

Növényi fehérjék frakcionálása

— KORPÁCZY ISTVÁN

Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1955. november 26.

Osborne (1) klasszikus vizsgálatai bebizonyították, hogy a növényekben előforduló valódi fehérjék nem egységes anyagok, hanem legtöbbjük több összetevő fehérjére bontható szét. Az elválasztás, megkülönböztetés és csoportokba osztás alapjául az egyes elkülönített fehérje összetevők egymástól eltérő viselkedése szolgált különböző oldószerekkel és kiszóó anyagokkal szemben. Ezen az alapon a növényi fehérjéket öt főosztályba sorolták. Ezek: a desztillált vízben oldható, csak nagy sókoncentrációkkal kisózható albuminok; a desztillált vízben nem, de híg sóoldatokban oldható, azonban viszonylagosan kis sókoncentrációkkal kisózható globulinok; a vízben és híg sóoldatokban nem, de 70—75 százalékos alkoholban oldható prolaminek; az előbbi oldószerekben nem, de híg lúgokban oldható glutelinek és végül a közönséges oldószerekben oldhatatlan vázfehérjék, szkleroproteinek.

A fehérjekémia nagyszerű haladása, főleg azonban az elektroforetikus és ultracentrifugás vizsgálatok eredményei folytán kiderült, hogy ezek az addig egységeseknek tartott fehérjék sem egyneműek, majdnem mindegyikük további fehérje összetevőkre különíthető. Ezek a tapasztalatok a jövőben a fehérjék új osztályozását, új ismertetőjelek és értékek megállapítását teszik szükségessé. Az erre irányuló kutatások folyamatban vannak, de addig is, amíg ismereteink gyarapodásával és a beható tanulmányok eredményeképpen ez a helyzet bekövetkezik, nem mondhatunk le az eddig bevált és könnyen kezelhető osztályozásról. Ezért hasznosnak vélem, hogy ismeressem a fehérje frakcionálásának intézetünkben kidolgozott módszerét. Ezt annál is inkább szükségesnek tartom, mert a későbbiek folyamán közölt táblázatból könnyűszerrel kiolvas-

ható, hogy egymással közeli rokonságban álló növényfajták fehérje összetevői közt olyan lényeges különbségek vannak, hogy azok segítségével még akkor is megállapíthatjuk valamely növényi fehérje eredetét, ha a teljes fehérjék aminosavösszetételében jelentősebb eltérések nem tapasztalhatók (2). Meghatározzuk az albumin, kétféle globulin, prolamin és glutelin mennyiségét és a vázfehérje nitrogénjét. A módszer kidolgozásában *Osborne* munkáin kívül *Lózsza Albert* (3) tanulmánya is segítségemre volt.

A minta előkészítése

A fehérjék denaturálásának elkerülése végett légszáraz növényi anyagból indulunk ki. Fehérjében gazdag anyagnál 10 g, szegénynél 50—100 g, sőt burgonyánál 300—500 g szükséges egy frakcionálás eredményes keresztülviteléhez. Fehérjében aránylag gazdag, száraz növényi anyagoknál (olajos magvak, gabonaszemek, hüvelyesek) lehetőleg finomra őrölt lisztjükből 10 g-ot mérünk le, porcelán mozsárba helyezük és ugyanannyi üveggörrel vagy mosott finom kvarchomokkal összekeverve 50 ml petroléterrel néhány percig alaposan dörzsöljük, hogy a zsiradékot belőle kioldjuk. A petroléteres kivonatot óvatosan leöntve vagy lecentrifugálva a petroléteres kivonást addig ismétljük, amíg az örlemény zsírtalanná válik. (Az egyesített petroléteres kivonatok egy részlegét a zsír meghatározására használhatjuk fel.) A petroléter maradékának kioldására az örleményt egyízben acetonnal vagy etiléterrel dörzsöljük össze, majd ennek eltávolítása után a zsírmentesített anyagot vékony rétegben üveglapra terítjük ki és levegőn szobahőmérsékleten megszáritjuk. Ezt a folyamatot légárammal, pl. ventilátor vagy „hajszáritó” segítségével meggyorsíthatjuk. Fehérjében szegény anyagoknál 50—100 g-ot őrölünk meg, az esetleg kicsurgó vagy kipréselhető levét külön felfogjuk és néhány csepp kloroformmal konzerválva a szilárd rész kioldásáig félretesszük. Az örleményt szükség esetén langyos légáramban (hőmérséklete ne haladja meg a 45 C°-t!) megszáritjuk, az esetleg jelenlevő zsiradéktól a leírt módon petroléteres kivonással megszabadítjuk. A burgonya-fehérje frakcionálását később tárgyalom.

A fehérje frakcionált kioldása

Az előbbieket szerint előkészített örleményt veszteség nélkül visszavisszük a porcelán mozsárba és toluollal telített (azaz néhány csepp toluollal előzetesen összerázott) kb. 40 ml 2 szá-

zalékos nátriumklorid oldattal (vagy helyesebben 1 százalékos káliumszulfát oldattal), amelyet erősen hígított sósavval (illetve kénsavval) 5,7 pH-ra állítottunk be, 20 ± 1 C° hőmérsékleten 5 percig erősen eldörzsöljük. Ezután a keveréket 50 ml-es centrifugacsőbe visszük át és percenkint 2500—3000 fordulattal $1/4$ — $1/2$ óráig centrifugáljuk. A tiszta oldatot 500 ml-es bőszejű Erlenmeyer-lombikba gyűjtjük, a szilárd maradékot pedig a porcelánmozsárba visszavisszük és a használt oldószerrel a leírt módon ismételten mindaddig kioldjuk, amíg oldódást tapasztalunk; 4—5 kivonás rendszerint elegendő. A fehérje kioldását úgy ellenőrizzük, hogy az oldat tisztájából kapillárisal egy cseppet kivesszünk és óraüvegen 1—2 csepp 10 százalékos triklórecetsav oldatba keverjük; legfeljebb igen gyenge opalizálásnak szabad mutatkoznia. A lecentrifugált tiszta oldatokat egyesítjük és a térfogatot megmérve annyi szilárd ammonszulfátot oldunk benne lassú keverés mellett, hogy 40 százalékos telítést érjünk el. Ekkor a könnyen oldható globulin-1 frakció kicsapódik. A csapadékot 12 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd leszűrjük vagy lecentrifugáljuk, 40 százalékos telítettségű ammonszulfát oldattal kimossuk és a mosófolyadékot az albumint oldatban tartalmazó szűrlethez adjuk. A kimosott globulin csapadékot újra oldjuk a toluollal telített oldószerben és teljesen hasonló módon újra kisózzuk, állni hagyjuk, a folyadéktól elválasztjuk, mossuk, e folyadékokat az albumint tartalmazó oldathoz adjuk. A kimosott tiszta globulin csapadékot celofáncsőbe mossuk át, néhány csepp toluollal elkeverjük és gyakran váltott vagy áramló desztillált vízzel szemben a szulfation teljes eltűnéseig dializáljuk. Ezután a globulincsapadékot lemért kristályosító csészébe visszük át és vákuumexszikkátorban foszforpentoxid felett legfeljebb 40 C°-ig terjedő hőmérsékleten kiszárítjuk, lehűlés után mérjük.

Az albumint tartalmazó oldat térfogatát megmérjük és szilárd ammonszulfát hozzáadásával 60 százalékosra telítjük, amikor az albumin kicsapódik. Az albumint teljesen a globulin-1-re leírt módon nyerjük ki, újbóli oldással és kisózással tisztítjuk, dializáljuk, szárítjuk és mérjük.

Az albumin és globulin kioldása után visszamaradt anyagot a porcelán mozsárban kb. 40 ml, előzetesen toluollal telített, 5,7 pH-ra beállított 10 százalékos nátriumklorid, illetve 5 százalékos káliumszulfát oldattal dörzsöljük el 5 percig. Négy ízben megismételt kioldás itt is elegendő szokott lenni. Egyebekben teljesen úgy járunk el, mint a globulin-1 esetében, csupán a töményebb sóoldatban újra feloldott globulint már nem sózzuk

ki újra, hanem közvetlenül sómentessé dializáljuk desztillált vízzel szemben. A dialízis folyamán válik ki a nehezebben oldható globulin-2 frakció.

A globulin-2 kioldása után a maradékot egyízben összedörzsöljük 5,7 pH-ra savanyított desztillált vízzel, hogy a sómaradékot belőle kioldjuk. Ezt a kivonatot előntjük. Ezután a maradékot 5 percig összedörzsöljük kb. 40 ml 70 térfogat-százalékos etilalkohollal. Háromszoros kivonás elegendő szokott lenni, csak a gabonaneműeknél kell nagy prolamintartalmuk miatt 4—5-ször megismételt kivonást alkalmazni.

Az egyesített alkoholos kivonatok térfogatát megmérjük és kilencszeres mennyiségű vízzel hígítjuk. Ekkor a prolamin kicsapódik, másnap leszűrjük vagy lecentrifugáljuk, az oldatot előntjük. A prolamint tisztítás végett 70 százalékos etilalkoholban oldjuk, kilencszeres mennyiségű vízzel hígítva újra kicsapjuk. Centrifugálás vagy szűrés után egy ízben acetonnal, majd etiléterrel mossuk, szobahőmérsékleten vákuumban foszforpentoxid felett megszáritjuk, mérjük.

A prolamin kioldása után visszamaradt anyagot toluollal telített kb. 40 ml 0,2 százalékos vizes nátriumhidroxid oldattal 5 percig összedörzsölve vonjuk ki, a kioldást még 4—5 ízben megismételjük. Gabonaféléknél e kioldásra 60 százalékos etilalkoholban oldott 0,2 százalékos káliumhidroxidot használunk. Az egyesített oldatokat 0,2 százalékos sósavval 7 pH-ra semlegesítjük, amikor a glutelin kicsapódik.

Másnap leszűrjük, vagy lecentrifugáljuk, kevés desztillált vízzel mossuk, a leírt lúgoldatban újra oldjuk, neutralizálással újra kicsapjuk. E tisztítást megismételve a glutelint vákuumszáritóban foszforpentoxid felett legfeljebb 40 C° hőmérsékleten megszáritjuk, mérjük. A glutelin kioldása után visszamaradt anyagot kiszáritása után lemérjük, egyenletesre eldörzsöljük és mért részlegében Kjeldahl szerint meghatározzuk a nitrogént, amit az egész maradékra vonatkoztatva mint oldhatatlan szkleroprotein-nitrogén-t adunk meg.

Az összes értékeket százalékokban fejezzük ki a kiindulási anyagra vagy a szárazanyagra számítva. Hogy azonban jól összehasonlítható értékekhez jussunk, összeadjuk a meghatározott fehérjefrakciók százalékos mennyiségét és most már erre az adatra vonatkoztatva számítjuk ki az egyes frakciók százalékos mennyiségét, azaz feltüntetjük, hogy a kérdéses növényi anyag oldható fehérjében az egyes frakciók hány százalékban vannak jelen. Itt közlöm néhány élelmiszerként használatos

Egyes növényi élelmiszerek fehérje frakciói

	A légszáraz anyagban %							Az oldható fehérjében %				
	Albu- min	Globu- lin-1	Globu- lin-2	Prola- min	Glute- lin	Oldható fehérje	Váz- fehérje N	Albu- min	Globu- lin-1	Globu- lin-2	Prola- min	Glute- lin
Bánkúti búza	0,6	1,1	0,5	5,6	5,2	13,0	0,2	4,3	8,2	4,0	43,7	40,1
Fehér csillagfűrt, Kisvárdá ..	3,7	3,5	25,1	1,3	7,1	40,7	0,03	9,0	8,7	61,8	3,1	17,4
Sárga csillagfűrt, Gyulatanya .	0,6	4,6	27,0	0,9	7,3	40,4	0,04	1,5	11,5	66,9	2,1	18,1
Zöldborsó	3,0	2,0	7,4	0,4	5,4	18,2	0,01	16,6	11,1	25,6	2,1	29,8
Sárgaborsó	1,2	2,2	20,3	0,6	6,6	30,9	0,03	4,0	7,1	65,8	1,9	21,3
Fehérbab	2,5	3,4	17,2	0,6	8,1	31,8	0,2	6,0	10,9	55,7	1,8	25,6
Tarkabab	0,6	4,5	15,4	0,9	4,6	26,0	0,1	2,3	17,4	59,5	1,1	17,6
Szójabab	1,0	2,6	31,3	0,01	1,0	35,9	0,1	2,9	7,2	87,0	0,2	2,7
Lencse	0,2	4,1	17,4	1,3	2,5	25,5	0,2	0,8	16,2	68,4	5,1	9,7
Ella burgonya	0,05	0,4	0,08	0,03	0,04	0,6	0,1	8,5	67,2	13,2	4,7	6,5

növénynek a leírt eljárással meghatározott fehérje frakciói táblázatos összeállítását (1. táblázat).

A táblázatból kiderül, hogy a fehérjefrakciók meghatározása alkalmas módszer arra, hogy egy növényi fehérje eredetere következtethessünk, ha az nem denaturálódott túlságosan nagy mértékben. Pl. jelentős különbségeket láthatunk a fehérvirágú csillagfürt és a sárgavirágú csillagfürt között az albumintartalomban. Hasonlóképpen a zöldborsó és a sárgaborsó közt, különösen az albumin : globulin arány között feltűnő az eltérés. Ugyanezt láthatjuk a fehérbab és tarkabab fehérje frakciói esetében is, míg a lencsénél az albumin : globulin hányados még az 0,01 értéket sem éri el.

2. táblázat

Az albumin : glutelin hányados

Búza	0,35	Fehérbab	0,01
Fehér csillagfürt	0,12	Tarkabab	0,03
Sárga csillagfürt	0,02	Szójabab	0,03
Zöldborsó	0,45	Lencse	0,01
Sárgaborsó	0,06	Ella burgonya	0,11

Érdekeség szempontjából közlök néhány, az irodalomban a fehérje frakciókra vonatkozólag található adatot (4). Búza : összes fehérje : 10—15 %, ebben albumin : 3—5 %, globulin : 6—10 %, prolamin : 40—50 %, glutelin : 30—40 %. Sárga csillagfürt : összes fehérje : 40 %, ebben albumin : 1 %, globulin : 78 %, prolamin nincs, glutelin : 16 %. Szójabab : összes fehérje : 30—50 %, ebben albumin : kevés, globulin : 85—95 %, prolamin, glutelin : nincs. Amint látható, adataim nem minden esetben egyeznek meg az irodalmi adatokkal, aminek oka részben az eltérő származású növényi nyersanyagban, részben az eltérő meghatározási eljárásban van. Ugyanis csak akkor kaphatunk összehasonlítható és reprodukálható eredményeket, ha szigorúan betartjuk az előírt követelményeket. Nagyon fontos, sőt döntő befolyása van a kioldásra használt só természetének, az oldat töménységének, hőmérsékletének, hidrogénion koncentrációjának, az időtartamnak, a kisózás módjának, mikroorganizmusok behatása kiküszöbölésének, vizsgálati anyag előkészítésének, a fehérjék esetleges denaturálódásának stb.

Az előzőekben ismertetett eljárás némi módosításon megy át, ha burgonya fehérje frakcióit akarjuk meghatározni. Egészen a legújabb időkig azt hitték, hogy a burgonya fő fehérjefrakciója a tuberin, egy könnyen oldható globulin, a mi nomenklaturánk

szerint globulin-1, ami mellett még igen kis mennyiségben albumin fordul elő. Csak 1953-ban számolt be *Schwarze* arról (5), hogy papiroselektroforézissel a burgonya fehérjéjét biztosan négy frakcióra lehet szétválasztani, egy ötödik frakció létezése bizonytalan. E közlés alapján megkíséréltem a burgonya fehérjefrakcióit izolálni. Sikerült először négy (6), majd később öt frakcióját elkülönítenem és ezzel *Schwarze* papiroselektroforetikus megállapítását a frakciók tényleges előállításával megerősíteni. A burgonyafehérje frakcionálását megnehezíti az a körülmény, hogy a burgonya fehérjetartalma viszonylag igen csekély, másrészt szerencsésen megkönnyíti az, hogy e csekély mennyiség túlnyomó része a burgonya levében már oldatban van, aránylag keveset kell kioldani a sejtekből. A módosított eljárás röviden a következő: 500 g burgonyát 5 g porított nátriumhidrogénszulfáttal együtt megreszelünk, a pépbe és a préslebe azonnal kevés kloroformot keverünk bele. A pépet nagy porcelán mosárban 100 g mosott finom kvarchomokkal összekeverve 4 ízben az ismert módon összedörzsöljük 100 ml 1 százalékos, előzetesen toluóllal telített, 5,7 pH-ra beállított káliumszulfát oldattal, a kivonatokat a préslehez adjuk. Az oldathoz 40 százalékos telítettségig szilárd ammonszulfátot adunk hogy a tuberint kicsapjuk és másnap leszűrjük. A szűrletből 80 százalékos telítéssel az albumint csapjuk ki, majd másnap szűrjük. A tuberint 1 százalékos káliumszulfát oldatban, az albumint desztillált vízben oldjuk és a megfelelő telítettségi fokokon ammonszulfáttal újra kisózzuk őket, az ismert módon dializáljuk, szárítjuk, mérjük. Közben a pépmaradékból a rendes eljárásnál alkalmazott módon 5,7 pH-ra beállított, toluóllal telített 5 százalékos káliumszulfát oldattal kioldjuk a globulin-2-t, 70 százalékos etilalkohollal a prolamint, 60 százalékos etilalkoholban oldott 0,2 százalékos káliumhidroxiddal a glutelint, az ismert módon tisztítjuk őket, végül meghatározzuk az oldhatatlan vázfehérje nitrogénjét.

A tárgyalás folyamán állandóan szerepelt az ammonszulfátos kisózás 40, 60, 80 százalékos telítettségi fokkal. A telítés mértékéül tekintik azt az értéket, amit egy bizonyos oldathoz telített kisózó oldat hozzáadásakor kapunk, tekintet nélkül a fellépő térfogatváltozásra. Így pl. 1 térfogat víz + 1 térfogat telített ammonszulfát oldat összekeverésével kapott oldatot fél vagy 50 százalékos telítettségűnek tekintjük. Kényelmesebb és gazdaságosabb a telített oldat helyett a szilárd sót hozzáadni, azonban ilyen esetben is megtartjuk a telítettségi fok fogalmát. A számítás a következő (7):

X g sót kell adni 100 ml S_1 telítettségű oldathoz, hogy S_2 telítettségű oldatot kapjunk :

$$X = \frac{0,1 G \cdot (S_2 - S_1)}{1 - \frac{VG}{1000} \cdot S_2},$$

ahol G az ammónszulfát mennyisége g-okban 1000 ml telített oldatban,

V az ammónszulfát látszólagos fajlagos térfogata a telített oldatban.

G , V és $\frac{VG}{1000}$ értékei a 3. táblázatból vehetők ki.

3. táblázat

Telített vizes ammónszulfát oldatok különböző hőmérsékleten

Hőmérséklet C°	0	10	20	25	30
Molekula $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1000 g vízben	5,35	5,53	5,73	5,82	5,91
g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1000 g víz- ben	706,95	730,73	757,16	769,05	780,95
Súly %	41,42	42,22	43,09	43,47	43,85
Sűrűség	1,2428	1,2436	1,2447	1,2450	1,2449
g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1000 ml oldatban	514,72	525,05	536,34	541,24	545,88
Molekula $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1000 ml oldatban ..	3,90	3,97	4,06	4,10	4,13
g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot kell adni 1000 ml vízhez (G) ..	706,86	730,53	755,82	766,80	777,55
Látszólagos fajlagos tér- fogot a telített oldat- ban (V)	0,5262	0,5357	0,5414	0,5435	0,5458
$\frac{V \times G}{1000}$	0,271	0,281	0,290	0,294	0,298

ÖSSZEFOGLALÁS

A közölt eljárás alapján meglehetősen egyszerűen, reprodukálható módon és megfelelő pontossággal meghatározhatjuk valamely növényi termék oldható fehérjetartalmát és annak frakcióit. E frakciók több komponensből állhatnak ; ha jól definiált fehérjéket akarunk előállítani, sokféle és hosszadalmas tisztítási műveleteket kell elvégezni és még akkor is kiderülhet egy kristályosított fehérjéről is, hogy elektroforetikus vagy ultracentrifugás szedimentálással több összetevőből állónak bizonyul. Ezek ellenére a módszer összehasonlító és tájékoztató ismeretek

szerzésére teljes mértékben alkalmas, bár az ismételt kisózás vagy kicsapás és dialízis ellenére előfordulhat, hogy a frakciókban a fehérje mellett még nagymolekulájú szénhidrátok vagy pektinanyagok is jelen vannak, de ez a lehetőség a klasszikus frakcionálási eljárásnál is fennáll.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Й. Корпацу

Сообщенным способом возможно просто, воспроизводимо и достаточно точно определить содержание растворимых белков и их фракции в растениях. Фракции состоят из нескольких компонент; если необходимо приготовить дефинированные белки для этого необходимо произвести продолжительную очистку и несмотря на это, может получиться, что и кристаллизованные белки по способу электрофореза или ультрацентрифугирования состоят из нескольких составных частей. Несмотря на это, предложенный метод вполне пригоден для понятия и сопоставления. Возможно, что несмотря на повторные осаждения и диализирования может получиться, что в отдельных фракциях кроме белков находятся высокомолекулярные углеводы или пектиновые вещества, но это возможно также и при классических методах фракционирования.

FRAKTIONIERUNG PFLANZLICHER PROTEINE

von I. Korpáczy

Auf Grund des mitgeteilten Verfahrens kann der lösliche Proteingehalt eines pflanzlichen Produktes und dessen Fraktionen einfach, reproduzierbar und mit genügender Genauigkeit bestimmt werden. Die Fraktionen können aus mehreren Komponenten bestehen. Will man gut definierte Proteine darstellen, muss man vielerlei und langwierige Reinigungsverfahren anwenden und selbst in diesem Falle kann es sich von einem kristallisierten Protein herausstellen, dass es elektrophoretisch oder durch Sedimentierung vermittelt der Ultrazentrifuge geprüft, aus mehreren Komponenten besteht. Trotz alledem ist die Methode zur Gewinnung vergleichender und orientierender Kenntnisse durchaus geeignet; es kann zwar trotz wiederholter Fällung und Dialyse vorkommen, dass in den Fraktionen neben dem Protein noch grossmolekulare Kohlenhydrate oder Pektinstoffe zugegen sind, doch besteht diese Möglichkeit auch bei dem klassischen Fraktionierungsverfahren.

IRODALOM

- (1) *Osborne T. B.*: The vegetable proteins. 2-nd Ed. Longmans, Green and Co. London—New York. 1924.
- (2) *Lindner K., Jaschik S. és Korpáczy I.*: Egyes hazai élelmiszer-fehérjék aminosav összetétele. Közlés alatt.
- (3) *Lócsa A.*: Hazai rizsek fehérjefrakcióinak vizsgálata. Agrokémia és Talajtan. 2, 147, 1953.
- (4) *Neurath H. és Bailey K.*: The proteins. Academic Press Inc. New York. II. a. kötet. 1953.
- (5) *Schwarze P.*: Die Zerlegung des Eiweisskomplexes der Kartoffelknolle durch Papierelektrophorese. Naturwissenschaften. 40, 21, 1953.
- (6) *Lindner K., Jaschik S., Korpáczy I., Polner R., Várdi P.*: A magyar burgonya táplálkozási értéke. Növénytermelés. 3, 261, 1954.
- (7) *Neurath H. és Bailey K.*: Idézett mű I/a kötet.