

690456

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТИМИРЯЗЕВСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ

ТРУДЫ

Проф. С. С. ПЕРОВ. - О СПЕЦИФИЧНОСТИ
ФЕРМЕНТОВ

Б. А. ДОГАДКИН. - ПЕРИОДИЧЕСКИЕ
ОСАДКИ В ФОСФОРНО-
КАЛЬЦИЕВЫХ СОЛЯХ

М. А. ЛИЦИЦЫН. - ФРАКЦИИ
БЕЛКОВОГО ВЕЩЕСТВА
ФАСОЛИ

СЕВЕРНЫЙ ПЕЧАТНИК
ВОЛОГДА 1927



ТРУДЫ ГОСУДАРСТВЕННОГО ТИМИРЯЗЕВСКОГО НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА

изучения и пропаганды естественно-научных основ диалектического
материализма

Отделение изучения природы

СЕРИЯ I Отд. VII

Выпуск I

С. С. Перов

S. S. Peroff

О специфичности ферментов

Über die Specificität der Fermenten

Б. А. Догадкин

B. Dogadkin

Периодические осадки в фосфор-
но-кальциевых солях

Rhythmische Fällung von CaHPO_4

М. А. Лисицын

M. A. Lissitzyn

Фракции белкового вещества
фасоли

Die Eiweissfraktionen des Faseo-
lus vulgaris

„СЕВЕРНЫЙ ПЕЧАТНИК“

ВОЛОГДА, 1927

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТИМИРЯЗЕВСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ

Т Р У Д Ы

С. С. Перов.—О специфичности ферментов. Б. А. Догадкин.—Периодические осадки в фосфорно-кальциевых солях. М. А. Лисицын.—Фракции белкового вещества фасоли

690456

ВОЛОГОДСКАЯ
областная библиотека
им. И. В. Бабушкина

„СЕВЕРНЫЙ ПЕЧАТНИК“

ВОЛОГДА

1927

Типо-литография Акц. Об-ва „Северный Печатник“.
Гублит № 339 (Вологда). Тираж 1500 экз.

О специфичности ферментов

С. С. Перов

ИСКЛЮЧЕНА
ИЗ
Б-ки ИМЭЛ

О специфичности ферментов.

Решение проблемы фермента, и решение на диалектической почве, есть главнейшая цель биохимии и особенно экспериментальной биохимии, занимающейся нахождением физико-химических основ жизни, *conditio sine qua non* биохимии и в то же время ее главный камень преткновения.

Работа «живого» организма соткана из энзимных процессов: свертывание, окисление, переваривание, усвоение в растительном и животном теле невозможно ни объяснить, ни мыслить без участия того или иного катализатора, и понятно, почему даже выделилась особая дисциплина — ферментология, посвященная обстоятельному изучению всех условий работы ферментов и соотношения их между собой.

Между тем до сих пор никто не знает, что такое фермент как химическое соединение, и даже физическое тело, и фермент наделяется такими свойствами, что впрямую прийти от него к понятию, если не о душе, то о направляющей силе, в роде энтелехии.

Обычно фермент связывают с белковой сущностью, но наиболее крупный исследователь этого вопроса—Вильштеттер—определенно отрицает или стремится отрицать это и считает белок лишь за носителя на себе фермента, что он логично доказывает очищением фермента путем отделения белка при условии возрастания действия самого очищаемого фермента.

Но, повидимому, и эта мысль упирается в тупик, ибо в опытах Вильштеттера известная стадия очищения от белка (высокая чистота) влекла за собой утрату или понижение ферментного действия в очищенном продукте. Не правильнее ли встать на точку зрения, что белок не только носитель, но и сам фермент, но только при условии определенной физической структуры, находящейся в области дисперсных состояний?

В свое время Э. Фишер пустил крылатое слово, что фермент есть нечто в роде ключа к веществам — замкам, которые он заставляет реагировать, т.-е. отпирает. За эту фразу скрывается обычно каждый ферментолог. А что она означает? Она

в некритической форме обуславливает специфичность ферментов и, по глухому впечатлению, химическую специфичность: сколько веществ, подвергающихся ферментным действиям, столько и ферментов с разным химическим составом. А ведь если критически понять гениального химика, то ключи можно трактовать, как предметы из одного вещества, скажем, железа; разнообразно в них лишь физическое строение и главным образом те поверхности, которые трутся в механизме замка. Может быть, и здесь правильнее понимать его выражение, как обозначение физической специфичности?

По поводу специфичности ферментов много спорят. Среди крупнейших химиков имеются сомнения в правильности отделять друг от друга ферменты или объединять около одного различные функции. Так, А. Н. Бах не соглашается с Виландом, что один и тот же фермент обладает способностью передатчика и кислорода и водорода, а в то же время сомневается в целесообразности дробить, делить окисляющие ферменты.

Большой спор вызвала работа И. П. Павлова об идентичности пепсина и химозина, где он приходит к выводу: «могу считать себя вполне убежденным в том, что растворяющая белки и свертывающая молоко функция пищеварительных соков принадлежит одному и тому же ферменту, а не двум, как об этом думали раньше»¹⁾, и основывает свою уверенность на том, «что в доказательство тождественности пепсина и химозина приводится параллелизм этих двух функций желудочного сока. Параллелизм этот выражается в том, что раз существует одна функция, то наблюдается и другая; раз под влиянием каких-либо условий падает переваривающая сила сока, одновременно с ней слабеет и свертывающее действие того же сока».

Метафизики-эклектики в роде Hammarstep'a ополчились со всей страстью против этих еретических взглядов и взяли верх. Между тем это одна из многих гениальных попыток И. П. Павлова вломиться в закрытые двери природы даже без ключа, ибо его аргументация в этом вопросе глубоко диалектична. Он по сходству хода функций определил возможность присутствия в веществе двух противоположных условно реакций — коагуляционного процесса и пептонизационного распада. Так, он пишет: «пропорциональность растворяющего и свертывающего действий в соках пилорическом и в соке Бруннеровых желез, которые приравнивались к эквивалентным количествам фундального желудочного сока и затем испытывались . . . на свертывание молока. Все это не

¹⁾ «Труды О-ва Русских Врачей» 71 г. 1904. И. П. Павлов, «Принадлежность белок растворяющ. и молоко свертыв. и т. д.», стр. 39.

оставляет никакого сомнения в точном тождестве двух противоположных функций белкового фермента»¹⁾).

Так смотрели и смотрят, сомневаясь, *dii majores, a dii minores* просто путаются в бесчисленности найденных ферментов, в их свойствах и зависимости работы ферментов, являющихся неиндивидуализированными веществами, от условий. Часто весьма проблематично могущих влиять на их деятельность, так, например, влияние ментола и резорцина на пепсин²⁾).

В работах всех ферментологов совершается крупнейшая познавательная ошибка, а именно — для вещества, которое заранее неверно индивидуализировано, точно индивидуализируются условия работы и влияние ряда агентов, в то время как имеется налицо полная вероятность, что ряд выбранных факторов может повлиять не на само вещество фермента, а на его примеси. Но, как бы то ни было, современная наука признает узкую обусловленную химическую специфичность. «Эти вещества носят общее название ферментов. Их следы уже оказывают заметные действия, но только при совершенно определенных условиях и соответственном субстрате, ибо каждый фермент строго специфичен»³⁾).

На основе этого происходит их классификация. Один из добросовестнейших биохимиков современности — И. А. Смординцев проделал⁴⁾ большую и полезную работу скрупулезного собирания всех данных о ферментах в своей работе «Ферменты растительного и животного царства», чем избавил химиков от необходимости копаться в многочисленной литературе. Его научная точность позволяет пользоваться рядом сведений о ферментах, конечно, главным образом общего характера. По его мнению, современная ферментология насчитывает до 68 отдельных представителей, относящихся к 4-м классам: 1) оксидаз и редуктаз; 2) гидролаз и гидратаз; 3) коагуляз и 4) ферментов брожения; внутри классов имеются еще группы в роде — эфираз (сахараз), эстераз, амидаз, совершающих одинаковую основную функцию в разных по составу веществах, но одного химического смысла, — жиры, белки и т. д. Все эти вещества заперты в свою клетку, воспроизводя только одну реакцию, не похожи друг на друга и создаются организмом, повидимому, в чрезвычайно простой обстановке. Трудно верится такой способности производительных сил клетки, ибо она в конечном счете продуцирует фермент.

¹⁾ *ibid.*, стр. 45.

²⁾ А. П. Афонский. Дисс. ПБ. 1907. В. С. 6 (940).

³⁾ Эмиль Абдергальден. Синтез клеточных веществ в растении и животном. Н. Т. Изд. Ленинград, 1926 г., стр. 32.

⁴⁾ Нами берется работа на русском языке. За границей есть еще более серьезные работы — Вильштеттер и др.

В то же время при взгляде на обстановку изучения энзим бросается в глаза не критичность и отсутствие методологического подхода.

Возьмем противопоставление функций: обычно понимается, что гидратазная функция (пептонизация) противопоставляется коагулязной (коагуляция), или им обоим вместе—оксидазная. Это противопоставление в первом случае неверно, а во втором—условно. Коагуляция есть процесс чисто физический, процесс кристаллизации вещества, и ей противоположной являться должна пептизация—вновь физическое растворение, а не пептонизация—химический распад вещества, хотя и это условно, ибо в отношении белка мы имеем авторитетное суждение Э. Фишера, что, может быть, «обычные белки» суть лишь смесь сравнительно простых веществ без химической связи друг с другом.

Что же касается второго случая, то кто ответит на вопрос, почему гидратазная функция не является уже началом оксидантного процесса, ибо введение вместо замкнутого ангидридного «О»—двух гидроксидов подготавливает путь к дальнейшему окислению продукта; как принято, в органической химии окисление вещества идет через разрыхление и в первую очередь—введением гидроксидов (окисление любого углеводорода в спирт). Реакция же брожения—четвертая отделенная группа в ферментах—есть в полном смысле окислительные процессы (классические дрожжи). Кроме того—коагулязная функция, особенно у белков, толкуется многими и в частности тем же Hammarsten'ом совершенно произвольно. В самом деле, говорить о разложении казеиногена на два белка при помощи химозина может лишь химик, совершенно игнорирующий достижения коллоидной химии, где процесс желатинизации белка объясняется просто и ясно; или химик, забывающий, что он же и возражал против снабжения сычужного фермента иными свойствами, кроме коагулязных. Кроме того, методы количественного определения действия фермента наивны и грубы. Берем способы, относящиеся к пепсину: Определяется по методу Mett. В трубочках (почему?) берется яичный белок или фибрин. Что такое белок, особенно свернувшийся? Есть ли гарантия, что всегда идентичны в опыте состав и свойства свернувшего субстрата? Почему фермент должен вести свою работу снизу вверх? Одинакова ли конечная реакция работы фермента в каждом отдельном случае? Все это весьма условно и весьма сложно.

Далее. Работа фермента не сравнена и не связана с неорганическими катализаторами, напр., платиновой чернью. А какие глубокие аналогии могло бы это дать!

Допустим, мы наблюдаем явление окисления водорода при помощи платиновой черни. Не зная химического состава катализатора (оксигин!?), принялись бы выделять наиболее активное состояние. Относясь к платине, как к побочному носителю катализатора, получили бы в известный момент уничтожение действия его, ибо переход за пределы черни к грубому препарату или к очень тонкому ионному состоянию уничтожает каталитическое свойство. Какой бы вывод отсюда сделала современная ферментология?

Или контактный способ получения серной кислоты? Он ясно указывает, что платина дает желаемый эффект только при определенной степени дисперсности катализатора. Этот же процесс объясняет, как легко объединяются при одном катализаторе две функции—окислительная и гидрирующая. Между тем, по идее ферментологов пришлось бы из платиновой черни выделить несколько специфических ферментов.

В органической химии действие на крахмал кислоты в отсутствие какого бы то ни было фермента разве не дает указаний на ход процесса гидратации при помощи увеличения поверхности в реакции, ибо процесс совершается быстро в растворимом крахмале или золе и медленно в грубо дисперсной суспензии, разница же в этих крахмалах лишь в величине слагающих частиц — веймарид.

Не проще ли принять предположение, одинаково обоснованное с существующим, что вся роль фермента сводится лишь к развитию реакционных возможностей на поверхностях, а потому ферменты лишь физически специфичны, отличаясь степенью дисперсности друг от друга?

Эта простота толкования даже не нарушает классификационных признаков существующей ферментологии.

Но наш эксперимент пошел дальше в отрицании специфичности.

Прежде чем развернуть опытную часть моей работы, я делаю небольшое теоретическое введение, своего рода построение некоторой рабочей гипотезы, высказывание ряда постулатов, которые не могут пока быть полностью доказаны опытом, но которые не противоречат экспериментальной научной действительности.

I постулат. Все состояния вещества, обладая кинетическими свойствами, имеют закономерную склонность к ассоциативности. Эта ассоциативность всеобща.

Везде и всегда, во всяком состоянии, вещество не остается в виде атомов или молекул, а складывается далее в так называемые веймариды, агрегаты более крупные, распадающиеся или округняющиеся в зависимости от ряда факторов—концентрации, температуры и т. д. Примеры: состояние электролитов

всегда связано с концентрацией ионов и неразложенных молекул; вода всегда нечто большее, чем H_2O , ее ассоциированность выражается в частицах $(H_2O)_x$; известны ассоциированные жидкости, газы *in statu nascendi*; золи разных степеней дисперсности. Все это указывает, что всеобщая ассоциированность вещества есть почти доказанный факт.

II постулат. Наиболее развитым и богатым по запасам поверхностной энергии является гелевое состояние, в отличие от золя тех же концентраций и тем более осадков или порошков тех же объемов.

Это покоится на явлении, что при желатинизации запас поверхностной энергии в дисперсной фазе остается, как и в золе, но прибавляется еще некоторое количество ее от перехода дисперсионной среды из кристаллоидного в коллоидное состояние. Отсюда понятно и продолжение постулата, что оптимум реакций фермента лежит при определенном значении степени дисперсности в пределах дисперсных систем от $6 \cdot 10^{-6}$ до $6 \cdot 10^{-5}$.

Примеры—переваривание в желудке, приготовление сыров.

III постулат. Фермент—лишь арена для реакций, тем более обширная, чем более развита поверхностная энергия самого фермента и среды, в которой он действует. Ферменты подобны жерновом, размалывающим веймариды, а сама реакция измельченных веществ создается ионами, обычно H^+ и OH^- , или атомами некоторого вещества, присутствующего в среде.

Во избежание упреков в поспешности постулирования я должен отметить, что принятие или непринятие этих постулатов отнюдь не влияет на те факты, которые мною будут изложены далее, но они помогают их объяснению.

Для наблюдения за ферментными реакциями, вместо обычно употребляющихся приемов с условными неизвестными веществами, ни в химическом, ни в физическом смысле, в роде свернувшегося белка яйца, или застудневшего крахмального субстрата, необходимо подобрать систему, наиболее простую, в которой было бы легко устанавливать направление действия, и в которой можно было бы произвольно менять несколько ингредиентов, вполне доступных прямому химическому наблюдению.

После многочисленных поисков и попыток я остановился на убеждении, что самой подходящей системой для этого была бы наиболее разнообразная по возможным функциям, а именно—белковая. В ней легко протекают процессы—коагуляции, пептонизации, окисления, ибо дальнейший распад после аминокислот приводит у белков к сгоранию в окончательные продукты обмена, а это значит, что белки подвержены всем функциям ферментативной работы, ибо и сбраживание в высшие спирты по установленному ныне химией происходит из аминокислот.

Из белков мною была выбрана, индивидуализированная ранее, но подробно изученная со стороны ее дисперсоидологических реакций мною в работе — о состоянии казеиновой кислоты в растворе¹⁾ — казеиновая кислота.

Препараты ее получались мною способом многократной перекристаллизации молочных сгустков от кислоты из слабой

$\frac{n}{50} - \frac{n}{25}$ NaOH, а затем полного удаления всех посторонних

веществ путем промывки водой, спиртом и эфиром, вплоть до получения порошка казеиновой кислоты в форме единой фазы—Т. Свойства этого препарата таковы: легкая и быстрая растворимость в слабой щелочи, в естественном растворителе (смесь—5 гр. K_2HPO_4 + аq., 1 гр. NaCl, 1 гр. KCl в 1000 к. см. воды), в 10% растворах солей органических кислот, в роде салициловой, винной и т. д. Нерастворимость в воде и 10%

NaCl. Число титрования, т.-е. количество $\frac{n}{10}$ NaOH, идущее на

усреднение 1 грамма казеиновой кислоты, равнялось 8,2 к. см., следовательно, эквивалентный вес кислоты равнялся 1220.

Такого рода чистый препарат казеиновой кислоты был взят в качестве основного субстрата для наблюдения над энзимными реакциями. Методика получения исходных опытных растворов покоилась на создании высоко напряженной пересыщенной системы казеиновой кислоты в свободном виде, что достигалось следующей операцией. Приготавлился раствор казеин-натрия растворением казеиновой кислоты в NaOH,—бралась навеска, смачивалась чистым спиртом (вода не смачивает), заливалась водой, и прибавлялось рассчитанное по эквиваленту

количество $\frac{n}{10}$ NaOH до полного растворения. В виду того,

что наиболее удобной по напряженности системой я признал

$\frac{E}{100}$, так как это граница полного выпадения казеиновой кис-

лоты, предоставленной самой себе в воде, как в дисперсионной среде, а, с другой стороны, форма осадка при этой концентрации—средняя между желатинозным и хлопьевидным, что говорит об оптимальной насыщенности пространства, то бралась обычно навеска в 0,61 гр., и раствор доводился до 25 к. см. в следующей последовательности: навеска, смачивание несколь-

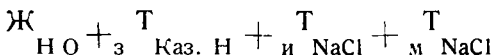
¹⁾ «Труды Вологодского Молочно-Хозяйственного Института», т. II, вып. 2, бюлл. № 30.

кими каплями спирта, приливание 10—12 к см. дистиллированной воды, приливание 5 к. см. $\frac{n}{10}$ NaOH, оставление до полного растворения и, наконец, доведение до 25 к. см. общего раствора, чтобы концентрация казеин-натрия равнялась $\frac{E}{50}$. Параллельно готовится 25 к. см. $\frac{n}{50}$ раствора HCl. Если слить оба раствора, то, в силу реакции $\text{Каз. Na} + \text{HCl} = \text{Каз. H} + \text{NaCl}$, казеиновая кислота выделится в чистом виде в раствор, и будет получена простая и известная среда, с которой допустимо наблюдать однозначно все действия фермента. Но оказалось необходимым систему несколько усложнить. Дело в том, что $\frac{E}{100}$ раствор казеиновой кислоты обладает слишком большим кристаллизационным напором, противостоять которому не может дисперсионная среда — H_2O со слабым раствором NaCl. Для увеличения поддерживательного напора среды необходимо ввести ббольшую концентрацию NaCl, который, как показали опыты, препятствует коагуляции казеиновой кислоты при концентрациях выше 3%. Оптимальное противодействие осаждению вызывает 10% раствор NaCl (ясная связь с обычным растворителем для глобулинов). Казеиновая кислота не коагулирует, вернее, не кристаллизуется, а остается в виде вполне ясного золя.

Отсюда методика получения $\frac{E}{100}$ раствора казеиновой кислоты была такова: 25 к. см. приготовленного казеин-натрия переливалось в эрленмейеровскую колбу, и в нее же вносились 5 гр. NaCl до полного растворения. Золь становился более ясным. В этот золь быстро вливалось при постоянном помешивании 25 к. см. $\frac{n}{50}$ HCl. Эта операция должна быть проведена чрезвычайно аккуратно. Малейшая неосторожность в смысле скопления вливаемого раствора в одном месте влечет появление хлопьев, уже не расходящихся, ибо они могут быть уничтожены: или механическим способом—встряхиванием, но лишь при условии неперехождения границ степени дисперсности, или химическим—прибавлением щелочи, но это возможно лишь при полном усреднении раствора, так как щелочь, приливаемая к неудачному золю, вначале идет на усреднение выделившейся в раствор казеиновой кислоты в виде золя, а потом уже на растворение выпавшей из раствора в виде хлопьев. Операция

же прибавления до усреднения нарушит все соотношения концентрации, ибо вновь разлагать систему казеин-натрия потребуются раствором HCl первоначальной крепости и объема ($\frac{p}{50}$ и 25 к. см.).

При тщательно проведенном сливании и при условии, что реакция прошла по уравнению, и нет избытка ни HCl, ни NaOH (первая вызывает коагуляцию, вторая мешает напряжению), получается дисперсная система состава



Эта явно коллоидная система напряжена достаточно сильно, ничтожный избыток Н⁺ вызывает коагуляцию. В ней казеиновая кислота предоставлена самой себе; в виду возможности ее титровать (кислотная функция), легко следить количественно за всеми изменениями в системе; присутствие поддерживающего вещества нейтрально для ферментных реакций, ибо химические свойства и концентрация NaCl не влияют сильно даже на свойства живого белка, что доказывается биологически морской водой, где организмы легко переносят высокие концентрации NaCl.

Итак, белковая система, легко наблюдаемая и легко направляемая, точно измеряемая, мною была найдена. После нахождения удобной среды выдвинулась естественная задача—проследить влияние на нее фермента с простейшей функцией—коагуляционной, т.-е. сычужного фермента—химозина.

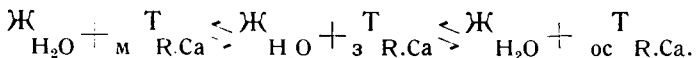
Отзыв чистой среды на температурное воздействие был нулевым, видимого изменения в состоянии не обнаруживалось. Прибавление к чистой среде сычужного фермента вызывало чуть заметное увеличение опалесценции; наблюдение велось в колориметре.

При обычных условиях действия химозина, в испытываемые среды вводят кальциевые соли.

В химической литературе есть ряд указаний на меньшую растворимость кальциевых солей органических кислот при повышении температуры.

Например, $\text{Ca} (\text{C}_7 \text{H}_{15} \text{O}_2)_2 + 1 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ имеет следующие значения растворимости: при 16° — 12,0, при 28° — 11,33, при 40° — 10,32, при 50° — 8,81.

Следовательно, при повышении температуры, в растворах этой соли при насыщении может происходить следующая дисперсоидологическая температурно-обратная реакция:



Отсюда, допустимо предположение, что и в пересыщенных, перенапряженных системах казеиновой кислоты может происходить в присутствии солей кальция нечто подобное. Опыт подтвердил это дедуктивное предположение.

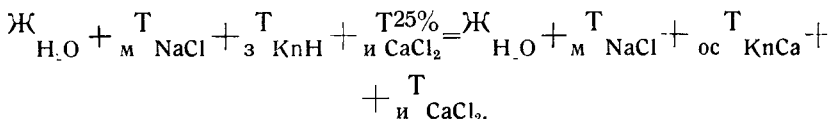
Опыт I. Приготовляем $\frac{E}{100}$ золь казеиновой кислоты в 10% NaCl. Берем по 10 к. см. золя в пробирки и прибавляем 3—5 капель 5% CaCl₂. Золь не меняется. Нагреваем до 50°. Появляется сильное увеличение опалесценции. При охлаждении опалесценция уменьшается.

Опыт П. На те же 10 к. см. золя прибавляем 3—5 капель 25% CaCl₂. Золь не меняется. Нагреваем до 50°. Появляется сильный осадок, не исчезающий при охлаждении.

Примечательно, что введение CaCl₂ в золь при обыкновенной температуре не вызывает никакого действия, обменная или иная реакция не происходит. Но достаточно поднять температуру выше 37°, как осадок выпадает. Здесь мы имеем случай явного изменения степени дисперсности в напряженной системе в зависимости от физических параметров следующего

закону пересыщенного состояния — $D = \frac{R_1}{CT}$.

Дисперсоидологически реакция протекает так.



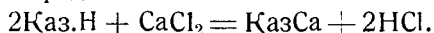
Осадок, полученный при повышении температуры, был вполне прочен и при понижении температуры обратно в золь не переходил, следовательно, мы имеем здесь дело с необратимой или трудно обратимой реакцией осаждения. Фаза KпCa, образуется в такой степени дисперсности, что поддерживательный напор 10% NaCl—недостаточен, и KпCa коагулирует; с другой стороны, образовавшиеся хлопья настолько велики, что они не могут вернуться в первобытное состояние золя без помощи дополнительных средств, хотя бы NaOH. Над фазой KпCa, коагулировавшей в хлопьях, остается мутный раствор; очевидно, реакция дисперсоидологически (а, может быть, и химически) не идет до конца, и остается некоторое количество

фазы $\frac{\text{Т}}{\text{з KпCa}}$ (или $\frac{\text{Т}}{\text{з KпH}}$). Но в первом опыте при понижении температуры наблюдалось просветление, очевидно, границы обратимости не были перейдены.

Отсюда делаем вывод: в системе $\frac{E}{100}$ золя казеиновой кислоты с фазой NaCl, при введении третьей фазы CaCl₂ при определенной концентрации и повышении температуры, вызывается появление фазы KпCa, при чем в зависимости от концентрации CaCl₂ появляются или фазы $\frac{T}{z} \text{ KпCa}$, или $\frac{T}{oc} \text{ KпCa}$; концентрация влияет и на температурную обратимость системы. Для того, чтобы проследить состав полученного коагулята, который дисперсоидологически определяется как $\frac{T}{oc} \text{ KпCa}$, ставится такой опыт.

Взята напряженная система казеиновой кислоты — $\frac{E}{100}$ в 10% NaCl. Разлита по 10 куб. см. в пробирки, и в каждую прибавлено по 3 капли 25% CaCl₂. Пробирки, количеством пять, нагреты до температуры 50°, после чего во всех образовались осадки. После отфильтрования последних, фильтрат титруется $\frac{n}{10}$ NaOH. Все пять пробирок дали или отрицательную реакцию на кислотность, или крайне низкую. В контрольной пробирке кислотность 0,5 куб. см. Описываемый опыт есть схема. При многочисленных повторениях, при разных температурах она в основном подтверждается. Но иногда некоторые пробирки имели кислотность до 0,1—0,15 куб. см. Это, казалось бы, маловажное обстоятельство имеет колоссальное теоретическое значение. В самом деле.

При условии одновременного сосуществования свободной казеиновой кислоты, CaCl₂ и NaCl, реакция осаждения может протекать лишь между двумя первыми веществами (контрольный опыт это подтверждает). Каким же путем может идти реакция? Обычное представление—



Но это противоречит всем химическим воззрениям, ибо классическая химия не допускает вытеснения сильной кислоты при помощи слабой. Между прочим, если бы реакция протекала этим путем, она подсказала бы простое объяснение для появления HCl в желудочном соке.

Другой тип реакции, уже не стехиометрический в обычном понимании,—это образование сложных комплексов или абсорбционных соединений. В этот тип реакции прекрасно укладывается явление коагуляции казеиновой кислоты при нагревании, но он требует отсутствия обменной реакции,—или вся казеиновая кислота осаждается в абсорбционное соединение,

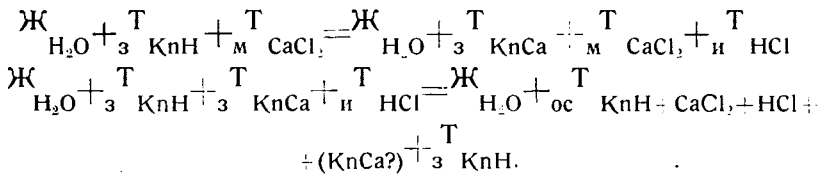
или часть ее (произвольная) остается в виде свободной кислоты в растворе.

Между тем, продолжая исследование фильтрата, я нашел, что в тех опытах, которые давали полное отсутствие кислотности, т.е., когда, при условии абсорбционности, казеиновая кислота должна была быть полностью в осадке, появлялись от воздействия уксусной кислоты значительные осадки казеиновой кислоты (до 0,07 гр.). Эти наблюдения уже не вмещаются в просто абсорбционные соединения, а требуют химических реакций обмена.

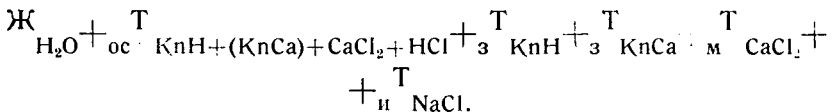
Раз отсутствует кислотность, то казеиновое соединение должно быть солевым, а, следовательно, реакция между Каз.Н и CaCl_2 идет по первому типу. Но тогда встает вопрос, куда же исчезает HCl , как результат обменной реакции? Она должна была бы титроваться в растворе, тем не менее он не дает реакции на кислотность.

Выход из всего наблюденного только один.

Несомненно, главная масса появляющегося осадка состоит из абсорбционных соединений между Каз.Н и CaCl_2 , так как количества Са в осадке колеблющиеся, но некоторая часть Каз.Н взаимодействует с CaCl_2 , о чем говорит присутствие не титрующей, но выпадающей от уксусной кислоты казеиновой кислоты в фильтратах, а получающаяся HCl увлекается абсорбционно в осадок, она и является главным стимулом к осадку в силу напряженности системы. Полная реакция по дисперсоидологическим стадиям идет так:



И окончательно получается весьма сложная система, в которой мне удалось путем обычной отгонки открыть наличие в осадке свободной HCl , но не удалось пока ясно установить, входит ли Са в составе KпCa осадка (вероятно, входит, в виду наличия этой фазы в фильтрате), а именно:



Проведенный анализ указывает, что в организмах при температурах обычных для них (37° и выше) происходят, вследствие напряженных белковых систем, сложные дисперсоидологические реакции, которые заставляют иначе представлять

биохимию, неправильно мыслимую нами в рамках простых обменных стехиометрических химических реакций. При этих условиях понятно появление HCl в желудочном соке, ибо наличие в организме всех фаз описываемой системы легко подтвердить (белки, соли кальция, NaCl).

Эти пока предварительные наблюдения, являющиеся поворотным пунктом для новых биохимических представлений, ложатся в основу особой темы моей работы.

Переходим теперь к изучению действия сычужного фермента.

Ставим следующие опыты.

Опыт I. Берется $\frac{E}{100}$ золь казеиновой кислоты в 10%

NaCl . Разливается в пробирки числом шесть по 10 к. см. В каждую прибавляется по 3 капли 5% раствора CaCl_2 . В три пробирки вводится сычужный фермент. Пробирки нагреваются до 45° . В первых трех без фермента появляется легкое помутнение. Во вторых трех с ферментом золь разрешается осадком. Тип осадка подобен описанному ранее. При постепенном нагревании без перемешивания можно добиться получения слабого геля. Отсюда ясный и прямой вывод. Реакция выпадения идет с ферментом скорее и отчетливее, чем без него,—химозин есть коагулирующий фермент для получения сложных абсорбционных соединений белка с солями кальция.

Опыт продолжается. Все пробирки подвергаются охлаждению до 18° . В первых трех без фермента происходит легкое просветление. В последних трех с ферментом, оказывается, тоже наступает просветление, но гораздо более полное, осадок ясно расходится, и получается золь, вполне подобный исходному.

Опыт II.—Берется $\frac{E}{100}$ золь казеиновой кислоты в 10%

NaCl . Разливается в 6 пробирок по 10 к. см. Во все пробирки прибавляется по 3 капли 25% раствора CaCl_2 . Фермент вносить бесполезно, ибо, как показывают ранее описанные опыты, в такой системе и так выпадает при нагревании осадок. Четыре пробирки нагреваются до 45° . Везде выпадает объемистый, мутно-слитый осадок. Пробирки охлаждаются до 18° . Осадок остается без изменения. В две из них прибавляется сычужный фермент, и все оставляется на некоторое время стоять в покойном месте. Через 10—15 минут пробирки с прибавленным ферментом просветляются настолько, что делаются неотличимыми от первых двух контрольных без нагревания. В двух пробирках без фермента, но с нагреванием, осадок остается, каким он выпал от повышения температуры.

Пробирки оставляются еще на несколько часов. Контрольные не нагретые и с ферментом являются ясным золем. Без фермента — содержат несколько неизменившийся осадок. Пробирки контрольные и с ферментом нагреваются вновь до 45°. Везде выпадает осадок. Снова охлаждаются до 18°. Контрольная содержит неизменившийся осадок, с ферментом — тотчас же образует золь. В контрольные и без фермента прибавляют фермент, через 10—15 минут везде получается ясный золь. Все пробирки нагреваются до 45°. Во всех выпадает осадок. Все охлаждается до 18°. Во всех получается ясный золь. Нагревание и охлаждение можно повторить после прибавления фермента большое число раз (в моих опытах до 50), и всегда наблюдается полная температурная обратимость: при 45° — осадок, при 18° — ясный золь.

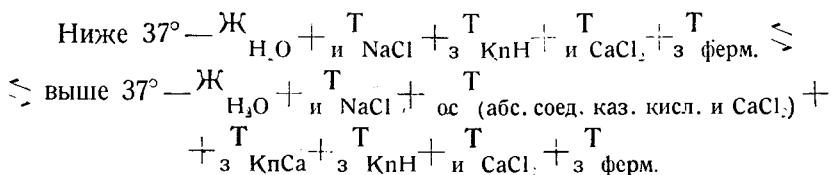
Исследуем золь после ферментных воздействий. Всюду выпадает осадок от прибавления CH_3COOH , следовательно, остается казеиновая кислота. Выделение осадка и обработка его до сухого состояния и проверка на титрование дают возможность определить количественно казеиновую кислоту. Потеря от первоначально взятого в растворе не превышает потери от обыкновенного переосаждения казеиновой кислоты.

Здесь мы встаем перед совершенно новой особенностью сычужного фермента по отношению к белку. Оказывается, химозин при определенных условиях обладает не коагуляционной способностью и не пептонизационной (химическое разложение), а пептизирующей (физическое раздробление) или декоагуляционной способностью, так как он переводит осадок абсорбционного соединения белка вновь в золь, не меняя глубоко химического состава взятой казеиновой кислоты. Отсюда напрашивается вывод: химозин есть пептизационный или пептизирующий фермент для осадков белка с солями кальция.

Если сопоставить этот вывод с выводом первого опыта, где химозин свертывал белок, то оказывается, что один и тот же фермент обладает двумя противоположными функциями, одновременно выявляя их при известных условиях среды, т. е. в зависимости от концентрации фаз системы и ее температуры.

Так как это обстоятельство можно отнести лишь за счет присутствия у фермента известного запаса поверхностной энергии, то можно химозин определить так: химозин является, в виду сконцентрированности на себе огромного запаса поверхностной энергии, дисперсоидологическим фактором, помогающим реакциям повышения или понижения степени дисперсности у соединений казеиновой кислоты, идущим в системе в зависимости от температуры и создающим легкую обратимость этих процессов, в виду удержания вещества в молекулярном внутреннем раздроблении.

Дисперсоидологически это выражается так:



Этим опытом и соображениями я исправляю основную ошибку в работе И. П. Павлова, а именно — сычужный фермент обладает несомненно двумя противоположными функциями, но противопоставление И. П. Павлова не верно: не **пептонизация** есть обратное коагуляции, а **пептизация**. И, как мы видим, этими обратными функциями обладает сычужный фермент.

На описанных опытах еще раз подтверждается один из законов диалектики — взаимное проникновение противоположных функций, проявляющихся в зависимости от условий среды.

Работа по наблюдению энзимных действий была продолжена. По моему предложению, Е. П. Хераскова проверила все описанные выше испытания на напряженных системах казеиновой кислоты над рядом других ферментов, и оказалось, что пепсин, трипсин, эмульсин, оксидаза, пероксидаза, диастаза и птиалин дают точно такую же реакцию коагуляционного и декоагуляционного процесса, как и химозин¹⁾.

Это видно из таблицы № 1:

Т а б л и ц а № 1.
Казеиновая кислота в 10% NaCl.

| Название фермента. | Форма состояния до нагревания. | Форма состояния после нагрев. до 42°. | Форма состояния по охлаждению до 18°. | Форма состояния после прибавления фермента. |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Пепсин | Коллоидный раствор. | Объемистый осадок. | Объемистый осадок остался без изменения. | Коллоидный раствор. |
| Трипсин | » | » | | » |
| Химозин | » | » | | » |
| Эмульсин | » | » | | » |
| Пероксидаза | » | » | | » |
| Оксидаза | » | » | | » |
| Диастаза | » | » | | » |
| Птиалин | » | » | » | » |
| Контрольн. | К. Р. | Об. ос. | Об. ос. | Осадок остается неизменным. |

¹⁾ «Труды Вологодского Молочного Института», том II, выпуск 4, бюлл. № 42.

Этими наблюдениями окончательно подтверждается правильность моих выводов о ферментном действии, как о дисперсоидологическом факторе развития в определенных системах больших внутренних поверхностей и тем помогающим каким угодно реакциям в зависимости от условий среды и компонентов системы.

Одним словом—специфичность ферментного действия заключается в том, что фермент предоставляет ту или иную, большую или меньшую поверхность для развертывания реакции, и только.

Иначе трудно объяснить, почему пероксидаза дает ту же реакцию с белком, как и пепсин и эмульсин, лишь с разной скоростью действия.

На это же указывают найденные Е. П. Херасковой связи между обратимостью белковой реакции и напряженностью системы (вытеснение полное или частичное казеиновой кислоты в раствор, количество CaCl_2), обратимостью и силой температурного воздействия на систему (высокая температура влечет необратимость реакции вследствие перехода степени дисперсности за пределы легкой обратимости)¹⁾.

После исследования пептизационных процессов совершенно естественно было проследить за действием ферментов на основной субстрат казеиновой кислоты, взятый без солей кальция, введя при наблюдениях фактор времени. Мною предполагалось, что явление будет протекать в такой форме, которая позволит полностью разобраться в механике процесса.

Наблюдения подтвердили предположения.

Приняты были такие условия получения напряженной системы казеиновой кислоты в 10% NaCl .

Навеска 0,61 гр. чистой казеиновой кислоты, проверенной на число титрования (8,2), была пересыпана в мерную колбу, вместимостью в 25 к. см.; смачивалась несколькими каплями

спирта; приливалось до 15 к. см. воды, 5 к. см. $\frac{n}{10}$ NaOH

и оставлялось; при помешивании, до полного растворения.

Получался $\frac{E}{50}$ раствор казеин-натрия. Параллельно готовился

25 к. см. $\frac{n}{50}$ HCl . В эрленмейеровскую колбу до 200 к. см.

всыпалось 5 гр. NaCl , и вливался раствор казеин-натрия, все

¹⁾ «Труды Вологодского Мол.-Хоз. Института», бюлл. № 42.

перемешивалось до полного растворения. После этого быстро вливался в колбу $\frac{n}{50}$ HCl. Колба находится в правой руке при постоянном круговом помешивании, левой рукой быстро вливается раствор HCl. После сливания происходит несколько раз энергичное встряхивание, пена исчезает при стоянии. При нормальном ходе реакции получается чуть мутный золь казеиновой кислоты концентрации $\frac{E}{100}$ в растворе NaCl, чуть большем 10%.

Эта методика приготовления золя казеиновой кислоты принята мною во всех дальнейших опытах. Достоинства этой системы белка: она содержит казеиновую кислоту в виде перенапряженной системы, устойчивость которой создает присутствие

NaCl (в воде при концентрации $\frac{E}{100}$ - происходит коагуляция), золь титруется, как кислота, с фенолфталеином, и, следовательно, возможно следить за ходом процесса; казеиновая кислота, будучи в напряженном состоянии, легко выделяется от незначительного количества уксусной кислоты, отсюда создается возможность учитывать ее количество в растворе.

Первые опыты были поставлены с химозином и пепсином. Основной приготовленный субстрат разливается в пробирки по 5 к. см. с крышечками. После разливания вносятся в виде порошка химозин и пепсин. Пробирки оставляются на время под наблюдением при обыкновенной температуре. Одна осталась контрольной без фермента.

Результаты приведены в таблицах № 2 и № 3:

Т а б л и ц а № 2.
Х и м о з и н.

| Время наблюдения. | Характеристика системы. | Контрольная пробирка. |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Октябрь. | | |
| 3 | Коллоидный раствор. | Коллоидн. раствор. |
| 4 | Мутный раствор. | Коллоидн. раствор. |
| 5 | Сильно мутный. | Без изменения. |
| 6 | Отделяется осадок; синерезис. | Без изменения. |
| 7 | Осадок уменьш. | Без изменения. |

Т а б л и ц а № 3.
П е п с и н.

| Время наблюдения. | Характеристика системы. | Контрольная пробирика. |
|-------------------|--------------------------------|------------------------|
| Октябрь. | | |
| 20 | Коллоидн. раствор. | Коллоидн. раствор. |
| 21 | Отделяется осадок. | » » |
| 22 | Синерезис. Осадок уменьшается. | Без изменения. |
| 23 | Сильно уменьш. | » » |
| 24 | Едва на дне. | » » |
| 25 | То же. | » » |

Из таблиц явствует, что химозин и пепсин действуют на золь казеиновой кислоты совершенно аналогично, отличаясь лишь скоростью эффекта. С пепсином резкое изменение происходит на другой день, тогда как с химозином эта стадия наступает на 3-й или 4-й. Все явление проходит такие фазы. Даже без присутствия солей кальция происходит коагуляция в виде нормального сгустка, напоминающего обыкновенный сырный сгусток; над ним раствор делается почти прозрачным. В самом сгустке с течением времени идет ясный синерезис; сгусток, сохраняя форму, уменьшается в объеме (у химозина медленнее), и остается в конце реакции чуть заметный осадок на дне. Раствор становится настолько прозрачным, что дает лишь едва заметный конус Тиндаля. Повидимому, здесь идет уже не процесс пептизации, при которой коллоидность ясно сохраняется при обратном процессе. Контрольные пробирики сохраняют во все время опыта полные коллоидные свойства золя казеиновой кислоты. Явление, описанное мною, было повторено десятки раз с одинаковым результатом. Отсюда вывод. Коагуляция белка идет и в отсутствие солей кальция под влиянием фермента, при чем тип этой коагуляции заставляет думать о простой кристаллизации, в отличие от взглядов *Namptargsten'a*; вслед за ней наступает фаза исчезновения осадка, который можно как-будто подвести под пептонизацию. Эта реакция обща обоим ферментам, и химозину и пепсину. Таким образом устанавливается качественная общность явления, и понятие о химической специфичности этих ферментов начинает колебаться.

Чтобы проследить, что происходит с казеиновой кислотой, мною были поставлены опыты одновременно с этими же двумя ферментами, проверенными на специфичность обыкновенно принятыми методами, с наблюдением по окончании реакции за судьбой казеиновой кислоты при помощи воздействия CH_3COOH на окончательную фазу ферментной реакции. Один из многих, вполне согласных между собой опытов приведен в таблице № 4:

Т а б л и ц а № 4.

| Время наблюдения. | Химозин. | Пепсин. | Контрольн. без фермента. |
|---------------------------------------|-------------------|-----------------------|------------------------------|
| | Состояние системы | Состояние системы | |
| Ноябрь. | | | |
| 1 | Коллоидн. раств. | Коллоидн. раств. | Коллоидн. раств. |
| 2 | Мутный раствор. | Осадок. | » » |
| 3 | Сильно мутный. | Ум. ос.; синерезис. | » » |
| 4 | Осадок. | Сильно уменьш. | » » |
| 5 | Ос. уменьш. | » » | » » |
| После вливания уксусной кислоты . . . | Небольшой осадок. | Едва заметный осадок. | Полный во весь объем осадок. |

Из анализа таблицы ясно, что вторая фаза действия фермента есть пептонизация, вернее—химическое разложение, ибо осадок в пробирках с химозином и пепсином после CH_3COOH весьма незначителен по сравнению с выделившимся осадком в контрольных пробирках без ферментов, при чем видно, что пепсин работает скорее и сильнее, химозин—медленнее и слабее. Отсюда вывод, что процесс воздействия фермента на напряженную систему белковой кислоты слагается из двух фаз—коагуляционной и пептонизационной, идущих друг за другом. Это становится легко понятным при принятии моего постулата второго об оптимальных свойствах геля.

Из соображений вполне понятных, следующим ферментом для испытания был избран—эмульсин, как фермент, ничего общего не имеющий с протеолитическими и коагуляционными функциями. Препарат взят от Мерка, проверен на свою основную реакцию и на реакцию пепсина и химозина. Обстановка опыта совершенно аналогична предыдущему. Результаты опытов сведены в типическую таблицу № 5, из которой видно,

что в опыте применен прием испытания при помощи CH_3COOH конечных фаз системы:

Т а б л и ц а № 5.
Э м у л ь с и н.

| Время наблюдения. | Характеристика системы. | Контрольная. |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Ноябрь. | | |
| 6 | Коллоидный раствор. | Коллоидный раствор. |
| 7 | » » | » » |
| 8 | » » | » » |
| 9 | Слабо-мутный раств. | » » |
| 10 | Мутный раствор. | » » |
| 11 | Сильно-мутный раств. | » » |
| 12 | Отдел. осадок. | » » |
| После прибавления CH_3COOH | Осад. довольно больш. часть объема. | Сильный осадок во весь объем. |

Из анализа таблицы № 5 ясно видно, что первая фаза—коагуляционная протекает и с эмульсином, но гораздо медленнее, чем с предыдущими ферментами. Что же касается пептонизационной фазы, то она менее явственна в этих опытах, может быть, потому, что медленно идущая реакция не довела до конца действие фермента, во всяком случае осадок от CH_3COOH наблюдается меньший, чем в контрольных пробирках. Поэтому я прибег к очень кропотливому способу выделения сгустка после эмульсина казеиновой кислоты и титрования ее щелочью.

Результаты оказались такие: $-\frac{n}{10} \text{NaOH}$.

Титрование прямое в 10 к. см. золя—0,81 к. см.

Титрование осадка в контрольной пробирке—0,79 к. см.

Титрование осадка после эмульсина—0,65 к. см.

Ясно, что эмульсин разложил часть казеиновой кислоты, тогда как контрольная пробирка дала титрование в пределах ошибки опыта при обычном переосаждении.

В заключение первого цикла опытов были подвергнуты испытанию в том же духе еще два фермента: трипсин, как

ясный протеолитический фермент, обычно в щелочной среде, и диастаза, как амилолитический фермент, обычно в кислой среде. Условия опыта были взяты те же. Основная среда казеиновой

кислоты $\frac{E}{100}$ в 10% NaCl разливается по 5 к. см. в пробир-

ки. Ферменты прибавляются в сухом виде. Препараты их от Мерка, проверенные на действие и отсутствие примесей. Наблюдение ведется при обыкновенной температуре. Изменяемый фактор—время. Среда—явно кислая. Результаты размещены в таблице № 6:

Т а б л и ц а № 6.

| Время наблюдения. | Трипсин. | Диастаза. | Контрольн. без фермента. |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Ноябрь. | | | |
| 4 | Коллоидн. раств. | Коллоидн. раств. | Коллоидн. раств. |
| 5 | » » | Мутнеет. | » » |
| 6 | » » | Сильно мутный раствор. | » » |
| 7 | Мутный раствор. | Отделился осадок | » » |
| 8 | Отделился осадок. | Синерезис; уменьш. осадок. | » » |
| 9 | Синерезис.; осад. уменьш. | Сильно уменьш. осадок. | » » |
| После приливания CH_3COOH | Средний осадок. | Малый осадок. | Сильный осадок до весь объем. |

Из анализа таблицы № 6 видно, что для обоих ферментов первая коагуляционная фаза проходит в таком же виде, как и для описанных раньше ферментов. Кажется несколько странным, что она легче возникает у диастазы, чем у трипсина, но если исходить в объяснении действия фермента из степени дисперсности его, то это обстоятельство допустимо. Фаза пептонизации идет тоже с обоими ферментами, и опять, как ни странно, у диастазы резче, чем у трипсина. Приливание к окончательной фазе CH_3COOH вызывает осадки меньшие, чем в контрольной.

У диастазы осадок значительно меньше, чем у пепсина. Оказывается, что диастаза является более сильно пептонизирующим ферментом, чем безусловно протеолитический «присяж-

ный» трипсин, при чем последний достаточно хорошо, как видно из опыта, работает в явно кислой среде. Отсюда окончательный вывод, что специфичность ферментов есть весьма условное понятие.

В результате всех наблюдений выяснилась полная ошибочность представления о специфичности ферментов; все ферменты, подвергнутые опыту, выявили наличие коагуляционной и протеолитической функций. В виду этого работа мною была углублена с постановкой опытов одновременно со всеми ферментами, с одновременно же приготовленной основ-

ной средой. Она готовится в 25 к. см. при 5 к. см. $\frac{n}{10}$ NaOH

и т. д. или все удвоенное, утроенное и т. д. по надобности.

В результате получается $\frac{E}{100}$ золь казеиновой кислоты в 10³%

NaCl. Среда разливается в пробирки по 5 к. см.; прибавляются проверенные ферменты в сухом виде—пепсин, трипсин, химозин, эмульсин, диастаза. Оставляется контрольная пробирка без фермента. Опыт ведется при обыкновенной температуре, при чем меняющимся фактором является время. Из ряда таких опытов, совершенно согласовавшихся друг с другом и проведенных около 20 раз, при чем некоторые из них были с прибавкой, в качестве асептических средств, толуола и тимола, я беру типичное, размещенное в таблице № 7.

Анализ таблицы убеждает, что все ферменты на напряженную белковую систему влияют одинаково. Эта общая реакция ферментов ясно разбита на две фазы—коагуляционную и пептонизационную через синерзис. Некоторые ферменты обладают большой активностью в этой реакции—пепсин, другие весьма слабой—эмульсин. Процесс зависит не от химической специфичности, так как диастаза работает одинаково по силе с химозином, немногим уступая пепсину, а трипсин, типично протеолитический фермент, уступает по активности диастазе, являясь в кислой среде немногим сильнее эмульсина. Повидимому, все зависит от той поверхности, которую создают ферменты в растворе вне зависимости от их химического состава (если он различен?). Контрольная пробирка, где все время остается золь, убеждает, что все явления зависят от ферментов, внесенных в среду, а не от бактериологических процессов, могущих разыграться от случайного засорения. Бактериологические посевы дали во всех и в контрольной пробирке почти отрицательные результаты.

При сопоставлении этих наблюдений с пептизационными явлениями, описанными мною ранее, напрашивается сам собою

Т а б л и ц а № 7.

Опыт поставлен 4 мая. Везде коллоидный раствор.

| НАЗВАНИЕ ФЕРМЕНТА. | В Р Е М Я Н А Б Л Ю Д Е Н И Я. | | | | | | | | |
|--------------------|---------------------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------------|--------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 5 мая. | 6 мая. | 7 мая. | 8 мая. | 10 мая. | 11 мая. | 17 мая. | 20 мая. | 30 мая. |
| | Х а р а к т е р и с т и к а с о с т о я н и я. | | | | | | | | |
| Пепсин | Мутный раствор. | Коагул. | Осадок отдел. | Синерез. осадок уменьш. | Сильно мутный. | Уменьш. | Немного на дне. | Едва заметно. | Тоже. |
| Трипсин | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Мутный раствор. | Мутный раствор. | Сильно мутный. | Отдел. осадок. | Резко отд. | Сильно уменьш. | Еще меньше. |
| Химозин | Мутный раствор. | Очень мутный. | Появился осадок. | Резкое отделен. | Синерез. уменьш. осадок. | Сильно уменьш. | Сильно уменьш. | Уменьш. | Немного на дне. |
| Эмульсин | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Мутный. | Сильно мутный. | Отдел. осадок. | Уменьш. осадок. | Уменьш. |
| Диастаза | Колл. раствор. | Мутный раствор. | Сильно мутный. | Отдел. осадок. | Синерез. ум. осад. | Сильно уменьш. | Еще уменьш. | Еще уменьш. | Немного на дне. |
| Контрольн. | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Колл. раствор. | Колл. раствор. |

вывод, что все три функции—коагуляционная, пептизационная и пептонизационная—связаны со всеми ферментами и идут в полном соответствии друг с другом по силе. Для большей ясности, в таблице № 8 сведены, пока качественно, все характеристики по активности ферментов по результатам моего опытного материала. Система принята балльная, на 5 баллов.

Т а б л и ц а № 8.

| НАЗВАНИЕ ФЕРМЕНТА. | Коагуля- ционные свойства. | Пептиза- ционные свойства. | Пептони- зацион. свойства. |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Пепсин | 5 | 4 | 5 |
| Химозин | 5 | 5 | 4 |
| Диастаза | 4 | 3 | 5 |
| Трипсин | 3 | 3 | 4 |
| Эмульсин | 3 | 2 | 2 |

Из таблицы видно, что сила всех функций совершенно параллельна для каждого фермента, и что ступенчатость характеристики явно говорит о каком-то едином источнике этой силы. В моей теории это выпадает на долю степени дисперсности самого фермента. Поскольку опытами подтверждается пептонизация казеиновой кислоты, белковый распад, идущий со всеми ферментами, но с различной интенсивностью у каждого, интересно было проследить за ходом этого распада.

Были повторены опыты со всеми ферментами над напряженной системой казеиновой кислоты в 10% NaCl. Из каждого опыта взяты окончательные стадии обработки по времени при одновременном действии всеми ферментами, конечно, в разных пробирках, через две-три недели после начала опыта.

В пробирки, где осадок или едва заметен, или в полном ходу синерезиса, прибавлялся $\frac{n}{10}$ NaOH до усреднения по фенолфталеину, для того, чтобы привести все пробирки к равномерному состоянию слабого зольа. Затем в почти однородные оптические жидкости прибавлялось по 0,25 к. см. 10% CH₃COOH. В зависимости от фермента, в пробирке выпадает той или иной величины осадок. Его размер в контрольной пробирке принимался за единицу $\left(\frac{1}{1}\right)$, а в остальных оценка давалась в дроб-

ных долях к контрольному осадку. Из ряда опытов взяты типичные выписки из дневников и сведены в таблице № 9. В каждом месяце даны опыты, подвергавшиеся действию фермента не одинаковое количество времени:

Т а б л и ц а № 9.

| Название фермента. | Октябрь. | Ноябрь. | Декабрь. | Апрель. | Май. | Июнь. |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------|----------|---------|------|-------|
| | Величина объема осадка казеиновой кислоты от CH ₃ COOH. | | | | | |
| Пепсин . . | 1/12 | 1/12 | 1/20 | 1/20 | 1/20 | 1/15 |
| Трипсин . . | 1/5 | 1/5 | 1/10 | 1/10 | 1/10 | 1/5 |
| Химозин . . | 1/6 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/6 |
| Эмульсин . . | 2/3 | 2/3 | 1/2 | 2/3 | 1/2 | 2/3 |
| Диастаза . . | — | — | 1/10 | 1/10 | 1/12 | 1/10 |
| Контрольн. | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 |

Из анализа этой таблицы явствует, что наиболее сильным пептонизационным (химическое действие) обладает пепсин, за ним диастаза, далее идут, чередуясь,—трипсин и химозин, и, наконец, последнее место занимает эмульсин. Неодинаковость чисел у отдельных ферментов пепсин—от $1/20$ до $1/12$, трипсин—от $1/10$ до $1/6$ и т. д., объясняется неодинаковым по времени действием фермента. Разница в числах между различными ферментами, пепсин $1/20$, эмульсин $2/3$, построена исключительно на разнице запасов внутренней поверхностной энергии. Это заметно даже грубо оптически. В то время как чистый раствор пепсина дает заметный золь и ясный конус Тиндаля, раствор чистого эмульсина почти прозрачен и дает слабый конус Тиндаля; трипсин же мало растворим в жидкости той кислотности, которая получается в опытах. Повидимому, порядком отбора, как в эволюционном процессе, каждое из веществ, подвергающееся распаду, сочетало около себя фермент, создающий тот запас поверхностной энергии, который является оптимальным, не исключая возможности и способности использовать запасы энергии и другого фермента. Вещество порядка глюкозидов, более просто построенное, чем белок или крахмал, требует меньших запасов поверхности для разложения, и наоборот. Химозин, который обладает средней активной поверхностью,

легко приостанавливает свое действие на первой фазе общего процесса распада вещества на фазе коагуляционной.

Дальнейшей задачей встала передо мной необходимость найти объективное выражение совершающегося процесса распада белка и проследить его течение при различных ферментах. В качестве меры явления наметилось определение свойства, данного в опытах, легко доступного и обусловленного наличием кислотных функций в казеиновой кислоте.

В те же повторенные массовые опыты с перенапряженной системой казеиновой кислоты в 10% NaCl я ввел определение кислотности, выражаемое количеством $\frac{n}{10}$ NaOH на 5 к. см.

разлитого золя для опытов. Что эта функция налицо у раствора, понятно из реакции $\text{Каз. Na} + \text{HCl} = \text{Каз. H} + \text{NaCl}$, где титроваться должен Каз.Н.

Наблюдения над кислотностью были взяты из разных серий опытов рядовых и отнесены к тем месяцам, когда производились наблюдения. Числа их подтверждаются и в самих рядах и сериях рядов. Сводные результаты размещены в таблице № 10:

Т а б л и ц а № 10.

| НАЗВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ. | Ноябрь. | Декабрь. | Январь. | Март. | Май. | Июнь. | Июль. |
|---------------------|----------------------------------------|----------|---------|-------|------|-------|-------|
| | Кислотность в к. см. на 5 к. см. золя. | | | | | | |
| Пепсин | 1,0 | 0,92 | 0,9 | 1,05 | 1,0 | 0,7 | 0,95 |
| Трипсин | 0,65 | 0,67 | 0,67 | 0,7 | 0,75 | 0,55 | 0,82 |
| Химозин | 0,8 | 0,75 | 0,82 | 0,9 | 0,9 | 0,6 | 0,85 |
| Эмульсин | 0,55 | 0,7 | 0,65 | 0,6 | 0,55 | 0,5 | 0,55 |
| Диастаза | — | 0,85 | 0,88 | 0,9 | 0,85 | 0,75 | 0,90 |
| Контрольн. | 0,5 | 0,52 | 0,57 | 0,55 | 0,5 | 0,35 | 0,45 |

Анализ этой таблицы указывает, что при происходящем процессе пептопизации определенно растет кислотность, очевидно, образуются белковые кислоты более простые, чем казеиновая кислота, ибо основной химический характер белковых

веществ не меняется, на что указывает биуретовая реакция в продуктах реакции фильтрата. Рост кислотности по отношению к контролю весьма своеобразен. Самые высокие значения дает пепсин, самые низкие — эмульсин, так что картина по кислотности вполне совпадает с прежней оценкой силы действия ферментов. Величина крайнего распада в вертикальном ряду никогда не превышает удвоенной начальной цифры опыта в контроле, — напр.: ноябрь — контрольная — 0,5, пепсин — 1,0; июль — контрольная — 0,45, пепсин — 0,95 и т. д., что указывает на сравнительно простой распад вещества — удвоение кислотных функций; в большинстве же распад лежит между 1 и 2 с полной закономерностью своего хода, хотя бы: март — контрольная — 0,55, эмульсин — 0,60, трипсин — 0,7, химозин и диастаза — 0,9 и пепсин — 1,05, как и предполагалось из общего закона, устанавливающего силу фермента (см. таблицу № 8).

В горизонтальных рядах совпадение тоже разительное. Ход процесса ограничивается некоторыми рамками, за них, как правило, процесс не переходит. Эмульсин все время держится — 0,5 — 0,7, диастаза — 0,75 — 0,9 и т. д., так что каждый фермент дает границу равновесия распада, и лишь пепсин доводит распад до конца.

В приведенных опытах участвуют — казеиновая кислота в свободном состоянии, H_2O , $NaCl$ и фермент. Конечной реакцией являются исчезновение казеиновой кислоты и появление новых кислот. Если фермент, как принято, в реакцию не входит, кислыми функциями не обладает, H_2O и $NaCl$ не могут быть пептонизаторами, то ясно, что единственным фактором распада могут быть свободные ионы H^+ от самой казеиновой кислоты. Очевидно, они при условии широко развернутой поверхности от фермента разлагают самое казеиновую кислоту. На их активность указывает и рН в растворе, в золе. Во всех наблюдаемых опытах оно оценивалось 5,1 — 5,2, что говорит о достаточно сильной активности водородных ионов, о большой концентрации их. А отсюда получается интересный вывод об автолитическом процессе в белке, когда белковая кислота при известных условиях, предоставленная самой себе, может разлагать себя.

Явления автолиза белков в чистой воде уже наблюдались ранее. Они понятны, ибо в воду уже при простом размешивании с порошком белка переходит такое количество белковой кислоты, что, как показали мои опыты с рН бидистилляты, оцениваемой — 7, оказывалось кислым и равным 5,5, при условии перехода белковой кислоты в H_2O от простого встряхивания.

Поскольку вопрос поднялся о рН, постольку был поставлен детальный опыт определения рН при всех стадиях обра-

ботки казеиновой кислоты различными ферментами. Опыт был повторен обычным порядком. Напряженная система казеиновой кислоты в 10% NaCl разливалась в пробирки; вносился фермент, оставлялась контрольная, и определялось рН в середине и конце процесса обработки ферментами. Результаты размещены в таблице № 11:

Т а б л и ц а № 11.

Изменения рН.

| НАЗВАНИЕ ФЕРМЕНТА. | 1-й опыт: | | 2-й опыт: | | 3-й опыт: | |
|--------------------|-----------|---------|-----------|----------|-----------|----------|
| | 8 мая. | 30 мая. | 5 июня. | 21 июня. | 4 июля. | 20 июля. |
| Пепсин | 5,0 | 4,8 | 5,0 | 4,9 | 5,0 | 4,8 |
| Трипсин | — | — | 5,0 | 4,9 | 5,1 | 5,0 |
| Химозин | 5,0 | 4,9 | 5,1 | 5,0 | 5,1 | 4,9 |
| Эмульсин | — | — | 5,1 | 5,0 | 5,2 | 5,1 |
| Диастаза | 5,0 | 4,9 | — | — | 5,1 | 4,9 |
| Контрольн. | 5,1 | 5,1 | 5,1 | 5,1 | 5,2 | 5,2 |

Из анализа таблицы № 11 явствует, что увеличение рН во всем течении реакции незначительно, чего и следовало ожидать теоретически, ибо распад пептонизационный и даже появление аминокислот не может создать большие значения рН, так как концентрация водородных ионов увеличивается крайне медленно в продуктах белкового распада; даже такие простые вещества, как аспарагиновая кислота, имеют изоэлектрическую точку около рН=4. Но сравнение в отдельных опытах значений рН середины фазы и конца ее: 8-го мая пепсин — 5,0, 30-го он же — 4,8, — свидетельствует, что медленный распад совершился, а сравнение в вертикальных рядах говорит об активности каждого фермента: слабее — эмульсин, сильнее — пепсин, прочие — в середине; у пепсина 20-го июля распад дошел до 4,8, а у эмульсина — 5,1 при условии контроля — 5,2.

Эти опыты, вполне согласуясь с общим ходом наблюдений, еще раз подчеркивают, что пептонизация идет со всеми ферментами, но с разной скоростью.

Последним я поставил задачу проследить влияние ферментов на систему казеиновой кислоты, где изменено рН в сторону повышения щелочности прибавлением NaOH.

В обычно приготовленный золь вносится $\frac{n}{10}$ NaOH в

таком количестве, чтобы рН = 7,2, т.-е. реакция была бы почти нейтральной. Таким путем обработанный золь разливается в пробирки по 5 к. см., в них вносятся обычным порядком порошки ферментов.

Результаты, полученные через несколько дней от начала наблюдения, размещены в таблицах № 12 и № 13. Таблица № 12 ясно указывает, что при условии рН = 7,2 явление извращается. В то время как в контрольной пробирке за все время опыта остается коллоидный раствор, в пробирках с ферментами идет постепенное просветление золь без наступания коагуляционной фазы. Отсюда прямое указание, что коагуляционная фаза обусловлена наличием свободных водородных ионов. Постепенное просветление особенно ярко идет в пробирках с трипсином и диастазой.

Т а б л и ц а № 12.

Прилито NaOH до рН = 7,2; в контрольной рН = 5,0.

| НАЗВАНИЕ ФЕРМЕНТА. | С о с т о я н и е с и с т е м ы . | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|----------------|----------------|--------------------|-----------|
| | 2 июня | 4 июня. | 9 июня. | 12 июня. | 15 июня. |
| Пенсип | Колл. р. | | | Без изм. | |
| Трипсин | » | Без изменений. | Без изменения. | Меньше опалесценц. | Т о ж е . |
| Химозин | » | | | Без изм. | |
| Эмульсин | » | | | Без изм. | |
| Диастаза | » | | | Меньше опалесценц. | |
| Контрольн. | » | | | Без изм. | |

Т а б л и ц а № 13.

Определено в конце процесса. рН=7,2—начальное достигнуто путем подщелочения NaOH.

| НАЗВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ. | рН. | Кислотность. | Осадок от CH_3COOH . |
|---------------------|-----|--------------|--------------------------------------|
| Пепсин | 6,9 | 0,2 | $\frac{1}{2}$ |
| Трипсин | 6,8 | 0,6 | 1 20 |
| Химозин | 6,9 | 0,1 | 4 5 |
| Эмульсин | 7,0 | 0,1 | 4 5 |
| Диастаза | 6,8 | 0,5 | 1 20 |
| Контрольн. | 7,2 | 0,05 | 1/1 |

Значение этого раскрывается таблицей 13, где сосредоточены значения рН, кислотности и осадка от CH_3COOH в последней стадии действия ферментов. Совершенно ясно, по изменениям рН и кислотности по сравнению с контрольной пробиркой, что фаза пептонизации идет со всеми ферментами, но не одинаково: лучше всего разлагают трипсин и диастаза, где значения кислотности достигают 0,6 и 0,5 вместо 0,05 в контрольной; изменения значений рН параллельны.

Но всего нагляднее о ходе распада свидетельствуют величины осадков от CH_3COOH . Явление совершенно иного толка, чем при обычном рН=5,1; здесь сильнее всего работают трипсин ($\frac{1}{20}$) и диастаза ($\frac{1}{20}$), тогда как пепсин ($\frac{1}{2}$), а особенно химозин ($\frac{4}{5}$), почти равняются с эмульсином ($\frac{4}{5}$). Это объясняется тем, что нарастание H^+ -ионов слабее у трех последних, чем у первых двух (трипсин и диастаза), а с нарастанием H^+ -ионов идет параллельно пептонизация. Еще лишнее подтверждение, что фермент — лишь активная поверхность, а явления распада зависят от ионов H^+ .

Совершенно естественно было углубить опыт с установленным при начале рН, равным 9,0, что говорит уже о сильно щелочной функции. Опыт был поставлен аналогично предыдущему с учетом тех же величин, и наблюдения сведены в таблицах № 14 и № 15.

Т а б л и ц а № 14.
Прилито NaOH до pH = 9,0. Начальное pH = 5,2.

| НАЗВАНИЕ ФЕРМЕНТА. | С о с т о я н и е с и с т е м ы . | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|----------------|----------------|--------------------|----------|
| | 2 июня. | 4 июня. | 9 июня. | 12 июня. | 15 июня. |
| Пепсин | Колл. р. | Без изменений. | Без изменений. | Без изм. | Т о ж е |
| Трипсин | » | | | Меньше опалесценц. | |
| Химозин | » | | | Без изм. | |
| Эмульсин | » | | | » | |
| Диастаза | » | | | Меньше опалесценц. | |
| Контрольн. | » | | | Без изм. | |

Т а б л и ц а № 15.
Определено в конце процесса. Начальное pH = 9,0.

| НАЗВАНИЕ ФЕРМЕНТА. | pH. | Кислотность | Осадок от CH ₃ COOH. |
|--------------------|-----|-------------|---------------------------------|
| Пепсин | 7,7 | Щелочн. | 4 5 |
| Трипсин | 7,8 | » | 1 20 |
| Химозин | 7,8 | » | 4 5 |
| Эмульсин | 8,0 | » | 4 5 |
| Диастаза | 7,7 | » | 1 20 |
| Контрольн. | 9,0 | » | 1/1 |

Первая таблица свидетельствует, что явление при pH = 9,0 протекает так же, как и при pH = 7,2, т.е. что щелочная и нейтральная реакции уничтожают коагуляционную фазу; вторая таблица, повторяя явления при pH = 7,2, указывает, что белковый распад при наличии ионов OH' все же вызывается образованием ионов H', которые и разлагают белок и тушат гидроксильные ионы, стремясь создать кислую реакцию, перевести pH за пределы нейтральности.

В присутствие же трипсина и диастазы гидроксильные ионы являются активно действующими, и, очевидно, поверхность трипсина создана так, что при ней энергичнее работает OH' , чем H' , тогда как для диастазы это не имеет значения. Для пепсиновой поверхности более активным является H' , а не OH' . Механика этого процесса подлежит детальному изучению. Из опытов следуют выводы, что нейтральная и щелочная реакции уничтожают коагуляционную фазу, пептонизационную — извращают.

На этих наблюдениях заканчиваю я первую часть своего исследования о специфичности ферментов.

Выводы:

1. Химической специфичности ферментов нет; то, что называют специфичностью ферментов, можно объяснить лишь физическим строением их, различным запасом поверхностной энергии в них, зависящей от степени дисперсности самого фермента.

2. Процесс действия фермента составляется из фаз коагуляционной и пептонизационной, следующих друг за другом. При $\text{pH} = 7$ и выше, коагуляционная фаза исчезает, а пептонизационная — извращается.

3. При наличии в перенапряженной казеиновой системе CaCl_2 фаза коагуляционная наступает при нагревании и без фермента; фермент помогает ей образоваться при малых концентрациях CaCl_2 ; при низких температурах в свернувшихся системах фермент является пептизирующим (физическое раздробление) фактором.

4. Фермент есть дисперсоидологический катализатор, помогающий в перенапряженных белковых системах явлениям коагуляции, пептизации и пептонизации, — которые наступают под воздействием других факторов (ионы H' , OH' , температурные колебания и т. д.). Фермент, развертывая внутреннюю поверхность, создает благоприятные условия для совершения дисперсных (абсорбционных) реакций.

5. Существуют особые соединения у белков с солями кальция, которые можно назвать коагуляционно-абсорбционно-химическими, ибо при этих реакциях имеются налицо и реакция двойного обмена, и выпадение от определенных ионов, и абсорбционные сочетания

Folgerungen.

1. Es gibt keine chemische Specificität der Fermenten; was als Specificität der Fermenten genannt wird, kann bloss als ihre physische Struktur, als verschiedene Vorräte der in ihnen enthaltenen, von dem Dispersionsgrade des Fermentes selbst abhängigen—oberflächlichen Energie—erklärt werden.

2. Der Fermentenwirkungsprozess besteht aus Koagulations- und Peptonisationsphasen, die nacheinander folgen. Bei $\text{pH}=7$ und höher verschwindet die Koagulationsphase während die der Peptonisation verunstaltet wird.

3. Bei vorhandenen CaCl_2 im überspannten Kaseinsystem im Falle der Erwärmung beginnt die Koagulationsphase auch ohne Ferment; das Ferment hilft ihr bei der schwachen Konzentrationen von CaCl_2 sich zu bilden; bei niedrigen Temperaturen in der koagulierten Systemen stellt sich das Ferment als Peptisationsfaktor (physische Zerbröckelung) dar.

4. Das Ferment ist ein dispersoidologischer Katalisator, der in den überspannten Eiweissystemen als Hilfsmittel der Koagulations-Peptisations-Peptonisationserscheinungen, welche bei der Wirkung anderer Faktoren (H^+ , OH^- - Ionen, Temperaturschwankungen usw.) auftreten, vorkommt. Das Ferment, indem es die innere Oberfläche entwickelt, erzeugt günstige Bedingungen zur Vollbringung von Dispersions-, Absorptionsreaktionen.

5. Es gibt besondere Verbindungen des Eiweisses mit Calciumsalz, die als Koagulations-, Absorptions-chemische bezeichnet werden können, da bei diesen Reaktionen auch Reaktion von doppelter Umstellung, Ausfall wegen bestimmten Ionen und Absorptionsvereinigen statt finden.

Периодические осадки в фосфорно- кальциевых солях

Б. А. Догадкин

Периодические осадки в фосфорно-кальциевых солях.

Так называемые кольца Лизеганга в фосфорно-кальциевых солях принадлежат к числу типичных для этого рода явлений. Большое внимание уделил им Е. Hatschek¹⁾, изучая кольцообразование для $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Если допустить принципиальную возможность объяснения некоторых моментов формообразования в организмах с точки зрения механизма явлений Лизеганга, как это делает, например, Е. Küster²⁾, то периодические осадки фосфорно-кальциевых солей имеют особый интерес в силу их обычного нахождения в составе животных и растений. Кроме того, как будет видно из дальнейшего изложения, образование в желатине колец CaHPO_4 происходит чрезвычайно быстро и отчетливо, так что они являются весьма удобным объектом для ознакомления с периодическими реакциями вообще. Эти два обстоятельства и обусловили настоящую работу.

1. Описание явления.

В общем случае периодические осадки получаются в результате реакции $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{CaCl}_2 = \text{CaHPO}_4 + 2\text{NaCl}$. Впрочем, состав осадка далеко не соответствует его формуле, приведенной в схеме: в действительности получается вещество с переменным содержанием Н в молекуле³⁾. Употребление $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ вместо Na_2HPO_4 не дает кольцообразования при опытах в пробирках. В этом случае в системах с наиболее высокими концентрациями электролитов образуются на некотором расстоянии от мениска желатины равномерно разбросанные кристаллические агрегаты осадка. В тех же условиях, при ведении опытов на стеклянных пластинках (центральная капля $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1п, в желатине CaCl_2 0,08п) после высыхания желатины—через 30—35 часов, зернистый кристаллический осадок имеет ясно различимое

¹⁾ См. R. E. Liesegang: Chemische Reaktionen in Gallerten (Dresden, 1924).

²⁾ E. Küster: Ueber Zonenbildung in kolloidalen Medien (Jena, 1913).

³⁾ В. Оствальд: «Основы неорганической химии», стр. 522 (М. 1924).

периодическое распределение в виде довольно широких зон различной интенсивности (рис. 1). Напротив, замена CaCl_2 азотно-кислым кальцием не влияет на характер кольцеобразования ни с качественной, ни с количественной стороны. На рис. 2 засняты пробирки с системами, полученными в одних и тех же условиях, с тем лишь различием, что в пробирках а, б в желатине содержится CaCl_2 в конц. 0,015н, а в пробирках с, д— $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ в той же концентрации. Число колец и расстояния между ними тождественны.

В качестве среды для опытов в пробирках употребляется 3%-й раствор желатины, а для опытов на пластинках—8%-й. Желатина неизвестной немецкой фирмы и содержит Ca^+ и Cl^- ; для 3% раствора ее $\text{pH} = 5$ (приблизительно)¹⁾. Поэтому желатина очищается по возможности многократным промыванием в дистиллированной воде, а в случае необходимости очищение производится по Лебу²⁾.

Порядок опытов таков, что внутренним электролитом (содержащимся в желатине) служат всегда кальциевые соли, а внешним электролитом (диффундирующим в желатину) являются соли фосфорной кислоты. Обратный порядок не дает скольконибудь удовлетворительных результатов, так как концентрированный раствор CaCl_2 пептизирует желатину. При этом, при диффузии CaCl_2 в желатину с фосфатионом, осадок CaHPO_4 имеет размытую границу, что всегда служит внешним признаком условий, не способствующих образованию периодических осадков.

Самое явление протекает следующим образом. Желатина, содержащая Ca^+ , наливается в пробирку; через 3—12 ч. по застывании поверх нее наливается 2 к. см. раствора фосфата. Тотчас начинает образовываться осадок CaHPO_4 («пробка»), который по мере диффузии фосфата постепенно спускается вниз. При этом внешний край пробки, обращенный к жидкости, в процессе роста осадка видимо теряет в своей интенсивности: нижний край резко ограничен, и осадок в нем кажется более густым. Закончившая свой рост пробка полупрозрачна и одинаково интенсивна на всем протяжении. Рост ее прекращается, как только на некотором удалении от нижнего края пробки по стенкам пробирки намечается еле заметный мазок осадка, дающий начало первому слою. Слои растут от периферии к центру, имеют первоначально значительную (от 0,6 до 1,0 мм.) толщину и плоское очертание. В дальнейшем он принимает вид тонкой пленки, прогнутой соответственно мениску желатины.

¹⁾ pH определяется колориметрически по *W h e r r y*.

²⁾ *J. Loeb: Die Eiweisskörper und die Theorie der kolloidalen Erscheinungen (Berlin, 1924), 39.*

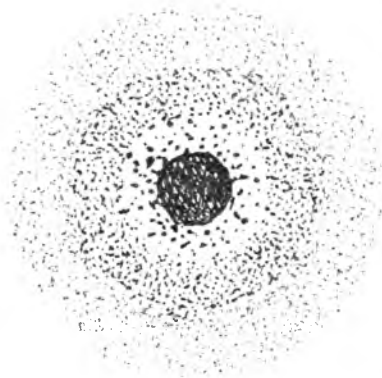
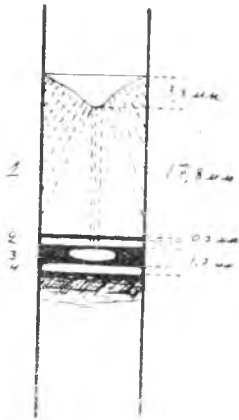


Рис. 1.



1 Трубка
24 Холщя 3 Диск

Рис. 3.

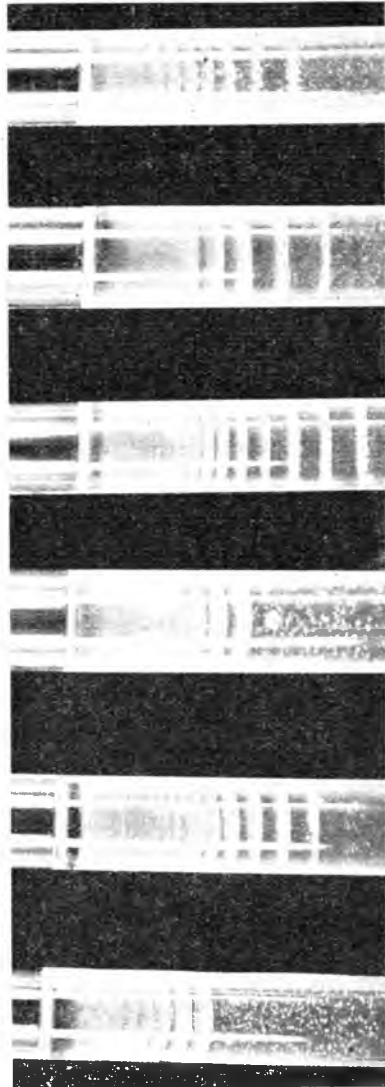


Рис. 2.

Надлежит заметить, что уплотнение слоя, аналогично пробке, идет по нижней его границе, т.е. в направлении диффузионного тока. Вслед за первым слоем образуется второй, третий и т.д., пока в прослойках не появятся кристаллические агрегаты осадка. Обычно они появляются между последними тремя слоями, более или менее нарушенными в своих очертаниях; дальше осадок уже выпадает исключительно в виде этих кристаллических агрегатов, не показывающих в своем распределении какой-либо периодичности.

Таким образом, после окончательного завершения процесса, для чего потребуется 30 — 60 час., система состоит из пробки, некоторого количества слоев в виде пленок, практически одинаковой толщины, и кристаллического осадка. Расстояния между слоями растут по мере удаления от мениска желатины, прогиб же их увеличивается в обратном порядке. В дальнейшем слои «перекристаллизовываются»; они становятся заметно сетчатыми.

Помимо типичных, сплошных слоев, а также слоев неполных, разорванных, — в некоторых случаях образуются так наз. «сатурновы кольца», которые, как сообщает К. Порр ¹⁾, были впервые наблюдаемы Е. Hatschek'ом. «Сатурновы кольца» — слои, состоящие из хорошо образованного на периферии кольца, внутри которого чуть ниже лежит диск из осадка. Эти кольца получаются сравнительно редко; появление в системе одного кольца обычно влечет за собой появление другого; ниже идут уже разорванные слои, и никогда не образуется сплошных. Возможное объяснение «сатурновых колец» можно видеть в том, что при соответствующем прогибе мениска желатины диффузионный ток внешнего электролита разделяется на два русла — центральный и боковой. Первое дает начало диску, второе — кольцу; между ними образуется зона, лишенная осадка, в результате и получается названная конфигурация. Правильность такого предположения подтверждается схематическим рис. 3, в котором точно соблюдены размеры одной из систем с «сатурновыми кольцами».

II. Количественные отношения.

Несомненно, что одним из основных условий, определяющих каждую систему периодических осадков с количественной стороны, является концентрация реагирующих электролитов. А так как в нашем случае замена CaCl_2 равным ему по степени диссоциации $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ не меняет количественных отношений в системе, в то время, как замена Na_2HPO_4 посредством $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ изменяет картину не только количественно,

¹⁾ К. Порр. Koll. Zeitschr., 36, 208 (1925).

но и качественно, то характер системы, очевидно, зависит от концентрации ионов реагирующих веществ. Эта зависимость довольно сложна. С одной стороны, как совершенно справедливо доказывает Вольфанг Оствальд ¹⁾, выпадение осадка вообще протекает в условиях, определяемых законом действующих масс; с другой стороны, от концентрации, по Фику, зависит скорость диффузии, и, наконец, концентрация же определяет степень дисперсности осадка, что, как нам кажется, имеет свое влияние на кольцеобразование. Раскрыть эту зависимость по суммарному эффекту не представляется возможным. Более или менее общим показателем ее является число, выражающее соотношение в концентрациях между внешним и внутренним электролитами ($l = \frac{c}{c_1}$). Так, для 3% желатины при 18° предельное значение $l = 8$. При $l < 8$ уже не происходит кольцеобразования. Это видно из приводимой таблицы и рис. 4.

Т а б л и ц а № 1.

| Концентрация внешн. электрол. С | Концентрация внутр. электрол. С ₁ | $l = \frac{c}{c_1}$ | Число колец (без пробки) $n = \frac{l}{k} + 1$ |
|---------------------------------|----------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------|
| 1 n | 0,0125n | 80 | 6 |
| 0,8 » | » | 64 | 5 |
| 0,6 » | » | 48 | 4 |
| 0,4 » | » | 32 | 3 |
| 0,2 » | » | 16 | 2 |

Само собой разумеется, что приведенная в последней графе формула общего числа колец в системе (не считая пробки) $n = \frac{l}{k} + 1$, где $k = 16$, соблюдается только в совершенно тождественных по внешним условиям сериях опытов. Тем не менее, она полезна для общего представления функциональной зависимости системы от имеющегося равновесия электролитов.

Зависимость между концентрациями электролитов, с одной стороны, и толщиной слоев, а также расстояниями между ними (прослойками)—с другой отмечалась многими исследователями. Для системы колец из CaHPO_4 , как уже указывалось, толщина отдельных слоев практически одинакова или, вернее, определение различия в толщине крайне затруднительно в силу незначительности толщины колец и их конфигурации (на фотографиях видна не самая толщина слоев, а их прогиб). Что касается расстояний между слоями, то измерение их приводит

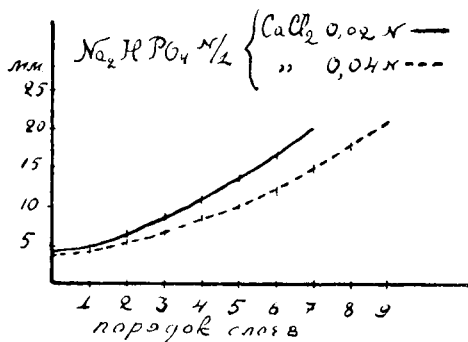
¹⁾ Wo. Ostwald, Zsigmondy-Festschrift (Kol. Zeitschr. 36., 380 (1925)).

к установлению несколько иной зависимости, чем это делает К. Рорр для системы $Mg(OH)_2$. Ряд серий опытов, из которых предлагаемая выбрана произвольно, приводят к данным:

Т а б л и ц а № 2.

Желатина=3%. Концентр. Na_2HPO_4 постоянна : $C=1$ п.

| Концентр. $CaCl_2$ C_1 | $l = \frac{c}{c_1}$ | Толщина пробки. | Расстояние колец от мениска желатины в мм. | | | | | | | | |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------------------|-----|-----|------|------|------|------|----|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 0,02 п | 50 | 4,5 | 4,8 | 6,7 | 8,8 | 11,2 | 14 | 17,2 | 20,6 | — | — |
| 0,04 » | 25 | 3,6 | 4 | 5,2 | 7 | 9 | 10,4 | 12,7 | 15 | 18 | 21,6 |
| 0,58 » | 12,5 | 2,6 | 3 | 4 | 5 | 6,4 | 8 | 9,7 | 11 | — | — |



Чертеж 1.

Эта таблица, а также и кривая к ней (черт. 1), устанавливают следующее положение: при постоянной концентрации внешнего электролита и уменьшении концентрации внутреннего, увеличиваются расстояния между кольцами. Или: чем больше значение для l , тем круче кривая расстояний между кольцами, если концентрация внешнего электролита постоянна.

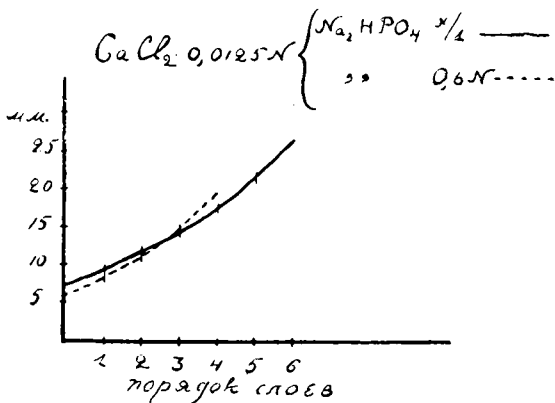
Обратная постановка опытов дает такие результаты:

Т а б л и ц а № 3.

Желатина = 3%. Концентр. $CaCl_2$ постоянна : $C_1 = 0,0125$ п.

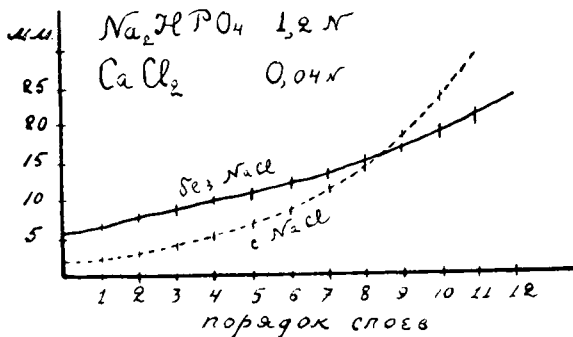
| Конц. Na_2HPO_4 C_1 | $l = \frac{c}{c_1}$ | Толщина пробки. | Расстояние колец от мениска желатины в мм. | | | | | |
|-------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------------------|------|------|------|------|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 п | 80 | 7 | 9,4 | 12 | 15 | 18,2 | 21,7 | 26,2 |
| 0,8 » | 64 | 6,8 | 9 | 11,8 | 15,1 | 18,5 | 22,1 | — |
| 0,6 » | 48 | 6,5 | 8,9 | 11,5 | 15 | 19 | — | — |
| 0,4 » | 32 | 5,6 | 8 | 11 | 14,6 | — | — | — |

Таким образом, при постоянной концентрации внутреннего электролита, уменьшение концентрации внешнего увеличивает расстояния между кольцами. В этом случае кривая расстояний (черт. 2) при уменьшении значения l становится круче.



Чертеж 2.

Не безынтересно отметить, что график 2 по своему характеру сходен с графиком действия $NaCl$ на расстояния между кольцами системы (черт. 3) в случае прибавления последней соли к желатине. Аналогия будет тем более законна, если рассматривать действие $NaCl$ на увеличение расстояний между кольцами, как результат вызываемого этим электролитом понижения степени диссоциации Na_2HPO_4 , другими словами—уменьшения активной массы внешнего электролита.



Чертеж 3.

III. Среда и кольцеобразование.

Получение периодических осадков в грубо дисперсных средах (напр., красивейшие кольца берлинской лазури в гипсе по J. Traube) естественно приводит к умалению значения среды для кольцеобразования. В опытах с CaHPO_4 , напротив, обнаруживается чрезвычайно важное значение ее, как качественное, так и количественное. Влияние концентрации желатины на $\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -систему в свое время исследовал Köhler¹⁾; некоторую зависимость между концентрацией желатины и кольцеобразованием для $\text{Mg}(\text{OH})_2$ устанавливает K. Popp²⁾.

Эта зависимость для CaHPO_4 совершенно определена и может быть формулирована так: для данной концентрации электролитов с повышением концентрации желатины уменьшаются число колец и расстояния между ними, при чем увеличивается тенденция осадка переходить в зернисто-кристаллический. Сказанное вытекает из таблицы и подтверждается рис. 5³⁾ и черт. 4.

Т а б л и ц а № 4.

NaHPO_4 в конц.=1 п; CaCl_2 в конц.=0,04 п; конц. желатины меняется.

| Концентр. желатины. | Толщина пробки. | Расстояние слоев от мениска в мм. | | | | | | |
|------------------------|--------------------|-----------------------------------|------|------|-------|------|------|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 2% | 6,5 | 7 | 8,5 | 10,3 | 12,6 | 15,4 | 19 | 23 |
| 3% | 6,3 | 6,8 | 8,3 | 10,5 | 12,7 | 15,2 | 18,3 | — |
| 4% | 6,5 | 6,8 | 8,1 | 9,7 | 11,6 | — | — | — |
| 5% | 6,5 | 6,7 | 8,3 | 9,9 | 11,7 | 14 | — | — |
| 6% | 6,5 | 6,7 | 8,2 | 9,7 | 11,6 | — | — | — |
| 8% | 6,2 | ? | ? | ? | — | — | — | — |
| 10% | 6,1 | ? | ? | ? | — | — | — | — |
| 15% | Кольц | не | обра | зу | ется. | | | |

Таким образом, для системы $l = \frac{1 \text{ п}}{0,04 \text{ п}}$ желатина в концентрации = 15% не дает колец Лизенганга. Осадок выпадает

¹⁾ Köhler. Koll. Zeitschr, 19, 65 (1925).

²⁾ K. Popp, loc. cit.

³⁾ Фотография представляет иную серию опытов, чем таблица и кривая.



Рис. 4.

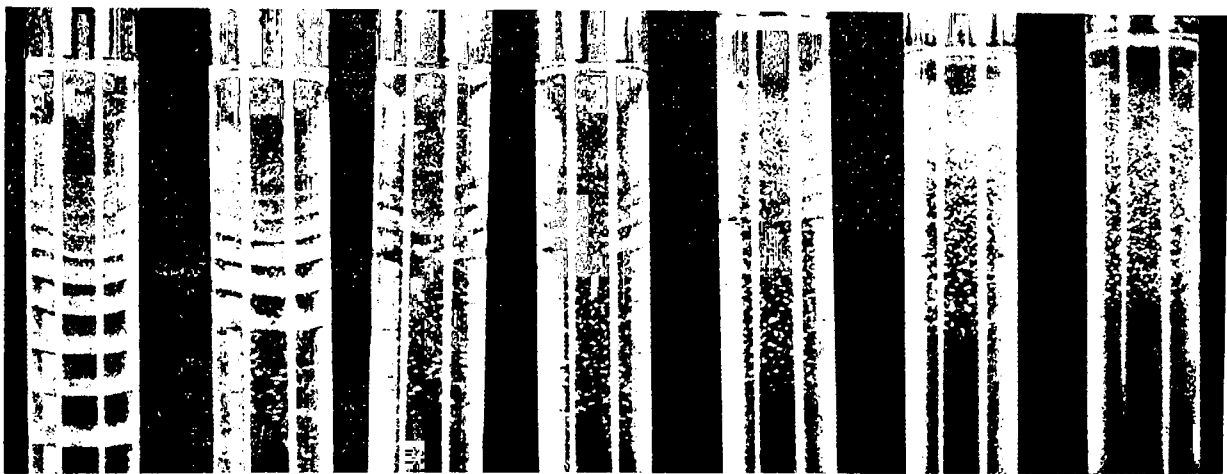
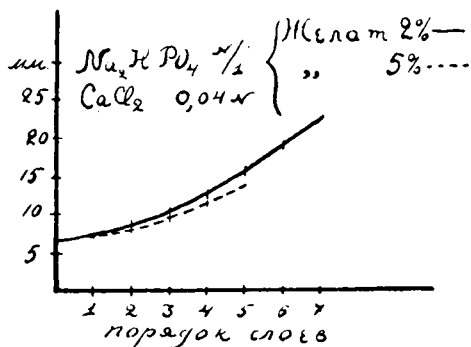


Рис. 5.

в виде крупных кристаллических агрегатов, без видимой ритмичности в распределении. N.R. Dhar и A. C. Chatterij ¹⁾ устанавливают относительно более сильное пептизирующее действие желатины на осадок по мере ее разбавления. Поэтому было бы естественно объяснить разбираемое явление с этой точки зрения. Однако, как находят указанные авторы, для $\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; 5% желатина не дает кольцевания в концентрациях



Чертеж 4.

внутреннего электролита от $\frac{n}{183}$ до $\frac{n}{250}$; в то же время кольца получаются при употреблении раствора ниже $\frac{N}{330}$. Аналогичная зависимость устанавливается и для CaHPO_4 . Отсюда очевидна связь между кольцеобразованием и скоростью диффузии внешнего электролита. Чем концентрированнее желатина, тем менее скорость кристаллизации осадка, тем менее степень его дисперсности (см. работы П. П. Веймарна). Концентрированная желатина для известных соотношений электролитов создает, наконец, такие условия, когда медленное выпадение осадка приводит к хорошо образованным кристаллическим агрегатам, не дающим в своем распределении видимой периодичности.

В агар-агаре концентрация среды влияет на качественную сторону явления. Как видно по рис. 6, в 0,5% агаре система электролитов CaHPO_4 дает типичные для большинства периодических осадков кольца, имеющие значительную толщину (до 5 мм.). Следовательно, вторичного уплотнения слоев, как это бывает в желатине, здесь не наблюдается. Увеличение же концентрации агара приводит к «двойной периодичности».

¹⁾ N. R. Dhar und A. C. Chatterij, Koll. Zeitschr., 37, 2 (1925).

В 1% агаре система состоит из чередующихся колец, из которых одно всегда тоньше другого, соседнего с ним. Сходная в известной степени картина иногда получается и в желатине в опытах, когда кольца вызываются действием внешнего электролита на предварительно пептизированный в желатине кристаллический осадок (на фотографии пробирка справа).

Попытки (недостаточно настойчивые) получить периодические осадки CaHPO_4 в песке и глицерине не дают положительных результатов.

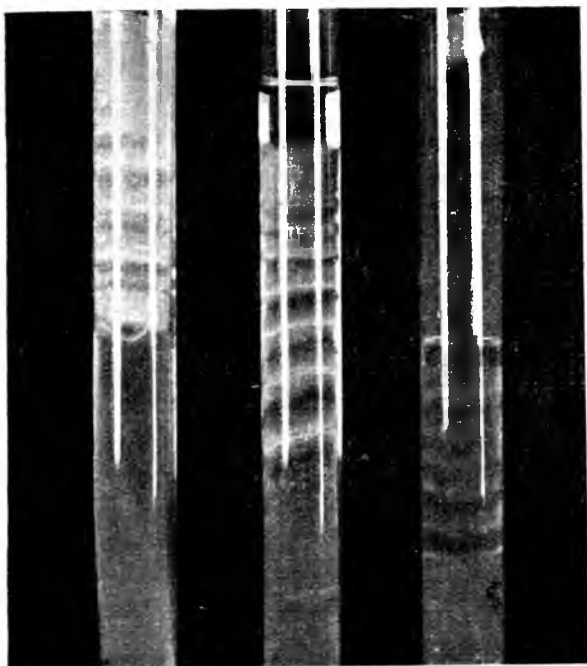


Рис. 6.

IV. Некоторые соображения по теории кольцеобразования.

Вольфганг Оствальд ¹⁾ развивает в высшей степени простую, методологически выдержанную и экспериментально обоснованную теорию колец Лизеганга. В отношении фосфорно-кальциевых периодических осадков эту теорию, как нам кажется, в особенности подтверждают: 1) постоянство количественной характеристики системы при замене CaCl_2 эквивалент-

¹⁾ W o. O s t w a l d, loc. cit.

ным раствором $(\text{CaNO}_3)_2$; 2) сходство графика действия NaCl с графиком, характеризующим изменение системы при уменьшении концентрации внешнего электролита; 3) зональность распределения кристаллического осадка на пластинке в результате реакции $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{CaCl}_2$. Последнее явление, описанное в начале статьи, с несомненностью доказывает наличие в желатине зон большей и меньшей растворимости осадка (максимум и минимум концентр. «реакционного электролита» по Оствальду — здесь NH_4Cl). Однако, теория В. Оствальда далеко не охватывает всей сложности явления. В самом деле, если явление сводится к интерференции диффузионных волн, то почему за пределами известной концентрации желатины (см. выше) CaHPO_4 не дает картины периодического осадка? Здесь выступает влияние среды, которую теория Оствальда рассматривает лишь как фактор, топографически определяющий место осадка в результате диффузионного распределения электролитов. Теория не затрагивает также вопроса о состоянии вещества в момент кольцеобразования, считая коагуляцию и адсорбцию вторичными факторами, именно постольку, поскольку они могут оказывать влияние на процессе в смысле закона действующих масс. В противовес этому, Dhar и Chatterij¹⁾ опубликовывают богатый материал, доказывающий золевое состояние вещества в момент образования осадка; они же строят свою теорию на основе явлений коагуляции и адсорбции.

Принимая определенную зависимость явления Лизе-ганга от характера состояния (степень дисперсности) вещества, можно объяснить значение концентрации среды, как это и сделано выше. Далее приводится ряд опытов, с несомненностью доказывающих пептизационное²⁾ действие желатины на осадок CaHPO_4 .

Опыт № 1. 10 к. см. $\text{CaCl}_2 \frac{n}{65}$ сливается с равным ему количеством эквивалентного Na_2HPO_4 . Получается золевой раствор, коагулирующий через 3—4 часа. После полного осаждения осадка в раствор вносится желатина из 3% расчета. Пробирка нагревается, и раствор желатины энергично в течение 10 мин. встряхивается с осадком. По застывании получается картина, не отличимая от обычного геля желатины. Действие внешнего электролита Na_2HPO_4 в конц. 1 п дает систему из 13 хорошо образованных колец (рис. 2, б), в то время как контрольный, проведенный обычным путем опыт дает систему из 5 колец (рис. 2, а).

¹⁾ N. R. Dhar und A. C. Chatterij, loc. cit.

²⁾ Очевидно, при участии содержащихся в желатине электролитов, от которых она абсолютно отмыта быть не может.

Опыт № 2. Условия те же, что и в № 1. Вместо CaCl_2 взят в той же концентрации $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Результаты изображены на рис. 2, с и d.

Опыт № 3. Раствор CaCl_2 в конц. 2 п осаждается избытком нормального раствора Na_2HPO_4 . Осадок отфильтровывается и промывается десятикратно под насосом. Немного полученной пасты CaHPO_4 вносится в 3% раствор желатины и энергично в течение получаса взбалтывается. Часть осадка отстаивается на дне. По застывании получается чуть мутный гель желатины. Диффузия внешнего электролита Na_2HPO_4 нормальной концентрации дает систему из 6 зернистых колец (рис. 2, f).

Опыт № 4. Условия опыта, как в № 3; пасты внесено меньше, гель прозрачный. Система из 4 колец (рис. 2, e).

Сходные явления получаются при пептизации мелко кристаллической пасты $\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Кольцеобразования вызываются диффузией AgNO_3 . При этом сильно сказывается действие света: кольца хорошо образуются лишь с освещенной стороны.

Пептизационное действие желатины падает по мере понижения ее кислотности. Тем не менее желатина, нейтрализованная по лакмусу, дает отчетливо все выше описанные явления.

Здесь следует заметить, что наиболее развитые системы колец CaHPO_4 получаются при употреблении внутреннего электролита CaCl_2 в концентрациях от $\frac{n}{60}$ до $\frac{n}{120}$. Это как раз те концентрации, в которых реагирующие соли дают при реакциях обмена в водной среде золевые растворы CaHPO_4 ¹⁾. Таким образом, процесс кольцеобразования следует представлять так, что в результате реакции между диффундирующими веществами образуется золь CaHPO_4 , в среде защитного коллоида (желатина, агар) значительно устойчивый. Однако, устойчивость его не настолько велика, чтобы не поддаваться действию «реакционного электролита» — в данном случае NaCl . В зонах, где концентрация его незначительна, происходят наиболее полно коагуляция и адсорбция — по схеме D h a r' a; здесь образуется слой. В зонах с высокой концентрацией «реакционного электролита» золь переходит в ионное состояние, и коагуляции и адсорбции не наблюдается; здесь находится прослойка, в которой выпадает иногда осадок в виде редко разбросанных кристаллических агрегатов. Наконец, когда соотношение между реагирующими электролитами таково, что концентрация CaHPO_4 недостаточна для достижения золевого состояния, то осадок выпадает в виде кристаллических агрегатов, так как явления коагуляции и адсорбции, как доказывает D h a r, в этих условиях крайне незначительны. В частности, такое соотношение

¹⁾ Б. Догадкин, Труды Гос. Тимирязевск. Ин-та, 1925 1, 38.

с самого начала процесса достигается в сильно концентрированной желатине и вообще в каждой системе вслед за образованием определенного числа колец.

V. Выводы.

1. Фосфорно-кальциевые кольца Лизеганга получаются в результате реакции: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{CaCl}_2 = \text{CaHPO}_4 + 2\text{NaCl}$, при чем внешним электролитом служит Na_2HPO_4 .

2. Замена CaCl_2 эквивалентным раствором $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ не изменяет ни качественно, ни количественно системы; при замене Na_2HPO_4 раствором $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ в пробирках не получается колец.

3. В конечном результате образуется система, состоящая из пробки и колец, в виде тонких пленок практически одинаковой толщины; наблюдаются так наз. «сатурновы кольца».

4. Количественная сторона явления зависит от соотношений между концентрациями электролитов. При уменьшении концентрации внешнего или внутреннего электролита, в случае постоянства концентрации соответственно другого компонента, увеличиваются расстояния между кольцами системы.

5. Расстояние между кольцами системы увеличивается от прибавления к желатине NaCl .

6. При увеличении концентрации желатины уменьшаются число и расстояния между кольцами. Для всяких концентраций электролитов есть предельная концентрация желатины, когда система не образует колец, и осадок выпадает в виде кристаллических агрегатов.

7. В концентрированном растворе агар-агара образуются кольца двойной периодичности.

8. Процесс колецобразования CaHPO_4 укладывается в основные положения теории Вольфганга Оствальда, с тем, однако, добавлением, что CaHPO_4 при реакции между диффундирующими веществами выпадает в виде золя, со свойственными ему явлениями коагуляции и адсорбции. Некоторые эксперименты подтверждают эту мысль.

Работа продолжается.

Folgerung.

1. Rhythmische Fällung von CaHPO_4 bildet sich in Reaktion $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{CaCl}_2 = \text{CaHPO}_4 + 2 \text{NaCl}$, wobei Na_2HPO_4 als Aussenelektrolyt fungiert.

2. Der Ersatz CaCl_2 durch Aequivalente Lösung von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ist qualitativ und quantitativ ohne Einfluss auf das System. Beim Ersatz Na_2HPO_4 durch $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ —bildet sich in Reagenzgläsern keine Schichtung.

3. Am Schlusse des Experiments bekommt man ein System aus Pfropfen und mehreren scheinbar gleicher Dünne Schichten bestehend. Man beobachtet dabei zuweilen die sogenannte Saturnringe.

4. Die Quantität der Erscheinung hängt vom Konzentrationverhältniss der Elektrolyten ab. Bei Konzentrationannahme des Aeusseren oder inneren Elektrolytes,—im Falle, wenn die Konzentration des entsprechenden anderen Komponentens konstant bleibt,—nimmt sich der Abstand der Schichten von einander zu.

5. Mit Zusatz zur Gelatine NaCl nimmt sich der Abstand der Schichten von einander zu.

6. Bei steigender Konzentration der Gelatine nimmt sich die Zahl der Schichten und deren Abstand von einander ab. Es gibt für jede Konzentration der Elektrolyten eine bestimmte Konzentration der Gelatine, wo das System keine Schichten mehr bildet und der Niederschlag fällt in Form von Kristallaggregaten aus.

7. In konzentrierten Agar-Agar Lösungen bilden sich die Schichten in verdoppelten Periodizität.

8. Rhythmische Fällung von CaHPO_4 erfolgt nach den Grundzügen der Theorie von Wo. Ostwald jedoch mit der Angabe, dass bei Reaktion diffundierender Stoffe CaHPO_4 in Form eines Sols mit ihm eigenen Erscheinungen der Koagulation und Adsorption niederschlägt.

Einige Experimente bestätigen diese Folgerung.

Weitere Untersuchung wird fortgesetzt.

Фракции белкового вещества фасоли

М. А. Лисицын

Изучение физико-химических свойств белка.

Фракции белкового вещества фасоли.

В изучении растительных протеинов с давних пор установлена общность характера их с белками животными (работы Beccari, Rouelle, Fourcroy, Vauquelin, Jordan, Cadet, Proust и др. См. Osborne: «The vegetable proteins»).

Einhof¹ нашел в семенах бобовых белковое вещество, впоследствии более подробно изученное Brasconnot², сходное во многом с казеином молока (легумин).

Позднее Liebig³ защищал взгляд, что такие белковые вещества, как легумин, фитовиттелин, конглутин или амандин, идентичны с животными белками: казеином, фибрином, ововиттелином и т. д. К подобному взгляду склонялись Mulder⁴), Moleschott, Gerhardt⁵ и др.

Позднейшие работы целого ряда исследователей, произведенные в направлении изучения растворимости и изучения продуктов глубокого распада белковых веществ, получаемых при гидролизе (аминокислоты), привели к обратным результатам: к разделению белков растительного и животного царств в особые группы, к глубокой индивидуализации белков и, как крайность, к представлению о существовании специфических для каждого организма видов белка (в доказательство последнего указывается на возможность получения различных по составу аминокислот продуктов в количестве 1.216.10¹⁷).

В попытках систематики полученного опытным путем материала была создана (еще Ritthausen'ом⁶) классификация белковых веществ, впоследствии дополненная и различно видоизмененная Abderhalden'ом⁷, Osborne'ом⁸ и др. авторами (в России—главным образом проф. Д. Н. Прянишниковым⁹). Взятые за основу классификации различия в растворимости и в условиях коагуляции белковых веществ, а впоследствии и различия в составе аминокислот^{*}), то-есть

^{*}) Не взирая на то, что полного анализа производить не удавалось, и выводы делались на основании исследования продуктов, составлявших 50—70% от общего количества белка.

в одном случае признаки мало характерные для суждения о химических различиях, а в другом—совершенно недостаточно изученные,—неоднократно вызывали возражения со стороны многих исследователей; однако, классификация, построенная на этих признаках, сохранилась, и, несмотря на частые противоречия с данными эксперимента, она приобрела широкое распространение. Не претендуя на абсолютное значение этой классификации, ее обычно приемлют, как рабочую схему, облегчающую дальнейшую работу по изучению белковых веществ. Однако, некоторые новейшие исследования не оправдывают ее и в этой роли и говорят за совершенную непригодность ее для систематического изучения белков.

Укажу на работы Herzfeld'a и Klinger'a ¹⁰, которые (относительно белков кровяной плазмы) показали, что существующие способы фракционировки отдельных белков ведут к ошибочным выводам, и недостаток этих способов заключается в том, что при разработке их не были учтены различия физического состояния белковых тел, различия, обуславливающие неодинаковое поведение отдельных фракций при высаливании, нагревании и т. д. Эти авторы находят, что альбумин, глобулин, псевдоглобулин и др. возможные фракции белкового вещества плазмы являются не различными белками, а различными только по степени дисперсности разновидностями одного и того же белка, и что различия, приписываемые этим фракциям, основаны на неоднородности получаемых при помощи существующих методов препаратов белка.

То же самое показано С. С. Перовым ¹¹ относительно белков молока на основании изучения кислотных свойств различных препаратов белка. В работах по изучению свойств казеина молока С. С. Перов показал (вопреки Osborne'y), что осаждаемое при подкислении раствора белковое вещество есть свободный белок, а не соль его с употребленной для осаждения кислотой (как это утверждал Osborne, l. c.). Новейшие работы J. Loeb'a ¹² с исключительной точностью доказывают этот факт (при соблюдении известных условий, именно при строго определенной концентрации водородных ионов в растворе). Затем, применяя статистический метод, С. С. Перов на множестве (300) препаратов казеина (различного происхождения) показал, что «число титрования» *) казеина равно 8,2, откуда эквивалентный вес его равен 1220. У других авторов находим такие «числа титрования» для казеина ¹³:

*) Количество кубич. см. $\frac{n}{10}$ NaOH, употребляемое для нейтрализации 1 гр. белка, растворенного в так наз. «естественном растворителе» (5 гр. K_2HPO_4 +1 гр. KCl +1 гр. $NaCl$ в 1 литре воды). Индикатор—фенол-фталеин; концентрация белка в растворе=1%.

Т а б л и ц а № 1.

| Год. | А В Т О Р. | Число титр. |
|------|----------------------------|-------------|
| 1891 | Courant | 9.5 |
| 1898 | Spiro и Pensel | 8.7—8.57 |
| 1903 | Laqueur и Sackur | 8.81 |
| 1906 | Long | 8.3 |
| 1914 | Robertson | 8.0 |

Из сопоставления этих чисел видно, что это величины одинакового (за исключением старых работ) порядка,—и только к трудности получения однородных и чистых препаратов белка следует отнести незначительные отклонения (Robertson успешно пользовался методом титрования для количественного определения казеина). Оказалось, что и другие фракции белкового вещества молока: альбумины и проч., будучи надлежащим образом очищены, титровались щелочью и давали то же число титрования, т. е. 8.2. На основании этого и ряда других сопоставлений, С. С. Перов делает вывод, что в молоке имеется один белок—казеиновая кислота,—а не ряд отдельных белков, относимых к различным группам классификации.

В дальнейших работах С. С. Перов¹⁴ получил препараты белка из овса, миндаля, пшеницы, гороха, которые так же, как и казеин, титровались щелочью, и числа титрования равнялись в среднем 8.2.

Заслуживает также внимания (в связи с этим) исследование Lieberkühn'ом¹⁵ щелочных альбуминатов яичного белка. В его анализах находим, что количество связанного белком $K_2O=5.44\%$, что отвечает $8.17 \text{ кб. см. } \frac{n}{10} \text{ КОН}$ на 1 гр. белка.

В связи с работами С. С. Перова я исследовал в том же направлении белок семян фасоли (*Faseolus vulgaris*). В своей работе я поступал следующим образом. Навеску (50 гр.) тонко измельченных семян фасоли выдерживал в течение суток для растворения солей в $250 \text{ кб. см. } \frac{n}{10}$ уксусной кислоты, после чего остаток отфильтровывал и отмывал водой от уксусной кислоты; промытый остаток настаивался в течение 2-х дней

(при частом взбалтывании) в 250 кб. см. $\frac{n}{20}$ NaOH; щелочной экстракт отфильтровывался, и при подкислении слабой уксусной кислотой осаждался белок. Осаждение производилось при рН раствора=4,5. Собранный на фильтре белок промывался дистиллированной водой, затем вновь растворялся в $\frac{n}{20}$ NaOH (в возможно малом количестве: обычно 1 гр. белка в 20 кб. см. щелочного раствора) и подкислением обратно осаждался. Такое повторное осаждение производилось 7 раз (способ Hammarsten'a для очистки казеина); наконец, осадок белка промывался водой, спиртом (сначала водным, затем постепенно более крепким и, наконец, абсолютным) и затем высушивался эфиром; остаток эфира удалялся в вакуум-эксикаторе. Таким образом получался препарат, лишенный дисперсионной среды, представляющий собой мелкий (проходящий через шелковое сито) снежно-белый порошок, нерастворимый в воде и в растворах поваренной соли, легко растворимый в слабых щелочах и кислотах, растворимый в «естественном растворителе» (5 гр. K_2HPO_4 +1 гр. KCl +1 гр. $NaCl$ в 1 литре воды), несколько труднее в уксуснокислом натре и салициловом натре. Однопроцентный раствор его в «естественном растворителе» титруется щелочью по фенол-фталеину; число титрования равно 8.22 (1). Препараты белка, недостаточно очищенные от примесей, плохо растворялись в «естественном растворителе» и давали числа титрования меньшие, иногда и бóльшие (мне приходилось наблюдать колебания в пределах 5.8—9.3); дальнейшим пересаживанием из них получались препараты с числом титрования уже близким к средней величине 8.2. Три отдельно полученных таким образом препарата имели числа титрования такие:

| | |
|---------|----------|
| I—8.22 | III—8.17 |
| II—8.16 | IV—8.23 |

При кипячении раствора белка в «естественном растворителе» — свертывание белка не происходит; наоборот, повышение температуры увеличивает растворимость. По своим свойствам этот продукт сильно отличается от «фазеолина» Осборна *) (растворимого в 10%-м и более слабых растворах $NaCl$ и не осаждаемого кислотами) и, подобно «легумину», является аналогом казеина.

С получением из семян фасоли «растительного казеина» — белка с ясно выраженной кислотностью, легко определяемой количественно путем алкалометрического титрования, возникал

*) Ср. различные характеристики «легумина» у Osborne (l. c.), Д. Н. Прянишникова¹⁶ и у М. А. Ракузина¹⁷. Последний рассматривает «легумин», как полный аналог казеина.

вопрос, как ведут себя по отношению к титрованию другие белки — так наз. «альбумины» и «глобулины». Обычно белки со стороны реакции характеризуются как амфотерные электролиты, в которых, однако, может преобладать основной или кислотный характер, при чем казенны (нуклеоальбумины) обладают ясно кислой реакцией, вытесняя CO_2 ; глобулины нейтральны или же слабо кислы; альбумины — нейтральны, или, скорее, в них преобладает основной характер (Osborne относит «фазеолин» к типу «глобулинов»). Нами был выделен из семян фасоли ряд препаратов белка с помощью различных способов выделения; очистка же препаратов всюду производилась описанным уже методом Hammarsten'a для казеина.

Получение «альбумина». 1. Навеска измельченных семян фасоли (50 гр.) настаивается в течение 2-х дней (при частом взбалтывании) в 250 куб. см. дистиллированной воды, экстракт отфильтровывается и подкисляется слабой уксусной кислотой до $\text{pH} = 4.5$. По отстаивании выпавшего осадка, последний собирается на фильтре, промывается дистиллированной водой, затем растворяется в возможно малом количестве $\frac{n}{10}$ NaOH, фильтруется и подкислением слабой уксусной кислотой (до $\text{pH} = 4.5$) опять осаждается. Такое переосаждение повторяется до 10 раз, после чего осажденный белок тщательно промывается водой и высушивается спиртом, затем эфиром. Сухой препарат легко растворяется в децинормальных NaOH, HCl, растворяется в естественном растворителе, в Na-ацетате, не растворяется в воде, растворах NaCl, в спирте. Его 1%-й раствор в «естественном растворителе» титруется щелочью, при чем для разных препаратов получены такие числа титрования (по фенолфталеину):

I 8.2; II 8.15; III 8.2; IV 8.2; V 8.05; VI 8.10; VII 8.25; VIII 8.20.

Таким образом, в отношении перечисленных свойств мы видим полную аналогию между препаратами белка, независимо от растворителя, которым он извлекался из семян, — была ли то щелочь или вода.

2. После отделения белка, коагулировавшего при подкислении водного экстракта, фильтрат нагревается до кипения, при чем оставшийся в растворе белок свертывается. Выпавший осадок собирается на фильтре, промывается водой, затем в течение суток выдерживается в децинормальной уксусной кислоте для растворения захваченных белком солей; после этого вновь промывается, растворяется в возможно малом (1 гр. белка в 10 куб. см.) объеме $\frac{n}{10}$ NaOH и подкисляется

слабой уксусной кислотой до $\text{pH} = 4.5$. Осадок после промывки повторно переосаждается несколько раз из раствора $\frac{n}{10}$ щелочи, наконец, тщательно промывается водой, спиртом и высушивается эфиром. Полученные препараты обладают теми же свойствами, что и ранее описанные, и числа титрования их получены следующие:

I 8.2; II 8.2; III 8.2.

Получение «глобулина». 50 грамм измельченных семян фасоли настаиваются два дня (при частом взбалтывании) в 250 кб. см. 10%-го раствора NaCl. Из экстракта при разбавлении водой и подкислении слабой уксусной кислотой до $\text{pH} = 4.5$ выпадает белок, который затем отфильтровывается, промывается дистиллированной водой, затем так же, как и в предыдущих случаях, несколько раз переосаждается из раствора децинормального едкого натра подкислением уксусной кислотой до изоэлектрического пункта и, наконец, промывается водой, спиртом и эфиром. Препараты белка обладают теми же свойствами, что и белки, выделенные из щелочной и водной вытяжек; числа титрования для этих препаратов найдены такие:

I 8.2; II 8.2; III 8.2; IV 8.1; V 8.08; VI 8.14; VII 8.15; VIII 8.2.

Аналогичными оказались препараты белка, выделенные нагреванием до кипения из раствора NaCl, после отделения выпавшего при подкислении осадка. Применением других растворителей: 1) «естественного растворителя» и 2) $\frac{n}{20}$ NaOH (в противоположность первому опыту — без предварительной обработки семян уксусной кислотой) получают препараты белка с теми же свойствами, что и ранее описанные. Порядок работы таков.

Извлечение «естеств. растворителем». Навеска (50 гр.) молотой фасоли в течение 2-х дней настаивается в 250 кб. см. «естественного растворителя»; экстракт после фильтрования подкисляется уксусной кислотой до $\text{pH} = 4.7 - 4.5$, осадок белка подвергается очистке по *Hammarsten*'у. Числа титрования для нескольких препаратов таковы:

I 8.05; II 8.25; III 8.14; IV 8.25; V 8.25; VI 8.25; VII 8.22; VIII 8.3.

Извлечение $\frac{n}{20}$ NaOH. 50 гр. молотой фасоли настаиваются в течение 2-х дней в 250 кб. см. $\frac{n}{20}$ NaOH;

отфильтрованный экстракт подкисляется уксусной кислотой до $pH = 4.7 - 4.5$; осадок очищается и высушивается по Hammarsten'у. Числа титрования полученных препаратов:

I 8.22; II 8.25; III 8.14; IV 8.10; V 8.2; VI 8; VII 8.05; VIII 8.15.

В следующей таблице сгруппированы числа титрования различных фракций белкового вещества фасоли.

Т а б л и ц а № 2.

| Препарат белка, полученный из: | pH при коагуляции. | Числа титрования. | | | | | | | |
|--------------------------------------------|--------------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII |
| Водной вытяжки: | | | | | | | | | |
| 1) подкислением | 4.5 | 8.2 | 8.15 | 8.2 | 8.2 | 8.05 | 8.10 | 8.25 | 8.2 |
| 2) нагреванием до кипения | — | 8.2 | 8.2 | 8.2 | — | — | — | — | — |
| Раствора в 10% NaCl | 4.5 | 8.2 | 8.2 | 8.2 | 8.1 | 8.08 | 8.14 | 8.15 | 8.2 |
| » в «естеств раств.» | 4.7—4.5 | 8.05 | 8.25 | 8.14 | 8.25 | 8.25 | 8.25 | 8.22 | 8.3 |
| » » $\frac{n}{20}$ NaOH | 4.7—4.5 | 8.22 | 8.25 | 8.14 | 8.10 | 8.2 | 8— | 8.05 | 8.15 |
| » » » » | | | | | | | | | |
| из семян, выдержан. в CH_3COOH | 4.5 | 8.2 | 8.2 | 8.15 | 8.2 | 8.15 | 8.25 | 8.2 | 8.2 |

Таким образом, все указанные фракции белкового вещества фасоли (в отличие от «фазеолина» Osborne'a, — нейтрального белка) представляют собою белки с ясно выраженными слабо кислыми свойствами и обладают при этом одинаковой кислотностью: 1 грамммолекула NaOH на 1220 гр. сухого белка, т.-е. точно так же, как и белковые вещества молока, миндаля, пшеницы, овса и гороха. В этом отношении не обнаруживается существенных различий как между «альбуминами», «глобулинами» и «нуклеоальбуминами», так и между белками, выделенными из различных растений или животных продуктов. В этом факте можно усматривать существенный классификационный признак, определяющий белок на основе стехиометрических реакций его, как соединение, обладающее ясно

выраженной кислотной функцией. Местонахождение «изоэлектрического пункта» у большинства белковых веществ также говорит в пользу отнесения белков к соединениям, преимущественно кислотного характера. Это следует из сопоставления изоэлектрических точек различных амфотерных веществ.

Т а б л и ц а № 3.

| | рН изоэлектрич. пункта. |
|----------------------------------------------|-------------------------------|
| Аспарагин. кислота | 3.6—3.8 |
| p — амино - бензойная кислота | 4.0 |
| o — » » » | 4.0 |
| m — » » » | 4.14 |
| Белки (желатина, казеин, альбумин и др.) . . | 4.5—4.7 |
| Мышьяковистая кислота | 5.2 |
| Лизин | 10.25 |
| Аргинин | 11 — |

Белки диссоциируют в растворе, как кислоты, при чем диссоциация их уменьшается при введении в раствор—кислоты, сильнее диссоциирующей, и почти совершенно прекращается при рН = 4.5 — 4.7. Тот факт, что изоэлектрические точки белков находятся почти при одинаковых рН (4.5 — 4.7), указывает на одинаковую диссоциацию их в растворах, титрование же белков, выделенных из фасоли, молока, овса и т. д.

(8.2 куб. сантиметров $\frac{n}{10}$ щелочи на 1 гр. белка), указывает на одинаковую общую кислотность их. Таким образом, в основных химических свойствах все эти белки близки между собой.

В целях идентификации полученных препаратов белка фасоли были произведены рефрактометрические определения. В качестве растворителя употреблялась смесь 5 гр. K_2HPO_4 + 1 гр. KCl + 1 гр. $NaCl$ в 1 литре воды. Показатель преломления ее $n_d^{18.5}$ равен 1.3350 (без погр.) рН 1% раствора белка в этом растворителе = ок. 6,5. По исследованиям Roberts-son'a¹⁸, удельная преломляющая способность вещества не

изменяется от pH; то же относится и к действию солей; Arnd и Hafner¹⁹ нашли, что удельн. рефракция не зависит и от степени дисперсности.

1%-е растворы белка фасоли имели такие показатели преломления:

Т а б л и ц а № 4.

| Белок получен из: | 18.5. n_d | Разность. |
|---------------------------------------|----------------|-----------|
| Водной вытяжки подкислением | 1.3375 | 0.0025 |
| » » нагреванием | 1.3373 | 0.0023 |
| 10% раствора NaCl | 1.3375 | 0.0025 |
| Естеств. растворителя | 1.3374 | 0.0024 |
| $\frac{n}{20}$ NaOH | 1.3376 | 0.0026 |

Близость и даже идентичность показателей преломления еще не говорит за тождество исследуемых объектов, как это можно видеть на следующем примере:

Т а б л и ц а № 5.

| В е щ е с т в о. | n |
|-----------------------------|--------|
| CaSO ₄ | 1.5696 |
| Изосафрол | 1.5693 |
| Антипирин | 1.5697 |

Но если два тела имеют различные показатели преломления, то эти тела различны. На этом основании Arnd и Hafner исключают всякую возможность идентичности альбуминов с глобулинами, так как в их работах и в работах Robertson'a—эти белки обладали различной рефракцией.

Т а б л и ц а № 6.

| Вещество. | Уд. ре- фракция. |
|--------------------------|---------------------|
| Серум глобулин | 0.00229 |
| » альбумин | 0.00117 |
| Ововиттелин | 0.00130 |
| Казеин | 0.00152 |
| Овомукоид | 0.00160 |
| Парануклеин | 0.00140 |

В наших препаратах белка фасоли таких различий обнаружено не было, как видно из таблицы 4-й.

Взаимные сравнения фракций белкового вещества фасоли, сопоставление их с другими белками, исследование составов их и определение физико-химических констант, — являющиеся темой дальнейшей работы, — дадут указания к разрешению вопроса: являются ли эти фракции различными веществами, или же они представляют собой один и тот же белок.



Résumé.

1. Die aus Bonensamen gewonnenen Eiweissstoffe wurden durch wiederholtes Ausfüllen (7—10 mal) aus einer $\frac{n}{10}$ NaOH Lösung mit schwacher CH_3COOH (bis $\text{pH} = 4'5$) gereinigt. Nach Entfernung des Dispersionsmittels und Auflösung im «natürlichen Lösungsmittel» (siehe Punkt 2, c.) wurden die so behandelten Eiweissstoffe mit Alkali in Gegenwart von Phenolphthalein wie Kasein titriert (8.2 c. cm. $\frac{n}{10}$ NaOH auf 1 gr. Eiweiss). Folglich, besitzen diese Eiweissstoffe eine ausgesprochene saure Reaktion.
 2. Das obengesagte bezieht sich egal zu allen Fraktionen des Eiweisses und ist vom Lösungsmittel, mit dem das Eiweiss extrahiert wurde, unabhängig. Es wurde mit folgenden Lösungsmitteln extrahiert:
 - a) destilliertes Wasser,
 - b) 10% NaCl Lösung,
 - c) «natürliches Lösungsmittel» (5 gr. K_2HPO_4 + 1 gr. KCl + 1 gr. NaCl im 1 l. Wasser),
 - d) $\frac{n}{20}$ NaOH.
 3. Alle oben aufgezählten Fraktionen besitzen dieselbe Löslichkeit und die Lösungen dieser Fraktionen weisen einen gleichen Brechungsindex auf.
 4. Die oben beschriebenen Eigenschaften stehen im Gegensatz zur Charakteristik der Eiweissstoffe, die in gegenwärtiger Klassifikation angenommen wird.
 5. «Die Titrierungszahl», welche das Eiweiss auf Grund seiner stochiometrischer Reaktionen charakterisiert, muss als ein wesentliches Klassifikationsmerkmal des Eiweisses angesehen werden.
-

Литература ¹⁾).

1. «Neues allgem. Journal d. Chemie u. Physik v. Gehlem», 6.126; 548.
2. «Ann. ch. phys.», [2] 34, p. 68; 43, p. 347.
3. «Ann. ch. phys.», [3] 6, p. 410; «Chem. Briefe», Leipzig; 1875; «Ann. Chem. Pharm.», 39, 5.129; L. Ann. 1841.
4. «J. pr. Chem.», 1, 296.
5. «Org. Chem.», 4. 461.
6. Die Eiweisskörper. Bonn, 1872.
7. Э. Абдергальден. Руководство по физиолог. химии, пер. Завьялова. 1913.
8. Th. Osborne. The vegetable proteins. London and N). 1909. «Biochem. Handlexikon», статья пер. L. Kautsch: «Die Proteine d. Pflanzenwelt».
9. «Известия Моск. С.-Х. Инст.», 1899. «Белк. вещества и их превращения в растениях».
10. «Bioch. Zeitschr.», 83. 42. 228. 1917.
11. «Труды Вологодск. Молочно-Хоз. Ин-та», т. II, вып. 1, бюлл. № 24: «О тождесамости белков».
12. «Die Eiweisskörper und die Theorie d. kolloidalen Erscheinungen». Berlin. J. Springer, 1924.
13. «Biochem. Handlexikon»—см. 8.
14. «Труды Тимирязевск. Института», сер. I, отд. I, вып. I.
15. «Pogg. Ann.», 86. 117, 298. 1852.
16. «Белковые вещества». Изд. Сабашниковых, 1926.
17. «Протеины растит. царства». Петроград, 1919. Н.Х.Т. Изд.
18. «Journ. of biol. Chem.», 7.359; 1909; 8.287; 441; 507; 1910, 9. 181, 1911. 11. 179, 1912. (цитир. по Arnd и Hafner ¹⁹⁾).
19. «Biochem. Zeitschr.», 167. 440. 1926.

¹⁾ 1, 2, 3, 4, 5, 15 цитированы по Н. Fehling: «Neues Handwörterbuch der Chemie». Braunschweig, 1875.

