

## Síkerfehérjék C-terminális aminosavainak vizsgálata

### II. A gliadin C-terminális aminosavainak meghatározása tiohidantoinos eljárással

NEDELKOVITS JÁNOS] és WÖLLER LÁSZLÓ]

Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémia Tanszék

Érkezett: 1970. augusztus 13.

Korábbi közleményünkben (1) ismertettük az alkohololdható sikerfehérje frakció C-terminális aminosavainak vizsgálatával összefüggő általános kérdéseket, továbbá beszámoltunk ilyen irányú kutatásaink első eredményeiről. E munka első részeként a gliadin C-terminális aminosavait hidrazinolízises eljárással határoztuk meg. Jelen értekezésben a tiohidantoinos eljárással végzett C-terminális meghatározásainkról számolunk be.

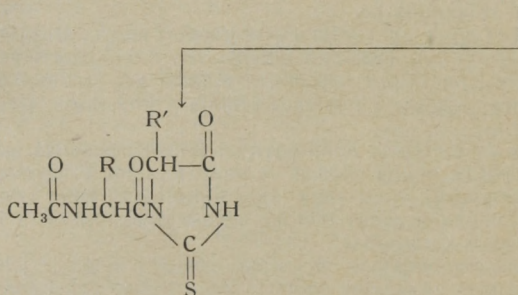
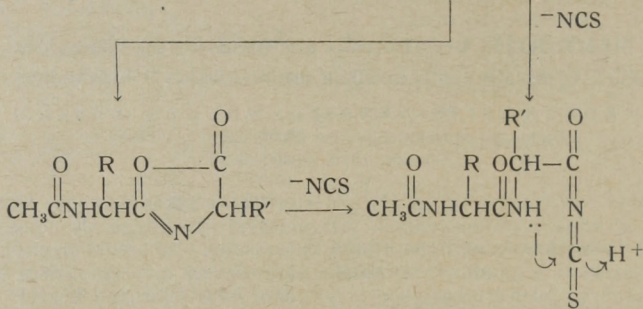
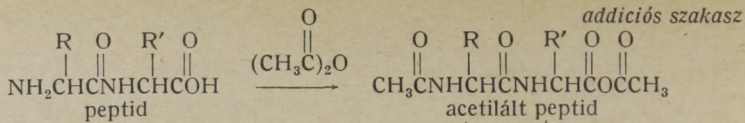
A tiohidantoinos eljárás egyik régi módja a C-végcsoport meghatározásának, amelyet *Schlack* és *Kumpf* (2) már 1926-ban kidolgozott. A módszer elve sok tekintetben az *Edman*-féle lebontáshoz hasonló, a reakció két szakaszban – addíció és lebontás – megy végbe. A folyamat sémája a következő: (reakció séma).

A tiocianát a fehérje C-végcsoport aminosavával acilizotiocianáttá alakul, amely sav hatására aciltiohidantoinná ciklizál. A polipeptidlánc C-végcsoportján így kialakult hidantoingyűrűt savas vagy lúgos hidrolízissel lehet eltávolítani. A gyakorlatban általában a savas bontást alkalmazzák, mivel a lúgos hasításnál a hidantoingyűrű is károsodhat.

A fehérjék C-terminális csoportjainak meghatározásánál e módszer jelentősége abban áll, hogy a reakció viszonylag gyors és kvantitatív. Ezzel szemben hátránya, hogy egyes aminosavak C-végcsoportként nem azonosíthatók. Így a glutaminsav, aszparaginsav, tirozin, szerin, treonin nem mutatható ki. Ezért szokásos e módszert kiegészíteni a karboxipeptidázos eljárással vagy a hidrazinolízises módszerrel.

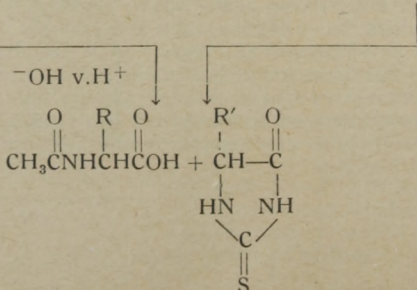
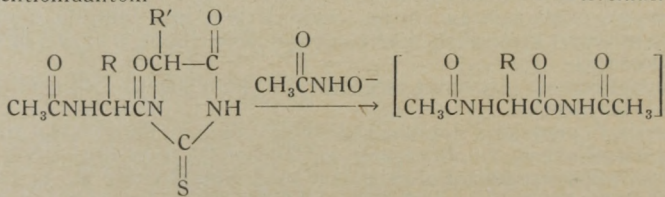
A hidantoinos C-végcsoport meghatározás körülményei még nem minden részletében tisztázottak.

Fehérjék és peptidek C-terminális aminosavainak meghatározását tiohidantoinos eljárással számos kutató végezte, gabonaneműek fehérjéinek C-végcsoportos aminosavainak vizsgálatát ez ideig csak kevés kutató vizsgálta. Az irodalomban található erre vonatkozó közlemények különböző eljárásokkal elért eredményekről számolnak be. Tiohidantoinos C-terminális meghatározást gliadinból *Ramachandran* és *McKonnell* (3) végzett. A képződött tiohidantoinokat papírkromatográfiás eljárással, közvetlen módszerrel azonosították, és csak két aminosavat, glutaminsavat és leucint sikerült kimutatniuk. Feltételezhető, hogy az általuk alkalmazott azonosítási módszerek felbontóképeségének korlátozottsága miatt nem sikerült több végcsoportos aminosavat kimutatniuk.



aminoaciltiohidantoin

*lebontási szakasz*



## A vizsgálati anyag előállítása

A C-terminális aminosavak vizsgálatát alkohololdható sikerfehérje (gliadin) frakcióból végeztük. A sikért BL 112-es jelzésű, petroléterrel zsírtalanított búzalisztből 3%-os NaCl-os mosás után nyertük. A nedves sikért *McDonald* (4) eljárása szerint dolgoztuk fel.

### Vizsgálati módszerek

*A gliadin reagáltatása ammóniumtociánáttal, a C-terminálisok lehasítása és elkülönítése.*

A vizsgálati fehérjefrakció C-végcsoportos aminosav reakcióját *Baptist* és *Bull* (2) leírása alapján végeztük: 1 g gliadint szuszpendáltunk 70 ml ecetsav és ecetsavanhidrid 1 : 9 arányú elegyében és az így kapott szuszpenziót 45 °C-on 4 óráig kevertettük. Közben 0,3 g finoman porított vízmentes ammóniumtociánátot adagoltunk a reakcióelegyhez. Ennek hatására a fehérje erősen megduzzadt, majd teljesen feloldódott. A folyamat végén cseppenként 30 ml cc HCl-t adtunk az oldathoz és vízfürdőn 1 óráig melegítettük. Ezt követően az oldatot vákuumban bepároltuk. Ezáltal barna színű, szilárd termékhez jutottunk. E reakcióterméket 60 ml 6,5 pH-jú foszfát pufferbe oldottuk, és azonos térfogatú etilacetáttal Soxhlet készülékben extraháltuk.

Az extraktot egyszeres térfogatú desztillált vízzel tisztítás céljából kiráztuk, és a szerves fázist vízmentes nátriumsulfáttal szárítottuk.

A reakció végtermékből, amely most már a C-terminálisoknak megfelelő hidantoinokat tartalmazza, közvetlen és közvetett eljárással meghatároztuk az aminosavakat.

### A C-terminálisok közvetlen azonosítása TH-származékként

#### *Tisztítási művelet*

A tiohidantoinok többlépéses reakciójában a közbenső termékek között található olyan vegyületek is, amelyek oldhatósága hasonló, mint a vizsgálandó anyagé. Ezek jelentős kimutatási nehézséget okozhatnak, és ezért lehetőleg el kell távolítani őket a rendszerből. Eltávolításukra a következő tisztítási eljárást dolgoztuk ki és alkalmaztuk: a tiohidantoinokat feloldottuk etilacetátban (1 g kristályos tiohidantoin + 10 ml etilacetát) és 20 ml 6%-os NaHCO<sub>3</sub> oldattal választótölcsérben kiráztuk, majd elválasztottuk a két fázist. A hidrogén-karbonátos fázist 3 × 10 ml etilacetáttal extraháltuk egy-egy ml 2 n sósav jelenlétében annak érdekében, hogy valamennyi tiohidantoin csak az etilacetátos fázisban oldódjék. A kirázás után az etilacetátos fázisokat egyesítettük, azonos térfogatú desztillált vízzel kétszer kiráztuk, és végül a szerves fázist vízmentes nátriumsulfáttal szárítottuk. Az oldószer elűzése után visszamaradt kristályos terméket 8 ml 96%-os etilalkoholban oldottuk, majd azt 30 ml jeges vízbe öntöttük. A tiohidantoinok ennek hatására pelyhes csapadék formájában kiváltak. A csapadékos oldatot éjszakán át hűtőszekrényben tároltuk, majd szűrés után (üvegszűrő) foszforpentoxid felett exikkátorban megszáritottuk.

Az így tisztított, enyhén sárgás kristályos termék alkalmas a kromatográfiás meghatározásra.

### A tiohidantoinok vékonyrétegekromatográfiás elválasztása

A gliadin C-terminálisaként kinyert tiohidantoinokat vékonyrétegekromatográfiás eljárással választottuk szét. Az elválasztást 20 × 20 cm-es üveglapra vitt szilikagél G (Merck) rétegen végeztük. Kétdimenziós technikát alkalmaztunk.

Első irányban heptán-piridin-etilacetát (70+30+10), a második irányban kloroform-hangyasav (100+0,8) elegyet használtunk. A tiohidantoinok előhívását jódadiz reagenssel végeztük (5). Előhívás előtt a lemezt 1%-os keményítő oldattal kell permetezni és szárítani. Utána a jódadizzal permetezett kromatogramon a hidantoinok sötétbarna háttérben fehér foltok alakjában jelennek meg.

#### *A C-terminálisok közvetett azonosítása aminosavként*

A gliadin C-terminális csoportjaiként előállított tiohidantoinok meghatározása közvetett úton is elérhető. A fehérjéből nyert hidantoinkeverék hidrolitikus bontása révén a C-végcsoportos aminosavakhoz juthatunk. A bontást savas hidrólissal érték el.

A tiohidantoin keveréket visszafolyó hűtővel ellátott lombikba tettük, és 15 ml 20%-os sósavat adtunk hozzá. A hidrolízist 4 óráig 120 °C-on végeztük. A hidrolízis befejeztével a tiszta oldatot vákuumban szárazra pároltuk. Majd az így kapott végterméket 4 ml desztillált vízben oldottuk és *Schleicher – Schüll* 2043/b szűrőpapíron leszálló technikával kromatografáltuk. Kifejlesztőszerként butanol-jégecet-víz 120+30+50 arányú keverékét használtuk. Előhívószerként ninhidrin alkoholos oldatát alkalmaztuk.

#### **Vizsgálati eredmények és értékelésük**

A tiohidantoinos C-terminális meghatározások során gyűjtött tapasztalatok alapján megállapíthatjuk, hogy az eljárás – összehasonlítva a hidrazinolízises módszerrel – nehezebben vihető végig, és különösen a végtermék kimutatásánál mutatkoznak bizonytalanságok. Mindezek ellenére a módszer alkalmasnak látszik a C-terminálisok meghatározására. Az eredményes munkához két feltételt mindenképpen biztosítani kell:

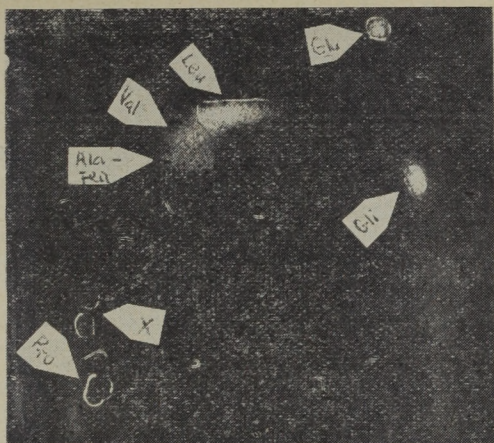
- a reakciókörülményeket pontosan be kell tartani,
- a végtermékek tisztítását gondosan kell elvégezni.

Az alkohololdható sikefűhéj frakció C-terminálisainak vizsgálata során tiohidantoin képzéssel és közvetett meghatározással az alábbi hét aminosavat tudtuk azonosítani:

valin  
leucin  
alanin  
fenilalanin  
prolin  
glicin  
glutamin

A tiohidantoinok elválasztásának jellegzetes vékonyréteg kromatogramját az 1. ábrán mutatjuk be. Láthatóan a TH-aminosavak jól elkülönülő foltokat adnak, eltekintve az alanintól és fenilalanintól, amelyek esetében egy közös foltban jelenik meg a két vegyület. Az egyes TH-származékok azonosítását ismert, tiszta tiohidantoinok kromatografálása alapján végeztük.

A közvetett eljárásnál kapott eredményeket összehasonlítva a közvetlen módszerrel kapott adatokkal megállapítható, hogy a két módszer között eltérések tapasztalhatók. Így az előzőekben felsorolt aminosavakon túl szerin, treonin, tirozin és hisztidin volt még kimutatható a hidrolizátumban. Ugyanakkor a glicin jelenlétét nem lehetett megállapítani, és glutamin helyett glutaminsavat találtunk. Megjegyezzük, hogy a hisztidin kimutatását nem találtuk teljesen



1. ábra

A gliadin C-terminális tiohidantoinjainak kétdimenziós kromatogramja  
 Kifejlesztőszer: heptán-piridin-etilacetát (70+30+10)  
 2; kloroform-hangyasav (100+0,8)

egyértelműnek és ezért mint végsoportot csak feltételezzük. A szerin, treonin és tirozin megjelenése a közvetett eljárásnál elméletileg alátámasztott és mint C-terminális elfogadható.

#### I R O D A L O M

- (1) Nedelkovits J. – Wöller L.: ÉVIKE. 16, 203, 1970.
- (2) Baptist, V. H. – Bull, H. B.: J. Amer. Chem. Soc. 75, 1727, 1953.
- (3) Ramachandran, L. K. – McKonell, W. B.: Can. J. Chem. 33, 1463, 1956.
- (4) McDonald, C. E.: Cer. Chem. 39, 311, 1962.
- (5) Kiel, B. – Sormova, Z.: Laboratoriumstechnik für Biochemiker, Leipzig, 1965.

### ИСПЫТАНИЕ С-ТЕРМИНАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ БЕЛКОВ КЛЕЙКОВИНЫ

#### II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ С-ТЕРМИНАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ ГЛИАДИНА ТИОГИДАНТОИННЫМ МЕТОДОМ

Я. Неделкович – Л. Вёллер

Авторы тиогидантоинным способом исследовали С-терминальные аминокислоты спирторастворимых белков клейковины полученных из пшеничной муки обезжиренной петролейным эфиром БЛ-112.

В результате испытания непосредственной идентификацией удалось отделить и опознать аминокислоту 7 крайних С-групп (валин, леуцин, аланин, фенилаланин, пролин, глицин, глутамин), а косвенной идентификацией 3 крайние группы – С (серин, треонин и тирозин).

PRÜFUNG DER C-TERMINALEN AMINOSÄUREN VON  
KLEBEREIWEISS-STOFFEN

II. BESTIMMUNG DER C-TERMINALEN AMINOSÄUREN DES GLIADINS  
MIT DEM THIOHYDANTOINVERFAHREN

*J. Nedelkovits und L. Wöller*

Die Verfasser untersuchten die C-terminalen Aminosäuren der alkohollöslichen Eiweiss-stoffe von aus mit BL 112 bezeichnetem, mit Petrolaether entfettetem Weizenmehl bereiteten Kleber mit dem Thiohydantoinverfahren.

Als Resultat ihrer Versuche konnten si durch unmittelbare Identifizierung 7 (Valin, Leucin, Alanin, Phenylalanin, Prolin, Glycin und Glutamin), und durch indirekte Identifizierung weitere 3 (Serin, Threonin und Tyrosin) C-terminale Aminosäuren von einander trennen und identifizieren.

INVESTIGATION INTO THE C-TERMINAL AMINO ACIDS OF GLUTEN  
PROTEINS.

II. DETERMINATION OF THE C-TERMINAL AMINO ACIDS  
OF GLIADIN BY THE THIOHYDANTOIN PROCEDURE

*J. Nedelkovits, and L. Wöller*

The C-terminal amino acids of the alcohol soluble proteins of gluten obtained from wheat flour defatted by petroleum ether BL 112 were examined by the thiohydantoin procedure.

Direct identification yielded 7 separated and identified C-terminal amino acids (valine, leucine, alanine, phenylalanine, proline, glycine and glutamine), while 3 more were identified indirectly (serine, threonine and tyrosine).

EXAMEN DES AMINOACIDES C-TERMINAUX DES PROTÉINES DU  
GLUTEN.

II. LE DOSAGE DES AMINOACIDES C-TERMINAUX DE LA  
GLIADINE PAR LA MÉTHODE À LA THIOHYDANTOÏNE

*J. Nedelkovits et L. Wöller*

Les auteurs ont effectué l'examen au procédé à la thiohydantoïne des aminoacides C-terminaux des protéines solubles en alcool du gluten, obtenues à partir de la farine de froment par dégraissage à l'aide de l'éther de pétrol BL 112.

Il est réussi de séparer et identifier 7 aminoacides (valine, leucine, alanine, phénylalanine, proline, glycine et glutamine) par identification directe, tandis que l'identification indirecte décelait 3 acides ultérieurs (sérine, thréonine et tyrosine).