

A fehérje triptofán enantiomereinek meghatározása

Dr. Csapó János

A kutatás célja megfelelő analitikai módszer kidolgozása a triptofán-enantiomerek meghatározására, és a módszer alkalmazhatóságának vizsgálata.

A munkatervben vállaltuk a lehetséges hidrolízismódszerek vizsgálatát, HPLC elválasztási technika kidolgozását és validálását a triptofán-enantiomerek meghatározása szempontjából. Vállaltuk továbbá, hogy a kidolgozott módszer segítségével vizsgáljuk a triptofán racemizációját különböző körülmények között modelloldatokban, valamint élelmiszer- és takarmány-alapanyagokban (szója, kukorica).

Munkatervtől való eltérések:

Munkatervünkben vállaltuk, hogy megvizsgáljuk a triptofán racemizációját szójababban, ill. kukoricában termikus kezelések hatására. A módszerfejlesztés során azonban nem sikerült olyan hidrolízismódszert találnunk, ami lehetővé tette volna a minták analízisét, azok magas szénhidrát-tartalma miatt. Helyettük magas fehérjetartalmú, állati eredetű alapanyagokban határoztuk meg a triptofán-enantiomerek mennyiségét.

A kutatási eredmények az alábbiak:

1. Analitikai módszerfejlesztés

Először egy analitikai módszert kellett kidolgozni a Trp-enantiomerek elválasztására, hiszen enélkül a hidrolízismódszereket sem tudtuk volna megvizsgálni. A Trp-enantiomerekből OPA-val és TATG-vel képeztünk származékokat, és az így létrejövő diasztereoizomereket akirális állófázisú oszlopon, fordított fázisú folyadékkromatográfiás rendszerben választottuk el egymástól. A módszerfejlesztésnél kétféle standard oldattal dolgoztunk az egyéb aminosav-származékok interferenciájának kiszűrése érdekében. Az egyik oldat csak D- és L-Trp-t, a másik az élelmiszerfehérjékben előforduló többi aminosav D- és L-enantiomerjét tartalmazta.

Az elválasztás optimalása során változtattuk az állófázis minőségét, a mozgófázis összetételét, ezen belül a szerves fázis arányát és minőségét (metanol, acetonitril, vagy mindkettő). Miután a módszerfejlesztést befejeztük, elvégeztük az analitikai módszer validálását is.

2. Hidrolízismódszerek vizsgálata

Az élelmiszer- és takarmányfehérjékben előforduló aminosavak közül talán a triptofán (Trp) mennyiségének pontos meghatározása a legnehezebb. A többi aminosavval szemben, a Trp fehérjeláncból való felszabadításához nem alkalmazható az elterjedten használt 110 °C-on, 24 óráig, 6 M sósavoldattal végzett hidrolízis, mivel a Trp teljesen elbomlik ilyen körülmények között. A Trp-bomlás csökkentése céljából a "klasszikus" fehérje-hidrolízis módszerét módosítani kell. Ez egyrészt úgy valósítható meg, hogy a szokásos savas közegű elegyhez redukálószerket adunk, a másik megoldás lúgos közegű hidrolízismódszerek alkalmazása.

Annak ellenére, hogy a lúgos hidrolízismódszerek jó eredményeket adnak a Trp-tartalom meghatározása esetén, jelen kutatás feltételeit nem elégíti ki, hiszen a lúgos közeg az aminosavak racemizációját felgyorsítja, így az egyes enantiomerek mennyiségi meghatározását lehetetlenné teszi. Ezért a triptofán-enantiomerek meghatározásához savas hidrolízismódszer alkalmazása szükséges.

2.1. Merkaptó-etán-szulfonsavas hidrolízis

Merkaptó-etán-szulfonsav jelenlétében nem alakultak ki az aminosavak OPA-TATG származékai, melynek valószínűsíthető oka az volt, hogy a TATG helyett a MES képzett származékot az OPA-val és a Trp-nal. A MES eltávolítása, illetve szulfhidril-csoportjának átalakítása céljából több módszerrel próbálkoztunk. Először a MES-ből réz-merkaptid csapadékot képeztünk, majd a csapadékot centrifugálással eltávolítottuk, és a felülúszó oldat aliquot részével végeztük el a származékképzést, azonban a Trp-származékok jelét a merkaptidok eltávolítása után nem észleltük.

Ezt követően a MES-t perhangyasavval diszulfonsavvá oxidáltuk. Mivel a perhangyasav reagálhat a triptofánnal, és feleslege a származékképző reagensekkel is, az egész folyamatot ugyanolyan körülmények között megvalósítottuk alaninnal (Ala) is, melynek oldallánca (R-csoportja) nem érzékeny az oxidatív átalakulásokra. A perhangyasav feleslegét nátrium-metabiszulfittal kötöttük meg. Ilyen körülmények között sem jelent meg a Trp és az Ala diasztereoizomer származékainak a jele a kromatogramon, tehát sem a Trp, sem az Ala OPA-TATG származéka nem alakult ki detektálható mennyiségben a MES perhangyasavas oxidációja és a perhangyasav-felesleg megkötését követő származékképzés során. A Trp esetében valószínűsíthető az oxidatív átalakulás N-formil-kinureninné.

Legvégül a MES-t jódecetsavval karboxi-metil-származékká alakítottuk át, de a Trp-nak csak egy kis hányada alakult át OPA-TATG származékká, és a TATG koncentrációjának növelése sem vezetett eredményre. Vizsgáltuk, hogy megfelelő volt-e az oldatok pH-ja a származékképzéskor (pH=9,5), de nem tapasztaltunk eltérést. Kipróbáltuk a MeS-OH oldat származékképzés előtti semlegesítését, a pH 2-re, 6-ra, illetve 9-re állítását, de egyik esetben sem tapasztaltuk a diasztereoizomer-párok jelintenzitásának növekedését.

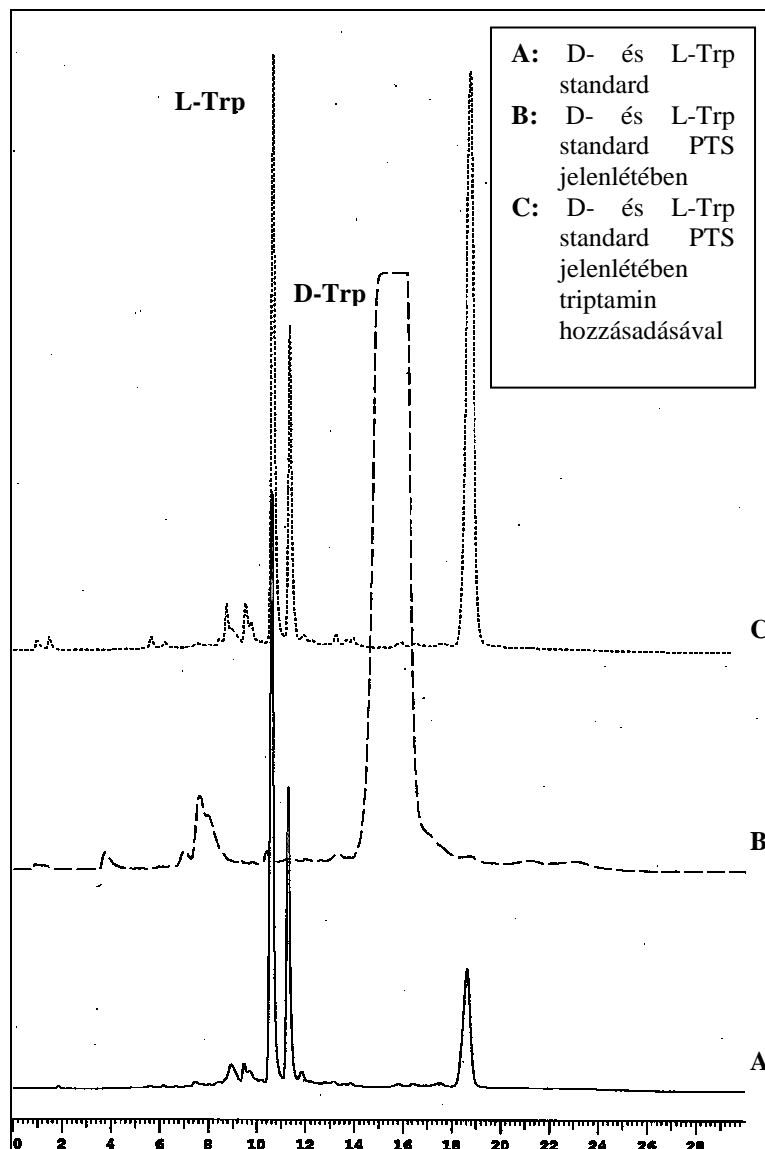
2.2. Para-toluol-szulfonsavas hidrolízis

A MES hidrolízis nehézségei miatt, bár ez adja a legnagyobb kitermelést a triptofánra a savas módszerek közül (származékképzés nélkül, ioncserés oszlopkromatográfiával meghatározva), a továbbiakban a para-toluol-szulfonsavra (PTS) koncentráltunk. Magas fehérjetartalmú juh hemoglobin és savófehérje koncentrátum mintákon végeztük el a hidrolízismódszerek vizsgálatát. A kísérletek során három különböző összetételű hidrolizáló elegyet használtunk. Megvizsgáltuk a Trp visszanyerést 3 M-os PTS oldattal, 3 M-os 0,2% 3-(2-amino-etil)indol (triptamin) tartalmú PTS oldattal, illetve szintén 3 M-os PTS oldattal 3-(3-indolil)-propionsav jelenlétében (a fehérje – 3-(3-indolil)-propionsav tömegaránya 1 volt) elvégzett hidrolíziseket követően. A vizsgálatokhoz kb. 15 mg fehérjét tartalmazó mintát mértünk be orvosi ampullába, majd 5 cm³-t adtunk hozzá a hidrolizáló reagensből. Az ampullákba két percig nitrogéngázt vezettünk, majd leforrasztottuk, és 110±2 °C-on tartottuk 24 órán keresztül. Ezt követően 4 M-os NaOH oldattal semlegesítettük és 25 cm³-es mérőlombikba téve desztillált vízzel jelre töltöttük, majd ötszörösére hígítottuk.

PTS jelenlétében a származékképzés megfelelő módon végbement (1. ábra / C). Tisztított fehérje (juh hemoglobin) mintát vizsgálva azonban azt kaptuk, hogy csupán PTS jelenlétében a Trp-visszanyerés rendkívül alacsony, mindössze az eredeti Trp-tartalom 44±2%-a. Amennyiben követtük a szakirodalomban leírtakat, és a triptofán indolgyűrűjének védelme érdekében triptamint adtunk az oldathoz, a származékképzés – valószínűleg a triptamin aminocsoportja miatt – nem megy végbe (1. ábra / B).

A PTS hidrolízisek közül a legkedvezőbb eredményt azoknál a mintáknál kaptuk, ahol védőreagensként 3-(3-indolil)-propionsavat alkalmaztunk. A triptofánhoz hasonló szerkezetű vegyület ugyanis nem rendelkezik aminocsoporttal, így a származékképzésnél jelenléte nem okoz problémát. A magas fehérjetartalmú mintákkal (juh hemoglobin, savófehérje koncentrátum) elvégezve a hidrolíziseket, a mintában jelenlevő Trp mennyiségének 88±3%-a megmaradt. A magas visszanyerés mellett az is a módszer mellett szól, hogy a kimutatható

Trp kizárólag L-enantiomer formájában van jelen, ezért a hidrolízis során racemizációval nem kell számolni.



1. ábra: A triptofán-enantiomerek diasztereomer származékainak elválasztása PTS hidrolízist követően triptamin hozzáadásával és anélkül

3. Trp racemizációjának vizsgálata

3.1. Szabad Trp racemizációja

Az 1 mg/cm^3 L-Trp-t tartalmazó oldatok pH-ját (3; 5; 7; 9; 11) 6 M sósav oldattal, illetve 4 M NaOH oldattal állítottuk be. Az oldatokat orvosi ampullába tettük és a leforrasztás előtt 2 percig nitrogéngázzal öblítettük, majd $100 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 0; 5; 10; 20; 40; 60 percig, illetve 2; 4; 8; 12; 24; és 48 óráig melegítettük.

A szabad L-Trp racemizációja nem volt jelentős az alacsonyabb pH-jú oldatokban ($\text{pH}=3-7$). Ennél lúgosabb körülmények alkalmazása esetén a D-Trp mennyisége 12 óras forralás után kezdett el növekedni, de a D – L átalakulás mértéke kisebb volt, mint 1%.

Az L-Trp mennyisége egy napos hőkezelést követően 2–5%-kal csökkent, de a racemizációhoz képest a többi átalakulási/bomlási folyamat nagyobb szerepet játszott a Trp-tartalom csökkenésében.

3.2. Fehérjében kötött Trp racemizációjának vizsgálata modelloldatokban

40 mg lysosimot (fehérjetartalom 98%, Trp-tartalom 7,41 g/100 g fehérje) orvosi ampullába mértünk, majd 5 cm³ különböző pH-jú (3, 7, 9, 11, 13) oldatot adtunk hozzá. Az oldatok pH-ját 6 M sósavoldattal, illetve 4 M NaOH oldattal állítottuk be. Az ampullákat a leforrasztás előtt 2 percig nitrogéngázzal öblítettük, majd 100 ± 1 °C-on 0; 1; 4; 8; 16; 24; 32; 40; ill. 48 óráig melegítettük. Ezt követően az oldatokat 10 cm³-es mérőlombikokba mértük és annyi para-toluol-szulfonsavat oldottunk fel bennük, hogy a PTS-koncentráció 3 mol/dm³ legyen. A kapott oldatokból 5 cm³-t újból orvosi ampullába mértünk, ami már tartalmazott 20 mg 3-indol-propionsavat, majd elvégeztük a minták hidrolízisét. A hidrolízist hőkezeletlen lysosimmal is elvégeztük, hogy a hidrolízisből adódó racemizációt és egyéb veszteségeket az eredmények értékelésénél figyelembe vehessük.

Savas és semleges körülmények között nem tudtuk kimutatni a Trp racemizációját még 48 órás hőkezelést követően sem. Magasabb pH tartományok alkalmazása esetén azonban tapasztaltunk némi átalakulást. Kilences pH-jú közegben 8 óra elteltével tudtuk először kimutatni a D-enantiomerek jelenlétét, a racemizáció mértéke (D/(D+L) arány) 48 óra elteltével elérte a 12%-ot. Tizenegyes pH-jú oldatok alkalmazása esetén már egy óra elteltével ki tudtuk mutatni a D-Trp-t, majd az átalakulás a kezelési idővel arányos 48 óra alatt elérte a 24%-ot. Még lúgosabb körülményt alkalmazva (pH=13) azt tapasztaltuk, hogy a racemizáció már egy óra alatt teljesnek mondható.

3.2. Élelmiszer- és takarmány-alapanyagok vizsgálata

A szakirodalomban nem találtunk információt arra, hogy savas hidrolízist követően magas szénhidrát-tartalmú mintákból határozhatk volna meg triptofánt. Ezért célul tűztük ki ilyen minták (szója, kukorica) vizsgálatát. A kutatási tervnek megfelelően fullfat szóját üzemi körülmények között tósztereztünk, valamint kísérleti extrúderrel száraz termikus kezelésnek vetettük alá. Az így kapott mintákból akartuk meghatározni a triptofán racemizációjának mértékét a termikus kezelések hatására.

Elvégeztük a minták hidrolízisét, valamint HPLC analízisét, azonban a hidrolizátumokból csak jelentős veszteséggel (80–90%) tudtuk kimutatni a triptofánt. A tapasztaltak alapján, a szakirodalomban találtakkal összhangban, továbbra sem áll rendelkezésünkre olyan savas hidrolízismódszer, ami lehetővé tenné a triptofán meghatározását nagy szénhidrát-tartalmú mintából.

Ennek megfelelően a termikus kezelések hatását a triptofánra sem a szója-, sem pedig a kukoricaminták esetén nem tudtuk vizsgálni. Ezen kísérletek helyett különböző állati eredetű mintákon vizsgáltuk, hogy a különböző technológiai beavatkozások mennyire befolyásolják a triptofán racemizációját.

3.3. Trp racemizációja húsokban sütés hatására

Miután a tisztított fehérjék esetén megfelelő eredményeket értünk el, valós mintákon kívántuk a hidrolízismódszer alkalmazhatóságát ellenőrizni. Első lépésben magas fehérje- és alacsony szénhidrát-tartalmú húsmintákat vizsgáltunk, mivel a magas szénhidrát-tartalom előidézheti a Trp bomlását. A húsok sütésével a Trp racemizációját akartuk vizsgálni.

A sütés során csökkent a húsok víztartalma, ami a szárazanyag- és nyersfehérje-tartalom növekedését eredményezte. Megfigyeltük azt is, hogy a sütés következtében, ha kis mértékben is, de csökkent a minták Trp-tartalma, ami szintén a Trp külső hatásokkal szembeni érzékenységét igazolja.

A vizsgálatok eredményei alapján megállapítottuk, hogy az alkalmazott sütési körülmények között D-Trp nem képződött. Ezért az eredményeket tartalmazó 1. táblázatban csak a minták L-Trp-tartalmát tüntettük fel.

1. táblázat

A sült húson végzett vizsgálatok eredményei

Sütési idő perc	Száranyag- tartalom m/m%	Nyersfehérje- tartalom m/m%	g Trp/100 g fehérje	g L-Trp/100 g fehérje	Visszanyerés
0	27,2	23,32	1,24	1,11	89,5
1	31,3	28,09	1,25	1,12	89,6
8	71,7	59,01	1,16	1,09	88,4
12	77,0	62,98	1,14	0,98	86,0

A mért L-Trp mennyiségek jó egyezést mutatnak az össz-Trp-tartalommal. Ha a két hidrolízismódszerrel elvégzett analízis eredményeit összehasonlítjuk, azt kapjuk, hogy bár némileg kisebb Trp-mennyiséget tudunk mérni a savas hidrolízist követően, azonban ez csak nagyon kis mértékben tér el a lúgos hidrolízis esetén kapott eredményektől.

3.4. Trp racemizációja vágóhídi hulladékokban lúgos kezelés hatására

Az Európai Unió legújabb előírásai szerint kérődzők vágóhídi melléktermékét takarmányozásra csak akkor szabad felhasználni, ha azt relatíve tömény lúggal (kálium- vagy nátrium-hidroxiddal) magas hőmérsékleten (135–155 °C-on), hosszú ideig (2–6 óra) hidrolizálják. Korábbi vizsgálatainkból kitűnt, hogy minden olyan behatás, amely magas hőmérsékleten, lúgos kezeléssel jár, az aminosavak többségénél racemizációt okozhat. Alacsony hőmérsékleten lúggal kezelve a fehérjét, vagy magas hőmérsékleten semleges vagy savas környezetben végezve a hidrolízist is előfordulhat racemizáció, a lúgos kezelés és a magas hőmérséklet kombinációja pedig szinte biztos, hogy racemizációhoz vezet.

Fenti hipotézis bizonyítására 400 g első kategóriájú, szarvasmarha vágóhídról származó vágóhídi hulladékot 600 cm³ vízzel homogenizáltunk, majd hozzáadtunk 44 cm³ 45%-os kálium-hidroxid-oldatot, egy megismételt kísérletben pedig 30 cm³ 45%-os nátrium-hidroxid-oldatot. A keveréket 135, 150 és 153 °C-on kettő, három és hat órán keresztül kezeltük, majd lehűlés után meghatároztuk az így kapott anyagok D-aszparaginsav- és D-glutaminsav-, valamint D-triptofán-tartalmát.

Megállapítottuk, hogy még a legalacsonyabb hőmérsékleten és a legrövidebb ideig (135 °C, 2 óra) végzett NaOH-os hidrolízisnél az aszparaginsavnak 42,9%-a, a glutaminsavnak pedig 43,6%-a racemizálódott. Ha a hőmérsékletet 135 °C-ról 153 °C-ra emeljük, a racemizáció mértéke pár százalékkal nagyobb, azonban magas hőmérsékleten a 2 és a 6 órás hidrolízisidő alig okozott különbséget a racemizáció mértékében. Ha a hidrolízist nem nátrium-hidroxiddal, hanem kálium-hidroxiddal végezzük, a racemizáció mértéke szinte teljes mértékben egybeesik a nátrium-hidroxidnál mértével.

A triptofán esetében megállapítottuk, hogy a kontrollhoz viszonyítva a lúgos kezelés során a hőkezelés idejétől és hőmérsékletétől függetlenül a triptofán mintegy 40%-a elbomlott, a maradék triptofánnak pedig 39–45%-a racemizálódott a hőkezelés során. Nem kaptunk egyértelmű összefüggést az alkalmazott hőmérséklet és a triptofán racemizációja között, az viszont egyértelműen kitűnik, hogy minél hosszabb a hőkezelés ideje, annál nagyobb volt, hacsak elenyésző mértékben is, a D-triptofán részaránya a mintában.

Összefoglalva a kísérleteink eredményeit elmondhatjuk, hogy az általunk alkalmazott hő- és lúgkombináció során az aszparaginsav és a glutaminsav mintegy 44%-a, a triptofánnak pedig 40–45%-a D-módosulattá alakul át. Amennyiben az így kapott hidrolizált termék egyéb

paraméterei meg is felelnének a korszerű takarmányozás feltételeinek, számolni kell azzal, hogy az aminosavak többsége teljes racemizációt szenved az eljárás során.

Az új tudományos eredmények:

- Új módszert dolgoztunk ki a Trp-enantiomerek szétválasztására és meghatározására OPA/TATG származékképzést követően nagyhatékonyságú kromatográfiával.
- Az alkalmazott savas fehérje-hidrolízismódszerek közül a 3-(3-indolil)propionsavat tartalmazó 3 M-os p-toluol-szulfonsav oldattal optimális hidrolízis feltételeket dolgoztunk ki a fehérjében kötött Trp-enantiomerek meghatározására alacsony szénhidrát-tartalmú mintákból.
- Vizsgáltuk a szabad, valamint a fehérjében kötött Trp racemizációját a 3–13 pH tartományban. Szabad formában minimális volt a racemizáció, míg a peptidláncban lévő Trp racemizációja a lúgos tartományban jelentős mértékben megnőtt.
- A módszerünk megfelelőnek bizonyult magas hőmérsékleten, lúgos körülmények között feltárt, nagy fehérjetartalmú vágóhídi melléktermékek D- és L-Trp-tartalmának meghatározására.

Tudományos közlemények:

Az elért eredményekből 5 folyóiratcikkből, 6 konferencia kiadványban, 7 absztraktban számoltunk be.

A kutatási téma további lehetséges irányai:

A kidolgozott módszer alkalmas magas fehérje- és alacsony szénhidrát-tartalmú minták D-Trp tartalmának meghatározására, a technológia során kialakult racemizáció mértékének mérésére.

A téma folytatását két úton lenne célszerű tovább végezni:

- 3-indol-propionsav mellett újabb indolcsoportot tartalmazó vegyületek kipróbálása a Trp savas hidrolízis közbeni elbomlásának visszaszorítására.
- A módszert mindenképpen tovább kellene fejleszteni alacsony fehérjetartalmú és magas szénhidrát-tartalmú mintákban (mint amilyen az élelmiszereink nagy része) történő Trp racemizációjának mérésére.

Az elért eredmények hasznosítása:

A módszerünk már jelenleg is alkalmas nagy fehérjetartalmú, magas hőmérsékleten lúggal kezelt vágóhídi melléktermékek D-Trp-tartalmának mérésére, magas hőmérsékleten előállított húsokban, húskészítményekben lejátszódó Trp racemizáció tanulmányozására. E termékek mérésére a módszert már szinte rutinszerűen alkalmazzuk a Kaposvári Egyetem Kémiai-Biokémiai Tanszékén. A módszer alkalmas Trp-tartalmú gyógyszerekben és élelmiszerkiegészítőkben lejátszódó racemizáció mértékének mérésére. Ajánlható élelmiszer- és takarmányvizsgáló laboratóriumoknak, akik vizsgálataik közé beállíthatják a D-Trp tesztelését.

A kutatáshoz felhasznált **egyéb támogatások** nem voltak.