

Účinok chlórovacího procesu na aminokyseliny a proteíny (II) Aktívny chlór vo vaječnom albumíne chlúrovanom za rôznych podmienok

J. VAŠÁTKO, I. STANKOVIČ

*Katedra chémie a technológie sacharidov a potravín Slovenskej vysokej školy technickej,
Bratislava*

Sleduje sa množstvo viazaného aktívneho chlóru vo vaječnom albumíne pri jeho chlorácii priamo v reakčnom prostredí za rôzneho pH, rôzneho pomeru chloračného činidla k albumínu a za rôznu dobu chlorácie. Stanovilo sa aj množstvo dusíka uvoľneného pri chlorácii albumínu za rovnakých podmienok. Z dosiahnutých výsledkov sa vypočítal mólový pomer viazaného aktívneho chlóru k dusíku.

V práci [1] sme opísali prípravu vaječného albumínu s obsahom aktívneho chlóru. Sledovali sme aj stabilitu aktívneho chlóru v závislosti od času a spôsobu uchovania chlúrovaného preparátu. V práci [2] sme sa zaoberali rozkladom aminokyselín a bielkovín pri ich chlorácii chlúrovou vodou a chlórnanom sodným, pričom sme rozlíšili celkovú oxidáciu a celkovú chloráciu albumínu.

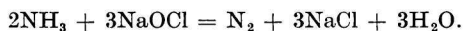
V predloženej práci študujeme tvorbu aktívneho chlóru viazaného s vaječným albumínom za podmienok uvedených v experimentálnej časti.

Experimentálna časť

Vykonalí sme chloráciu vaječného albumínu chlúrovou vodou a chlórnanom sodným pri pH 1,0; 5,0; 9,3 a 13,0 za rôzneho pomeru chlóru k albumínu a za rôznu dobu chlorácie vo vodnom prostredí.

Množstvo viazaného chlóru sme zistili z rozdielu celkového aktívneho chlóru, stanoveného jodometricky po pridaní vaječného albumínu do roztoku, a voľného aktívneho chlóru, stanoveného titráciou roztokom metyloranže.

Sledovali sme aj množstvo dusíka uvoľneného pôsobením HOCl a NaOCl na vaječný albumín, pričom reakciou proteínu s chloračným činidlom dochádza k dekarboxylácii a dezaminácii. Touto reakciou uvoľnený amoniak reaguje ďalej:



Uvoľnený dusík sme stanovovali preto, aby sme mohli presne počítať pomer viazaného aktívneho chlóru k dusíku, keďže je známe, že pôsobením chlóru na proteíny dochádza k zníženiu obsahu dusíka podľa uvedených reakcií [3, 4].

Reagencie

1. 0,01 % roztok vaječného albumínu vo vode; 2. 0,01 N-NaOCl; 3. 0,01 N-Na₂S₂O₃; 4. 0,01 N roztok metyloranže; 5. 0,1 N-HCl a 5 N-HCl; 6. Brittonov—Robinsonov tlmivý roztok o pH 5,0 a 9,3; 7. 0,1 N-NaOH; 8. 2 N-KOH; 9. roztok škrobu.

*Metodika***A. Stanovenie viazaného aktívneho chlôru**

Obsah viazaného aktívneho chlôru (tab. 1) a dusíka (tab. 2) sme stanovili v závislosti:

- a) od pH (1,0; 5,0; 9,3 a 13,0),
 b) od pomeru chloračného činidla k proteínu (pomer chlôru v chloračnom činidle k vaječnému albumínu 1 : 1, 5 : 1, 10 : 1),
 c) od doby pôsobenia chloračného činidla na albumín (po 5 min., 30 min., 1 hod. a 6 hod.).

Postup

Do 3,55 ml (resp. 1,42, 0,71 ml) 0,01 % vaječného albumínu rozpusteného vo vode sme pridali 30 ml 0,1 N-HCl (resp. 30 ml tlmivého roztoku o pH 5,0 a 9,3, resp. 30 ml

Tabuľka 1

Tvorba aktívneho chlôru na dusíku chloračiou vaječného albumínu v roztoku pri

a) pH 5,0; b) pH 9,3; c) pH 13,0

Roztok vaječného albumínu pH	Pôvodné množstvo		Váhový pomer ak- tívneho chlôru k va- ječnému albumínu	Doba chloračie	Úbytok aktívneho chlôru v roztoku		Množstvo viazaného aktívneho chlôru na dusíku		Pomer viazaného aktívneho chlôru k dusíku	
	vaječného albumínu mg	aktívneho chlôru mg			celkového %	voľného %	mg	%	váhový*	mólový*
a) 5,0	0,355	0,355	1 : 1	5 min.	12,0	30,0	0,0639	18,0	1,570 : 1	0,443 : 1
b) 9,3	0,355	0,355	1 : 1	5 min.	12,0	34,0	0,0781	22,0	1,886 : 1	0,532 : 1
c) 13,0	0,355	0,355	1 : 1	5 min.	7,0	17,0	0,0355	10,0	0,811 : 1	0,229 : 1
a) 5,0	0,355	0,355	1 : 1	30 min.	17,0	34,0	0,0603	17,0	1,578 : 1	0,445 : 1
b) 9,3	0,355	0,355	1 : 1	30 min.	25,0	40,0	0,0532	15,0	1,359 : 1	0,365 : 1
c) 13,0	0,355	0,355	1 : 1	30 min.	14,0	39,0	0,0532	15,0	1,249 : 1	0,352 : 1
a) 5,0	0,355	0,355	1 : 1	1 hod.	21,0	39,0	0,0639	18,0	1,693 : 1	0,477 : 1
b) 9,3	0,355	0,355	1 : 1	1 hod.	29,0	49,0	0,0710	20,0	1,839 : 1	0,519 : 1
c) 13,0	0,355	0,355	1 : 1	1 hod.	21,0	41,0	0,0710	20,0	1,655 : 1	0,467 : 1
a) 5,0	0,355	0,355	1 : 1	6 hod.	23,0	54,0	0,1100	31,0	2,941 : 1	0,829 : 1
b) 9,3	0,355	0,355	1 : 1	6 hod.	57,0	94,0	0,1313	37,0	3,410 : 1	0,962 : 1
c) 13,0	0,355	0,355	1 : 1	6 hod.	33,0	74,0	0,1455	40,0	3,329 : 1	0,939 : 1
a) 5,0	0,142	0,709	5 : 1	6 hod.	5,5	8,0	0,0177	2,5	1,372 : 1	0,387 : 1
b) 9,3	0,142	0,709	5 : 1	6 hod.	16,5	28,0	0,0816	11,5	6,425 : 1	1,812 : 1
c) 13,0	0,142	0,709	5 : 1	6 hod.	8,5	21,5	0,0923	13,0	6,279 : 1	1,771 : 1
a) 5,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
b) 9,3	0,071	0,709	10 : 1	6 hod.	13,0	18,5	0,0390	5,5	6,393 : 1	1,803 : 1
c) 13,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* Počítané s ohľadom na korigované množstvo dusíka uvoľneného pri chlôrovaní.

Tabuľka 2

Ubúdanie obsahu dusíka chloráciou vaječného albumínu pri rôznom pH roztoku

Pôvodné množstvo		Váhový pomer aktívneho chlóru k vaječnému albumínu	Doba chlorácie	Ubúdanie dusíka v % pri pH roztoku		
vaječného albumínu mg	aktívneho chlóru mg			5,0	9,3	13,0
14	14	1 1	5 min.	12,0	10,3	5,2
14	14	1 1	30 min.	17,4	15,2	7,7
14	14	1 1	1 hod.	18,2	16,4	7,0
14	14	1 1	6 hod.	19,0	16,7	5,3
3	15	5 : 1	5 min.	15,2	19,2	6,1
3	15	5 1	30 min.	23,6	27,6	11,7
3	15	5 1	1 hod.	28,2	30,0	13,6
3	15	5 : 1	6 hod.	29,3	30,2	19,0
1,5	15	10 : 1	5 min.	—	23,1	—
1,5	15	10 1	30 min.	—	30,9	—
1,5	15	10 : 1	1 hod.	—	32,8	—
1,5	15	10 : 1	6 hod.	—	33,0	—

0,1 N-NaOH o pH 13,0 v závislosti od pH skúmaného roztoku). Ďalej sme pridali 1 ml (resp. 2 ml) 0,01 N-NaOCl. Reakciu sme nechali prebiehať pri laboratórnej teplote a po 5 minútach, 30 minútach, 1 hodine a 6 hodinách sme odoberali vzorky, z ktorých sme viazaný aktívny chlór určovali takto:

a) množstvo celkového aktívneho chlóru sme stanovili jodometricky, t. j. titráciou jódu vylúčeného z jodidu draselného 0,01 N- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$,

b) množstvo voľného aktívneho chlóru sme stanovili 0,01 N roztokom metyloranže titračne po úprave pH roztokom 5 N-HCl približne na 2,5–3.

Rozdiel hodnôt uvedených dvoch stanovení aktívneho chlóru udáva množstvo viazaného aktívneho chlóru.

Z množstva viazaného aktívneho chlóru sme ďalej vypočítali pomer chlóru k dusíku, korigovaného o hodnoty dusíka odštiepeného pri chlorácii.

B. Stanovenie ubúdania dusíka pri chlorácii vaječného albumínu

Úbytok dusíka pri chlorácii vaječného albumínu sme stanovili manometricky Warburgovým prístrojom meraním uvoľneného plynného dusíka. Súčasne sme uvoľňujúci sa kyslíčnik uhličitý eliminovali pridaním 2 N-KOH do stredného komínčeka manometricky.

kých baniek. V jednotlivých pokusoch sme v príslušných časových intervaloch odčítali objem uvoľneného plynu. Získané výsledky sú aritmetickým priemerom z troch paralelných stanovení.

Diskusia

Z údajov v tab. 1 a 2 vidieť, že po pridaní chloračného činidla do roztoku vaječného albumínu dochádza k rozkladu albumínu, ktorý závisí od času pôsobenia chloračného činidla a jeho pomeru k albumínu, pričom množstvo viazaného aktívneho chlóru sa takmer nemení. Pri pH 5,0 a 9,3 (tab. 1 ad *a*, *b*) pozorovať po 30 minútach pokles množstva viazaného aktívneho chlóru v porovnaní s množstvom viazaného aktívneho chlóru po 5 minútach (tab. 1 ad *b*).

Vplyv zloženia reakčnej sústavy na množstvo viazaného aktívneho chlóru vidieť z toho, že pri pomere chloračného činidla k albumínu 5 : 1 je množstvo viazaného aktívneho chlóru nižšie než pri pomere 1 : 1 pri pH 5,0 po 6 hodínovej chlorácii.

Pri skúmaní vplyvu pH na množstvo celkového aktívneho chlóru po pridaní vaječného albumínu sme zistili, že jeho zníženie je najvyššie pri pH 9,3. Pri pH 5,0 a 13,0 je približne rovnaké. Možno tiež predpokladať, že rozklad vaječného albumínu pri pH 9,3 je najhlbší. Potvrďuje to aj skutočnosť, že pokles voľného aktívneho chlóru je pri týchto podmienkach najvyšší.

Množstvo viazaného aktívneho chlóru pri chlorácii vaječného albumínu je pri pH 9,3 a 13,0 približne rovnaké.

Stanovenie voľného aktívneho chlóru titráciou roztokom metyloranže je nevyhnutné vykonať pri nízkych koncentráciách vaječného albumínu a chloračného činidla, pretože pri vyšších koncentráciách dochádza k intenzívnejšiemu unikaniu chlóru a paralelné pokusy sú neporovnateľné.

Stanovenie viazaného aktívneho chlóru nemožno uskutočniť pri pH 1,0, pretože počas reagovania, ako aj v priebehu titrácie voľného aktívneho chlóru roztokom metyloranže dochádza k intenzívnejšiemu unikaniu chlóru a paralelné pokusy sú neporovnateľné.

Pri skúmaní vplyvu chloračného činidla na uvoľňovanie plynného dusíka z vaječného albumínu v závislosti od pH, doby chlorácie a pomeru chlóru k albumínu sme zistili, že tvorba dusíka pri pH 5,0 a 9,3 je vyššia než pri pH 13,0. Z tab. 2 vyplýva, že uvoľňovanie dusíka pri pH 5,0 a 9,3 po polhodine sa značne spomaľuje.

Pri meraní množstva uvoľneného plynu pôsobením NaOCl na vaječný albumín pri pH 13,0 a pri pomere chloračného činidla k albumínu 1:1 sa po jednej hodine množstvo uvoľneného plynu znižuje. Vysvetľujeme to tým, že po dezaminácii albumínu, t. j. po odštiepení NH_3 dochádza k jeho intenzív-

nejšiemu unikaniu z alkalického prostredia, a preto sa uvoľňuje zmes NH_3 a N_2 . V takomto prípade však ide o väčšie množstvo uvoľneného plynu, pretože v roztoku neprebíha uvedená reakcia, ktorá má za následok, že z 2 mólov NH_3 sa uvoľní len 1 mól N_2 . Na rozhraní kvapalnej a plynnej fázy dochádza však k pomalej reakcii NH_3 s NaOCl v roztoku. To má za následok zníženie množstva plynu. Pri pomere chloračného činidla k albumínu 5 : 1 však už dochádza k rýchlejšiemu priebehu reakcie NH_3 s NaOCl za uvoľnenia N_2 .

Amoniak uvoľňujúci sa z kvapalného prostredia pri pôsobení NaOCl na vaječný albumín pri pH 13,0 sme skutočne aj kvalitatívne dokázali Nesslerovým činidlom.

Pri chlorácii rozličných proteínov chlórovou vodou pozoroval M. J. Taras [5] malé zníženie dusíka v chlórovanom produkte. Môžeme to očakávať aj v našom prípade pri chlorácii vaječného albumínu kyselinou chlórnu pri pH 1,0, ktorá sa najviac ponáša na chloráciu proteínov chlórovou vodou. Uvoľnený dusík nemožno manometricky stanoviť, keďže plyný chlór, ktorý zvyšuje objem uvoľneného plynu, z prostredia rýchle vyprchá a nestačí zreagovať s vaječným albumínom.

Z tab. 1 vidieť, že pri pH 9,3 a 13,0 sa zvyšovaním pomeru chloračného činidla k albumínu množstvo viazaného aktívneho chlóru nezvýši, pri pH 5,0 sa zníži.

Z experimentálnych výsledkov vyplýva, že optimálne pH za účelom dosiahnutia maximálneho množstva viazaného aktívneho chlóru pri chlorácii vaječného albumínu je v alkalickom prostredí. Získanie vaječného albumínu s maximálnym množstvom aktívneho chlóru je však najefektívnejšie pri zadržaní chlóru do vodného roztoku vaječného albumínu v kyslom prostredí. Pri chlorácii sa totiž vylúči nerozpustný chlórovaný produkt, ktorý možno veľmi ľahko izolovať z vodného prostredia obyčajnou filtráciou a premývaním [1]. Pri chlorácii vaječného albumínu v alkalickom prostredí sa však nezíska tuhý produkt, pretože chlórovaný vaječný albumín je v alkalickom prostredí dobre rozpustný.

ДЕЙСТВИЕ ХЛОРИРОВАНИЯ НА АМИНОКИСЛОТЫ И ПРОТЕИНЫ (II) СВЯЗЬ ХЛОРА В ЯИЧНОМ АЛЬБУМИНЕ ХЛОРИРОВАННОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

Й. Вашатко, Л. Станкович

Кафедра химии и технологии сахаридов и пищевых продуктов Словацкого политехнического института, Братислава

Искались оптимальные условия образования активного хлора при хлорировании яичного альбумина в растворе при различных приведенных условиях. Определилось, что оптимальное соотношение соединенного активного хлора и азота достиглось хлори-

рованием яичного альбумина при pH 9,3 и 13,0 после 6-ти часового хлорирования субстрата, при весовом соотношении хлора к субстрату 5 : 1. Достиглось мольного соотношения хлора к субстрату 1,8 : 1.

В щелочной среде полученный продукт содержит высшее количество активного хлора, но в этой среде он в значительной мере растворяется. Поэтому выгоднее проводить хлорирование в кислой среде, где получается твердый, в реакционной среде нерастворимый продукт, который можно легко изолировать.

Preložil M. Fedoroňko

ÜBER DIE WIRKUNG DES CHLORIERUNGSPROZESSES AUF AMINOSÄUREN UND PROTEINE (II) BINDUNG DES CHLORS IM UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN CHLORIERTEN EIERALBUMIN

J. Vašátko, L. Stankovič

Lehrstuhl für Chemie und Technologie der Saccharide und Lebensmittel
an der Slowakischen Technischen Hochschule, Bratislava

Es wurde die optimalen Bildungsbedingungen des aktiven Chlors untersucht, u. zw. bei der Chlorierung des Eieralbumins in Lösung. Es konnte festgestellt werden, daß das optimale Verhältnis des gebundenen aktiven Chlors zum Stickstoff durch eine Chlorierung des Eieralbumins bei pH 9,3 und 13,0 erreicht wurde, u. zw. nach sechsständiger Chlorierung des Substrats bei einem Gewichtsverhältnis des Chlors zum Substrat von 5 : 1. Das erzielte Molverhältnis des Chlors zum Substrat betrug 1,8 : 1.

Im alkalischen Milieu wird zwar ein höherer Gehalt des aktiven Chlors erreicht, doch ist die Löslichkeit des Produktes ziemlich groß. Es ist deshalb die Chlorierung im sauren Medium vorteilhafter, da in diesem Falle ein festes, im Reaktionsmilieu unlösliches und leicht isolierbares Produkt entsteht.

Preložil M. Liška

LITERATÚRA

1. Vašátko J., Stankovič L., *Chem. zvesti* **13**, 817 (1959).
2. Stankovič L., Vašátko J., *Chem. zvesti* **14**, 434 (1960).
3. Herken H., Schunk J., *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **215**, 102 (1952).
4. Bartmann K., Gehrman K., Remmer H., *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **215**, 433 (1952).
5. Taras M. J., *Am. Water Works Assoc.* **45**, 47 (1953).

Do redakcie došlo 7. 9. 1965

Adresa autorov:

*Akademik Jozef Vašátko, DrSc., Katedra chémie a technológie sacharidov a potravín
SVŠT, Bratislava, Jánska 1.*

Prom. chem. Ľudovít Stankovič, Chemický ústav SAV, Bratislava, Dúbravská cesta.