

ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БЕЛКОВ ИЗ ИКРЫ СЕВРЮГИ (*ACIPENSER STELLATUS* P.)

В. В. Феофилактов и П. П. Карпов

(Лаборатория жиров и белков. Руководитель лаборатории В. В. Феофилактов)

THE CHARACTERISTIC OF THE PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF PROTEINS IN THE EGGS OF *ACIPENSER STELLATUS*

By Feofilaktov V. V. and Karpov P. P.

Наши сведения относительно состава и свойств белков икры рыб далеко не полны. В литературе имеются, правда, указания относительно их состава: G. Walter (2)—икра карпа, P. A. Levene (3)—икра трески, O. Hammersten (7)—икра окуня, Steudel и др. (4, 5, 6)—сельди, J. König и J. Grossfeld (8)—икра осетра и др., однако данные эти далеко не полны, часто не характеризуют отдельных фракций белков, особенно присутствующих в малых количествах альбуминов. Поэтому систематическое изучение этих белков по отдельным породам, исследование химического состава и физико-химических свойств отдельных входящих в состав икры белков представляет значительный интерес.

В настоящей работе мы хотели бы привести добытые нами данные, касающиеся некоторых физико-химических свойств растворимых белков—ихтулина и альбумина икры севрюги. Работа проводилась над совершенно свежей икрой в лаборатории промысла им. Нариманова (Азрыба) в октябре 1934 г.

Ихтулин и альбумин, представляя главную, если не всю, массу растворимых белков икры, содержатся в свежей икре севрюги в следующих количествах: ихтулина 17—18%, альбумина от 2 до 2,5%.

ИХТУЛИН

Выделение ихтулина можно легко осуществить, пользуясь его растворимостью в водных растворах нейтральных солей (например NaCl) и его способностью выпадать из солевых растворов при достаточном разбавлении их водой. Повторным переосаждением можно получить достаточно чистые препараты ихтулина. Для наших опытов ихтулин переосаждался не менее четырех раз.

Концентрация NaCl, достаточная для удержания ихтулина в растворе, оказывается 3%. Такие растворы даже после многократных и тщательных фильтрований представляют слегка опалесцирующие

жидкости, постепенно мутнеющие при стоянии, а при взбалтывании (даже осторожном переливании) — выделяющие некоторое количество сгустков в результате легкого денатурирования ихтулина. Эта малая стойкость растворов ихтулина очень затрудняет работу.

Определение границ высаливания проводилось с раствором ихтулина в 5% NaCl, и границы высаливания сернокислым аммонием оказались 3,4—6,0. Как видно, верхняя и нижняя границы высаливания сильно раздвинуты, и это заставляет подозревать, что эта фракция белка не вполне однородна.

Определение температуры свертывания. Так как солевые растворы ихтулина не вполне прозрачны и момент свертывания при нагревании не может быть точно отмечен по появлению мути, то была сделана попытка определить эту температуру вискозиметрическим путем (W. Ostwald, H. Chick и. Martin (9,10), хотя согласно воззрениям W. Pauli (11) связь между тепловой коагуляцией и изменением вязкости еще не достаточно ясна, да и само понятие „температура свертывания“ является условным, так как свертывание белка представляет мономолекулярную реакцию с чрезвычайно большим температурным коэффициентом.

Из многочисленных опытов, имеющих целью установить также влияние различных концентраций NaCl на температуру свертывания, мы даем ниже кривую изменения с температурой вязкости 0,2% ихтулина в 4% NaCl — сплошная линия. (Ось абсцисс — температура, ось ординат — время истечения в секундах).

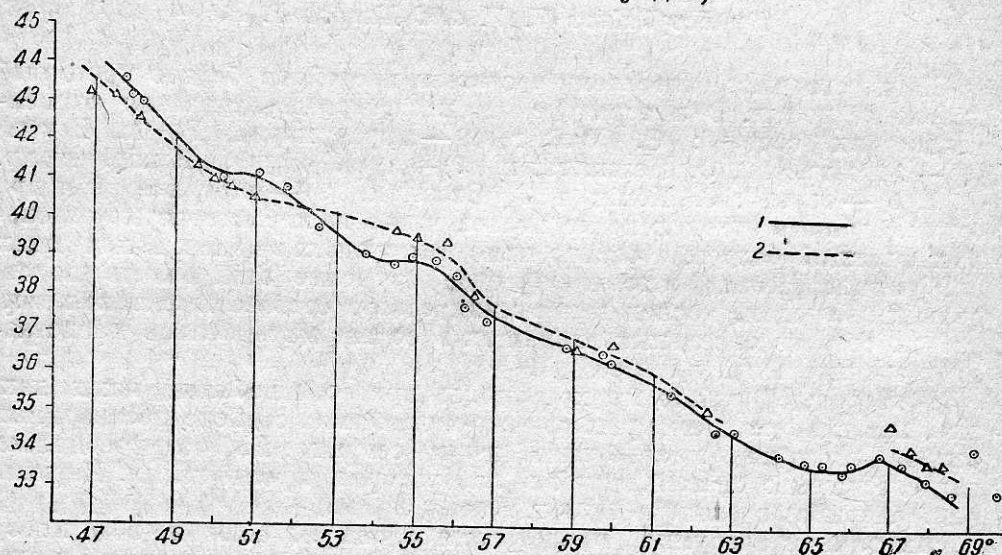


Рис. 1. Кривые изменения вязкости ихтулина

1—опыт № 6—0,2% раствор ихтулина в 4% NaCl; 2—опыт № 6 bis—тот же раствор предварительно был нагрет (во время опыта № 6) до 57,6°, охлажден до комнатной температуры и через 2 часа послужил для опыта № 6 bis.

Эта кривая уже непосредственно (без перечислений) обнаруживает несколько максимумов (51°, 55,5°, 66,8°). Второй максимум соответствует температуре свертывания, так как в этом интервале температуры отмечается усиление мутности. Температура свертывания для данного раствора таким образом будет 55,5°. Вторая, пунктирная, кривая представляет изменения с температурой вязкости того же самого раствора, но предварительно нагретого до 57,6°, охлажденного и подвергнутого вновь вискозиметрии. Несовпадение обеих кривых в интервале температур до 57,6° говорит за необратимость измене-

ний, происходящих с ихтулином в таком растворе при нагревании его до 57,6°. Максимум при 67° указывает на какие-то дальнейшие изменения, происходящие в системе, или на коагуляцию какой-то фракции ихтулина, а может быть связан с выпадением денатурированного ихтулина в виде хлопьев, так как в этом интервале наблюдается действительно хлопьеобразование. рН раствора до опыта 6,32, а после опыта 6,13.

Определение изоэлектрической точки. Эта важная для характеристики белка константа была определена по методу оптимума коагуляции, предложенному Михаэлисом и Рона (12). Метод этот достаточно прост и точен, особенно в сопровождении потенциометрической проверки, но в присутствии значительного количества солей дает не вполне правильные результаты (13,14), показывая оптимум осаждения в более кислой области.

Для исследования применялся раствор ихтулина в водном растворе NaCl. Хотя ихтулин и растворяется в NCH_3COONa , но при разбавлении водой (1:10) полностью выпадает в осадок, поэтому этот способ, примененный Z. Michaelis и H. Rechstein (15) к казеину, оказался здесь не применимым. Воспользоваться легкой растворимостью ихтулина в щелочах или кислотах, как это было использовано Михаэлисом для эдестина (16), нам казалось рискованным ввиду чрезвычайно легко наступающей денатурации ихтулина в растворе.

Таблица 1

Опыт с ацетатными буферными растворами

	Номер пробирки							Примечание
	1	2	3	4	5	6	7	
N/10 $\text{CH}_3\text{COO Na}$, см ³ . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
N/10 CH_3COOH см ³ . . .	0,5	1,0	2,0	—	—	—	—	
N/1 CH_3COOH , см ³ . . .	—	—	—	0,4	0,8	1,6	3,2	
Вода, см ³	2,5	2,0	1,0	2,6	2,2	1,4	—	
Испытуемый раствор . .	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	
рН измеренное	—	—	—	3,87	3,57	3,26	2,88	рН измерено водородным электродом
Эффект через 5 мин.	—	—	—	—	—	++	++	+ означает помутнение
через 60 мин.	—	—	—	—	++	××	××	× означает хлопьеобразование

Испытуемый раствор: 0,062% ихтулина в 5%-ном растворе NaCl; при взятии его 6,0 см³ на общий объем 10,0 см³ концентрация в пробирках будет соответственно 0,037% ихтулина и 3% NaCl.

Во всем ряду таким образом соблюдено условие постоянства концентрации электролитов (кроме пробирки № 7, где объем равен 10,2 см³ вместо 10,0 см³).

Настоящий опыт при повторении дал совершенно ту же картину. Ввиду неожиданно малого осаждающего значения рН и того, что эти значения лежат на границе значений, воспроизводимых ацетатной смесью, было необходимо, с одной стороны, проверить эти результаты на повторных опытах, а, с другой,—уточнить на более кислой буферной смеси.

В условиях работы на промысле из таких более кислых смесей удалось составить только „цитратную“ смесь Зеренсена, хотя цитратная смесь по Михаэлису (17) и не вполне надежна для подобных

целей в силу способности лимонной кислоты давать недиссоциирующие соединения вообще, а в том числе, по видимому, и с белками.

Таблица 2

Опыт с цитратными буферными растворами

	Номер пробирки										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Цитрат, см ³	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
N/10 HCl, см ³	0,66	0,82	1,00	1,10	1,22	1,29	1,36	1,43	1,50	2,00	2,33
Вода, см ³	2,34	2,18	2,00	1,90	1,78	1,71	1,64	1,57	1,50	1,00	0,67
Испытуемый раствор	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
pH по Зеренсену	4,16	3,95	3,69	3,53	3,36	—	—	—	2,97	2,27	1,92
pH измеренное	3,91	3,69	3,45	3,28	3,14	3,07	3,01	2,92	2,85	2,39	2,21
Эффект											
через 5 мин.	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—
„ 45 „	+	++	×	×	××	×××	××	×	××	++	+

Примечания: 1. Цитрат 21,008 г лимонной кислоты + 200,0 см³ N/10 NaOH на 1 л воды.

2. pH измерено хингидронным электродом; расхождение между теоретическими значениями буфера и найденными обусловлено наличием NaCl.

Испытуемый раствор имеет следующий состав: 0,068% ихтулина, 5% NaCl; концентрация в пробирках соответственно: ихтулина 0,041% и NaCl 3%.

Оптimum осаждения ихтулина в 3% NaCl имеем в пробирке № 6, измеренный pH которой — 3,07¹.

Несовпадение оптимума осаждения с изоэлектрической точкой белка для случаев солевых растворов, особенно подробно исследованное Н. Weber для миозина (14), не позволяет, конечно, считать величину 3,07 за изоэлектрическую точку ихтулина; учитывая наблюденные Вебером величины сдвига для миозина, все же можно сделать ориентировочный вывод, что изоэлектрическая точка ихтулина северюги лежит около 4. Применение других методов, например метода катафореза при минимальной концентрации присутствующих солей, позволит более уточнить эту величину.

Такой необычный для известных до сих пор белков резко выраженный кислотный характер ихтулина северюги заставляет распространить подобные исследования и на ихтулин других пород рыб, что мы и намерены выполнить. И если окажется, что это свойство вообще присуще аналогичным белкам², то нельзя не сопоставить их в этом отношении с протаминами, где, как известно, изоэлектрические точки также сдвинуты далеко от нейтральной, но уже в щелочную сторону. Изоэлектрические точки протаминов равны (18):

Стурин — 11,71 Сальмин — 12,09
Скомбрин — 12,00 Клупеин — 12,16 и т. д.

Это вполне совпало бы со взглядами некоторых исследователей, особенно развиваемыми Тадокоро, что в свойствах белков мужских и женских (особенно половых продуктов) наблюдается известная полярность — белки мужских особей имеют по сравнению с белками женских особей более основной характер.

¹ В пробирке № 9 при pH, равной 2,85, намечается второй (меньший) максимум осаждения.

² Указания, что растворы ихтулина (кари) кислы на лакмус, имеются у J. König u. J. Grossfeld, Bioch. Zeitschr. 54, 375, 1913.

АЛЬБУМИН

Так как альбумин находится в икре в весьма незначительных количествах, он не был для приводимых ниже определений получен в чистом виде, а лишь в виде водных растворов совместно с другими растворимыми в воде веществами икры (водная вытяжка из икры 1 : 1).

Границы высаливания альбумина 2—7, что говорит за его неоднородность.

Температура свертывания белка, определяемая по появлению мути в растворе, оказалась неожиданно низкой, +36° С. Присутствие NaCl ее несколько повышает (4% NaCl 37,5°; 8% NaCl 38,4°). Такая низкая температура свертывания представляет собой не частое явление, темеченное исследователями, особенно для белков холоднокровных, например растворимых белков ткани пикши—I. Logan (1).

Изoeлектрическая точка данного альбумина, определенная по оптимуму осаждения в ацетатной смеси с добавлением спирта, как видно из приводимого опыта, около 5,1 (оптимум осаждения в пробирке № 5, где рН равно 5,14).

Таблица 3

	Номер пробирок									Примечание
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
N/10 H ₂ COONa, см ³ . . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
N/100 CH ₃ COOH, см ³ . . .	0,62	1,25	—	—	—	—	—	—	—	
N/10 CH ₃ COOH, см ³ . . .	—	—	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0	8,0	—	
N/1 CH ₃ COOH, см ³ . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	1,6	
Вода, см ³	7,38	6,75	7,75	7,50	7,0	6,0	4,0	0	6,4	
Испытуемый раствор . . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
Спирт (90°)	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	
рН, заданное для водного раствора	6,0	5,7	5,4	5,1	4,7	4,4	4,1	3,8	3,5	рН измерено хингидронным электродом
рН измеренное	—	—	—	5,37	5,14	—	—	—	—	
Эффект через 1 мин.	—	—	—	+	++	+	—	—	—	+ муть
" 15 "	—	—	+	×	××	++	—	—	—	× хлопья

Если хингидронный электрод в применении к спиртоводной жидкости дает и не вполне точные показания, то мы все же полагаем, что порядок этой величины (именно около 5,1) установлен.

В дальнейшем полученные для альбумина предварительные результаты желательно проверить на возможно чистых его препаратах, полученных высаливанием и диализом, чему в период выполнения настоящей работы мы не смогли уделить времени.

ВЫВОДЫ

Изучение физико-химических свойств альбумина и ихтулина икры было проведено над белковыми фракциями, выделенными из свежей икры севрюги на промысле им. Нариманова в октябре 1934 г. На основании этой работы можно сделать следующие выводы.

1. Наименьшая концентрация NaCl, достаточная для удержания ихтулина в растворе, равна 3%.

2. Солевые растворы ихтулина — слегка опалесцирующие жидкости, постепенно мутнеющие при стоянии. Вообще этот белок обнаруживает свойство легко денатурироваться.

3. Границы высаливания ихтулина из раствора в NaCl сернокислым аммонием 3,4—6,0. Значительная раздвинутость границ высаливания заставляет предполагать, что этот белок не вполне однороден.

4. Температура свертывания ихтулина, определенная вискозиметрическим путем, —54,5°; образование хлопьев при температуре 57,6°.

5. Изоэлектрическая точка ихтулина около 4.

6. Воднорастворимые белки начинают свертываться при 36°.

7. Границы высаливания альбумина 2 и 7; такая раздвинутость границ высаливания говорит также за его неоднородность.

8. Изоэлектрическая точка альбумина около 5,1.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Logan, Conte. Can. Biol. Fisheries № 1, 1930.
2. G. Walter, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 15, 477, 1891.
3. P. A. Levene, " " " 32, 281, 1901.
4. Stendel u. Osato, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 127, 220, 1923.
5. Shungo Osato " " " " 131, 151, 1923.
6. Kenzo Jguchi, " " " " 135, 188, 1924.
7. O. Hammersten, Skand. Arch. f. Physik, 17, 113, 1905.
8. J. König u. J. Grossfeld, Biochem. Zeitschr., 54, 351, 1913.
9. Ostwald, Koll. Zeit., 31, 342, 1922.
10. H. Chick, C. Martin, Journ. of Physiol., 45, 64, 261, 1912.
11. W. Pauli, Kolloidchemie der Eiweisskörper, 1933.
12. Michaelis u. Rona, Biochem. Zeitschr. 27, 38, 1910; 47, 250, 1912.
13. Michaelis u. Rona, " " " 103, 176, 1920.
14. H. Weber, " " " 158, 443, 473, 1925.
15. Michaelis u. Rechstein, " " " 47, 260, 1912.
16. Michaelis u. Rechstein, " " " 65,1, 1914.
17. Michaelis u. Rechstein, " " " 27, 219, 1910.
18. Miyake, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 172, 225, 1927.

SUMMARY

The study of the physical and chemical properties of the water soluble protein and ichthulin of fish eggs has been made on these protein fractions extracted from fresh eggs of *Acipenser stellatus*. The following conclusions may be drawn on the basis of this work:

1. The concentration of NaCl at which the ichthulin remains soluble must not be lower than 3%.

2. Salt ichthulin solutions are slightly opalescent liquids, which gradually grow turbid when left to stand. In general this protein shows a tendency to denaturate.

3. The limits of precipitation of ichthulin from a solution of NaCl with sulfate of ammonium are 3,4—6,0. The greater distance of the limits of precipitation makes us suppose that this fraction of protein is not quite of the same nature.

4. The temperature of coagulation for ichthulin determined by the viscosimetric method is 54,5°; the formation of flakes takes place at a temperature of 57,6°.

5. The isoelectric point of ichthulin is at, about, pH = 4.

6. The water soluble protein of the fish eggs begins to coagulate already at a temperature of 36°.

7. The limits of the albumin sodium chloride precipitation are 2—7; such an extenuation of the limits of precipitation of albumin indicates probably its heterogenous nature.

8. The isoelectric point of albumin lies about 5,1.