

Sikérfehérjék C-terminális aminosavainak vizsgálata III. A gliadin C-terminális aminosavainak meghatározása karboxipeptidázos eljárással

NEDELKOVITS JÁNOS és WÖLLER LÁSZLÓ

Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémia Tanszék

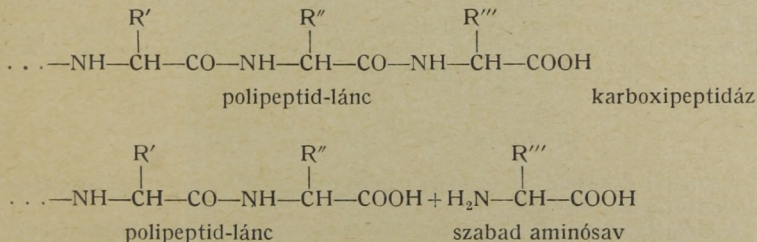
Érkezett: 1970. szeptember 16.

Előző közleményeinkben (1,2) ismertettük az alkohololdható sikérfehérje frakció (gliadin) C-terminális aminosavaival kapcsolatos vizsgálataink eddigi eredményeit és a vizsgálatokkal összefüggő általános kérdéseket. Az előzőekben említett munka keretében a gliadin C-terminális aminosavait hidrazinolízises és tiohidantoinos eljárással határoztuk meg. Jelen dolgozatban a karboxipeptidázos lebontással végzett C-terminális meghatározásainkról számolunk be.

Néhány általános és módszertani kérdés

Peptidek és fehérjék C-terminális aminosavainak analizisében egyre szélesebb körben használják a karboxipeptidázos lebontást.

A karboxipeptidáz a hidrolázok csoportjába tartozó fehérjebontó enzim. Funkcionális jellegénél fogva exopeptidáz, mivel a polipeptidlánc végén elhelyezkedő C-terminális aminosavakat hasítja le. Optimális pH viszonyok között (8 pH) már kis koncentrációban is megfelelő aktivitással működik és bontja a peptidlánc végét. E sajátosságát szekvencia analizisnél is alkalmazzák. A folyamat általános sémája a következő:



A karboxipeptidázos C-terminális aminosav meghatározása kedvezőbbnek, könnyebben kivitelezhetőnek látszik, mint a kémiai eljárások. Ennek ellenére ez az eljárás – számos előnye mellett – sem teszi lehetővé egy adott fehérje vagy polipeptid C-végcsoportos aminosavainak teljes és biztonságos meghatározását. Az eljárás alkalmazásakor több tényezőt kell figyelembe venni.

Az enzim által katalizált hidrolízis nagymértékben függ a vizsgálandó anyag sajátosságaitól. A C-terminális általában nem hozzáférhető az enzim számára, ha a fehérje természetes, natív szerkezettel rendelkezik. Ilyen esetekben denaturált szubsztráttal meg kell ismételni a hidrolízist.

A peptidláncok hosszúsága nem befolyásolja az enzim működését, de ha a fehérje több polipeptid-láncból épül fel és azok nem egyenértékűek, a módszer nem alkalmas a C-végcsoport meghatározására.

A C-terminális aminosavak karboxipeptidázos hidrolízisének sebességét döntő mértékben az oldallánc határozza meg. Leggyorsabban az aromás aminosavak hasadnak le. Igen lassú a rövid oldalláncú, semleges aminosavak hidrolízise. Karboxipeptidázzal nem bonthatók a prolint tartalmazó peptidek ($-\text{CO}-\text{N}$ kötés), továbbá nem alkalmas a savamid végcsoportok kimutatására sem. A bázikus C-terminálisokat a tiszta készítmény, a karboxipeptidáz „A” nem bontja, ezért mindig jelen kell lenni a karboxipeptidáz „B”-nek is. A gyakorlatban kevert enzimmészítményt alkalmaznak.

A fehérjelánc másodlagos szerkezete is befolyással van a terminális aminosav lehasadásának mértékére, továbbá az elektrosztatikus tényezők és a hidrogénkötések is bizonyos jelentőséggel bírnak.

Gabonafehérjék C-terminális aminosavainak karboxipeptidázos meghatározására vonatkozó közlemény mindezideig csak kevés található. Gliadinból és enzimes hidrolízis-termékeiből elválasztott peptidek karboxipeptidázos vizsgálatáról *Rohrlich* és *Gallert* számolnak be (3).

Vizsgálatukhoz 7 órás karboxipeptidázos bontást, és a keletkezett termékek azonosítására kétdimenziós vékonyrétegekromatográfiás eljárást alkalmaztak. Ily körülmények között az általuk tanulmányozott buzagliadinból 4 C-végcsoportos aminosavat mutattak ki: leucint, izoleucint, glutaminsavat és „glutamint”.

A sikérféhrjék C-terminális aminosavainak tanulmányozása során korábban a kémiai lebontás területén végeztünk részletes vizsgálatokat. A karboxipeptidázos eljárással egyrészt az ezekkel kapott eredmények kiegészítését illetve igazolását kívántuk elérni. Másrészt megvizsgáltuk, hogy a módszer a nagymolekulasúlyú, összetett fehérje esetében mennyire alkalmazható.

Vizsgálati anyagok és módszerek

A C-terminális aminosavak karboxipeptidázos vizsgálatához alkohololdható sikérféhrje (gliadin) frakciót állítottunk elő. 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.

C-terminálisok karboxipeptidázos lebontása

A gliadin C-terminális aminosavainak meghatározására *Leng* és *Chung* (5) karboxipeptidázos módszerét alkalmaztuk.

A vizsgálatokhoz 30 mg/ml koncentrációjú gliadin oldatot készítettünk. Az enzimoldat koncentrációját 0,3 mg/ml-re állítottuk be. A karboxipeptidáz enzimet felhasználás előtt preinkubáltuk a megfelelő reakció elérése érdekében. 10 mg kristályos enzimet (Reanal) 5 ml 1%-os nátriumhidrogénkarbonát oldatban szuszpendáltunk és 0,1 n NaOH lassú adagolásával feloldottuk. Majd 0,1 n HCl-al 8 pH-ra állítottuk be. Ezután kb 50 szeres feleslegben 0,1 n izopropanolos diizopropilfluorofoszfátot adtunk az oldathoz és 90 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk.

A megfelelő reakcióidő kiválasztására elővizsgálatot végeztünk 2, 4, 6 és 8 órás enzimes bontással. Ehhez 5–5 ml gliadinoldatot és 1,5 ml enzimoldatot adtunk jól záró üvegdugós üvegbe és 36 °C-os termosztátba helyeztük.

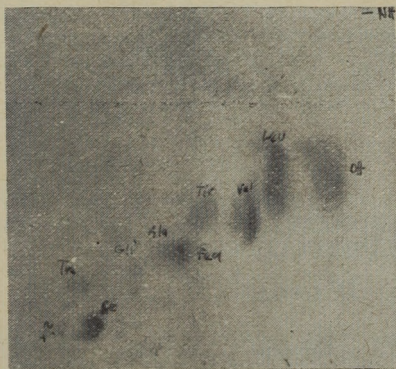
Az enzimreakciót 100 °C-os hőkezeléssel állítottuk le és az oldat tisztájából elvégeztük az aminosav kimutatását. Valamennyi mintánál azonos aminosavak jelenléte volt megállapítható csak mennyiségük változott az idő függvényében.

Az elővizsgálatok tapasztalatai alapján a továbbiakban a következőképpen jártunk el:

30 ml 3%-os gliadinoldathoz 10 ml 0,3 mg/ml koncentrációjú karboxipeptidáz oldatot adtunk és a pH-t 8-ra állítottuk be. Az elővizsgálatban leírt körülmények között 36 °C-on 8 óráig végeztük az inkubálást. Az enzimreakció megszakítására 10 percig forró vízfürdőbe helyeztük a reakcióedényt, majd szobahőmérsékletre visszahűtöttük és szűrtük. Ezután az oldat tisztáját 0,05 n nátriumhidroxid oldattal 9 pH-ra állítottuk be és 1,5 ml DNFB-t adtunk hozzá. A hőmérsékletet 40 °C-ra emeltük és 90 percig erőteljesen ráztattuk a reakció teljes végbemenetele végett. A reakció lezajlása után az elegyből eltávolítottuk a szilárd, oldhatatlan részeket, majd a visszamaradt sárga oldatot sósavval meg-savanyítottuk és a kivált DNF-származékokat elkülönítettük. Ezután a csapadékból 3×10 ml peroxidmentes éterrel kioldottuk a karboxipeptidázos reakcióban felszabadult és DNF-származékká átalakított aminosavakat. Az egyesített éteres oldatot szárazra pároltuk és vékonyrétegekromatográfias eljárással az egyes DNF-aminósav származékokat azonosítottuk.

A DNF-aminósavak vékonyrétegekromatográfias meghatározása

A DNF-származékká átalakított aminosavak elválasztását kétdimenziós vékonyrétegekromatográfias eljárással végeztük. A szilárd DNF-származékból 10 mg/ml koncentrációjú oldatot készítettünk és 20×20 cm-es szilikagél-G rétegre 0,01–0,02 ml-t cseppentettünk fel. A kifejlesztésre első irányban toluol-piridin-etilénklórhidrin-0,8 n ammóniumhidroxid (100+30+60+60), második irányban kloroform-benzinalkohol-jégecet (70+30+3) elegyét használtuk.



1. ábra

A gliadin C-végsoportos dinitrofenilált aminosavainak kétdimenziós kromatogramja

Kifejlesztőszer:

1. irány: toluol-piridin-etilénklórhidrin-0,8 n ammóniumhidroxid (100+30+60+60)
2. irány: kloroform-benzinalkohol-jégecet (70+30+3)

A karboxipeptidázos lebontással nyert C-terminális aminosavak DNF-származékainak jellegzetes vékonyréteggromatogramját az 1. ábrán mutatjuk be. Ezzel az eljárással a gliadinból az alábbi aminosavakat tudtuk kimutatni, mint C-terminálisokat:

szerin
glicin
treonin
alanin
fenilalanin
tirozin
valin
leucin

A vékonyréteggromatogramból látható, hogy a DNF-aminósavak jól elkülönülő foltokat adnak. Ezen túlmenően a felcseppentési pont környékén két halvány folt látható, amelyek kiértékelése illetve azonosítása mindezideig megnyugtató módon nem valósult meg. A kérdéses ismeretlen vegyület megjelenési helye egybeesik az aszparaginével és a glutaminével. Tekintettel arra, hogy az elvi megfontolások alapján karboxipeptidázos lebontással az amidok nem határozhatók meg, így a kérdés végleges tisztázásáig C-végcsoportos aminosavként nem vesszük figyelembe.

A karboxipeptidázos C-terminális meghatározás során nyert tapasztalataink alapján megállapítható, hogy a módszer jól, könnyen kivitelezhető, a végtermékként keletkező aminosavak mind közvetlenül, mind közvetetten, DNF-származékká átalakítva biztonságosan meghatározhatók. Az eljárás a C-végcsoportos aminosavak vizsgálatának fontos lépése és kiegészítve más módszerrel (hidrazinolízis, tiohidantoin képzés) a kívánt eredmény eléréséhez vezet.

I R O D A L O M

- (1) Nedelkovits J. és Wöller L.: ÉVIKE 16, 203, 1970.
- (2) Nedelkovits J. és Wöller L.: ÉVIKE 16, 211, 1970
- (3) Rohrllich, M. és Gallert H.: Z.U.L. 137, 223, 1968.
- (4) McDonald, C. E.: Cer. Chem. 39, 311, 1962.
- (5) Leng, A. L.—Chung, D.: Nature 25, 396, 1953.

ИСПЫТАНИЕ С — ТЕРМИНАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ БЕЛКОВ КЛЕТЧАТКИ. III. ОПРЕДЕЛЕНИЕ С — ТЕРМИНАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ ГЛИАДИНА СПОСОБОМ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ

Й. Неделковитш и Л. Вёллер

При испытании С — терминальных аминокислот белков клетчатки проводили карбоксипептидазное расщепление спирторастворимых белков. Из пшеничной муки знака БЛ 112 полученную спирторастворимую фракцию белков клетчатки подвергли 8 часовому ферментному разложению и выделённую аминокислоту переобразовали в дериват ДНФ. Образующийся при этом продукт идентифицировали хроматографически.

При карбоксипептидазном расщеплении способом тонкослойной хроматографии выделили аминокислоту с концевой группой С — (серин, глицин, треонин, аланин, фенилаланин, тирозин, валин и леуцин).

PRÜFUNG DER C-TERMINALEN AMINOSÄUREN VON
KLEBEREIWEISSSTOFFEN. III. BESTIMMUNG DER
C-TERMINALEN AMINOSÄUREN DES GLIADINS MIT
DEM CARBOXIPEPTIDASE-VERFAHREN

J. Nedelkovits und L. Wöller

Die Verfasser bauten im Laufe ihrer Untersuchungen über C-terminale Aminosäuren von Klebereiweissstoffen die alkohollöslichen Eiweissstoffe mit Carboxypeptidase ab. Die aus Weizenmehl BL 112 bereitete alkohollösliche Klebereiweissfraktion wurde 8 Stunden lang der Wirkung des Enzyms ausgesetzt und die freigewordenen Aminosäuren zu DNF-Derivaten umgesetzt. Die entstandenen Produkte wurden chromatographisch identifiziert.

Im Laufe der Abbauung mit Carboxypeptidase konnten dünnenschichtchromatographisch 8 C-terminale Aminosäuren nachgewiesen werden (Serin, Glycin, Threonin, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin, Valin und Leucin).

INVESTIGATION OF THE C-TERMINAL AMINOACIDS OF GLUTEN
PROTEINS. III. DETERMINATION OF THE C-TERMINAL AMINOACIDS
OF GLIADIN BY THE CARBOXYPEPTIDASE METHOD

J. Nedelkovits and L. Wöller

In the course of the investigation of the C-terminal aminoacids of gluten proteins, proteins soluble in ethanol were degraded by carboxypeptidase. The ethanol-soluble protein fraction of gluten prepared from wheat flour of type BL 112 has been subjected to enzymatic decomposition for 8 hours, and the liberated aminoacids converted into dinitrophenyl derivatives. The formed products were identified by chromatography. In the course of the decomposition by carboxypeptidase, eight C-terminal aminoacids (serine, glycine, threonine, alanine, phenylalanine, tyrosine, valine and leucine) were detected by thin layer chromatography.

EXAMEN DES AMINOACIDES C-TERMINAUX DES PROTÉINES DU
GLUTEN

J. Nedelkovits, et L. Wöller

La décomposition à la carboxypeptidase des protéines solubles en alcool a été effectuée afin d'étudier les aminoacides C-terminaux des protéines du gluten. On a hydrolysée la fraction soluble en alcool de la protéine du gluten préparée de la farine de froment BL 112 par voie enzymatique pendant 8 heures. Ensuite on a transformé les aminoacides libérés en dérivés DNP. Les produits formé ont été identifiés par chromatographie.

Lors de la décomposition à la carboxypeptidase on a décelé par chromatographie en couches minces 8 aminoacides C-terminaux (sérine, glycine, thréonine, alanine, phénylalanine, tyrosine, valine et leucine).