

## Hazai búzák lipoproteinjeinek vizsgálata II. A purotionin izolálásának metodikai problémái

BÉKÉS FERENC – MONORIS ÁNDOR

Budapesti Műszaki Egyetem Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

Érkezett: 1974. november 24.

Intézetünkben – a komplex búzafehérjekutatás keretében – intenzíven vizsgáljuk a búzalisztben található összetett fehérjék, elsősorban a fehérje-lipid kölcsönhatások összetételét, szerkezetét, illetve a liszt sütőipari minőségében játszott szerepüket. Ennek kezdeti eredményeiről *Lásztity* és *mtsai* számoltak be. (1)

Már a huszas évek elején *Woring* (2) megállapította, hogy a liszt foszfatid-tartalma és a lisztből készült sükér reológiai sajátságai között összefüggés van. Később *Mc Caig* és *Mc Calla* (3) kísérletei a jelenség okát is megadták: a búza-fehérjék foszfolipid jelenlétében történő hidratációja esetén kölcsönhatás lép fel, melynek során fehérje-lipid komplexek jönnek létre. Számos közlemény számol be arról, hogy a fehérje-lipid komplexek nagy szerepet játszanak mind a búzalisztből készült tészta technológiai sajátságaiban, mind a sütőipari termékek minőségének alakulásában. (4) *Rohrlich* és *Niederauer* vizsgálatai (5) azt igazolták, hogy a búzaliszt már eredendően tartalmaz fehérje-lipid komplexeket.

Az utóbbi két évtizedben e témával foglalkozó vizsgálatok közül ki kell emelni *Redman* és *Elton* (6) munkáját, akik a búzaliszt petroléteres extraktjából lipopurotionint állítottak elő, amelynek fehérjerésze, az először *Balls* és *Hale* (7) által izolált purotionin.

Ezt a fehérjét – amely aminosavösszetételét tekintve teljesen eltér a búzaliszt egyéb fehérjéitől – számos kutató behatóan tanulmányozta. (8, 9, 10, 11, 12) Molekulaszűrőssel, elektroforetikus frakciókra bontották, meghatározták bruttó aminosav összetételét, a C-terminális aminosavakat, megállapították, hogy a fehérje viszonylag nagyszámú ciszteinmolekulái között csak intramolekuláris diszulfidhidak alakulnak ki.

Karboximetil cellulóz oszlopon, gradienselúcióval sikerült a gélelektroforézis kísérletek során már megfigyelt  $\alpha$  és  $\beta$  purotionin elválasztása is. *Nimmo* és munkatársai (13) a purotionin fizikai tulajdonságainak részletes vizsgálatát végezték el, megállapítva a fehérjelánc konformációs sajátságait, a pontos molekulásúlyt stb.

*Pomeranz* összefoglaló munkájában (4) nem tartja bizonyítottnak a purotionin szerepét a sikérsajátságok kialakulásában, de az a tény, hogy a purotioninhoz kapcsolódó lipidkomponensek éppen a tészta sajátságait legjobban befolyásoló lipidosztályok – foszfo- és glikolipidek – tagjai, azt mutatja, hogy a purotioninnak, csekély mennyisége ellenére, fontos szerepet kell játszania a lisztminőség kialakításában.

Bár a búzaliszt összetett fehérjéi közül a lipopurotionint, ezen belül is ennek fehérjekomponensét ismerjük a legjobban, az anyag izolálásában, tisztításában még számos metodikai kérdés tisztázatlan. Ezt legjobban az szemlélteti, hogy szinte valamennyi szerző módosította az elődök módszereit.

Ezért, miután tisztáztuk, hogy a hazai búzáinkból készült lisztből, a külföldi szerzők által közölt adatokhoz igen hasonlóan viselkedő purotionin nyerhető (1), elsődleges célul tűztük ki, hogy a purotionin kinyerésének egyes lépéseit részletes vizsgálat tárgyává tegyük és az optimálisnak ítélt módszerekkel előállított készítmény vizsgálatát végezzük el. A purotionin előállítását 1972. évi termésű búzából készült BL – 112 típusú lisztből végeztük. A kinyerés lényegében *Balls* és *Hale* módszere (7) alapján történt.

Ebben a munkában a búzaliszt petroléteres extrakciójának és az extrakció során nyert búzaolaj sósavas hidrolízisének vizsgálati eredményeit ismertetjük.

### A búzaliszt petroléteres extrakciója

A búzalisztból sokféle szerves oldószerral végezték már extrakciót, (14, 15, 16) a lipidkomponensek kinyerése, illetve a liszt zsirtalanítása céljából. Általánosságban megállapítható, hogy univerzálisan alkalmazható extrahálószerek nem ismeretes, a gyakorlatban a petroléter, a kloroform és metanol 1:1 arányú elegye, valamint a vízzel telített n-butanol terjedt el (17). Utóbbi képes a legnagyobb számú lipidkomponens kinyerésére, de számos, nem lipid jellegű anyagot is kiold. A petrolétert előszeretettel alkalmazzák a liszt zsirtalanítására, mert alacsony forrtpontja révén könnyen visszanyerhető.

Egyszeri egyszerű extrakcióval a liszt petroléterben oldható komponensei nem távolíthatók el, ezért a teljes kioldás érdekében vagy ismételt extrakciót használhatunk, vagy elúciós módszert alkalmazhatunk: az üvegoszlopban levő lisztre mindaddig öntünk friss oldószert, amíg az oszlopot elhagyó folyadék már nem színeződik.

Esetünkben, amikor viszonylag nagy mennyiségű liszt feldolgozására került sor, indokoltnak tartottuk a petroléteres extrakció kvantitatív vizsgálatát, abból a célból, hogy a minimális idő- és oldószerráfordítással kapjuk meg a vizsgálatokhoz szükséges terméket.

Ezen célból – az elúciós módszert időigényessége és nehézsége miatt elvetve – a többszöri egyszerű extrakciót vizsgáltuk.

A felhasznált liszt adatai:

Nitrogéntartalom

(Kjeldahl szerint): (18) = 29,35 mgN/g sz. a.

Nyerszsirtartalom

(Besson szerint): (18) = 0,94%.

Az extrakciós kísérleteket a következőképpen végeztük:

2000 g BL – 112-es lisztet 1600 cm<sup>3</sup> petroléterrel (fp.: 50 – 60°) 5 literes állólombikban 2 órán át rázattunk, majd 15 perc dekantálás után Büchner-tölcséren szűrtük. A sárgás oldatot vákuumban desztilláltuk, és a visszamaradt búzaolajat vákuumszáritószekrényben 40 C°-on megszabadítottuk az oldószernyomoktól.

Minden extrakciós lépés termékéből az alábbi vizsgálatokat végeztük:

a liszt N- és nyerszsirtartalma:

a búzaolaj mennyisége; a lipidkomponensek minősége és arányai [*Malins* és *Mangold* vékonyrétegekromatográfiás módszerével (19)]; a búzaolajból acetonnal kicsapható foszfolipidek mennyisége; a foszfolipidfrakció összetétele; valamint

a búzaolaj bruttó zsírsavösszetétele, metilészterek gázkromatográfiás vizsgálatával.

Vizsgálatunk eredményeit az 1–3. táblázatban valamint az 1. és 2. ábrán foglaltuk össze.

1. táblázat

A búzaliszt nyerszsír-tartalmának változása az extrakció során

Minta	Nyerszsír-tartalom (%)	Az extrakció lépésenkénti összességelt határfoka (%)	
Eredeti liszt .....	0,94	—	—
I. extr. után .....	0,54	43,4	43,4
II. extr. után .....	0,28	29,6	73,0
III. extr. után .....	0,16	12,12	85,5
IV. extr. után .....	0,11	5,58	90,78
V. extr. után .....	0,08	2,34	93,12

2. táblázat

A búzaolajból acetonnal kicsapható foszfolipidek mennyisége

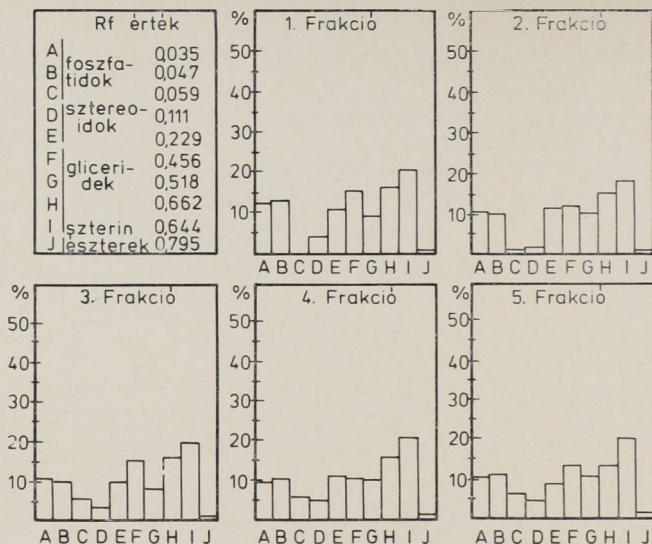
Minta	Foszfolipid g/100 g búzaolaj
I. extr. után .....	20,2
II. extr. után .....	20,3
III. extr. után .....	17,8
IV. extr. után .....	19,6
V. extr. után .....	18,0

3. táblázat

A búzaolajok bruttózsírsav összetétele %

Zsírsav	I. extr.	II. extr.	III. extr.	IV. extr.	V. extr.
14:0 .....	1,76	0,61	0,89	1,1	1,6
16:0 .....	20,0	18,2	24,3	21,4	23,7
18:0 .....	0,9	0,8	0,8	0,7	0,9
18:1 .....	17,6	16,3	14,0	15,5	21,3
18:2 .....	59,5	64,2	60,3	61,7	53,0

Az 1–3. táblázatok adatai, illetve az ábrák alapján megállapítható, hogy az egyes extrakciós lépések során kapott búzaolajok összetétele azonosnak vehető. Így a lépések számát a kinyerhető mennyiség, illetve a felhasználás módja dönti el. A 3. ábra segítségével az extrakciós kísérletek előre tervezhetők. Ha a búzaolaj kinyerése a cél – látható – nem érdemes kétszeri extrakciónál többet végezni, míg ha a liszt megfelelő mértékű zsírtalanítását akarjuk elérni, a diag-

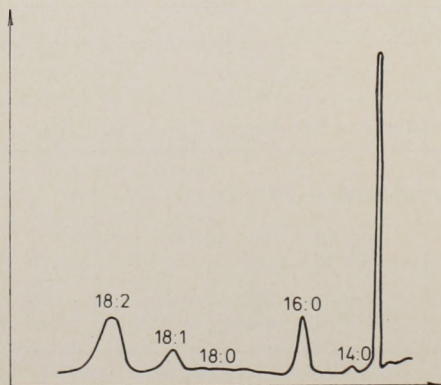


1. ábra

BL 11-es liszt petroléteres búzaolajának összetétele Vékonyrétegkromatográfiai módszerrel (Kieselgel hordozó, Futtatószer = éter: petroléter: ecetsav = 100:100:2)

Hívó: foszformolibdénsav 2%-os alkoholos oldata

Kiértékelés: Vitatron típusú denzitóméteren



2. ábra

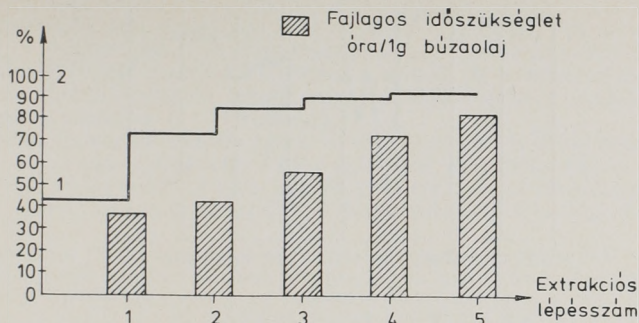
BL 112-es petroléteres búzaolajának zsírsav-metilészterei gázkromatográfiai analízissel

Készülék: CROM-3

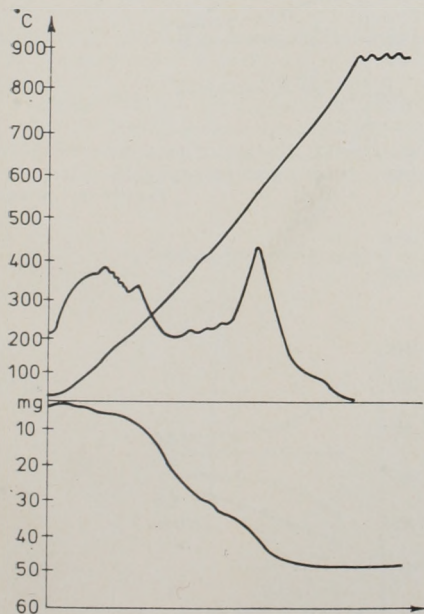
Kolonnatöltet: 10% glikol-szukcinát, Chromosorb W 100/120 mesh hordozón  
Lángionizációs detektor, a kolonna hőmérséklete 180°C A N<sub>2</sub> vívógáz sebessége 54 cm<sup>3</sup>/perc

ramról leolvasható, hogy hány lépéses extrakcióval csökkenthető a liszt lipidartalma a kívánt szint alá.

Ezek alapján 300 g liszt kétszeri extrakciójával 2150 g búzaolajat izoláltunk.



3. ábra  
BL 112-es liszt petroléteres többszöri egyszerű extrakciójának összefoglaló diagramja

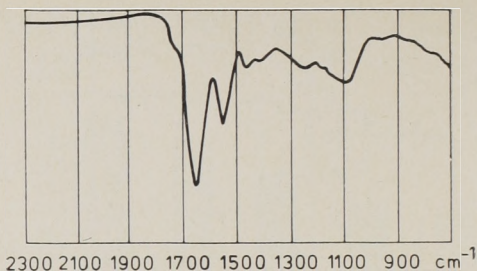


4. ábra  
A nyers purotionin termogravimetriás görbéi MOM gyártmányú derivatográfán  
A felvétel körülményei: bemérés 45 mg, inert anyag  $Al_2O_3$ ,  $T = 900\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $TG = 100\text{ mg}$ ;  
 $DTG = 1/5$ ;  $DTA = 1/5$

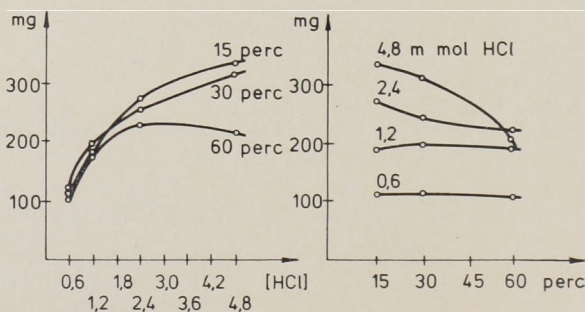
### A búzaolaj sósavas hidrolízise

Balls módszerével a búzaolajból éter-absz. alkoholos közegben száraz sósavval kicsapható a purotionin. Előkísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a kapott termék mennyisége és tisztasága nagymértékben függ a sósavas hasítás reakciókörülményeitől. Ezért különböző reakciókörülmények között végzett próbahidrolízisekkel meghatároztuk azokat a paramétereket, ahol a purotionin maximális mennyiségben és tisztán kinyerhető.

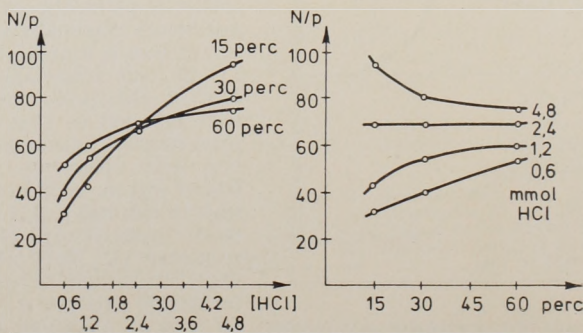
20  $cm^3$  búzaolajat 30  $cm^3$  éterben oldottunk, majd annyi absz. alkoholt és absz. alkoholos sósavreagenst adtunk az oldathoz, hogy valamennyi térfogata 70  $cm^3$  legyen. A hidrolízist négy savkoncentráció [0,6; 1,2; 2,4; 4,8 meqv/reakcióelegy] esetén 3–3 reakcióidő (15; 30; 60 perc) mellett végeztük szobahőmérsékleten. A reakcióidő elteltével az elegyket fél órán át  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartottuk, majd centrifugáltuk. A nyers purotionint éterrel, majd absz. alkohollal mostuk.



5. ábra  
A nyers puerthionin infravörös spektruma IR-10 típusú készüléken, KCl pasztillás felvételen



6. ábra  
A nyers puerthionin mennyiségének függése a hidrolízis-paramétereiktől



7. ábra  
A nyers puerthionin tisztaságának [N%/P%] függése a hidrolízis-paramétereiktől

A purotioninhoz kapcsolódó lipidek főtömegét foszfolipidek teszik ki, így a tisztaság mértékéül kézenfekvő volt a N-tartalom és a P-tartalom hányadosát választani. Vizsgáltuk tehát a minták N-tartalmát, foszfortartalmát *Chen* és mtsai módszerével (20), ezen kívül fölvevük a minták IR spektrumát és termogravimetriás görbéit, valamint tanulmányoztuk molekulaméret szerinti szeparálhatóságukat Sephadex G-75 kolonnán.

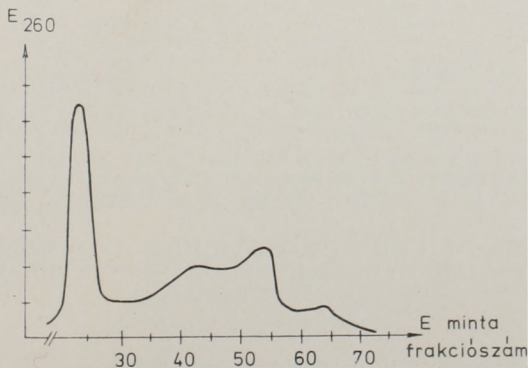
A minták termogravimetriás görbéit összehasonlítva (4. ábra) megállapítható, hogy a minták között szignifikáns különbség nem fedezhető fel. Valamennyi minta görbéjén két bomlási lépcsőt lehet észlelni, szénhidrátszennyezés jelenlétére semmi sem utal. A minták nedvességtartalma 4,1–5%, hamutartalma 6–7,2%.

A purotionin IR spektrumát az 5. ábra mutatja be. Az infravörös spektrumok kiértékelésénél *Freeman* és mtsai (21) módszerét alkalmaztuk, az 1530  $\text{cm}^{-1}$ -nél jelentkező CO-NH rezgés és az 1080  $\text{cm}^{-1}$ -nél jelentkező P-O-C rezgés optikai sűrűségeiből a kémiai módszerekkel szoros korrelációt mutató N%/P% arányokat tudunk számolni.

A termékkihozatal és a N/P faktor változását a reakcióidő, illetve a savkoncentráció függvényében szemlélve (6. és 7. ábra) megállapíthatjuk, hogy a termék mennyiségének és tisztaságának a rövid reakcióidő és a viszonylag nagy savkoncentráció kedvez.

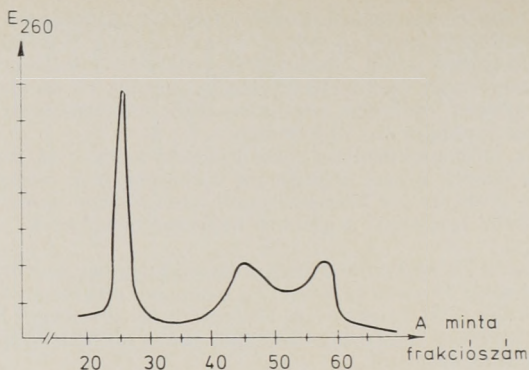
A molekulaméret szerinti frakcionálás elúciós görbéi szerint a frakciók száma és mennyiségi arányaik is változnak a hidrolízisparaméterek értékétől függően. Az alacsonyabb foszfortartalommal rendelkező (tisztább) mintákban négy főfrakciót találunk, míg a szennyezettebb készítményekben csak hármat (8. és 9. ábra). Ez arra enged következtetni, mintha a lipopurotioninban a fehérjemolekulák között „foszfolipid-hidak” lennének.

A hidrolíziskísérletek eredményeit összegezve megállapítottuk, hogy a búzaolaj sósavas hidrolízisének reakciókörülményei számottevően befolyásolják a keletkező termék mennyiségét és minőségét; a termékkihozatal és a minta tisztasága szempontjából optimalizált savtöménység négyszerese, a reakcióidő fele az irodalmi értékeknek.



8. ábra

A nyers purotionin elúciós diagramja Sephadex G-75 kolonnán. Oszlopméret:  $26 \times 530 \text{ mm}$ ,  $V_0 = 60 \text{ cm}^3$ . Eluens: 2 mol dimetilformamidot és 0,1 mol ecetsavat tartalmazó puffer. Az eluens sebessége  $14 \text{ cm}^3/\text{óra}$ . Hidrolízisparaméterek:  $\text{HCl} = 4,8 \text{ mequiv}/70 \text{ cm}^3$ , 15 perc



9. ábra

A nyers purtotionin elúciós diagramja  
 Sephadex G-75 kolonnán. Oszlopméret:  $26 \times 530$  mm,  $V_0 = 60$   $\text{cm}^3$ . Eluens: 2 mol dimetilformamidot és 0,1 mol ecetsavat tartalmazó puffer. Az eluens sebessége:  $14 \text{ cm}^3/\text{óra}$ . Hidrolizisparaméterek:  $\text{HCl} = 1,2 \text{ mequv}/70 \text{ cm}^3$ , 60 perc

#### IRODALOMJEGYZÉK

- (1) Lásztity R., Monori S., Kovács A.: ÉVIKE 15, 257, 1969.
- (2) Grosskreutz J. C.: Cer. Chem. 38, 336, 1961.
- (3) Mc Caig T. D., Mc Calla A. G.: Canad. J. Res. 19, 163, 1941.
- (4) Pomeranz Y.: Adv. Food. Res. 20, 153, 1973.
- (5) Röhrlich M., Niederauer T.: Fette, Seifen, Anstr. 69, 226, 1967.
- (6) Redman D. G., Elton, G. A. H.: J. Sci. Fd. Agric. 20, 546, 1969.
- (7) Balls A. K., Hale W. S.: Cer Chem. 17, 243, 1940.
- (8) Balls A. K.: Cer. Chem. 19, 279, 1942.
- (9) Redman D. G., Fisher N.: J. Sci. Fd. Agric. 19, 651, 1968.
- (10) Redman D. G., Fisher N.: J. Sci. Fd. Agric. 20, 427, 1968.
- (11) Axford D. W. E. és mtsai: Milling 40, 29, 1968.
- (12) Nimmo C. C., Osuóivan M. T., Bernardin J. S.: Cer. Chem. 46, 117, 1969.
- (13) Nimmo C. C., Kosarda D. P., Ellen J. L.: J. Sci. Fd. Agric. 25, 607, 1974.
- (14) Röhrlich M., Niederauer, T.: Fette, Seifen, Anstr. 69, 225, 1967.
- (15) Röhrlich M., Niederauer T.: Fette, Seifen, Anstr. 70, 58, 1968.
- (16) Hosenev R. C. F., Nney K. F., Pomeranz Y.: Cer. Chem. 47, 135, 1970.
- (17) Fisher N., Broughtou M. E.: Chem. Ind. 869, 1969.
- (18) Lásztity R. és mtsai: Élelmiszerkémiai és technológia gyakorlatok Budapest, 1971. J6-576.
- (19) Malins D. D., Mangold H. K.: J. Am. Oil. Chem. Soc. 37, 383, 1960.
- (20) Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H.: Anal. Chem. 28, 1759, 1956.
- (21) Freeman N. K., Lindgren F. T., Nichols A. V.: J. Biochem 203, 293, 1953.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОПРОТЕИНОВ В ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПШЕНИЦАХ. II. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ИЗОЛЯЦИИ ПУРТОИОННИА

Ф. Бэкш и Ш. Монори

Авторы занимаются проблемами методики получения пуртотинина из изолята пшеничной муки БЛ-112. Приводят диаграмму с помощью которой можно предварительно каментить многократную простую экстракцию пшеничной муки (выход, удельное время экстракции) с петролейным фэйром. Определяют оптимальные условия реакции солянокислого гидролиза пшеничного масла.



UNTERSUCHUNG DER LIPOPROTEIN UNGARISCHER WEIZEN-  
SORTEN II. METHODOLOGISCHE PROBLEME DER ISOLIERUNG VON  
PUROTHIONIN

*F. Békés and S. Monori*

In Verbindung mit der Isolierung von Purothionin aus Weizenmehl BL 112, methodologische Probleme in Zusammenhang mit der Herstellung von Purothionin wurden geklärt. Ein Diagramm wird angegeben, mittels welchen man die Verhältnisse einer wiederholten, einfachen Extraktion des Weizenmehls mit Petroläther (Ausbeute, spezifisches Zeiterfordernis) vorangehend planen kann. Die optimalen Reaktionsumstände der salzsauren Hydrolyse des Weizenöls werden angegeben.

INVESTIGATION OF THE LIPOPROTEINS OF HUNGARIAN WHEATS  
II. METHODOLOGICAL PROBLEMS OF THE ISOLATION OF  
PUROTHIONINE

*F. Békés and S. Monori*

In connection with the isolation of purothionine from wheat flour BL 112, methodological problems correlated with the preparation of purothionine were elucidated. A diagram is given with the use of which the conditions of the repeated simple extraction of wheat flour with petroleum ether (yield, specific time requirement) can be predicted. Optimum reaction conditions of the hydrolysis of wheat oil by hydrochloric acid are established.

ETUDE DES LIPOPROTÉINES DES FROMENTS DOMESTIQUES.  
II. PROBLÈMES MÉTHODIQUES DE L'ISOLEMENT DE LA PURO-  
THIONINE

*F. Békés et S. Monori*

En isolant la purothionine à partir de la farine BL 112, les auteurs mettent au point les problèmes méthodiques par rapport à la préparation de ce composé. Ils publient le diagramme, à l'aide duquel l'extraction simple et répétée, à l'éther de pétrole, de la farine de froment (y compris le rendement et le temps nécessaire spécifique) se fait planifier d'avance. On établit les conditions optimales de réaction de l'hydrolyse, à l'acide chlorhydrique, de l'huile de froment.