



УДК 541.549

## Ионная сила раствора как фактор, определяющий механизм многокомпонентной ионообменной сорбции белков

Меленевский А.Т., Павлова Е.Н., Никифорова Е.С.

*Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург*

Поступила в редакцию 20.05.2011 г.

### Аннотация

Проведено исследование влияния ионной силы раствора смеси белков (цитохром с, лизоцим, рибонуклеаза) на их сорбцию на карбоксильных катионитах. Показана возможность перехода от синергического механизма сорбции к конкурентному при увеличении ионной силы раствора.

**Ключевые слова:** адсорбция, ионообменники, белки, хроматография

The investigation of ionic strength influence on protein mixture sorption (cytochrom *c*, lysozyme, ribonuclease) on cation exchangers was carried out. The possibility of transition from synergetic to competitive sorption mechanism with ionic strength increasing was shown.

**Keywords:** Adsorption, Ion-exchangers, Proteins, Chromatography

### Введение

Среди проблем, возникающих при изучении взаимодействия веществ, обладающих биологической активностью, с полимерными заряженными поверхностями, важное место занимает проблема влияния многокомпонентности сорбционной смеси на результат сорбции. Тот же самый вопрос возникает при разработке процессов хроматографического выделения и очистки биологически активных веществ (БАВ) с использованием полимерных сорбентов. Одним из эффективных и экономически выгодных способов первичного извлечения целевого компонента из сложного биологического сырья является применение ионообменных хроматографических методов выделения. Как было много раз продемонстрировано, использование селективных высокоемкостных сорбентов [1] позволяет в целом ряде случаев извлечь целевой компонент из сложной смеси в одноактном сорбционном процессе. Даже в таких сложных случаях, когда содержание целевого компонента не превышает долей или единиц процентов, правильный выбор ионообменного сорбента и условий сорбции обеспечивает увеличение содержания компонента в элюате до нескольких десятков процентов [1]. В то же самое время, как было показано на модельных смесях белков [2-4], результат сорбции зависит от доли и концентрации компонентов в смеси. Более трех десятков лет тому назад Гельферихом и Клейном была предложена математическая модель, учитывающая

взаимное влияние компонентов при сорбции. Ими и было введено понятие о конкурентном и синергическом механизмах сорбции [5]. Если взаимодействие белков с поверхностью пор сорбента происходит по синергическому механизму, то есть осуществляется многослойная сорбция белков, то разделение компонентов в динамическом колоночном эксперименте практически невозможно. Можно предположить, что белок сначала занимает все доступные сорбционные центры, при этом связывается с сорбентом настолько прочно, что не происходит его вытеснения другим белком. Дальнейшая сорбция идет за счет взаимодействий белок-белок. Очевидно, что в этом случае имеет место многослойная укладка белка. Как показывает эксперимент, при наличии синергических эффектов, сорбционная емкость сорбентов по «суммарному» белку значительно превышает таковую по индивидуальному белку [3]. По-видимому, сорбция идет слоями: слой первого белка, слой второго белка. Именно поэтому, такие межбелковые взаимодействия в фазе сорбента приводят к резкому ухудшению эффективности разделения белковых смесей. Было показано, что путем изменения рН сорбции и проведении процесса в условиях далеких от оптимального связывания, можно перейти от синергического механизма сорбции к конкурентному [2-4].

Изучение влияния ионной силы раствора на процесс взаимодействия модельных бинарных смесей белков с ионообменными сорбентами и на переход от синергизма к конкуренции в этих процессах и является целью данной работы.

## Материалы и методы исследования

В качестве модельных белков были использованы цитохром *c* (производства Санкт-Петербургского завода медпрепаратов), лизоцим, выделяемый из белков куриных яиц, производства ФАО «Феррейн», степень чистоты 97% и рибонуклеаза (производства Санкт-Петербургского завода медпрепаратов).

Цитохром *c* – щелочной белок с молекулярной массой 12,3 кДа и изоэлектрической точкой 10,05. В спектре обнаруживает два пика поглощения: в видимой (410 нм) и в ультрафиолетовой (280 нм) области.

Лизоцим - белок, с молекулярной массой 14600, имеющий изоэлектрическую точку в щелочной области рН (10.7-11.2), сохраняющий ферментативную активность в нейтральной области рН [5-7].

Рибонуклеаза – фермент, катализирующий гидролитическое расщепление рибонуклеиновых кислот на олиго- и мононуклеотиды. Рибонуклеаза А представляет собой одноцепочечный полипептид основного характера (рI=9,4), молекулярная масса рибонуклеазы 14000.

В качестве сорбентов были использованы карбоксильные сетчатые полиэлектролиты (КСПЭ) катиониты КМДМ-2-7.5 и КМДМ-6-5, синтезированные, путем осадительной радикальной сополимеризации метакриловой кислоты с кроссагентами амидного типа, отличающимися как длиной цепи, так и растворимостью в воде. В результате сополимеризации метакриловой кислоты с N,N - этилендиметакриламидом (ЭДМА) были получены КСПЭ - КМДМ-2-7.5, а с N,N-гексаметилендиметакрилами-дом (ГМДМ ) КМДМ-6-5.

Характеристики полученных КСПЭ приведены в таблице

КСПЭ	Кнаб. в воде	Кнаб. в буферном растворе рН=6.8	Котн.	Емкость по иону Na мгэкв/г	рК
КМДМ-2-7.5	6.0	9.0	1.5	9.7	6.6
КМДМ-6-5	5.0	10.0	2.0	9.5	6.4

Как видно из таблицы характеристики КСПЭ КМДМ-2-7.5 и КМДМ-6-5 близки. Несмотря на то, что содержание кроссагента в сорбенте у КМДМ-2-7.5 больше на 2.5 процента, его коэффициент набухания в воде несколько выше, чем у КМДМ-6-5, что объясняется гидрофильным характером кроссагента ЭДМА, который хорошо растворим в воде. К отн., характеризующее подвижность межузловых цепей (отношение коэффициента набухания при заданной степени ионизации (рН=6.8) к коэффициенту набухания неионизованной формы) у КМДМ-6-5 выше на 0.5 и составляет 2.0, что можно объяснить большей длиной цепи кроссагента ГМДМ. Значения рК, найденные по данным потенциометрического титрования говорят об близости структур данных КСПЭ.

Концентрации белков в смешанных растворах, одним их компонентов которых был цитохром *c*, определяли, исходя из свойства аддитивности величины оптической плотности [2], относительная погрешность измерений по такой методике составляет 5 %. При этом:

$$D = D_{\text{цитохром}} + D_{\text{лизоцим}}$$

Основываясь на этом утверждении, проводили следующие действия:

- 1) измеряли величину  $D_{280}$  (оптическая плотность смеси белков на длине волны 280 нм);
- 2) измеряли величину  $D_{410}$  (оптическая плотность раствора цитохрома *c* на длине волны 410 нм);
- 3) находили концентрацию цитохрома *c* в смеси по калибровочному графику.
- 4) по предварительно построенной градуировочной зависимости определяли величину  $D_{\text{цитохром } 280}$  (поглощение цитохромом *c*, полученной концентрации на длине волны 280).
- 5) рассчитывали величину  $D_{\text{лизоцим } 280} = D_{280} - D_{\text{цитохром } 280}$  (поглощение лизоцима на длине волны 280);

Находили концентрацию лизоцима в смеси по калибровочному графику.

Концентрации белков в смешанных растворах лизоцима и рибонуклеазы определяли при помощи хроматографа «Милихром».

## Обсуждение результатов

На рис. 1 (а,б и в) приведены изотермы сорбции индивидуальных белков цитохрома *C*, лизоцима и рибонуклеазы на катионите КМДМ-6-5 при различных значениях ионных сил в оптимуме сорбции при рН (5.5). Заданная ионная сила достигалась посредством добавления к буферному раствору рассчитанного количества NaCl.

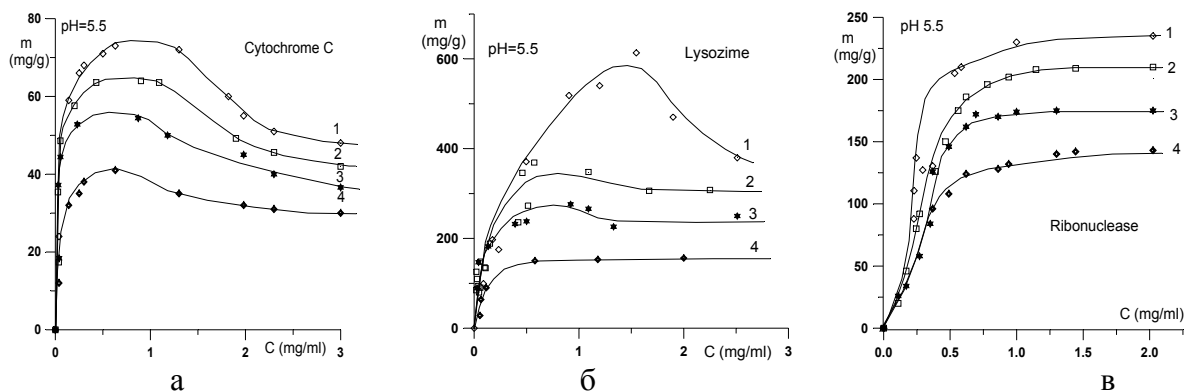


Рис. 1. Изотермы сорбции цитохрома С (а), лизоцима (б) и рибонуклеазы (в) на карбоксильном катионите КМДМ-6-5 при различных ионных силах. Ионная сила (моль/л): 1 - 0.1, 2 - 0.125, 3 - 0.15, 4 - 0.2

На рис. 2 (а и б) приведены изотермы сорбции индивидуальных белков лизоцима и рибонуклеазы на катионите КМДМ-2-7.5 при различных значениях ионных сил в оптимуме сорбции при рН (5.8).

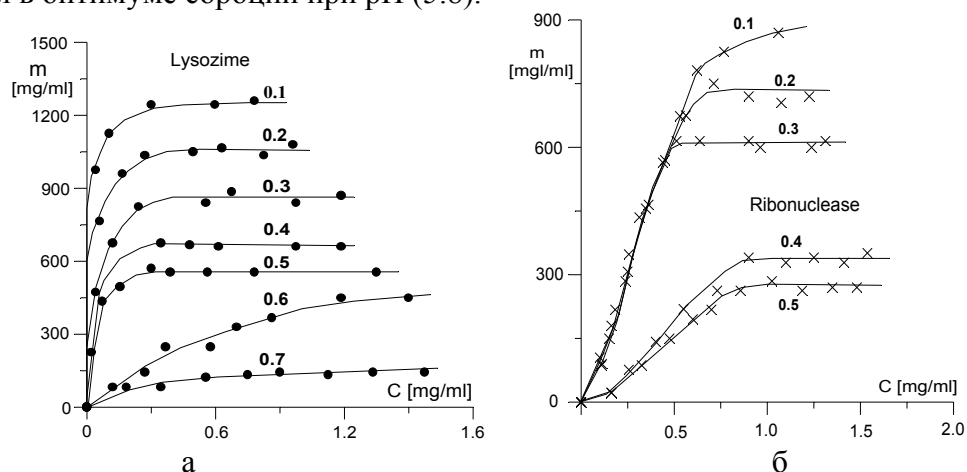


Рис. 2. Изотермы сорбции рибонуклеазы(а) и лизоцима (б) на карбоксильном катионите КМДМ-2-7.5 при различных ионных силах. Цифры на кривых – значения ионных сил (моль/л)

Легко видеть, что во всех случаях с ростом ионной силы изменяется форма изотерм и падает сорбционная емкость сорбентов.

В экспериментах по последовательной сорбции было показано, что при использовании катионита КМДМ-6-5 для всех модельных пар белков (цитохром С – рибонуклеаза, цитохром С – лизоцим и рибонуклеаза - лизоцим) при ионной силе 0.1 М процесс сорбции идет в соответствии с синергическим механизмом (рис. 3а). При увеличении ионной силы до 0.125 М происходит переход от синергизма к конкуренции для всех пар исследованных белков (рис. 3б).

Для катионита КМДМ-2 процесс сорбции лизоцима и рибонуклеазы протекает по синергическому механизму вплоть до ионных сил 0.3М. При дальнейшем увеличении ионной силы происходит переход к конкурентному механизму сорбции (рис.4).

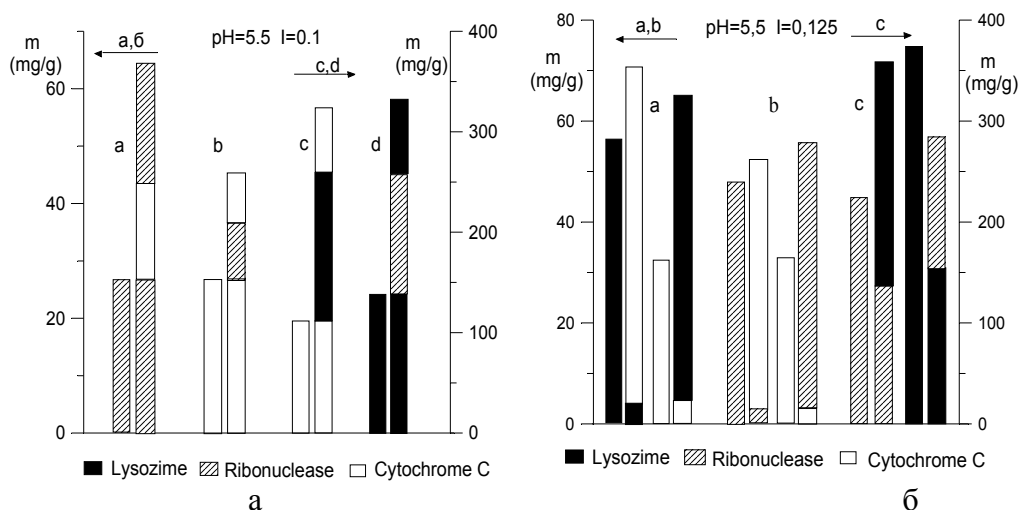


Рис. 3. Последовательная сорбция пар цитохром С – рибонуклеаза, цитохром С – лизоцим и рибонуклеаза - лизоцим на катионите КМДМ-6-5 при ионных силах (моль/л): а - 0.1, б - 0.125

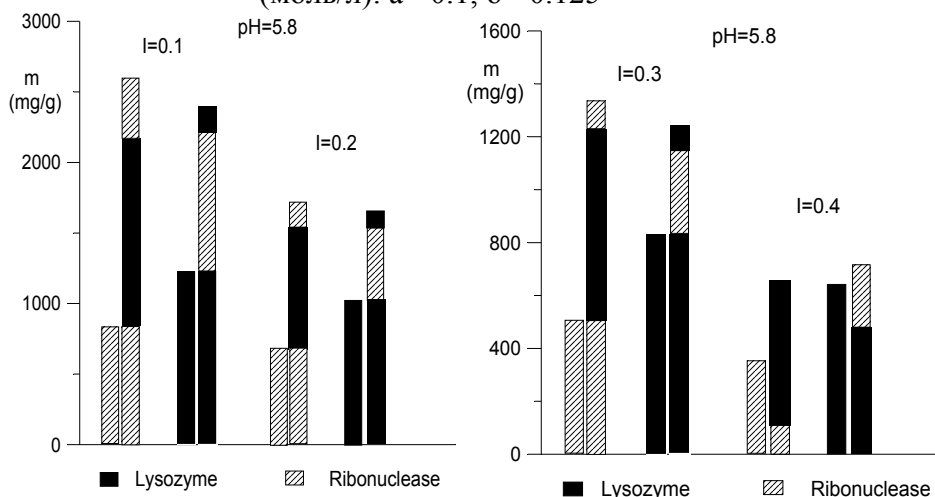


Рис. 4 Последовательная сорбция лизоцима и рибонуклеазы на катионите КМДМ-2-7.5 при различных ионных силах

Расхождение величин ионных сил, при которых происходит переход к конкурентному механизму сорбции для сорбентов КМДМ-6-5 и КМДМ-2-7.5, объясняется различием в энергии связывания белков исследованными катионитами, которое отражается в величине сорбционной емкости по белкам при сравнимых ионных силах. Это различие может быть связано с природой кроссагентов, применяемых при синтезе КМДМ-6-5 и КМДМ-2-7.5 (гидрофобной и гидрофильной, соответственно).

## Заключение

На основании полученных результатов было показано, что переход от синергического к конкурентному механизму сорбции может иметь место при увеличении ионной силы раствора сорбционной смеси. Однако этот переход происходит при различных значениях ионных сил для разных сорбентов.

---

## Список литературы

1. Самсонов Г.В., Меленевский А.Т. //Сорбционные и хроматографические методы физико-химической биотехнологии. Л.: Наука. 1986. 230 с.
2. Меленевский А.Т., Чижова Е.Б., Папукова К.П. Сорбция белков лизоцима и цитохрома С на карбоксильном катионите КМДМ-6-5. //Журн. физ. химии. 1999. Т.73. №9. с.1693-1696.
3. Меленевский А.Т., Чижова Е.Б., Папукова К.П. Сорбция белковых систем лизоцим - цитохром С и рибонуклеаза - цитохром С на карбоксильном катионите КМДМ-6-5. //Журн. физ.химии. 2000. Т.74. №8. С.1464-1467.
4. Demin A.A., Mogilevskaya A.D., Samsonov G.V. Synergistic effects in the processes of protein multicomponent sorption // J.Chromatogr. 1997. V.760. P.105.
5. Helfferich F., Klein G. Multicomponent chromatography. N.Y., 1970. 485 p.

---

**Меленевский Александр Тарасович** – ст. науч. сотрудник, к.х.н., Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, тел. (812)3288547

**Павлова Екатерина Николаевна** – мл. науч. сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

**Никифорова Елена Сергеевна** – науч. сотрудник, Учреждение Российской академии наук Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

**Melenevsky Alexander T.** – research associate, Institution of Russian Academy of Sciences Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St Petersburg, [melenev@imc.macro.ru](mailto:melenev@imc.macro.ru)

**Pavlova Ekaterina N.** – research associate, Institution of Russian Academy of Sciences Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St Petersburg

**Nikiforova Elena S.** – research associate, Institution of Russian Academy of Sciences Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St Petersburg