

## Új technika búzafehérjefrakciók elválasztására molekulaszűréssel

VARGA JÁNOS

Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémiai Tanszék

Érkezett: 1968. március 11.

Preparatív célokra alkalmas mennyiségű fehérjefrakciókat búzalisztekből kiindulva *Osborne* (1), *Pence* és *Eller* (2) klasszikus eljárásával, továbbá *Hess* (3) szedimentációs eljárásával nyerhetünk. E módszereken túlmenően egyéb frakcionálási eljárások is alkalmazhatók. Törekvés egységes frakciók nyeresére a tanszékünkön folyó kiterjedt búzafehérjekutatás során is sokféle frakcionálási mód kipróbálását eredményezte. E frakcionálások változatossága számos közleményben leírt munkából tűnik ki (4, 5, 6, 7, 16).

Az így kapott frakciók nem egységesek. Ezt bizonyítják azok a gélelektroforézises vizsgálatok, melyek búzalisztből kivont fehérjékben 15–20 frakciót mutattak ki (8, 9). Az elektroforézises elválasztás a fehérjék elektrokémiai sajátosságain alapul. Alkalmazása fehérjék finomabb frakcionálására elterjedt. Egyes változatai mikropreparatív célokra is felhasználhatók. Hatásfoka lényegesen növelhető, ha molekulásúly szerinti elválasztás is megelőzi.

A dextrángéleken („Sephadex”) (10) történő molekulanagyság szerinti fehérjefrakcionálás nagy lépéssel segítette elő e feladat megoldását. A modern biokémiai elválasztástechnikában a gélszűrés egyre inkább alkalmazott módszerré válik. A növekvő népszerűség oka, hogy bonyolult anyagkeverékek molekulaméret szerinti elválasztását a hasonló célú eszközökhöz képest (pl. ultracentrifuga) gazdaságosan és kíméletesen oldja meg. Biokémiai módszerként történt bevezetése óta számos vizsgálatnál sikeresen alkalmazták a gélszűrést. Sótalanításra, frakcionálásra, szennyvezések eltávolítására egyaránt alkalmas ez az eljárás.

A gabonafehérjék vizsgálatába is bevonult ez a módszer. Az utóbbi években számos közlemény jelent meg, amelyek a búzafehérjék frakcionálásának eredményeiről számoltak be (11, 12, 13). A gélszűrés lehetővé teszi, hogy olyan mennyiségben nyerjünk fehérjefrakciókat, hogy azokból további vizsgálatokat (végcsoport, aminosavösszetétel, gélelektroforézis) elvégezhessük. A búzafehérjék esetében a gélszűrést Al-laktátban, ecetsav-karbamid pufferben történő oldás után G–100 vagy G–200 jelzésű kevés keresztkötetést tartalmazó, laza típusú gélen végzik el. A frakciók eloszlását 280 nm-es hullámhosszon történő méréssel lehet meghatározni, az egyes rész-eluátumokból. A frakciók megjelenését és a frakcionálás befejeztét fehérje-színreakciós vizsgálattal ellenőrzik. A búzafehérjék vizsgálatánál (és más fehérjék esetében is) az ilyen jellegű gélszűrés fáradtságos, állandó ellenőrzést kíván és bizonyos bizonytalanságot rejt magában. Ha nem ismeretes a fehérje molekulásúlya, akkor a megfelelő gél kiválasztása is hosszadalmas probléma. Az egyes elválasztott frakciók további vizsgálata betöményítés után lehetséges és minden ilyen lépés veszteséget okoz. Ezen hátrányok kiküszöbölésére vetődik fel az egyes frakciók vizuális észlelésének biztosítása már az oszlopon. Így jutottam el a gélszűrés új technikájához, melyet a dinitrofenilezett fehérjék (továbbiakban: DNF-fehérje) frakcionálása jelent.

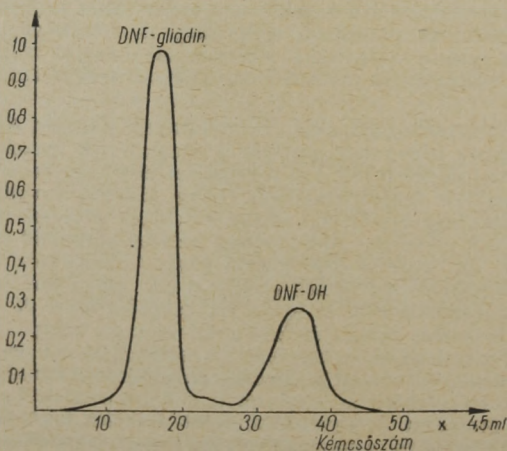
## 1. A DNF-fehérjék eluens oldószerének (puffer) kiválasztása

Közismert, hogy a DNF-fehérjék oldhatósága rosszabb, mint kezeletlen fehérjéké. A gelszűrésnél általában alkalmazott pufferekben (Al-laktát; ecetsav, karbamid stb.) a DNF-fehérjék nem oldódnak. Probléma továbbá az is, hogy a használt puffernek a gél duzzadását is biztosítania kell. Több oldószer kipróbálása után végül is sikerült ezt a problémát is megoldani. Piridin-ecetsav-víz elegye a célnak igen jól megfelel. A puffer összetétele 400 ml piridin + 20 ml ecetsav + 580 ml desztillált víz. Ha a DNF-fehérje oldódása nehezen indul, akkor célszerű kevés piridinben duzzadni hagyni, majd a puffer hozzáöntésével feloldani. A tapasztalatok eddig igen kedvezőek az egyes DNF-fehérjefrakciók oldását illetően. A puffer jól biztosítja a gél duzzadását is.

## 2. A megfelelő Sephadex-gél kiválasztása

Az elővizsgálatok során Sephadex G-25, G-50, G-100 és G-200-as gél próbáltam ki. A vizsgálatokhoz DNF-gliadin frakciót használtam. A frakciót előzőleg dörzsmosárban alkohol-éter (1:1) keverékével ismételtelen eldörzsöltem. Végül éterrel is többször kimostam. A szárított DNF-gliadint azután a fenti pufferben oldottam (4-5 ml-ben 20-40 mg-ot).

G-25-ös Sephadex gélből 2 cm  $\varnothing$ -jú 70 cm hosszú oszlopot készítettem. A géltre 4 ml pufferben oldott 30 mg DNF-gliadint vittem fel. A gél felett kb. 2 mm-es puffert célszerű hagyni és az oldott anyagot *óvatosan* pipetta segítségével aláretegezni. A felvitel után megvárjuk, amíg a teljes anyagmennyiség a gél felső részébe húzódik, majd óvatosan tiszta puffert rétegezzük föléje. Megvárjuk, amíg a puffer 1-2 mm-nyire leviszi az oldott DNF-fehérje frontjának felső szélét és azután rákötjük az oszlopra a megfelelően összeszerelt, vízszlopnyomással működő puffertartályt. A csepegés sebessége 5 ml/10 perc volt. Az egyes frakciókat frakciógyűjtővel kémcsövekben gyűjtöttem össze. Az egyes minták extinkcióját közvetlenül mértem, „Spektromom 360”-as készü-

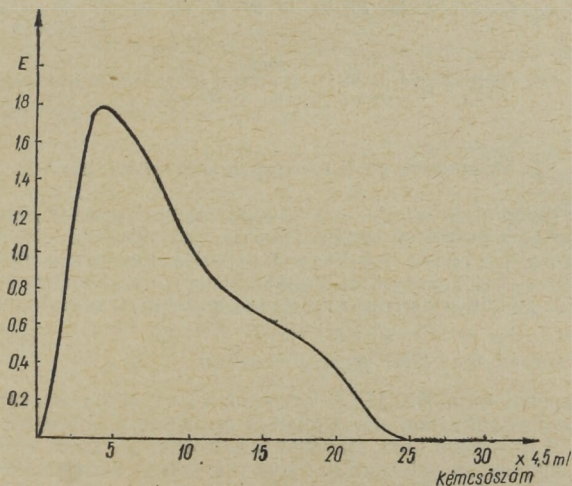


1. ábra  
BL 112 - DNF - gliadin tisztítása Sephadex G - 25-ös gélen oszlop mérete:  
2 x 70 cm



lékkel 380 nm-nél. Vakoldatként a puffert használtam. A 70 cm-es 2 cm  $\varnothing$ -jú oszlopról az első frakció megjelenése 72 ml puffer lecsepegése után következik be. A frakciókat a mért extinkció és a kémsószám függvényében az 1. ábrán láthatjuk. A II. frakció lassú mozgása igen kis molekulásúlyú termék jelenlétét mutatta. E frakciót összegyűjtve és bepárlás után a DNF-terméket kicsapva hidrolízisnek vettem alá. Az éteres extrakt zömmel DNF-OH-t tartalmazott, ami arra mutat, hogy a DNF-fehérjefrakció az alkoholos és éteres mosás ellenére is igen nagymennyiségű dinitrofluorbenzolt tartalmaz, valószínűleg adszorptív vagy gyenge kötással kapcsolódva! E kapcsolat a fehérje és dinitrofluorbenzol között a Sephadex G-25-ös oszlopon felbomlik és a szennyezés a DNF-fehérjétől elválik. Tulajdonképpen tehát a G-25-ös gélen a fehérje nem frakcionálódik, de megtisztul a nem  $-NH_2$  csoportokhoz kötődő dinitrofluorbenzoltól.

A G-25-ös gélről lejtött II. frakciót további frakcionálásra G-50, G-75 és G-100-as Sephadex géltre vittem fel. Az oszlopok hossza 90 cm volt. AG-50-es és G-75-ös oszlopon további frakcionálódás nem következett be. A G-100-as jelzésű gélen már gyorsabban mozgó és egy nyújtott frakció jeientkezik, de az elnyúlásnál kitüntetett maximum helyet nem észleltem. A frakcionálás eredményét a 2. ábrán szemléltethetjük.

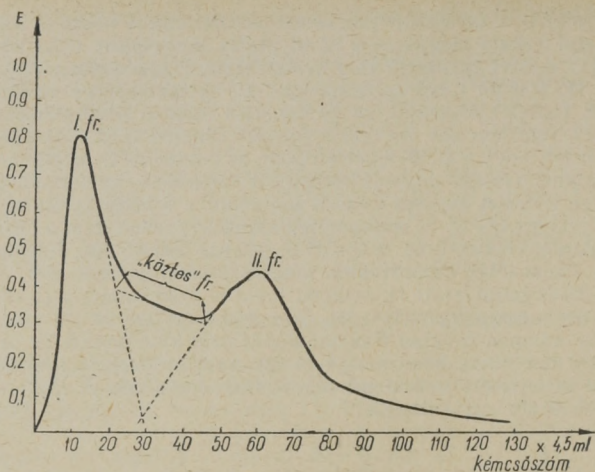


2. ábra

BL 112-DNF-gliadin Sephadex G-100-as gélen történő molekulaszűrés  
Oszlop mérete: 2x90 cm  
Kémsószám\*

Végül a G-25-ös gélről lejtött I. frakciót Sephadex G-200-as oszlopra vittem fel. Az oszlop ugyancsak 90 cm volt. A felvitt DNF-fehérje élesen további két frakcióra vált szét. Ezenkívül a két frakció között elnyújtott „köztes” frakciót is elkülönítettem. Kb. 60-80 ml puffer lecsepegése után jelent meg az I. frakció. A kémsóvekbe frakciószedővel 4,5-4,5 ml-t gyűjtöttem össze. A frakciók fehérjetartalmának eloszlását a 3. ábra mutatja.

\* A kémsószám ezen és utána valamennyi ábrán csak a frakciók megjelenésétől lett számozva.



3. ábra  
BL 112 – DNF-gliadin Sephadex G – 200-as gélen történő molekulaszűrése  
Oszlop mérete: 2 x 90 cm

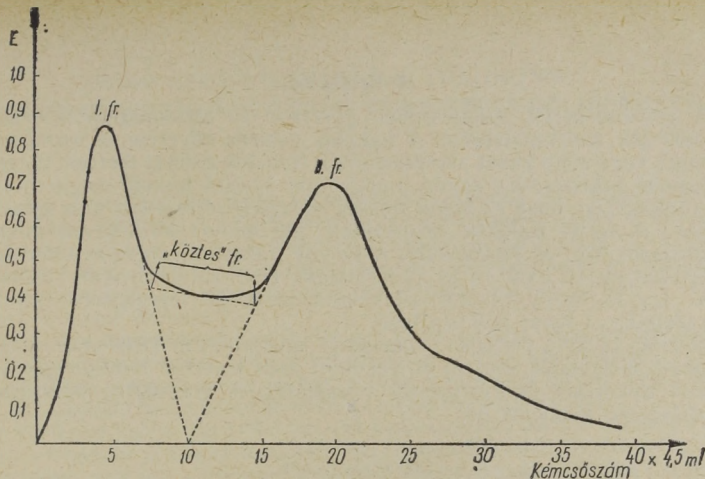
### 3. Vizsgálatok adott búzafajták DNF-gliadinjával

A modellvizsgálatok után arra a következtetésre jutottam, hogy az egyes DNF-gliadinokat a pufferben történt feloldás után először G – 25 jelzésű gélen tisztítottam, majd a lejövő első frakciót bepárlás, kicsapás és újraoldás után G – 200 oszlopon vizsgálom tovább. Vizsgálatomhoz Szkoroszelka és Bezosztaja lisztjéből nyert gliadinok dinitrofenilezett származékaival végeztem kísérleteket.

#### 3.1. „Szkoroszelka” DNF-gliadin vizsgálata

Szkoroszelka búza BL 112-es lisztjéből sikért, majd a sikérből 70%-os alkohollal gliadint állítottam elő. A gliadint újraoldással és ismételt kicsapással tisztítottam. A lipidokat absz. etanollal távolítottam el. Végül a tisztított gliadint 70%-os alkoholban oldottam és Varga (14) szerint dinitrofenileztem. A kapott DNF-gliadint alkoholos és éteres mosás után a gélszűrés pufferében (lásd 1.) oldottam (40 mg DNF-gliadint 5 ml pufferben). A kapott oldatot a már ismertett módon a G – 25-ös Sephadex gélt tartalmazó oszlopra vittem. A lejött I. frakciót (30 ml) vízfürdőn 2 – 3 ml-re bepároltam, majd desztillált vízzel 3 – 4-szeresére hígítottam. A kicsapódott DNF-gliadint centrifugáltam és újra oldottam a piridin tartalmú pufferben. Ezután az oldatot G – 200-as géloszlopra rétegeztem. A G – 200-as oszlop méreteit már úgy választottam meg, hogy preparatív mennyiségek nyerése is lehetővé váljon. Az oszlop 120 cm magas és 4 cm Ø-jű volt. A csepegés sebessége 10 – 15 ml/óra. A puffer csepegését a hőmérséklet ingadozás befolyásolja. Alacsonyabb hőmérsékleten (éjszaka) a puffer megnövekedett viszkozitása miatt a csepegés sebessége 15 ml/órától 10 ml/óra alá csökkent. (Ezt a továbbiakban köpenyvel ellátott, hűthető és fűthető oszloppal küszöbölöm ki.) Az I. frakció kb. 450 – 500 ml puffer lecsepegése után jelent meg. A lejövő frakciók a 4. ábrán láthatók.



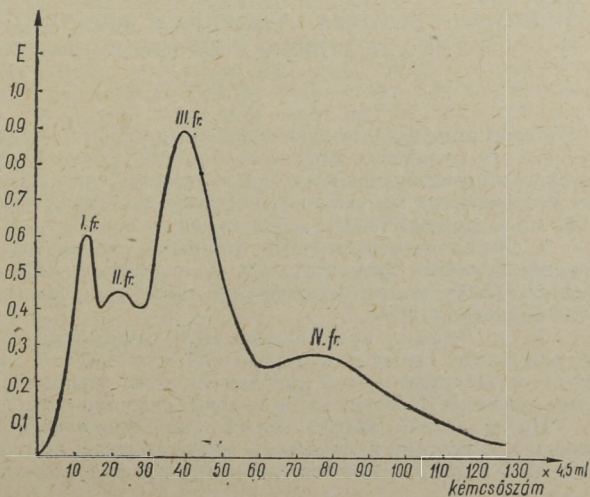


4. ábra  
Szkoroszelka DNF-gliadin Sephadex G-200-as gélen történő molekulaszűrése  
Oszlop mérete:  $4 \times 120$  cm

### 3.2. „Bezostaja” DNF-gliadin vizsgálata

A gliadin frakciót Bezostaja búza BL 112-es lisztből állítottam elő a „Szkoroszelka” gliadin előállításával azonos módon. Dinitrofenilezés, tisztítás után a DNF-gliadint a pufferben oldottam és G-25-ös oszlopon a DNFB-től elválasztottam. Bepárlás és kicsapás után ismét oldottam a pufferben, majd az I. frakció frakcionálást Sephadex G-200-ason ismételt meg (a felvitt DNF-gliadin mennyisége 50 mg/5 ml puffer volt). Az első frakció megjelenése itt hamarabb bekövetkezett (360 ml-nél már megjelent), mint a „Szkoroszelka”-gliadin esetében. Ez arra mutat, hogy a különböző búzafajtákból származó frakciók molsúlyában már eltérések vannak. További megfigyelés az volt, hogy a „Bezostaja”

DNF-gliadinből négy frakció különült el. Az egyes frakciók extinkciói a lejött puffert tartalmazó kémcsövek számának függvényében az 5. ábrán láthatók.



5. ábra  
Bezostaja DNF-gliadin  
Sephadex G-200-as  
gelen történő molekulaszűrése Oszlop mérete:  
 $4 \times 120$  cm

#### 4. Értékelés

A gabonafehérjék gélzürésének gyorsabb és biztonságosabb formája a DNF-fehérjék molekulaszürése. A frakciók vizuális követése az oszlopon lehetővé teszi, hogy előre képet alkothassunk a frakciók számát illetően. Elegendő a frakciószedő bekapcsolása akkor, amikor már az első frakció megjelenése várható. (Tekintettel, hogy az összes frakció lejövetele több napot vesz igénybe, ez lényeges.) A lejött frakciók extinkcióját 380 nm-nél közvetlenül mérhetjük „Spektromtom 360”-as készülékkel. A kapott frakciókat kicsapás után azonnal hidrolizálhatjuk HCl-val és az N-terminális DNF-aminosavakat meghatározhatjuk. Így az egyes frakciók szétválasztásának és végcsoportvizsgálatának összes ideje kb. a felére csökkenthető.

Munkám további részében valamennyi fehérjefrakció DNF-származékainak gélzüréses vizsgálatát végzem el, valamint ezen frakciók N-terminális aminosavainak kvalitatív és kvantitatív vizsgálatát. A vizsgálatok eredményeiről folytatólagosan számolok be.

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

- (1) Osborne, T. B.: The Protein of the Wheat Kernel. Abderhalden, E.: Handbuch Biol. Arbeitsmethoden. Abt. 1. 8. Berlin. 1955.
- (2) Pence, J. W. — Elder, A. H.: *Cer. Chem.* 30, 275. 1953.
- (3) Hess, K.: *Kolloid Zeitschrift.* 136, 93. 1954.
- (4) Lásztity R. — Nedelkovits J. — Szabó L. — Winkler M.: *ÉVIKE* 11, 50. 1965.
- (5) Lásztity R.: *Sütőipar.* 12, 57. 1966.
- (6) Meredith, P.: *Cer. Chem.* 42, 64. 1965.
- (7) Meredith, P. — Sammons, H. G. — Frazer, A. C.: *J. Sci. Food Agric.* 11, 328. 1960.
- (8) Meredith, P.: *Cereal Chem.* 42, 54. 1965.
- (9) Elton, G. A. — Ewart, J. A. D.: *J. Sci. Food Agric.* 13, 62. 1962.
- (10) Coulson, B. G.: — Sim, A. K.: *Biochem. J.* 80, 46. 1961.
- (11) Porath, J. — Flodin, P.: *Nature.* 183, 1657. 1959.
- (12) Jones, R. W. — Babcock, G. E. — Tylor, N. W. — Dimler, R. J.: *Cer. Chem.* 40, 409. 1963.
- (13) Oka, S. — Babel, F. J. — Drandt, H. N.: *Journ. Food Sci.* 30, 215. 1965.
- (14) Winzor, D. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 173, 421. 1966.
- (15) Varga J.: *ÉVIKE* 12, 240. 1966.
- (16) Telegdy — Kováts L. — Lásztity R.: *Periodica Polytechnica* 9, 253. 1965.

### НОВАЯ ТЕХНИКА ОТДЕЛЕНИЯ ФРАКЦИЙ ПШЕНИЧНОГО БЕЛКА ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Я. ВАРГА

Автор разработал новую технику отделения фракции пшеничного белка, гелевой фильтрацией производных-ДФ фракций получил буферный элюат, который хорошо растворяет белковых фракций-ДФ, а также отлично обеспечивает и набухание геля Сефадекс. Состав буфера: 400 мл пиридина + 20 мл уксусной кислоты + 580 мл воды.

В опытах на модели автор установил, что на Сефадекс геле Г-25 очищается белковая фракция-ДФ от излишнего ДФБ. После испытания нескольких гелей для целей фракционирования, самым лучшим оправдался гель Сефадекс - 200.

Автор испытал производную ДФ глиадин у двух пород пшеницы. В результате испытания определили, что глиадин Скороспелки дает две строго разделимые и одну „промежуточную” фракцию. При испытании глиадин пшеницы Безостая автор заметил сходство четырёх фракций.

Преимущество метода: визуальная сложность фракций, непосредственное измерение количества в видимом свете, обратное получение фракций ДФ и выполнение испытания непосредственно концевой группы.



## EINE NEUE TECHNIK ZUR TRENNUNG VON WEIZENEIWEISSFRAKTIONEN VERMITTELS GELFILTRATION

*J. Varga*

Verfasser arbeitete eine neue Technik zur Trennung der Weizeneiweissfraktionen aus; vermittels der Gelfiltrierung der DNF-Derivate der Fraktionen stellte er einen solchen eluenten Puffer zusammen, welcher die DNF-Eiweissfraktionen gut löst. Auch die Schwellung des Sephadex-Gels wird in demselben vorzüglich ermöglicht. Zusammensetzung des Puffers: 400 ml Pyridin + 20 ml Essigsäure + 80 ml Wasser.

Anhand von Modellversuchen stellte der Verfasser fest, dass am Sephadex-Gel G-25 eine Reinigung der DNF-Eiweissfraktionen vom überflüssigen DNFB stattfindet. Nach Ausprobierung mehrerer Gele erwies sich für die Fraktionierung das mit G-200 bezeichnete Sephadex-Gel besonders vorteilhaft.

Der Verfasser prüfte das DNF-Derivat von Gliadinen zweier Weizensorten. Als Versuchsergebnis stellte er fest, dass das Gliadin der Sorte Skorospelka zwei scharf getrennte und eine „mittlere“ Fraktion lieferte. Aus dem Gliadin der Sorte Besostaja konnte die Absonderung von vier Fraktionen beobachtet werden.

Vorteile der Methode: Möglichkeit visueller Verfolgung der Fraktionen, unmittelbare Messung der Mengen im sichtbaren Licht, Wiedergewinnung der erhaltenen DNF-Fraktionen und Durchführung einer unmittelbaren Prüfung der Endgruppen.

## A NEW TECHNIQUE FOR THE SEPARATION OF WHEAT PROTEIN FRACTIONS BY MOLECULAR FILTRATION

*J. Varga*

A new technique was evolved by the author for the separation of wheat protein fractions. By the gel filtration of the DNF derivatives of the fractions an eluent buffer was obtained which is capable of readily dissolving the DNF protein fractions and promotes the swelling of Sephadex gel. The composition of the buffer is: 400 ml. of pyridine + 20 ml. of acetic acid and 580 ml. of water.

It was found in model experiments that the DNF-protein fractions can be purified on Sephadex G-25 gel which separates excess DNFB. After testing a number of gels, Sephadex G-200 proved to be the best suitable one for the purposes of fractionation.

The gliadin-DNF derivatives of two wheat varieties were investigated by the author. The experimental results proved that the gliadin of the Skorospelka variety yields two sharply separating and one "intermediate" fractions while the gliadin of the wheat variety Bezostaya gave four different fractions.

The method offers the following advantages: the amount of the fractions can be followed visually, the amounts can be measured directly in the visible region, the obtained DNF fractions can be recovered and it is possible to conduct a direct investigation as regards terminal groups.

## NOUVEAU PROCÉDÉ POUR LA SÉPARATION DES FRACTIONS DE PROTÉINES DU BLÉ PAR FILTRATION MOLÉCULAIRE

J. Varga

L'auteur a élaboré un procédé nouveau pour la séparation des fractions de protéines du blé. Il a préparé par filtration gélifique des dérivés DNF des fractions un tamponéluant qui dissout bien les fractions des protéines DNF et dans lequel le gonflement du gel Sephadex est bien assuré. La composition du tampon est 400 ml de pyridine + 20 ml d'acide acétique + 580 ml d'eau. Avec des expériences faites sur des modèles il a été établi que sur le gel Sephadex C-25 il se produit la purification des fractions de protéines DNF du DNFB en surplus. Après l'essai de plusieurs gels c'est le gel Sephadex C-200 qu'il a trouvé comme le meilleur pour ce but.

L'auteur a examiné le dérivé DNF de la gliadine de deux espèces de blé. Il a établi que la gliadine du blé Szkoroszelka a donné deux fractions nettement séparées et une fraction «intermédiaire.» Il a observé la formation de quatre fractions dans le cas de la gliadine du blé Begosztaja.

Les avantages de la méthode sont: l'on peut suivre visuellement les fractions, le mesurage direct des quantités à la lumière visible, la récupération des fractions DNF obtenues et l'examen direct du radical final.

### A szerkesztőbizottsághoz a következő dolgozatok érkeztek:

*Edelényi Miklós:* Tankpezsgőgyártás mikrobiológiai ellenőrzése 2, 3, 5-trifenil-tetrazólium-klorid (TTC) segítségével (1968. júl. 13.).

*Gál Ilona Emma:* Biológiai aktív kapszicidin kimutatása és meghatározása paprikában agárdifúziós módszerrel (1968. júl. 18.).

*ijj. Sarudi Imre:* Módosított vízgőzdesztillációs eljárás gyümölcszörpök hangsavtartalmának meghatározására (1968. júl. 20.)

*Cserháti Tibor:* Tejto.mpitás ellenőrzése differenciál spektrofotometria segítségével (1968. júl. 25.)

*Török Attiláné:* L-aszkorbinsav meghatározás növényekben polarográfiásan (1968. aug. 2.)

*Gábor Miklósné:* Növények egyes flavonoid vegyületeinek hatása a C-vitamin oxidatív átalakulására (1968. aug. 2.)

*Moldvai Rezső:* Kumisz és savanyútej készítmények (1968. aug. 3.).

*Bátyai Jenő, Miklya János és Nové László:* Húsipari termékek merkurimatriás klorid meghatározásáról (1968. aug. 11.).

*Vidéki László:* Mintavételi vizsgálatok görögdinnyével (1968. aug. 15.)

*W. Jurics Éva:* Egyes gyorsfagyasztott és friss zöldségfélék C-vitamin tartalmának összehasonlító vizsgálata nyers és főtt állapotban (1968. aug. 16.)