

ПРОТАМИНЫ ИЗ МОЛОК ЛОСОСЕВЫХ

Канд. техн. наук Н. Е. НИКОЛАЕВА, техник Л. В. СЫСОЕВА

В последние годы при изготовлении ряда лекарственных препаратов широко применяют протамины. Способность протаминов образовывать соединения с высшими белками использована при изготовлении антидиабетических препаратов — инсулинов протамин, гормональная активность которых снижается медленнее, чем активность чистого инсулина.

Протамины широко используют также при изготовлении антибиотиков с пролонгированным действием. Такие препараты можно вводить в организм человека в уменьшенных дозах или значительно реже, чем чистый антибиотик.

Известны также и бактерицидные свойства протаминов, что позволяет использовать их непосредственно как лекарство.

В СССР из молок осетровых рыб производят трипротамин. Этот препарат, названный эсмолином, используют в основном для создания антибиотических препаратов с удлинённым сроком действия в организме. Для изготовления некоторых лекарственных препаратов, например протамин-цинк-инсулина, необходимы моно- или дипротамины.

В 1957—1960 гг. во ВНИРО проводили работы по изучению химического состава молок лососевых, а также получаемых из них протаминов. Уточнялась также технология производства протаминов с целью получения препарата протамин-сульфата, пригодного для изготовления различных лекарств с пролонгированным действием.

В качестве сырья для получения протаминов были использованы молоки кеты (*Oncorhynchus keta*) и горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*), заготовленные в период нерестового хода этих рыб. Молоки были заморожены при температуре -23 — -28°C и затем их хранили при температуре, не превышающей -11°C .

В табл. 1 приведены результаты химического анализа мороженых молок, использованных в опытах для получения протаминов.

Таблица 1

Вид рыбы	Стадия зрелости молок	Химический состав молок в %				Содержание азота в белке молок в %	Примечание
		влага	жир	зола	общий азот		
Горбуша	Смесь III—IV и IV	81,46	1,04	2,10	2,79	18,11	Использованы для заводских опытов
Кета	IV	72,80	1,22	3,08	4,60	20,08	То же
Кета	III—IV	79,91	0,54	2,24	2,81	16,24	Использованы для лабораторных опытов

Из табл. 1 видно, что состав молок у кеты и горбуши несколько различается. Имеются также различия в составе молок в зависимости от степени их зрелости; при созревании молок содержание азота в них увеличивается.

Аминокислотный состав белков молок кеты и горбуши определяли методом восходящей распределительной хроматографии на бумаге, предварительно обработанной буферным раствором с pH 6,8. Аминокислоты разделяли двухмерным способом. В первом направлении в качестве подвижного растворителя применяли фенол, насыщенный водой.

Для более четкого разделения диамино и дикарбоновых аминокислот атмосферу камеры насыщали аммиаком. Для этого на дно камеры помещали в отдельной чашечке 25%-ный раствор аммиака, взятый в количестве 1,5% от объема налитого в камеру фенола. Во втором направлении подвижным растворителем служила смесь изо-бутилового спирта, ледяной уксусной кислоты и воды в соотношении 7:2:1. Проявляли хроматограммы 0,2%-ным раствором нингидрина в этиловом спирте в течение 5 мин при 100 — 105°C . Для закрепления полученной окраски пятен аминокислот хроматограммы опрыскивали 0,5 н. раствором сернокислотого никеля.

На лист хроматографической фильтровальной бумаги¹ размером 26×26 см на расстоянии 3 см от нижнего и левого краев наносили каплю нейтрализованного гидролизата, который готовили следующим образом. 200 мг сухих обезжиренных молок

¹ Использовали хроматографическую бумагу плотностью 85 Ленинградской бумажной фабрики № 2.

гидролизovali в автоклаве в присутствии 6 н. соляной кислоты при температуре 134° С в течение 5 ч. Перед нанесением капли гидролизата на бумагу гидролизат очищали от гуминовых веществ фильтрованием, освобождали от избытка соляной кислоты многократным (3—4 раза) упариванием на водяной бане, после чего небольшой остаток соляной кислоты нейтрализовали содой (по лакмусу), предварительно добавив к сиропообразному остатку 1—2 мл воды.

Так как известно, что положение пятен аминокислот на хроматограммах относительно одно другого для двух определенных растворителей постоянно, то идентификацию компонентов на хроматограммах производили сопоставлением полученного узора пятен с картой расположения чистых аминокислот на двухмерной хроматограмме. В тех случаях когда почему-либо возникали сомнения в точности идентификации той или иной аминокислоты на каплю исследуемого гидролизата на параллельных хроматограммах наносили каплю раствора той кислоты («свидетель»), которую предполагали обнаружить. При этом в случае совпадения идентифицируемого пятна и свидетеля проявленные пятна были более интенсивно окрашены.

В редких случаях, когда положение какого-либо пятна относительно других было не ясно или пятна сливались, рассчитывали коэффициенты R_f или $R'f$. R_f — это отношение пути, пройденного пятном данной кислоты, к пути, пройденному фронтом растворителя. $R'f$ — отношение пути, пройденного исследуемой аминокислотой, к пути другой, известной аминокислоты, принятой за стандарт. Такой стандартной аминокислотой мы выбрали пролин, который удобен тем, что на проявленных нингидрином хроматограммах пятно пролина легко найти по ярко-желтой или оранжевой окраске, характерной только для пролина и оксипролина.

В табл. 2 приведены значения $R'f$ аминокислот в феноле и изо-бутиловом спирте с ледяной уксусной кислотой, установленные нами на двухмерных хроматограммах смесей чистых аминокислот.

Таблица 2

Аминокислоты	Фенол +1.50% NH ₃		Изо-бутанол + ледяная уксусная кислота + вода	
	средняя величина	колебания $R'f$	средняя величина	колебания $R'f$
Аспарагиновая кислота	0,13	—	0,29	—
Глютаминовая кислота	0,21	0,11—0,33	0,59	0,46—0,71
Цистин	0,39	0,31—0,46	0,09	0,03—0,12
Серин	0,46	—	0,43	0,35—0,52
Гликокол	0,51	0,47—0,55	0,49	0,46—0,57
Оксипролин	0,53	0,45—0,59	0,84	0,75—0,98
Аланин	0,65	0,65—0,66	0,90	0,82—1,03
Тирозин	0,73	0,71—0,75	0,89	0,78—0,92
Гистидин	0,79	0,74—0,85	0,31	0,21—0,41
Орнитин	0,84	—	0,33	—
Валин	0,88	0,84—0,90	1,41	1,26—1,54
Метионин	0,90	0,89—0,90	1,26	1,13—1,34
Триптофан	0,92	0,91—0,93	0,92	0,83—1,03
Лейцин	0,94	0,88—0,96	1,71	1,49—1,87
Лизин	0,89	0,87—0,94	0,37	0,33—0,41
Норлейцин	0,96	0,94—0,98	1,73	1,85—1,90
Пролин	1,00	—	1,00	—
Аргинин	1,00	0,97—1,03	0,40	0,30—0,48
Фенилаланин	0,99	0,98—1,03	1,41	1,23—1,51

Как видно из табл. 2, некоторые аминокислоты, такие как аланин, тирозин, валин, лейцин, гликокол, триптофан и метионин имеют постоянное значение $R'f$ в феноле; значение других аминокислот, например глютаминовой, гистидина, цистина, изменяется. Что касается разделения аминокислот во втором растворителе — смеси изобутилового спирта с ледяной уксусной кислотой, то постоянного значения $R'f$ аминокислот здесь мы не наблюдали ни у одной аминокислоты (некоторое постоянство значения $R'f$ можно отметить лишь у цистина и гликокола).

Причиной резких колебаний скорости движения большинства аминокислот во втором растворителе, по-видимому, являются феноляты, образующиеся при взаимодействии аммиака с фенолом при разделении аминокислот в первом растворителе — феноле с аммиаком и пропитывающие бумагу.

Для идентификации пятен аминокислот иногда приходилось пользоваться одномерными хроматограммами, на которые рядом с исследуемым веществом наносили несколько свидетелей — чистых аминокислот.

Прежде чем приступить к анализу гидролизатов молок и протамина, нами была проведена методическая работа по получению одномерных и двухмерных хроматограмм отдельных аминокислот и их смесей. На основании установленных значений R_f для отдельных аминокислот на одномерных хроматограммах в выбранных нами растворителях (феноле и изо-бутиловом спирте с ледяной уксусной кислотой) была составлена карта расположения аминокислот на двухмерной хроматограмме (рис. 1). Этой картой мы и пользовались для идентификации аминокислот.

Хроматограмма аминокислотного состава белков молок кеты (рис. 2) дает четкое представление о качественном аминокислотном составе белков молок кеты и гор-

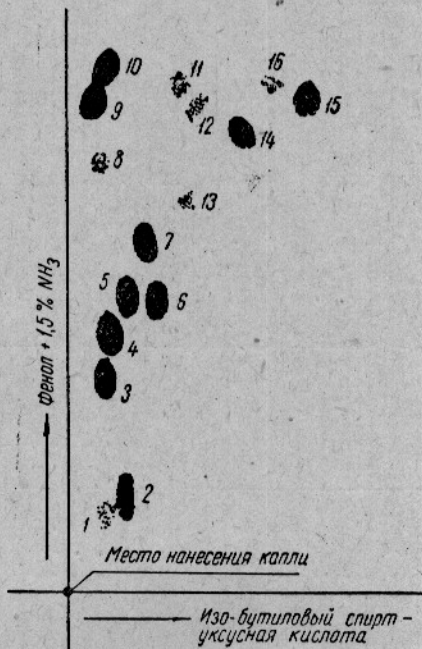
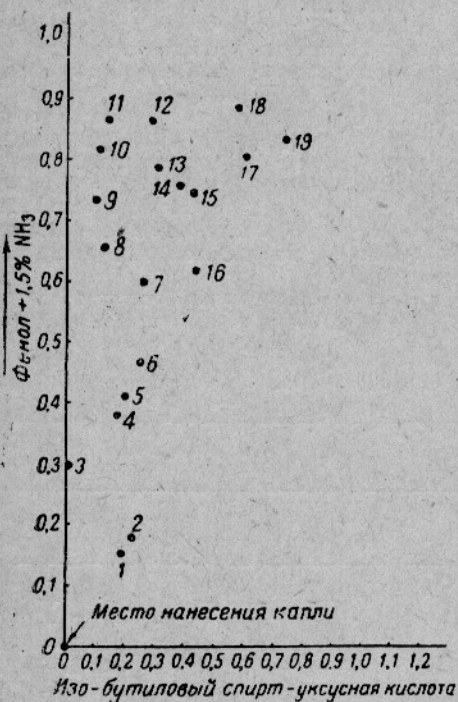


Рис. 1. Карта расположения пятен аминокислот на хроматограмме:

1 — аспарагиновая кислота, 2 — глутаминовая кислота, 3 — цистин, 4 — серин, 5 — гликокол, 6 — оксипролин, 7 — аланин, 8 — гистидин, 9 — орнитин, 10 — лизин, 11 — аргинин, 12 — пролин, 13 — триптофан, 14 — метионин, 15 — валин, 16 — тирозин, 17 — лейцин, 18 — фенилаланин, 19 — норлейцин.

Рис. 2. Хроматограмма аминокислот белков молок кеты:

1 — аспарагиновая кислота, 2 — глутаминовая кислота, 3 — серин, 4 — гликокол, 5 — неизвестная кислота, 6 — оксипролин, 7 — аланин, 8 — гистидин, 9 — лизин, 10 — аргинин, 11 — пролин, 12 — неизвестная кислота, 13 — возможно тирозин, 14 — валин, 15 — лейцин, 16 — фенилаланин.

буши. Так как расположение пятен аминокислот белков молок горбуши абсолютно идентично расположению пятен аминокислот белков молок кеты (хроматограммы аминокислотного состава белков молок горбуши мы сочли возможным не приводить).

Как видно из хроматограммы, в солянокислых гидролизатах белков молок, очищенных от примесей (жиров, слизистых веществ, экстрактивных веществ и др.) были найдены следующие аминокислоты: аспарагиновая, глутаминовая, серин, гликокол, аланин, лизин, аргинин, пролин, оксипролин, валин, лейцины, тирозин, гистидин и фенилаланин. Два пятна аминокислот, проявленных также на хроматограммах, остались не идентифицированными. Из числа незаменимых аминокислот в солянокислых гидролизатах белков молок не обнаружено метионина, треонина и триптофана. Триптофан, возможно, не обнаружен потому, что он разрушается при кислотном гидролизе, а щелочных гидролизатов белков молок мы не исследовали.

Для определения содержания диаминокислот использовали специально приготовленные препараты сухих, обезжиренных растворителем молок. Препараты получали тремя способами:

образец № 1 — измельченные молекулы обрабатывали 0,1%-ным раствором уксусной кислоты, затем холодным и горячим этиловым спиртом, после чего промывали эфиром и сушили на воздухе (метод Косселя);

образец № 2 — измельченные молекулы обрабатывали холодным, а затем горячим этиловым спиртом и эфиром;

образцы № 3, 4, 5 — измельченные молекулы обрабатывали ацетоном и затем эфиром (метод Бакинского завода медпрепаратов).

Содержание диаминокислот определяли в солянокислых гидролизатах препаратов по методу, рекомендованному Институтом питания Академии медицинских наук СССР [4].

Результаты анализов препаратов сухих обезжиренных молок и их выход (от веса сырых молок) представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Номер образца препарата	Вид рыбы	Стадия зрелости мо-лок	Выход препарата в % от веса сырых мо-лок	Химический состав препарата в %				Содержание азота в белке препарата мо-лок в %
				влага	жир	зола	общий азот	
1	Кета	III—IV	11,8	10,75	0,1	4,46	14,87	17,59 в сред- нем 18,29
2	Кета	III—IV	15,3	10,75	Нет	9,60	14,77	
3	Кета	III—IV	16,7	11,16	—	10,14	14,76	
4	Кета	IV	26,0	14,77	0,04	9,51	15,50	
5	Горбуша	III—IV IV	19,8	15,15	0,03	9,84	13,68	

Таблица 4

Номер образца препарата	Содержание (в % от общего азота в препарате)				Содержание диаминокислот в белке препарата в %				
	азота диаминокислот				азота моноаминокислот	аргинин	гистидин	лизин	всего
	аргинин	гистидин	лизин	всего					
1	20,4	1,6	16,1	38,2	51,9	11,2	1,1	14,7	26,9
2	15,7	0,2	20,4	37,2	53,0	9,1	0,1	19,7	28,9
3	17,8	1,1	19,5	38,5	48,4	11,0	0,8	20,2	32,0
Среднее	18,0	0,7	18,7	37,4	51,3	10,7	0,7	18,2	29,3
4	28,6	0,2	18,9	47,7	36,0	18,2	0,2	19,1	37,4
5	16,1	1,0	20,4	37,4	46,8	9,1	0,6	19,3	29,1

Как видно из данных табл. 3 и 4, состав белков молок непостоянен и зависит от степени зрелости желез. При созревании молок содержание диаминокислот увеличивается в основном за счет увеличения количества аргинина. Белки не вполне зрелых молок кеты содержали в среднем 10,7% аргинина, а созревших — 18,2%. Содержание других аминокислот изменяется в меньшей степени.

Таким образом, при созревании молок соотношение диаминокислот в белках молок заметно меняется. Так, в белках не вполне зрелых молок кеты содержалось аргинина 36,3, гистидина — 1,7 и лизина — 61,9%, а в белках созревших молок соответственно: 48,6; 0,48 и 50,9% от общего содержания диаминокислот в белках молок.

Зная выход и состав препаратов сухих обезжиренных молок, можно расчетным путем определить содержание отдельных аминокислот в сырых молоках. Оказалось, что в молоках кеты III—IV стадии зрелости содержится в среднем: аргинина 1,85, гистидина — 0,12 и лизина — 3,15%, а в созревших молоках (IV стадия) — соответственно 4,08, 0,04 и 4,37%. В молоках горбуши содержится в среднем: аргинина 1,41, гистидина 0,10 и лизина 2,98%.

УТОЧНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТАМИНОВ

По получению протамин-сульфата из молок лососевых проведено около 20 опытов. В основу работы были положены существующие способы выделения протаминов из молок [1, 2, 3, 7 и 8], основывающиеся на способности протаминов образовывать солеобразные соединения с минеральными кислотами, растворимые в воде и нерастворимые в спирте.

Процесс производства протаминов можно разделить на два самостоятельных этапа. 1) обезвоживание и обезжиривание молок растворителями и 2) извлечение протамин [7, 8]. Перед обезвоживанием молекулы измельчают и обрабатывают слабым раствором уксусной кислоты при нагревании или без нагревания (метод Косселя). Для обезвоживания обычно применяют 96°-ный этиловый спирт, который также растворяет жир. Исключение представляет метод А. И. Караева, Р. К. Алиева и др. [2], по которому измельченные молекулы обезвоживают ацетоном, при этом предварительную обработку уксусной кислотой не производят.

Из сухих обезжиренных молок протамин извлекают чаще всего растворами серной кислоты различной концентрации — от 1 до 10%. Образующийся при этом протамин-сульфат выделяют из раствора путем осаждения спиртом, а затем различными приемами очищают от примесей (свободной серной кислоты, минеральных солей, балластных белков и пр.).

Авторы выполняли работы по упрощению методики получения протамин-сульфата. С этой целью были испытаны все известные методы получения протаминов. Кроме того, проводили опыты по извлечению протамин-сульфата растворами серной кислоты непосредственно из измельченных молок, минуя стадию их высушивания и обезжиривания. Проверяли также возможность использования вареных молок для получения протамин-сульфата и выясняли оптимальные концентрации раствора серной кислоты для экстракции протамин-сульфата из сырых молок, обезжиренных растворителями, и вареных молок. Уточняли способы очистки протамин-сульфата от балластных белков и определяли концентрацию спирта, необходимую для полного осаждения протамин-сульфата из водных растворов.

Полученные в разных опытах образцы протамин-сульфата из молок кеты и горбуши подвергали подробному анализу.

Чтобы установить количество спирта, необходимое для полного осаждения протамин-сульфата, мы определили степень осаждения протамин-сульфата при разных концентрациях спирта в растворе. Для этого в 10 колбочек налили по 10 мл профильтрованного сернокислого экстракта протамин-сульфата и затем добавили различное количество 96%-ного спирта с таким расчетом, чтобы получить концентрацию спирта в разных колбочках в пределах от 24 до 80°. Спустя 24 ч выпавший в колбах осадок белка отфильтровали через высушенные и взвешенные бумажные фильтры. Затем фильтры с осадком белка были высушены при 105°С до постоянного веса. В табл. 5 показано количество белка, осажденного спиртом, при различных концентрациях его в растворе.

Таблица 5

Количество 96%-ного спирта добавленного к экстракту протамин-сульфата в мл	Концентрация спирта в растворе в °	Выход сухого осадка белка	
		в г	в %
3,3	24	0,0190	33,3
10,0	48	0,0249	43,7
13,4	55	0,0488	85,6
16,6	60	0,0487	85,4
21,0	65	0,0498	87,4
23,1	67	0,0504	88,4
27,0	70	0,0570	100,0
31,7	73	0,0566	99,3
35,7	75	0,0569	99,8
50,0	80	0,0600	105,3

Из табл. 5 видно, что полное осаждение белка спиртом происходит при концентрации спирта в растворе равной 70°. Отсюда следует, что рекомендуемая некоторыми исследователями для осаждения белка концентрация спирта в растворе ниже 70° не обеспечивает полного осаждения белка, что, естественно, ведет к потерям и уменьшению выхода готового протамин-сульфата. На основании этого опыта мы пришли к выводу, что осаждение протамин-сульфата спиртом следует проводить таким количеством спирта, чтобы его концентрация в сернокислом экстракте или в водных растворах протамин-сульфата была равна 70—72°.

В последующей работе, во всех случаях при осаждении протамин-сульфата мы применяли указанную концентрацию спирта в растворе.

В некоторых опытах для извлечения протамин-сульфата растворами серной кислоты использовали специально приготовленные препараты (которые в дальнейшем будем называть полупродуктами) сухих, обезжиренных молок (образцы № 1, 2, 4, 5, 7). Полупродукты готовили из не вполне созревших молок кеты (III—IV стадия) следующими четырьмя способами:

1) образцы № 1, 2 и 3 — измельченные сырые (образцы № 1 и 3) или вареные (образец № 2) молоки обрабатывали 0,1%-ным раствором уксусной кислоты (при нагревании или без нагревания), затем холодным и горячим этиловым спиртом, после чего промывали эфиром и сушили на воздухе (метод Косселя);

2) образцы № 5 и 7 — измельченные сырые (образец № 5) или вареные (образец № 7) молоки обрабатывали ацетоном и затем эфиром (метод Караева и др.);

3) образец № 4 — измельченные сырые молоки обрабатывали холодным, а затем горячим этиловым спиртом и эфиром;

4) образец № 6 — измельченные вареные молоки обрабатывали спиртом, затем ацетоном и промывали эфиром.

Все описанные методы обезживания и обезжиривания молок сводятся к получению по возможности чистого белка.

Выход полупродуктов и результаты анализа их представлены в табл. 6.

Таблица 6

Номер образца полупродукта	Выход в % от веса сырых молок		Химический состав полупродуктов в %				Содержание азота в белке в %
	вареные молоки	полупродукты	влага	жир	зола	общий азот	
1	—	11,8	10,75	0,1	4,46	14,87	17,59
2	67,0	12,0	9,86	Нет	6,25	15,02	18,23
3	—	12,1	11,03	Нет	4,78	14,71	17,47
4	—	15,3	10,75	—	9,60	14,77	18,54
5	—	16,7	11,16	Нет	10,14	14,76	18,75
6	64,8	11,7	10,79	—	7,31	14,62	17,85
7	64,1	12,8					

Не анализировали

В среднем 18,00%

Как видно, выход полупродуктов зависит от способа получения, тогда как их химический состав весьма близок.

Эти же полупродукты (образцы № 1, 4, 5) были в дальнейшем использованы для определения содержания диаминокислот и качественного анализа аминокислотного состава белков молок.

Из отечественной и зарубежной практики известно, что протамины можно получать как из свежих, так и из мороженных молок.

Майоли [3] предложил для производства протаминов использовать вареные молоки, из которых при варке удаляется часть жировых и слизистых веществ, что весьма важно для проведения экстракции протамин-кислотой и фильтрации сернокислых экстрактов. Варенные в течение 10 мин, не вполне зрелые молоки жеты содержат около 78% влаги, 3% золы, 0,56% жира и 3% азота.

Как отмечалось выше, технология получения протамин-сульфата в отдельных опытах изменялась. Так, процесс экстракции протамин-серной кислотой варьировали следующим образом.

1 Извлечение протамин проводили из сухих обезжиренных молок (полупродуктов).

2. Протамин извлекали непосредственно из измельченных молок как сырых, так и вареных.

3. Для экстракции в разных опытах применяли растворы кислоты различной концентрации: 1, 5 и 10%, причем в том случае, когда экстрагировали протамин из полупродуктов (сухих обезжиренных молок), к ним добавляли 5 или 10%-ные растворы серной кислоты. В случае, когда экстрагировали протамин непосредственно из измельченных молок, к ним добавляли разведенную серную кислоту с таким расчетом, чтобы создать различную концентрацию кислоты в массе: 1, 5 и 10%.

4. Число экстракций в разных опытах меняли от 1 до 3.

5. Соотношение экстрагируемого материала и кислоты также изменяли. Так, в тех опытах, когда кислотой воздействовали непосредственно на измельченные молоки придерживались соотношения молок и кислоты 1:1,5 (исключение составил один опыт, в котором первая экстракция проходила при соотношении молок и кислоты 1:7, вторая — 1:10 и третья — 1:0,5).

В тех опытах, в которых экстрагировали протамин из сухих молок, соотношение полупродуктов и кислоты изменяли от 1:2 до 1:6.

Сернокислые экстракты протамин-сульфата, полученные в отдельных опытах, объединяли. Эти экстракты представляли собой растворы желтовато-белого цвета, непрозрачные. Кроме находящегося в растворимом состоянии протамин-сульфата, в этих растворах содержалось большое количество балластных белков, находящихся во взвешенном состоянии, а также серной кислоты и других примесей.

Процесс выделения протамин-сульфата из экстрактов и его очистку осуществляли путем применения следующих операций:

1) фильтрование сернокислого экстракта через асбестовые фильтры под вакуумом;

2) подщелачивание сернокислого экстракта аммиаком для изменения pH среды (в щелочной аммиачной среде pH 8—9, большая часть балластных белков выпадает в осадок и в этом случае от них сравнительно легко освободиться центрифугированием);

3) многократное переосаждение сульфата протамин спиртом из его водных растворов для удаления свободной серной кислоты (число переосаждений в разных опытах было от 1 до 3);

4) подщелачивание аммиаком водного раствора протамин-сульфата, очищенного от свободной серной кислоты переосаждениями и от большей части балластных белков фильтрованием экстракта;

5) промывка готового препарата спиртом и эфиром для удаления возможных остатков жира.

Такой очистке подвергали все образцы протамин-сульфата.

В табл. 7 показан выход образцов протамин-сульфата (в % от веса сырых молок) и результаты физико-химического анализа этих образцов.

Таблица 7

Номер опыта	Экстрагируемый материал	Выход протамин-сульфата в % от веса сырых молок	рН 5%-ного раствора протамин-сульфата	Содержание в %			
				влаги	золы	общего азота	азота в белке
1	Полупродукты:						
	№ 1	0,34	7,0	9,85	7,16	13,22	15,9
2	№ 5	0,36	—	—	—	—	—
3	№ 4	0,66	7,0	15,48	4,61	14,52	18,2
4	№ 4	1,00	4,0	10,44	0,56	13,40	15,1
5	№ 7	0,62	4,0	10,26	14,04	12,10	16,0
6	№ 2	0,74	4,0	11,12	6,98	14,50	17,7
7	Измельченные сырые молоки	0,16	—	13,06	2,52	—	—
8	То же	0,35	5,5	13,91	1,67	16,45	19,5
9	Измельченные вареные молоки	0,43	7,0	15,39	7,01	13,03	16,8
10	То же	0,41	—	—	—	—	—
11	"	0,47	—	—	—	—	—
12	"	0,24	—	—	—	—	—
13	"	0,43	7,0	16,05	3,10	15,85	19,6
14	"	0,56	4,0	13,79	11,28	12,75	17,0
15	"	0,52					
16	"	0,48	—	—	—	—	—
17	"	0,64	4,0	10,51	8,71	13,98	17,3
18	"	0,53	4,0	11,50	3,61	14,80	17,4
19	"	0,53	4,0	9,34	7,53	13,28	16,0

На основании данных, полученных в разных опытах, было сделано заключение, что при одинаковой очистке препаратов (опыты 3, 8—11, табл. 7) выход протамин-сульфата, выделенного из полупродуктов, был несколько выше, чем выделенного из измельченных сырых или вареных молок, а из вареных, в свою очередь, выход был выше, чем из сырых молок.

Химический состав всех образцов протамин-сульфата, полученных из недостаточно зрелых молок кеты, не удовлетворил нас, так как содержание азота в них было значительно меньше, а зола больше, чем в трипротамине, получаемом на Бакинском заводе медпрепаратов.

Сравнение по органолептическим показателям (цвет, внешний вид) образцов протамин-сульфата показало, что все они достаточно светлые — бело-кремовые; по виду некоторые из них представляют собой крупитчатые, а некоторые очень тонкие, прилипающие к стеклу, порошки. Вкус всех образцов складчатый, немного вяжущий, характерный для протаминов.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ОБРАЗЦОВ ПРОТАМИН-СУЛЬФАТА

Способность протамин-сульфата оказывать пролонгирующее действие и связываться с инсулином была проверена биологическим путем во Всесоюзном институте экспериментальной эндокринологии.

Так как все образцы протамин-сульфата, полученные в наших опытах, подвергнуть биологическим испытаниям не представилось возможным, были отобраны 7 образцов, технология которых наиболее резко различалась (см. порядковые номера 1, 6, 8, 9, 13, 17 и 19, табл. 7).

Биологические испытания препаратов протамин-цинк-инсулина, приготовленных Институтом эндокринологии с отобранными семью образцами протамин-сульфата, показали, что в молоках дальневосточной кеты содержится протамин, пригодный для создания гормонального препарата протамин-цинк-инсулина, но не все 7 образцов протамин-сульфата дали одинаковые результаты. Так, препараты протамин-цинк-инсу-

лина, приготовленные с образцами протамина № 1, 6, 8, 9, обладали достаточно пролонгированным действием. Однако образцы протамин-сульфата № 8 и 9 растворялись в 2%-ном растворе динатрийфосфата хуже образцов № 1 и 6. В соединении с инсулином образцы № 1 и 6 образовали тонкую суспензию, а образцы № 8 и 9 — грубую. Технология этих образцов протаминов различалась, а именно: образцы протаминов № 1 и 6 были получены путем экстрагирования протамин-сульфата из полупродуктов, образец № 8 — непосредственно из измельченных сырых молок и образец № 9 — из вареных. Во всех этих четырех опытах, экстракцию протамин-сульфата осуществляли 10%-ной серной кислотой. В опытах № 13, 17 и 19 протамин-сульфат извлекали из измельченных вареных молок, причем добавляли к фаршу такое количество кислоты, чтобы ее концентрация в общей массе составляла 5%.

Полученные сернокислые экстракты протамин-сульфата образцов № 1, 6, 17 и 19 были очищены от балластных белков фильтрованием, а из экстрактов протаминов образцов № 8, 9 и 13 балластные белки не отделяли.

Препарат протамин-сульфата очищали следующими путями. Из экстрактов, полученных в опытах 1, 6, 13, 17 и 19, протамин-сульфат осаждали спиртом и затем повторными переосаждениями очищали от свободной серной кислоты. После этого в опытах 1 и 13 из водного раствора протамин-сульфата отделяли оставшиеся балластные белки подщелачиванием аммиаком до pH 7; в опытах № 6, 17 и 19 такой очистки не делали. В опытах 8 и 9, полученные сернокислые экстракты протамин-сульфата, минуя фильтрование, сразу подщелачивали аммиаком до pH 7. При этом выпавшие балластные белки отделяли от протамин-сульфата, который затем осаждали спиртом. От образующегося при этом сернокислого аммония протамин-сульфат очищали двукратным переосаждением спиртом из водных растворов.

Недостаточная очистка образцов протамин-сульфата, полученного в опытах 6, 17 и 19, сказалась на результатах их биологических испытаний. Препараты протамин-цинк-инсулина, приготовленные с образцами протамин-сульфата № 17 и 19, вызвали при эксперименте судороги у 50% подопытных животных, в этих препаратах содержалось более 10% несвязанного инсулина. Образец № 13 не испытывали на животных ввиду его плохой растворимости в 2%-ном растворе динатрийфосфата. Таким образом, недостатки, которые выявились во время биологических испытаний различно приготовленных образцов протамин-сульфата, можно до некоторой степени отнести за счет недостаточной очистки образцов протамин-сульфата от примесей.

Высокая зольность препаратов (см. табл. 7) до 8,7%, пониженное содержание азота и наличие балластных белков вызывают болезненность при инъекции и могут вызвать судороги у подопытных животных.

Проведенные опыты по выделению протамин-сульфата из молок кеты и результаты биологических испытаний ряда препаратов показали, что в технологии приготовления протамин-сульфата следует внести ряд дополнений и изменений. С учетом этого была составлена технологическая инструкция получения протамин-сульфата из молок дальневосточных лососевых. По разработанной усовершенствованной технологии в 1960 г. в заводских условиях были получены образцы протамин-сульфата из молок кеты и горбуши. Выход протамин-сульфата из не вполне созревших сырых молок кеты при получении его по уточненной технологии в лабораторных условиях не превышал 0,5% от веса сырых молок.

Судя по тому, что образцы протаминов, полученные в опытах 1, 6, 8 и 9, по способности оказывать пролонгирующее действие оказались одинаковыми, можно предположить, что трудоемкий процесс высушивания и обезжиривания молок перед экстракцией протамин-сульфата не обязателен. В том случае, когда на производство поступают не жирные молоки (с содержанием жира около 1%), протамин хорошо извлекается из фарша молок разбавленной серной кислотой. Поэтому указанный процесс, связанный с большим расходом растворителей (спирта, ацетона, эфира), мы предложили исключить из технологии. Процесс варки молок с целью удаления части жира, наоборот, мы рекомендовали для включения в технологию.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТАМИН-СУЛЬФАТА В ЗАВОДСКИХ УСЛОВИЯХ

Опыты проводили на заводе медицинских препаратов Ленинградского мясокомбината имени С. М. Кирова.

Было проведено два опыта по получению протамин-сульфата из мороженых молок кеты и горбуши, заготовленных на Стародубском заводе Главсахалинрыбпрома в сентябре 1959 г. и доставленных самолетом в Ленинград. Молоки кеты были IV стадии зрелости, а горбуши смешанные — III—IV и IV стадий. Химический состав молок, использованных в этих опытах, приведен в табл. 1.

Целью этих опытов была проверка разработанной нами в лабораторных условиях технологии получения протамин-сульфата из молок лососевых, уточнение норм выхода протамин-сульфата и расхода материалов.

При заводском испытании технологический процесс получения протамин-сульфата был уточнен. Предложено варить молоки в подкисленной уксусной кислотой воде и при температуре не превышающей 95—96°С. Для этого в воду, нагретую до указанной температуры, добавляют такое количество уксусной кислоты, чтобы ее концентрация в растворе была не выше 0,2%. Воды следует наливать в котел в

Таблица 8

Номер опыта	Вид рыбы	Вес дефростированных мо- локов в кг	Выход варе- ных молок в % от веса де- фростирован- ных	Выход фарша из молок в % от веса варе- ных молок	Потери в % от веса варе- ных молок	Характерис- тика серно- кислого экст- ракта прота- мина	Характерис- тика профиль- трованного экстракта протамина	Выход прота- мин-сульфата в % от веса дефростиро- ванных молок
1	Гор- буша	16,5	70,65	98,7	1,3	Мутно-бе- лый как вода с молоком	Прозрачный, светло-жел- тый, слегка опалесциру- ющий	0,67
2	Кета	37,8	70,10	98,5	1,5	Белый, не- прозрачный, видны хлопья во взвешенном состоянии	То же	0,83

Таблица 9

Номер опыта	Вид рыбы	Ледяная уксусная кислота в кг	Серная кислота (уд. вес 1,84) в кг	Аммиак 25% -ный раствор в кг	Эфир этиловый в кг	Спирт этиловый 96% -ный в л
1	Горбуша . .	0,97	8,42	0,09	4,24	52,7
2	Кета	0,53	8,25	0,15	2,12	42,9
В среднем		0,70	8,33	0,12	3,18	47,8

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТАМИНОВ (САЛЬМИНОВ)

Полученные образцы протамин-сульфата из молок кеты и горбуши были довольно близки по составу. В протамине из зрелых молок кеты содержалось влаги 12,02%, азота — 21,36% (на сухое вещество), а в протамине из молок горбуши соответственно — 11,72 и 20,10%. Содержание золы в этих образцах протамин-сульфата не превышало 2,5%. Все образцы протамин-сульфата хорошо растворялись в 2%-ном растворе двуназрийфосфата. По указанным показателям, полученные нами образцы протамины не уступают по качеству отечественному трипротамину¹ и импортному протамину.

По внешнему виду образцы протамин-сульфата представляют светлые кремовые тонкие порошки.

Качественный хроматографический анализ аминокислотного состава солянокислых гидролизатов протаминов (рис. 4) показал, что в них содержатся две диамино-кислоты — аргинин и лизин. Из моноаминокислот были найдены серин, гликокол, аланин, пролин, валин и лейцины и в небольших количествах также дикарбоновые аминокислоты — аспарагиновая и глутаминовая. Таким образом, в протамин-сульфатах из молок кеты и горбуши содержится десять аминокислот.

В табл. 10 приведены данные о количественном содержании аминокислот в разных образцах протамин-сульфата (в %).

Как видно из табл. 10, общее содержание диамино-кислот в продукте зависит от степени зрелости молок, использованных для производства протамин-сульфата.

В протамине из зрелых молок кеты азот диамино-кислот составил $\frac{3}{4}$ общего азота, а из не вполне зрелых молок — только $\frac{1}{2}$. В протамине из зрелых молок кеты содержится значительно больше аргинина (почти в 2 раза) и несколько меньше лизина, чем в протамине из не вполне созревших молок.

¹ ВТУ на трипротамин (сульфат) 446-51.

Вид сырья	Азот аминокислот в % от общего азота продукта					Содержание диаминокислот в % от белка продукта		
	диаминокислоты				моноаминокислоты	аргинин	лизин	всего
	аргинин	гистидин	лизин	всего				
Молоки горбуши III—IV и IV стадий	44,4	Нет	16,0	60,4	36,7	28,5	17,2	45,7
Молоки кеты IV стадий	60,7	Нет	14,1	74,8	21,7	41,3	16,1	57,4
Молоки кеты IV стадий	59,6	Нет	11,5	71,1	25,7	41,7	13,5	55,2
Молоки кеты III—IV стадий	37,0	Нет	17,7	54,8	39,5	22,4	18,0	40,4

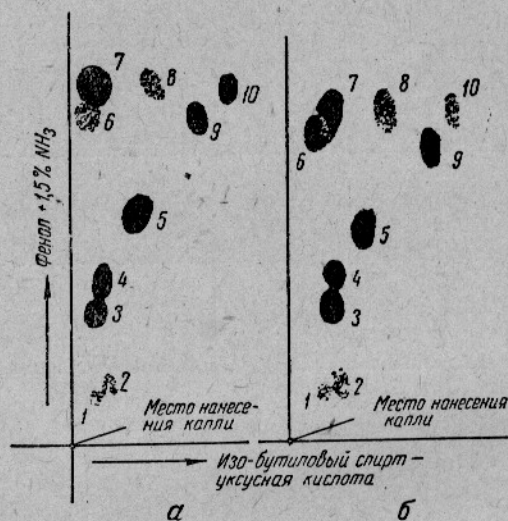


Рис. 4. Хроматограмма аминокислотного состава протаминов:

а — кетина, б — горбушина, 1 — аспарагиновая кислота, 2 — глутаминовая кислота, 3 — серин, 4 — гликокол, 5 — аланин, 6 — лизин, 7 — аргинин, 8 — пролин, 9 — валин, 10 — лейцины.

Зависимость аминокислотного состава протаминов от степени зрелости желез, особенно хорошо видна из данных табл. 11, в которой показано соотношение аргинина и лизина в % от общего содержания диаминокислот в протаминных и соотношение азота аргинина и азота лизина от общего азота диаминокислот.

Таблица 11

Вид сырья	От общего азота диаминокислот в %		От общего количества диаминокислот в %	
	азот аргинина	азот лизина	аргинин	лизин
Молоки горбуши (смешанные)	73,5	26,5	62,3	37,7
Молоки кеты IV стадий	81,1	18,8	72,0	28,0
IV стадий	83,8	16,2	75,5	24,4
III—IV стадий	67,6	32,4	55,4	44,6

Сопоставляя полученные данные о составе и выходе протаминов из молок кеты и горбуши с имеющимися в литературе сведениями о протаминных из других рыб, интересно отметить следующее. Вальдшмидт-Лейтц и Гудернач [6], исследовавшие зависимость между составом и степенью зрелости молок сельди, отмечают, что в процессе созревания молок происходит образование и накопление протамин, соответственно чему выход протамин из незрелых молок был получен значительно меньше, чем из зрелых текучих молок. По данным этих авторов, в протамин из зрелых молок сельди не содержится дикарбоновых аминокислот, но они имеются в протамин из незрелых молок.

Феликс, Голпфольд-Крекеельс и др. [9], изучая нуклеопротамин, выделенные из молок канадской форели, также нашли, что на определенных стадиях развития желез, в нуклеопротаминных содержатся дикарбоновые аминокислоты. Кроме того, в некоторых препаратах нуклеопротаминных из молок гольца и речной форели ими был обнаружен треонин.

В свою очередь, Андо, Ямаси и др. [5] не нашли разницы в содержании азота и аминокислот в белках основного характера, выделенных из молок форели, находящейся в разном физиологическом состоянии.

Таким образом, имеющиеся в литературе данные относительно протаминных некоторых рыб в общем согласуются с полученными нами для протаминных из молок кеты и горбуши.

Образцы протамин-сульфата из молок кеты и горбуши, полученные в заводских условиях, были переданы Московскому заводу эндокринных препаратов для биологических испытаний. Гормональные препараты протамин-цинк-инсулина, приготовленные с обими образцами протамин, были не токсичны и обладали пролонгированным действием.

Следует отметить, что препарат протамин-цинк-инсулина, приготовленный с протамин из молок горбуши при испытании на длительность действия (испытывали после хранения в течение года) оказался несколько лучше препарата протамин-цинк-инсулина, приготовленного с протамин из молок кеты.

ВЫВОДЫ

1. В молоках дальневосточных лососевых (кеты и горбуши) III—IV и IV стадий зрелости содержатся дипротамин, в состав которых входят две диаминокислоты — аргинин и лизин.

2. Протамин из молок кеты и горбуши содержат по 10 аминокислот, в том числе небольшое количество дикарбоновых.

3. В процессе созревания желез происходит изменение в аминокислотном составе основных белков молок, вследствие изменения соотношения аргинин и лизин: количество аргинин увеличивается, а лизин соответственно уменьшается.

4. Белки молок лососевых рыб богаты лизином и аргинином, что свидетельствует о целесообразности использования молок также для целей диетического питания в тех случаях, когда требуется обогащение пищи этими аминокислотами.

5. В результате проведенных работ уточнена технология получения протамин-сульфата из молок дальневосточных лососевых: рекомендовано включить в нее варку молок в воде, подкисленной уксусной кислотой. При поступлении в производство нежирных молок (с содержанием жира около 1%) предлагается исключить процесс обезвоживания и обезжиривания молок растворителями. Эти изменения, наряду с экономией времени и материалов, обеспечивают получение препаратов протамин-сульфата, не уступающих, как показали биологические испытания, по способности связывать инсулин и оказывать пролонгирующее действие препаратам протамин-сульфата, полученным по существующим методам (за рубежом).

6. Выход протамин-сульфата из молок зависит от степени их зрелости и для молок кеты и горбуши, заготавливаемых в период нерестового хода этих рыб, может колебаться от 0,50 до 0,83%.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Александровская Н. С. Протамин некоторых видов рыб. Труды лаборатории по изучению белка и белкового обмена в организме. Вып. 6. Изд. ВАСХНИЛ, 1934.
2. Караев А. И., Алиев Р. К., Осина Е. Е., Гаузер Е. Г. и Иоганец Г. Я. Производственный способ получения трипротамин-сульфата из молок осетровых рыб. Известия Академии наук Азербайджанской ССР, № 1, 1957.
3. Майоли. Французский патент 1040991.20.10.53. Реферативный журнал «Химия», 1956, № 12.
4. Шарпенак А. Э., Балашова О. Н., Соловьева Е. М. и Львова В. В. Метод определения аминокислотного состава белков. Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова, Т. XVII, № 2. Изд-во АН СССР, 1934.
5. Ando T., Jamasaki M., Abukumagawa E., Yshii S., Nagai J., Hashimoto C. Studies on protamines. III. N—terminal residues of salmine and clupeine.

- IV. The basic proteins of the testis cell nuclei of adult and immature rainbow-trouts in breeding season. *J. Biochem.*, 1958, 45, N 6. (Реферативные журналы «Химия», «Биологическая химия». Изд-во АН СССР, 1959, № 17, 22810).
6. Waldschmidt—Leitz E., Gudernatsch H. Über die Struktur der Protamine. V. Über die Beziehungen zwischen Zusammensetzung und Reifegrad des Clupeins. *Hoppe—Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1957, (1958), N 4—6; (Реферативные журналы «Химия», «Биологическая химия», Изд-во АН СССР, 1958, № 22, 28608).
7. Kossel A. *The Protamines and Histones* Longmans. Green and Co, London and New York, 1928.
8. Scott D. A., Fisher A. M. Studies on insulin with protamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 58, 1936, N 1.
9. Felix K., Goppold—Krekels A., Schiff O., Yamada T., Nucleoprotamin VII. — *Hoppe—Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1958, N 4—6. (Реферативные журналы «Химия», «Биологическая химия», Изд-во АН СССР, 1959, № 12).
-