

Р 133 041

ны Вологодского Молочно-Хозяйственного
Института

Я. С. ЗАЙКОВСКИЙ

**О влиянии химозина на белки
МОЛОКА**

Zaykowsky, J

**Die Wirkung des Chimosins
auf die Eiweissstoffe der Milch**

„СЕВЕРНЫЙ ПЕЧАТНИК“
ВОЛОГДА
1925

Труды Вологодского Молочно-Хозяйственного
Института

Бюллетень № 51

Я. С. ЗАЙКОВСКИЙ

**О влиянии химозина на белки
молока**

„СЕВЕРНЫЙ ПЕЧАТНИК
ВОЛОГДА
1925

Влияние химозина на белки молока.

Насколько невыясненным является вопрос существования химозина, как самостоятельного фермента, настолько же мало известна та роль, которую он играет в живом организме, а также и самый процесс перехода казеина в какое-то новое вещество—параказеин. Даже самое существование параказеина, как нового белка, химически отличающегося от казеина, находится под сомнением у многих авторов. Мало того, некоторые авторы идут еще дальше в упрощении явлений природы и признают существование в молоке вообще только одного белка, а именно казеина, но в разной степени дисперсности. То явление, что часть белка молока выпадает под влиянием ионов водорода, часть же остается в растворенном виде и может быть выделена другими средствами (высаливание, алкоголь и т. п.), объясняется авторами, защищающими теорию единства белков, тем, что для осаждения более крупных частиц (система с меньшей степенью дисперсности) достаточно известной концентрации ионов водорода, тогда как для осаждения более мелких частиц необходимо создать другие условия, вызывающие выделение их из раствора. Выпадение казеина под влиянием сычужного фермента объясняется способностью последнего расщеплять конгломерат молекул казеина, который уже после расщепления выпадает в виде сгустка в присутствии ионов кальция.

Теория единства белков молока, впервые высказанная Дюкло¹, имеет и теперь многих приверженцев (Перов², Инихов³, Мороховец⁴), из которых некоторые признают единство всех белков молока, другие—только некоторых. Большинство авторов метод идентификации белков молока, примененный Дюкло (фильтрация через пористый сосуд), является мало точ-

ным и убедительным. Также мало убедительными можно считать данные, полученные для химического состава белков путем элементарного анализа (сжигания) уже потому, что нет пока возможности получить совершенно и заведомо чистые препараты белков. Еще менее убедительным является метод, применяемый С. Перовым, а именно титрование навесок разных препаратов белков молока $\frac{1}{10}$ н. NaOH, тем более, что количество едкой щелочи, нужное для нейтрализации навески белка, будет зависеть с одной стороны—от количества золы в препарате белка, с другой—от количества адсорбированной белком уксусной кислоты, употребляемой С. Перовым, в своих статистических исследованиях, для промывки препаратов казеина и параказеина до тех пор, пока при титровании препаратов белков не получались сходные результаты. Г. С. Инихов⁵ доказывает единство казеина и параказеина на основании титрования казеина $\frac{1}{10}$ н. NaOH до и после действия на него сычужного фермента, устраняя NH₂ группы формальдегидом. При этом автором в большинстве случаев найдено небольшое увеличение кислотности, отнесенное автором за счет ошибок при титровании.

Поскольку мало данных, доказывающих тождественность казеина и параказеина, постолько их еще меньше для идентификации всех остальных белков молока, а именно лактоальбумина и—глобулина с казеином. Не основываясь на результатах химического элементарного анализа белков молока, произведенного разными авторами, достаточно только тех фактов, что ни альбумин ни глобулин не содержат фосфора, и что альбумин и казеин при гидролитическом разложении не дают гликоколя, а альбумин и глобулин—целого ряда других продуктов разложения, получающихся при разложении казеина (Nattmarsten⁶). Таким образом, между этими белками имеется существенная разница в химическом составе и в продуктах разложения. А лактопротеин отличается, по Küster'у, громадным содержанием фосфора (около 8⁰/₁₀).

Еще труднее установить отличие между параказеином и казеином или доказать тождественность этих белковых тел.

Химический элементарный анализ, при современном состоянии очистки белков и самой техники сжигания, почти бессилён дать хотя бы некоторые указания на те небольшие разницы, какие могут происходить в крупной молекуле белков. Литература по этому вопросу собрана подробно в цитированной работе Г. С. Инихова⁵. Предположение некоторых авторов, что действие сычужного фермента на казеин ограничивается расщеплением агрегата молекул казеина на более мелкие частицы, которые и выпадают из раствора в виде параказеина, противоречит основному закону коллоидной химии, что из коллоидного раствора легче всего коагулируют системы с наиболее крупной дисперсной фазой. Чем сильнее дисперсия, тем труднее гидрозоль переходит в гидрогель. Таким образом, если уже стать на точку зрения исключительно физического действия сычужного фермента, то последний скорее полимеризовал бы частицы казеина, но не расщеплял бы таковые.

Для выяснения таких вопросов, при которых химический анализ не может дать вполне надежных результатов, физические методы исследования могут дать значительно более веские доказательства. Такими физическими методами исследования могут служить, например, изучение влияния тех или других факторов на коагуляцию, изучение вязкости растворов, рефракции удельного вращения и т. п. Но из перечисленных свойств только удельное вращение не зависит от величины агрегата молекулы, а исключительно от химического строения и состава. Что касается данных для коагуляции казеина и параказеина, то они доказывают скорее разницу между этими белками, но не их тождественность.

Но эта разница может быть как химического, так и физического характера. Разницы в числах коагуляции могут тоже зависеть от небольших примесей минеральных солей, находящихся всегда в препаратах белков. Эти примеси не влияют на удельное вращение, поскольку они не химически связаны, а только механически захвачены.

Исходя из этого предположения, мною были исследованы разные препараты белков молока на их вращательную способ-

ность. Для предварительной ориентировки были получены препараты белков из молока следующим образом:

К нагретому до 35° С молоку прибавлено сычужного фермента, и полученный сгусток промывался несколько раз водой. Часть промытого параказеина растворялась в небольшом количестве кислого-углекислого натрия, и раствор фильтровался после прибавки щавелево-кислого аммония для осаждения Са. Фильтрат осаждался $\frac{1}{10}$ н. уксусной кислотой. Осадок промывался водой и подвергался для дальнейшей очистки еще двукратному растворению и осаждению. Перед каждой промывкой водой осадок протирался через очень частое сито. После последней промывки водой следовало промывание спиртом и эфиром. Препарат высушивался на воздухе. Вторая часть параказеина подвергалась тем же процессам очистки, только растворителем служил, вместо углекислого, 5% раствор уксусно-кислого натрия. Таким образом были получены два препарата параказеина, из которых один подвергался денатурированию щелочью, другой нет. В полученных препаратах содержание золы было в 1-м 1.05% во 2-м 1.18% . Зола не содержала и следов кальция. Белки, оставшиеся в сыворотке, были выделены тоже двумя способами. Одна часть сыворотки нагревалась до 90° С и, несмотря на выделившийся незначительный осадок, насыщалась поваренной солью. Выделившийся осадок промывался водой, причем растворения осадка не наблюдалось, и дальше подвергался очистке переосаждением из NaHCO_3 , как выше, и промывкой водой, спиртом и эфиром. Ко второй части сыворотки прибавлено для выделения белков равное по объему количество чистого спирта. Выделившийся осадок подвергался такой же очистке, как и предыдущий препарат. Первый из этих препаратов содержал 1.29% золы, второй 0.80% . В золе не обнаружено совершенно солей кальция. Как видно, содержание золы у всех четырех препаратов отвечает в известных границах содержанию фосфора. Белки, полученные из сыворотки, растворялась в нейтральных солях значительно труднее двух первых препаратов и казеина. В $\frac{1}{10}$ н. NaOH растворялись легко, но, тогда как 0.25 гр. казеина уже в 0.5 к.с. $\frac{1}{10}$ NaOH давали

вполне прозрачные растворы; для получения растворов параказеина, пригодных для наблюдений в поляриметре, нужно было для растворения 0.25 гр. параказеина употреблять не менее 4 к.с. $\frac{1}{10}$ н. NaOH. Все препараты, кроме полученного из нагретой сыворотки, потеряли через некоторое время способность растворяться в нейтральных солях.

Полученные таким образом препараты были исследованы на их вращательную способность. Были приготовлены 1% растворы белков с разным количеством $\frac{1}{10}$ н. NaOH. В таблице помещены средние из нескольких определений, разница между которыми не превышала 0.1° Ventzke, что равняется 0.034 круг. град. Помещенные в таблице к.с. $\frac{1}{10}$ н. NaOH относятся к навеске белков в 0.25 гр.

Уд. вращ. к.с. $\frac{1}{10}$ н. NaOH.	Казеин.	Парак. из NaHCO ₃ .	Парак. из CH ₃ COO Na.	Белки на- грет.	Белки спирт.
4	110,47	99,94	99,10	51,99	98,86
6	115,23	102,41	102,28	65,4,0	99,64
8	117,00	104,16	103,92	78,19	101,03
10	116,98	107,78	107,87	87,89	104,71
12	116,72	107,25	107,87	93,68	104,56
14	116,92	107,31	107,10	100,45	103,62

Как видно из этой таблицы, уд. вращ. параказеина (у обоих препаратов) ниже такового у казеина и то значительно (около 10°), и, кроме того, максимум уд. вращ. лежит не при 8 к.с. $\frac{1}{10}$ н. NaOH, как у казеина, а при 10 к.с. $\frac{1}{10}$ н. NaOH на 0.25 гр. параказеина. Вращательная способность белков, полученных из сыворотки, тоже ниже как казеина, так и параказеина. У препарата, полученного из сыворотки путем осаждения спиртом, максимум вращения лежит при том же количестве щелочи, что и у параказеина, тогда как препарат, полученный нагреванием, связанным с высаливанием, имеет, при

малом количестве щелочи, очень низкую вращательную способность. Это резкое понижение уд. вращ. у белков, полученных нагреванием, можно объяснить или разложением белков от высокой температуры, или выпадением из раствора белков с низким уд. вращ. Хотя, конечно, могли иметь место и оба явления.

Кислотность полученных препаратов была следующая: у препаратов параказеина 8.05 и 8.08 к.с. $\frac{1}{10}$ н. NaOH; у белков, осажденных из сыворотки спиртом 8.07 и полученных при нагревании—12.0 к.с. $\frac{1}{10}$ н. NaOH на 1 гр. препарата.

Для подтверждения этих предварительных опытов был приготовлен новый препарат параказеина, но не из молока, а из казеина, полученного способом, описанным мною в предыдущей работе. Препарат казеина растворялся в 5% уксуснокислом натре, разбавлялся водой так, чтобы содержание белка было около 3%, и к раствору прибавлялся сычужный фермент в количестве, достаточном для свертывания десятикратного количества молока в течение 40 м. при 35° С. Действие сычуга продолжалось 1 час. Одна часть раствора нагревалась 10 минут при темп. 80° С для уничтожения сычужного фермента. При этом нагревании выпадение осадка не произошло.

Дальнейшей обработке обе части раствора подвергались одинаково: параказеин осаждался $\frac{1}{10}$ н. уксусной кислотой, промывался водой и после протирания через частое сито окончательно промывался водой, спиртом и эфиром. В полученных препаратах содержание золы было следующее: у казеина 0.82%; параказеина нагретого 0.94%, не нагретого 0.86%. Содержание воды соответственно 5,82, 5,90 и 4,90%. Кислотность, пересчитанная на безводный препарат, была: у казеина 8.23, параказ. нагрет. 8.72 и не нагрет. 8.54 к.с. $\frac{1}{10}$ н. NaOH на 1 гр. препарата. 10 к.с. 1% раствора казеина в 5% CH_3COONa не давал при комнатной температуре осадка с $\frac{1}{10}$ н. раствором CaCl_2 ; такой же раствор нагретого параказеина давал осадок от 1.8 к.с. $\frac{1}{10}$ н. CaCl_2 , а не нагретого от 2.0 к.с. У препаратов определено уд. вращ. в растворе 5% CH_3COONa ; уд. вращ. у казеина оказалось для 1% раствора 83.81; у параказеина нагретого 83.02 и не нагретого 83.23.

Дальше было определено уд. вращ. всех препаратов при разных количествах $\frac{1}{10}$ н. NaOH. Результаты помещены в следующей таблице:

К.с. $\frac{1}{10}$ н. NaOH. \diagdown	Уд. вращ.	Казеин.	Параказеин нагретый.	Параказеин не нагр.
4		110,02	99,02	99,22
6		115,33	102,30	102,34
8		116,98	104,15	104,02
10		117,01	107,88	107,91
12		116,85	107,90	107,88
14		116,92	107,79	107,90

Результаты этого определения совпали полностью с предыдущими не только относительно абсолютной величины, но и максимума. Нагревание (кратковременное) почти не сказалось на влияние уд. вращ. Разницы могут быть отнесены за счет ошибок определения. Поскольку нагревание не отозвалось на изменении уд. вращ. у параказеина, постолько оно имеет значение для сохранения препаратов параказеина. Нагретый препарат не потерял своей способности растворяться в нейтральных солях, тогда как не нагретый параказеин очень быстро теряет эту способность. Вероятно, здесь играет роль сычужный фермент, механически увлекаемый при осаждении параказеина. На основании полученных результатов можно предполагать, что при действии сычужного фермента на казеин последний подвергается более глубокому химическому распаду, но не только физическому расщеплению. Этот распад можно себе представить следующим образом: сычужный фермент отщепляет какую-то часть от громадной величины молекулы казеина, с освобождением карбоксильных групп. Это освобождение карбоксильной группы не может быть обнаружено обыкновенным титрованием в виду этой величины молекулы, но оно сказывается на уд.

вращ. при насыщении всех карбоксильных групп параказеина металлом. Пока неизвестно, сколько групп карбоксильных освобождается, нет возможности вычислить граммэквивалентный вес для параказеина, как это сделано мною для казеина, но по передвижению максимума уд. вращения в сторону увеличения количества можно предполагать, что этот эквивалент будет меньше, если даже освобождается только одна карбоксильная группа. Отщепленная часть остается в сыворотке, а главная (основная) молекула, в виду изменения химического характера, обладает способностью коагулировать от прибавки солей щелочно-земельных металлов, что трудно объяснить, если принять в основу действия сычужного фермента только физическое расщепление агрегата молекул казеина.

Для дальнейшего выяснения этого вопроса приготовлены препараты параказеина, после длительного действия сычужного фермента на казеин, лактопротеина, лактоглобулина и казеина из молозива. Исследование этих препаратов продолжается.

Предполагая, что казеин под влиянием сычужного фермента изменяется химически, были поставлены опыты относительно изменения некоторых свойств казеина при длительном действии на него сычужного фермента. Изменения эти наблюдались: над кислотностью раствора казеина, его вращ. способностью, осаждаемостью CaCl_2 , кислотностью сыворотки после осаждения казеина CaCl_2 и вращ. способностью сыворотки.

Для этой цели были приготовлены растворы 1 гр. казеина в 25 к.с. 5⁰/₀. CH_3COONa с разным количеством сычужного фермента и добавлением воды до 100 к.с. Растворы выдерживались при определенной температуре и исследовались через известные промежутки времени. Для предохранения растворов от загнивания к ним прибавлено по 2 к.с. толуола на каждые 100 к.с. раствора.

Через определенные промежутки времени в растворе определялась кислотность путем титрования 5 к.с. раствора $\frac{1}{100}$ н. NaOH . Вторые 5 к.с. раствора служили сначала для определения угла вращения, после чего определялась граница осаждаемости $\frac{1}{10}$ н. CaCl_2 . В этих же 5 к.с. после осаждения всех

белков 5-ю к.с. $1/10$ н. CaCl_2 и фильтрования определялись кислотность и угол вращения. Цифры, помещенные в таблицах, относительно кислотности и угла вращения сыворотки, уже умножены на два, т. к. после прибавления 5 к.с. CaCl_2 к 5 к.с. раствора казеина, раствор разбавлялся два раза. (См. табл. 1, 2, 3, и 4 после текста).

Из данных этих таблиц можно отметить несколько любопытных фактов: кислотность раствора белков с прибавкой сычужного фермента в первые дни повышается незначительно, после чего постепенно падает. Это понижение кислотности можно у раствора белков объяснить образованием плотного осадка, который невозможно отделить от стенки колбы. Понижение кислотности наблюдается и у сыворотки. Но это явление происходит только при температуре 15°C ; при температуре 25°C наблюдается то же, но процесс протекает здесь значительно быстрее, и после незначительного падения на 3—4 день кислотность постоянно возрастает, как у раствора белка, так и фильтрата.

Количество к.с. $1/10$ н. CaCl_2 , нужное для появления осадка, тоже меняется, переходя через минимум, при чем к концу опыта получается раствор, в котором никакими количествами хлористого кальция нельзя вызвать образование осадка. Белки, стоящие при температуре 25°C , после этого момента вновь осаждаются хлористым кальцием. Разница между кислотностью раствора белка и фильтратом почти постоянная и составляет приблизительно отношение, как 3:1. Это отношение сохраняется в известных границах и относительно угла вращения раствора и сыворотки. Другое наблюдается у белков, сохранявшихся при темп. 25°C ; здесь кислотность сыворотки указывает или на то, что хлористым кальцием осаждается очень незначительная часть белков, или же—что остающиеся в фильтрате тела обладают высокой кислотностью. В виду быстрого образования сначала мути, а впоследствии осадка, проследить изменения угла вращ. здесь удалось только у сыворотки. Но здесь поражает высокий угол вращения, который указывает на присутствие или больших количеств белков, или с большим уд.

вращ. Несоответствие между кислотностью раствора и фильтра, угла вращения и отсутствие связи между этими величинами указывают на то, что при действии сычужного фермента на казеин происходит какой-то химический процесс, при чем весьма вероятно, что процесс этот, а не только его скорость, зависит от температуры. Поставленные при темпер. 35° С опыты не дали результатов в виду очень быстрого течения в первой стадии, которую как-раз интереснее всего было проследить. Казеин, как видно из этих таблиц, претерпевает такое же почти изменение, как и с прибавкой сычужного фермента, но значительно медленнее и с другим характером изменения кислотности. Характерно здесь получение на 2-3 день осаждаемости казеина хлористым кальцием. Изменения параказеина нагретого сходны с казеином, а не нагретого—с казеином с небольшим количеством сычужного фермента. Угол вращения в таблицах указан в градусах Ventzke.

1. Дюкло.—Le lait.

2. С. С. Перов.—О тождесамости белков. Труды В. М. Х. И., т. II.

3. Г. С. Инихов.—Химия молока и молочных продуктов.

4. Мороховец.—Единство протеиновых тел.

5. Г. С. Инихов.—Химическое действие сычужного фермента. Труды В. М. Х. И. 1922, т. II.

6. O. Hammarsten. Lehrbuch d. Physiol. Chemie, стр. 105.

7. J. Zaukowsky.—Das optische Drehungsvörm. u. das Molekulargew. d. Kasein. Bioch. Zeitschr. 137. 1923.

Раствор белков при температуре 15° С.

№ №		Кислотность 5 к.с. раств.							К.с. 1/10 н. CaCl ₂ на 5 к.с. раств.							Угол вращ. раств.						
		13/XII	14/XII	16/XII	18/XII	21/XII	24/XII	29/XII	13/XII	14/XII	16/XII	18/XII	21/XII	24/XII	29/XII	13/XII	14/XII	16/XII	18/XII	21/XII	24/XII	29/XII
1	Казеин	4,1	4,1	4,0	3,5	2,8	2,2	1,8	∞	7,0	2,5	2,2	1,9	2,2	3,5	2,4	2,2	2,3	2,4	—	—	—
2	2 к.с. 1/100 сыч. ферм.	4,2	4,3	4,3	4,3	3,7	2,9	1,7	2,7	2,4	1,9	1,8	2,0	2,5	3,6	2,3	2,7	2,8	2,4	—	—	—
3	4 к.с.	4,3	4,3	4,4	4,3	4,1	3,3	1,9	2,6	2,5	2,0	1,3	2,2	2,4	∞	2,3	2,5	2,8	2,5	—	—	—
4	6 к.с.	4,3	4,5	4,5	4,4	4,2	3,6	2,0	2,5	2,1	1,9	1,8	2,0	∞	∞	2,3	2,4	2,5	—	—	—	—
5	8 к.с.	4,3	4,6	4,5	4,4	4,3	3,8	2,7	2,5	2,0	1,8	1,6	1,0	∞	∞	2,3	2,5	—	—	—	—	—
6	10 к.с.	4,3	4,7	4,6	4,4	4,3	0	3,1	2,5	2,4	1,4	1,0	∞	∞	∞	2,3	2,6	—	—	—	—	—
7	Параказеин нагрет.	4,2	4,2	4,0	3,4	3,0	2,4	1,5	2,5	2,4	2,2	2,0	2,2	2,3	2,6	2,8	2,4	2,4	—	—	—	—
8	Параказеин не нагрет.	4,2	4,3	4	4,3	4,1	3,3	1,9	2,5	2,4	2,0	1,9	1,9	2,3	3,3	2,3	2,7	2,8	2,5	—	—	—

Сыворотка при 15° С.

№ №		Кислотность 5 к.с. фильтр.							Угол вращ. фильтр.						
		13/XII	14/XII	16/XII	18/XII	21/XII	24/XII	29/XII	13/XII	14/XII	16/XII	18/XII	21/XII	24/XII	29/XII
1	Казеин +	—	—	1,1	1,0	0,7	0,6	0,7	—	—	0,2	0,4	0,5	0,5	0,4
2	2 к.с. 1/100 сыч. ферм.	0,9	1,4	1,7	1,7	1,3	0,8	0,7	0,2	0,5	0,5	0,8	0,9	0,7	0,4
3	4 к.с.	1,2	1,5	1,8	1,7	1,4	1,1	0,8	0,3	0,5	0,6	0,8	1,1	0,6	0,3
4	6 к.с.	1,3	1,6	1,8	1,8	1,7	1,5	1,3	0,4	0,6	0,7	0,8	1,2	1,1	0,6
5	8 к.с.	1,4	1,7	1,8	1,9	1,8	1,7	1,4	0,5	0,7	0,8	0,9	1,3	1,2	0,7
6	10 к.с.	1,5	1,6	1,9	2,0	1,9	1,8	1,4	0,5	0,7	0,8	1,0	1,5	1,2	0,8
7	Параказеин нагрет.	1,1	1,1	1,1	1,0	0,9	0,7	0,7	0,3	0,3	0,4	0,5	0,7	0,6	0,3
8	Параказеин не нагрет.	1,1	1,2	1,3	1,0	0,8	0,7	0,5	0,3	0,4	0,4	0,7	0,9	0,7	0,5

Раствор белка при температуре 25° С.

№ №		Кислотность 10 к.с. раств.							К.с. CaCl ₂ на 10 к.с. раствора.								
		7/III	8/III	9/III	10/III	12/III	14/III	17/III	23/III	7/III	8/III	9/III	10/III	12/III	14/III	17/III	23/III
1	Казеин +	8,5	8,3	7,8	7,9	8,0	8,1	8,4	7,9	∞	4,9	3,5	3,2	2,8	3,1	∞	∞
2	8 к.с. ¹ / ₁₀₀ сычуж. ферм.	9,5	9,9	9,6	9,9	10,0	10,3	11,7	12,2	4,6	2,7	2,7	2,7	∞	∞	1,2	1,4
3	10 к.с.	9,4	10,0	9,5	8,9	8,8	8,5	9,1	9,7	3,8	2,2	2,4	3,2	∞	∞	0,7	0,8

Табл. 3.

Сыворотка при температуре 25° С.

№ №		Кислотность 10 к. с. фильтр.							Угол вращения фильтрата.								
		7/III	8/III	9/III	10/III	12/III	14/III	17/III	23/III	7/III	8/III	9/III	10/III	12/III	14/III	17/III	23/III
1	Казеин +	—	—	6,0	5,8	5,0	5,6	—	—	—	0,5	0,8	1,0	1,0	1,4	—	—
2	8 к.с. ¹ / ₁₀₀ сычуж. ферм.	7,4	8,0	8,8	9,0	—	—	10,8	11,4	0,7	2,0	2,2	2,6	—	—	2,6	2,7
3	10 к.с.	7,4	8,8	9,0	8,6	—	—	8,3	8,8	0,7	2,0	2,6	2,8	—	—	2,7	2,8

Табл. 4.