

ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА БЕЛКОВ ИКРЫ ОСЕТРОВЫХ

Н. Г. Белинская, П. П. Карпов, О. И. Шапиро

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

A STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF PROTEIN IN THE EGGS OF THE DIFFERENT ACIPENSERIDAE

By Belinskaya K. G., Karpov P. P. and Shapiro O. I.

ОБЩАЯ ЧАСТЬ

Икра рыб разных пород, особенно осетровых, является важным и ценным пищевым продуктом. Имея высокую общую питательную ценность (в частности благодаря значительному содержанию белков), она содержит также большие количества витаминов (А, D). Поэтому икра имеет большое значение для питания городского населения и особенно детей, так как среди них часты проявления авитаминозов (рахит).

В литературе имеются многочисленные указания о составе икры разных рыб — карпа (1), трески (2), окуня (7), сельди (3, 4, 5), семги (8), осетра и др. (9, 10). Но данные эти далеко не полны и часто не характеризуют отдельные фракции белков; это относится особенно к наиболее ценной икре осетровых. Поэтому работы белковой группы ВНИРО (бывшей белковой лаборатории ВНИИРП) в период 1933—1935 гг. были посвящены изучению азотистых составных частей (в частности белков) икры осетровых.

Белковые вещества икры были разделены нами на несколько фракций, которые, будучи выделены, соответствующим образом очищены, высушены и измельчены, послужили нам для исследования в качестве препаратов белков.

Эти выделенные и исследованные нами фракции были следующие: 1) альбумин — фракция воднорастворимых белков; 2) ихтулин содержащий фосфор белков, растворимый в солевых растворах (по растворимости, следовательно, типа глобулинов); 3) оболочки — 1-я нерастворимая в воде и солевых растворах фракция белков и 4) 2-я нерастворимая фракция белка, т. е. белок, содержащий нерастворимый пигмент икринки (названный нами по ходу получения „мутью“).

Примерное количество в икре этих белков (фракций) видно из табл. 1, составленной на основании данных наших анализов.

Таблица 1

	Альбу- мин %	Ихту- лин %	Нерас- твори- мые белки %	Из них	
				1-я фрак- ция обо- лочки %	2-я фракция нераствори- мых белков %
Икра осетра пастеризованная	1,3	13—17	5,4—6,4	3,4	2—3
Икра осетра непастеризованная (соленая)	2,5	17	4,2	—	—
Икра севрюги пастеризованная	0,75—1,2	15,5—18	6,1—6,6	3,6	2,5—3
Икра севрюги свежая	2,5	17	3	—	—

Для получения возможно полной химической характеристики белков было бы желательно подробное изучение их аминокислотного состава, т. е. количественного содержания отдельных аминокислот в белковых фракциях.

Однако в настоящей работе проведено изучение химического состава белков по более простой, но в первом приближении достаточно удовлетворительной схеме распределения азота по группам аминокислот.

В основу была принята схема Ван-Слайка; по его же методике проводилось сначала и само исследование белков; впоследствии, не изменяя схемы, мы заменили методику анализа более новой, усовершенствованной методикой Плиммера. Кроме того мы считали интересным для характеристики фракций включить в наш план также определения содержания серы, фосфора и железа и качественные пробы на нуклеиновые кислоты.

Распределение азота, серы, фосфора и железа в белках икры осетра и севрюги

Полученные нами при исследовании белков результаты сведены в табл. 2, где приведены кроме того для сравнения соответствующие данные для альбумина куриного яйца, опубликованные Плиммером, а также и полученные нами (В).

Просматривая приведенные цифры, можно отметить следующие моменты.

1. Количество амидного азота в нерастворимых фракциях белков заметно ниже по сравнению с таковым в растворимых белках (альбумине и ихтулине) (табл. 3).

Таблица 3

Амидный азот %	Оболочка		2-я нераствори- мая фракция		Ихтулин		Альбумин	
	сев- рюги	осетра	сев- рюги	осетра	сев- рюги	осетра	сев- рюги	осетра
В абсолютно сухом веществе	1,24	1,27	1,24	1,23	1,74	1,85	1,78	1,71
От общего азота	8,38	8,59	8,12	8,03	11,09	11,71	12,17	11,16

2. Количество азота меланинов в ихтулине ниже, чем в других белках икры; белки 2-й нерастворимой фракции отличаются, наоборот, высоким содержанием меланинов. Так как количество меланинов

	Влага в %	Азота в абсолютно сухом веществе в %										
		общего гидро- лизата	амид- ного	мела- нинов	основа- ний	общего моноами- нокис- лот	аминного		неамин- ного моноами- нокис- лот	рги- нина	гисти- дина	лизина
							осно- ваний	моноами- нокис- лот				
А. Белки икры севрюги												
Оболочки	16,63	14,80	1,24	0,34	3,53	9,49	1,69	8,53	0,96	2,18	0,22	1,13
Ихтулин	14,76	15,66	1,74	0,24	5,23	9,16	2,62	6,90	2,26	3,34	0,15	1,73
Альбумин	7,52	14,67	1,78	0,34	3,35	9,87	1,55	8,71	1,16	0,83	1,71	0,80
2-я нерастворимая фрак- ция белков	11,09	15,29	1,24	0,56	4,21	9,22	2,06	9,20	0,02	1,82	1,18	1,21
Б. Белки икры осетра												
Оболочки	17,28	14,77	1,27	0,39	3,32	10,09	1,32	8,56	1,53	1,98	0,78	0,54
Ихтулин	11,09	15,81	1,85	0,25	4,95	9,15	2,02	6,64	2,51	3,80	0,12	1,01
Альбумин	7,13	15,35	1,71	0,34	3,14	9,99	1,83	9,42	0,56	1,16	0,66	1,32
2-я нерастворимая фрак- ция белков	13,43	15,31	1,23	0,64	4,37	9,21	2,96	9,21	0	1,67	0,21	2,47
В. Яичный альбумин												
Альбумин (препарат Каль- баума)	12,96	14,76	1,24	0,30	3,14	10,17	2,01	10,01	0,16	1,413	0,097	1,63
Альбумин по Плиммеру .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Продолжение таблицы 2

	% в абсолютно сухом веществе			В % от общего азота										
	S	P	Fe	амидного	меланинов	оснований	филтратата от оснований	сумма	аминного		неаминного моноаминокислот	аргинина	гистидина	лизина
									оснований	моноаминокислот				
А. Белки икры севрюги														
Оболочки	1,19	0	следы	8,38	2,33	23,88	64,10	98,69	11,42	57,62	6,48	14,73	1,50	7,64
Ихтулин	0,83	0,39	"	11,09	1,54	33,37	58,49	104,49	16,72	44,05	14,44	21,35	0,95	11,07
Альбумин	—	—	—	12,17	2,31	22,82	67,27	104,57	10,55	59,39	7,88	5,66	11,65	5,48
2-я нерастворимая фракция белков	1,64	0,373	0,17	8,12	3,69	27,52	60,34	99,66	13,47	60,19	0,15	11,89	7,70	7,92
Б. Белки икры осетра														
Оболочки	1,05	0	следы	8,59	2,61	22,50	68,32	102,03	8,94	57,93	10,39	13,38	5,29	3,62
Ихтулин	0,75	0,42	"	11,71	1,60	31,33	57,85	102,50	12,79	41,97	15,88	24,04	0,77	6,41
Альбумин	—	0,18	0,22	11,16	2,24	20,46	65,05	98,91	11,94	61,37	3,68	7,56	4,31	8,58
2-я нерастворимая фракция белков	1,54	0,37	0,17	8,03	4,21	28,53	60,15	100,92	19,33	60,15	0	10,94	1,40	16,15
В. Яичный альбумин														
Альбумин (препарат Кальбаума)	—	—	—	8,41	2,05	21,25	68,87	100,58	13,65	67,78	1,09	9,57	0,62	11,06
Альбумин по Плиммеру	—	—	—	9,2	2,0	22,1	67,6	100,9	13,1	66,0	1,6	11,7	0,2	10,1

в гидролизате может быть при известных условиях связано с содержащимся в исходном белке триптофаном, как показали Гортнер и его сотрудники (11, 12), то по указанному соотношению цифр можно в первом приближении сказать, что триптофан — это одна из наиболее биологически важных аминокислот, обуславливающая своим содержанием (наравне с некоторыми другими аминокислотами) полноценность белка — содержится в большем количестве именно во 2-й нерастворимой фракции белков (табл. 4).

Таблица 4

Азот меланинов в %	2-я нерастворимая фракция		Оболочки		Альбумин		Ихтулин	
	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра
В абсолютно сухом веществе	0,56	0,64	0,34	0,39	0,34	0,34	0,24	0,45
От общего азота	3,66	4,21	2,33	2,61	2,31	2,24	1,54	1,60

3. Высоким содержанием диаминокислот отличается ихтулин; значительно беднее основаниями альбумин и оболочки; белок 2-й нерастворимой фракции занимает в этом отношении промежуточное положение (табл. 5).

Таблица 5

Азот оснований в %	Ихтулин		2-я нерастворимая фракция		Оболочки		Альбумин	
	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра
В абсолютно сухом веществе	5,23	4,95	4,21	4,37	3,53	3,32	3,35	3,14
От общего азота	33,37	31,33	27,52	28,53	23,88	22,50	22,82	20,46

4. По содержанию моноаминокислот белки икры располагаются в обратном порядке (табл. 6).

Таблица 6

Азот фильтрата от оснований в %	Альбумин		Оболочки		2-я нерастворимая фракция		Ихтулин	
	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра
В абсолютно сухом веществе	9,87	9,98	9,49	10,09	9,22	9,21	9,16	9,15
От общего азота	67,27	65,05	64,10	68,32	60,34	60,15	58,49	57,85

5. По количеству неаминного азота в фильтрате от оснований, что может характеризовать содержание пролина и оксипролина, наблюдаем большую разницу между различными белками икры: высоким содержанием этой фракции азота отличается ихтулин, белок же 2-й нерастворимой фракции не содержит неаминного азота в фильтрате от оснований (табл. 7)

Таблица 7

Неаминный азот в фильтрате от оснований в %	Ихтулин		Оболочки		Альбумин		2-я фракция нерастворимых белков	
	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра
В абсолютно сухом веществе	2,26	2,51	0,96	1,53	1,16	0,56	0,02	0
От общего азота	14,44	15,88	6,48	10,39	7,88	3,68	0,15	0

6. Что касается отдельных аминокислот, то обращает на себя внимание распределение аргинина по фракциям белков: ихтулин резко отличается большим содержанием этой аминокислоты, альбумин, наоборот, является наиболее бедным аргинином. Промежуточное положение занимают оболочки и 2-я нерастворимая фракция белков (табл. 8).

Таблица 8

Азот аргинина в %	Ихтулин		Оболочки		2-я нерастворимая фракция		Альбумин	
	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра
В абсолютно сухом веществе	3,34	3,80	2,18	1,98	1,82	1,67	0,83	1,16
От общего азота	21,35	24,04	14,73	13,38	11,89	10,94	5,66	7,56

7. Отметить какую-либо закономерность в содержании гистидина и лизина на основании наших данных, повидимому, нельзя.

8. Остановившись на цифрах содержания отдельных элементов — серы, фосфора и железа, — можно отметить, что оболочки отличаются отсутствием фосфора, ничтожным количеством железа и сравнительно большим количеством серы; ихтулин, имея в своем составе также ничтожное количество железа (меньшее по сравнению с оболочками) и серы, отличается богатством фосфора; 2-я нерастворимая белковая фракция характеризуется высоким содержанием всех трех элементов; Для альбумина осетра¹ по неполному анализу на эти элементы (определение серы не произведено вследствие недостатка препарата) можно отметить для этого белка сравнительное богатство фосфором и особенно железом (табл. 9).

Таблица 9

В абсолютно-сухом веществе %	Оболочки		Ихтулин		Альбумин		2-я нерастворимая фракция	
	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра	сев-рюги	осетра
Сера (S)	1,19	1,05	0,83	0,75	—	—	1,64	1,54
Фосфор (P)	0	0	0,39	0,42	—	0,18	0,37	0,37
Железо (Fe)			С л е д ы		—	0,22	0,17	0,17

Таким образом по богатству серой (что обусловлено содержанием цистина, а может быть и метионина) белки располагаются в следующий ряд, не включающий альбумин за неимением данных: 1) 2-я фракция нерастворимых белков, 2) оболочки, 3) ихтулин.

¹ Определение этих элементов в альбумине севрюги не было произведено из-за недостатка материала.

Сопоставления, сделанные нами для разных белков на основании распределения азота по фракциям и количества отдельных элементов—серы, фосфора и железа, — справедливы в равной мере для белков икры как осетра, так и севрюги, что указывает на достаточную близость в составе белков икры этих пород.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика выделения фракций белков икры севрюги и осетра

Объектом для выделения фракции белков послужили образцы пастеризованной икры осетра и севрюги, заготовленные весной 1933 г. на промысле им. Нариманова. Икра заготовлена трехкратной пастеризацией при температуре 65° , посол 6%-ный, упаковка—в банки по 250 г.

Такая пастеризованная икра не вполне соответствует свежей икре, так как пастеризация, связанная с нагревом до 65° , влечет, как показали наши работы (20), свертывание части воднорастворимых белков и увеличение за счет их убыли нерастворимых фракций.

Ввиду больших объемов жидкости, с которыми приходилось оперировать при выделении фракции, одновременно открывалось только по две банки. Обработка велась по следующей схеме.

Оболочки. Содержимое банки делилось на три порции по 70 г каждая. В каждой порции отдельные икринки раздвигались в чашках Петри каучуковым пестиком и затем переносились с 100 см^3 5% NaCl в стакан на 500 см^3 . Раздавленная икра оставлялась на $\frac{1}{2}$ часа при частом помешивании, после чего жидкость отсасывалась через полотняный фильтр по методу Геннеберга и Штомана при определении сырой клетчатки (полотно туго натягивалось на стеклянную воронку, которая соединялась с колбой Бунзена и водоструйным насосом). Отсасывание производилось возможно полнее, приставшие к полотну оболочки икры счищались шпателем обратно в стакан, затем снова приливали 100 см^3 5% NaCl и повторяли эту операцию четыре-шесть раз с 5% NaCl и два последних раза с 2,5% NaCl.

Проверив биуретовой реакцией полноту извлечения белков из оболочек, последние отмывали водой до исчезновения реакции на хлор (10—15 раз). Последние промывания оболочек водой проводили на воронке Бюхнера, отсасывая каждую порцию промывной жидкости досуха. Промытые оболочки переносили при помощи шпателя в широкогорлую колбу и заливали спиртом. Настаивание продолжалось 2—3 суток, после чего оболочки отфильтровывались через фильтр, отжимались фильтровальной бумагой и подвергались дальнейшей очистке, о которой будет сказано ниже.

Ихтулин. Соединенные по отдельным порциям (от первого, второго и т. д. промываний) солевые фильтраты, имевшие мутный вид от взвешенных неизвестной природы белковых веществ и эмульгированного жира, пропускались через складчатый фильтр в $15\text{—}20\text{ см}$, отдельный для каждой порции фильтрата. Фильтрование сильно тормозилось вследствие того, что взвесь, или, как мы условно ее назвали, „мут“, забивала поры фильтра.

Прозрачный фильтрат, точно измеренный, обычно в количестве около 1000 см^3 , разбавлялся 20-кратным количеством дистиллированной воды, консервировался смесью хлороформа с толуолом и оставлялся на 2 суток. В течение этого времени выделившийся ихтулин оседал на дно, а находящаяся над ним почти прозрачная жидкость переносилась в другой сосуд при помощи сифона. Из нее в даль-

нейшем выделяли альбумин. Осадок ихтулина переносили на большой складчатый фильтр. После стекания жидкости ихтулин растворяли 5% NaCl в стакане на 500 см³. Раствор пропускался через бумажное тесто и снова разводился 20-кратным количеством воды. Таким образом производилось переосаждение ихтулина. Последняя операция повторялась два раза. Осадок ихтулина, собранный на фильтре после последнего переосаждения, смывался сильной струей воды с фильтра в банку на 5 л, разбавлялся 3—4 л воды, хорошо перемешивался и отстаивался сутки, после чего вся масса фильтровалась через большой складчатый фильтр. Фильтр вместе с осадком ихтулина завертывался в фильтровальную бумагу и помещался в стакан со спиртом для удаления влаги. Через 3—4 дня осадок отжимался и помещался в бумажные пакетики для окончательной очистки.

Альбумин. Фильтрат из-под ихтулина подкислялся уксусной кислотой для осаждения следов ихтулина, задержавшихся в растворе вследствие отклонения pH среды от изоэлектрической точки этого белка. Количество прибавляемой уксусной кислоты, минимально необходимое для полноты выделения ихтулина, находилось специальным опытом в небольшой аликвотной части фильтрата.

После этого жидкость освобождалась фильтрованием через бумажное тесто с отсасыванием от ничтожного осадка ихтулина и выпаривалась в фарфоровых чашках на водяной бане для уменьшения объема; при этом наступало свертывание альбумина. Сгущенная жидкость с осадком переносилась в видах удобства дальнейшей работы в несколько литровых стаканов, в которых производилось окончательное свертывание альбумина, для чего стаканы одновременно нагревались в кипящей водяной бане. Хлопьевидный альбумин быстро оседал на дно стакана, после чего переносился на фильтр диаметром 15 см. С фильтра осадок смывался сильной струей горячей дистиллированной воды из промывалки, после отстаивания отфильтровывался на небольшой бумажный фильтр и промывался несколько раз горячей водой. Потом альбумин вместе с фильтром помещали в спирт на 2 суток.

2-я нерастворимая фракция белков. Взвесь, названная нами „мутью“, полученная фильтрованием солевых растворов, содержащих ихтулин и альбумин, снималась шпателем с фильтра в небольшой стакан. Через небольшой промежуток времени над осадком выделялся слой жира, который возможно полно удаляли пипеткой, затем „муть“ обрабатывалась 10% NaCl и снова переносилась на складчатый фильтр. Затем снова снималась с фильтра и обрабатывалась вышеописанным способом. Так промывали эту фракцию белков четыре-пять раз хлористым натром и затем водой до исчезновения реакции на хлор. Далее, препарат, как и остальные фракции, переносили вместе с фильтром в спирт на два.

Дальнейшая обработка выделенных фракций происходила следующим образом. После того как отжимали спирт, вещество помещалось в бумажные пакетики и кипятилось со спиртом в колбе с обратным холодильником 6—8 час. Такая обработка с заменой спирта на свежий (обычно пять-шесть раз) повторялась до тех пор, пока спирт не перестал окрашиваться, затем вещество переносили в бумажный патрон и около 18 часов экстрагировали эфиром в аппарате Сокслета. После этого снова кипятили с абсолютным спиртом, и снова экстрагировали сухим эфиром в аппарате Сокслета. Вещество, обработанное таким образом, растирали в ступке, просеивали через мелкое сито для удаления могущих быть волокон фильтровальной бумаги и получали порошкообразные легко пылящие вещества: 1) ихтулин — светло-желтый, 2) альбумин — серовато-белый, 3) оболочки — белые и 4) 2-ю нерастворимую фракцию белков — темносерая.

По вышеописанному способу были обработаны десять банок икры северюги и девять банок икры осетра.

Исследование химического состава белковых фракций

В дальнейшем был изучен химический состав полученных препаратов белков, как об этом упомянуто выше: сначала (для одних фракций) по оригинальному методу Ван-Слайка (13), позднее (для других фракций) этим же методом, но усовершенствованным Плиммером.

Этими методами учитываются: 1) амидный азот, 2) азот меланинов, 3) аргинин, 4) гистидин, 5) лизин, 6) неразрушенный цистин, 7) аминный азот веществ, не осажденных фосфорновольфрамовой кислотой (группа первичных моноаминокислот: лейцин, аланин и др.), 8) неаминный азот, не осажденный фосфорновольфрамовой кислотой (пролин, оксипролин, триптофан).

Принцип метода Ван-Слайка, как известно, заключается в следующем.

После окончания гидролиза и отгона аммиачного азота осаждают диаминокислоты фосфорновольфрамовой кислотой. В осадке определяют общий азот и аминный азот. По разности находят неаминный азот, который состоит из $\frac{2}{3}$ азота гистидина и $\frac{3}{4}$ азота аргинина. Аминный азот представляет азот лизина и цистина. Из последних аминокислот цистин определяют по сере, а азот лизина — по разности. Из первой пары аминокислот аргинин определяют отщеплением от него аммиака щелочью. Аминокислоты фильтрата от оснований делятся на две подфракции: первичные аминокислоты и вторичные аминокислоты — пролин, оксипролин и триптофан.

Гидролиз

Навеска в 3 г анализируемого вещества помещалась в тарированную колбу Эрленмейера емкостью в 250 см^3 с притертой трубкой длиной 1,25 м, заменяющей собой обратный холодильник, обливалась 20-кратным количеством HCl (1:1) и нагревалась на водяной бане при частом перемешивании, пока жидкость не становилась более или менее однородной.

Дальнейшее нагревание производилось на горелке. Ход гидролиза (накопление аминного азота) учитывался в аппарате Ван-Слайка.

Первая проба в начале работ бралась через 8 час., в дальнейшем через 15 часов. Для этого гидролизат охлаждался, колба взвешивалась на технических весах с точностью до 0,01 г. Чувствительной пипеткой отбирали 2 см^3 гидролизата в пробирку и к ним прибавляли еще 8 см^3 дистиллированной воды. Содержимое пробирки хорошо встряхивалось и из него брали по 0,5—1 см^3 для определения аминного азота в микроаппарате Ван-Слайка. Смесь гидролизата с азотистой кислотой выдерживали 5 мин. и в течение 1 мин. производили встряхивание. Колба с гидролизатом вновь взвешивалась и по разности находили вес взятой жидкости.

Повторное определение аминного азота производили потом через каждые 5 час., соблюдая те же условия. Концом гидролиза является момент, когда количество аминного азота, найденное по Ван-Слайку, оставалось постоянным. Отдельными опытами было установлено, что для полного гидролиза исследуемых белков необходимо кипячение в течение 36 часов. При дальнейшем гидролизе получалось понижение аминного азота.

Определение общего азота гидролизата. По окончании гидролиза гидролизат переносился в колбу Кляйзена и избыток соля-

ной кислоты удалялся под вакуумом. Остаток обрабатывался горячей водой, переносился в мерную колбу на 250 см³ и добавлялся водой до метки. Из остатка были взяты две пробы по 25 см³, в которых определяли общий азот гидролизата.

Определение амидного азота. По Longe аммиак, получаемый при кислотном гидролизе, соответствует аммиаку, отщепленному от амидов кислот (глутаминовой и аспарагиновой).

После отбора проб для определения общего азота оставшийся гидролизат целиком переносился в колбу Кляйзена емкостью 1 л и усреднялся 10%-ным раствором Са(ОН)₂ в небольшом избытке.

Для избежания вспенивания прибавлялось 100 см³ спирта. Отгон производился под вакуумом по методу Longe. В первый приемник (литровую колбу Вюрца) помещали 30 см³ N/10 Н₂SO₄, а во второй приемник (маленькую колбу Вюрца)—10 см³ Н₂SO₄.

Необходимое разрежение—не выше 30 мм; время отгона—30 мин. с момента закипания; температура бани—40—50°.

Азот меланинов. Во время дистилляции меланины адсорбируются известковым молоком. После отгона амидного азота содержимое колбы Кляйзена фильтровалось. Фильтр с осадком меланина промывался водой до исчезновения реакции на хлор и сжигался по Кьельдалю 35 см³ концентрированной Н₂SO₄.

Получение раствора и анализ оснований. Фильтрат из-под меланинов подкислялся соляной кислотой, снова переносился в колбу Кляйзена и сгущался под вакуумом примерно до 100 см³. К нему прибавлялось 18 см³ концентрированной НСl уд. в. 1,19 и 15 г фосфорновольфрамовой кислоты, разведенной в небольшом количестве воды. Фосфорновольфрамовая кислота должна быть очищена по способу Винтерштейна (6), т. е. извлечением из водного раствора эфиром и по отгонке его—перекристаллизацией из воды.

Объем жидкости в колбе доводился до 200 см³ дистиллированной водой, и колба нагревалась на водяной бане до почти полного растворения осадка. При охлаждении фосфорновольфраматы снова выпадали в осадок. Для полной кристаллизации раствор оставляли на 48 часов. Более короткий промежуток времени не дает полного осаждения гистидина. Отстоявшийся осадок оснований фильтровался через глянцевый фильтр и многократно промывался 10—12 см³ промывной жидкостью (2,5% фосфорновольфрамовая жидкость + 3,5% НСl), охлажденной до 0°С, чтобы свести к минимуму растворение осадка оснований при промывании. Сам процесс промывания велся по следующей схеме: 10—12 см³ охлажденной промывной жидкости выливались на осадок, хорошо перемешивались с осадком стеклянной палочкой и отсасывались досуха. Фильтрат из колбы Бунзена переливался в плоскодонную колбу на 500 см³, дальше следовало новое промывание, и так 10—15 раз, пока фильтрат не переставал давать осадок с щелочным раствором щавелевой кислоты (щавелевая кислота растворялась в 3% щелочи). К 1 см³ этого раствора в пробирке прибавляли 2—3 капли фильтрата, смесь слегка взбалтывали до появления щелочной реакции в верхних слоях пробирки; промывание закончено, если через несколько минут после взбалтывания не образовалось осадка в верхнем слое пробирки.

Отмытый осадок оснований смывался с фильтра 200 см³ дистиллированной воды в делительную воронку на 500—750 см³, к ним прибавлялось 5—10 см³ концентрированной НСl и затем 100 см³ смеси амилового спирта с эфиром (1:1), после чего смесь взбалтывалась в течение 2 минут. Если после этого не наблюдалось резкого разделения слоев, это означало, что меланины плохо адсорбировались известковым молоком, попали в фильтрат и осаждались вместе с осно-

ваниями. В этом случае они отфильтровывались с отсасыванием через небольшой бумажный фильтр. Смесь эфира с амиловым спиртом применялась для удаления фосфорновольфрамовой кислоты.

Водный раствор оснований промывался экстракционной смесью до тех пор, пока не исчезала реакция с насыщенным раствором барита. Все фракции экстракционной смеси соединялись вместе, промывались водой для извлечения из них могущих там быть оснований. Промывная вода в свою очередь промывалась смесью и присоединялась к раствору оснований. Водный раствор оснований выпаривался в вакууме досуха и смывался в колбу емкостью 50 см³. Отсюда брались аликвотные части для определения аргинина, цистина, общего и аминного азота оснований.

Определение аргинина. Принцип определения аргинина основан на том, что аргинин при кипячении со щелочами отдает половину своего азота в форме NH₃.

25 см³ раствора оснований (из 50 см³) помещали в колбу Кьельдаля на 250—300 см³, к ним прибавляли 12,5 г твердого едкого кали и несколько кусочков пористой глины. Колба соединялась с обратным холодильником, к которому пришлифована насадка Фолина с 15 см³ N/10 H₂SO₄. Колба умеренно нагревалась в течение 6 час., затем по охлаждении через форштосс прибавляли 100 см³ дистиллированной воды. Дальше следовала отгонка аммиака по Кьельдалю, причем в приемник переносили содержимое насадки Фолина.

Дистиллата должно быть не больше 100 см³, так как при дальнейшем сгущении реакционной жидкости имеет место распад и других азотистых соединений.

Определение общего азота оснований. После отгона аргинина содержимое колбы сжигалось по Кьельдалю 35 см³ H₂SO₄ и в нем определялся общий азот оснований.

При расчете к кислоте, связанной выделившимся аммиаком, прибавляется кислота, связанная при определении аргинина.

Определение цистина. Количество цистина вычисляется по его сере. Определение основано на окислении серы путем сожжения азотнокислой медью (по Дени).

Из раствора оснований, оставшегося после изъятия 25 см³ для определения аргинина, брали 10 см³ и помещали с 5 см³ жидкости Дени (25 г кристаллической азотнокислой меди + 10 г азотнокислого аммония + 20 г хлористого натрия в 100 см³ воды) в фарфоровую чашечку диаметром 6—7 см. Смесь выпаривали на водяной бане досуха и прокаливали почти докрасна в течение 10 мин. Остаток обрабатывали 10 см³ 10%-ной соляной кислоты, разбавляли приблизительно до 150 см³ и осаждали 10 см³ 5%-ного раствора BaCl₂.

С осадком BaSO₄ поступали обычным образом. Каждый миллиграмм BaSO₄ соответствует 0,06 мг азота цистина во взятом объеме жидкости или 0,3 мг азота во всем объеме раствора оснований.

При гидролизе наших препаратов нами было замечено по запаху выделение сероводорода, особенно резкое в случае оболочек. При определении по описанному здесь методу цистина во фракции оснований гидролизата были получены ничтожно малые количества, поэтому в наших сводных таблицах не приводятся данных о цистине; общее же количество серы в белках было определено из отдельных навесок препаратов.

Определение аминного азота оснований. Аминный азот оснований определялся в микроаппарате Ван-Слайка в 1 см³ в течение 30 мин. при 20°. Холостой опыт необходим.

Азот гистидина и лизина вычисляется по формулам:

$$\text{Азот гистидина} = \frac{3}{2} (D - \frac{3}{4} \text{ азота аргинина}), \quad (1)$$

где D — разность между общим и аминным азотом оснований.

Азот лизина = общий азот оснований — (азот аргинина + азот гистидина + азот цистина) (2)

Анализ фильтрата от оснований. Фильтрат от оснований подщелачивался 50% раствором NaOH до слабощелочной реакции (появление мути). Муть растворялась затем несколькими каплями уксусной кислоты, и фильтрат выпаривался под вакуумом до начала кристаллизации. Затем раствор переводился в мерную колбу на 250—200 см³. Из него брались две пробы по 25 см³ для определения азота по Кьельдалю.

Для того чтобы присутствие фосфорновольфрамовой кислоты не влияло на точность результатов, необходимо продолжать кипячение в течение 3 часов после того, как жидкость стала прозрачной.

Азот аминокислот в фильтрате от оснований определяли в микроаппарате Ван-Слайка в 1 см³ фильтрата в течение 6 минут.

Неаминный азот фильтрата оснований находили по разности.

Методика Ван-Слайка — видоизменение Плиммера (14)

В этой методике устранены операции сгущения в вакууме растворов оснований, раствора моноаминокислот, связанных с потерей части азота в форме аммиака, устранена также громоздкая операция удаления фосфорновольфрамовой кислоты из фракции оснований.

Ход работ был следующий: для гидролиза бралось по две навески от 1,5 до 4 г, и гидролиз осуществлялся 36-часовым нагреванием сначала на водяной бане, а затем на горелке, в колбе с пришлифованным обратным воздушным холодильником, с 20-кратным количеством 20% ной соляной кислоты.

Гидролизат выпаривался в вакууме до пастообразного состояния. Паста растворялась в воде, и раствор вновь выпаривался в вакууме для возможно полного удаления соляной кислоты; остаток растворялся в воде и доводился до объема 250 см³.

Из этого раствора брали 15—20 см³ для определения общего азота. Определение производили по Кьельдалю с 20—30 см H₂SO₄, 0,5 г CuSO₄ и 7—10 г K₂SO₄; титровали с ализаринсульфонатом.

Из этого же раствора брали 100 см³ для определения азота по схеме Ван-Слайка. Жидкость в колбе Кляйзена (1 л) слабо подщелачивалась небольшим избытком 10%-ного известкового молока (количество известкового молока, необходимое для нейтрализации, находилось титрованием отдельной небольшой пробы гидролизата, и для отгона аммиака брался избыток сверх нужного для нейтрализации в количестве около 5 см³) и добавлялось для избежания вспенивания 100 см³ спирта. Аммиачный (амидный) азот отгонялся в вакууме при температуре водяной бани не выше 50° при давлении около 40 мм в N/10 серную кислоту (25—40 см³); отгонка продолжалась до тех пор, пока объем жидкости в колбе не уменьшался до 25—50 см³; отгон титровался N/10 NaOH в присутствии ализаринрота (ализаринсульфонат).

Остаток в колбе фильтровался через 9-см фильтр для отделения меланинов, которые на фильтре промывались приблизительно 100 см³ воды. Частицы меланинов, прилипшие к стенкам отгонной колбы, смывались концентрированной серной кислотой, а затем дистиллированной водой в кьельдалевскую колбу. Фильтр с осадком меланинов вносился в колбу лишь после того, как кипячением из него была удалена вода, и все сжигалось, как обычно, по Кьельдалю (35 см³ H₂SO₄, 0,5 г CuSO₄ и 7—10 г K₂SO₄).

Фильтрат от меланинов подкислялся 18 $см^3$ соляной кислоты (уд. вес 1,19) и осаждался 15 г фосфорновольфрамовой кислоты, растворенной в небольшом количестве воды. Объем доводили до 200 $см^3$. Колба с выделившимися фосфорновольфраматами оснований нагревалась в водяной бане почти до полного растворения осадка, затем охлаждалась и оставлялась на 2 суток.

Осадок оснований отфильтровывался на небольшой (5 см) воронке Бюхнера (удобнее — фильтргласе), промывался пять раз небольшим количеством (по 10 $см^3$) разбавленной (1:10) соляной кислоты при размешивании стеклянной палочкой. Осадок на фильтре же растворялся в 30—40 $см^3$ N/1 NaOH, которым предварительно растворяли частицы фосфорновольфрамовых оснований, прилипших к стенкам колбы, где происходило осаждение. Раствор фильтровали через 7-см фильтр в мерную колбу на 100 $см^3$. Фильтрглас, колбу Бунзена и колбу, где велось осаждение, промывали водой, которую сливали в мерную колбу пока объем жидкости в ней не достигал 100 $см^3$.

Из этого раствора брались 10—15 $см^3$ для определения общего азота оснований по Кьельдалю и 50 $см^3$ для определения аргинина. Определение велось кипячением с 50 $см^3$ 50% NaOH в течение 6 час. с улавливанием аммиака в трубке Фолина и последующей добавочной отгонкой аммиака с нисходящим холодильником по добавлению 100 $см^3$ воды; индикатор — ализаринсульфонат. Из этого же раствора брались 2,5—5 $см^3$ для определения аминного азота по Ван-Слайку; продолжительность реакции 50 мин.

Фильтрат от оснований вместе с промывной жидкостью доводился до 250 $см^3$ и отсюда брались 25 $см^3$ для определения общего азота по Кьельдалю и 2—5 $см^3$ для определения аминного азота по Ван-Слайку; реакция длилась 5—6 минут.

Перед введением в нашу практику вышеописанной методики Плиммера мы считали целесообразным для освоения ее провести исследование альбумина куриного яйца, объекта, изученного Плиммером при разработке его методики. Полученные нами данные для яичного альбумина (препарат Кальбаума) хорошо согласуются с данными Плиммера.

Считаем необходимым отметить здесь, что при определении аминного азота в аппарате Ван-Слайка мы столкнулись с некоторыми трудностями, поэтому полученные в этой части нашей работы результаты желательнее уточнить при более благоприятной обстановке.

Определение серы производилось по принципам метода, описанного Пинкусеном (15). Навеска белка (0,3—0,5 г) помещалась в небольшую фарфоровую чашку (удобнее тигель емкостью около 50 $см^3$), вносилось 2 г азотнокислого калия в виде порошка и 2 $см^3$ концентрированной азотной кислоты. Спустя некоторое время, когда реакция заканчивалась, нагреванием на водяной бане удалялась азотная кислота и к охлажденному, но не совсем еще сухому остатку добавлялось 10 $см^3$ раствора Бенедикта (200 мг азотнокислой меди, 50 г $KClO_3$ в 1 л воды). Содержимое вновь выпаривалось досуха на песчаной бане и озолалось осторожным обогреванием дна чашки пламенем спиртовой горелки; при неосторожном нагревании могут иметь место довольно бурные вспышки, сопровождаемые потерей части вещества. Для окончательного озоления чашки помещались в муфель, где нагревались 10 мин. при красном калении. По охлаждении содержимое чашки растворялось в 10 $см^3$ соляной кислоты (1:4), раствор фильтровался, затем некоторое время кипятился. По охлаждении раствор нейтрализовался содой и вновь подкислялся разбавленной соляной кислотой до положительной реакции на конгоруж

или до исчезновения желтого окрашивания в случае применения в качестве индикатора динитрофенола. В полученном таким образом растворе определялось количество серной кислоты по способу Рашига (Ф. Тредвел, Курс аналитической химии, т. II, кн. 2, 187, 1930). Исследуемый раствор, содержащий сульфат, приливался к 30—50 см³ раствора солянокислого бензидина¹ и спустя 10 мин. осадок сернокислого бензидина отфильтровывался с отсасыванием, промывался 10 см³ дистиллированной воды в три приема с отсасыванием каждый раз досуха, переносился в тот же стакан, где производилось осаждение, обливался 50 см³ воды, нагревался до 80° и титровался N/10 NaOH в присутствии фенолфталеина.

К недостаткам данной методики нужно отнести затруднения, возникающие при исследовании богатых фосфором объектов (в нашем случае ихтулин). В таких случаях при осаждении сернокислого бензидина вместе с ним выпадает осадок темнозеленого цвета (повидимому, фосфорнокислая медь), препятствующий последующему титрованию в присутствии фенолфталеина. Вследствие этого приходилось повторять озоление, беря новую навеску и озоляя ее при помощи селитры, азотной кислоты и перекиси водорода. Результаты такого видоизменения метода оказались хорошими.

Определение железа по Лорберу (16). Навеска около 0,8 г белка минерализовалась смесью 5 см³ азотной и 5 см³ серной кислот нагреванием в колбе Кьельдаля. Азотная кислота по возможности удалялась кипячением с добавлением некоторого количества воды, раствор переводился в мерную колбу на 100 см³ и доводился до метки. Из этой колбы отбирали 75 см³ в мерную колбу на 100 см³, вносили 2 см³ 20% раствора сульфосалициловой кислоты и понемногу концентрированного аммиака до появления желтого окрашивания, после чего доводили до метки. Приготовленный так раствор сравнивался в колориметре с образцовым раствором, одновременно приготовлявшимся обработкой сульфосалициловой кислотой и аммиаком стандартного раствора, содержащего 1 мг железа в 100 см³ (железные квасцы).

Определение фосфора по Дениже (17). 25 см³ раствора, приготовленного для определения железа, помещались в мерную колбу на 500 см³, из этого раствора бралось 5 см³, к ним добавлялось 2 см³ реактива А и 8 капель реактива В; после появления голубого окрашивания объем доводился до 100 см³ и раствор сравнивался в колориметре с одновременно обработанным таким же способом образцовым раствором по истечении 20 мин. с момента появления в нем голубой окраски.

Образцовый раствор готовился соответствующим разведением стандартного раствора KH_2PO_4 — 1,9167 г в литре (или 1 г P_2O_5).

Реактив А: 100 см³ 10% молибденовокислого аммония смешивались с 300 см³ 50% серной кислоты, приготовленной разбавлением 28,4 см³ серной кислоты уд. в. 1,84 до 100 см³.

Реактив В: 0,1 г мелко изрезанного металлического олова обрабатывался 2 см³ соляной кислоты (1,19), добавляли 1—2 капли 10% раствора CuSO_4 , нагревали на водяной бане до полного растворения олова (3—4 часа), прибавляли 1 см³ 10% раствора CuSO_4 и доводили до объема 10 см³. Реактив В необходимо иметь ежедневно свежеприготовленный.

¹ 2 г бензидина (основание) растирают в ступке с 5 см³ дистиллированной воды до кашицеобразной консистенции и, смывая ступку струей воды, переводят бензидин в мерную литровую колбу, прибавляют 2,5 см³ соляной кислоты (1,19), взбалтывают, доводят водой до метки; растворение ускоряют подогреванием, жидкость фильтруют и хранят в склянке с притертой пробкой.

Пробы на компоненты нуклеопротеидов — нуклеиновые кислоты — были нами проделаны по способам, изложенным у Неймана (18), а также у Л. Броуде (19).

Проделанные реакции не дали положительных результатов.

ВЫВОДЫ

Материалом для работы послужили белковые препараты, выделенные в 1934 г. из пастеризованной икры осетра и севрюги.

Белки икры были разделены на следующие четыре фракции: 1) альбумин — воднорастворимые белки; 2) ихтулин — белок, растворимый в солевых растворах; 3) оболочки — 1-я нерастворимая в воде и солевых растворах фракция белков; 4) 2-я нерастворимая фракция белков.

Изучение проведено по методике Ван-Слайка и Плиммера, кроме того определено содержание серы, фосфора и железа.

Как для икры осетра, так и для икры севрюги можно отметить следующие моменты, касающиеся различия в составе изученных белков:

1) количество амидного азота в нерастворимых фракциях белков заметно ниже, чем в растворимых белках (альбумине и ихтулине);

2) по содержанию азота меланинов 2-я нерастворимая фракция стоит выше, ихтулин — ниже других белков икры;

3) по общему количеству диаминокислот на первом месте стоит ихтулин, значительно беднее основаниями альбумин и оболочки; белки 2-й нерастворимой фракции занимают промежуточное положение;

4) по содержанию моноаминокислот белки икры располагаются в обратном порядке;

5) по количеству неаминного азота в фильтрате от оснований высоким содержанием отличается ихтулин; 2-я нерастворимая фракция белков не содержит его;

6) по содержанию аргинина по фракциям белков можно отметить, что ихтулин резко отличается большим количеством этой аминокислоты; альбумин, наоборот, очень беден аргинином;

7) по содержанию гистидина и лизина на основании наших данных отметить какую-либо закономерность, по видимому, нельзя;

8) что касается количества отдельных элементов — серы, фосфора и железа, то здесь можно отметить, что оболочки отличаются отсутствием фосфора и железа и сравнительно большим количеством серы; ихтулин не имеет железа и содержит много фосфора; 2-я нерастворимая фракция белков характеризуется высоким содержанием всех трех элементов; альбумин, по видимому (по неполному анализу одного образца), характеризуется сравнительным богатством фосфора и особенно железа.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Walter, Zeitschrift für physiologische Chemie, 15, 477, 1891.
2. P. A. Levene, " " " " 32, 281, 1901.
3. Kenzo Jguchi, " " " " 135, 188, 1924.
4. Shungo Osato, " " " " 131, 151, 1923.
5. Steudel u. Osato, " " " " 127, 220, 1923.
6. E. Winterstein, " " " " 34, 155, 1901—1902.
7. O. Hammersten, Skandin. Arch. f. Physik, 17, 113, 1905.
8. Noel—Paton, Report of investigations on the Life—History of the Salmon in fresh water, S. 145, Glasgow, 1898.
9. J. König u. Grossfeld, Zeitschr., 54, 351, 1913.
10. Г. Ф. Друккер, Труды центр. науч.-исслед. ин-та рыбного хозяйства, т. IV, 1932.
11. Gortner R. A. u. Blisch M. J., Journ. Amer. Chem. Soc., 37, 1630—1636, 1915.
12. Burr G. O. a. Gortner R. A., Journ. Amer. Chem. Soc., 46, 1224—1246, 1924.