

WPLYW KATIONÓW NA PRZEBIEG HYDROLIZY BIAŁKA  
ROZCIĘNCZONYM KWASEM SOLNYM

Jan Kryściak, Anna Solecka

Wydział Farmaceutyczny  
Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

Wydzielenie aminokwasu z surowca naturalnego składa się z dwóch głównych etapów: hydrolizy i oddzielenia od balastu obecnych w hydrolizacie związków. Do celów analitycznych bądź preparatywnych zwykle hydrolizę przeprowadza się gotując białko przez 24 godziny w 6 N HCl. Tak prowadzony proces hydrolizy jest dość kosztowny z uwagi na zużycie kwasu, jak i z powodu dużej energochłonności. Z tego względu głównie etap hydrolizy powoduje, że tylko pewne aminokwasy i tylko w stosunkowo niewielkich ilościach otrzymuje się przez wydzielenie z surowców naturalnych.

Z drugiej strony, rozmaite odpady białkowe można by wykorzystać dla produkcji cennych z żywieniowego punktu widzenia aminokwasów, gdyby istniała dostatecznie efektywna i tania metody hydrolizy białka do aminokwasów. Próbowano znaleźć taką metodę stosując różne czynniki hydrolizujące i różne warunki prowadzenia reakcji, ale stosunkowo mało badano wpływ kationów na reakcję hydrolizy. Bamann i wsp. [1, 2] stwierdzili, że w pewnych warunkach przyspieszają hydrolizę jony  $Ce^{4+}$  i  $Ce^{3+}$  oraz jony  $La^{3+}$ . W badaniach Lieben [4] hydroliza białka przebiegała szybciej w obecności  $TiCl_3$ ,  $SnCl_2$  i  $SnCl_4$ . W niniejszej pracy badano wpływ obecności różnych kationów jedno-, dwu- i trójwartościowych na szybkość hydrolizy białka rozcieńczonym kwasem solnym pod kątem ewentualnego wyłonienia kationów przyspieszających reakcję.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

## Chemikalia

Bufor octanowy 4 M o pH 5,5 - Mikrotechna NP, Praha.

Chlorek cynawy  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  cz.d.a. - POCh, Gliwice.

Chlorki metali:  $\text{KCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  
 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  
 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3$  bezw. - wszystkie cz.d.a. POCh, Gliwice;  
 $\text{LiCl}$  bezw. cz.d.a. - Lachema, CSRS.

$\text{TiCl}_3$  cz. - używano 25% roztwór wodny, Koch-Light Laboratories Ltd, Colnbrook, Bucks, Anglia.

Izopropanol cz.d.a. - POCh, Gliwice. Dla przygotowania mieszaniny rozcieńczającej mieszano z wodą w stosunku 1:1.

Kazeina - Light Soluble Casein, British Drug Houses, Anglia.

Do badania przebiegu hydrolizy odważano po 250 mg kazeiny i rozpuszczano w 500 ml odpowiedniego roztworu hydrolizującego.

2-Metoksyetanol do analizatora aminokwasów - Mikrotechna NP, Praha.

Ninhydryna cz.d.a. - POCh, Gliwice.

Roztwory hydrolizujące były to: 0,1 N roztwór  $\text{HCl}$  oraz 0,1 M roztwory wyszczególnionych powyżej chlorków w 0,1 N  $\text{HCl}$ . Przygotowano je rozpuszczając odpowiednią naważkę soli w 0,1 N  $\text{HCl}$ . Tylko w przypadku  $\text{FeCl}_3$  i  $\text{TiCl}_3$  postępowano inaczej. Najpierw przygotowano około 10% wodne roztwory tych soli w wodzie. Przez oznaczenie chlorków metodą Volharda [5] ustalono stężenie odpowiedniego kationu w przygotowanych roztworach. Następnie obliczoną odpowiednią objętość roztworu stężonego umieszczano w kolbie miarowej, dodawano równą objętość 0,2 N  $\text{HCl}$  i uzupełniano do wymaganej objętości dodatkiem 0,1 N  $\text{HCl}$ . W ten sposób wszystkie roztwory hydrolizujące, zawierające kation były 0,1 M względem testowanego kationu i 0,1 N względem  $\text{HCl}$ . Roztwory  $\text{HCl}$  0,1 lub 0,2 N przygotowano z odważek analitycznych, POCh, Gliwice.

## METODY

Hydrolizę prowadzono w dwuszyjnych kolbach okrągłodennych gotując pod chłodnicą zwrotną przez 10 godzin roztwór 125 mg kazeiny w 250 ml odpowiedniego roztworu hydrolizującego. Szybkość przebiegu reakcji w danym roztworze hydrolizującym śledzono obserwu-

jąc narastanie wartości absorbancji wybarwionych z ninhydriną próbek mieszaniny reagującej. Próbki pobierano w momencie zawrzenia, a następnie co godzinę. Ostatnią próbkę pobierano po 10 godzinach hydrolizy. Przy hydrolizie samym 0,1 N roztworem HCl z pobranych próbek odpipetowywano do probówek po 0,5 ml, dodawano po 1,5 ml 0,1 N HCl, a następnie dodano po 1 ml odczynnika ninhydrynowego i wybarwiono. Tak samo postępowano przy hydrolizie kazeiny w 0,1 M roztworach KCl, LiCl, NaCl i  $MnCl_2$  w 0,1 N HCl. Pozostałe kationy, których wpływ badano, przeszkadzały [3] w reakcji wybarwiania z ninhydriną i należało je przed wybarwieniem usunąć z próbek hydrolizatu. W tym celu odpowiednią objętość próbki hydrolizatu z dawano roztworem NaOH o znanym stężeniu, mieszano i sączono. Wolny od kationu przesącz poddawano wybarwieniu z ninhydriną. Stężenie roztworu NaOH i jego objętość, jak również objętość alkalizowanej próbki były tak dobrane, aby nie przekraczając objętości 2 ml brać do wybarwienia ilość wolnego od kationu przesączu odpowiadającą 0,5 ml próbki hydrolizatu. Przykładowo: przy badaniu przebiegu hydrolizy w roztworze zawierającym kadm ( $0,1 M CdCl_2$  w 0,1 N HCl) do 3 ml próbki hydrolizatu dodano 3 ml 0,3 N NaOH, a do wybarwiania brano 1 ml przesączu. Do 2 ml uzupełniano dodatkem wody (1 ml) i wybarwiano jak poprzednio. W ten sposób wybarwiano zawsze ilość odpowiadającą 0,5 ml roztworu hydrolizowanego, zawierającego 0,5 mg kazeiny w 1 ml. W miarę postępu reakcji hydrolizy zwiększa się zawartość zdolnych do reagowania z ninhydriną wolnych grup aminowych w mieszaninie reakcyjnej. Większym zawartościom wolnych grup aminowych odpowiadają wyższe wartości absorbancji i w ten sposób szybkość narastania wartości absorbancji może służyć jako wskaźnik szybkości reakcji.

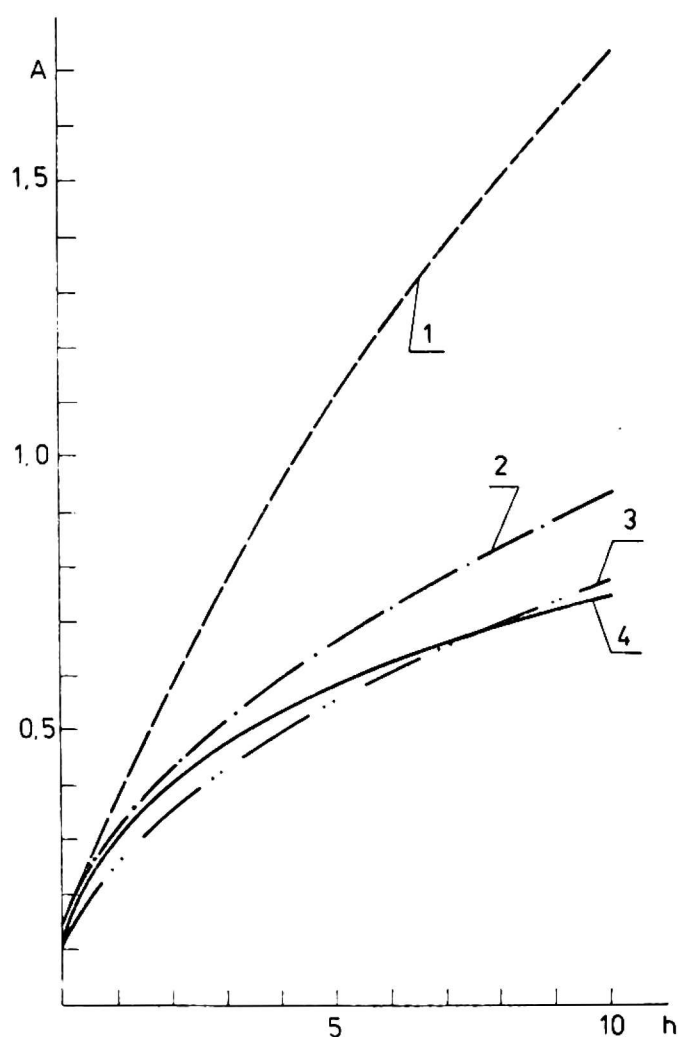
Każdy roztwór hydrolizujący wypróbowano gotując równolegle dwie identyczne mieszaniny reagujące. Z każdej pobranej próbki hydrolizatu przygotowywano po trzy równoległe wybarwienia. Przy wyciąganiu średniej odrzucano wartości mocno odbiegające od pozostałych.

Wybarwianie prowadzono według Spackmana, Steina i Moore'a z odczynnikiem ninhydrynowym zalecanym do stosowania w automatycznych analizatorach aminokwasów [7] o następującym składzie: ninhydryny - 20 g,  $SnCl_2 \cdot 2H_2O$  - 400 mg, 2-metoksyetanolu - 750 ml, buforu octanowego 4 M o pH 5,5 - 250 ml. Używano zawsze świeżo przygotowanego odczynnika. Do 2 ml wybarwianych roztworów w pro-

bówkach dodawano 1 ml odczynnika i po łagodnym wymieszaniu próbki nakrywano kapturkami z folii aluminiowej i wstawiano do wrzącej łaźni wodnej na 20 minut. Po zakończonej reakcji próbki studzono i dodawano po 5, 10 lub 15 ml mieszaniny rozcieńczającej. Zawartość próbek intensywnie mieszano i mierzono wartości absorbancji przy 570 nm wobec analogicznie wybarwionej i rozcieńczonej ślepej próby (2 ml 0,1 N HCl zamiast próbki hydrolizatu).

### WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

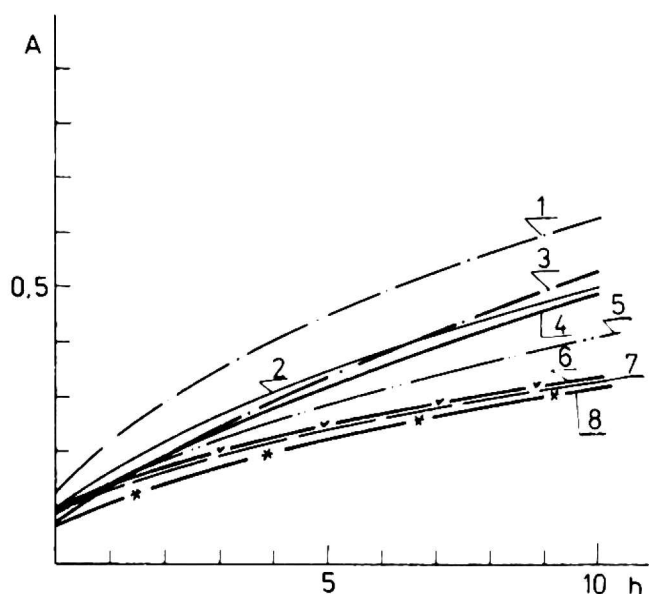
Wartości absorbancji uzyskane dla tej samej próbki hydrolizatu w niektórych przypadkach wykazywały spory rozrzut. Z tego



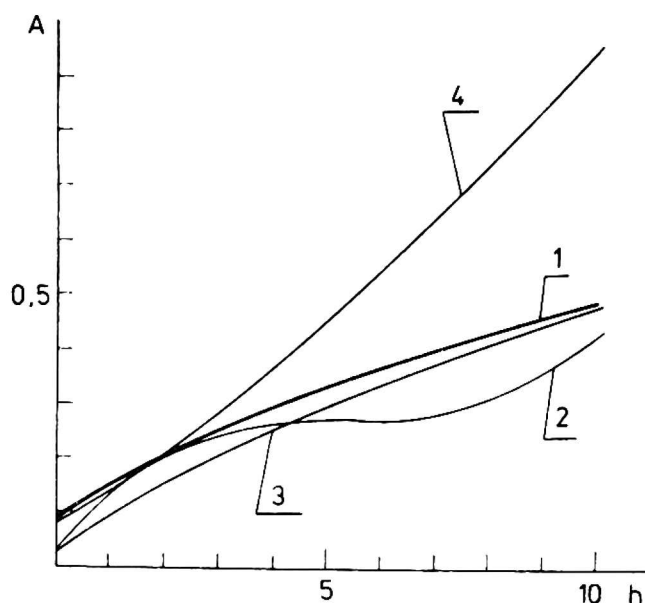
Rys. 1. Przebieg hydrolizy kazeiny 0,1 N roztworem HCl w obecności: 1 - 0,1 M KCl, 2 - 0,1 M NaCl, 3 - bez kationów metali, 4 - 0,1 M LiCl; na osi rzędnych absorbancja (A). Po wybarwieniu rozcieńczano dodatkem 10 ml mieszaniny rozcieńczającej

względu szybkość hydrolizy oceniano przez graficzne przedstawienie przebiegu narastania wartości absorbancji w zależności od czasu trwania reakcji. Pozwalało to na wyeliminowanie przypadkowych wartości absorbancji, odbiegających od przebiegu zależności. Narastanie wartości absorbancji wybarwianej z ninhydriną mieszaniny reakcyjnej w zależności od czasu gotowania kazeiny w obecności chlorków jednowartościowych metali przedstawiono na rysunku 1. Narastanie wartości absorbancji przy hydrolizie w obecności chlorków metali dwuwartościowych przedstawiono na rysunku 2, a na rysunku 3 w obecności chlorków metali trójwartościowych.

Porównanie przebiegu narastania wartości absorbancji przy hydrolizie samym 0,1 N HCl i przy hydrolizie 0,1 N



Rys. 2. Przebieg hydrolizy kazeiny 0,1 N roztworem HCl w obecności 1 - 0,1 M  $MnCl_2$ , 2 - bez kationów metali, 3 - 0,1 M  $CuCl_2$ , 4 - 0,1 M  $FeCl_2$ , 5 - 0,1 M  $CdCl_2$ , 6 - 0,1 M  $ZnCl_2$ , 7 - 0,1 M  $NiCl_2$ , 8 - 0,1 M  $CoCl_2$ ; na osi rzędnych absorbancja (A); z wyjątkiem roztworu hydrolizującego, zawierającego miedź, po wybarwieniu rozcieńczano dodatkami 15 ml mieszaniny rozcieńczającej. W przypadku miedzi rozcieńczano dodatkami 5 ml



Rys. 3. Przebieg hydrolizy kazeiny 0,1 N roztworem HCl 1 - bez kationów metali, w obecności: 2 - 0,1 M  $CrCl_3$ , 3 - 0,1 M  $FeCl_3$ , 4 - 0,1 M  $TiCl_3$  na osi rzędnych absorbancja (A). Po wybarwieniu rozcieńczano dodatkami 15 ml mieszaniny rozcieńczającej

HCl w obecności  $Li^+$ ,  $Na^+$  i  $K^+$  (rys. 1) wskazuje, że jony  $Li^+$  obecne w mieszaninie reakcyjnej w stosowanych warunkach są wobec hydrolizy obojętne. Jony  $Na^+$  nieznacznie przyspieszają przyrost wartości absorbancji w miarę trwania reakcji, co może świadczyć o niewielkim przyspieszeniu hydrolizy w obecności  $Na^+$ . Natomiast w obecności jonów  $K^+$  wartości absorbancji narastają znacznie szybciej. Po 10 godzinach hydrolizy wartość absorbancji w obecności jonów  $K^+$  jest ponad dwukrotnie wyższa w porównaniu z analogiczną wartością w przypadku hydrolizy samym 0,1 N HCl.

Spośród przebadanych dwuwartościowych jonów metali (rys. 2) niewielkie przyspieszenie narastania wartości absorbancji występuje w obecności jonów  $Mn^{2+}$ . Obecność kationów  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  powoduje zahamowanie tempa narastania tych wartości.

Najsilniejsze zahamowanie występuje w obecności jonów  $\text{Cu}^{2+}$ . Obecność jonów  $\text{Fe}^{2+}$  pozostaje praktycznie bez wpływu.

Trójwartościowe kationy:  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Ti}^{3+}$  (rys. 3) wpływają na przebieg narastania wartości absorbancji także w zróżnicowany sposób. Jony  $\text{Fe}^{3+}$  praktycznie są bez wpływu. Jony  $\text{Cr}^{3+}$  w początkowym okresie pozostają bez wpływu, a począwszy od 5 godziny zmniejszają tempo narastania wartości absorbancji. Znacznie szybsze narastanie obserwuje się natomiast w obecności jonów  $\text{Ti}^{3+}$ . Po 10 godzinach gotowania wartość absorbancji po wybarwieniu z ninhydryną jest około dwukrotnie wyższa dla roztworu 0,1 M  $\text{TiCl}_3$  w 0,1 N HCl niż dla roztworu samego 0,1 N HCl.

### DYSKUSJA

Biorąc za odniesienie przebieg narastania wartości absorbancji przy gotowaniu kazeiny z 0,1 N HCl można stwierdzić, że KCl, NaCl,  $\text{MnCl}_2$  i  $\text{TiCl}_3$  przyspieszają reakcję hydrolizy. Przy czym, w roztworach zawierających NaCl i  $\text{MnCl}_2$  to przyspieszenie reakcji jest nieznaczne. Natomiast w roztworach zawierających KCl i  $\text{TiCl}_3$  można przyjąć, że reakcja przebiega około dwukrotnie szybciej niż w roztworze 0,1 N HCl. W przypadkach pozostałych przebadanych kationów przebiegi narastania wartości absorbancji układają się bądź to w pobliżu przebiegu dla 0,1 N HCl i można wnioskować, że w tych przypadkach obecne w roztworze sole są wobec hydrolizy obojętne, bądź też przebiegają poniżej krzywej przebiegu dla 0,1 N HCl. Ten ostatni fakt można interpretować dwojako. Może to być wynikiem hamowania reakcji hydrolizy, ale może także być wynikiem destrukcji uwalnianych aminokwasów. Jeśli w trakcie destrukcji zachodzą procesy dezaminacji bądź dekarboksylacji aminokwasów wtedy uwolniony amoniak jak i powstałe aminy reagują z ninhydryną z wytworzeniem mniejszych ilości barwnych produktów [6, 8].

Z punktu widzenia celu pracy istotny jest fakt szybszego przebiegu hydrolizy w obecności KCl, NaCl,  $\text{MnCl}_2$  i  $\text{TiCl}_3$ , a szczególnie w obecności KCl i  $\text{TiCl}_3$ . Przyspieszenie reakcji spowodowane jest zapewne obecnością kationu. Jony chlorkowe są wobec hydrolizy obojętne - co wynika z faktu, że tylko niektóre chlorki metali reakcję tę przyspieszają. Gdyby bowiem reakcję przyspieszały jony chlorkowe - wtedy we wszystkich przebadanych roztworach hydrolizujących, zawierających chlorki metali, reakcja biegłaby szybciej niż w 0,1 N HCl.

Większą szybkość hydrolizy wiązań peptydowych w obecności niektórych kationów obserwowano już wcześniej. Bamann, Rother i Trapmann [1, 2] stwierdzili, że jony  $Ce^{4+}$  i  $Ce^{3+}$  katalizują rozbijanie wiązań peptydowych w temperaturze  $37^{\circ}C$  w buforze  $NH_4OH-NH_4Cl$ . W tym samym środowisku aktywność katalityczną wykazują jony  $La^{3+}$  w temperaturze  $70^{\circ}C$ . Według Lieben [4] hydroliza zachodzi szybciej w obecności  $TiCl_3$ ,  $SnCl_2$  i  $SnCl_4$ . Tak więc katalityczny wpływ jonów  $Ti^{3+}$  został w niniejszej pracy potwierdzony. Wpływu  $Sn^{2+}$  w niniejszej pracy nie badano z uwagi na fakt, że w trakcie gotowania w  $0,1 N HCl$  cyna wytrąca się z roztworu - tym samym ewentualny wpływ na szybkość hydrolizy byłby spowodowany nie jodem  $Sn^{2+}$ .

Przebadano w niniejszej pracy w sumie 13 kationów. Spośród nich dwa ( $K^+$  i  $Ti^{3+}$  w stężeniu równym  $0,1 M$ ) znacznie przyspieszają reakcję hydrolizy kazeiny w  $0,1 N$  roztworze  $HCl$ . Przyspieszenie jest na tyle duże, że przyspieszający wpływ tych kationów warto poddać dalszym badaniom pod kątem ewentualnego praktycznego wykorzystania tego efektu.

#### LITERATURA

1. Bamann E., Rother A., Trapmann H., Chem. Ber., 91, 1744, 1958.
2. Bamann E., Rother A., Trapmann H., Naturwissenschaften, 43, 326, 1956.
3. Kryściak J., Chem. Anal., 25, 883, 1980.
4. Lieben F., J. Biol. Chem., 151, 117, 1943.
5. Lipiec T., Szmaj S., Chemia analityczna z uwzględnieniem półmikroanalizy jakościowej, PZWL, 393, Warszawa 1968.
6. Moore S., Stein W. H., J. Biol. Chem., 211, 907, 1954.
7. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S., Anal. Chem., 30, 1190, 1958.
8. Yemm E. W., Cocking E. C., Analyst, 80, 209, 1955.

Я. Крысник, А. Солецка

#### ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ НА ГИДРОЛИЗ БЕЛКА В РАЗБАВЛЕННОЙ СОЛЯНОЙ КИСЛОТЕ

#### Р е з ю м е

Исследовали влияние моно-, би- и тривалентных катионов на скорость гидролиза казеина в растворе  $0,1 n$  соляной кислоты. Для исследования раствор  $0,1 n$  хлорида данного катиона обрабатывали

раствором 0,1 n соляной кислоты. Таким образом были получены растворы хлоридов кадмия, хрома (III), кобальта, меди, железа (II), железа (III), магния, марганца, натрия, никеля, калия, титана (III) и цинка. Казеин подвергали варке в этих растворах и в 0,1 n, при их постоянном притоке. В начале варки, а затем через каждые 60 минут отбирали образцы кипящих смесей. Последний образец был отобран через 10 часов. В случае необходимости катионы удаляли из образцов гидролизата, а полученные растворы окрашивали нингидрином. В каждом случае объем окрашенного раствора отвечал 0,5 мл гидролизата. После разбавления измеряли величины поглотительной способности и представляли их на чертеже по отношению к времени варки. В сравнении со скоростью гидролиза в растворе 0,1 n соляной кислоты эта реакция ускорялась только при наличии ионов марганца, натрия, калия и титана (III). В случае ионов марганца и натрия это ускорение было незначительным, тогда как при наличии ионов калия и титана (III) скорость гидролиза удвоилась.

J. Kryściak, A. Solecka

#### EFFECT OF CATIONS ON THE PROTEIN HYDROLYSIS IN DILUTED HYDROCHLORIC ACID

##### S u m m a r y

The effect of mono-, di- and trivalent cations on the rate of casein hydrolysis on 0.1 N solution of hydrochloric acid was investigated. For investigations 0.1 N solution of chloride of the given cation was prepared in 0.1 N solution of hydrochloric acid. In such a way solutions of cadmium, chromic (III), cobaltous, cupric, ferric, ferrous, lithium, manganous, sodium, nickelous, potassium, titanium (III) and zinc chloride were obtained. In these solutions and in 0.1 N HCl casein (0.5 mg/ml) was boiled under reflux. Samples of the boiling mixtures were taken at the beginning and after every 60 minutes of boiling. The last sample was taken after ten hours. In case of need the cations were removed from samples of hydrolysate and the solutions obtained were coloured with ninhydrin. In each case, the volume of solution corresponding with 0.5 ml of the hydrolysate was coloured. After dilution absorbancy values were measured and plotted against the boiling time. In comparison with the rate of hydrolysis in 0.1 N



solution of hydrochloric acid this reaction was accelerated only in presence of manganous, sodium, potassium and titanium (III) ions. In case of manganous and sodium ions this acceleration was negligible, whereas in presence of potassium and titanium (III) ions the rate of hydrolysis was doubled.