, з'єднаних водневим зв'язком [9]. Це смуги коливань амід A та амід B відповідно.

Підтвердженням утворення водневих зв'язків у розчині пептиду при pH 9,25 є зсув смуг амід I та амід II

Подальше збільшення рН розчину пептиду до 9,5 зумовлює зменшення інтенсивності й невеликий зсув максимуму смуг валентних коливань гідроксильних груп ($3300...3600\text{ см}^{-1}$), що свідчить про деяке послаблення міцності водневих зв'язків. Спостерігаються перерозподіл інтенсивностей і зміна обрисів контуру валентних коливань $\nu(\text{CH})$, $\nu(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{CH}_3)$ груп. Збільшення рН розчину пептиду до 10,0 сприяє зростанню інтенсивності коливань іонізованих карбоксильних груп, що пояснюється деяким збільшенням кількості цих груп у молекулах пептиду. Збільшення рН розчину до 10,5 і далі до 11,0 зумовлює зростання інтенсивності та зміну положення максимумів смуг валентних коливань гідроксильних і $\nu(\text{CH})$, $\nu(\text{CH}_2)$, $\nu(\text{CH}_3)$ груп, а також значні зміни в інтервалі частот від 1800 до 800 см^{-1} .

Усі наведені вище факти зміни інтенсивності та зміщення коливань амід А, В, І і ІІ можна розглядати як конформаційні зміни в макромолекулах пептиду Glucyl-DL-Valine при рН 9,25, які супроводжуються змінами в пептид-пептидних водневих зв'язках та у вторинній структурі молекули. Очевидно, конформаційні зміни білка, поліпептидів і пектинових речовин [10] зумовлюють наявність другої оптимальної зони коагуляції РКД дифузійного соку в лужному середовищі й підтверджують доцільність введення осаду CaCO_3 в зону рН 9,25 попередньої defeкації для досягнення максимального ефекту очищення [11].

Висновок. Встановлено, що в області рН 9,25 у водних розчинах пептиду відбуваються складні внутрішньомолекулярні перетворення, спостерігаються значні зсуви у зв'язках валентних коливань $\text{C}=\text{O}$ та $\text{N}-\text{H}$ при коливаннях, характерних для амід А, В, І, ІІ, які супроводжуються змінами в пептид-пептидних водневих зв'язках та у вторинній структурі макромолекули. Цілком можливо, що змінюються торсійні кути між амінокислотними залишками. Всі ці зміни можна розглядати як конформаційні зміни макромолекули пептиду. При високих

значеннях рН (10...11) відбувається утворення солі з кінцевою карбоксильною групою пептиду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сімахіна Г.О. Исследование осаждения несахаров свекловичного сока на предварительной defeкации с целью повышения их эффективности: Автореф. дис...канд. техн. наук / УГУПТ. — К., 1980. — 26 с.
2. Бобровник Л.Д., Волошаненко Г.П., Федорова Н.С. Роль сахарозы в пептизации коагулята при обработке диффузионного сока известью // Сах. пром-сть. — 1979. — № 3. — С. 18–20.
3. Измайлова В.Н., Ребиндер П.А. Структурообразование в белковых системах. — М.: Наука, 1974. — 267 с.
4. Структура и стабильность биологических макромолекул: Пер. с англ. / Под ред. М.В. Волькенштейна. — М.: Мир, — 1973. — 584 с.
5. Олянская С.П. Агрегативная устойчивость высокомолекулярных соединений диффузионного сока // Сахар. — № 4. — 2000. — С. 16–21.
6. Miyazawa T. Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins // Univ. Wisconsin Press. — Madison, 1962.
7. Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. — М.: Изд-во ин. лит-ры, 1963. — 590 с.
8. Miyazawa T., Shimanouchi T., Mizushima S. // Journal Chem. Phys. — 1956. — № 24. — Р. 408.
9. Miyazawa T. // Journal Mol. Spectry. — 1960. — № 4. — Р. 168.
10. Оляньська С.П., Клімович В.М., Бобрівник Л.Д. Конформація макромолекул пектину у водних розчинах // Наук. пр. УДУХТ. — 2000. — № 7. — С. 57–59.
11. Олянская С.П. Очистка сока с использованием активированного осадка ІІ сатурации // Сахар. — 1999. — № 1. — С. 12–16.

Надійшла до редколегії 15.10.2000 р.