

## О РОЛИ ВОДОРОДНОЙ СВЯЗИ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ ИОНОВ БЕЛКАМИ

*E. A. Бауман*

Целью настоящей работы является сравнительное изучение связывания анионных комплексов тяжелых металлов нативными и измененными белками и уточнение механизма происходящих при этом процессов, в частности, выяснение роли водородной связи при связывании ионов белками, учитывая большое физиологическое и техническое значение этой проблемы [1—6].

### Экспериментальная часть

Йодирование белков проводилось в мягких условиях в слабо аммиачной среде [7], с контролем по реакции Миллона. Затем йодированные белки (бычий альбумин,  $\beta$ -лактоглобулин и бычий  $\gamma$ -глобулин) диализировались. Определение содержания йода производилось по методу Шиффа [8].

Величина связывания анионного комплекса триоксалатоферриата калия измерялась на йодированных белках и ряде нативных белков: инсулине, казеине,  $\beta$ -лактоглобулине, бычьем альбумине, бычьем  $\alpha + \beta$ -глобулине, альбумине сыворотки лошади, бычьем  $\gamma$ -глобулине, яичном альбумине и глиадине.

Методика осаждения белков комплексами и определения величины связывания комплекса белком была следующей. Реакционные смеси получались добавлением исследуемого комплекса к раствору белка при pH около 3,0 (достигавшемся при помощи раствора уксусной кислоты). Образовавшийся осадок белка немедленно отделяли центрифугированием, отмывали 4—5 раз водой, контролируя промывные воды по реакции на центральный ион комплекса (в случае оксалатоферриата, подверженного заметной диссоциации — непосредственно ферриоцианидом калия, в случае оксалатохромиата — при помощи окисления комплекса в бихромат), затем промывали 2 раза алкоголем и 2 раза эфиром, после чего высушивали в вакууме над серной кислотой до постоянного веса. Затем производили определение содержания комплекса в осадке и в некоторых случаях сравнивали содержание азота в осадке и в исходном белке. Для определения величины связывания оксалатоферриата находили количество железа в остатке от прокаливания белка по методу Маргерита и колориметрически. Кроме того, определяли также содержание оксалатного иона в белке, осажденном оксалатоферриатом калия, для чего осадок дважды обрабатывали 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты и в экстракте определяли ион оксалата манганометрически на холоду. Результаты различных методов определения величины связывания железоз содержащих комплексов хорошо совпадали между собой. Во всех сериях определений концентрации белков комплексов равнялись 1%. Содержание иона в йодированных белках составляло: в  $\beta$ -лактоглобулине — 3,9%, в бычьем альбумине — 4,2% и в бычьем  $\gamma$ -глобулине — 4,1%.

Влияние йодирования белков на величину связывания комплекса белками видно из табл. 1.

Определение связывания аниона оксалатохромиата калия было проведено нами для очищенных нативных белков: инсулина, бычьего альбу-

Таблица 1

**Величина связывания комплексного аниона  
триоксалатоферриата калия нативными и йоди-  
рованными белками**

Наименование белка	Величина связывания (содержание железа в сухом белке, %)	
	нативный белок	йодирован- ный белок
Инсулин	1,6	—
Казеин	1,51	—
β-лактоглобулин	1,35	1,62
Бычий альбумин	1,06	1,41
Бычий $\alpha + \beta$ -глобулин	1,05	—
Альбумин сыворотки лошади	1,02	—
Бычий $\gamma$ -глобулин	0,93	1,25
Яичный альбумин	0,56	—
Глиадин	0,40	—

мина, бычьего  $\alpha + \beta$ -глобулина и альбумина сыворотки лошади. Определение хрома в белке производилось калориметрически в виде бихромата. Приводим полученные данные.

	%
Инсулин . . . . .	1,7
Бычий альбумин . . . . .	1,1
Бычий $\alpha + \beta$ -глобулин . . . . .	1,1
Альбумин сыворотки лошади . . . . .	1,07

Нами были также проведены две серии опытов определения связывания комплекса триоксалатоферриата калия альбумином сыворотки лошади и яичным альбумином по методу равновесного диализа с учетом доннановского эффекта. Опыты проводились при 18°. Результаты опытов приведены ниже.

**Величины связывания альбумином сыворотки лошади:**

Концентрация комплекса, моль/л . . .	0,005	0,010	0,015
Величина связывания в молях комплекса на $10^5$ г белка . . . . .	50	63	67

**Величины связывания яичным альбумином:**

Концентрация комплекса, моль/л . . .	0,001	0,002	0,004
Величина связывания в молях комплекса на $10^5$ г белка . . . . .	3,1	7,3	13,1

**Обсуждение результатов**

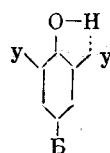
По литературным данным [1, 2] сильно связываемые анионы могут нарушать внутренние связи между катионным азотом и другими функциональными группами белка. К числу таких анионов относятся и исследованные нами комплексные ионы  $[Fe(C_2O_4)_3]^3$  и  $[Cr(C_2O_4)_3]^3$ . При сопоставлении данных о связывании этих анионов нативными белками (табл. 1) с процентным содержанием основных аминокислот в белках (табл. 2) удается установить достаточное соответствие между этими величинами, что подтверждает невозможность влияния связывания анионов на разрыв связей между катионным азотом и другими функциональными группами белка; заметные отклонения наблюдаются лишь для инсулина.

Таблица 2

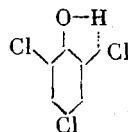
## Содержание основных аминокислот в некоторых белках

Белок	Содержание основных аминокислот, % (гистидина, орнитина и лизина)
Инсулин	15,01 (9)
Казеин	15,40 (9)
$\beta$ -лактоглобулин	14,18 (9)
Альбумин сыворотки крови	12,9 (14)
$\gamma$ -глобулин (человека)	15,40 (6)
Яичный альбумин	12,11 (15)
Глиадин	6,59 (9)

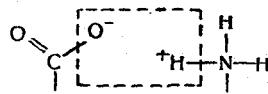
При йодировании белков можно ожидать возникновения водородной связи между фенольной группой и введенным в ядро галоидом, как это изображено на следующей схеме:



Возникающие в данном случае пятичленные циклы должны обладать повышенной прочностью. Аналогичное образование водородных связей между фенольным гидроксилом и хлором найдено для 2, 4, 6-трихлорфенола (3):



Блокировка фенольных гидроксилов путем введения в белок йода должна была ослабить прочность водородных связей между гидроксильными и карбоксильными группами белка и соответственно усилить взаимодействие последних с катионными группами белка (4):



В этом случае результатом йодирования белка явилось бы сокращение или по крайней мере постоянство числа активных групп основного характера, т. е. уменьшение (или постоянство) величины связывания простых анионов. Однако из табл. 1 видно, что в результате йодирования белка фиксация комплексных анионов триоксалатоферриата усиливается. Причину этого можно найти в участии других функциональных групп йодированного белка, например йодированных остатков тирозина в связывании комплексного аниона.

Как известно, диссоциацию фенольных групп тирозина можно резко повысить путем йодирования (5); вместе с тем триоксалатоферриат калия представляет комплекс, в котором между атомом железа и аддендами действуют электростатические силы притяжения и поэтому его адденды довольно быстро вступают в обмен с окружающей средой (11, 12). Вследствие этого естественно допустить внутрисферное взаимодействие этого комплексного аниона с сильноионизированными остатками йодированного тиро-

зина белка, как обладающее повышенной прочностью (12). Известно также образование прочных комплексных соединений железа с фенолами (13). Таким образом, взаимодействие, обусловленное координацией железом иона триоксалатоферриата может действительно привести к дополнительной фиксации его йодированным белком.

Так как механизм связывания комплексных анионов включает в себя реакцию со всеми катионными группами белка, освободившимися после нарушения комплексными ионами водородных связей в белке, то блокировка водородными связями функциональных групп белка, очевидно, не влияет на величину связывания комплексных анионов. Поэтому результаты наших исследований связывания комплексных анионов резко отличаются от данных о связывании белками простых анионов, полученных Клотцем (1, 2), по мнению которого блокировка белковых групп водородными связями оказывает сильное влияние на величину связывания простых анионов белками.

Считаю своим долгом выразить свою глубокую благодарность А. И. Опарину за весьма ценные советы и помочь, оказанные мне в работе.

### Выводы

Исследование связывания комплексных анионов триоксалатоферриата и триоксалатохромиата нативными и йодированными белками показало, что величина связывания находится в соответствии с числом основных групп белковой молекулы. Показано, что полученные данные противоречат представлениям Клотца о роли водородных связей во взаимодействии анионов с белками.

Винницкий медицинский  
институт

Поступила в редакцию  
15 III 1960

### ЛИТЕРАТУРА

1. И. К л о т ц, Аминокислоты и белки, ИЛ, 1952, стр. 212, 215.
2. И. К л о т ц, Белки, т. II, Физико-химия белковых веществ, ИЛ, 1956, стр. 577.
3. Л. П а у л и н г, Природа химической связи, ИЛ, 1947.
4. О. П у т н е м, Белки, т. II, Физико-химия белковых веществ, ИЛ, 1956, стр. 687.
5. В. А. Б е л и ц е р, Е. Л. Х од о р о в а, Актуальные вопросы современной биохимии, I, 280, 1959.
6. В. Б. О р е х о в и ч, Белки в промышленности и сельском хозяйстве. Конференция по белку, Изд. АН СССР, 1952, стр. 19.
7. F. Blum, E. Strauss, Z. Physiol. Ch., 27, 199, 1923.
8. Г. М а и е р, Анализ и определение строения органических веществ, 1953, 138.
9. А. Г. П а сы н с к и й, Усп. химии, 14, 510, 1945.
10. О. Паули, О. Валько, Коллоидн. химия белковых веществ, гл. III, 1936.
11. А. А. Г р и н б е р г, Введение в химию комплексных соединений, 1945, 285.
12. А. Н. М и х а и л о в, Химия дубящих веществ и процессы дубления, Гизлэг-пром, 1953, стр. 153, 294.
13. А. В е р н е р, Новые взгляды в области неорганич. химии, 1936, стр. 128, 284.
14. C. Schmidt, O. Calverly, The chemistry of aminoacids and proteins, 1938.
15. F. Chibnall, Proc. Roy. Soc. 131, 862, 1942.

### THE ROLE OF THE HYDROGEN BOND IN THE LINKING OF IONS TO PROTEINS

E. A. Baumann

### Summary

The linking of the complex anions ferritrioxalates and chromitrioxalates to native and iodinated proteins has been investigated. The degree of binding has been shown to be related to the number of basic groups in the protein molecule.

The concept regarding the mechanism of linkage of complex anions developed by the author is in disagreement with that of Clotz in which the degree of binding of the anions is considered to be affected by the mutual screening of the protein groups by hydrogen bonds.