

Vizsgálatok a búzaliszt fehérjéről*

I. A biuret-reakcióról

† MÁRKUS LÁSZLÓ

Agrokémiai Kutató Intézet Biokémiai Osztálya, Budapest

Az Agrártudományi Egyetem Mezőgazdasági Kémiai Intézete évekig foglalkozott a növények nitrogénforgalmával. Ezeknek a vizsgálatoknak során D o b y és F ü l e k y [4] munkáival kapcsolatban a növényi fehérjék, nevezetesen a búza, illetve búzaliszt fehérje forgalma részletesebb megismerésének kérdése merül fel.

Vizsgálataimat a semleges sóoldattal oldható fehérjefrakció vizsgálatával kezdem meg. Ez a fehérjefrakció O s b o r n [23] csoportosításában globulin-edsztin elnevezés alatt szerepel.

E fehérjefrakció vizsgálatával számosan foglalkoztak. H o f f m a n és G o r t n e r [14] a sóoldható fehérje frakcionálását és izolálását dolgozták ki, G e d d e s és G o u l d e n [9], valamint M a n g e l s [21] a kenyér térfogata és a peptizálható fehérje viszonya közötti összefüggést tanulmányozták. H a r r i s [13] kapcsolatot talált a liszt minősége és az anorganikus sókban diszpergálható fehérjék között. B l i s h [2] szerint a búzalisztek különbségét legjobban a nemsikér- és sikérfehérje viszonya mutatja. Különböző koncentrációjú nátriumklorid oldatokkal dolgoztak T e l l e r [32], H a l l e [12]. Az A.O.A.C. szabvány [1] 1%-os nátriumklorid-oldattal történő kioldást ad meg. G o r t n e r n e k és munkatársainak [10] vizsgálatai szerint sóoldatokban történő diszpergálás nem jelent éles elválasztást a sikér és nemsikér frakciók között. R i c h [26, 27] a kioldott fehérje mennyiség és az alkalmazott só mennyiség közötti összefüggésre a Hofmeister-sort találta érvényesnek. Szerinte a szelektív oldás, illetve kicsapás által kapott frakciók önkényesek. N a g y, W e i d l e i n és M i x o n [22] vizsgálatai szerint az 5%-os nátriumkloriddal diszpergálható fehérjenitrogén a búzafehérje összes nitrogénjének 18–20%-a. Az irodalmi adatok alapján az 5%-os nátriumklorid-oldattal való kioldást alkalmaztam.

A fehérje mennyiségi meghatározására a körülményes Kjeldahl módszernél gyorsabb nitrogén, illetve fehérjemeghatározást tűztem ki célul. Az irodalmi adatok és előkísérleteim alapján erre a célra a fehérjék biuret-reakciója, mint kolorimetrikus módszer alkalmasnak mutatkozott. Másrészt felmerült az a kérdés is, hogy a biuret reakció a fehérje minőséggel milyen kapcsolatban van.

A biuretreakció mennyiségi meghatározásokra először Riegler használta. S c h u l h o f [29] különböző állati eredetű fehérjéket vizsgált biuret módszerrel. Fotométeres vizsgálataiban a látható spektrum területén az extinkció értéke az oldathoz adott rézmennyiséggel erősen változott. A biuret-reakció feltételeinek részletes vizsgálatában L i e b e r és J e s s e r e r [20] pepton-, kazein- és zselatin-

* A dolgozat a váratlanul elhunyt szerző 1948-ban elkészült doktori értékezésének egy részlete. Mivel a külföldi irodalom újabb ismét behatóan foglalkozik a biuret reakció kérdésével, indokolt az eredeti doktori értekezés eredményeinek közreadása. A kéziratot közlésre összeállította dr. Doby Géza professzor és Nagymihály Ferenc docens.

(Szerkesztőbizottság.)

oldatokon a Beer—Lambert-féle törvény érvényességét állapították meg. Különböző fehérjéken, azonos súlykoncentrációjú oldatban megegyező erősségű és színárnyalatú biuret-színre kaptak. A biuret-szín egy vörös és egy kék komponensből áll, a két komponens aránya a pH -tól és a hozzáadott réz mennyiségétől függ. Óvatos savanyításkor a vörös komponens eltűnik, lúgos fehérjeoldathoz néhány csepp rézszulfátot adva csak a vörös komponens keletkezik. Szerintük a vörös színű származékban a rézatom magasabb vegyértékű több nitrogént telít, mint a kék színű komponensben. Kuntzler és Dröschler [19] a két komponens különböző színét a réz különböző kötési készségével magyarázza. A peptidcsoportokkal létesített komplex vörös színű, csak lúgos közegben állandó. A szabad aminos-csoportokkal létesített komplex kék színű. Megállapításuk szerint a fehérjék biuret színe a két szín keveréke és függ a hozzáadott réz és fehérje anyagától, arányától, a közeg pH értékétől, sőt a reagensek hozzáadási sorrendjétől. A rézszulfát mennyiségének növelésével telített, vagy túltelített komplexek állnak elő. A fehérjék lebontottságának foka is hatással van a biuret-színre. Fine [6] vizsgálatai szerint egyforma töménységű albumin- és globulin-oldat ugyanolyan színerősséget mutat. Sizer [31] Hardy-féle spektrográffal a biuret-színnek két maximumát állapította meg, az első $431 m\mu$ -nál van és kisebb mint a második $700 m\mu$ -nál; minimum $514 m\mu$ -nál található. Kingsley [15], Robinson és Hogen [28], Christensen [3] és Coleman szérumalbumin és globulin meghatározására használták a biuret-reakciót. Gubarev és Sergejeva [11] baktérium tápanyag pepton tartalmát mérték biuret reakcióval.

A búzaliszt fehérjéjének biuret-reakcióját minőségi úton Kuhl [18] tanulmányozta. Különböző érettségi fokú és származású lisztek biuret-színében különbségeket észlelt, módszere azonban sok kívánnivalót hagy. Dodonova és Ivanov [5] is a búza-fehérjék biuret-reakciójának meghatározásával foglalkoztak. A fehérjét lúgos alkohollal vonták ki. Összehasonlításra tetszőleges minőségű és ismert fehérjetartalmú lisztet használtak. Hibahatár 2—5%.

A fehérjék és bomlási termékei biuret-reakcióját Gavrilov és munkatársai [7, 8], Utkin [33], Pope és Stevens [25] használták fel proteolízis követésére. Plechan [24] a fölös rézhidroxid által okozott zavarosodásig titrálva, a fogyott rézacetát-oldat alapján határozza meg az oldat fehérje mennyiségét.

Kísérleti rész

Vizsgálataimban kétféle lisztmintát dolgoztam fel (2-es sz. és A).

A szárazanyag tartalom meghatározás $100^{\circ}C$ -on vákuum piztolyban történt. A nitrogént félmikro Kjeldahl-módszerrel határoztam meg. Az áthajtott Parnass—Wagner-készülékben történt, az ammóniát 1%-os bórsavban fogtam fel, a titrálást $n/50$ és $n/100$ kénsavval végeztem.

A vizsgálatokban használt lisztminták adatai:

2. minta $12,88 \pm 0,04\%$ víztartalom, $2,02 \pm 0,06\%$ összes-N (szárazanyag).

A. minta $13,52 \pm 0,09\%$ víztartalom, $2,02 \pm 0,03\%$ összes-N (szárazanyag).

A kioldás módja: A vizsgálatához bemeért 2—5 g lisztet gumidugóval lezárható centrifugacsőben 40 ml 5,20%-os nátriumklorid hozzáadása után rázógéppel 24 óra hosszat diszpergáltam. Tíz percnyi üleptetés után 30 perc centrifugálás (1500—2000 fordulat), majd kétszeri átmosás következett 20 ml mosófolyadékkal. Végül az oldatot 100 ml-re kiegészítettem.

A biuret-reakció kivitelezése a következő: A fehérjeoldatot desztillált vízzel 10 ml-re kiegészítettem, 2,5 ml 20%-os rézszulfátot, majd 12,5 ml 6%-os nátrium-

hidroxidot adtam hozzá. A 25 ml végső térfogat nátriumhidroxid koncentrációja 3%. A reakciónak ilyen kivitelezése lehetőséget nyújtott mind a fehérje, mind a rézszulfát koncentráció változtatására, valamint a lúg koncentrációja a pH állandóságát biztosította. Tíz percnyi állás után 10 percig centrifugáltam kétezres fordulatszámmal. A biuret-oldatot kétszer 5 ml-éből nitrogén meghatározással ellenőriztem, hogy a reakció folyamán a fehérje koncentráció változott-e. Kétszer 5 ml-ből pedig a kötött rész mennyiségét határoztam meg a következő módszerrel.

1. *Koloriméteres rézmeghatározás.* Lieben és Jesserer [20] szerint végzett rézmeghatározás nem bizonyult helyesnek. Az extinkció mértéke függ az ammoniumhidroxid koncentrációjától, ez pedig a réztartalom szerint változik. A megsavanyításkor a fehérje kicsapódik, az oldatot zavarossá teszi a kolorimetriás mérés kárára, eltávolítása pedig rézvesztést okoz. Ily módon jelentős hiba alakul ki.

2. *Titrimetriás rézmeghatározás.* Egyszerűbben kivitelezhetőnek és pontosabbnak bizonyult a titrimetriás rézmeghatározás, részben az Utkin [33], részben a Koltzoff által módosított Brunnsfélé eljárás [16] szerint. Ezzel a módszerrel a hibahatár $\pm 2-4\%$ között ingadozott.

A kioldáskor megvizsgáltam az oldást szabályozó tényezők hatását.

Az oldószertérfogat és a bemért lisztmennyiség aránya is befolyásolja a kioldott fehérje mennyiségét. Az oldószer mennyiségét állandónak tartva, a kioldott fehérjemennyiség változását a bemért lisztmennyiség függvényében az 1. ábra mutatja.

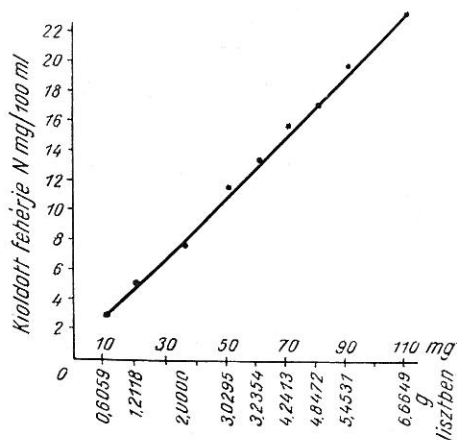
2 g liszt 24 órás diszpergálás után hosszabb centrifugálással sem tisztult ki. Az erős opalizálást azbeszttel rétegzett 1 G 3-as üvegszűrőn szűrővel szüntettem meg.

Az 5%-os nátriumkloridban diszpergálható fehérjefrakció biuret-reakciójának vizsgálata

A rézszulfátmennyiség növelésének hatása a biuret-oldat extinkció értékének változására

A rézszulfát mennyiségének hatását már Lieben és Jesserer [20], valamint Kuntzel és Dröschler [19] is vizsgálták. Vizsgálataik azonban minőségi jellegűek voltak, kis határok között mozogtak. Kísérleteimben a fehérje-N mennyisége 0,34—1,07 mg/ml között, a rézszulfát értéke 0,05—2,5 ml között változott. A különböző hullámhosszakat áteresztő szűrőkkel mért extinkció értékeket (több kísérleti középértéke) az 1. táblázat és a 2. ábra tünteti fel.

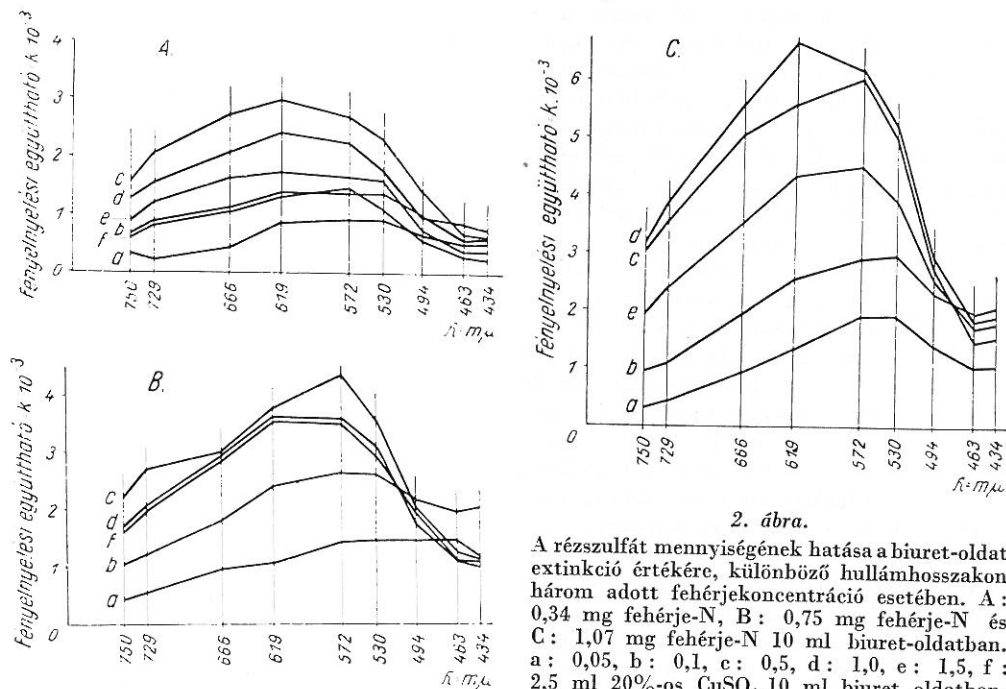
Ha a rézadagolás függvényében vizsgáljuk az egyes szűrőkkel mért extinkciós értékváltozásokat, akkor két különböző típusú görbét kapunk, melyeket az S 43-as és az S 61-es szűrő jellemez. Az átmenetet az S 50-es szűrő mutatja. Lieben és Jesserer a vörös és a kék színű komplex jellegzetes szűrőjének az S 43-at és az S 72-t tartják (3. ábra).



1. ábra.

A kioldott fehérjemennyiség változása a bemért lisztmennyiség függvényében (oldószer : 40 ml 5%-os NaCl). Vízszintes tengely felső számsora : lisztben levő fehérje-N mg ; alsó számsor: a bemért liszt mennyisége.

A fenti adatokból kitűnik, hogy a rézkoncentráció növelésével az extinkció értéke eleinte növekszik, majd a maximumot elérve csökken. A vörös színű peptid komplex többnyire két maximummal kimutathatóan jelentkezik: 0,10 és az 1,00 ml-es rézszulfát koncentrációban. A kék színű amino-komplex maximális értékét az 1,00 ml-es rézszulfát koncentrációban mutatja.



2. ábra.

A rézszulfát mennyiségének hatása a biuret-oldat extinkció értékére, különböző hullámhosszakon három adott fehérjekoncentráció esetében. A: 0,34 mg fehérje-N, B: 0,75 mg fehérje-N és C: 1,07 mg fehérje-N 10 ml biuret-oldatban. a: 0,05, b: 0,1, c: 0,5, d: 1,0, e: 1,5, f: 2,5 ml 20%-os CuSO_4 10 ml biuret oldatban.

Eszerint változik a biuret-oldat színe, amely kifejezésre jut a típusos abszorpciós görbében. A típusos abszorpciós görbe extinkció maximuma a rézszulfát koncentráció növelésével a következőképpen tolódik el:

1. táblázat

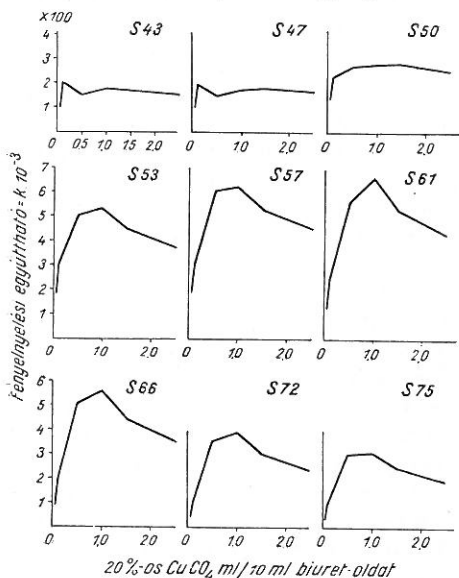
A biuretoldat abszorpciós görbéjének extinkció maximuma a rézszulfát koncentráció növelésével

20% CuSO_4 ml 10 ml biuret-oldat	Fehérje-N mg 10 ml biuret-oldat		
	0,34	0,75	1,07
0,05	530 m μ	530 m μ	530 m μ
0,10	530 «	530 «	530 «
0,50	572 «	572 «	572 «
1,00	619 «	—	619 «
1,50	619 «	619 «	619 «
2,50	572 «	619 «	572 «

A rézadagolás növelésével az extinkció maximuma előbb a hosszú hullámhossz felé tolódik, majd újból a rövidebb hullámhosszra tér vissza. 0,34—1,18 mg fehérje-N 10 ml biuretoldatban a fehérje koncentráció értéke ezeket a változásokat lényegében nem érinti. A rövid hullámhossz felé akkor tér vissza, amikor a rézszulfát koncentrációjának növelése a relatív extinkció értékét csökkenti.

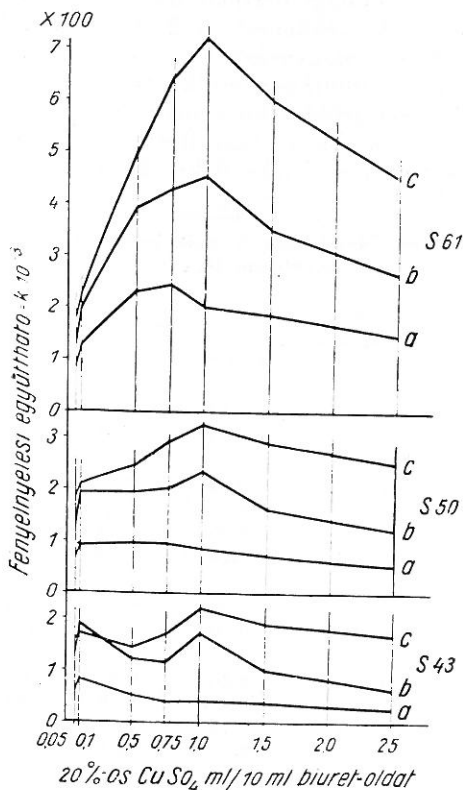
Az optimális rézszulfát koncentrációban, ahol a relatív maximális értéket kapjuk, a fehérje komplex telítettnek tetelezhető fel. A kisebb rézszulfát koncentrációban, tehát a telítetlen komplexek extinkció értékeire jellemző, hogy rövidebb hullámhosszban (434—463 m μ) magasabb, mint a hosszú hullámhosszban (729—750 m μ). Az optimálisnál nagyobb rézkoncentrációban, tehát a túltelített komplexekben ez a viszony fordított. Ennek megfelelően a telítetlen komplex vörösibolya, a túltelített pedig jellegzetesen kék színű, gyengén ibolya árnyalattal.

Az eredmények azzal a pontossággal fogadhatók el, amelyet a Pulfrich fotométer színszűrői kismértékű szelektivitásuk folytán megengednek.



3. ábra.

A különböző hullámhosszokon mért extinkciók értékváltozása rézszulfát adagolás függvényében



4. ábra.

A biuret-oldat extinkciójának változása különböző szűrőn mérve a rézszulfát koncentráció függvényében. a: 0,27, b: 0,79, c: 1,18 mg fehérje-N 10 ml biuret-oldatban.

Az extinkció érték és a kötött réz mennyiségének összefüggése

Ezekben a vizsgálatokban csak a jellegzetes színszűrőket használtam. A kötött réz mennyiségét titrimetrikusan állapítottam meg. Az adatok tanúsága szerint az extinkció értékével együtt nő, illetve csökken a kötött réz mennyisége. A telítetlen komplexek kötött rézértéke hasonló, ennek ellenére az extinkció értéke a fehérje koncentrációnak megfelelően növekszik. A telített rézkomplexekben a kötött réz értéke és az extinkció együtt növekszik a fehérje koncentrációjával. Hasonló a viszony a túltelített komplexekben is. A korreláció a kötött réz és a kék amino-komplex extinkció értéke között a legnagyobb. A telített rézkomplex több órai állás után a kötött réz egyrészt leadja a rézhidroxid kiválása közben. Több kutató feltételezi, hogy a réz egyrésze ilyenkor kolloidálisan kötött rézhidroxid, ún. »labilisan kötött« réz. Az adatokat a 4. ábra tünteti fel.

A fehérjenitrogén koncentráció csökkenése a biuret-oldatban

Annak eldöntésére, hogy a kicsapódó fölös rézhidroxid milyen mértékű nitrogénvesztést idéz elő a biuret-oldatban, meghatároztam a biuret-oldat valóságos fehérje-nitrogén koncentrációját. A fehérje-nitrogén koncentráció csökkenése nem volt olyan nagymértékű, hogy megokolná a rézadagolás növekedésével beálló extinkció érték csökkenést. A 2. táblázat adataiból kitűnik, hogy az okozott nitrogénvesztés magyarázható a fehérjének a kicsapott rézhidroxidon történő adszorpciójával, minthogy értéke független a feleslegben levő rézhidroxid mennyiségétől és a fehérjeoldat koncentrációjától. Értéke 0,01–0,03 mg fehérje-nitrogén között ingadozik, ha a rézszulfát koncentrációja 0,05–1,50-ig változott, míg a fehérje koncentráció értéke 0,30–1,20 mg volt 10 ml biuret-oldatban.

2. táblázat

A biuret-oldat fehérje-N csökkenése a rézszulfát koncentráció függvényében

20%-os CuSO ₄ ml 10 ml biuret-oldat	Fehérje-N mg 10 ml biuret oldat		
	számított	talált	vesztés
0,05	0,32	0,30	0,02
	0,73	0,71	0,02
0,10	0,30	0,27	0,03
	0,73	0,71	0,02
	0,76	0,74	0,02
	1,18	1,18	—
0,50	0,30	0,27	0,03
	0,76	0,75	0,01
1,00	0,30	0,27	0,02
	0,40	0,39	0,01
	0,74	0,71	0,03
	0,75	0,73	0,02
	0,76	0,74	0,02
	0,77	0,76	0,01
	0,83	0,80	0,03
1,50	0,76	0,73	0,03
	0,30	0,26	0,04
	1,18	1,17	0,01

Az összes só koncentrációjának hatása a biuret-oldat extinkciójára és rézkötő képességére

Annak megállapítására, hogy a rézszulfát mennyiségének növelésekor fellépő összes só koncentráció emelkedése milyen hatással van a biuret-oldat rézkötő képességére és extinkció értékére, összehasonlító kísérletet végeztem ugyanolyan koncentrációjú oldattal. Az egyik sorozatban 1 ml rézszulfátoldatban levő rézből és összes só koncentrációból (I), a másik sorozatban az 1 ml-ben lévő réz koncentráció, de a 2,5 ml-ben levő összes só koncentráció (II) volt egyenértékű mennyiségű, nátriumszulfát hozzáadása révén. Az eredmények középértékeit a 3. táblázat tartalmazza. A sókoncentráció növelése nem okozott változást sem az extinkció értékében, sem a kötött réz mennyiségében. A rézadagolás növelése nem változtatta meg számottevően a biuretoldat hidrogénion koncentrációját.

3. táblázat

Az összes só koncentrációjának hatása a biuret-oldat extinkciójára és rézkötő képességére

Sorozat	Fehérje N mg 10 ml biuret-oldat	Extinkció			Kötött Cu mg 10 ml biuret-oldat
		S 43	S 50	S 61	
I.	0,61	0,149	0,194	0,345	5,21
II.	0,61	0,149	0,187	0,347	5,34

Az 1 ml-nél magasabb rézszulfát koncentrációban bekövetkező extinkcióérték és a kötött rézmennyiség csökkenés tehát nincs összefüggésben az összes só

koncentrációjával, a fehérje koncentrációnak csökkenésével, a p_H értéknek változásával, aminek oka a rézion koncentráció növekedésében keresendő. A fehérje biuret-oldat állás közben K ü n t z e l és D r ö s c h e r [19] adatai értelmében változtatja extinkció értékét. A kötött réz egyrésze rézoxid vagy hidroxid formájában kiválik.

A fehérjeoldat állásának hatása a fehérje biuret-színére

A fehérje és a biuret-oldat állásának a biuret-színére és rézkötő képességére gyakorolt hatásának vizsgálatára a következő sorozatot állítottam be: 1. frissen előállított fehérjeoldat, 2. 24 óra múlva $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on xilol alatt eltartott, 3. 48 óra múlva szobahőmérsékleten konzerválás nélkül tartott fehérjeoldat, 4. végül a fehérje biuret-oldat 24 órai állás után. Eredményeit a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat

A fehérjeoldat állásának hatása a biuret-oldat színére
(0,50 ml 20%-os CuSO_4 10 ml biuret-oldatban)

	Extinkció									Cu mg 10 ml biuret- oldat
	S 43	S 46	S 49	S 53	S 57	S 61	S 66	S 72	S 75	
1. Fehérjeoldat frissen elő- állítva	0,119	0,125	0,222	0,415	0,519	0,537	0,464	0,335	0,270	10,32
2. Fehérjeoldat 24 óráig $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on	0,124	0,131	0,223	0,418	0,511	0,546	0,469	0,339	0,274	10,48
3. Fehérjeoldat 48 óráig szoba- hőmérsékleten	0,117	0,125	0,217	0,396	0,472	0,489	0,405	0,297	0,234	9,45
4. Biuret-oldat 24 óra múlva	0,106	0,108	0,217	0,392	0,480	0,502	0,427	0,321	0,244	9,32

A fehérje oldatok $0\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartva 24 óra múlva is azonos szint eredményeztek. A másik két esetben bekövetkezett csökkenés a kék amino-komplexet érinti. 24 órai állás után a kötött réz 9,7%-a vált ki a biuret-oldatból.

A fehérje koncentráció összefüggése a biuret-szín extinkció értékével és a kötött réz mennyiségével

A fenti vizsgálatok alapján kidolgoztam a fehérjenitrogénnek a biuret-reakció, valamint a rézkötő képesség alapján való kvantitatív meghatározását az 5%-os nátriumkloridban diszpergálható búzaliszt frakciójára. Minden esetben a 25 ml-re feltöltött biuret-oldathoz a maximális értéket adó 1 ml 20%-os rézszulfátot adtam. Az 5. és 6. ábra alapján kimondhatjuk, hogy az 5%-os nátriumkloridban diszpergálható fehérje koncentrációja és az általam használt eljárás szerint meghatározott extinkció értéke, valamint a kötött réz mennyisége között a Beer—Lambert-féle törvény szerinti egyenes arányosság fennáll.

A kék amino-komplex extinkció értéke erősebben növekedik a fehérje koncentráció növelésével, mint a peptid-komplexus extinkció értéke. Az adatait az 5. és 6. ábrák mutatják.

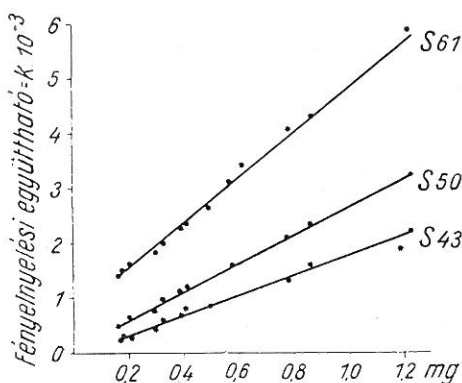
Az extinkció és a kötött réz értékének alakulása az oldás idejének függvényében

A diszpergálható fehérje 94%-a már az első óra elteltével diszpergálódik. Vizsgálat tárgyává tettem a fehérjének az oldási idő folyamán a biuret-reakcióval kimutatható változását. Ezekben a kísérletekben 2 g lisztet a szokásos módon

extraháltam, 10 ml-éből 1 ml 20%-os rézsulfáttal végeztem a biuret-reakciót. A biuret-oldat térfogata 25 ml volt. A kísérlet eredményeit az 5. táblázat összegezi.

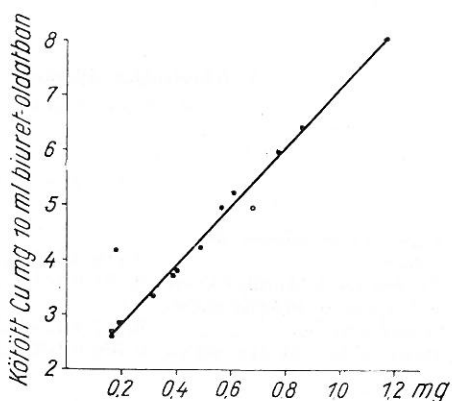
A harmadik óráig a kötött réz és az extinkció értéke együtt halad a kioldott fehérje mennyiségével. A 3—4. óra között újabb mennyiségű fehérje diszpergálódik, ennek ellenére a kötött réz és az extinkció értéke csökken, azonban nem szignifikánsan. 16 óra múlva a kismértékű fehérjenitrogén emelkedése nagymértékű rézkötést idéz elő, a réz kék amino-komplex formájában kötődik. A 16. órás eredmény a koncentráció emelkedésével arányos extinkció értéknél magasabb.

Valószínű, hogy ilyenkor amino, illetve karboxil csoportok válnak szabaddá, minthogy a peptid kötést jellemző vörös komponens extinkció értéke változatlan marad. Ez annak a jele, hogy hidrolitos bomlás nem következett be, tehát a felszabadult csoportok az oldalláncban, illetve a lánc végeken helyezkednek el. Nyitva



5. ábra.

A fehérje koncentráció összefüggése a biuret-szín extinkció értékével. Vízszintes tengely: mg fehérje-N 10 ml biuret-oldatban.



6. ábra.

A fehérje koncentráció összefüggése a kötött réz mennyiségével. Vízszintes tengely: mg fehérje-N 10 ml biuret-oldatban.

marad az a kérdés, hogy vajon az oldószer hozza-e létre ezt a változást, vagy proteolízis hatására következik be. A következtetést megnehezíti az, hogy gyakorlati célból nem egységes fehérjével, hanem fehérje-komplexszel dolgoztam.

5. táblázat

Az extinkció és a kötött réz értékének alakulása az oldás idejének függvényében

Idő	Fehérje-N mg 10 ml		Extinkció			Kötött Cu mg 10 ml biuret-oldat
	eredeti oldat	biuret-oldat	S 43	S 49	S 61	
10 perc	1,80 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,143 ± 0,002	0,211 ± 0,003	0,393 ± 0,007	5,69 ± 0,28
30 «	1,83 ± 0,01	0,73 ± 0,01	0,125 ± 0,004	0,189 ± 0,000	0,386 ± 0,010	5,61 ± 0,14
60 «	1,89 ± 0,00	0,76 ± 0,02	0,134 ± 0,008	0,251 ± 0,002	0,432 ± 0,009	5,89 ± 0,08
2 óra	1,93 ± 0,05	0,77 ± 0,02	0,152 ± 0,001	0,235 ± 0,002	0,446 ± 0,025	6,32 ± 0,18
3 «	1,93 ± 0,01	0,77 ± 0,01	0,132 ± 0,008	0,201 ± 0,004	0,438 ± 0,006	6,36 ± 0,15
4 «	1,94 ± 0,02	0,78 ± 0,01	0,130 ± 0,008	0,203 ± 0,005	0,410 ± 0,011	6,02 ± 0,11
8 «	2,01 ± 0,01	0,80 ± 0,00	0,163 ± 0,001	0,219 ± 0,004	0,416 ± 0,005	6,03 ± 0,05
16 «	2,05 ± 0,02	0,83 ± 0,01	0,157 ± 0,007	0,241 ± 0,005	0,513 ± 0,004	7,92 ± 0,31

Mindenesetre levonható az a tanulság, hogy az extinkció és a rézkötő készség értékére a fehérje diszpergálási időtartamának is szabályzó hatása van. A diszpergálás optimális időtartama 4 óra. Ez a legrövidebb idő, amely alatt egy hosszabb ideig fennálló egyensúlyi állapot beáll és nem történik eltolódás a két komponens között.

Összefoglalás

1. A szárazanyag meghatározásra legalkalmasabb a 100 C°-on, 20 Hg mm-en való szárítás 6 órán keresztül, mert lényegesen csökkenti a szárítás időtartamát.

2. Az 5%-os nátriumkloridban diszpergálható búzaliszt fehérje frakció középértékben az összes nitrogén 22,7%-át teszi ki. A fehérjenitrogénnek 90%-a diszpergálódik az első óra elteltével. Ismételt oldás az összes nitrogén 3%-át oldja ki 24 óra alatt. A kétszeri utánmosás 14,18%-kal — a kioldható összes nitrogén %-ban számítva — emeli a fehérje nitrogén koncentrációját.

3. A lisztnek az oldószerhez való maximális aránya 1:8-hoz. A bemérés növekedésével egyenesen arányos a kioldott fehérje növekedése.

4. A fehérjeoldatnak azbeszttel rétegzett üvegszűrőn való szűrésekor felépő fehérjevesztés a mechanikusan visszatartott durván diszperz fehérje, másrészt az adszorptíve megkötött fehérje mennyiségéből tevődik össze. Az előbbi a kioldott fehérjenitrogén 10,9%-át, az utóbbi 7,7%-át tette ki.

5. A rézszulfát mennyiségének növelése emeli a fehérje biuret-oldat extinkció értékét és rézkötő képességét egy maximális értékig, majd csökkenti, ugyanakkor a típusos abszorpciós maximum a hosszabb hullámhossz felé tolódik el. Lényeges eltérés van a telített és telítetlen biuretoldat színe között, az előbbi kék szín ibolyás árnyalattal, az utóbbi ibolyaszínű vöröses árnyalattal.

6. A rézszulfát mennyiségének növelésére bekövetkező extinkció és a rézkötő képesség csökkenés nem magyarázható sem p_H eltolódással, sem az összes só koncentráció növekedésével bekövetkező változással. A fehérjenitrogén koncentráció értéke sem csökken ebben a szakaszban nagyobb mértékben. A kimutatható fehérje-nitrogén veszteség nem adszorbtív jellegű, értéke függetlenül a fehérjenitrogén koncentrációtól és a feleslegben kiváló rézhidroxid mennyiségtől, 0,01—0,03 mg között ingadozik 10 ml biuretoldatban.

7. A fehérjeoldat 24 órát 0 C°-on sterilen tartva nem változtatta biuret értékét, a kötött réz mennyisége sem változott.

8. Ha az 5%-os nátriumkloridban diszpergálható fehérje nitrogén koncentrációja 0,20—1,20 között van, mennyisége, a Kjeldahl-féle módszer hibahatárával azonosan, kolorimetrikusan meghatározható a közölt módszer alkalmazásával.

9. A komplexben kötött réz korrelációban van az extinkció értékével, egyenesen arányos az oldat fehérje-nitrogén koncentrációjával, tehát nagyságából következtethetünk az oldat fehérjetartalmára. Meghatározásának legalkalmasabb módja az egyszerű és pontos jodometrikus titrálás.

Érkezett : 1955. április 14.

Irodalom

- [1] Association of Official Agricultural Chemists, Official Tentative Methods of Analysis IV. Washington 1940.
- [2] Blish, M. M.: Cereal Chem. 7. 421. 1930.
- [3] Christensen, J.: J. lab. clin. Med. 31. 916. 1946.
- [4] Doby, G. & Füleky, Gy.: Mathem. és Termtud. Értesítő, 59. 155. 1940; 61. 926., 947. 1942.
- [5] Dodonowa, J. W. & Ivanow, N. N.: Biohimija 3. 723. 1938. Chem. Zbl. 110. II. 260. 1939.
- [6] Fine, J.: Biochem. J. 28. 799. 1935.
- [7] Gavrilow, J. I. & Guizburg, I.: Arch. Sci. Biol. 39. 549. 1940.

- [8] *Gavrilov, N. I., Paradaschwili, A. I. & Govorov, A. I.*: Biohimija, 4. 35. 1939. Chem. Zbl. 110. II. 3823. 1939.
- [9] *Geddes, W. F. & Goulden, O. H.*: Cereal Chem. 7. 527. 1930.
- [10] *Gortner, R. A., Hoffman, F. W. & Sinclair, B. W.*: Cereal Chem. 6. 1. 1929.
- [11] *Gubareff, E. & Sergejew, E.*: Biochem. Z. 255. 89. 1931.
- [12] *Halle, W. S.*: Cereal Chem. 16. 695. 1939.
- [13] *Harris, R. H.*: Cereal Chem. 8. 113. 190., 1931.
- [14] *Hoffmann, W. F. & Gortner, R. A.*: Cereal Chem. 4. 221. 1927.
- [15] *Kingsley, R. G.*: J. Biol. Chem. 135. 107. 1940.
- [16] *Kolthoff, I. M. & Menzel, H.*: Die Massanalyse. II. Springer, Berlin. 1931.
- [17] *Kossolapov, B. M.*: Lab. Prakt. 15. 18. 1940.; Zs. Prikl. Him. 13. 314. 1940. Chem. Zbl. 111. II. 3232. 1940.
- [18] *Kühl, H.*: Mühlenleb. 3. 17., 35., 55. 1933.
- [19] *Küntzel, A. & Dröscher, Th.*: Biochem. Z. 306. 177. 1940.
- [20] *Lieben, F. & Jesserer, H.*: Biochem. Z. 285. 36. 1936.; 292. 403. 1937.
- [21] *Mangels, C. E.*: Cereal Chem. 11. 164. 1934.
- [22] *Nagy, D., Weidlein, W. & Mixon, R. M.*: Cereal Chem. 18. 515. 1941.
- [23] *Osborne, T. B.*: The Proteins of the Wheat Kernel. Abderhalden, E.: Handb. d. Biol. Arbeitsmethoden Abt. I. 8. 382. Urban & Schwarzenberg. Berlin. 1955.
- [24] *Plechan, M. I.*: Zs. Prikl. Him 13. 620. 1940. Chem. Zbl. 111. II. 3232. 1940.
- [25] *Pope, C. C. & Stevens, M. F.*: Biochem. J. 33. 1070. 1939.
- [26] *Rich, E. C.*: Cereal Chem. 13. 522. 1936.
- [27] *Rich, E. C.*: Cereal Chem. 15. 596. 1938.
- [28] *Robinson, W. H. & Hogben, G.*: J. Biol. Chem. 135. 707. 721., 1940.
- [29] *Schulhoff, L.*: Magy. Chem. Folyóirat 35. 10., 32., 50. 1931.
- [30] *Sharp, P. F. & Elmer, F.*: Cereal Chem. 1. 83. 1924.
- [31] *Sizer, A.*: Proc. Soc. Exp. Biol. 37. 107. 1937.
- [32] *Teller, L. G.*: Cereal Chem. 9. 261. 1932.
- [33] *Utkin, L.*: Biochem. Z. 267. 69. 1933.

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВ ПШЕНИЧНОЙ МУКИ I. О БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИИ

Л. Маркуш

Научно Исследовательский Институт Агрохимии, Отдел Биохимии, Будапешт (Венгрия)

Резюме

При исследовании биуретовой реакции растворимых в нейтральном растворе солей фракции белков пшеничной муки получились следующие результаты:

1. Для определения сухого вещества является самым пригодным высушивание при 100° С при 20 мм ртутного столба в течение 6 часов, так как существенно снижает время сушки.

2. Белковая фракция пшеничной муки, диспергируемая в 5%-ном растворе Na Cl составляет в среднем 22,7% от общего азота. В течение первого часа диспергируется 90% белкового азота. Повторное растворение извлекает за 24 часа 3 % общего азота. Дальнейшее двукратное отмывание повышает концентрацию белкового азота на 14,18% — в процентах от растворимого общего азота.

3. Максимальное соотношение муки и растворителя 1:8 с увеличением навески прямо пропорционально увеличению растворимого белка.

4. Потеря белка при фильтрации белкового раствора через азбестово — стеклянный фильтр состоит из количества механически задержанного грубо-дисперсного и адсорбционно-связанного белка. Первое составляет 10,9%, второе 7,7% от растворенного белкового азота.

5. Повышение количества медного купороса увеличивает величину биуретового раствора белка и способность связывания меди до максимального значения, потом снижает, и в то же время типичный адсорбционный максимум перемещается в сторону более длинных волн. Существенная разница имеется между окраской насыщенного и ненасыщенного биуретового раствора. Первый имеет синюю окраску с фиолетовым оттенком, а второй фиолетовую окраску с красноватым оттенком.

6. Снижение способности связывания меди и величины экстинкции под влиянием увеличения количества медного купороса не объясняется ни перемещением рН, ни изменениями, происходящими в увеличении и концентрации общей соли. Величина концентрации

белкового азота не снижается в этом периоде существенным образом. Обнаруживаемая потеря белкового азота не носит характер адсорбции, величина его колеблется независимо от концентрации белкового азота и от количества меди от 0,01 до 0,03 мг/10 мл биуретового раствора.

7. Выдержанный белковый раствор в 24 часа при 0°C в стерильных условиях не изменил величину биурета, и количество связанной меди тоже не изменилось.

8. Если концентрация диспергируемого в 5%-ном растворе NaCl белкового азота колеблется между 0,20--1,20, тогда количества его можно определить в пределах точности, метода Келдала колориметрическим путем следующим образом. Белковый раствор, если объем его ниже 11,5 мл., тогда дистиллированной водой доведем до 11,5 мл. Прибавим 1 мл. 20% медного купороса, хорошо взбалтываем и прибавляя 12,5 мл NaOH снова взбалтываем. Величина экстинкции определяется после 10 мин. стоянки и 10 минутного центрифугирования при помощи фильтров S 43 или S 61.

9. Связанная в комплексе медь находится в корреляции с величиной экстинкции, прямопропорционально концентрации белкового азота раствора. Значит по величине ее можно судить о количестве белков раствора. Самым годным способом определение его из-за простоты является иодометрическое титрование.

Табл. 1. Связь между величиной экстинкции и концентрацией медного купороса 1. Белковый азот в мг. на 10 мл биуретового раствора.

Табл. 2. Белковый азот, в мг на 10 мг биуретового раствора 1. вычисленный, 2. найденный белковый азот в мг. 3. Потеря.

Табл. 3. Влияние концентрации общей соли на экстинкцию и способность связывания меди биуретового раствора. 1. Белковый азот в мг на 10 мл. биуретового раствора. 2. Связанная медь в мг на 10 мл. биуретового раствора.

Табл. 4. Влияние выдерживания белкового раствора на окраску биурета белков (0,5 мл. 20% CuSO_4) 1. Свежий белковый раствор. 2. Выдержанный в течение 48 часов при комнатной температуре без консервирования 4. биуретовый раствор белка после 24 часовой стоянки.

Табл. 5. Формирование величин экстинкции связанной меди в зависимости от времени растворения. 1. Время (первые три данные обозначают минуты остальные часы). 2. Исходный раствор, 3. биуретовый раствор. Белковый азот в мг на 10 мл. 5. Связанная медь на 10 мл биуретового раствора.

Рис. 1. Изменение количества растворенного белка в функции измеренного количества муки. (Растворитель 40 мл 5% NaCl Верхний ряд чисел вертикальной оси: количества И-белка в муке в мг; нижний ряд чисел: количество муки).

Рис. 2. Действие количества медного купороса на изменение экстинкции биуретового раствора, в случае трех данных концентрации белка на различных длин волны. А: И-белка 0,34 мг, В: И-белка 0,75 мг, С: И-белка 1,07 мг в 10 мл биуретового раствора, А: 0,05, b: 0,1, c: 0,5, d: 1,0, e: 1,5 f: 2,5 мл 20% CuSO_4 в 10 мл биуретового раствора.

Рис. 3. Изменение экстинкции на различной длине волны в функции медного купороса.

Рис. 4. Изменение экстинкции биуретового раствора на различном фильтре в функции концентрации медного купороса: А: 0,27, b: 0,79, c: 1,18 мг И-белка в 10 мл биуретового раствора.

Рис. 5. Взаимная зависимость концентрации белка с изменением экстинкции биуретового цвета. Вертикальная ось: И: белка в мг, b: 10 мг биуретового раствора.

Рис. 6. Взаимная зависимость концентрации белка количеством связанной меди: вертикальная ось: И-белка в мг, b: 10 мг биуретового раствора.

The Proteins in Wheat Meal I. The Biuret Reaction

† L. MÁRKUS

Agrochemical Research Institute, Department of Biochemistry, Budapest (Hungary)

Summary

A study of the biuret reaction given by neutral saline-soluble protein fractions of wheat meal resulted in the following findings:

1. Dry substance determination is best made after 6 hours' drying at 100°C and under 20 mm Hg for it means a considerable saving of time.

2. The mean value of the wheat-meal protein fractions dispersed in 5% NaCl amounts to 22,7% of the total nitrogen. 90% of the protein nitrogen is dispersed at the end of the first hour. A subsequent solution dissolves 3% of the total nitrogen in 24 hours. Computed in percentage of

the dissoluble total nitrogen, the concentration of nitrogen protein increases after the two subsequent washings by 14,18%.

3. The highest ratio of meal : solvent is 1 : 8. In direct ratio to increased additions increases the amount of protein dissolved.

4. The amount of coarsely dispersed protein retained mechanically by the filter together with the amount of adsorbed protein account for the loss of protein which arises on filtering the solution through a glass filter with asbestos layers. The first-mentioned loss amounted to 10,9, the second one to 7,7% of the total nitrogen.

5. By increasing the amount of CuSO_4 the extinction value of the protein biuret solution as well as its copper-binding capacity are first increased to a maximum, thereafter diminished, while the typical adsorption maximum simultaneously shifts to the longer wavelength. There is an essential difference in the colour of the saturated and unsaturated biuret solution : the former is blue with a violet hue, the latter is violet with a redish shade.

6. Neither pH displacement nor changes consequent upon increases in the concentration of total salt can be accounted for the decrease in copper-binding capacity and extinction caused by increases in the amount of CuSO_4 . Nor is the value of the protein nitrogen concentration diminishing in this phase appreciably. The demonstrable loss of the protein nitrogen is not an adsorption phenomenon, its value varies over a range from 0,01 to 0,03 mg/10 ml of biuret solution, independently of the protein nitrogen concentration and of the copper hydroxide precipitating in excess.

7. Kept for 24 hours at 0° under sterile conditions, the biuret value of the protein solution did not change and the amount of bound copper also remained unchanged.

8. If the concentration of the protein nitrogen dispersed in 5% NaCl is between 0,20 and 1,20, then its amount can be determined colorimetrically, within the limits of error allowed in Kjeldahl's method, by applying the following procedure : the protein solution is made up with sterile water to 11,5 ml, 1 ml of 20% CuSO_4 is added, and shaken thoroughly, then 12,5 ml of NaOH is added, and shaken once more. After standing for 10 minutes and centrifuging for another 10 minutes, the extinction coefficient is determined with the filter S 43 or S 61.

The bound copper of the complex and the extinction value are in correlation : the bound is proportional to the protein nitrogen concentration of the solution, consequently it allows of concluding the protein content of that solution. For the determination of the bound copper the iodometric titration is the most suitable owing to its simplicity and exactness.

Table 1. The relationship between CuSO_4 concentration and extinction coefficient. (1) Protein N mg in 10 ml of biuret solution.

Table 2. Protein N mg in 10 ml of biuret solution. (1) Calculated. (2) Found. (3) Loss.

Table 3. Effect of total salt concentration on the extinction of the biuret solution and its copper-binding capacity. (1) Protein N mg in 10 ml of biuret solution. (2) Bound copper in mg in 10 ml of biuret solution.

Table 4. The effect of protein solutions allowed to stand for different periods of time upon the colour of the protein biuret (0,5 ml of 20% CuSO_4). (1) Freshly prepared protein solution. (2) Stored under xylol at 0°C for 24 hours. (3) Protein solution kept at room temperature for 48 hours without any preservation. (4) Protein biuret solution after 24 hours' standing.

Table 5. The relationship between extinction and bound copper as functions of time for dissolution. (1) Time, first three data in minutes, the others in hours. (2) Original solution. (3) Biuret solution, protein N mg/10 ml. (5) Bound Cu mg in 10 ml of biuret solution.

Fig. 1. Changes in the amount of dissolved protein as a function of the amount of meal. Ordinate : dissolved protein N mg/100 ml ; abscissa : protein N in meal mg.

Fig. 2. Effect of quantity of copper sulphate on the extinction values of biuret at different wave-lengths in case of three given levels of protein concentration. A : 0,34 mg. of protein-N, B : 0,75 mg. of protein-N, C : 1,07 mg. of protein-N in 10 ml. of biuret solution. a : 0,05, b : 0,1, c : 0,5, d : 1,0, e : 1,5 and f : 2,5 ml. of 20% copper sulphate in 10 ml. of biuret solution.

Fig. 3. Changes in extinction values measured at different wave-lengths as a function of copper sulphate applied.

Fig. 4. Changes in extinction values of biuret solution measured with the use of different filters, as a function of the concentration of copper sulphate applied. a : 0,27, b : 0,79 and c : 1,18 mg. of protein-N in 10 ml. of biuret solution.

Fig. 5. Correlation of concentration of protein and extinction values of biuret colour. Ordinate : mg. of protein-N in 10 ml. of biuret solution.

Fig. 6. Correlation of concentration of protein and quantity of bound copper. Ordinate : mg. of protein-N in 10 ml. biuret solution.