

ODŠTĚPOVÁNÍ AMONIAKU PŘI ŠTĚPENÍ BÍLKOVIN POMOCÍ KYSELINY SOLNÉ A URČENÍ HLOUBKY ŠTĚPENÍ

VLADIMÍR MAREČEK

Výzkumný ústav pro oleje a tuky v Praze

Ve srovnání s určováním rychlosti přechodu dusíku primárních aminoskupin nebo přechodu veškerého dusíku do roztoku nebylo odštěpování amoniaku při hydrolytickém štěpení bílkovin věnováno mnoho pozornosti. Dnes se všeobecně má za to, že amoniak je vázán v bílkovinné molekule jako amid dikarbonových aminokyselin [1] a že po dlouhodobé hydrolyse částečně také pochází z deaminačních reakcí aminokyselin [2]. V řadě hydrolyz různých bílkovin a jejich koncentrátů bylo zjištěno, že amoniak se odštěpuje velmi rychle, a že jednotlivé bílkoviny dávají za různých reakčních podmínek téměř stejné až mírně stoupající množství amoniaku, které však u různých bílkovin je různé. Dále byl stanoven poměr amoniakového dusíku k dusíku obou dikarbonových aminokyselin a bylo shledáno, že jsou podstatné rozdíly v poměru obou hodnot u jednotlivých bílkovin. Konečně byl kriticky zhodnocen současný vzorec, určující hloubku štěpení, a navržen vzorec vhodnější.

Experimentální část

Všechny hydrolysy byly provedeny ve skleněné baňce opatřené chladičkem a zahříváné na vodní nebo olejové lázni, či bez chladiče v autoklávu. Do baňky se nejprve odvážíla kyselina solná a voda v množství, které převyšovalo teoretické (poměr 1 HCl 1 N) o 20—50 %. Jednotlivé bílkovinné koncentráty obsahují: kasein 13,65 % N, lepek 14,46 %

Tabulka 1

reakční podmínky	trvání hydrolysy v hod.	N veškerý v g	N prim. aminoskupin v g	N amoniakový v g
95 °C, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	4	4,03	1,576	0,302
	8	4,08	1,888	0,313
	12	4,1	2,712	0,33
	24	4,11	2,712	0,33
110 °C, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	4	4,17	1,974	0,417
	8	4,12	2,364	0,430
	12	4,1	2,49	0,440
	24	4,11	2,53	0,441
	36	4,3	2,23	0,470
1,8 atm, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	4	4,31	2,65	0,440
	8	4,35	2,86	0,453
	12	4,43	2,90	0,51
	24	4,47	2,67	0,53

N, sojová bílkovina 13,15 % N, sušené kvasnice 7,31 % N, keratin 15,21 % N; po uplynutí uvedené reakční doby byl hydrolyzáát zbaven filtrací huminových zbytků a vpraven do odměrné baňky na 300 ml. Jednotlivá určení byla provedena podle [3]. Nalezené hodnoty se vztahují na 100 ml hydrolyzáátu.

Amoniakový dusík tvoří 11,5 % veškerého dusíku (0,51 : 4,42). Za předpokladu 16 % N v bílkovině (= 100 %) je obsah dusíku dikarbonových aminokyselin (v 16 μg veškerého N je 24 μg kyseliny glutamové s 2,28 μg N, a 8,5 μg kyseliny asparagové

Tab. 2. Lepek

reakční podmínky	trvání hydrolysy v hod.	N veškerý v g	N prim. aminoskupin v g	N amoniakový v g
95 °C, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	4	3,78	1,104	0,86
	8	3,78	1,495	0,86
	12	3,9	1,851	0,9
	24	4,0	1,925	0,9
110 °C, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	4	4,14	1,885	0,97
	8	4,3	2,185	0,969
	12	4,37	2,513	0,985
	24	4,40	2,734	1,002
	48	4,47	2,665	1,05
1,8 atm, 50 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	4	4,56	2,77	1,03
	8	4,63	2,76	1,02
	12	4,73	2,86	1,03
	24	4,60	2,68	1,01

Tab. 3. Sušené kvasnice

reakční podmínky	trvání hydrolysy v hod.	N veškerý v g	N prim. aminoskupin v g	N amoniakový v g
95 °C, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	4	2,1	0,923	0,142
	8	2,15	1,113	0,147
	12	2,2	1,204	0,147
	24	2,22	1,224	0,158
110 °C, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	4	2,17	1,244	0,161
	8	2,20	1,274	0,183
	12	2,26	1,41	0,196
	24	2,29	1,45	0,20
1,8 atm, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	4	2,20	1,520	0,213
	8	2,23	1,520	0,234
	12	2,26	1,546	0,246
	24	2,30	1,60	0,260

s 0,89 μg N) 3,17 μg čili 19,8 % veškerého dusíku. Poměr dusíku dikarbonových aminokyselin k dusíku amoniakovému u kaseinu je jako 100 : 57.

Amoniakový dusík tvoří zde 21,8 % veškerého dusíku. Obsah kyseliny glutamové v 16 μg veškerého dusíku bílkoviny je 35 μg a kyseliny asparagové 4,5 μg . Poměr dusíku dikarbonových aminokyselin k dusíku amoniakovému je jako 100 : 91.

Tab. 4. Keratin (50 g)

reakční podmínky	trvání hydrolysy v hod.	N veškerý v g	N prim. aminoskupin v g	N amoniakový v g
95 °C, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	4	2,6	1,255	0,213
	8	2,71	1,508	0,216
	12	2,74	1,960	0,230
	24	2,99	2,061	0,249
110 °C, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	12	3,01	2,429	0,260
1,8 atm, 20 % přebytek, 20 % koncentrace HCl	12	3,02	2,50	0,275

Tab. 5. Kasein

čas v min.	N amoniakový v mg	N veškerý v mg	N prim. aminoskupin v mg
0	—	—	—
15	4,47	178,0	5,47
60	14,0	214,0	11,3
120	14,8	248,0	14,7
180	17,9	258,0	45,2
240	18,6	268,0	54,1
300	18,6	269,5	75,6
360	18,8	269,5	96,0
420	18,7	270,0	99,2
540	18,6	269,7	115,1
660	18,7	269,8	130,1
840	18,6	270,3	133,1
1440	18,7	270,4	146,8

Amoniakový dusík tvoří 11,3 % veškerého dusíku. Dusík dikarbonových aminokyselin (18 μg kyseliny glutamové a 5 μg kyseliny asparagové) tvoří 10,9 % veškerého dusíku. Poměr obou hodnot je jako 100 : 104.

Amoniakový dusík tvoří 9 % veškerého dusíku. Dusík dikarbonových aminokyselin (19 μg kyseliny glutamové a 10,5 μg kyseliny asparagové) tvoří 17,8 % veškerého dusíku. Poměr obou hodnot je jako 100 : 50,5.

Pro určení rychlosti přechodu dusíku amoniakového, dusíku veškerého a dusíku primárních aminoskupin bylo sledováno štěpení 50 g bílkoviny v 500 ml 20 % HCl při 95 °C. Odebírané vzorky v množství 20 ml byly dříve uvedeným postupem analysovány. Chromatograficky byl současně proveden důkaz o nepřítomnosti amidů dikarbonových aminokyselin po uplynutí $\frac{1}{3}$ reakční doby.

Tab. 6. Sojová bílkovina

čas v min.	N amoniakový v mg	N veškerý v mg	N prim. aminoskupin v mg
15	4,64	179,0	7,82
30	5,61	185,0	8,92
60	8,70	—	—
120	23,0	245,0	37,9
180	23,7	257,0	64,8
240	24,1	260,1	80,4
300	26,3	260,1	128,2
360	56,2	260,2	139,5
480	26,3	260,3	148,2
600	26,3	260,2	158,1
720	27,1	260,7	169,8
840	27,0	261,0	177,5

Tab. 7. Lepek

čas v min.	N amoniakový v mg	N veškerý v mg	N prim. aminoskupin v mg
15	6,7	146,1	4,55
60	33,4	221,3	11,37
120	49,6	228,1	36,4
180	50,9	232,1	63,7
240	50,8	233,6	82,1
300	50,5	234,1	100,1
360	50,4	235,0	111,1
480	50,9	235,1	124,1
600	51,0	235,4	127,5
720	51,5	236,0	138,9
840	51,4	236,1	141,1

Konečně byl kriticky zhodnocen vzorec pro určení hloubky štěpení, který ve světové literatuře se pravidelně udává:

$$\frac{N \text{ amino} \times 100}{N \text{ veškerý}}$$

Jestliže použijeme tohoto vzorce v případě úplné hydrolysy lepku a kaseinu, nalezneme tyto hodnoty: lepek má max. N amino = 76,2 % (100 — N amoniakový); kasein potom 88,5 %.

$$\frac{76,2 \times 100}{100} = 76,2! \quad \frac{88,5 \times 100}{100} = 88,5!$$

Ačkoliv obě suroviny jsou zcela odbourané, vykazují (číslicně) rozdílné hloubky štěpení. Amoniak je totiž také produktem hydrolysy, ale ve vzorci vyjádřen není. Bude proto bílkovina s větším množstvím amoniaku vykazovat vždy nižší čísla štěpení než bílkovina na amoniak chudší. Tento nedostatek lze obejít zavedením amoniakové hodnoty do vzorce. Správný vzorec zní:

$$\frac{(N \text{ amino} + N \text{ amoniakový}) \times 100}{N \text{ veškerý}}, \quad \text{nebo} \quad \frac{N \text{ amino} \times 100}{N \text{ veškerý} - N \text{ amoniakový}}.$$

Podle tohoto vzorce oba uvedené případy poskytnou hodnoty shodné, t. j. 100.

Souhrn

Z výsledků je patrné, že neexistuje přímý vztah mezi množstvím dikarbo-
nových aminokyselin a množstvím amoniaku, a že tedy předpoklad Osbornův a spolupracovníků není správný. Poměr obou hodnot je jiný u živočiš-
ných (přibližně 100 : 50) a jiný u rostlinných bílkovin (přibližně 100 : 100).
Zjev vyloženě souvisí s jinou stavbou bílkovinné molekuly obou druhů bíl-
kovin. V rostlinných bílkovinách je každá volná (nevázaná peptidicky) kar-
boxylová skupina dikarbonových aminokyselin ve formě amidu, v živočiš-
ných bílkovinách jen polovina těchto skupin. Není vyloučeno, že poměr ve
skutečnosti je nepatrně odlišný, ježto není úplné záruky, že zvolené hodnoty
dusíku amoniakového (maximální) náležejí *jen* dusíku amoniakovému (a ni-
koliv i z deaminačních reakcí). Při odbourání bílkovin pomocí HCl je nej-
rychlejší reakcí přechod veškerého dusíku do roztoku, těsně následován pře-
chodem dusíku amoniakového, a nejpomalejší reakcí je přechod dusíku pri-
márních aminoskupin. Po dosažení maximální hodnoty dusíku amoniakového
v roztoku stoupají ještě 3—4 krát hodnoty dusíku primárních aminoskupin.
Vzhledem k tomu, že mezi prvními aminokyselinami převládá ze 40—80 %
kyselina glutamová a kyselina asparagová. [4], nelze zatím rozhodnout, zda
uvolněný amoniak pochází z větších štěpných celků, či *jen* z uvolněné kyseliny
glutamové a asparagové. Pro správné určení hloubky štěpení byl na základě
získaných výsledků navržen nový vzorec, který dává porovnatelné výsledky
u různých bílkovin.

ОТЩЕПЛЕНИЕ АММИАКА ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ ДЕЙСТВИЕМ СОЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ РАЗЛОЖЕНИЯ

ВЛАДИМИР МАРЕЧЕК

Исследовательский институт масел и жиров в Праге

Выводы

Результаты показывают, что не существует прямой зависимости между количеством дикарбоновых аминокислот и количеством аммиака а поэтому предположение Осборна и сотрудников не является обоснованным. Отношение обоих значений является различным и белковых веществ животного происхождения (приблизительно 100 : 50) и у белковых веществ происхождения растительного (приблизительно 100 : 100). Описанное явление находится в зависимости от строения молекул у обоих видов белковых веществ. В растительных белковых веществах каждая свободная (не связанная пептидической формой) карбоксильная группа дикарбоновых аминокислот находится в форме амида, в белковых веществах животного происхождения только половина этих групп. Не исключена возможность, что отношение в действительности отличается незначительно, потому что нельзя вполне гарантировать то, что избранная форма аммиачного азота (максимальная) соответствует только аммиачному азоту (и ни в коем случае и из дзаммиачных реакций). При отщеплении белковых веществ при помощи HCl наиболее быстрой реакцией является реакция перехода всего азота в раствор, за ней следует переход аммиачного азота и самой медленной реакцией является переход азота примарных аминогрупп. По достижении максимальных значений аммиачного азота в растворе, увеличивается еще в 3—4 раза значение примарных аминогрупп. Несмотря на то, что между первыми аминокислотами преобладает в количестве 40—80 % глутаминовая кислота и кислота аспарагиновая [4] нельзя пока что решить, что освобожденный аммиак походит с больших расщепленных целых единиц, или же только из освобожденных аспарагиновой и глутаминовой кислот. Для правильного определения степени расщепления, на основании полученных результатов, было предложено новое уравнение, которое дает сравнительные результаты у различных белковых веществ.

Поступило в редакцию 9. IV. 1955

ABSPALTUNG VON AMMONIAK BEI DER EIWEISSPALTUNG MITTELS SALZSÄURE UND BESTIMMUNG DER INTENSITÄT DER SPALTUNG

VLADIMÍR MAREČEK

Forschungsinstitut für Öle und Fette in Prag

Zusammenfassung

Aus den erzielten Ergebnissen geht hervor, dass zwischen der Menge der Monoaminocarbonsäuren und der Ammoniakmenge keine direkte Beziehung besteht und dass demnach die von Osborn u. Mitarb. ausgesprochene Voraussetzung nicht richtig ist.

Das Verhältnis beider Werte ist ein anderes bei tierischen (annähernd 100 : 50) und ein anderes bei pflanzlichen Eiweissarten (annähernd 100 : 100). Diese Erscheinung hängt offenbar mit dem anderen Aufbau des Eiweissmoleküls beider Eiweissarten zusammen. In pflanzlichen Eiweissarten tritt jede freie (ungebundene peptidische) Carboxylgruppe der Monoamino-dicarbonsäuren in der Form des Amids auf, dagegen in den tierischen Eiweissarten nur die Hälfte dieser Gruppen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass dieses Verhältnis in Wirklichkeit ein nur unbedeutend abweichendes ist, es besteht jedoch keine völlige Gewähr dafür, dass die gewählten Werte des Ammoniakstickstoffs (maximal) nur dem Ammoniakstickstoff zugehörig sind (und auf keinen Fall auch aus den Desaminierungsreaktionen entstammen). Beim Abbau des Eiweiss mittels HCl ist die rascheste Reaktion der Übergang des Gesamtstickstoffs in Lösung und dieser Reaktion folgt knapp darnach der Übergang des Ammoniakstickstoffs, wogegen die langsamste Reaktion der Übergang des Stickstoffs der primären Aminogruppen ist. Nach Erreichung des Maximalwertes des Ammoniakstickstoffs in der Lösung steigen noch 3—4 mal die Werte des Stickstoffs der primären Aminogruppen an. Mit Rücksicht darauf, dass unter den ersten Aminosäuren zu 40—80 % Glutamin- und Asparaginsäure vorherrschen [4], bleibt es bisher noch unentschieden, ob das freigewordene Ammoniak aus den grösseren Spaltstücken oder nur aus der freigewordenen Glutamin- und Asparaginsäure entstammt. Für eine richtige Bestimmung der Intensität der Spaltung wurde auf der Grundlage der erzielten Ergebnisse eine neue Formel vorgeschlagen, welche bei verschiedenen Eiweissarten vergleichbare Ergebnisse bietet.

In die Redaktion eingelangt den 9. IV. 1955

LITERATURA

1. Osborne T. B., Harris J. E., *J. am. chem. Soc.* 25, 323 (1903); Osborne T. B., Leavenworth C. S., Brautlecht C. A., *Am. J. Physiol.* 23, 180 (1908).
2. Gortner R. A., Holm G. E., *J. am. chem. Soc.* 39, 2736 (1917).
3. Jednotné analytické metody MPP, č. 6, 15 (1954).
4. Mareček V., Kožich K., *Chem. listy* (v tisku).

Došlo do redakcie 9. IV. 1955