

A gliadin gélkromatográfiás frakcionálásának néhány újabb eredménye

VARGA JÁNOS

Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémia Tanszék

Érkezett: 1973. május 8.

A gélkromatográfiás módszer gyors elterjedése a biokémiai kutatásokban, számos probléma megoldásában jelentett hathatós segítséget. A búzafehérjék frakcionálása, a frakciók finomabb szerkezetének tanulmányozása nélkülözhetetlen módszert talált a gélkromatográfiában. A módszernek számos olyan előnye van, mely a búzafehérjekutatás felgyorsulását eredményezte a 60-as években. A kiméletes molekulasúly szerinti csoportfrakcionálás, a frakciók további vizsgálatra alkalmas mennyiségekben való összegyűjthetősége, a tisztítás (sómentesítés) gyors lehetősége olyan előnyöket jelentettek, amelyek a kutatás eredményeiben is tükröződtek.

Gyors egymásutánban jelentek meg közlemények a búza víz-, só- oldható frakcióinak vizsgálati eredményeiről. *Abbott és Johnson* (1) a vízdoldható (albumin) frakcióelválasztását végezték Sephadex G-100-as gélen, *Feillet és Bourdet* (2) ugyancsak albumint frakcionáltak és Sephadex G-100-as gélen négy frakciót kaptak. *Kawabata* (3) sóoldható búzafehérjéket, etilalkohollal és etilénklórhidrinnel extrahált búzafehérjéket vizsgált G-100-as gélen.

Természetesen a legtöbb közlemény a sikérkomplexet alkotó búzafehérjék vizsgálatáról jelent meg. Ismeretes e fehérjék sütőipari technológiai jelentősége, és így érthető a kutatóknak az a törekvése, hogy e fehérjék finomabb kémiai szerkezetéről minél többet tudjanak meg. A kezdeti vizsgálatok a teljes sikérkomplex fehérjeinek szétválasztására irányultak. *Jones* és munkatársai (4) sikért ecetsav, Al-laktát-tejsav pufferben és ecetsav-metilalkohol elegyben G-75-ös gélen választották szét hat frakcióra, melyek közül az első kettőt kizárólag glutenin alkotta.

A későbbiekben a vizsgálatok mindinkább, a viszonylag könnyebben kezelhető gliadin frakcióra irányultak. *Beckwith* és munkatársai (5) Sephadex G-100-as oszlopon Al-laktát pufferben választották szét a gliadin-frakciókat és a nagyobb molsúlyú frakciók vizsgálatát is elvégezték. *Bernardin* és munkatársai (6) α -gliadint állítottak elő gélkromatográfiásan és vizsgálták tovább.

Tanszékünkön folyó búzafehérjekutatás keretében Sephadex G-200-as gélen valamennyi fehérjefrakció gélkromatográfiás vizsgálatát elvégeztük (7). A sikérfehérjekomplex beható tanulmányozását több év óta folytatjuk rendszeresen. A glutenin vizsgálatát Sephadex G-200-as gélen végeztük (8). A sikérfehérjék módosított frakcióinak vizsgálatára is alkalmas módszernek bizonyult a gélkromatográfia. Dezamidált, perhangyasavval oxidált, észterezett sikérfehérjék vizsgálata számos megfigyelés és következtetés lehetőségét biztosította

automatikus analizátorával végeztük. Az aminosavanalízis eredményeit frakciókra vonatkoztatva az 1. táblázatban mutatom be. (Lásd 1. táblázat)

A táblázatban a %-ot jelző oszlopokban, az egyes aminosavaknak a frakciókon, ill. teljes gliadinon belüli százalékos megoszlását tüntettük fel.

A táblázat adataiból szemléltető módon tűnik ki, hogy a frakciók között nemcsak a molekulasúlyokban van eltérés, hanem az egyes aminosavak mennyiségi eloszlásában is. Sőt megfigyelhető az NH_3 mennyiségeiben is eltérés. Ez utóbbi a frakciók molekulasúly csökkenésével párhuzamosan növekszik. Ebből arra következtethetünk, hogy az amidáltság is ilyen értelemben nőtt. Természetesen az ammóniatartalom abszolút értékei a vákuumbepárlás következtében csökkentek. (Az NH_4Cl illékonyága miatt).

Az aminosavak mennyiségeiben megmutatkozó különbségek a frakciókban jól nyomon követhetők. Az ASP mennyiségei a frakciók számozása irányában nőttek. A SER és a THR az 1. frakcióban közel kétszerese a másik két frakcióban megfigyelhető mennyiségeknek. A GLU a 2. frakcióban mutat kiugróan nagy értéket. A GLY a frakció számozás irányában csökken, míg az ALA ebben a sorrendben nő. Érdekes a VAL mennyiségének a 2. frakción belüli, közel fele értéke, mint az 1. és 3. frakcióban. A TYR mennyiségei a frakciószámozás sorrendjében nőnek, míg a PHE mennyiségei ugyanebben az irányban csökkennek.

A bázikus aminosavak közül a 2. frakcióban az ARG feltűnően nagy részaránya, a 3. frakcióban a HIS megnövekedett mennyisége figyelemre méltó.

Az aminosavak fent említett mennyiségi eltérései, a gliadin frakciókon belül arra utalnak, hogy a frakciókat felépítő polipeptidláncok aminosav felépülésében is különbségek vannak.

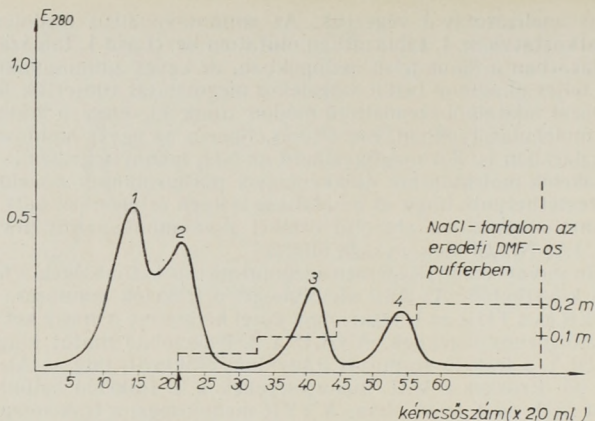
Az előzőekben ismertetett gliadinfrakciók közül a 2. frakciót ($M_s \sim 26\,000$) további finomfrakcionálási eljárás kidolgozásával megkísértem, molekulatöltés tulajdonságok alapján, homogénebb frakciókra bontani. Az eljárás kidolgozásához a jelenleg kereskedelmi forgalomban beszerezhető Sephadex alapú

1. táblázat

„Aminochrom“ aminosavanalizátoron a gliadinban, és a gliadinból Seph. G – 100-as gélen elválasztott frakciókban meghatározott aminosavak mennyiségei

Aminosavak	Eredeti gliadin		1. frakció		2. frakció		3. frakció	
	μg	%	μg	%	μg	%	μg	%
LYS	3,30	0,20	2,00	0,13	4,4	0,21	8,9	0,70
HIS	22,80	1,40	9,90	0,70	12,6	1,00	38,8	3,10
NH_3	6,50	0,40	5,00	0,35	23,10	1,85	25,2	2,0
ARG	35,60	2,20	15,00	1,05	51,8	4,20	33,8	2,7
ASP	61,60	3,80	28,40	1,95	27,10	2,20	37,90	3,0
THR	45,10	2,80	65,90	4,50	27,40	2,20	35,70	2,8
SER	80,40	4,90	67,60	4,60	34,40	2,80	42,70	3,4
GLU	518,50	32,00	451,00	30,90	449,90	36,25	376,50	30,10
PRO	205,20	12,60	184,20	12,60	130,60	10,50	142,50	11,40
GLY	32,40	2,00	56,70	3,85	28,40	2,30	24,00	1,90
ALA	35,40	2,20	26,50	1,80	25,70	2,10	32,70	2,60
CYS-CYS	51,40	3,20	39,60	2,70	34,30	2,70	44,20	3,50
VAL	103,10	6,30	93,10	6,35	40,60	3,30	92,70	7,40
METH	22,60	1,40	32,40	2,20	14,30	1,10	17,30	1,40
i-LEU	92,30	5,70	90,40	6,20	65,40	5,20	86,20	6,90
LEU	108,40	6,70	105,00	7,20	79,20	6,30	76,30	6,10
TYR	58,40	3,60	39,50	2,70	38,70	3,10	57,30	4,60
PHE	105,10	6,50	128,60	8,70	83,50	6,70	58,20	4,70
TRY*	18,20	1,10	18,10	1,25	116,30	1,30	18,20	1,50

A TRY-t $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -os hidrolízis után határoztuk meg.



Gliadin Sephadex 6-100 gélen elválasztott 2 frakciójának felbontása OAE-SEPH. A-50 - ioncserélő géloszlopon

Oszlopméret: 2,2 x 20 cm

Eluens: 8,2 pH-jú DMF-os puffer
+ (NaCl tartalmú DMF-puffer

2. ábra

ioncserélő gélek közül két kationcserélő (CM- és SE- Sephadex- C - 50) és két anioncserélő gél (DEAE- és QAE Sephadex A - 50) használtam fel. A kationcserélő géleket 3,3 pH-jú alumíniumlaktát és piridinacetát pufferben alkalmaztam, míg az ioncserélőket 8,2 pH-jú, 2 mól dimetilformamidot (továbbiakban DMF) tartalmazó ammónia-sósav pufferben próbáltam ki. A négyféle gélen kapott eluciós diagram összehasonlítása alapján végül is a QAE-Sephadex A - 50-es típusú gél frakcionáló hatását találtam a legmegfelelőbbnek. A frakcionálás hatását minden esetben (NaCl-ot tartalmazó puffer) iongradiens elucióval fokoztam. A NaCl koncentráció 0 és 0,2 m között változott. A QAE-Sephadex A - 50-es erős anioncserélő gélen a gliadin 2. frakciójából kapott frakcióeloszlás eluciós diagramját a 2. ábrán mutatom be. Az ábrán látható diagram első két frakciója tisztán az ioncserélő gél hatására elkülönül, míg a harmadik és negyedik frakció elkülönülése a 0,2 m NaCl koncentrációig növekvő iongradiens hatására következett csak be. E két frakció erősebb kötődése a molekuláikon levő negatív töltések túlsúlyára enged következtetni (—COOH, fenolos hidroxilú tirozin). Feltehetően ezek a frakciók a gliadin 2. frakciójának azok a polipeptidláncai lehetnek, amelyek amidaltsági foka mérsékeltebb (több a szabad —COOH,) vagy esetleg több savanyú —OH csoportot tartalmaznak.

Az ioncserélő gélen nyert frakciók aminosavösszetételi adatait is meghatároztuk. Az aminosavakra kapott mennyiségi értékeket a 2. táblázatban foglaltam össze. (L. 2. tábl.)

Az aminosavanalizátorra felvitt anyagmennyiség (hidrolizátumban) 1-2 mg értékek között váltokozott.

A táblázat adataiból kitűnik, hogy a frakciók összetétele aminosavak tekintetében eltérő. Megmutatkozik ez a GLU mennyiségeiben. Az 1. és 3. frakciók átlagosnál nagyobb mennyiségeket, míg a 4. frakció az átlagosnál kevesebbet

A gliadin 2. frakciójából ioncserélő gélkromatográfiával nyert frakciók aminosavösszetételei adatai

Aminosavak	1. frakció		2. frakció		3. frakció		4. frakció	
	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%
LYS	—	—	—	—	—	—	—	—
HIS	13,00	0,8	15,50	0,9	10,5	1,00	9,2	0,9
NH ₃	80,20	5,0	76,10	4,7	36,4	3,50	12,3	1,5
ARG	51,30	3,2	773,20	4,5	43,3	4,20	74,7	9,3
ASP	30,30	1,9	39,00	2,40	28,70	2,80	23,90	2,9
THR	28,10	1,7	40,00	2,50	23,50	2,30	20,10	2,5
SER	92,60	5,7	70,30	4,50	52,90	5,20	44,30	5,5
GLU	616,20	38,0	477,60	30,50	382,80	37,90	201,40	25,2
PRO	156,20	9,6	179,00	11,40	152,70	15,00	102,3	12,8
GLY	40,80	2,5	31,10	2,00	25,50	2,50	20,9	2,6
ALA	42,30	2,6	32,50	2,10	17,20	1,70	27,8	3,5
CYS-CYS	36,40	2,2	76,60	4,80	64,30	6,30	38,7	4,8
VAL	63,80	3,9	61,40	3,90	33,10	3,30	28,8	3,6
METH	34,60	2,1	13,10	0,80	9,50	0,90	6,1	0,7
i-LEU	88,80	5,5	90,60	5,80	25,60	2,50	45,6	5,7
LEU	161,30	9,9	142,30	9,10	76,50	7,50	70,0	8,8
TYR	6,00	0,3	20,70	1,30	23,80	2,30	15,0	1,9
PHE	112,30	6,9	113,80	7,30	14,0	1,40	45,1	5,6
TRY	18,4	1,1	13,70	0,80	11,3	1,10	10,2	1,2

tartalmaz GLU-ból. Feltűnő a 3. frakció nagy PRO tartalma. Általában a frakciókra a kéntartalmú aminosavak átlagosnál nagyobb mennyisége jellemző, kiugróan nagy értéket mutat ez a 3. frakció esetében. Ugyanakkor a 3. frakció a legszegényebb hidrofób oldalláncú aminosavakban (VAL, LEU, i-LEU). Feltűnő még az 1., 2. és 4. frakciók nagy PHE tartalma.

A TYR tartalom a frakciószámzással párhuzamosan enyhén növekvő értékeket mutat. Ugyancsak szembeszökő a bázikus aminosavak közül az ARG nagy mennyisége valamennyi frakcióban, de különösen a 4. frakció mutat extrém nagy ARG tartalmat.

Végül a táblázatban közölt eredményekkel kapcsolatban néhány megjegyzés. Az 1. táblázatban a 2. frakció aminosavai százalékos mennyiségeinek összege 95,3%, amely arra mutat, hogy néhány aminosav esetében a ténylegesnél kevesebbet határoztunk meg. Ezek az eltérések a SER, ASP, PRO mennyisége csökkenésének rovására írhatók. A csökkenő értékek a hidrolízis megváltozott körülményeire, vagy az aminosavanalizátoros meghatározás pontatlanságára vezethetők vissza. E feltételezés annál is inkább valószínű, mivel a 2. frakcióból a későbbiek során ioncserélő gélen elválasztott frakciók aminosavai közül az említett aminosavak esetében nagyobb mennyiségeket határoztunk meg. (lásd 2. tábl.)

Ezenkívül az 1. táblázatban még feltűnő, hogy a TRY az eredeti gliadinban csökkentebb mértékben jelentkezett, mint az összes többi — belőle elválasztott — frakcióban. Ez az eredeti gliadin szénhidráttartalmával magyarázható. A frakciók gélkromatográfiás elválasztásakor a szénhidráttartalmú rész a frakcióktól elkülönült. Így a frakciók hidrolízisekor a TRY mennyiségét, a vele való reakció elmaradása miatt nem csökkentette.

A gliadin frakció gélkromatográfiás vizsgálatának kombinációja ioncserélő gélkromatográfiás elválasztással hatékonyan segítette a finomfrakcionálás továbbfejlesztését.

Ezzel a módszerrel lényegében a gélelektroforézissel azonos elválasztást lehet megvalósítani, és ami a módszer fő előnye, hogy továbbvizsgálatra alkalmas mennyiségeket lehet a frakciókból nyerni.

Ezzel a módszerrel a gliadin finomabb szerkezetének vizsgálatához ismét jelentős lépéssel kerültünk közelebb, és várhatóan az ily módon nyert frakciók végsőport és parciális hidrolízistermék vizsgálata már a gliadin komponensek primér szerkezetének ismeretéhez nyit utat.

A szövegben alkalmazott aminosavak névrövidítéseinek összefoglalása

LYS = lizin	ALA = alanin
HIS = hisztidin	CYS – CYS = cisztin
ARG = arginin	VAL = valin
ASP = aszparaginsav	METH = metionin
THR = treonin	i-LEU = izo-leucin
SER = szerin	LEU = leucin
GLU = glutaminsav	TYR = tirozin
PRO = prolin	PHE = fenilalanin
GLY = glikokoll	TRY = triptofán

IRODALOM

- [1] Abbot, D. C. – Johnson, J. A.: Food Sci. 37, 38, 1966.
- [2] Feillet, P. – Bourdet, A.: Acad. Sci. Paris, Ser. D. 263, 2030, 1966.
- [3] Kawabata, A.: Eiyo To Shokuryo. 20, 407, 1968.
- [4] Jones, R. W. és mtársai: Cereals Chem. 40, 409, 1963.
- [5] Beckwith, A. G. és mtársai: Cereals Chem. 43, 14, 1966.
- [6] Bernardin, J. E. és mtársai: J. Biol. Chem. 242, 445, 1967.
- [7] László Gy.: Diplomamunka. BME Élelmiszerkémia Tsz. Budapest. 1969.
- [8] Lengyel, M.: Diplomamunka. BME Élelmiszerkémia Tsz. Budapest. 1971.
- [9] Varga J. – László R. – Győreyné – Vadon E.: Untersuchung von chemisch modifizierten Klebereiweissen. Előadás. I. Vajdasági Vegyészeti Napok. Novi Sad, 1971. dec. 10 – 11.
- [10] Varga J.: ÉVIKE. 14, 153, 1968.
- [11] Osborne, T. B.: The Protein of the Wheat Kernel. ABDERHALDEN, E.: Handbuch Biol. Arbeitsmethod. Abt. I. 8. Berlin. 1955.

НЕКОТОРЫЕ НОФЕЙШИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ГЕЛЕВОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ГЛИАДИНА

Й. Варга

Автор в трех элюентах (раствор уксусной кислоты 0,1 м; раствор уксусной кислоты 0,05 м с содержанием 20% этанола; элюент с содержанием диметилформамида проводил отделение фракции белка пшеницы на колонне Сефадекс Г – 100. Отделил три фракции. После солянокислого гидролиза проводил испытание состава аминокислоты всех фракций. Установил, что в составе аминокислоты полипептидных фракций глиадина имеются расхождения. Вторую фракцию отделенную на колонне Сефадекс Г – 100 (Ms 26.000) на ионообменном QAE Сефадекс А – 50 геле фракционировал дальше в диметилформамидном буфере. Элюированием градиента отделил дальнейшие четыре фракции. Отделил также и данных аминокислотного состава этих фракций. Сравнением данных аминокислотного фракционирующих компонентов в результате разного количества ионизируемых групп, автор наблюдал значительные расхождения в количествах некоторых аминокислот.

EINIGE NEUERE RESULTATE DER GELCHROMATOGRAPHISCHEN FRAKTIONIERUNG DES GLIADINS

J. Varga

Verfasser trennte die alkohollösliche (gliadin) Eiweissstofffraktion des Weizens mit dreierlei Eluenten (0,1 m Essigsäurelösung; 0,05 Mol Essigsäurelösung mit 20%-igem Aethanolgehalt; Dimethylformamid enthaltendes Eluens) auf einer Sephadex G-100 Säule. Er separierte drei Fraktionen. Sämtliche Fraktionen wurden nach einer Hydrolyse mit Salzsäure auf Aminosäuren-Zusammensetzung analysiert. Er stellte fest, dass in der Aminosäuren-Zusammensetzung der Polypeptidketten der Gliadinfraktion Unterschiede bestehen.

Die auf der Sephadex G-100 Säule getrennte zweite Fraktion (MS 26,000) wurde vermittels des Ionenaustauscher-Gels QAE A-50 in einem Dimethylformamid-Puffer (pH 8,2) weiter fraktioniert. Durch NaCl Gradienten-Elution wurden vier weitere Fraktionen abgetrennt. Die Aminosäuren-Zusammensetzung dieser Fraktionen wurde ebenfalls bestimmt. Der Vergleich der Aminosäuren-Zusammensetzung der aufgrund der verschiedenen Menge von ionisierbaren Gruppen fraktionbildenden Komponenten ergab bedeutende Unterschiede in der Menge der einzelnen Aminosäuren.

SOME NOVEL RESULTS OF THE FRACTIONATION OF GLIADIN BY GEL CHROMATOGRAPHY

J. Varga

The wheat protein fraction soluble in ethanol (gliadin) was separated on a column of Sephadex G-100, using three different eluting agents (a 0,1 M solution of acetic acid; a 0,05 M solution of acetic acid containing 20% of ethanol; and an eluting agent containing dimethyl formamide). Three fractions were separated, subjected to hydrolysis by hydrochloric acid and their aminoacid composition was established by analysis. Differences were detected in the aminoacid composition of the polypeptide chains of the gliadin fraction.

The second fraction (of a molecular weight of 26000) separated on the column of Sephadex G-100 was subjected to further fractionation on ion exchanger QAE Sephadex A-50 gel, in a buffer containing dimethyl formamide (of pH 8,2). By using gradient elution with NaCl four further fractions could be separated.

The data of the aminoacid composition of these fractions were also determined. On comparing the data of the aminoacid composition of the components fractionated due to the different amounts of ionizable groups, significant deviations could be observed in the quantity of the various aminoacids.

QUELQUES RÉSULTATS RÉCENTS DU FRACTIONNEMENT DE LA GLIADINE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR GEL

J. Varga

L'auteur a effectué la séparation de la fraction alcoolosoluble de la protéine de froment (la gliadine) sur une colonne de Sephadex G 100 en se servant de trois éluants (une solution 0,1 m d'acide acétique, une solution 0,05 m d'acide acéti-

que à une teneur en éthanol de 20 p.c., et un éluant contenant du diméthyleformamide). Il a soumis à l'examen, après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, la composition d'acides aminés de toutes les fractions. Il a établi qu'il y a des différences dans la composition des acides aminés des chaînes polypeptidiques de la fraction de gliadine.

La seconde fraction séparée sur la colonne de Sephadex G 100 (poids moléculaire = 26 000) a été soumise à un fractionnement ultérieur sur le gel échangeur d'ions QAE Sephadex A-50, dans un tampon à diméthyleformamide (pH = 6,2). Par élution à gradient de NaCl quatre fractions ultérieures se sont faites séparer. On a déterminé également la composition des acides aminés de ces fractions. En comparant les données relatives à la composition des acides aminés des composants qui se font fractionner en vertu de leurs quantités différentes de groupes ionisables, on a pu observer des différences notables dans les quantités des divers acides aminés.

KÜLFÖLDI LAPSZEMLE

DUDEN, R., FRICKER, A.,
CALVERLEY, R., PARK, K. - H.,
RIOS, V. M.:

Benzoésav, szorbinsav és PHB-észter rétegekromatográfiás elválasztása és remissziós-fotométeres meghatározása.

(*Dünnschichtchromatographische Trennung von Benzoesäure, Sorbinsäure und PHB-Estern und deren remissionsphotometrische Bestimmung.*

Z. U. L. 151, 23, 1973.

A szerzők 80% poliamid- és 20% cellulózpor keverékéből készített lemezekben toluol-petrol-éter-kloroform-ecetsav 30+15+10+1 futtatóval választották el egymástól a benzoésavat, a szorbinsavat és a PHB-észtert. A lemezek kiértékelése benzoésav esetében 230 nm-en, szorbinsavnál és PHB-észternél pedig 260 nm-en történt Zeiss Chromatogramm Spektralfotométer segítségével. Megállapították, hogy a módszer mennyiségi meghatározására benzoésavnál 2-30, szorbinsavnál 0,2-15,0 míg PHB-észternél 0,5-10 µg/folt anyagmennyiségek esetében használható. Kvalitatív kimutatásnál egy nagyság-

renddel kisebb anyagmennyiségek is elegendőek.

Aczél A. (Szeged)

GANTENBEIN M.

Összehasonlító mérések húspari termékek automatikus, nitrogén meghatározására.

(*Collaborative Study of the Automated Determination of Nitrogen in Meat Products*

Association of Official Analytical Chemists 56, (1) 31-35. (1973.)

Szerzők előző dolgozatukban leírt automatikus nitrogénmeghatározás módszert módosították és összehasonlító méréseket végeztek. A mintát hígított kénssavban oldják, szobahőmérsékletre hűtik és automatikus analizátorral vizsgálják. Az analizátor kolorimetriás mérésen alapszik. Az eredményeknél az átlaghiba 0,95% protein, átlag standart deviáció $\pm 0,39$ és az átlag variációs koefficiens 2,44%. A módszer alkalmas 0,8-4% nitrogén tartalmú (5,0-25,0% fehérjetartalom) hús és hústermék nitrogéntartalmának meghatározására.

Kulcsár F. (Szeged)