

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Wydział Farmaceutyczny.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Stanisław Bliński

Andrzej GÓRSKI, Jerzy ISKIERKO

**Porównawcza analiza białek pszenicy, żyta i dwóch odmian pszenżyta
T₂₇₅ i T₂₉₄. III. Zawartość tryptofanu i tyrozyny w gliadynach i gluteninach
oraz N-końcowe aminokwasy frakcji gliadynowej**

Сравнительный анализ белков пшеницы, ржи и двух родов тритикале — T₂₇₅
и T₂₉₄. III. Содержание триптофана и тирозина в глиадинах и глютеминах,
а также N-конечные аминокислоты глиадиновой фракции

A Comparative Analysis of the Proteins of Wheat, Rye and Triticale T₂₇₅ and T₂₉₄.
III. Content of Tryptophan and Tyrosine in Gliadines and Glutenines and N-End
Amino Acids of Gliadine Fraction

Dotychczasowe badania struktury gliadyn i glutenin dotyczyły głównie składu jakościowego i ilościowego aminokwasów. Bietz i Rothfus (2) przeprowadzili hydrolizę enzymatyczną gliadyn i glutenin za pomocą pepsyny, a następnie określili sekwencję aminokwasową otrzymanych peptydów. Wyżej omawiane badania wykazały pewne różnice w strukturze I-rzędowej białek gliadyn i glutenin. Hydroliza kwaśna białek prowadzi do częściowego lub całkowitego rozłożenia się niektórych aminokwasów. Po 24-godzinnej hydrolizie w 6 N HCl prawie całkowicie ulega rozłożeniu tryptofan (4). Kwaśna hydroliza niszczy również częściowo tyrozinę (6). Rozkładem tryptofanu podczas hydrolizy kwaśnej zajmowała się również Opieńska i wsp. (5). Biorąc pod uwagę całkowity rozkład tryptofanu i częściowy rozkład tyrozyny w czasie hydrolizy kwaśnej białek, w niniejszej pracy te aminokwasy w białkach gliadyn i glutenin oznaczano metodą spektrofotometryczną wg Beavana i Holidaya (1). Poza tym w gliadynach i gluteninach izolowanych z glutenu pszenicy, żyta i dwóch odmian pszenżyta oznaczano N-końcowe aminokwasy łańcuchów polipeptydowych.

MATERIAŁ I METODY

Do badań stosowano gliadyny i gluteniny wyizolowane z glutenu mąki żyta, pszenicy i dwóch odmian pszenżyta. Użyto zestaw wzorcowych DNS-aminokwasów firmy Koch-Light — Anglia, tryptofan i tyrozyna firmy BDH Chemicals Ltd. Poole

Anglia, 5-dwumetyloamino-1-naftalenosulfochlorok (DNS-Cl) firmy Serva — Szwajcaria. Do chromatografii cienkowarstwowej pochodnych N-końcowych aminokwasów stosowano płytki DC-Plastikfolien Kieselgel 60 o grubości żelu 0,2 mm. N-końcowe aminokwasy oznaczano metodą dansylacji wg Gross i Labouesse (4). DNS-pochodne aminokwasów rozdzielano metodą chromatografii cienkowarstwowej techniką wstępującą, stosując układ rozpuszczalników: benzen—pirydyna—kwas octowy (80:20:2). Ilościową zawartość tryptofanu i tyrozyny oznaczano metodą spektrofotometryczną podaną przez Beavana i Holidaya (1).

BADANIA WŁASNE

Ilościowe oznaczanie tryptofanu i tyrozyny w białkach metodą Beavana i Holidaya (1) oparte jest na pomiarze absorbancji zasadowych roztworów białek przy dwóch długościach fal: 280 nm i 294,4 nm, którym to wartościom odpowiadają punkty przecięcia się krzywych absorbencji tryptofanu i tyrozyny. Korzystając ze wzoru (1) i (2) obliczono zawartość tryptofanu i tyrozyny w M/g białka.

$$M_{\text{Try}} = \frac{E_{\text{Tyr}_{294,4}} \cdot K_{280} - E_{\text{Tyr}_{280}} \cdot K_{294,4}}{E_{\text{Try}_{280}} \cdot E_{\text{Tyr}_{294,4}} - E_{\text{Tyr}_{280}} \cdot E_{\text{Try}_{294,4}}} \quad (1)$$

$$M_{\text{Tyr}} = \frac{E_{\text{Try}_{294,4}} \cdot K_{280} - E_{\text{Tyr}_{280}} \cdot K_{294,4}}{E_{\text{Tyr}_{280}} \cdot E_{\text{Tyr}_{294,4}} - E_{\text{Try}_{294,4}} \cdot E_{\text{Tyr}_{280}}} \quad (2)$$

gdzie $K = \frac{D}{c \cdot l}$; K — stała absorbancji przy danej długości fali, C — stężenie białka w g/l, l — grubość warstwy mierzonego roztworu, D — absorbancja mierzona przy długościach fal 280 nm i 294,4 nm, E — molowy współczynnik ekstynkcji dla tryptofanu i tyrozyny.

Molowe współczynniki ekstynkcji dla tryptofanu i tyrozyny wyznaczono doświadczalnie. W tym celu sporządzono roztwory tryptofanu w 0,1 N NaOH o stężeniu $4,89 \cdot 10^{-4}$ M/l i $2,44 \cdot 10^{-4}$ M/l oraz dla tyrozyny $5,52 \cdot 10^{-4}$ M/l i $2,76 \cdot 10^{-4}$ M/l. Korzystając ze wzoru (3) obliczono molowe współczynniki ekstynkcji.

$$E = \frac{D}{c \cdot l} \quad (3)$$

Wartości wyznaczonych doświadczalnie molowych współczynników ekstynkcji przy użyciu spektrofotometru VSU-2P firmy Carl-Zeiss Jena wynoszą: $E_{\text{Try}_{280}} = 5340$, $E_{\text{Try}_{294,4}} = 2180$, a dla tyrozyny odpowiednio:

$$E_{\text{Tyr}_{280}} = 1536, E_{\text{Tyr}_{294,4}} = 2330.$$

W celu określenia ilościowej zawartości tryptofanu i tyrozyny sporzą-

dzono roztwory białek gliadyn i glutenin żyta, pszenicy oraz dwóch odmian pszenżyta w 0,1 N NaOH. Stężenie białka utrzymywane w granicach 30—50 mg/100 ml roztworu pozwalało na to, aby mierzone wartości absorbancji mieściły się w granicach 0,2—0,8. Uzyskane wyniki dla gliadyn zestawiono w tab. 1, a dla glutenin w tab. 2.

Tab. 1. Procentowa zawartość tryptofanu i tyrozyny w gliadynach
Per cent content of tryptophan and tyrosine in gliadines

Gliadyny	Stężenie białka mg/100 ml	E_{280}	$E_{294,4}$	TRY %	TYR %
Ż	30	0,339	0,314	2,3	6,2
P	30	0,315	0,300	2,0	6,0
T ₂₇₆	50	0,316	0,307	1,2	3,8
T ₂₉₄	50	0,280	0,276	1,0	3,4

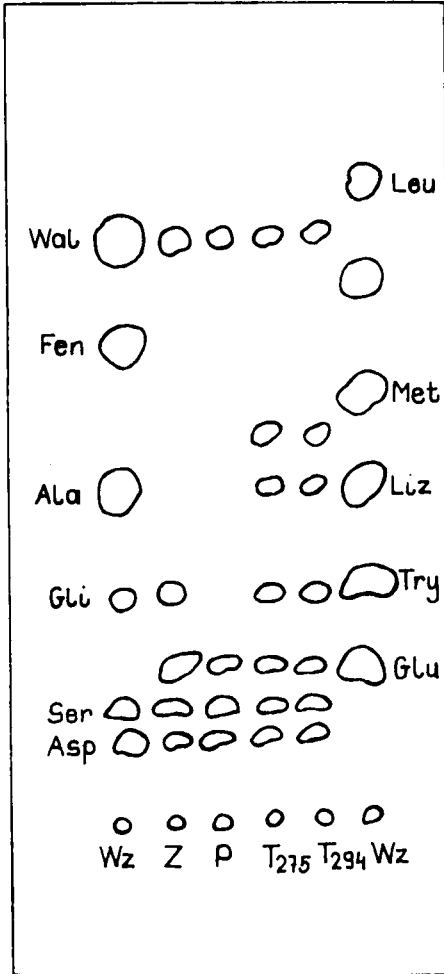
Tab. 2. Procentowa zawartość tryptofanu i tyrozyny w gluteninach
Per cent content of tryptophan and tyrosine in glutenines

Gluteniny	Stężenie białka mg/100 ml	E_{280}	$E_{294,4}$	TRY %	TYR %
Ż	40	0,451	0,416	2,3	6,1
P	40	0,281	0,320	1,0	5,2
T ₂₇₆	40	0,282	0,279	1,3	4,3
T ₂₉₄	40	0,304	0,310	1,3	4,9

OZNACZANIE N-KOŃCOWYCH AMINOKWASÓW W GLIADYNACH

Oznaczanie N-końcowych aminokwasów dokonano wg postępowania opisanego przez Gross i Labouesse (4). Gliadyny poddano reakcji dansylacji przy pomocy DNS-Cl w środowisku zasadowym przy pH 8,2—8,8. Białko gliadyn w ilości 2,5 mg (50 nM) rozpuszczono w 0,3 ml wody destylowanej, dodano 200 mg mocznika i całość uzupełniono wodą destylowaną do 0,5 ml. Do tego roztworu dodano 0,24 ml dwuetyloformamidu, a następnie 0,2 ml 0,4 M buforu fosforowego o pH 8,2. Następnie wprowadzono do roztworu 0,1 ml 0,2 M roztworu DNS-Cl w acetonie. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 2 godz. w temp. ok. 20°C. Po tym czasie białko wytrącono 5 ml 10% kwasu trójchlorooctowego, osad przemywano dwa razy po 1 ml 1 N HCl, a następnie 2 razy 1 ml acetonu. Przemyte białko wysuszono, a następnie dodano 0,3 N HCl i prowadzono hydrolizę przez 12 godz. w 110°C. Hydrolizat zateżono do sucha, rozpuszczano w mieszaninie kwas octowy—aceton (2:3), a następnie poddano chromatograficznemu rozdzielaniu. DNS-pochodne N-końco-

wych aminokwasów rozdzielano techniką wstępującą metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach DC-Plastikfolien Kieselgel 60 o grubości żelu 0,2 mm. Do rozwijania chromatogramów stosowano układ rozpuszczalników benzen—pirydyna—kwas octowy (80:20:2). Rozdział chromatograficzny DNS-pochodnych N-końcowych aminokwasów gliadyn analizowanych gatunków zbóż przedstawia ryc. 1.



Ryc. 1. Rozdział chromatograficzny DNS-pochodnych N-końcowych aminokwasów białka gliadyn w układzie: benzen-pirydyna—kwas octowy (80:20:2)

Chromatographic separation of DNS-derivatives of N-end amino acids of gliadine protein in the system: benzene—pyridine—acetic acid (80:20:2)

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Gliadyny i gluteniny, podobnie jak inne białka roślinne, charakteryzują się niską zawartością aminokwasów aromatycznych. Metoda spektrofotometryczna Beavana i Holidaya (1) umożliwia oznaczenie trypto-

fanu i tyrozyny w badanych białkach. Jak wiadomo, aminokwasy te częściowo lub całkowicie ulegają rozkładowi podczas hydrolizy kwaśnej i nie mogą być oznaczane ilościowo w automatycznym analizatorze aminokwasów metodą Steina i Moora (6). Gliadyny i gluteniny żyta posiadały najwyższą zawartość tryptofanu. Najmniej tego aminokwasu zawierały gliadyny dwóch odmian pszenżyta: T₂₇₅ i T₂₉₄. Gliadyny pszenicy wykazywały zbliżoną zawartość tryptofanu do gliadyn żyta, natomiast gluteniny pszenicy zawierały o połowę mniej tego aminokwasu niż gluteniny żyta. Zawartość tryptofanu w gluteninach pszenżyta była zbliżona do ilości tego aminokwasu w gluteninach pszenicy.

Gliadyny żyta i pszenicy posiadają o około 2 razy więcej tyrozyny niż analogiczne białka pszenżyta. W gluteninach pszenżyta występuje również znacznie mniej tyrozyny niż w gluteninach pszenicy czy żyta. Na podstawie dokonanej analizy N-końcowych aminokwasów można wnioskować o dużej złożoności białka gliadyn oraz odmienności gatunkowej. Przeprowadzone badania wykazały, że frakcja gliadynowa w zależności od rodzaju zboża posiada kilka łańcuchów polipeptydowych zakończonych różnymi lub takimi samymi N-końcowymi aminokwasami. Gliadyny żyta składają się co najmniej z pięciu, pszenicy — z czterech, a pszenżyta T₂₇₅ i T₂₉₄ — z siedmiu łańcuchów polipeptydowych zakończonych różnymi N-końcowymi aminokwasami. Przeprowadzone badania pozwoliły na określenie tylko minimalnej liczby łańcuchów polipeptydowych. Liczba łańcuchów polipeptydowych może być większa niż liczba znalezionych N-końcowych aminokwasów, ponieważ mogą występować łańcuchy polipeptydowe zakończone jednakowymi N-końcowymi aminokwasami. Należy podkreślić, że w gliadynach wszystkich analizowanych gatunków zbóż występowały 4 identyczne N-końcowe aminokwasy. Ponadto gliadyny żyta w porównaniu do gliadyn pszenicy posiadały o jeden N-końcowy aminokwas więcej. Gliadyny dwóch odmian pszenżyta (T₂₇₅ i T₂₉₄) posiadały 5 N-końcowych aminokwasów identycznych jak w pszenicy i dodatkowo lizynę oraz alaninę, tj. aminokwasy nie występujące jako N-końcowe ani w życie, ani w pszenicy.

PIŚMIENNICTWO

1. Beavan G. H., Holiday E. R.: *Advances in Prot. Chem.* **7**, 319—382, 1952.
2. Bietz I. A., Rothfus I. A.: *Cereal Chem.* **48**, 677—690, 1971.
3. Block R. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* **31**, 266—272, 1951.
4. Gross C., Labouesse B.: *Europ. J. Biochem.* **7**, 463—470, 1969.
5. Opieńska-Blauth M., Charęziński M., Sanecka M., Brzuszkiewicz M.: *J. Chromat.* **7**, 321—328, 1962.
6. Stein W. H., Moore S.: *J. Biol. Chem.* **211**, 915—926, 1954.

Otrzymano 23 XI 1978.

РЕЗЮМЕ

В глиадинах и глюteniнах исследуемых сортов хлебов обнаружено низкое содержание ароматических аминокислот — таких как триптофан и тирозин. На основании обозначения N-конечных аминокислот предложено гипотезу, что белок глиадина в зависимости от сорта хлеба имеет 4—7 полипептидную цепь, законченную такими же или разными N-конечными аминокислотами.

SUMMARY

In gliadins and glutenins of the analysed varieties of corn the low content of aromatic amino acids such as tryptophane and tyrosine was demonstrated, on the basis of the designation of N-end amino acids a hypothesis was made that gliadins protein, depending on the variety of corn, possesses 4—7 polipeptide chains which end in the same or different N-end amino acids.