

# Technika dělení sladových bílkovin diskovou elektroforézou

663.439  
547.96 : 543.546

Ing. M. NENTWICHOVÁ, prom. biol. M. KOTASOVÁ — Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Brno a Dr. Z. PECHAN, CSc. — katedra biochemie UJEP Brno

Do redakce došlo 2. 12. 1970

Ve snaze po hlubším poznání struktury sladového zrna a jejích změn v průběhu technologického procesu se stále vyhledávají metody, jimiž by byly zachyceny tyto změny v zrně pokud možno citlivě a přesně. Ve sladařské i pivovarské analytice se v posledních letech ve světovém měřítku začaly uplatňovat moderní biochemické metody, především při studiu bílkovin s vysokou molekulární hmotou. V zahraničních literárních pramenech nyní často nacházíme zprávy o dělení bílkovin v pivovarských roztocích chromatografií na sloupcích dextranových gelů (Sephadexů), nebo jiných nosičích například polyakrylamidu (Bio-gelu), kde se bílkoviny dělí podle svých molekulových hmot. Toto dělení je ve složitých směsích jen skupinové, proto se pro identifikaci látek o určité molekulové hmotě kombinuje s jinými metodami, např. s elektroforetickým dělením, popřípadě s imunologickými metodami. Pro dělení bílkovin živočišného původu (např. v lékařství) se velmi osvědčila metoda tzv. diskové elektroforézy s použitím akrylamidových polymerů jako molekulových sít. Princip dělení uvádíme dále.

Původní práce o diskové elektroforéze publikovali *Ornstein* [6, 7] a *Davis* [8]. Tato metodika je již aplikována v pivovarství. *Szilvinyi* [1] při svých pokusech s ozařováním ječmenů ionizačním zářením hodnotil změny v rozdělení výluhů sloupcovou chromatografií na Sephadexech a diskovou elektroforézou v polyakrylamidovém gelu podle *Clarkeho* [2]. *Woof* a *Pierce* [3] studovali diskovou elektroforézou podle *Ornsteina* a *Davise* mechanismus tvorby zákalů. *Mikola* [4] kombinoval diskovou elektroforézu se sloupcovou chromatografií na Sephadexech při frakcionaci ječných albuminů a globulinů.

V naší práci jsme aplikovali metodiku popsanou *Cebecauerem* [5] na sladinu s poměrně dobrými výsledky.

Technika diskové elektroforézy byla umožněna zavedením vhodného syntetického gelu. Je to v podstatě polyakrylamid, trojrozměrný hydrofilní polymer, v němž lineární řetězce zpolymerovaného akrylamidu jsou pospojovány prostřednictvím síťovadla (N,N'-metyl-bis-akrylamid). Poréznost gelu lze regulovat volbou koncentrace monomerního akrylamidu a síťovadla.

Osvědčené koncentrace jsou: 2,5 % akrylamidu a 0,62 % síťovadla pro řídký gel, 7 % akrylamidu a 0,17 % síťovadla pro hustý dělicí gel. Gelové vrstvy se vytvoří v trubičce ze zásobních roztoků. V řídkém gelu se bílkoviny pohybují na základě elektroforetické mobility. Po zapojení proudu se molekuly nahromadí v mezivrstvě řídkého a hustého gelu do úzké zóny. V dělicím gelu se bílkoviny rozdělí podle elektroforetické mobility, dané jejich efektivním nábojem — dělení bílkovin probíhá při pH vyšším, než je jejich izoelektrický bod — a podle velikosti molekul.

Diskontinuita pH na rozhraní mezi řídkým a hustým gelem zaručuje velkou dělicí schopnost. (Hustý gel má o dvě jednotky vyšší pH). Do trubiček se bílkoviny zpravidla nanášejí zapolymerované v další vrstvičce řídkého gelu, pro naše vzorky jsme však museli volit poněkud jiný postup.

## Experimentální část

### a) Chemikálie

Potřebné chemikálie jsme získali z n. p. Labora Brno. Jsou to chemikálie z dovozu:

akrylamid,

N, N' — metylen-bis-akrylamid (BIS) — síťovadlo,  
N, N, N' N' — tetrametyletylendiamin (TEMED) —  
urychlovač polymerace,

tris (hydroxymetyl) aminometan (TRIS) — kation  
pufru.

Zásobní roztoky:

a	b
48,0 ml N HCl	48,0 ml N HCl
36,0 g TRIS	6,0 g TRIS
0,2 ml TEMED	0,5 ml TEMED
do 100 ml H <sub>2</sub> O	do 100 ml H <sub>2</sub> O
pH 8,9	pH 6,7
c	d
28,0 g akrylamid	10,0 g akrylamid
0,7 g BIS	2,5 g BIS
do 100 ml H <sub>2</sub> O	do 100 ml H <sub>2</sub> O
uchovávat v chladnu	uchovávat v chladnu
e	f
0,004 % riboflavin	40 % sacharóza

Elektrolyt pro plnění aparatury: TRIS — glycin  
pH 8,3.

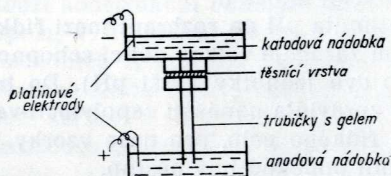
Složení elektrolytu: 6,0 g TRIS + 28,8 g glycin, doplnit do 1 litru destilovanou vodou. Používá se zředěný 1 : 10.

Všechny roztoky jsme uchovávali v chladničce po několik týdnů, pouze roztok katalyzátoru (0,14 až 0,20% persíran amonný) je nutno připravit ke každému pokusu čerstvý. (Pozn.: persíran amonný musí být zvlášť čistý — při rozpouštění praská — jinak nekatalyzuje polymerační reakci.)

Barvicí směs: 0,5 g amidočerni, 5,0 g HgCl<sub>2</sub>, 5 ml ledové kyseliny octové, doplnit do 100 ml destilovanou vodou. Odbarvení 7% kyselinou octovou.

#### b) Popis aparatury

Aparaturu pro diskovou elektroforézu nám zhotovili na katedře lékařské fyziky UJEP v Brně podle A. Āujíka. Je to velmi jednoduché zařízení z nádobek z plexiskla (obr. 1). Horní elektrodová nádobka má 10 otvorů průměru 9 mm, do nichž jsou zasunuty skleněné trubičky, dlouhé 70 mm, jejichž průměr je 5 mm. Elektrody jsou platinové. Při polymeraci a nanášení vzorků jsou trubičky upevněny vertikálně ve stojánku rovněž z plexiskla, tak, aby jejich spodní část byla zasunuta ve vhodné těsnící hmotě (pěnová guma, plastelína apod.). Aparaturu připojujeme ke stabilizovanému zdroji stejnosměrného proudu Tesla BS 275.



Obr. 1. Schéma aparatury na diskovou elektroforézu

Fixování a odbarvování provádíme v lázni členěné na 10 částí pro každý sloupeček zvlášť. Hotové diskové elektroforeogramy uchováváme v 7% kyselině octové v malých zkumavkách.

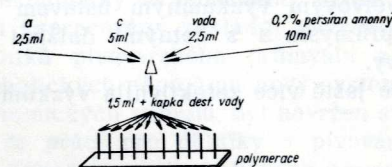
#### c) Příprava vzorku

Vzorky sladiny i piva, použité k dělení, jsme koncentrovali lyofilizací.

#### d) Pracovní postup

Používané sklo jsme vymývali kyselinou chromsírovou a oplachovali destilovanou vodou. Zvláště vnitřní stěna skleněných trubiček musí být čistá a hladká. Roztoky a vzorek jsme do trubiček nanášeli injekční stříkačkou.

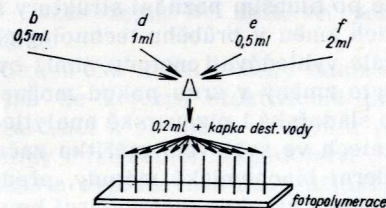
Příprava hustého gelu (obr. 2):



Obr. 2

Roztoky v trubičkách pro hustý i řídký gel pře-  
vrstvíme kapkou destilované vody, která má zabránit inhibici polymerace vzduchem. Před nanášením každé další vrstvy odstraníme kapalnou část injekční stříkačkou a vysušíme vnitřní stěnu trubičky proužkem filtračního papíru.

Příprava řídkého gelu (obr. 3):



Obr. 3

Hustý gel zpolymeruje na slunci asi za 45 až 60 min. Je možno použít také silné žárovky. Konec polymerace se projeví vytvořením viditelného rozhraní mezi gelem a vodou. Polymerace řídkého gelu proběhne asi za 15 min a projeví se opalescencí vrstvy.

Poněvadž lyofilizovaná sladina nebyla nijak upravována a obsahovala značné množství cukrů a jiných nízkomolekulárních látek, vznikaly při polymeraci druhé vrstvy řídkého gelu potíže. Proto byl vzorek aplikován v suspenzi se Sephadexem. Přímou na první vrstvu řídkého gelu bylo nanášení 0,1 ml vzorku, jehož koncentrace byla volena tak, aby na jeden sloupeček připadalo cca 200–300 µg bílkovin. Vzorek převrstvíme Sephadexem (G 200 nebo G 100), který jsme předem nechali bobtnat v destilované vodě 24 h.

Takto připravené trubičky upevníme do aparatury tak, aby horní i dolní konec byly ve styku s elektrolytem. Elektrolyt ředíme 1 : 10 pro každý pokus čerstvý a v horní nádobce ho obarvíme 0,01% bromfenolovou modří pro lepší sledování postupujícího dělení.

Podmínky dělení: 6 mA na jednu trubičku, napětí kolem 250 V, doba dělení asi 60 min.

Po skončení elektroforézy opatrně vyjmeme tru-

bičky a proudem vody z injekční stříkačky uvolníme sloupky gelu. V barvicí lázni jsou gelové sloupky 5 min. Odparujeme v 7% kyselině octové po několik dní.

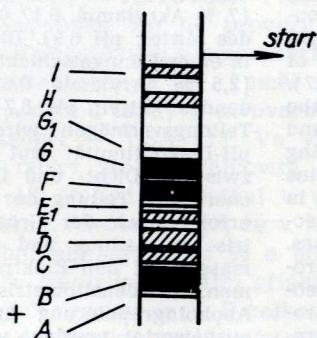
Diskové elektroforeogramy se vyhodnocovaly jednak vizuálně, jednak denzitometricky přístrojem zn. Vitatron. Bylo použito oranžového filtru 600 nm, štěrbinu 5 mm, rychlost posunu papíru 1 cm/20 s. Denzitometr nebyl speciálně upraven, sloupečky gelu byly proměřovány ve skleněné zkumavce v roztoku 7% kyseliny octové. Tím se snížila citlivost měření, poněvadž na grafu bylo zaznamenáno méně frakcí, než bylo lze postihnout vizuálně. Diskové elektroforeogramy byly tedy vyhodnoceny ofotografováním a denzitometrickým proměřením hotových snímků.

Fotografování bylo provedeno přístrojem Exacta při osvětlení zdola, doba expozice 4 s, clonou 8. Typ denzitometru: Zeiss RI 10.

### Výsledky a diskuse

K dělení jsme použili sladinu koncentrovanou lyofilizací a na jeden sloupeček jsme dávkovali 20 mg sušiny, což odpovídá asi 200–300 µg bílkoviny.

Po odparvení diskových elektroforeogramů jsme získali 8 až 11 frakcí. Na schematickém nákresu jsou frakce zachyceny a označeny písmeny A až I, a to od čela dělení směrem ke startu, tj. od nejrychleji putujících látek k látkám s nejnižší elektroforetickou mobilitou (obr. 4).



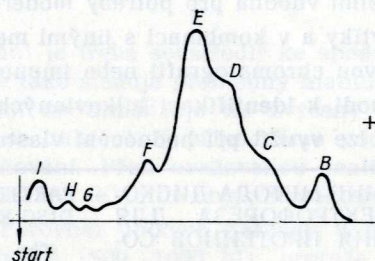
Obr. 4. Schematický nákres diskového elektroforeogramu

Porovnáme-li tento diskový elektroforeogram se vzorkem krevního séra, děleného touto metodou, pak zóny A, B, C, D odpovídají svou elektroforetickou pohyblivostí albuminovým složkám séra a zóny E až I sérovým globulinům.

Dělení jsme prováděli u dvou sérií různých pokusů. V první části asi třiceti vzorků byla frakce A zřetelně oddělena jen v některých případech. Patrně byly frakce B, C, D, E, E<sub>1</sub>, F, G, G<sub>1</sub> a H, přičemž nejvýraznější byly B a C. V oblasti D až H bylo dělení neostré, frakce I s nejnižší pohyblivostí chyběla.

V druhé části (26 vzorků) bylo zřetelně rozděleno 8 frakcí, frakce A chyběla, rovněž frakce E<sub>1</sub> a G<sub>1</sub>. Intenzita frakcí B a C se snížila a jako dominující vystoupily zóny D a E. Frakce C a D jsou neostré, poslední splývá s velmi intenzivní frakcí E. Zóny G a H jsou slabé, avšak dobře pa-

trné a frakce I je ostrá a značně intenzivní. Různé rozdělení u dvou sérií přičítáme vlivu suroviny, tj. odrůdovým odchylkám u různých ječmenů (obr. 5). Výsledky prací Mikoly [4] a Woofa a Pierce [3] nemůžeme porovnávat se svými výsledky, poněvadž pracovali za jiných podmínek a s jiným výchozím materiálem.



Obr. 5. Diskový elektroforeogram bílkovin sladiny

Diskový elektroforeogram hvozděného sladu, který uvádí ve své práci Szilvinyi [1], koresponduje v základních frakcích s našimi elektroforeogramy, kde vystupují markantně zóny s nejmenší elektroforetickou mobilitou (odpovídá asi naší frakci I), dále střední frakce (naše D a E) a výrazná frakce s velkou pohyblivostí, korespondující u nás s frakcí B.

Tuto metodiku jsme aplikovali i při dělení bílkovinných složek u vzorků piva, koncentrovaných rovněž lyofilizací, s tím rozdílem, že na jeden sloupeček jsme dávkovali dvojnásobné množství sušiny vzorků.

Diskové elektroforeogramy piva byly podstatně chudší na počet frakcí. Jasně vystupovala nejintenzivnější a ostře oddělená zóna B, dále frakce C, D a E. Složky s malou elektroforetickou mobilitou v těchto elektroforeogramech chybějí.

Výhody této metody pro sladařské roztoky:

- jednoduché a levné zařízení
- krátká doba dělení
- lepší rozdělení frakcí než při papírové elektroforéze
- snadná úprava pro imunoelktroforézu.

Nevýhody:

- méně ostré dělení než u živočišných bílkovin
- méně citlivé denzitometrické vyhodnocování (úprava denzitometru).

### Souhrn

V práci je podrobně popsána technika dělení bílkovinných složek sladiny a piva metodou diskové elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Vzorky sladiny i piva byly koncentrovány lyofilizací. Téměř beze změny byl aplikován postup, který se osvědčil Cebecauerovi k dělení bílkovin krevního séra (tris-glycinový pufr, barvení amidočerní 10 B). Byly zachovány také poměry koncentrací monomeru a síťovadla, které určují poréznost nosiče. Dělení probíhá ve sloupcích hustého gelu [7 % akrylamid, 0,17 % síťovadla; pH 8,9]. Vzorek se koncentruje ve vrstvě řídkého gelu [2,5 % akrylamid, 0,62 % síťovadla; pH 6,7]. Velkou dělicí schopnost zajiš-

tuje diskontinuita pH na rozhraní hustého a řídkého gelu. Bílkoviny se rozdělí podle velikosti elektrického náboje a molekulové hmoty. Na elektroforeogramech, které byly vyhodnocovány denzitometricky po ofotografování na mikrofilm, bylo nalezeno 8 až 11 bílkovinných frakcí, což je srovnatelné s obdobnými výsledky Szilvinyiho. Popsaná metoda je velmi vhodná pro potřeby moderní pivovarské analytiky a v kombinaci s jinými metodami, např. s gelovou chromatografií nebo imunoelektroforézou se hodí k identifikaci bílkovinných složek sladiny, což lze využít při hodnocení vlastností pi-

vovarského ječmene jako výchozí suroviny pro výrobu sladu.

#### Literatura

- [1] SZILVINYI, A.: EBC Conv. Proc. Congr. Madrid 1967, 17-33
- [2] CLARKE, I. T.: Proc. Conf. Gelectrophoresis, Academy of Science, New York, 1964, 428
- [3] WOOF, J. B. - PIERCE, J. S.: EBC Conv. Proc. Congr. Madrid 1967, 365
- [4] MIKOLA, J.: Mallasjuomat 1966, č. 9, s. 309
- [5] CEBECAUER, L. - ŽITŇAN, D.: Chemické listy, 61, 1967, 1221
- [6] ORNSTEIN L. M.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964)
- [7] ORNSTEIN L. M.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 310 (1964)
- [8] DAVIS, B. J.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)

Lektoroval Ing. Dr. O. Mikeš, DrSc.