

Р133040

Вологодского Молочно-Хозяйственного  
Института

---

Проф. С. С. ПЕРОВ

# О кристаллизации казеиновой КИСЛОТЫ

---

Peroff, S

Ueber die Krystallisation der  
Caseinsäure

---

„СЕВЕРНЫЙ ПЕЧАТНИК“

ВОЛОГДА

1925

В брошюре „О кристаллизации казеиновой кислоты“  
 надлежит исправить на странице 8 следующие опечатки:

	Напечатано:	Следует:
Стр. 4 сверху:	$\frac{E}{50000}$	$\frac{E}{500000}$
„ 5 „	$\frac{n}{50000}$	$\frac{n}{500000}$
„ 5 „	$\frac{E}{100000}$	$\frac{E}{1000000}$
„ 10 „	$\frac{1220.100}{100000.100}$	$\frac{1220.100}{1000000.1000}$

Труды Вологодского Молочно-Хозяйственного  
Института

---

Бюллетень № 50

Проф. С. С. ПЕРОВ

О кристаллизации казеиновой  
КИСЛОТЫ

„СЕВЕРНЫЙ ПЕЧАТНИК“  
ВОЛОГДА  
1925

## О кристаллизации казеиновой кислоты.

Вопрос о кристаллизации белков имеет особенно острое значение в эпоху, когда химия стремится нащупать верные подходы к раскрытию состава белковых тел. Возможность получить вещество для анализа в форме кристалла обеспечивает, по установившемуся взгляду, индивидуальность тела, а потому понятно, с каким интересом химик пытается разбить непреодолимую пока аморфность белкового вещества. Дисперсоидологическая ориентация в химии принципиально отрицает аморфность, как специфическое состояние, и точка зрения Грэма находит доказательность единственно в некристаллизующихся белках.

Физиологами Hartig'ом и Radlkofer'ом еще в середине XIX века были описаны кристаллы алейроновых зерен, белковая сущность которых была установлена. Эти наблюдения, уже указавшие на путь к методике получения кристаллов белка, можно сопоставить с аналогичными наблюдениями встречаемых в природе кристаллов трудно растворимых веществ, в роде кремневой кислоты, образование которых объяснимо лишь наличием огромных масс растворителя и неограниченного времени. В дальнейшем были произведены попытки, и вполне удачные, искусственной кристаллизации белковых веществ. Основные работы по кристаллизации белков проведены были Hofmeister'ом. Его способ основывается на высаливании белков из растворов — ряд белковых веществ нерастворим в соляных растворах высокой концентрации.

Альбумин куриного яйца легко растворяется только в слабых растворах  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; почти полное высаливание альбумина происходит при концентрации до 70% соли. Поэтому, из рас-

твора альбумина в 50—60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  путем медленного испарения можно было получить кристаллы в форме глобулитов. При повторении кристаллизации выпадают более или менее ограниченные кристаллы. А подкисление раствора помогает этой кристаллизации, как было доказано позднейшими опытами Норкинса и Pincusa.

Но все эти подходы к кристаллизации белков не подвергались достаточной оценке и критике; между тем, полная продуманность и с физической и химической сторон приводит к тому, что все эти кристаллизации совершались с веществами, являвшимися вторичными. При кристаллизации белков по способу Hofmeister'a наблюдается внезапный процесс ее; момент перехода границы концентрации  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  сопряжен с мгновенным выпадением осадка. При этих условиях необходимо было знать дисперсоидологические законы о пересыщениях, по которым концентрация вещества является главным аргументом. От нее зависит количество кристаллизационных центров, а ими обуславливается ход кристаллизации. Но законы эти не были тогда открыты, и во всех опытах кристаллизации белков брались слишком высокие концентрации, почему и получались плохо ограниченные кристаллы. Но, с другой стороны, и невозможно было избежать этого, ибо при меньших концентрациях не будет происходить высаливания. Следовательно, этот способ порочен с точки зрения физической.

Но не менее порочен он и с химической.

Подкисление, вводимое для успеха кристаллизации, рассматривалось только, как физический фактор, а это далеко не так. Даже небольшие дозы кислоты уже разлагают состав белковых веществ, обычно присутствующих в виде солей.

И Hofmeister имел дело с какими-то солями (чистыми) «альбумина», между тем, как Pincus—уже с разложенными, а весь смысл кристаллизации был отнесен и в том и другом случае как бы к одному белковому индивидууму, названному «альбумином». Эти соображения заставляют критически относиться к классическим опытам по кристаллизации белков.

Один из дисперсоидологических законов, открытых Веймарном, гласит, что скорость кристаллизации, а тем самым и

форма и величина кристаллических зерен осадка, прямо пропорциональна абсолютному пересыщению и обратно пропорциональна растворимости вещества, или в формуле:

$$W = \frac{P}{L}.$$

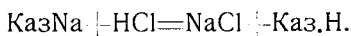
Приложение этого закона к практике дает выводы, что для получения трудно растворимого вещества в полногранных кристаллах, хотя бы и небольшого размера, необходимо создавать условия пересыщения не слишком большого значения скорости кристаллизации. В единицах, установленных Веймарном, она должна равняться не больше 3:

$$W = \frac{P}{L} = 3.$$

При подходе к вопросу о кристаллизации казеиновой кислоты встречается серьезное затруднение. В химической систематике и номенклатуре до сих пор неясно, что следует понимать под именем казеина. Является ли казеином состояние белка в молоке, или выделенное из него, и какими способами? Различного типа высаливания и осаждение кислотой дадут различные формы белка, между тем, все они как-будто считаются за одну. После достаточных наблюдений над выделением казеина, а особенно после работы над способом количественного определения его, я пришел к выводу, что белок молока нормально является белковой кислотой и должен носить наименование «казеиновой кислоты».

Казеиновая кислота есть препарат, выделенный кислотой из естественного молока коровы, обезжиренный и очищенный переосаждением из щелочи при условии выделения тоже кислотой, дегидратированный спиртом, деалкоголированный эфиром и высушенный при 45°. Этот препарат являет из себя белый порошок, растворимый в щелочи, естественном растворителе (NaCl, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) и нейтральных солях органических кислот, где он титруется, как кислота, с фенолфталеином. Эквивалентный вес его равен 1220. Растворимость казеиновой кислоты в воде крайне низка. Для приготовления ее растворов приме-

няют метод сливания, реакцию двойного обмена между эквивалентными растворами казеинового натрия и соляной кислоты.



При сливании растворов  $\frac{E}{50000}$  казеинового натрия и  $\frac{n}{50000}$  HCl получается  $\frac{E}{100000}$  раствор казеиновой кислоты, совершенно прозрачный, в котором не наблюдаются явления Тиндаля. Это дает некоторое право заключить о границах растворимости, насыщаемости казеиновой кислоты и относить ее к числу меньшему  $10^{-3}$  и около  $10^{-4}$

$$\frac{\text{экв. вес.}}{\text{разведение}} = \frac{1220 \cdot 100}{100000 \cdot 100} = 1,22 \cdot 10^{-4}$$

Для более пересыщенных растворов, из которых и необходимо вести кристаллизацию, необходимо прибегнуть к увеличению концентрации сливаемых растворов. Как показали наблюдения, всего удобнее брать концентрации, лежащие от  $\frac{E}{20000}$  до  $\frac{E}{10000}$  казеиновой кислоты, следовательно, от  $\frac{E \text{ и } n}{10000}$  до  $\frac{E \text{ и } n}{5000}$  сливаемых растворов казеинового натрия и соляной кислоты.

### Описание опытов кристаллизации казеиновой кислоты.

**ОПЫТ ПЕРВЫЙ.** Взятые были растворы  $\frac{E}{5000}$  казеинового натрия и  $\frac{n}{5000}$  HCl в количестве по 250 к. с. Слиты вместе в химический стакан при помешивании, при чем HCl вливается последней. На дно стакана опущено предметное стекло. Веществом консервирующим взят толуол. После пяти дней стояния в прохладном и спокойном месте на пластинке появился легкий налет, сам раствор чуть опалесцирует. Смысл этого налета в следующем. В сильно пересыщенном растворе казеиновой кислоты образовались уже в момент сливания весьма много-

численные центры кристаллизации. Время, являющееся фактором, усиливающим кристаллизацию, и сочетание действия законов Веймарна и Нойеса, приводят к росту центров и превращению их в кристаллы, уже не могущие находиться в суспендированном состоянии. Кристаллы опускаются на дно и образуют слой. В виду медленно совершающегося процесса кристаллизации, кристаллы успевают дорасти до полногранных форм; притекающий насыщенный раствор помогает их росту.

Предметное стекло вынуто из стакана, высушено и исследовано под микроскопом. Видна была равномерно расположенная масса кристаллического происхождения, зернистого строения. В нескольких местах заметны были как-бы осколки с неполными гранями кристаллов. Зернистость стала яснее после смачивания лакмусом, который неравномерно окрасил кристаллы и поры. Вполне ясных кристаллов не обнаружено.

ОПЫТ ВТОРОЙ. Взяты растворы  $\frac{E}{10000}$  казеинового натрия и  $\frac{n}{10000}$ -HCl в количестве по 250 к. с. Слиты вместе.

На дно стакана опущено предметное стекло. Прибавлен толуол. После семи дней стояния на предметном стекле был замечен более тонкий налет, чем в первом опыте. Раствор почти прозрачен. Предметное стекло высушено и исследовано под микроскопом.

Виден был, более тонкого строения, чем в первом опыте, зернистый слой, в котором уже во многих местах заметны бугорками плохо оформленные кристаллы. В некоторых удалось наблюдать две—три очерченные грани.

В силу того, что явление под микроскопом при концентрации  $\frac{E}{20000}$  обнаруживает медленный рост кристаллов, а при

$\frac{E}{10000}$  быстрый, не дающий нормальной кристаллизации, в дальнейшем я остановился на  $\frac{E}{15000}$ .



ОПЫТ ТРЕТИЙ. Взяты  $\frac{E}{7500}$  казеинового натрия и  $\frac{n}{7500}$  HCl по 250 к. с., слиты вместе, прибавлен толуол, опущено на дно стакана предметное стекло. После пяти дней стояния появился налет. Предметное стекло извлечено, высушено и исследовано под микроскопом. Замечены были в поле зрения на равномерно-зернистой поверхности отдельные кристаллы. Форма их напоминала таблички. Некоторые из них, с оборванными краями, давали легкий намек на шестисторонность. Этот опыт уже указал на правильность пути экспериментации. Концентрация найдена подходящая, и наметились условия получения полнораных кристаллов.

Очевидно, необходимо для получения вполне развитых кристаллов соблюдение следующих моментов: 1) брать концентрацию  $\frac{E}{15000}$ ; 2) проводить сливание больших объемов; 3) быстрее совершать смешивание и энергичнее—взбалтывание при сливании; 4) дать больше времени для процесса кристаллизации и 5) создать условия для нарастания кристаллов.

Поэтому были подготовлены два опыта в таком направлении.

ОПЫТ ЧЕТВЕРТЫЙ. Взяты 500 к. с.  $\frac{E}{7500}$  казеинового натрия и 500 к. с.  $\frac{n}{7500}$  HCl. Предварительно слиты в колбу при постоянном помешивании. Перелито все в стакан, опущены на дно три предметных стекла. Прибавлен толуол в большем, чем прежде, количестве. Оставлено на девять дней. Через девять дней вынуты два предметных стекла. Из них одно высушено и поступило под микроскоп. Второе без высушивания поступило в опыт пятый. Третье было оставлено еще на три дня, извлечено, высушено и поступило под микроскоп.

ОПЫТ ПЯТЫЙ. Приготовлено по 500 к. с.  $\frac{E}{10000}$  казеинового натрия и  $\frac{n}{10000}$  HCl. Слито вместе в колбу, потом

перелито в стакан, прилит толуол. Опущено второе предметное стекло из опыта четвертого, оставлено на пять дней. Потом извлечено, высушено и поступило под микроскоп. Под микроскопом все три пластинки дали на сильно кристаллическом, сравнительно равномерном фоне, ряд разбросанных кристаллов, не везде полногранных, но уже с ясно замеченными ограничениями.

На второй пластинке обнаружались вполне ясные формы.

В дальнейшем я даю подробное описание и зарисовку всех наиболее интересных образований.

На всех трех пластинках встречаются первые моменты кристаллизации, образования, имеющие ограничения, но еще векториально не завершенные.

На таблице № 1 зарисованы наиболее типичные из них. Кристаллы 1 и 6 дают уже шестигранные очертания, но одна из сторон кристалла нарушена присоединением обломка другого; во 2 и 7 кристаллах концевые грани налицо, но дифференциации отдельных кристаллов не заметно; 3 и 8 являют из себя наслоенные друг на друга кристаллы, при чем у верхних образованы все грани; 4 и 5 кристаллы дают тип двойниковых образований.

Все кристаллические образования полупрозрачны, напоминают желатиновые сгустки, имеют такой же оттенок клеевого тела, имеют в себе включения газа, ряд трещин и полос на поверхности, края граней неровны, углы не четки, наблюдается стремление к округлению очертаний.

Кристаллы 4, 5, 7 толсты, а потому имеют темный, желтоватый тон, не позволяющий разглядеть внутренность кристалла. Кристаллы 3, 4, 8 взяты с третьей пластинки. Таковы первые формы кристаллизации казеиновой кислоты.

На таблице второй зарисованы уже вполне развитые кристаллы. Мелкие кристаллы 5, 6, 10, 12 взяты с первой пластинки. Среди равномерной мелкой зернистости и рассеяны кристаллы, подобные им. Как видно, это вполне образованные шестигранные таблички. Размеры их от 4 до 10 микронов. Кристаллы 3, 9, 11, 14, 15, 16 найдены на третьей пластинке, остальные на второй. Кристаллы уже вполне оформлены. Все одинаково шестигранные. Принадлежат они к одно- или к трехклиномер-

ной системе; намек на симметрию слабый. В поляризованном свете ведут себя, как кристаллы двойного лучепреломления. Величина их—от 15 до 30  $\mu$ . На кристаллах, найденных на второй пластинке, факт роста сказался весьма ясно. Все они крупнее обычно находимых на первой и третьей. Второй кристалл имеет шестьдесят микронов длины. Все хорошо окристаллизованы. Шестигранность бесспорна, симметрия неясная.

На таблице третьей зарисованы своеобразные сростания кристаллов. Первый кристалл сросся полностью одной из сторон, второй и четвертый—частью нижней поверхности, третий—частью грани, а пятый является крайне интересной комбинацией: на маточном крупном кристаллическом образовании, в котором заметны прямые линии в общем очертании, сидит целая груда мелких кристаллов, обычного шестигранно-табличного типа. Вероятно, процесс кристаллизации здесь происходил в два приема. Выделился вначале комок в неопределенной закругленной форме, а в нем уже пошел внутренний процесс кристаллизации; кристалл пятый, таким образом, дает некоторое понятие о ходе кристаллизации белка.

На таблице 4-й зарисовано наиболее совершенное образование, встреченное на 2-й пластинке, которое является, несомненно, типичным кристаллом казеиновой кислоты во всех отношениях.

Это образование представляет из себя три кристалла, сросшихся друг с другом, при чем часть третьего, лежащего под двумя первыми, уже не видна в силу толщины кристаллов. Два первых кристалла представляют из себя шестигранные таблицы, повидимому, трехклиномерной системы (хотя не исключается возможность принадлежности их и к одноклиномерной). Величина всего образования равна пятидесяти микронам. Толщина—от 3 до 5 микронов. Величина длинной оси кристалла «а»—28 микронов и «b»—30 микронов; величина короткой оси кристалла «а»—25 микронов и кристалла «b»—22 микрона. Углы (тупые)—около  $120^\circ$ , а меньше (острые)—несколько больше  $90^\circ$ . Длина отдельных граней—от 15 до 17 микронов. Кристаллы напоминают образования сложных кремнекислых соединений.

Рисунки 1 и 2 взяты в двух плоскостях, и заметно, что в толщину кристаллы имеют неровную ограниченность; на первом рисунке края неровные, на втором — грани четкие.

Оба кристалла испещрены многочисленными трещинками, ясно заметна слоистость в их строении, имеются включения газа (пузырьки), тон их окраски несколько желтоватый, они не вполне прозрачны, заметна «коллоидность» их структуры.

Наблюдения в поляризованном свете указывают на двойное лучепреломление.

Из всех этих наблюдений можно сделать короткий вывод.

Казеиновая кислота, методом сливания растворов казеин-натрия и HCl в эквивалентных концентрациях не больше  $\frac{E}{15000}$ , может быть выкристаллизована в виде шестигранных табличек трехклиномерной (одноклиномерной) системы.

### Методика получения кристаллов казеиновой кислоты.

Казеиновая кислота выделяется из молока уксусной кислотой (на 100 к. с. молока берется 5 к. с. 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), отфильтровывается и промывается водой, дегидратируется спиртом и обезжиривается эфиром. Полученный препарат переосаждается из щелочного раствора (на 1 гр. казеиновой кислоты 8,2 куб. с.  $\frac{n}{10}$  NaOH) уксусной кислотой (на 1 гр. растворенного казеин-натрия 2 к. с. 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Дегидратируется спиртом и деалкоголируется эфиром, сушится при 45° в термостате. Приготовленная таким способом кислота может служить для нормальной кристаллизации.

Берется навеска казеиновой кислоты 0,081 гр. и растворяется в эквивалентном количестве NaOH, для чего необходимо приготовленную навеску всыпать в мерную колбу, вместимостью в 500 к. с., смочить двумя, тремя каплями чистого спирта, залить 100 к. с. дистиллированной воды, взмутить, как следует, порошок, прилить 0,68 к. с.  $\frac{n}{10}$  NaOH и по окончательном растворении долить до 500 к. с. дистиллированной водой. При-

готовленный раствор будет отвечать  $\frac{E}{7500}$  казеинового натрия. Параллельно готовится обычными аналитическими приемами  $\frac{n}{7500}$  HCl в количестве 500 к. с.

В обыкновенную литровую колбу вливается первый раствор казеинового натрия, затем при постоянном помешивании в пять, шесть приемов вливается раствор соляной кислоты. Получается ясный раствор с чуть заметной голубизной в отраженном свете. Раствор этот отвечает  $\frac{E}{15000}$  казеиновой кислоты. Из колбы он переливается в широкий стакан, на дно которого опускают одну или несколько стеклянных пластинок (удобнее всего предметные стекла). Стакан ставится в совершенно спокойное место, защищенное от солнечных лучей и притока теплоты; приливают толуол или бросают несколько кристаллов тимола.

Через два-три дня раствор начинает опалесцировать сильнее. Через пять-шесть дней на стеклянных пластинках появляется налет, который и является слоем кристаллов казеиновой кислоты. Через девять-десять дней пластинки извлекаются, высушиваются и помещаются для исследования на столик микроскопа. Для лучшего наблюдения можно легко окрасить. Для увеличения кристаллов необсушенные пластинки переносятся во второй свежее-приготовленный раствор казеиновой кислоты концентрации  $\frac{E}{15000}$  или  $\frac{E}{20000}$  и оставляют дней на пять, после чего опять извлекают, высушивают и помещают под микроскоп. Наиболее удобно наблюдать при объективе D и окуляре 3 или 5.

#### По поводу действительности описанного явления.

При всем этом процессе соблюдены все условия, позволяющие с несомненностью относить полученные кристаллы к кристаллам казеиновой кислоты.

Физически это обосновано приложением законов дисперсионной химии.

В химическом отношении сливание обуславливает присутствие в растворе двух веществ — NaCl и казеиновой кислоты.

Растворимость первой соли точно определена, а двойных солей между NaCl и казеиновой кислотой в химии неизвестно.

При условии прибавления консервирующих веществ исключена возможность бактериологического разложения, а обычного гидролиза происходить не может в силу того, что в растворе могут присутствовать только Н<sup>+</sup> от казеиновой кислоты, весьма слабой концентрации, тем более автолиза казеиновой кислоты пока химия не знает. Но все же может быть единственным возражением по поводу кристаллов, что они принадлежат к продуктам уже распада казеиновой кислоты, но это возражение, не доказанное фактами, будет беспочвенно, а имеющегося материала достаточно для обоснования принадлежности полученных кристаллов к кристаллам казеиновой кислоты.

В ближайшем времени мною ставятся опыты с получением этих кристаллов в количестве достаточном для титрования и ф.-х. исследования.

Эта же работа является первым шагом в вопросе кристаллизации казеиновой кислоты, белкового вещества, столь важного в химии живого организма.

ТАБЛИЦА №1.

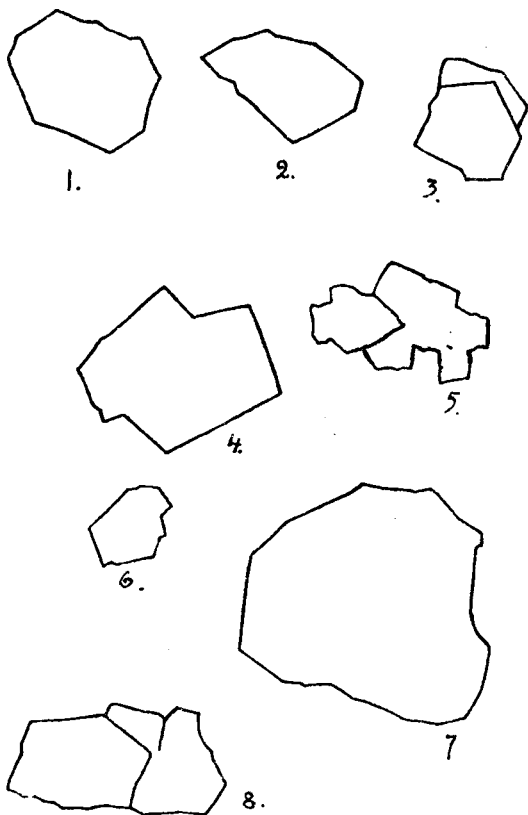


ТАБЛИЦА № 2.

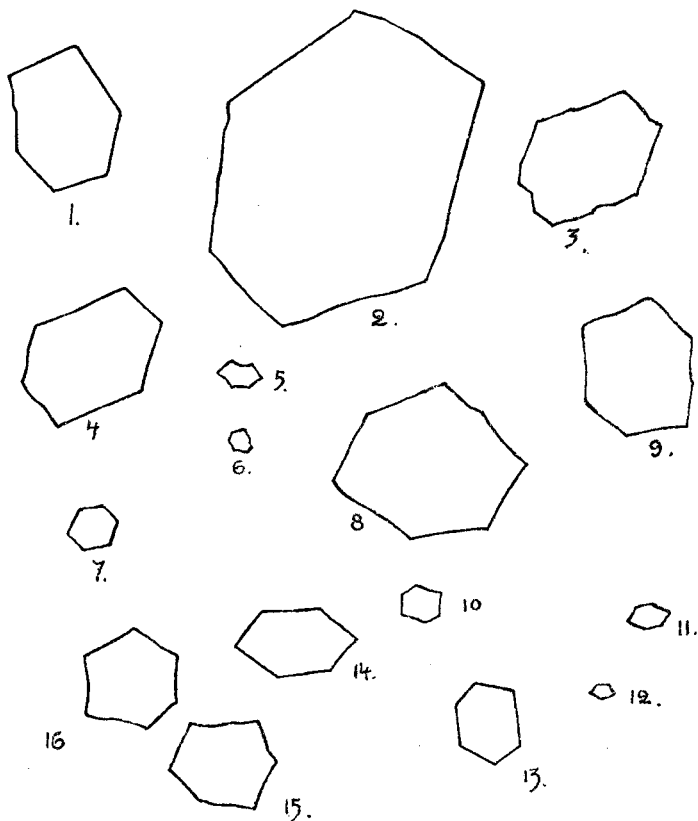
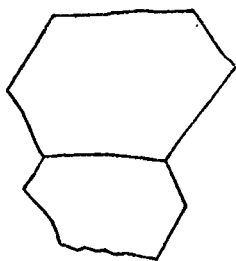




ТАБЛИЦА №3.



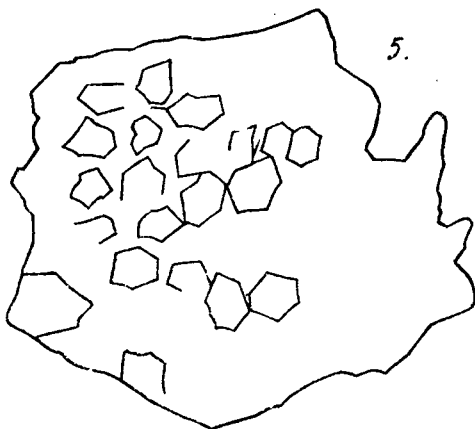
2.



3.



4.



5.

ТАБЛИЦА № 4.

