

PRŮBĚH HYDROLYTICKÉHO ŠTĚPENÍ BÍLKOVIN (IV) TVORBA A ISOLACE CYSTINU PŘI HYDROLYTICKÉM ŠTĚPENÍ KERATINU KYSELINOU SOLNOU

V. MAREČEK, A. TRUBNYJ

Výzkumný ústav pro oleje a tuky v Praze
Výroba polévkových přípravků, n. p., Byšice

Odštěpování a následující izolace cystinu z hydrolysátu keratinu jsou silně závislé na reakčních podmínkách hydrolysy. Z prací zabývajících se určením a izolací cystinu uvádíme práce K. A. H. Mörnera, Embdena, Pattena, Hesse a Sullivana a konečně H. Buchtaly [2]. H. Buchtala zdokonalil původní Mörnerův postup izolace cystinu z hydrolysátu prodloužením reakční doby až na 150 hodin na vodní lázni; oba autoři předpokládají, že při štěpení se tvoří nejprve cystin, který se při vyšších teplotách postupně rozkládá. Současně se s cystinem odštěpuje a vylučuje tyrosin.

Podle našich výsledků vyžadují názory obou autorů doplnění. Určili jsme odštěpený cystin a tyrosin při štěpení pomocí kyseliny solné a kromě toho jsme sledovali praktickou izolaci jeho z hydrolysátu. Zkoušeli jsme izolovaný preparát mikroskopicky a hledali šestiboké destičky (L-cystin) a jehličky (inaktivní forma cystinu) podle H. Buchtaly. Konečně jsme sledovali i pohyb síry, organicky vázané i síranové v hydrolysátu s postupující reakční dobou.

Experimentální část

Jako suroviny jsme použili čisté rohoviny s 1,66 % síry: teoreticky by bylo možno získat maximálně 6,24 % cystinu ze 100 g bílkoviny. Hydrolysy byly provedeny ve skleněné baňce se zpětným chladičkem na vodní nebo olejové lázni, či v autoklávu. Získaný hydrolysát byl zfiltrován a odebrán vzorek k určení amoniaku a dusíku primárních aminoskupin podle D. D. van Slykea [3]. Současně byly naneseny ze zředěného hydrolysátu vzorky na chromatografický papír, a to pro jednorozměrnou chromatografii (vyvíjeno v butanol-octové směsi 5 krát podle B. Keila [4]) a pro dvourozměrnou chromatografii (fenol-butanol-octová směs). Odhad a určení cystinu a tyrosinu bylo provedeno podle V. Marečka [5]. Hydrolysáty určené k izolaci cystinu byly zpracovány tak, že po hydrolyse byl kyselý hydrolysát částečně odbarven 5 % (váhově) karboraffinu za varu, zfiltrován a zneutralisován sodou do pH 5,9. Po 60 hodinách stání byla sraženina odfiltrována, lehce promyta vodou a filtrát s promývací vodou doplněn na 1000 ml. V alikvotním podílu byla stanovena síra síranová obvyklým postupem, dále síra organicky vázaná. Ze sraženiny byl cystin izolován tímto postupem:

1. Známým postupem podle E. Fischera tak, že se sraženina (obsahující tyrosin a cystin) rozpustí v 10 %-ním amoniaku za tepla a přidá se kyselina octová, až se začne tvořit sraženina. V případě většího množství tyrosinu vylučuje se tyrosin dříve.

2. Sraženina se rozpustí v 10 %-ním amoniaku a získaný roztok se podrobí destilaci ve vakuu až do doby, kdy začne vypadávat krystalická látka.

3. Sraženina se rozpustí ve zředěné kyselině solné za tepla a po zchladnutí se reakční

Tab. 1. 100 g keratinu (1,66 % S), 200 g HCl; po hydrolyse upraven objem filtrátu na 1000 ml

číslo pokusu	trvání hydrolysy v hodinách	reakční teplota °C	sraženina g	S ve sraženině g	S ve filtrátu g	S síranová ve filtrátu g	S org. ve filtrátu g	S org. veškerá	isolováno cystinu g
1	1	118	—	—	1,3779	0,1028	1,2751	1,275	—
2	2	118	5,86	0,4563	1,1379	0,089	1,0488	1,505	—
3	3	118	7,84	0,5440	1,0694	0,0905	0,9189	1,5230	—
4	4	118	7,18	0,8460	0,8478	0,1248	0,7225	1,5685	1,7
	8	118	8,38	0,9490	0,8103	0,1316	0,6787	1,6327	1,97
6	11	118	9,75	1,0079	0,7664	0,132	0,6345	1,6327	2,5
7	16	118	10,14	0,8899	0,8994	0,1337	0,7651	1,6520	2,34
8	20	118	12,13	0,9099	0,8911	0,1536	0,7375	1,6474	2,07
9	24	118	8,18	0,7738	0,9021	0,1460	0,7561	1,5298	2,28
10	30	118	4,79	0,4948	1,0461	0,1281	0,9240	1,3482	0,8
11	40	118	5,32	0,4510	1,0189	0,1028	0,9159	1,3701	0,32
12	50	118	2,30	0,1565	1,4601	0,1097	1,3504	1,5069	0,07
13	25	95	8,62	0,8230	0,9528	0,0713	0,8815	1,7045	—
14	50	95	5,00	0,1543	1,5420	0,0726	1,4694	1,6228	—
15	100	95	5,85	0,1683	1,5392	0,0740	1,4652	1,6335	—

směs otupí sodou na pH 3,5, načež se přidá octan sodný. Je-li cystinu více než tyrosinu, vypadává dříve cystin.

4. Sraženina se rozpustí v roztoku uhličitaru amonného za tepla a po zchlazení se okyselí kyselinou octovou. Tento postup je nejšetrnější, s nejmenšími ztrátami. Z 10 g původní sraženiny se získá po dvojnásobné krystalisaci 2,8 g cystin

Určení síry: 1 g látky 0,264 g síry (destičky),
1 g látky \approx síry (jehličky).

Chromatograficky jsou oba preparáty čisté aminokyseliny: destičky jsou shodné s cystinem, jehličky ukazují jednoduchou skvrnu — tyrosin. Výsledky nalezené u hydrolysy určených k izolaci cystinu jsou souhrnně uvedeny v tab. 1; tamtéž je uveden takový pohyb síry.

Pro sledování množství odštěpeného cystinu a tyrosinu během hydrolysy byly provedeny tyto hydrolysy: Do skleněné baňky se vpraví 100 g keratinu a následující množství kyseliny solné a vody:

100 g keratinu s 15,11 % N odpovídá 38,74 g HCl 100 %, čili 115,2 g HCl s 34,5 % HCl představuje teoretické množství kyseliny. 138,2 g HCl potom odpovídá 20 %-nímu přebytku HCl. Pro dosažení 20 %-ní koncentrace HCl nutno přidat 100 ml vody.

Výsledky jednotlivých hydrolysy podává tab. 2.

Tabulka 2

reakční podmínky	trvání hydrolysy v hodinách	N primárních aminogrupin	v % veškerého N	obsah tyrosinu cystinu v 10 μ g N primárních aminogrupin	
95 °C, 20 % přebytek 20 % koncentrace HCl	4	1,255	41,8	4	14
	8	1,508	50,3	5	15,1
	12	1,960	65,3	6	14
	24	2,061	68,7	6	13,5
110 °C, 20 % přebytek 20 % koncentrace HCl	4	1,920	64,0	6	13
	8	2,043	68,1	6	15,5
	12	2,208	73,6	5	14
	24	2,429	80,9	4,5	13
1,8 at. tlak, 20 % přebytek 20 % koncentrace HCl	4	2,304	76,8	3	11
	8	2,145	71,5	3	10
	12	2,070	69,9	3	10
	24	2,098	69,9	3	10
110 °C, 50 % přebytek 20 % koncentrace HCl	4	1,88	62,7	4	13
	8	2,05	68,3	3	16
	12	2,25	75,0	4	14
	24	2,28	76,0	4	14
1,8 at., teoretické množství, 20 % koncentrace HCl	48	1,96	65,3	4	9
1,8 at., 100 % přebytek, 25 % koncentrace HCl	48	2,075	69,2	3	8

Souhrn

Odštěpování cystinu a tyrosinu při hydrolyse keratinu pomocí kyseliny solné bylo sledováno kvantitativně a zjištěno, že optimální zastoupení cystinu v roztoku je při kratší reakční době do 12 hodin, při 20 % koncentraci HCl a při 110 °C reakční teploty. Mírnější podmínky (nižší teplota) a prodloužená reakční doba — jak doporučuje H. Buchtala — nejsou zastoupení cystinu v hydrolyzátu příznivé. Chromatograficky je sice i za těchto podmínek obsah cystinu v reakční směsi dosti vysoký, ale vzhledem k nižšímu obsahu dusíku primárních aminoskupin a vyššímu obsahu látek rozkladných jsou takové podmínky pro izolaci cystinu nevhodné. Určitý přebytek HCl v reakční směsi je pro zastoupení cystinu výhodný. Vyšší koncentrace násadové kyseliny (25 % HCl) je nežádoucí, neboť vyloženě podporuje destrukci cystinu. Také izolované jehličky nejsou inaktivní formou cystinu, neboť neobsahují síru a chromatograficky jasně prozrazují tyrosin. V provozním měřítku se osvědčil nový způsob izolace cystinu ze společné sraženiny cystinu a tyrosinu.

ПРОЦЕСС ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ БЕЛКОВ (IV) ВОЗНИКНОВЕНИЕ И ИЗОЛЯЦИЯ ЦИСТИНА ПРИ ГИДРОЛИТИЧЕСКОМ РАСЩЕПЛЕНИИ КЕРАТИНА СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

В. МАРЕЧЕК, А. ТРУБНЫЙ

Исследовательский институт масел и жиров в Праге
Производство суповых препаратов, г. з., Бышице

Выводы

Отщепление цистина и тирозина при гидролизе кератина при помощи соляной кислоты было исследовано количественно и найдено, что оптимальное содержание цистина в растворе бывает при реакции, которая проходит во времени короче 12 часов, при 20 % концентрации соляной кислоты и при температуре реакции 110 °C. Более мирные условия (пониженная температура) и продолженное время реакции — как предлагает Г. Бухтала — не являются благоприятными в отношении содержания цистина в гидролизатах. Хроматографическое исследование показывает, что и при этих условиях содержание цистина в реакционной смеси является высоким, но принимая во внимание низшее содержание азота примарных аминогрупп и высшее содержание продуктов разложения, такие условия для изоляции цистина не являются подходящими. Определенный избыток соляной кислоты в реакционной смеси для содержания цистина является благоприятным. Высшая концентрация соляной кислоты (25 %) является нежелательной, потому что способствует деstrukцию цистина. Изолированные таким образом иголки не являются инактивной формой цистина и при помощи хроматографических исследований ясно указывают на присутствие тирозина. В заводском масштабе нашел применение новый способ изоляции цистина из общего осадка, содержащего цистин и тирозин.

Поступило в редакцию 19. III. 1955 г.

VERLAUF DER HYDROLYTISCHEN EIWEISSPALTUNG (IV) BILDUNG UND ISOLIERUNG VON CYSTIN BEI DER HYDROLY- TISCHEN SPALTUNG VON KERATIN MITTELS SALZSÄURE

V. MAREČEK, A. TRUBNYJ

Forschungsinstitut für Öle und Fette in Prag
Erzeugung von Suppenfabrikaten, Nationalunternehmen in Byšice

Zusammenfassung

Es wurde die Abspaltung von Cystin und Tyrosin bei der Hydrolyse des Keratins mittels Salzsäure quantitativ verfolgt und festgestellt, dass das optimale Auftreten von Cystin in der Lösung bei kürzerer Reaktionszeit bis zu 12 Stunden, bei 20 % HCl-Konzentration und bei einer Reaktionstemperatur von 110 °C gelegen ist. Mässigere Bedingungen (niedrigere Temperatur) und verlängerte Reaktionszeit — wie dies H. Buchtala empfiehlt — sind dem Auftreten von Cystin im Hydrolysat nicht günstig. Chromatographisch ist zwar auch unter diesen Bedingungen der Cystingehalt im Reaktionsgemisch ziemlich hoch, aber mit Rücksicht auf den niedrigeren Stickstoffgehalt der primären Aminogruppen und den höheren Gehalt an Zersetzungsstoffen sind solche Bedingungen für die Isolierung des Cystins ungeeignet. Ein bestimmter Überschuss von HCl im Reaktionsgemisch ist für das Auftreten von Cystin vorteilhaft. Eine höhere Konzentration der Ansatzsäure (25 % HCl) ist unerwünscht, denn diese unterstützt erklärlicherweise die Destruktion des Cystins. Auch isolierte Nadeln stellen nicht die inaktive Form des Cystins dar, denn sie enthalten kein Tyrosin, was auch chromatographisch erkennbar wird. Im Betriebsmasstabe bewährte sich ein neues Verfahren zur Isolierung von Cystin aus einer gemeinsamen Ausfällung von Cystin und Tyrosin.

In die Redaktion eingelangt den 19. III. 1955

LITERATURA

1. Mareček V., I. Chem. Obzor 20, 188 (1945); II. Chem. Obzor 23, 46 (1948); III. *Sborník vědeckých prací potravinářského průmyslu*, Praha 1953, 121.
2. Mörner K. A. H., Z. physiol. Chem. 34, 207 (1899); Buchtala H., Z. physiol. Chem. 91, 260 (1907); Sullivan M. X., Hess W. C., J. biol. Chem. 145, 621 (1942); 155, 441 (1945).
3. van Slyke D. D., J. biol. Chem. 9, 195 (1911) a další.
4. Keil B., Čs. fysiол. spol., Praha, 17. XII. 1953. r Mareček V., Čs. Farm. IV-7, 339 (1955).

Došlo do redakcie 19. III. 1955