

БИОХИМИЯ

В. С. САДИКОВ

**НОВЫЙ СПОСОБ ИЗОЛИРОВАНИЯ АМИНОКИСЛОТ, ПЕПТИДОВ  
И ЦИКЛОПЕПТИДОВ ИЗ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ**

*(Представлено академиком Н. Д. Зелинским 2 I 1937)*

Для изучения химического строения белковых веществ последние должны быть подвергнуты более или менее глубокому расчленению. В зависимости от условий деградации из одного и того же белка могут быть получены протеинолизаты, имеющие разнообразный состав. Главными факторами, определяющими глубину и направление протеинолиза, являются: а) растворитель (вода, алкоголь, фенол и т. п.), б) химический агент и его концентрация (минеральные кислоты, карбонаты, щелочи при концентрации от 0.5 до 70%), в) температура воздействия на белок химического реактива (от 0 до 250°), г) продолжительность протеинолиза (от нескольких минут до нескольких суток). В составе тем или иным путем полученных протеинолизатов встречаются следующие категории азотистых соединений: 1) аминокислоты как продукты полного расщепления белка; 2) пептиды и полипептиды; 3) циклопептиды и циклополипептиды; 4) более сложные надаминоацильные и надциклопептидные комплексы, способные расщепляться нацело до аминокислот; 5) циклические комплексы, неспособные расщепляться на аминокислоты. Эти гетероциклические комплексы могут быть либо преформированными (предсуществующими) в строении белка либо являться вторичными продуктами конденсации, образовавшимися из первичных продуктов белкового распада; 6) более простые вещества, представляющие собою продукты разрушения аминокислот и пептидов, например амиак,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , органические кислоты, альдегиды и т. п.

В зависимости от условий протеинолиза возможно получение лизата, обогащенного той или иной категорией продуктов деградации. При продолжительном кипячении белка с концентрированным водным раствором минеральной кислоты гидролизат содержит главным образом аминокислоты; при кратковременном воздействии при 18° водного весьма концентрированного раствора серной кислоты (70%) или соляной кислоты (40%) в лизате может быть обнаружено наличие полипептидов и циклопептидов.

Совершенно особый интерес имеют надаминоацильные (пептидные и циклопептидные) и надциклопептидные комплексы, поскольку они являются предступенями аминокислот и всего ближе находятся к нативным строениям белковой мицеллы. Для изолирования этих комплексов намечены два пути: 1) применение высокой концентрации минеральных кислот при низкой температуре, причем продолжительностью воздей-

ствия на белок можно влиять на глубину «химической мацерации» белка; 2) применение малой концентрации кислоты, карбоната или щелочи при высокой температуре и малой продолжительности воздействия; этого рода «крекинг» белка совершается в автоклаве при 180—220° в течение немногих минут. Крекинг белка может быть осуществлен в безводных условиях и без участия кислот, карбонатов или щелочей, как например это имеет место при алкоголизе, т. е. при действии абсолютного метанола или этанола на белок при 180°.

Тогда как при гидролитическом кислотном крекинге образуется много продуктов деструкции (пиролиза) наряду с аминокислотными и циклическими продуктами, при метанолитическом крекинге явление деструкции мало выражено, или имеет место значительное преобладание надаминоацильных циклических соединений. При гидролитическом карбонатном крекинге иногда почти не наблюдается образования амиака, которое сигнализирует вторичное разложение белка.

Во всяком случае, применяя гидролитический или алкоголитический крекинг, мы никогда не можем быть свободными от сомнения в первичности, в натурности, в предсуществовании тех циклических комплексов, которые мы изолируем из крекинголизатов (автоклаволизатов), ибо эти циклические вещества могли возникнуть вторично под влиянием хотя бы и весьма кратковременного воздействия высокой температуры.

Изолирование индивидуальных циклополипептидов сопровождается продолжительной и сложной переработкой мацератолизата, и вследствие этого и здесь не исключается возможность вторичных преобразований предсуществующих строений. Процесс удаления серной кислоты при помощи барита может привести к потере многих продуктов мацерации либо вследствие сорбции их на сульфате бария, либо вследствие нерастворимости их в воде (циклопептиды и бариевые соли некоторых аминокислот), либо вследствие вторичных разложений. При удалении соляной кислоты из гидролизатов при помощи отгонки последней в вакууме, вследствие длительности дистилляции и лабильности многих составных частей гидролизата происходят значительные вторичные разложения и конденсации.

Нами в настоящее время применяется новый метод переработки мацератолизатов, гидролизатов и крекинголизатов белков, до известной степени гарантирующий первоначальное строение продуктов расщепления белка. Этот метод состоит из следующих частей: 1) насыщение серной кислоты в протеинолизате известковым молоком и превращение на холоду всего лизата в гипсовую кашу, которая затем обезвоживается спиртом и прокаленным гипсом; 2) извлечение в аппарате Сокслетта гипсово-лизатного порошка: а) эфиром, хлороформом, уксусным этилом, растворяющими циклопептиды (экстракты I, II и III); б) метанолом, извлекающим бариевые соли многих аминокислот: глицин, аланин, аспарагиновая, тирозин, гистидин, аргинин, лизин (экстракт IV); в) водой, извлекающей кальциевые соли некоторых аминокислот, нерастворимые в спирте (экстракт V); 3) дигерирование гипсовой каши с серной кислотой для освобождения аминокислот, не извлеченных вышеуказанными растворителями, и нейтрализация серной кислоты карбонатом меди, причем свободные аминокислоты превращаются в синие медные соли, после чего гипсовая каша обезвоживается выпариванием, обработкой спиртом и прокаленным гипсом и в виде сухого порошка извлекается в аппарате Сокслетта посредством метанола и ацетона, причем в экстракт переходят медные соли изовалина, изолейцина, пролина и оксипролина, а также других аминоацильных и надаминоацильных соединений (экстракты VI и VII).

Если гипсовая каша сохраняет синюю окраску, то она подвергается извлечению водой и слабым раствором уксусной кислоты (экстракт VIII). Гипсовая каша после этого высушивается, и в ней определяют содержание азота.

В некоторых случаях можно вместо медных солей аминокислот получить в гипсово-гидратном порошке цинковые, кадмиевые, свинцовые, никелевые, цериевые, ториевые и т. п. соли аминокислот и попытаться отделить их от гипса посредством разного рода растворителей.

В каждом экстракте определяют природу и содержание аминокислот или надаминоацильных веществ по распределению форм азота и колориметрическим стандартам. Препаративное изолирование отдельных аминокислот из вышеуказанных фракций совершается через посредство их гидантоинов и медных солей.

Этот первый вариант гипсово-экстракционного метода переработки протеинолизатов является более эффективным для мацератолизатов и крекинголизатов, в которых находится значительное количество циклических соединений, извлекаемых органическими растворителями.

Для выделения аминокислот из глубоко расщепленных гидролизатов наиболее удобным является второй вариант гипсово-экстракционного метода, состоящий в том, что гипсовую кашу нагревают в слабокислом растворе с избытком мочевины или  $\text{KCNO}$ , затем гипсовую кашу выпаривают, причем образовавшиеся ураминокислоты превращаются в гидантоины, нейтрализуют серную кислоту известковым молоком, выпаривают, застывший гипс высушивают на стеклянных пластинках при  $50^\circ$ , порошок обезвоживают спиртом, спирт обезвоживают прокаленным гипсом, фильтрат, содержащий растворимые в спирте гидантоины и циклопептиды, выпаривают досуха, и сухой остаток извлекают эфиром (фракция А, содержащая циклопептиды), затем извлекают хлороформом, уксусным этилом, метанолом, ацетоном (фракции В, С, D и E), в которые переходят циклические соединения и гидантоины аминокислот. Гипсовый остаток загружают в аппарат Сокслетта и извлекают эфиром (фракция  $A_1$ ), хлороформом, уксусным этилом, метанолом, ацетоном (фракции  $B_1, C_1, D_1, E_1$ ); кроме того следует выкипятить остаточный гипсовый порошок с бензолом, бутанолом и 1% спиртовым раствором пиридина или едкого натра (фракции F, G и H). Если в гипсовом порошке еще находятся азотистые вещества, неизвлекаемые вышеупомянутыми растворителями, то порошок извлекают водой или водными растворами кислоты или щелочи или аммиака.

Полученные фракции исследуют на содержание общего азота, аминокислотного азота по ван-Слайку, гидантоинового азота, до и после фолинизации, а также после дополнительного 18-часового гидролиза с 25%  $\text{HCl}$  при  $100^\circ$ .

Затем разлагают гидантоины до аминокислот посредством кипячения с  $\text{MgO}$  и устанавливают природу аминокислот и их количество по распределению форм азота и колориметрическим стандартам.

Препаративное изолирование отдельных аминокислот и надаминоацильных соединений из различных белков будет описано в следующих сообщениях.