

В. Г. ЯКОВЛЕВ

## ГИДРОЛИЗУЕМОСТЬ БЕЛКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АСИММЕТРИИ ЕГО МОЛЕКУЛ

(Представлено академиком К. И. Скрябиным 3 II 1948)

На основе представлений, развиваемых С. Е. Бреслером и Д. Л. Талмудом<sup>(1)</sup>, о природе глобулярных белков и дальнейших работ Д. Л. Талмуда и сотрудников<sup>(2)</sup>, показавших зависимость конфигурации глобулы от свойств растворителя, ими сделаны важные выводы.

Во-первых, форма глобулярной молекулы в растворе должна непрерывно меняться в широких пределах при изменении состава и, следовательно, свойств растворителя; эти изменения формы должны быть в определенных пределах вполне обратимы.

Во-вторых, при изменении формы глобулы, а следовательно, и ее поверхности, без изменения объема, по необходимости обнажаются химические группы, до этого находившиеся внутри глобулы или экранированные.

Лакком<sup>(3)</sup> в 1945 г. было установлено, что ферментативный гидролиз сывороточного альбумина человека папаином резко возрастает при растворении альбумина в крепких растворах мочевины. Нейратом<sup>(4)</sup> определены изменения формы молекулы в различных концентрациях мочевины. Талмудом и сотрудниками<sup>(5)</sup>, на основе данных Лакка и Нейрата, показана зависимость скорости ферментативного гидролиза от приращения поверхности белковой глобулы вследствие растрескивания ее.

К. И. Страцицким и М. П. Черниковым<sup>(6)</sup> получены чрезвычайно интересные данные при изучении расщепляемости папаином нативного денатурированного и ренатурированного кристаллического альбумина лошадиной сыворотки. Из этих измерений можно вывести дополнительное следствие. Под влиянием денатурирующих средств могли наступать структурные изменения не только белка субстрата, но и фермента, могущие вызвать изменение активности последнего. Следовательно, можно представить, что атакуемость белка протеолитическим ферментом происходит не только за счет изменения белка субстрата, но и за счет изменения фермента. Было интересно выяснить, изменяется ли расщепляемость денатурированной мочевиной глобулярного белка кислотами и щелочами. В этом случае изменение скорости гидролитического распада должно быть связано только изменению свойств белкового субстрата.

В качестве объекта исследования применялся яичный глобулин, получаемый из свежих куриных яиц<sup>(7)</sup>. Гидролиз его велся в буферных фосфатных смесях по Мак-Ильвину (рН=2,6) и по Рингеру (рН=10,97) при температуре 38,5°C, в ультратермостате по Геплеру; колебания температуры не превышали  $\pm 0,05^\circ$ . Денатурирующим средством

служила мочевины в количестве 9, 18, 36 г на 1 г белка в 100 см<sup>3</sup> смеси. Степень асимметрии белковой молекулы вычислялась из измерений относительной вязкости в вискозиметре Оствальда, по уравнению Симха (8).

Таблица 1

Прирост в мг аминного азота на 1 г глобулина

(Условия опыта: а — концентрация глобулина 1%, рН = 2,6 (фосфатный буфер), температура  $38,5 \pm 0,05^\circ \text{C}$ ; б — концентрация глобулина 1%, рН = 10,97, температура  $38,5 \pm 0,05^\circ$ )

|                                 | 6 час. |       | 12 час. |       | 18 час. |       | 24 часа |       |
|---------------------------------|--------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
|                                 | а      | б     | а       | б     | а       | б     | а       | б     |
| Нативный белок + 36 г мочевины  | 19,27  | 23,22 | 24,01   | 24,83 | 26,70   | 24,83 | 28,70   | 24,83 |
| То же + 18 г мочевины . . . . . | 13,20  | 5,90  | 18,16   | 8,05  | 20,20   | 8,86  | 20,30   | 8,86  |
| » » + 9 » » . . . . .           | 6,80   | 1,47  | 10,88   | 3,76  | 16,70   | 4,03  | 16,80   | 4,03  |
| » » . . . . .                   | 2,10   | 0,00  | 4,35    | 0,15  | 7,10    | 0,67  | 7,50    | 0,94  |

За ходом гидролиза следили путем определения количества аминного азота медным способом (9). Результаты исследований представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 2

| % мочевины | Кислотный гидролиз |       |               | Щелочной гидролиз |       |               |
|------------|--------------------|-------|---------------|-------------------|-------|---------------|
|            | $v$                | $b/a$ | $(b/a)^{1/3}$ | $v$               | $b/a$ | $(b/a)^{1/3}$ |
| 36         | 2,86               | 21,22 | 2,86          | 7,76              | 12,6  | 2,32          |
| 18         | 1,23               | 11,70 | 2,27          | 0,93              | 7,4   | 1,94          |
| 9          | 0,75               | 9,60  | 2,12          | 0,33              | 6,7   | 1,88          |
| 0          | 0,33               | 7,50  | 1,95          | 0,05              | 6,2   | 1,83          |

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что расщепляемость нативного глобулина при кислотном и особенно щелочном гидролизе очень мала и сильно возрастает в присутствии мочевины. С увеличением концентрации мочевины увеличивается расщепляемость глобулина как при кисло-

м, так и при щелочном гидролизе. Это наглядно иллюстрируется кривыми на рис. 1, построенном по данным опытов. Проведя касательные при начальных условиях, находим  $\text{tg } \alpha$  или начальную скорость гидролиза  $v$ , так как  $\Delta c/\Delta t = \text{tg } \alpha = v$ .

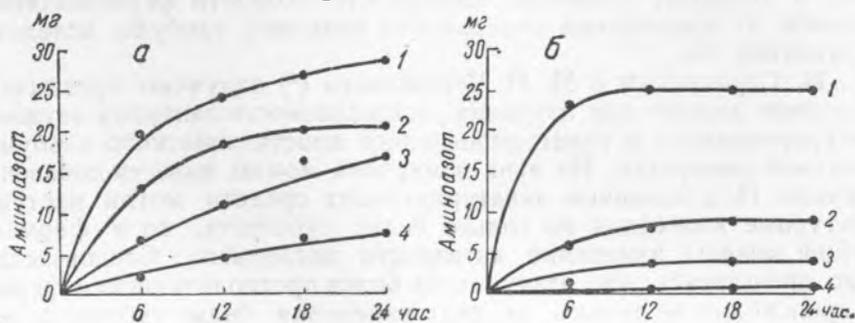


Рис. 1. Зависимость скорости гидролиза яичного глобулина от концентрации мочевины: а — кислотного, б — щелочного. 1 — нативный белок в 36% мочевины, 2 — нативный белок в 18% мочевины, 3 — нативный белок в 9% мочевины, 4 — нативный белок

Из определений относительной вязкости была вычислена степень асимметрии белковой молекулы ( $b/a$ ) при разных концентрациях мочевины. Можно легко показать, что увеличение поверхности глобулы (в первом приближении) пропорционально кубическому корню из увеличения степени асимметрии. Сопоставляя начальные скорости

реакции  $v$  с величиной приращения поверхности молекулы, т. е.  $(b/a)^{1/2}$  (табл. 2 рис. 2 (кислотный гидролиз) и рис. 3, (щелочной гидролиз))

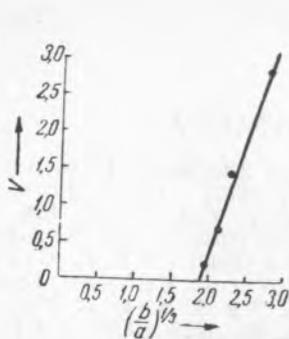


Рис. 2

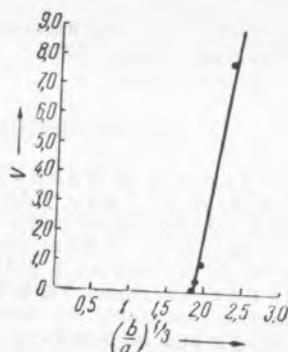


Рис. 3

мы видим, что скорость гидролиза линейно зависит от поверхности молекулы. По мере вытягивания молекулы пептидные связи становятся менее устойчивыми. Гидролиз молекулы глобулина прекращается задолго до превращения ее в строго шарообразную.

К. И. Страчицкий<sup>(10)</sup> показал, что изменение энзиматической устойчивости связано с изменением вязкости, т. е. с изменением асимметрии молекулы белка, а также с изменением оптической активности и количеством определяемых сульфгидрильных групп. Это указывает на близость механизмов кислотного, щелочного и энзиматического гидролиза и общность факторов, влияющих на кинетику этих процессов.

По данным опытов К. И. Страчицкого и М. П. Черникова<sup>(6)</sup> и К. И. Страчицкого<sup>(10)</sup> нами вычислены скорости гидролиза, степень асимметрии и увеличение поверхности молекулы (в первом приближении). Все эти данные приведены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Зависимость скорости ферментативного гидролиза нативного и денатурированного кристаллического альбумина лошадиной сыворотки от конфигурации молекулы (по данным Страчицкого и Черникова)

| Концентрация мочевины в молях | $v$  | $b/a$ | $(b/a)^{1/2}$ |
|-------------------------------|------|-------|---------------|
| 6                             | 26,0 | 13,0  | 2,35          |
| 4                             | 8,0  | 7,0   | 1,91          |
| 2                             | 1,6  | 6,3   | 1,84          |
| 0                             | 0,2  | 5,6   | 1,77          |

Таблица 4

Зависимость изменения реактивности сульфгидрильных групп и пептидных связей от изменения конфигурации молекул в кристаллическом яичном альбумине при денатурации (по данным Страчицкого)

| Концентрация мочевины в г на 1 мл смеси | SH-группа в % пистеина | $v$  | $b/a$ | $(b/a)^{1/2}$ |
|---|------------------------|------|-------|---------------|
| 1,00                                    | 0,93                   | 1,83 | 26,2  | 2,97          |
| 0,75                                    | 0,69                   | 1,36 | 21,6  | 2,78          |
| 0,50                                    | 0,34                   | 0,83 | 9,6   | 2,12          |
| 0,25                                    | 0,07                   | 0,13 | 5,6   | 1,77          |
| 0,00                                    | 0,04                   | 0,13 | 4,8   | 1,68          |

Сопоставляя начальные скорости  $v$  ферментативного гидролиза с величиной приращения поверхности молекулы, т. е.  $(b/a)^{1/2}$ , получаем линейную зависимость скорости ферментативного гидролиза от величины поверхности молекулы.

Таким образом, удалось экспериментально показать резкое увеличение начальной скорости кислотного и щелочного гидролиза под действием мочевины как денатурирующего агента.

Пользуюсь случаем выразить благодарность П. В. Афанасьеву за ценные указания и содействие в работе.

Биологический институт Киргизского филиала  
Академии Наук СССР  
г. Фрунзе

Поступило  
1 II 1948

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> С. Е. Бреслер и Д. Л. Талмуд, ДАН, 43, 326 (1944). <sup>2</sup> П. В. Афанасьев, Б. А. Талмуд и Д. Л. Талмуд, ДАН, 55, № 7 (1947). <sup>3</sup> R. C. Rice, G. A. Ballou, P. D. Boyer, J. M. Luck and F. G. Lum, J. Biol. Chem., 158, 609 (1945). <sup>4</sup> H. Neurath and A. M. Saum, *ibid.*, 128, 347 (1939). <sup>5</sup> П. В. Афанасьев, Б. А. Талмуд и Д. Л. Талмуд, ДАН, 55, № 8 (1947). <sup>6</sup> К. И. Страчицкий и М. П. Черников, Биохимия, 12, 4, 277 (1947). <sup>7</sup> Л. Броуде, Краткое руководство при практич. занятиях по биол. химии. <sup>8</sup> R. Simha, J. Phys. Chem., 44, 25 (1940). <sup>9</sup> C. Pore and M. Stevens, Biol. J., 33, 1070 (1939). <sup>10</sup> К. И. Страчицкий, ДАН, 58, № 7 (1947).