

Некоторые диэлектрические свойства кристаллов моноклинного лизоцима

© Л.Н. Рашкович, В.А. Смирнов, Е.В. Петрова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия

E-mail: rashk@polly.phys.msu.ru

(Поступила в Редакцию 18 июня 2007 г.

В окончательной редакции 10 сентября 2007 г.)

Исследовались частотные зависимости тангенса угла потерь и модуля импеданса кристаллов моноклинного лизоцима и раствора, из которого получены кристаллы. Измерения проводились при частотах $1-10^7$ Hz в условиях выдержки кристаллов при 25°C , охлаждения до -20°C и последующего нагрева. По измерениям диэлектрических свойств кристаллов было, в частности, установлено, что в процессе высушивания на воздухе при комнатной температуре из кристаллов сначала удаляется „свободная“ вода, содержание которой составляет около 65% от общего количества, а затем „связанная“; содержащийся в кристаллах растворитель (~ 26 wt.%) замерзает при постоянной температуре около -6.5°C ; на высоких частотах диэлектрическая постоянная обезвоженного кристалла существенно больше, чем льда.

Работа поддержана грантом РФФИ № 06-02-16204.

PACS: 64.70.Dv, 77.22.-d

1. Введение

В структуре кристаллов белков содержится значительное количество (до 80%) водного раствора, из которого осуществлялась кристаллизация. До сих пор не удается сделать выбор между следующими альтернативами: 1) некоторая часть воды в кристаллах упорядочена („связана“), а остальную воду можно считать „свободной“; 2) характерные параметры водородных связей воды в кристалле отличаются от таких связей в окружающем растворе. Спектральные исследования [1] не позволяют решить эту задачу, не решена она и другими методами. Автор [2], анализирувавший результаты большого числа исследований биологических объектов различными физическими методами, сделал один существенный вывод: большая часть воды в биологических системах мало отличается по своим структурным характеристикам от обычной воды. Похожие результаты получены при анализе люминесцентных характеристик ионов европия (симметрии его окружения), введенного в растворитель и вошедшего в кристалл моноклинного лизоцима. При термогравиметрических и калориметрических измерениях обнаружено, что основная масса воды (~ 25 wt.%) удаляется из кристаллов при комнатной температуре, а при последующем нагревании потеря веса, связанная с удалением воды, происходит при $\sim 140^\circ\text{C}$ и составляет лишь около 2 wt.% [3]. Целью настоящей работы являлось дальнейшее исследование свойств растворителя, содержащегося в кристаллах моноклинного лизоцима, методом диэлектрической спектроскопии.

2. Методика

Моноклинные кристаллы лизоцима получались спонтанной кристаллизацией при комнатной температуре в

растворе 0.05M-натрий-ацетатного буфера с $\text{pH} = 4.5$ в присутствии NaNO_3 (20 mg/ml, 0.23M). Начальная концентрация шестикратно перекристаллизованного лизоцима (фирма Seikagaku, Япония) составляла 20 mg/ml. Выпавшие через сутки кристаллы имели размер 10–200 μm и типичный пластинчатый габитус. Они хранились в „рабочем“ растворе с концентрацией лизоцима 5 mg/ml, в этих условиях новых зародышей не возникало, а уже образовавшиеся кристаллы медленно росли.

С поверхности кристаллов, извлеченных из раствора, жидкость удалялась с помощью фильтровальной бумаги, затем кристаллы помещались в измерительную ячейку. Ячейка представляла собой цилиндр из оргстекла высотой 12 mm, имеющий сквозное отверстие диаметром 5 mm, в котором располагались два медных электрода с полированными торцами диаметром 4.9 mm. Нижний электрод, на котором размещался образец, был закреплен. Типичная толщина образца составляла около 0.5 mm и измерялась с точностью ± 0.02 mm. Измерения проводились на автоматизированной установке BDS-40 фирмы Novocontrol (Германия). При заданной температуре прибор подает на образец синусоидальное напряжение определенной амплитуды и частоты. Измеряется амплитуда и сдвиг фазы протекающего через образец тока и вычисляется его активная и реактивная составляющие. Используя те или иные эквивалентные схемы, можно вывести на экран любые параметры комплексного импеданса, проводимости и пр. Измерения проводились при напряжении на образце 1 V и частотах $f \leq 10$ MHz. Стабилизация температуры с точностью 0.01°C осуществлялась путем продувания через измерительную камеру паров азота. Вода из образца могла медленно испаряться через щели между электродами и ячейкой. Время между извлечением кристаллов из раствора и началом измерений не превышало 20 min.

В опытах с растворами использовалась ячейка из оргстекла с золотыми электродами диаметром 15 mm. Толщина слоя раствора составляла 5 mm.

3. Результаты и обсуждение

Были проведены три группы опытов по измерению диэлектрических характеристик: 1) растворов, в которых находились кристаллы; 2) кристаллов в процессе высушивания при постоянной температуре; 3) кристаллов при последовательном охлаждении и нагревании.

3.1. Опыты с растворами. Для приготовления растворов использовалась дистиллированная вода, прошедшая ионнообменную колонку Milli-Q. Из-

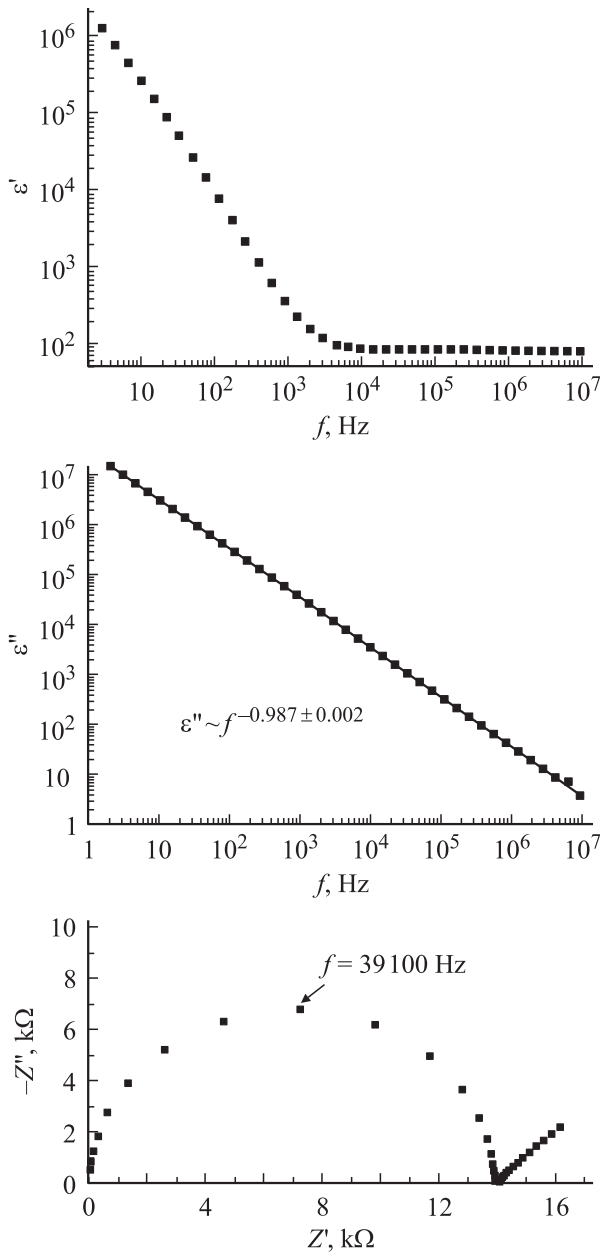


Рис. 1. Диэлектрические свойства воды при 25°C.

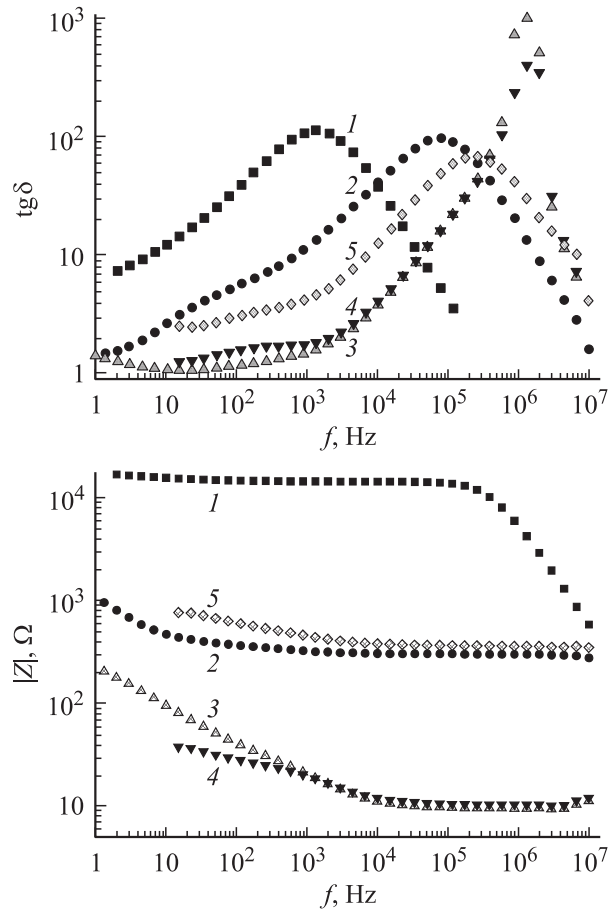


Рис. 2. Частотные зависимости тангенса угла диэлектрических потерь и модуля импеданса при 25°C для воды (1), ацетатного буфера (2), буфера с нитратом натрия (3), рабочего раствора (4) и кристаллов (5).

меренные диэлектрические характеристики воды (после ее недельного хранения в закрытом полиэтиленовом сосуде) при 25°C в области частот 2–10⁷ Hz приведены на рис. 1 и 2. Диэлектрическая проницаемость $\epsilon' \approx 80$ наблюдалась при частотах выше ~ 5 kHz, тангенс угла диэлектрических потерь имел максимум на частоте 1.3 kHz. Практически линейная зависимость мнимой части диэлектрической проницаемости ϵ'' от частоты и близкая к идеальной полукривость в координатах Коула–Коула [$-Z''(Z')$] указывают на то, что содержимое измерительного конденсатора можно представить эквивалентной схемой из параллельно соединенных емкости и сопротивления. Тогда $R = 1/2\pi\epsilon_0 f \epsilon'' = 50 \pm 4 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}$ (здесь $(2\pi\epsilon_0)^{-1} = 1.8 \cdot 10^{12} \Omega \cdot \text{cm/s}$). Если использовать воду сразу после ионообменной очистки, то она имеет величину $R = 130 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}$, а максимум $\text{tg } \delta$ наблюдается при 350 Hz. Большие значения ϵ' на низких частотах обычно связывают с образованием у электродов двойного электрического слоя, количественная интерпретация и учет этого явления пока невозможны.

На рис. 2 приведены частотные зависимости при 25°C $\text{tg } \delta$ и модуля импеданса $|Z|$ для воды, буфера, буфера+ NaNO_3 (20 mg/ml), рабочего раствора (содержащего 5 mg/ml лизоцима) и кристаллов. Заметим, что во всех случаях наблюдалась линейная зависимость $e''(f)$ с тангенсом угла наклона, близким к -1 (отличие не более 0.02), однако это имело место только для частот, больших соответственно 10 Hz, 10, 34, 4.5 и 4.5 kHz. При этом удельное сопротивление составляло $R = 860, 26, 29$ и $560 \Omega \cdot \text{cm}$. Из рис. 2 видно, что увеличение концентрации ионов в растворе приводит к существенному увеличению частоты, при которой наблюдается максимум $\text{tg } \delta$. Представляется, что на основании приведенных данных можно сделать лишь предварительные выводы.

1) Некоторое уменьшение величины максимума $\text{tg } \delta$ (от ~ 1000 до 400) при добавлении лизоцима к раствору с NaNO_3 указывает на связывание части ионов соли белком.

2) Содержащийся в кристаллах растворитель содержит меньше свободных ионов, чем маточный раствор. Это следует из меньшей величины диэлектрических потерь, меньшей частоты, при которой наблюдается максимум потерь, и существенно большей величины модуля импеданса по сравнению с рабочим раствором.

3.2. Высушивание кристаллов при 25°C . Результаты опытов приведены на рис. 3. Там же приведен график, демонстрирующий зависимость доли испарившейся воды от времени, построенный на основе данных [3]. При высушивании концентрация низкомолекулярных ионов в оставшемся в кристаллах растворителе увеличивается. Одновременно уменьшается степень их гидратации, что облегчает связывание ионов с белком. Наряду с этим уменьшается как подвижность ионов, так и содержание жидкости в кристаллах. Результирующим эффектом является увеличение активного сопротивления по мере удаления воды.

Изменение со временем модуля импеданса на частоте 20 Hz и $\text{tg } \delta$ на частоте 10 MHz происходит синхронно. При низких частотах величина импеданса определяется в основном активным сопротивлением образца. При высоких частотах от этого же зависит величина тангенса диэлектрических потерь.

На кривых, приведенных на рис. 3, *a* и *b*, можно выделить три временных участка в интервалах 0–50, 50– ~ 130 –150 и ~ 150 –300 min. Из сопоставления с рис. 3, *c* можно полагать, что выделяющаяся за первые 50 min вода (около 65% всей содержащейся в кристаллах воды) является „свободной“, и не отличается по свойствам от небольшого количества гигроскопической воды, оставшейся в образце после его извлечения из раствора и удаления влаги с поверхности с помощью фильтрованной бумаги. Следующие $\sim 30\%$ воды, потеря которых сопровождается изменением наклона кривых на рис. 3, *a* и *b*, можно интерпретировать как „связанную“ с белком воду. Изменение диэлектрических свойств на третьем временном интервале (здесь теряется около 5%

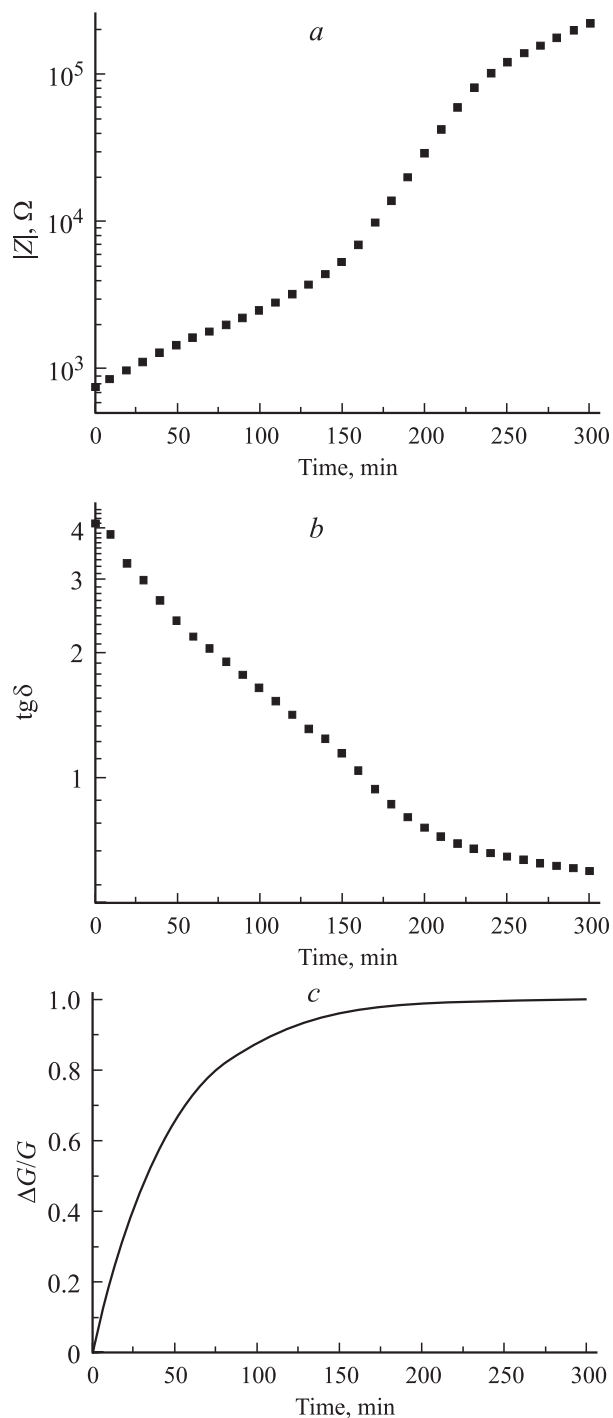


Рис. 3. Зависимость свойств кристаллов от времени в процессе высушивания. *a* — модуль импеданса при 20 Hz; *b* — тангенс угла диэлектрических потерь при 10 MHz, *c* — доля испарившейся воды.

всей воды), очевидно, связано не со свойствами оставшегося в кристаллах растворителя, а с изменением свойств самого белка.

На рис. 4, *a* представлены частотные зависимости $\text{tg } \delta$ в разные моменты времени. Видно смещение со временем частоты, при которой наблюдается максимум

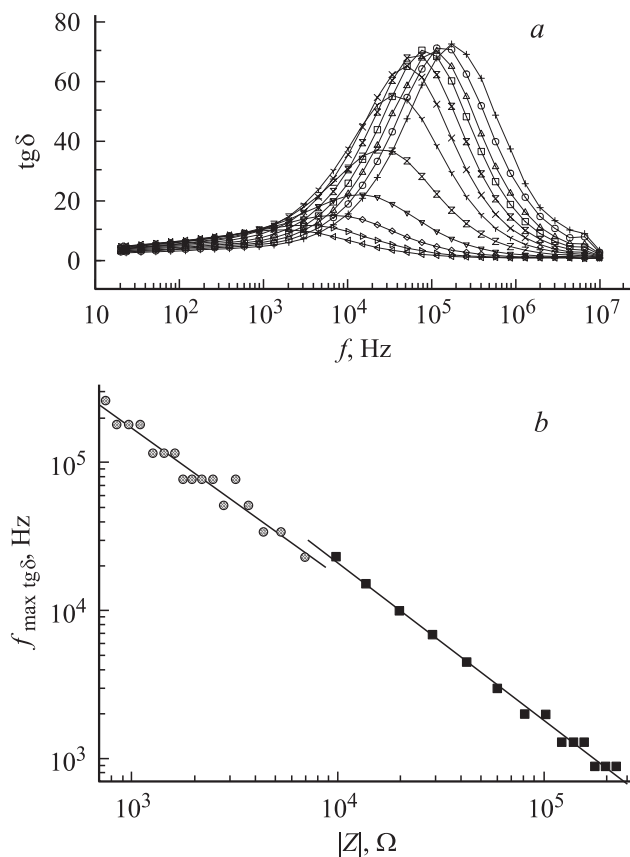


Рис. 4. *a*) Частотная зависимость тангенса угла диэлектрических потерь при высушивании образца. Кривые измерены в разные моменты времени с интервалом 20 min. Первая (правая) кривая характеризует образец через 20 min после начала опыта, последняя — через 240 min. *b*) Зависимость частоты, соответствующей максимальному значению $\text{tg } \delta$, от модуля импеданса при 20 Hz.

(от примерно 250 до 1 kHz), и уменьшение величины максимума (примерно от 70 до 8). Смещение максимума по частоте достаточно плавное, в то же время резкое уменьшение его величины происходит во временном интервале 140–180 min, т. е. там же, где резко меняется наклон модуля импеданса (рис. 3, *a*).

На рис. 4, *b* в двойном логарифмическом масштабе приведена зависимость частоты, соответствующей максимуму $\text{tg } \delta$, от модуля импеданса (при 20 Hz). Обе прямые имеют наклон, равный -1 с точностью ± 0.02 . Следовательно, имеет место постоянство величины произведения частоты, соответствующей максимуму $\text{tg } \delta$, и Z . Таким образом, частота максимума обратно пропорциональна активному сопротивлению образца. Десятичный логарифм коэффициента пропорциональности в интервале времени 0– ~ 150 min равен 8.2 ± 0.2 , а при больших временах — 8.6 ± 0.1 . Уменьшение частоты максимума потерь при небольшом уменьшении содержания воды в лизоциме наблюдалось ранее в [4]. Авторы связывают этот эффект с уменьшением протонной проводимости. Считая величину ϵ' постоянной, они по

приведенному выше коэффициенту пропорциональности определяли характерную частоту, которая может характеризовать скорость движения носителей заряда или время релаксации имеющихся диполей. В нашем случае действительная часть диэлектрической проницаемости меняется при удалении воды, поэтому подобный вывод сделать нельзя.

Данные рис. 4, *b* не обнаруживают различий между потерей образцом „свободной“ и „связанной“ воды; очевидно, что различие между ними невелико.

3.3. Измерения при охлаждении и последующем нагревании. На рис. 5 показано изменение тангенса угла диэлектрических потерь при снижении температуры от $+5$ до -20°C и последующем нагревании образца. Видно, что в процессе охлаждения при $-6 \div -7^\circ\text{C}$ происходит скачкообразное уменьшение $\text{tg } \delta$ и появляется второй максимум (рис. 5, *a*). Противоположная, но заметно менее резкая картина наблюдается при последующем нагревании (рис. 5, *b*). Зависимость от температуры при охлаждении и нагревании действительной части диэлектрической проницаемости (на частоте 6.67 MHz) представлена на рис. 6, *a*.

Фазовые диаграммы водных растворов низкомолекулярных солей характеризуются отсутствием твердых растворов со стороны льда и наличием эвтектики, температура которой заметно ниже температуры замерзания чистой воды. Поэтому можно было бы ожидать,

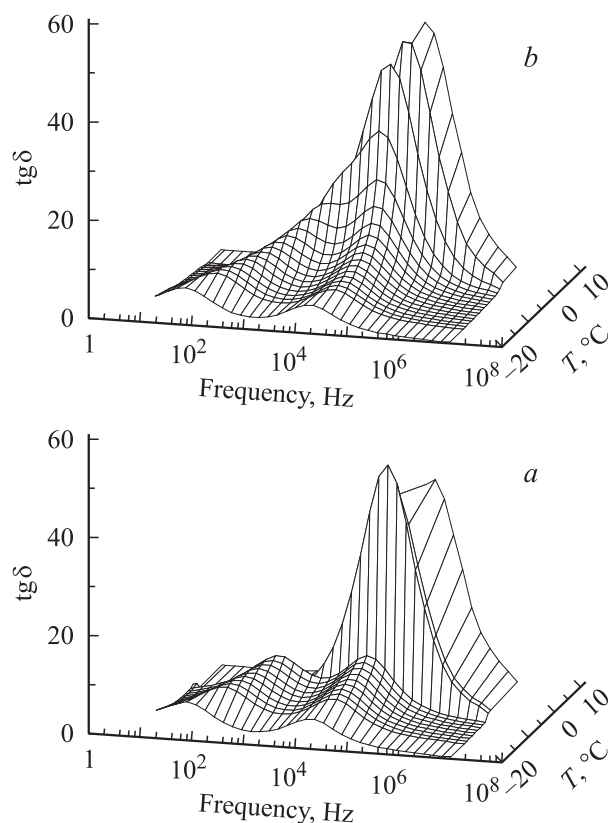


Рис. 5. Зависимость $\text{tg } \delta$ от температуры в интервале частот 20 Hz–10 MHz при охлаждении (*a*) и нагревании (*b*).

что процесс кристаллизации льда будет происходить в достаточно широком температурном интервале; этого, однако, не наблюдается. Переохлаждение образца может быть объяснено трудностью гомогенного образования зародышей льда. Примем, что теплота фазового перехода ($L = 80 \text{ cal/cm}^3$) и свободная поверхностная энергия границы вода–лед ($\alpha = 22\text{--}10 \text{ erg/cm}^2$ [5]) не зависят от температуры и наличия в воде посторонних веществ. Тогда диаметр критического зародыша льда $D_c = 4\alpha/L \ln(T_e/T_c)$ при $T_e - T = 6 \text{ K}$ ($T_e = 273 \text{ K}$) составит $7\text{--}15 \text{ nm}$, а при меньшем переохлаждении он будет еще больше. Таких больших пор в кристалле быть не может; следовательно, не могут возникнуть зародыши льда. Правда, гомогенное образование зародышей льда мало вероятно; скорее всего, они образуются на поверхности молекул белка. Оценить этот эффект трудно, так как нет оценок для выигрыша в свободной поверхностной энергии. Мы измерили кинетику изменения температуры при охлаждении (и последующем нагревании) растворителя (рабочего раствора) и обнаружили, что температура замерзания раствора (после небольшого переохлаждения) была такой же, как и в кристаллах (рис. 7). Эта температура ($\sim -6.5^\circ\text{C}$), очевидно, яв-

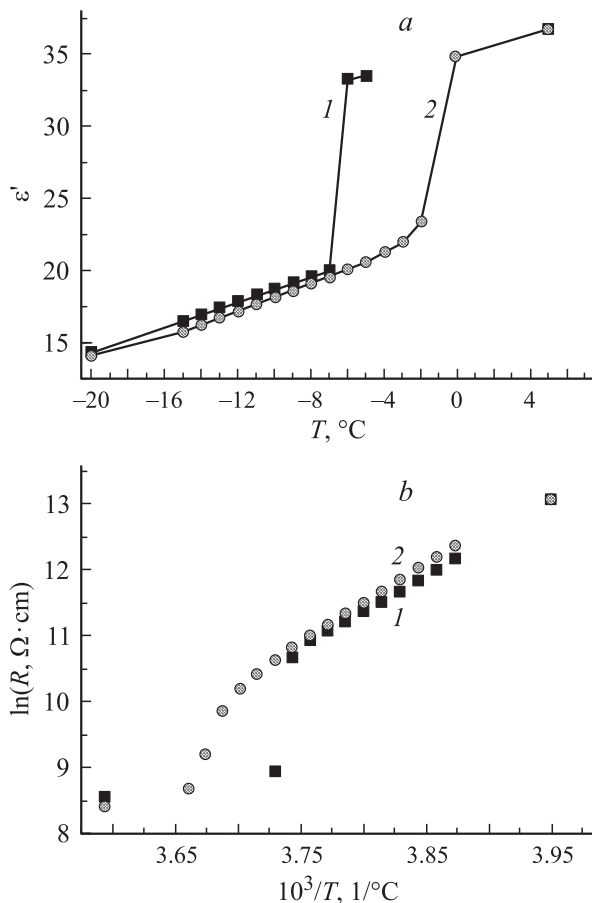


Рис. 6. Изменение диэлектрической проницаемости образца на частоте 6.67 MHz (*a*) и его удельного сопротивления на частоте 20 Hz (*b*) при охлаждении (1) и нагревании (2).

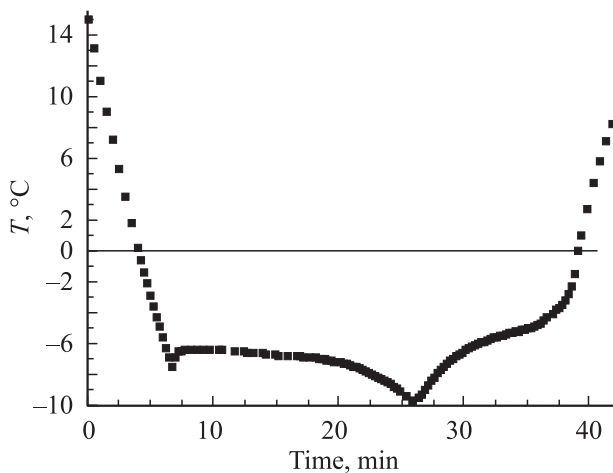


Рис. 7. Изменение температуры рабочего раствора в процессе охлаждения и последующего нагревания. 2 cm^3 раствора охлаждали в холодильнике при -18°C , нагревание проводили при комнатной температуре.

ляется температурой эвтектики. Трудно дать разумное объяснение факту совпадения температуры эвтектики раствора в кристалле и в свободном состоянии.

При нагревании образца плавление льда и растворение в образовавшейся воде всей закристаллизованной соли должны происходить при постоянной (эвтектической) температуре, и лишь затем температура должна повышаться, а концентрация солей уменьшаться до исходной. Конец плавления льда наблюдался в кристаллах около 0°C (рис. 6), а в растворе — при $-2\text{--}3^\circ\text{C}$ (рис. 7). Возможно, что и кристаллы, и раствор нагревались слишком быстро, и лед не успевал плавиться.

На рис. 6, *b* показана зависимость логарифма удельного сопротивления образца на частоте 20 Hz от обратной абсолютной температуры. В области существования льда эти кривые линейны, что как будто позволяет определить энергию активации проводимости. Она практически не отличается для процессов нагревания и охлаждения и составляет 22.8 ± 0.5 и $22.0 \pm 0.3 \text{ kcal/mol}$ соответственно. Аналогичные кривые получены и при высокой частоте (6.67 MHz). В этом случае энергия активации была меньше: $13.0 \pm 0.2 \text{ kcal/mol}$ при нагревании и $13.2 \pm 0.1 \text{ kcal/mol}$ при охлаждении.

На рис. 8 представлены данные об изменении модуля импеданса и угла диэлектрических потерь при охлаждении и последующем нагревании образца. Они дополняют информацию рис. 6 и 7 и приводят к тем же выводам. После замерзания воды в кристалле можно рассматривать существование в системе двух фаз: замерзшей воды и обезвоженного кристалла. Об этом свидетельствуют два максимума $\text{tg } \delta$ (рис. 5) и две дуги на диаграмме Коула–Коула (рис. 8). Форма этих дуг хорошо аппроксимируется окружностями радиусами $15.0 \pm 0.2 \text{ k}\Omega$ для левой дуги и $20.7 \pm 0.2 \text{ k}\Omega$ для правой. Центр обеих окружностей смещен вниз от оси абсцисс

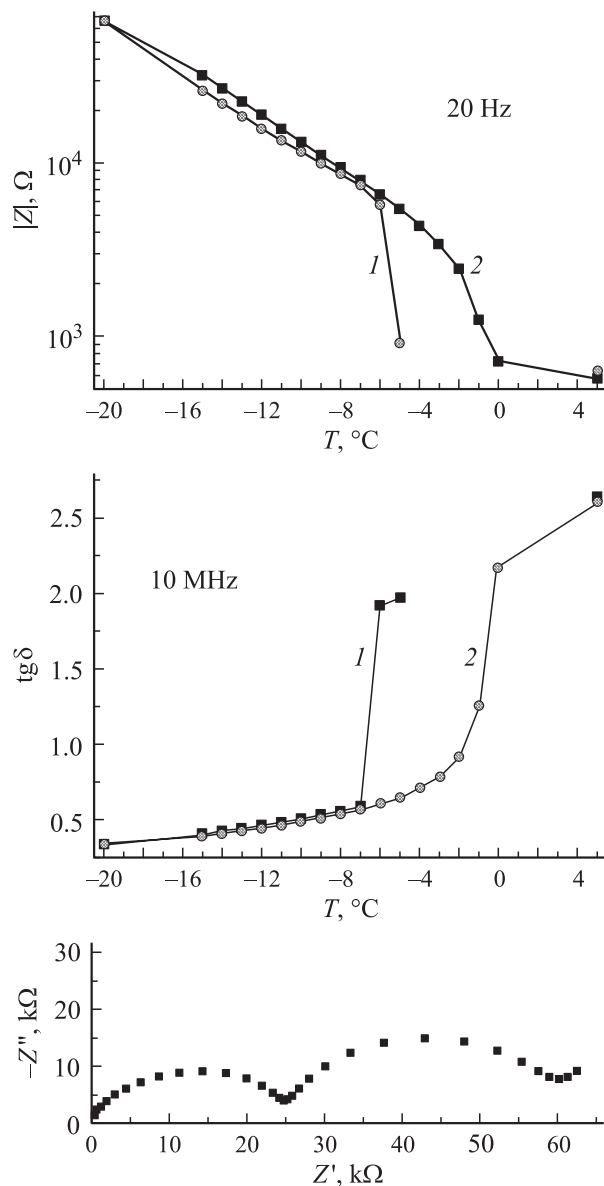


Рис. 8. Диэлектрические характеристики образца при охлаждении (1) и нагревании (2). Внизу приведена диаграмма Коула—Коула для образца при -20°C .

на одно и то же расстояние $5.9 \text{ k}\Omega$. Представляется, что низкочастотный максимум на рис. 5 характеризует белок, поскольку процесс обезвоживания белка также сопровождается сдвигом максимума диэлектрических потерь в область низких частот (рис. 4), а высокочастотный максимум характеризует лед.

Остановимся теперь на величине диэлектрической постоянной кристаллов моноклинного лизоцима. Принято считать, что для белков эта величина составляет порядка 3–5 [6, с. 173–174]. В то же время известно, что для льда на частоте 1 МГц при -10°C $\epsilon' = 3$ [7]. Из рис. 6 видно, что наш образец имел $\epsilon' \approx 20$ при -10°C , а при $+5^{\circ}\text{C}$ $\epsilon' \approx 37$. Иными словами, при низких температурах диэлектрическая постоянная образца была больше, чем у

льда, а при плюсовых температурах — меньше чем у воды. Точно определить диэлектрическую постоянную белка, основываясь на этих цифрах, нельзя, но можно утверждать, что она лежит между 20 и 37.

4. Заключение

Интерпретация диэлектрических спектров без использования эквивалентных схем в подавляющем большинстве случаев, к сожалению, невозможна. Такие схемы легко предложить, но трудно обосновать их адекватность реальности. Поэтому мы, как правило, пользовались величинами, непосредственно измеряемыми прибором: сдвигом фаз между приложенным напряжением и измеряемым током (тангенс угла диэлектрических потерь), а также отношением амплитуд напряжения и тока (модуль импеданса). Результатом такого подхода могут быть лишь качественные выводы. С учетом изложенного нам представляется, что:

1) две трети воды, содержащейся в структуре кристаллов моноклинного лизоцима, не отличаются по свойствам от обычной воды, оставшаяся треть связана с молекулами белка, но различие между обеими частями невелико;

2) содержание ионов в воде внутри кристалла меньше, чем в окружающем растворе;

3) диэлектрическая постоянная белка на высоких частотах больше, чем предполагалось ранее ($\gg 3-5$).

Обнаружены некоторые закономерности в поведении диэлектрических спектров. В частности, при потере воды кристаллами частота, соответствующая максимуму $\text{tg } \delta$, обратно пропорциональна активному сопротивлению образца; после заморозания воды в кристаллах энергия активации проводимости составляет 22 kcal/mol при 20 Hz и 13 kcal/mol при 6.67 MHz.

Авторы благодарят Б.А. Струкова за полезные консультации, А.М. Лотонова и Н.Д. Гаврилову за содействие в проведении опытов.

Список литературы

- [1] A.B. Kudryavtsev, G. Christopher, C.D. Smith, S.B. Mirov, W.M. Rosenblum, L.J. DeLucas. *J. Cryst. Growth* **219**, 102 (2000).
- [2] С.И. Аксенов. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов. Институт компьютерных исследований, М.—Ижевск (2004). 212 с.
- [3] Е.В. Петрова, В.А. Смирнов, Л.Н. Рашкович. *Кристаллография* **52**, 255 (2007).
- [4] G. Careri, M. Geraci, A. Giansanti, J.A. Rupley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5342 (1985).
- [5] Ю.В. Найдич, В.М. Перевертайло, Н.Ф. Григоренко. Капиллярные явления в процессах роста и плавления кристаллов. Наук. думка, Киев (1983). 100 с.
- [6] D. Voet, J.G. Voet. *Biochemistry*. J. Wiley & Sons. N.Y.—Chichester—Brisbane—Toronto—Singapore (1995). 1360 p.
- [7] Н. Маэно. Наука о льде. Мир, М. (1988). 229 с.