

Hazai búzák lipoproteinjeinek vizsgálata III. A purotionin tisztítása és frakcióinak vizsgálata

B É K É S F E R E N C

Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Erkezett: 1975. november 17

Lásztity és mtsai-nak (1) eredményei igazolták, hogy a magyar búzalisztekből is izolálható a *Balls és Hale* (2) nyomán *purotioninnak* nevezett különös aminosavösszetételű, kismolekulasúlyú fehérje, amelyet az elsőként izolált búzaliporotein fehérjekomponensének tekinthetünk. Előző közleményünkben (3) részletesen ismertettük a purotionin előállításával kapcsolatos vizsgálataink eredményeit, megállapítva, hogy a viszonylag nagyszámú purotioninnal foglalkozó közlemény ellenére az anyag izolálásának metodikai kérdései nem tekinthetők tisztázottnak. Vizsgálataink kiterjedtek a búzaliszt petroleteres extrakciójának mennyiségi követésére és a szteroidmentesített lipidextrakt sósavas hasításának vizsgálatára, amely kísérletek nyomán egy, viszonylag könnyen végrehajtható, tiszta terméket adó izolálási módszert írtunk le.

Jelen közleményben a purotionin tisztításának és a tisztított termék egyes tulajdonságainak vizsgálatát célzó kísérletekről számolok be.

Anyagok és módszerek

A vizsgálatokat előző közleményünk (3) alapján előállított nyers purotioninból végeztem.

A purotionin tisztítása

A purotionin tisztításáról eddig közölt adatokból körülbelül ugyanazon kép szűrhető le, mint az izolálás irodalmi hivatkozásairól. A kutatók többé-kevésbé követve a BALLS által leírtakat, annak részletes elemzését nem végezték el, így igen kevés a közölt mennyiségi adatok száma, az egyes tisztítási lépések során szennyezésként elkülönített anyag vizsgálatára nem került sor. A tisztítási eljárásokat két csoportba oszthatjuk:

- alkohol-víz rendszerrel végzett ismételt oldószeres tisztítás (2)
- metanol-víz-kloroform rendszerrel végzett oldószeres tisztítás (4)

Kísérleteim során e két módszer kombinációját alkalmaztam az alábbiak szerint:

1000 mg nyers purotionint (t_0) 100 cm³ vízben oldottam, majd a lehűtött oldathoz 135 cm³ absz. alkoholt adtam. Az opalizáló oldatot egy éjszakán át -5°C-on tartottam, majd MOM 120-as típusú ultracentrifugán preparatív rotorban centrifugáltam -7°C-on, 35000/perc fordulatszámon 45 percig. A centrifuga-csővek falán 41,5 mg halványsárga csapadék ülepedett ki (t_1), a tükrösen

tiszta oldat bepárlásával (vákuumszáritószekrényben 35°C-on) 871 mg egyszer tisztított puotionint nyertem (t_2). t_2 -anyagot 15 cm³ deszt. vízben oldottam 100 cm³ absz. alkoholt adtam hozzá, a fenti körülmények között tárolva, majd ultracentrifugálva 31,9 mg csapadékot (t_3), majd az oldat bepárlása után 716,2 mg kétszer tisztított puotionint kaptam (t_4).

t_4 -et 60 cm³ kloroform-metanol (1:1) arányú elegyében oldottam, majd anynyi deszt. vizet adtam az oldathoz, hogy a keletkező kétfázisú rendszer összetétele kloroform-metanol-víz (1:1:0,9) legyen. A tejszerű emulzió egy éjszakán át hűtőszekrényben tárolva két fázisra vált szét, illetve a felső és alsó fázis között egy tejszerű határreteget is meg lehetett figyelni. A felső fázist óvatosan leszivtam, a maradékhoz 5 cm³ kloroform-metanol-víz (1:1:0,9) rendszer felső fázisát adagoltam kis részletekben, óvatos rázogatás közben. Az újra tejszerűvé váló emulziót 1 órán át 8000/perc fordulatszámon centrifugáltam, amikor is a fentiekhez hasonlóan két fázist és határfázist nyertem. A felső fázist leszivtatva és a térfogatot kiegészítve a tisztítást még kétszer megismételtem. Végül az egyesített felsőfázist (t_7), az alsó fázist (t_6), illetve a határfázist (t_5) bepárlásával megkaptam a tisztított puotionint, illetve az utolsó lépés során eltávolítható szennyezéseket.

A tisztítás során nyert valamennyi anyagnak meghatároztam a foszfortartalmát *Bartlett* módszerével (5), illetve a biuret-reakcióval fehérjepozitívnak mutakozó anyagoknak meghatároztam a nitrogéntartalmát, bruttó aminosavösszetételüket, valamint molekulaméret szerint frakcionálhatóságukat.

A tisztított puotionin molekulaméret szerinti frakcionálása

A puotionin molekulaméret szerint: frakcionálását Sephadex G-75-ön történő gélszűréssel végeztem el. Több eluensrendszer kipróbálása után a következő összetételű eluent találtam a legalkalmasabbnak: 0,05 M ecetsav + 0,1 M KCl vizes oldata

A molekulaméret szerinti egységes frakciók nyeréséhez kétszeri rekromatografálásra volt szükség. Először egy 3,8 cm belső átmérőjű, 42 cm magas kolonnán preparatív előfrakcionálást végeztem, majd az így kapott frakciókat rekromatografáltam 22 cm magas, 2,2 cm átmérőjű kolonnán (a preparatív oszlop V_0 -ja 130 cm³, a kisoszlopé 27 cm³ volt). A gélszűrés követése, illetve a frakciók szedése LKB Uvicord készülékkel történt. Az egységes molekulaméret ellenőrzésére ultracentrifugás homogenitásvizsgálatokat végeztem.

Ultracentrifugás vizsgálatok

Az ultracentrifugás analíziseket MOM 120-as készülékkel végeztem. A homogenitásvizsgálatok mellett meghatároztam a gélszűréssel kapott frakciók nulla koncentrációra extrapolált szedimentációs állandóját és molekulásúlyát. Ezen kísérletek eredményeit más helyen publikáltuk (6). A homogenitásvizsgálatoknál 16–40 000/perc fordulatszámon dolgoztunk, a vizsgálatokat Schlieren optikával követtük.

Bruttó aminosav-összetétel meghatározása

A molekulaméret szerint egységes frakciók, valamint a tisztítás során keletkezett fehérjetartalmú szennyezések bruttó aminosav összetételének meghatározása – a minták sósavas hidrolizisét követően – AAA 881-es típusú, cseh-szlovák gyártmányú, automatikus aminosavanalizátorral történt. Az elválasztásoknál 0,9×54 cm-es AMINEX A6-töltetű oszlopokat használtunk, az alkalmasított pufferek *Dévényi* (7) hárompufferváltásos, egyoszlopos technika *Wöller* (8) által módosított pufferei voltak. A triptofán meghatározásához bázikus hidrolizist és „Fixionos vékonyrétegekromatográfiás vizsgálatot végeztem (9).

E R E D M É N Y E K

A háromlépéses oldószeres tisztítás adatait az 1. táblázatban foglaltam össze.

A purotionin oldószeres tisztításának adatai

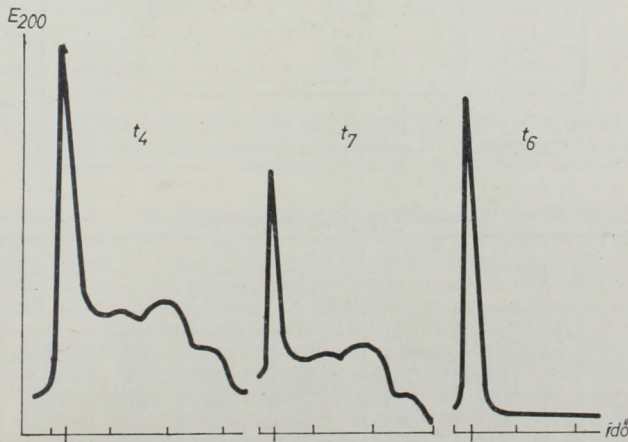
1. táblázat

Minta jele	Minta megnevezése	1000 g nyers purotioninból kapott anyag (g)	Kitermelés (%)	Foszfortartalom (%)
t_0	Nyers purotionin	1000	(100)	0,17
t_1	I. tisztítási lépés szennyezése	41,5		0,42
t_2	1× tisztított purotionin	871,0	87,1	0,09
t_3	II. tisztítási lépés szennyezése	31,9		0,13
t_4	2× tisztított purotionin	716,2	71,6	0,04
t_5	III. tisztított lépés határfázis	18,5		0,17
t_6	III. tisztított alsó határfázis	190,7		0,20
t_7	tisztított purotionin	504,7	50,5	< 0,01

A szennyezésként eltávolított anyagok közül a t_6 -jelzésű biuretreakcióval fehérjepozitívnak mutatkozott. Az 1. ábra a kétszer tisztított (t_4), a háromszor tisztított (t_7) purotionin, valamint a fehérjének mutató t_3 -szennyezés eluciós görbéit mutatja be.

A 2. ábra a tisztított purotionin rekromatografálással kapott eluciós görbét mutatja be. (Az ábrán látható római számos frakciójelöléseket az elkövetkezőkben következetesen használom.)

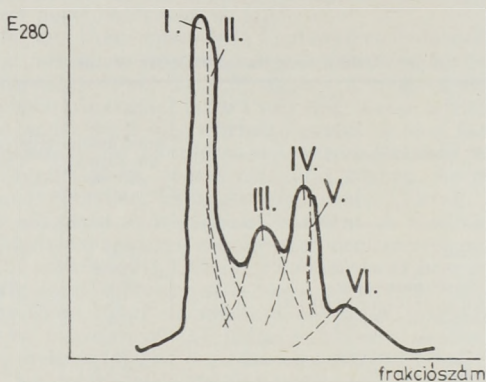
A 2. táblázat a géliszűréssel elkülönített frakciók mennyiségeit és az eluciós térfogat alapján számított közelítő molekulásúly-értékeket tünteti fel.



1. ábra

A purotionintisztítás egyes intermedierjeinek eluciós görbéi Sephadex G-75-ös oszlopon

Frakcionálás Sephadex
G-75 oszlopon



2. ábra
Purotionin frakcionálása Sephadex G-75-ös oszlopon

2. táblázat

A tisztított purotionin frakcióeloszlása és a molekulaméret szerint
egységes frakciók molekulásúlya

Frakció jele	Közelítő molekulásúly	Mennyiség (%) g/g tisztított purotionin
I.	132 000	32
II.	125 000	10
III.	32 000	20
IV.	11 200	23
V.	6 900	7
VI.	4 200	8

A 3. táblázat a tisztított purotionin molekulaméret szerint egységes frakcióinak és a t_6 „szennyezés” bruttó aminosavösszetételét tartalmazza.

A purotionin frakciók aminosavösszetétele

3. táblázat

Frakciók jele	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	t_6
	g aminosav/100 g fehérje						
ASP	9,13	7,70	8,21	6,69	6,78	4,31	8,34
THR	7,68	9,54	6,00	4,50	4,65	8,88	1,23
SER	3,56	6,41	7,09	7,33	7,31	8,30	4,54
GLU	10,09	9,13	11,60	3,03	3,07	5,80	0,10
PRO	1,87	3,10	3,80	4,45	4,65	5,86	1,59
GLY	4,98	5,00	5,20	6,53	3,70	5,54	4,93
ALA	4,13	4,54	5,50	5,08	3,15	2,98	6,27
CYS	6,60	5,05	6,00	14,05	14,40	9,20	7,00
MET	1,50	0,74	2,90	ny.	ny.	ny.	0,83
ILE	3,08	2,71	3,44	1,45	0,55	0,80	2,80

Frakciók jele	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	t ₆
	g aminosav/100 g fehérje						
LEU	9,14	7,60	8,60	9,28	11,91	11,9	8,6
TYR	0,50	0,10	1,90	1,73	3,20	ny.	0,4
PHE	2,38	4,90	5,40	2,05	3,04	4,61	3,01
LYS	8,94	14,10	8,02	13,69	14,02	13,1	7,9
HIS	1,87	0,19	2,12	0,19	0,6	ny.	0,9
ARG	10,00	8,64	7,35	15,52	15,02	14,2	9,25
TRP	—	—	—	—	—	—	—
NH ₃	2,87	1,89	1,7	2,7	2,9	2,5	2,3

KÖVETKEZTETÉSEK

A purotionin tisztítására kidolgozott háromlépéses oldószeres tisztítás hatékony módszernek bizonyult, a foszfortartalom alakulása alapján megállapítható, hogy a végtermékként kapott purotionin-preparátum alkalmas további vizsgálatok céljára.

A mennyiségi adatok segítségével, korábbi munkánk (3) eredményeit felhasználva megadható a purotionin-izolálás teljes menetének anyagmérlege, amely a 4. táblázatban foglaltam össze:

A purotionin-izolálás anyagmérlege

4. táblázat

	Nyers purotionin	Szteroidmentes extrakt	Nyers extrakt	Liszt
	(mg/g)			
Nyers extrakt				9,60
Szteroidmentes nyers extrakt			880	8,45
Nyers purotionin		16,0	14,1	0,12
Tiszta purotionin	504,0	8,06	7,11	0,06

A táblázat adataiból látható, hogy a purotionin igen kis mennyiségben található meg a búzalisztben (1 kg liszt mintegy 60 mg-ot tartalmaz). Felvetődik a kérdés, vajon milyen biokémiai, fiziológiai feladatot láthat el egy ilyen kis mennyiségű, a környezettől teljesen elütő összetételű anyag. A búzaliszt lipidfehérje komplexekének a sütőipari minőséget meghatározó szerepe mellett ez a probléma is a purotionin kutatásának további elmélyítését kívánja. A purotionin biokémiai, fiziológiai szerepéről igen keveset tudunk, de az eddig publikált adatok (proteáz-inhibítáló hatás, méhösszehúzó hatás) mindenképpen további kutatásokra sugálnak. Természetesen ezen vizsgálatok előfeltétele, a tiszta preparátum, a megfelelő izolálási metodika, amelynek tisztázása során számos, a kinyeréssel csak érintőlegesen kapcsolódó kérdés merülhet fel.

Esetükben ez történt a tisztítás során szennyezésként eltávolított t₆-jelzésű anyaggal kapcsolatban, amelyről a gélzúréssel meghatározható molekulaméret,

illetve a bruttó aminosavösszetétel alapján megállapítható, hogy ez a „szennyezés” nem más, mint a purotionin nagymolekulású komponense.

A tisztított purotionin G-75-ös Sephadex gélen 4 élesen elkülönülő, több csúcsot és vállat adó eluciós görbét mutat. Rekrumatografálással a preparátum 6 molekulaméret szerint egységes frakcióra bontható. A frakcionálásnál a gél-szűrés és az ultracentrifugálás kombinálás a hatékony, eredményes módszernek bizonyult.

A purotioninnal foglalkozó eddigi kutatások zöme csak a kismolekulású alfa- és béta-frakció izolálásra és vizsgálatára törekedett. Ennek tudható be, hogy a vizsgálandó anyag egyik frakcióját – illetve annak egy részét – mint szennyezést már eleve eltávolították a mintából. A két vizsgált frakció rendkívüli aminosavösszetételét már számos szerző leírta, de amint ez a 3. táblázat adataiból szembetűnő; a különös aminosavösszetétel nemcsak a kismolekulású purotionin frakciók sajátosága, hanem valamennyi frakciónál jelentkezik a búzafehérjék szokásos aminosavösszetételétől elütő jegyek: a bázikus aminosavak viszonylag nagy mennyisége, a prolin és a glutaminsav relatíve kisebb mennyisége, a triptofántartalom hiánya, sőt – bár ez valamivel kisebb mértékű, a nagymolekulású komponenseknél – a ciszteintartalom magas volta.

Balls és Hale a purotionin elnevezést a búzaliszt petroléeres extraktjából kinyert, nagy kéntartalmú, sok bázikus aminosavat tartalmazó fehérjének adta. Amint a fenti vizsgálati adatok mutatják, a kismolekulású frakciók mellett valamennyi purotionin-frakció különleges helyet foglal el a búzafehérjék között, így további vizsgálatuk indokolt.

IRODALOM

- (1) Lásztity, R. – Monori, S. – Kovács Á.: ÉVIKE 15, 257, 1969.
- (2) Balls, A. K., Hale, W. S.: *Cer. Chem.* 17, 243, 1940.
- (3) Békés, F., Monori, S.: ÉVIKE. 21, 163, 1975.
- (4) Redman, D. G., Elton, G. A. N.: *J. Sci. Fd. Agric.* 20, 546, 1969.
- (5) Bartlett, G. R.: *J. Biochem.* 234, 466, 1959.
- (6) Monori, S., Békés, F.: *Élelmezési Ipar* 29, 321 1975.
- (7) Devényi, T.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Hung.* 3, 429, 1968.
- (8) Wöller, L.: *Doktori értekezés. BME (1973)*
- (9) Devényi, T.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Hung.* 5, 435, 1970.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ В ВЕНГЕРСКИХ ПШЕНИЦАХ III. ОЧИСТКА ПУРОТИОНИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ФРАКЦИЙ

Ф. Бэжш

Автор, продолжая исследование пуротионина изолированного из венгерской пшеницы, знакомит триступенчатый метод его очистки разработанного для получения пуротионина. Из одной примеси удаленной в течении очистки, автор установил, что этот пуротионин является компонентом высоко – молекулярного веса. На основании количественных данных очистки составил материальный баланс пуротионина получасмого из пшеничной муки.

Очищенный пуротионин гелевой фильтрацией разделяет на 6 фракций соответствующих единным молекулярным весам; определяя при этом валовой аминокислотный состав фракций. Аминокислотный состав всех фракций пуротионина отличается от обыкновенного состава белка пшеничной муки, распоряжается большим количеством базисной аминокислотой и вымоким относительным количеством цистеина.

UNTERSUCHUNG DER LIPOPROTEINE UNGARISCHER WEIZEN,
III. REINIGUNG DES PUROTHIONINS UND UNTERSUCHUNG
SEINER FRAKTIONEN

F. Békés

Als Fortsetzung der Untersuchung des aus ungarischen Weizenmehlen isolierten Purothionins wird zur Herstellung des Purothionins eine mit Lösungsmittel in drei Stufen durchgeführte Reinigungsmethode beschrieben. Es wurde dabei festgestellt, dass eine der während dieser Reinigung entfernten Verunreinigungen aus einer hochmolekularen Komponente des Purothionins besteht. Auf Grund der quantitativen Angaben der Reinigung wurde die Materialbilanz der Purothioninherstellung aus Weizenmehl entwickelt. Das gereinigte Purothionin wird mittels Gelfiltrierens zu sechs vom Standpunkt der Molekülgrösse einheitlichen Fraktionen zersetzt, und die Brutto-Aminosäurezusammensetzung der Fraktionen wird auch bestimmt. Die Aminosäurezusammensetzung aller Purothioninfraktionen weicht von der üblichen Zusammensetzung der Weizenproteinen ab, indem die relative Mengen der basischen Aminosäuren und des Cysteins gross sind.

INVESTIGATION OF THE LIPOPROTEIN CONTENT OF HUNGARIAN
WHEATS. III. PUROFICATION OF PUROTHIONINE AND
INVESTIGATION OF ITS FRACTIONS

F. Békés

As a continuation of the investigation of purothionine isolated from Hungarian, wheat flour, a three-step solvent method of purification is described for the preparation of purothionine. One of the contaminants removed during purification proved to be the high molecular component of purothionine. On the basis of the quantitative data of purification the material balance of the production of purothionine from wheat flour was established. Purified purothionine was decomposed by gel filtration into six fractions which were homogeneous from the aspect of the size of their molecule. The overall aminoacid composition of the fractions was determined. The aminoacid composition of all fractions of purothionine deviated from the usual composition of wheat proteins, the amount of basic aminoacids and of cysteine was great.