

М. А. ЛИЩИЦЫН

ОСОБЫЕ СЛУЧАИ ВЫСАЛИВАНИЯ БЕЛКОВ*(Представлено академиком В. М. Родионовым 8 X 1946)*

Феномен высаливания протеинов служил предметом многочисленных исследований, но все еще остается невыясненным даже в основных положениях. Изучение природы эффекта является проблемой не только коллоидной химии, но входит в качестве одной из задач в обширную область общей теории растворов и связано с исследованием химического строения белков.

Очевидно, что высаливание представляет собою частный случай общих условий растворимости вещества; известно, что между растворимостью и химическим строением вещества существует закономерная зависимость. Вскрытие такой зависимости у белков представляет на современном уровне знания строения протеинов существенный интерес. Более четкому выяснению вопроса должен способствовать наметившийся прогресс в теоретической разработке аналогичных явлений в физической химии растворов электролитов применительно к простейшим случаям: с одной стороны, к растворам, содержащим нейтральные молекулы, с другой — к солевым равновесиям гетерогенных систем.

Впервые И. М. Сеченов⁽¹⁾ дал уравнение солевого эффекта, приведенное впоследствии к теории Дебая. Теперь установлено, что электростатическое влияние оказывается наиболее значительной составляющей в общем эффекте, проявляющемся в изменении растворимости вещества в присутствии солей—в высаливании или в повышении растворимости.

Тем самым, когда изучаемый раствор содержит не нейтральные молекулы, а ионные системы, как в случае белковых веществ, изучение явления существенно усложняется наличием подвижных солевых равновесий. Несомненно, что интересующее нас явление тесно связано с изменением величины диэлектрической постоянной, ионной крепости раствора pH и, в силу этого, усложняется еще, применительно к амфолитам, наличием амфионов с варьирующей одновременно с pH концентрацией.

Несмотря на это, исследования растворимости протеинов в солевых растворах всегда проводились — и это на известных основаниях предпочтается — в зоне значений pH вблизи изоэлектрического пункта, т. е. именно в зоне максимальной концентрации амфотерных ионов.

Я поставил перед собой задачу провести наблюдения над поведением солевых белковых растворов в условиях прямо противоположных, а именно, — в отсутствии амфионного состояния, ожидая, что в этом случае будет легко наблюдаемо соподчинение явления простым закономерностям, вытекающим из теории электролитической диссоциации. Я руководствовался при этом следующими соображениями.

Присутствие диполярных ионов в растворе ограничено такими пределами рН, в которых сохраняется диссоциация образующих эти ионы групп. С полным прекращением диссоциации групп одного заряда мы имеем в растворе уже не амфотерный электролит, а однозначные ионы и их парные сочетания с другими присутствующими ионами, т. е. обыкновенную форму бинарных и других электролитов. В случае белковых растворов эти пределы рН можно приближенно принять находящимися между 1,5 и 12,5. Вне указанных пределов протеин входит в состав солей в роли только катиона или только аниона, т. е.

при $\text{pH} < 1,5$ в солянокислом растворе как катион $\text{Cl}^- \dots \overset{+}{\text{N}}\text{H}_3 \cdot \overset{\text{R}}{\text{C}}\text{H} \cdot \text{COOH}$,

а при $\text{pH} > 12,5$ — в растворе NaOH как анион $\text{Na}^+ \dots \overset{-}{\text{O}}\text{OC} \cdot \overset{\text{R}}{\text{C}}\text{H} \cdot \text{NH}_2$. В водном растворе эти соли диссоциированы, причем степень диссоциации должна быть меньше диссоциации сильных электролитов — минеральных солей и, следовательно, подавляться последними. В таком случае одинаковым с минеральными солями должно быть действие сильных кислот на указанные белковые соли, где протеин является катионом, или, соответственно, действие щелочей там, где протеин находится в форме аниона. Все это полностью оправдалось в экспериментах.

Объектами этих экспериментов были растворы белков, принадлежащих различным классификационным группам: альбумины — сывороточный и яичный, глобулины — сывороточный и легумен, фосфопротеины — казеин, проламины — глиадин, протамины — стурин и перцин, гистоны — синтетический препарат (2), приготовленный из протаминина. Условия высаливания всех названных белков из растворов вне сильно кислой или щелочной среды весьма различны; они столь же общеизвестны, как и классификация белков, отчего описание этих различий здесь излишне. Но совершенно иным оказывается поведение этих растворов при увеличении концентрации кислоты или щелочи.

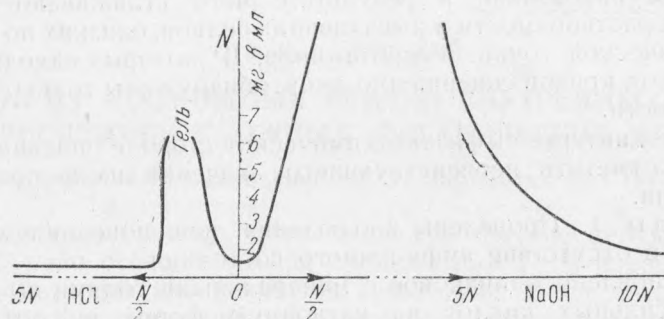
Каждый белковый раствор (1—3%) делится нами на порции, которые после добавления кислоты или щелочи составили 2 ряда: один ряд с варьирующей концентрацией кислоты, начиная от той величины ее, которая обеспечивает установление $\text{pH}=1,5$ и кончая нормальной, второй ряд с варьирующей концентрацией щелочи, начиная от той величины ее, которая обеспечивает установление $\text{pH}=10,5$, и кончая 10—12-нормальной. В каждую отдельную пробу производилась добавка насыщенного раствора минеральной соли; если высаливания не происходило, добавлялась сухая соль. При этом было обнаружено следующее.

Кислые растворы белков легко высаливаются нейтральными солями, так NaCl — при концентрации 0,5 моля. Высаливание осуществляется меньшими прибавками соли по мере дальнейшего подкисления раствора, пока, наконец, не наступает момент, когда белок выпадает из раствора без всякой добавки соли. Высаливающим агентом здесь служит сама добавляемая кислота. В случае соляной кислоты это происходит, когда ее концентрация в растворе приближается к 0,5-нормальной.

Групповые различия сглаживаются, за исключением протаминов и гистона, не высаливаемых в солянокислой среде. Сила и основность кислоты играют существенную роль. Так, органические кислоты, как недостаточно сильные, не обнаруживают указанного эффекта, серная кислота, как двухосновная, в меньших концентрациях вызывает осаждение сульфатов белков, причем последние и менее растворимы в воде, чем хлориды. В отличие от соляной кислоты, серная кислота осаждает и протамины.

Здесь можно констатировать, что известный метод очистки протаминов путем выделения их в виде маслянистого слоя из сернокислых растворов представляет собою первый случай именно тех особых явлений высаливания, которые теперь нам удалось открыть в совершенно общем их виде.

Полученные таким образом сульфаты белков легко препаративно выделить, высушивая их спиртом. Солянокислые соли в спирте раство-



римы и осаждаются оттуда эфиром. В сухом виде они получены высушиванием в эксикаторе.

Щелочные растворы белков не высаливаются ни от прибавления минеральных солей, ни от прибавления щелочи до концентрации 0,5 моля. Тем не менее высаливание наступает и здесь, но лишь при значительно более высокой концентрации щелочи. Нормальный щелочный раствор белка делается мутным при насыщении его поваренной солью; при той же концентрации NaCl по мере увеличения концентрации щелочи высаливание проявляется более интенсивно, пока, наконец, не наступает момент, когда белок выпадает из раствора без всякой добавки соли. Высаливающим агентом служит сама добавляемая щелочь. Na-протеинат осаждается из раствора 6-нормальной щелочи, осаждение достигает максимума в 10—12-нормальном растворе щелочи (температура всюду комнатная). Сначала на протамин, а затем и на других белках нами было замечено более сильное, чем у поваренной соли, высаливающее в щелочной среде действие соды, до сих пор всегда считавшейся реактивом, растворяющим белки, а не осаждающим их.

Таким образом, опыт прямо доказывает, что, охватывая всю шкалу растворимости от сильно кислой среды через изоэлектрическое состояние до сильно щелочной среды, мы находим в белковых растворах не один известный уже минимум растворимости, отвечающий положению изоэлектрического пункта, а три минимума: 1) в изоэлектрическом пункте, 2) в сильно кислой среде и 3) в сильно щелочной среде. Откладывая на ординате выражение растворимости протеина, а на абсциссе — выраженную в нормальностях кислоты или щелочи характеристику среды, можно получить кривую, схематически изображающую ход изменений растворимости протеинов (см. рисунок). Нетрудно видеть, что такое поведение белковых растворов отвечает требованиям закона действующих масс и теории электролитической диссоциации. Оно оправдывает представления, положенные в основу постановки опыта, и отображает в себе наличие двух новых равновесных состояний, достигающих предельных значений: 1) в пункте недиссоциированного кислот-протеина и 2) в пункте недиссоциированного алкали-протеина.

Неравенство вершин и плеч в ходе кривой не должно бы быть столь резким, однако в опыте растворимости в щелочной среде оказывается весьма высоким. Причиной этого является интенсивный

гидролиз протеината, ослабляемый лишь большим избытком свободной щелочи. Так же ведут себя растворимые соли жирных кислот. Осаждение протеината в сильно щелочной среде впервые наблюдал М. Фишер⁽³⁾. Пытаясь объяснить коллоидо-химическую природу явления по аналогии с мылами, этот автор не мог прийти к верному решению вопроса.

В сильно щелочной или кислой среде нативные белки подвергаются денатурированию, в результате чего сглаживаются различия в условиях растворимости и высаливания белков, близких по положению изоэлектрической точки. У протаминов, ИР которых находятся при рН около 12, ход кривой совершенно иной: обнаружены только 2 минимума растворимости.

При всем интересе к физико-химической стороне описанных явлений нельзя не отметить первенствующего значения их в препаративном направлении.

Выводы. 1. Проведены наблюдения над поведением белковых растворов в отсутствие амфионного состояния.

2. Установлено одинаковое с минеральными солями высаливающее действие сильных кислот на катионную форму и, соответственно, щелочей на анионную форму белков. Последняя высаливается также содой.

3. Установлено наличие не одного, а трех минимумов растворимости протеинов при учете всей шкалы растворимости от сильно кислой среды через изоэлектрическое состояние до сильно щелочной среды.

Поступило
8 X 1946

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ I. M. Setchenow, Mémoires de l'Acad. de Sciences Saint-Petersbourg, **22** (1876); **34** (1886); **35** (1887); Z. physik. Chem., **4**, 117 (1889); Ann. chim. phys., **25**, 226 (1892). ² М. А. Лисицын и Н. С. Александровская, Изв. АН СССР, ОХН, № 2, 289 (1941). ³ М. Фишер, Мыла и белки, 1932.