

Kierownik: prof. dr Zenon Wierchowski

Kierownik: dr inż. Jan Czajka

Jan CZAJKA

Die Veränderung der Koeffizienten $\frac{d\delta}{dc}$ und $\frac{d\delta}{dT}$ der kolloidalen Eiweisslösung während der termischen Denaturation

Dane doświadczalne większości autorów pozwalają przyjąć pogląd, że zjawisko denaturacji polega na rozrywaniu łańcuchów makrodrobin białka. W czasie tego procesu następuje więc zmiana konfiguracji makrodrobiny.

Zmiana wielkości drobiny powoduje zmiany na jej powierzchni. Mają one swoją przyczynę w zmianie stosunków grup polarnych i niepolarnych znajdujących się na powierzchni makrodrobiny. Powoduje to zmiany napięcia powierzchniowego. W zależności od stopnia denaturacji sumaryczna powierzchnia cząstek będzie zmieniała się niezależnie od tego czy wszystkie drobiny białka ulegają denaturacji, czy też tylko niektóre. Stwierdzili to Cuperowicz i Łosewa (5) przy denaturacji białka za pomocą mocznika.

Praca niniejsza nawiązuje do pracy własnej, wykonanej poprzednio (6), w której stwierdzono, że temperatura i czas denaturacji białka mają wpływ na wyrażenie na zmianę napięcia powierzchniowego.

Badania podjęte w niniejszej pracy mają na celu:

- 1) zbadanie zmiany własności adsorpcyjnych białka w czasie denaturacji w zależności od czasu i temperatury dla określonych stężeń;
- 2) zbadanie zmiany energii powierzchniowej w czasie denaturacji w zależności od temperatury i czasu.

1. Ilość zaadsorbowanej substancji wyraża się równaniem Gibbsa:

$$G = - \frac{c}{RT} \cdot \frac{d\delta}{dc} \quad 1$$

Współczynnik $\frac{d\delta}{dc}$ w zależności od temperatury i stężenia będzie charakteryzował zdolność adsorpcyjną białka w czasie denaturacji termicznej. Charakter zmiany tego współczynnika pozwoli wyciągnąć wniosek o jakości powierzchni.

- Dla dwóch określonych stężeń możemy w przybliżeniu założyć:

$$\frac{d\delta}{dc} = \frac{\Delta\delta}{\Delta c}$$

$\frac{d\delta}{dc}$ będzie miarą zdolności adsorpcyjnych. Zmiana tego współczynnika ze wzrostem temperatury i czasu ogrzewania będzie wskazywała na istnienie adsorpcji związanej z wytworzeniem nowej powierzchni.

2. Całkowita energia powierzchniowa określona jest równaniem:

$$U = \delta - T \frac{d\delta}{dT} \quad 2$$

Jej zmiana zależy między innymi od współczynnika temperaturowego $\frac{d\delta}{dT}$. Zmiana tego współczynnika ze wzrostem temperatury wskazuje na nieregularne zmiany energii w miarę podwyższania temperatury. Świadczy to o nieregularnej zmianie grup powierzchniowo czynnych na powierzchni białka w czasie termicznej denaturacji.

Również i w przypadku współczynnika temperaturowego zakładamy, że w przybliżeniu pochodna jest równa stosunkowi różnic:

$$\frac{d\delta}{dT} = \frac{\Delta\delta}{\Delta T}$$

Zbadanie zmiany współczynników $\frac{d\delta}{dc}$ i $\frac{d\delta}{dT}$ białka jaja dla określonych stężeń w zależności od temperatury denaturacji i czasu ogrzewania pozwoli scharakteryzować proces denaturacji pod względem powierzchniowym.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Przygotowanie prób do badań. Do pomiarów użyto 2 i 5% roztworów białka jaja kurzego. Roztwory powyższe sporządzono w następujący sposób. Oddzielono białka z kilku jaj, połączono je razem i wymieszano na jednolitą masę. Z tak przygotowanej średniej próbki sporządzono 2 i 5% roztwory wodne, z których pobierano próbki do pomiarów napięcia powierzchniowego.

Wykonanie pomiarów. Napięcie powierzchniowe mierzono metodą pęcherzykową według modyfikacji Rebindera (7) używając pojedynczej kapilary. Aparat pomiarowy wycechowano podwójnie destylowaną wodą przyjmując napięcie powierzchniowe wody w odnośnej temperaturze według danych literatury (8).

Naczynko pomiarowe z badanym roztworem białka ogrzewano przy użyciu termostatu Höplera. Pomiaru prowadzono w temperaturze 30—70°C w odstępach 5°C.

Wyniki pomiarów zastawiono w tabelach od 1 do 3 i na wykresach od 1—4.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Wyniki pomiarów przedstawiono w załączonych tabelach, każdy wynik stanowi średnia wartość z kilku pomiarów. Ze względu na małą powtarzalność wyników dane cyfrowe poszczególnych pojedynczych pomiarów bywały bardzo rozbieżne. Przedstawione dane liczbowe pozwalają jednak określić ogólny przebieg zjawisk powierzchniowych w czasie procesu denaturacji i stwierdzić zasadnicze prawidłowości kierunkowe w zależności od czasu ogrzewania i temperatury.

Tabela 1 i wykresy 1 i 2 przedstawiają zmianę napięcia powierzchniowego w czasie procesu denaturacji termicznej białka jaja. Ogólnie dla badanych stężeń napięcie powierzchniowe zmniejsza się ze wzrostem temperatury. Obniżenie to nie jest jednak liniowe. Dla białka o stężeniu 2% na przestrzeni badanych temperatur napięcie powierzchniowe zmniejsza się po 2 min. ogrzewania o 12,81 dyn/cm, po 10 min. — o 13,50 dyn/cm. Dla stężenia 5% zmniejsza się ono odpowiednio o 14,20

Tab. 1. Zmiana napięcia powierzchniowego δ (w dynach/cm) w zależności od temperatury i czasu ogrzewania białka jaja o stęż. 2% i 5%

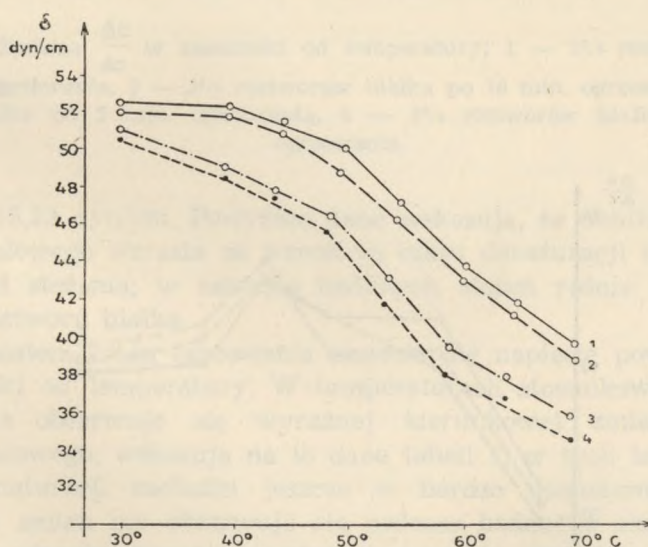
Stężenie w %	2					5				
	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10
Czas ogrzewania w min.										
Temp. w °C										
30	51,96	52,07	52,05	51,96	51,90	50,25	50,85	50,25	49,96	50,35
40	51,85	51,77	51,85	51,65	51,62	48,27	48,92	48,80	48,25	48,25
45	50,77	50,80	50,65	50,80	50,60	47,35	47,15	47,40	47,15	47,05
50	49,80	49,80	49,45	49,17	48,93	46,25	46,28	46,05	46,05	45,92
55	46,85	46,85	46,80	46,45	46,28	43,95	43,00	43,45	42,85	42,38
60	43,02	43,69	42,89	42,42	42,25	39,85	39,80	39,25	39,10	38,75
65	41,58	41,22	40,92	40,25	40,15	38,55	38,18	38,00	37,15	36,85
70	39,15	39,15	38,97	38,50	38,32	36,05	36,02	35,90	35,18	35,02

Tab. 2. Zmiana współczynnika — $\frac{d\delta}{dc}$ (dyna $\cdot$ cm $^{-1} \cdot$ 1%) w zależności od temperatury i czasu ogrzewania białka jaja dla stężeń 2% i 5%

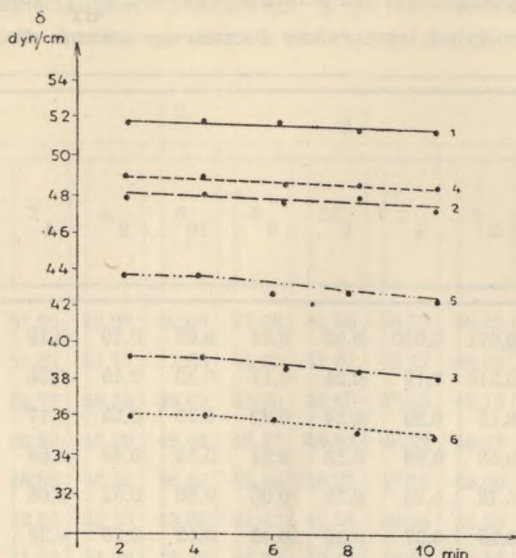
Czas ogrzewania w min.	2	4	6	8	10
Temp. w °C					
30	0,57	0,40	0,60	0,66	0,56
40	1,13	0,95	0,95	1,10	1,12
45	1,14	1,22	1,08	1,22	1,03
50	1,17	1,17	1,15	1,04	1,00
55	1,27	1,27	1,12	1,30	1,30
60	1,04	1,12	1,21	1,11	1,17
65	1,01	1,02	0,97	1,03	1,10
70	1,01	1,04	1,02	1,10	1,10

Tab. 3. Zmiana współczynnika temperaturowego — $\frac{d\delta}{dT}$ (dyna · cm⁻¹ · 10°K) białka jaja w zależności od temperatury i czasu ogrzewania dla stężenia 2‰ i 5‰

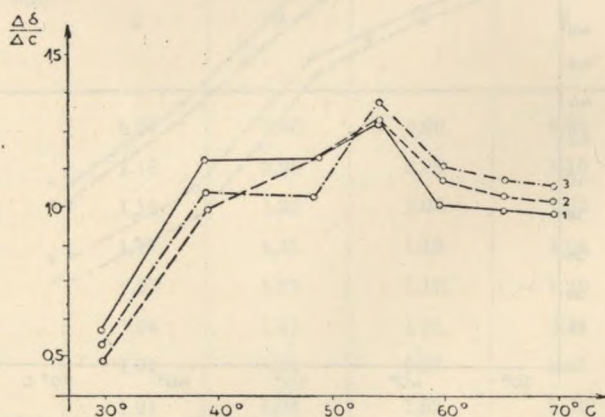
Stężenie w ‰	2					5				
Temp. w °K	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10
313	0,011	0,030	0,02	0,03	0,03	0,19	0,19	0,14	0,17	0,21
318	0,216	0,19	0,24	0,17	0,20	0,18	0,25	0,30	0,22	0,24
323	0,18	0,20	0,24	0,32	0,35	0,22	0,17	0,27	0,22	0,22
328	0,58	0,59	0,53	0,54	0,53	0,46	0,66	0,52	0,64	0,71
333	0,78	0,75	0,78	0,80	0,80	0,82	0,65	0,84	0,75	0,72
338	0,25	0,37	0,39	0,43	0,42	0,26	0,32	0,25	0,39	0,38
343	0,48	0,42	0,39	0,35	0,38	0,50	0,43	0,42	0,39	0,36



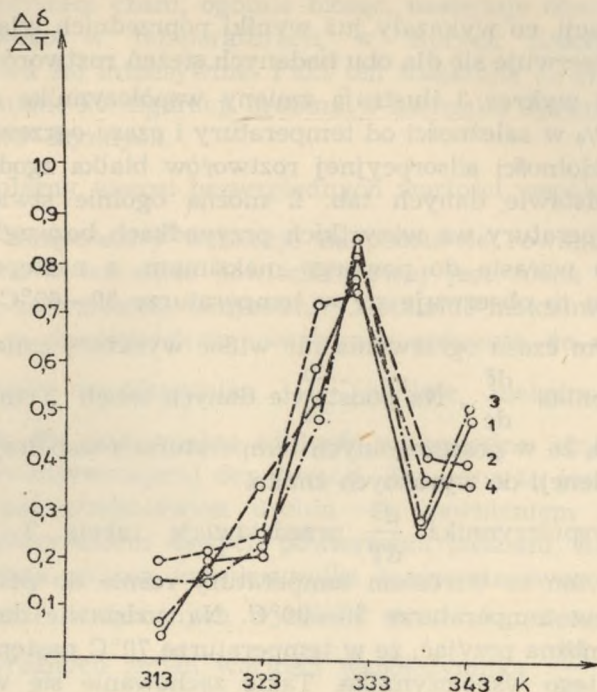
Wykres 1. Zmiana napięcia powierzchniowego białka jaja w zależności od temperatury dla stężeń 2 i 5‰; 1 — roztwór białka 2‰ po 2 min. ogrzewania, 2 — roztwór białka 2‰ po 10 min. ogrzewania, 3 — roztwór białka 5‰ po 2 min. ogrzewania, 4 — roztwór białka 5‰ po 10 min. ogrzewania.



Wykres 2. Zmiana napięcia powierzchniowego białka jaja w zależności od czasu ogrzewania dla 2 i 5% roztworu; 1 — roztwór białka 2% w 40°C, 2 — roztwór białka 2% w 55°C, 3 — roztwór białka 2% w 70°C, 4 — roztwór białka 5% w 40°C, 5 — roztwór białka 5% w 55°C, 6 — roztwór białka w 70°C.



Wykres 3. Zmiana $\frac{\Delta\delta}{\Delta c}$ białka jaja w zależności od temp.; 1 — zmiana po 2 min. ogrzewania, 2 — zmiana po 4 min. ogrzewania, 3 — zmiana po 10 min. ogrzewania



Wykres 4. Zmiana $\frac{\Delta\delta}{\Delta T}$ w zależności od temperatury; 1 — 2% roztworów białka po 2 min. ogrzewania, 2 — 2% roztworów białka po 10 min. ogrzewania, 3 — 5% roztwór białka po 2 min. ogrzewania, 4 — 5% roztworów białka po 10 min. ogrzewania.

dyn/cm i 15,33 dyn/cm. Powyższe dane wskazują, że obniżenie napięcia powierzchniowego wzrasta ze wzrostem czasu denaturacji i jest zależne również od stężenia; w zakresie badanych stężeń rośnie ze wzrostem stężenia roztworu białka.

Ze wzrostem czasu ogrzewania zmienia się napięcie powierzchniowe w zależności od temperatury. W temperaturach stosunkowo niskich 30 i 40°C nie obserwuje się wyraźnej kierunkowej zmiany napięcia powierzchniowego; wskazują na to dane tabeli 1; w tych temperaturach proces denaturacji zachodzi jeszcze w bardzo nieznacznym stopniu, wyraźnych zmian nie obserwuje się podczas badanego okresu 10 min. W miarę podwyższenia temperatury następuje wyraźne zmniejszenie napięcia powierzchniowego w zależności od czasu ogrzewania. W temperaturach 45—70°C widać wyraźnie obniżenie napięcia powierzchniowego ze wzrostem czasu, szczególnie w okresie ogrzewania 5—10 minut. Dane tej tabeli wskazują, że istnieje wyraźna zależność zmian napięcia od

czasu denaturacji, co wykazały już wyniki poprzednich własnych badań. Zjawisko to obserwuje się dla obu badanych stężeń roztworów białka jaja.

Tabela 2 i wykres 3 ilustrują zmiany współczynnika dla badanych stężeń 2% i 5% w zależności od temperatury i czasu ogrzewania. Zmiany te są miarą zdolności adsorpcyjnej roztworów białka zgodnie z równaniem. Na podstawie danych tab. 2 można ogólnie stwierdzić, że ze wzrostem temperatury we wszystkich przypadkach bezwzględna wartość współczynnika wzrasta do pewnego maksimum, a następnie zmniejsza się. Maksimum to obserwuje się w temperaturze 50—60°C.

Ze wzrostem czasu ogrzewania nie widać wyraźnej zmiany kierunkowej współczynnika $\frac{d\delta}{dc}$. Na podstawie danych tabeli 2 można przyjąć w przybliżeniu, że w poszczególnych temperaturach współczynnik ten nie wykazuje tendencji do wyraźnych zmian.

Zmiany współczynnika $\frac{d\delta}{dT}$ przedstawiają tabela 3 i wykres 4. Współczynnik ten ze wzrostem temperatury rośnie do pewnej wartości maksymalnej w temperaturze 50—60°C. Na podstawie danych wymienionej tabeli można przyjąć, że w temperaturze 70°C następuje ponownie lekki wzrost tego współczynnika. Takie zachowanie się współczynnika związane jest z procesem denaturacji. Zwiększanie intensywności denaturacji charakteryzuje się skokiem wartości współczynnika temperaturowego.

Również dane odnoszące się do zmiany współczynnika $\frac{d\delta}{dT}$ ze wzrostem czasu dla poszczególnych temperatur nie upoważniają do stwierdzenia zależności tego współczynnika od czasu ogrzewania. Nie obserwuje się wyraźnej zmiany kierunkowej w zależności od czasu ogrzewania. Można przyjąć, że w zakresie badanych stężeń temperatur i czasu nie wpływa ona wyraźnie na zmianę wartości.

WNIOSKI

Badania przeprowadzone nad zmianą napięcia powierzchniowego w czasie denaturacji białka jaja pozwalają wyciągnąć następujące wnioski:

1. W miarę wzrostu temperatury następuje obniżenie napięcia powierzchniowego. Zmiana ta nie jest liniowa, przyczyną jej może być zmiana stosunku grup polarnych i niepolarnych w czasie denaturacji. Zmiana ta jest najwyraźniejsza w temperaturach, w których proces denaturacji przebiega najintensywniej.

2. Pod wpływem czasu, ogólnie biorąc, następuje obniżenie napięcia powierzchniowego w temperaturach, w których proces denaturacji cieplnej odbywa się intensywnie. Fakt ten wskazuje, że czas ogrzewania wpływa na zmianę konfiguracji drobin w kierunku ujawnienia się grup powierzchniowo czynnych.

3. Nieregularny wzrost bezwzględnych wartości współczynnika $\frac{d\delta}{dc}$ ze wzrostem temperatury wskazuje na podstawie równania 1, że ilość białka zawarta w warstwie powierzchniowej jest różna i nie zmienia się regularnie ze wzrostem temperatury. Istnienie maksimum bezwzględnej wartości w określonych temperaturach wskazuje, że ze względu na ujemną wartość współczynnika $\frac{d\delta}{dc}$ istnieje maksimum zdolności adsorpcyjnych. Ta maksymalna zdolność adsorpcyjna istnieje w temperaturach najintensywniejszej denaturacji. Związane to jest ze zmianami w układzie powierzchniowym drobin — ujawnieniem nowych grup polarnych i stworzeniem nowych powierzchni podziału, na co wskazuje również podobna zmiana współczynnika temperaturowego.

Na podstawie otrzymanych wyników stosowaną metodą nie można stwierdzić wyraźnych zmian wartości współczynnika $\frac{d\delta}{dT}$ ze wzrostem czasu ogrzewania. Wskazałoby to, że w dwóch różnych stężeniach białka w tej samej temperaturze o tym samym czasie zachodzą podobne zmiany na powierzchni drobin białka w układzie stosunków grup polarnych i niepolarnych.

4. Wzrost współczynnika temperaturowego $\frac{d\delta}{dT}$ do wartości maksymalnej ze wzrostem temperatury świadczy o odbywających się gwałtownych zmianach w konfiguracji białka. Zmiany te odbywają się w interwale temperatur 50—60°C. To maksimum wartości $\frac{d\delta}{dT}$ w określonym przedziale temperatur związane jest z gwałtownymi przemianami konfiguracji drobin białka w procesie denaturacji.

Zgodnie z równaniem 2 w temperaturach charakterystycznych dla bezwzględnych maksymalnych wartości $\frac{d\delta}{dT}$ istnieją różne maksymalne bezwzględne wartości $T\frac{d\delta}{dT}$, wskazujące na maksymalne ciepło tworzenia nowej powierzchni rozdziału. Te nowe powierzchnie tworzą się skutkiem wewnętrznego przegrupowania w makrodrobinie białka w procesie termicznej denaturacji. Zgodnie z równaniem 2 również całkowita energia przybiera maksymalne wartości w temperaturze denaturacji.

PISMIENNICTWO

1. Putman F. W.: Proteins 1. B. 807—92, 1953.
2. Robst C., Warner, Milton Levy: J. Am. Chem. Soc. 80. 5735 (1948).
3. Stauff J.: Kolloid — Z. 146, 48, (1956).
4. Ponomarew W. W.: Biochimia, t. 16, s. 556, 1956, t. 21. s. 557, 1956.
5. Cuperowicz A. S., Łosewa A. Ł.: Biochimia 21, 53, (1956).
6. Czajka J.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, AA, XIII, (1958).
7. Pułłowa: Ćwiczenia laboratoryjne z chemii koloidów, Warszawa 1955.
8. Kalendarz chemiczny, t. 1, Warszawa 195, s. 374.

РЕЗЮМЕ

В исследованиях изменений поверхностного напряжения 2% и 5% растворов яичного белка во время термической денатурации констатируется:

1. Поверхностное напряжение уменьшилось с увеличением температуры и времени нагревания.
в температурах 50°—60°C.

2. Коэффициенты $\frac{d\delta}{dc}$ и $\frac{d\delta}{dT}$ указывают максимум и минимум

3. Эти максимумы, связанные с тепловой денатурацией, показывают, что молекулы яичного белка изменяют молекулярную структуру; при этом изменяются также поверхностно активные группы.

ZUSAMMENFASSUNG

Auf Grund der vorstehenden Untersuchungsergebnissen über die Oberflächenspannung 2 und 5% Eiereiweißlösung während der Denaturation können wir behaupten:

1) die Oberflächenspannung vermindert sich mit steigender Temperatur und der Erwärmungszeit;

2) die Koeffizienten $\frac{d\delta}{dc}$ und $\frac{d\delta}{dT}$ zeigen einen maximalen Wert in Temperaturbereich 50—60°C;

3) diese Maxima sind mit den Denaturationsproces verbunden. Sie zeigen, dass die Eeiweißmolekülen die Konfiguration verändern. Bei dieser Konfiguration ändern sich auch die Oberflächeaktiven Gruppen.