

Abbau von Purinderivaten zu Glycin durch saure Hydrolyse = Degradation of purine derivatives to glycine by acid hydrolysis

Autor(en): **Amadò, R. / Rothenbühler, E. / Arrigoni, Eva**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **74 (1983)**

Heft 1

PDF erstellt am: **09.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982995>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

R. Amadò, E. Rothenbühler*, Eva Arrigoni und J. Solms, Institut für Lebensmittelwissenschaft der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich, Zürich

Abbau von Purinderivaten zu Glycin durch saure Hydrolyse

Degradation of Purine Derivatives to Glycine by Acid Hydrolysis

Einleitung

Purinbasen kommen als Bausteine in den Nucleinsäuren vor und sind an energieliefernden Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Dem Lebensmittelchemiker und -technologien sind die 5'-Mononucleotide außerdem als Geschmacksverstärker bekannt. Vor allem Inosin-5'-monophosphat (IMP), Guanosin-5'-monophosphat (GMP) und Adenosin-5'-monophosphat (AMP) zeigen synergistische Effekte mit Glutaminsäure und anderen Aminosäuren (1, 2). Die Anwesenheit dieser Nucleotide verstärkt den Geschmack gewisser Aminosäuren um ein Vielfaches. Neben den natürlich in einem Lebensmittel vorkommenden Nucleotiden werden heute in vermehrtem Maße solche auch als eigentliche Geschmacksverstärker verschiedenen Nahrungsmitteln beigefügt.

Bei der Untersuchung von niedermolekularen Inhaltsstoffen aus Bäckerhefe hat *Rothenbühler* eine reine Fraktion isoliert, welche nach Hydrolyse mit 6 n Salzsäure Glycin als einzige Aminosäure enthielt (3). Diese Fraktion konnte in der Folge mit Hilfe verschiedener chromatographischer, elektrophoretischer und spektroskopischer Methoden eindeutig als Inosin identifiziert werden (3). Dieses überraschende Ergebnis stellte den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dar, in welcher abgeklärt werden sollte, ob und in welchem Maße Purine durch Hydrolysebedingungen, welche für die Bestimmung des Aminosäuremusters von Proteinen üblich sind, zu Aminosäuren abgebaut werden.

* jetzige Adresse: Dept. Food Science, Cornell University, Ithaca, N. Y., USA

Experimenteller Teil

Purinderivate

Die verwendeten Purinbasen, Nucleoside und Nucleotide entsprachen dem Reinheitsgrad puriss. und wurden bei Fluka AG (Buchs, CH), BDH-Chemicals (Poole, GB) und Böhringer GmbH (Mannheim, BRD) bezogen. Ribonucleinsäure (RNS) aus Hefe wurde ebenfalls bei Böhringer GmbH (Mannheim, BRD), Rinderserumalbumin (RSA) reinst > 98% bei Serva GmbH (Heidelberg, BRD) gekauft.

Hydrolysebedingungen

Je 100 μ Mole der Purinbasen, Nucleoside und Nucleotide wurden eingewogen und in 20 ml 6 n Salzsäure gelöst. Je 1 ml dieser Lösungen wurde in ein Hydrolyseröhrchen transferiert und während 10 min Stickstoff eingeleitet, um die Luft (CO_2) zu verdrängen. Die Proben wurden während 24 h bei 110 °C im Ölbad hydrolysiert. Anschließend wurde die Salzsäure am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur < 50 °C) abgedampft, der trockene Rückstand in 5 ml Citrat/Salzsäure Puffer pH 2,20 aufgenommen und das Hydrolysat durch eine G4-Glasfilternutsche filtriert. Mit dem gleichen Puffer wurde die benötigte Konzentration eingestellt und 100 μ l davon zur Analyse eingesetzt.

Von RNS und RSA wurden 10–12 mg in ein Hydrolyseröhrchen eingewogen, 1–2 ml 6 n Salzsäure zugegeben und wie oben beschrieben weiter behandelt.

Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalysen erfolgten auf einem Liquimat III (Kontron AG, Zürich, CH) im Einsäulenverfahren.

Folgende Parameter wurden gewählt:

Harztyp	Dionex DC 6 A (Pierce Chemical Comp., Rockford, Ill., USA)
Säulenhöhe	29,0 \pm 0,5 cm
Säulendurchmesser	0,4 cm
Pufferstrom	20 ml/h
Ninhydrinstrom	10 ml/h
Säulendruck	40–60 bar

Programm:

Puffer	pH	[Na ⁺]	T(°C)	t(min)
A	3,05	0,18	44	4
B	3,40	0,18	64	20
C	4,25	0,18	64	33
D	5,75	1,20	68	20
D	5,75	1,20	74	15
NaOH		0,40	74	11
A	3,05	0,18	44	35

Die totale Laufzeit, inklusive Regenerieren (NaOH) und Äquilibrieren (A) betrug 138 min.

Das beschriebene Programm erlaubte neben den in einem normalen Proteinhydrolysat vorkommenden Aminosäuren auch die Aminosäuren Hydroxyprolin und Hydroxylysin sowie die beiden Hexosamine Glucosamin und Galactosamin aufzutrennen. Mit einem automatischen Auftraggerät Sample Injector Modell 100 (Kontron AG, Zürich, CH) wurden jeweils 100 µl Probe aufgetragen. Die externen Standard-Chromatogramme wurden mit Amino Acid Standard CH (Pierce Chem. Comp., Rockford, Ill., USA) aufgenommen. Die Auswertung der Analysen erfolgte mit Hilfe eines rechnenden Integrators, Modell AA von Spectra Physics (Spectra Physics, Basel, CH).

Resultate und Diskussion

Die bei der Hydrolyse der verschiedenen Purinderivate sowie Hefe-RNS erhaltenen Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Es fällt auf, daß vor allem Adenin sowie Hypoxanthin und deren Derivate zu Glycin abgebaut werden. Guanin- und Xanthinderivate sowie Harnsäure lieferten unter den beschriebenen Hydrolysebedingungen nur in geringem Maße Glycin.

Ein Vergleich der Strukturformen in Abbildung 1 zeigt eine Gesetzmäßigkeit. Ersatz der Aminogruppe durch eine Hydroxylgruppe am C-6 Atom des Purinsystems führt zu einer Verdoppelung der Glycinbildung. Hypoxanthin ergibt äquimolare Mengen Glycin. Substitution in 2 und/oder 8 Position des Purinsystems führt dazu, daß die Hydrolyse dieser Purine nur Spuren von Glycin liefert.

Einen gewissen Einfluß haben die N-glykosidische Bindung und die Phosphorylierung. Die Bildung von Glycin ist am ausgeprägtesten mit der Base und sinkt sukzessive für das Nucleosid Mono-, Di- und Trinucleotid ab. Die Glycinbildung aus RNS ist relativ gering. RNS enthält nur Adenin als «Glycinbildner» während Guanin und die Pyrimidinbasen nicht zur Glycinbildung beitragen. Die große Zahl N-glykosidischer und Phosphorylbindungen hat vermutlich ebenfalls einen Einfluß.

Daß Glycin durch hydrolytischen Abbau aus Purinderivaten gebildet wird, war schon *Fischer* (4) bekannt. So werden Hydrolysebedingungen (conc. HCl/

Tabelle 1. Bildung von Glycin bei saurer Hydrolyse von Purinderivaten

Purinderivat	Hydrolysiert nMol	Glycin gebildet nMol	Mol Glycin pro Mol Purinderivat %
Adenin. HCl	20	9,83	49
Adenosin	20	9,42	47
AMP	20	8,42	42
ADP	20	7,52	38
ATP	20	7,24	36
Guanin. HCl	100	1,07	1
Guanosin	100	2,77	3
GMP	100	Spuren	–
Hypoxanthin	20	20,62	103
Inosin	20	18,40	92
IMP	20	15,81	79
Xanthin	100	1,31	1
Xanthosin	100	4,34	4
Harnsäure	100	0,77	1
RNS aus Hefe*	100	2,55	2,5

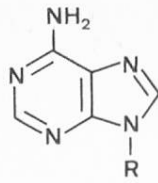
* Angaben in mg bzw. Gewichtsprozenten

170–200 °C/24 h) beschrieben, bei welchen selbst Harnstoff zu Glycin abgebaut wird. In der vorliegenden Arbeit zeigte es sich aber deutlich, daß die zur Hydrolyse von Proteinen üblicherweise verwendeten Bedingungen nicht ausreichen, um alle Purinderivate zu Glycin abzubauen.

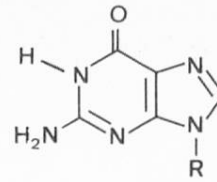
Tabelle 2 zeigt, daß freie Purinbasen und insbesondere 5'-Nucleotide in verschiedensten Lebensmitteln vorkommen. Vor allem Fleisch und Fisch sind reich

Tabelle 2. Vorkommen von Purinderivaten in Lebensmitteln

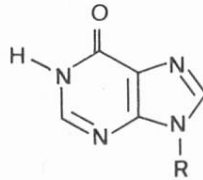
Freie Basen	
Adenin	Tierische Organe, Zuckerrübe, Tee, Hefe
Guanin	Fleisch, Fisch
Hypoxanthin	Muskelfleisch, Fleischextrakte
Xanthin	Pflanzen, Leber, Hefe
Harnsäure	Fleisch, Ausscheidungsprodukt
5'-Nucleotide	
AMP	Fleisch, Fisch, Gemüse, Pilze, Hefe
GMP	Fleisch, Pilze, Hefe
IMP	Fleisch, Fisch
ADP + ATP	Fleisch, Fische



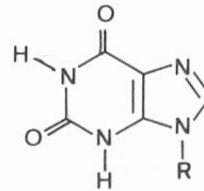
ADENINDERIVATE



GUANINDERIVATE

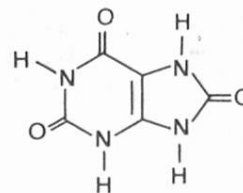


HYPOXANTHIN-
DERIVATE



XANTHINDERIVATE

R = H
R = RIBOSE
R = RIBOSE-
PHOSPHATE



HARNSÄURE

Abb. 1. Struktur von Purinderivaten

an AMP und IMP, aber auch in Gemüse und Pilzen wurden unterschiedliche Mengen an AMP und GMP nachgewiesen (1). Bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung eines Lebensmittels muß deshalb die Glycinbildung aus Purinderivaten berücksichtigt werden. Hoppe (5) stellte beispielsweise fest, daß Kohlenhydrate und Nucleinsäuren Aminosäureanalysen von biologischen Proben verfälschen. Bei der Hydrolyse von Hefe mit Adeninzusatz erhielt er wohl einen erhöhten Glycingehalt, ging aber dem Ursprung dieses Phänomens nicht nach. Watanabe et al. (6) beobachteten bei der sauren Hydrolyse von Fischmuskelextrakten eine Zunahme des Glycingehaltes und konnten in Modellversuchen zeigen, daß Glycin aus Adenosin-5'-triphosphat (ATP), AMP, IMP, Inosin und Hypoxanthin gebildet wird. Diese Glycinentstehung wurde aber nicht erklärt.

Die Modellversuche in der vorliegenden Arbeit von Mischungen eines reinen Proteins (RSA) mit unterschiedlichen Zugaben von Adenin, Hypoxanthin, IMP und RNS haben deutlich gezeigt, daß eine falsche Aminosäurezusammensetzung des Proteins vorgetäuscht werden kann. In Abbildung 2 ist die Erhöhung des Glycin- und Ammoniakpeaks am Beispiel der Zugabe von 10% Adenin zu RSA graphisch dargestellt. In Tabelle 3 ist zusätzlich der Einfluß anderer Purinderivate auf die Ausbeute von Glycin aus RSA zusammengefaßt.

Diese Modellversuche weisen darauf hin, daß bei Aminosäureanalysen von Lebensmitteln, welche reich an Nucleinsäuren bzw. Purinderivaten sind, erst

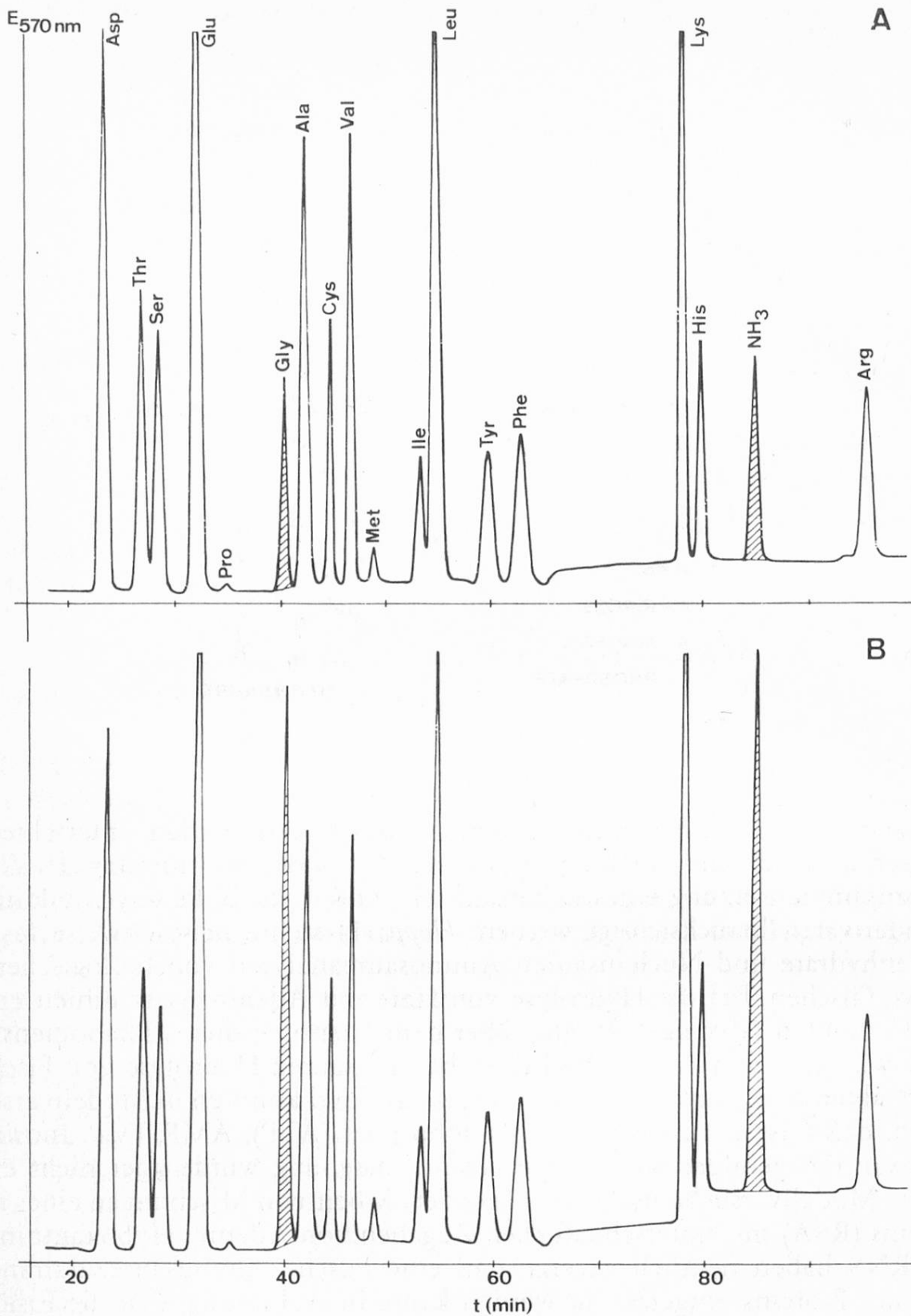


Abb. 2. Aminosäurespektrum von Rinderserumalbumin (A) und Rinderserumalbumin + 10% Adenin (B) nach saurer Hydrolyse (Prolin wurde bei 440 nm bestimmt)

Tabelle 3. Scheinbarer Glycingehalt von Rinderserumalbumin (RSA) mit verschiedenen Zusätzen

Probe	Glycin total	Glycin aus RSA	Glycin aus Zusatz	Ausbeute Glycin in %
10 mg RSA	2 273	2273	–	100
+ 1 mg Adenin	5 834	2273	3 561	256
+ 2 mg Adenin	9 562	2273	7 289	421
+ 1 mg Hypoxanthin	9 797	2273	7 524	431
+ 2 mg Hypoxanthin	17 532	2273	15 259	771
+ 0,1 mg IMP	2 381	2273	108	105
+ 0,2 mg IMP	2 583	2273	310	114
+ 0,5 mg IMP	3 215	2273	942	141
+ 1 mg RNS	2 517	2273	244	111
+ 2 mg RNS	2 986	2273	713	131

Alle Angaben in nMol

nach Abtrennung dieser Komponenten ein richtiges Bild des Aminosäuremusters der Proteine erhalten werden kann. Besonders bei IMP, AMP und ATP reichen Lebensmitteln, wie Fleisch und Fisch, kann die Aminosäurezusammensetzung der Proteinfraction stark verfälscht werden. Aus den gemachten Ausführungen geht hervor, daß die Bedeutung der Glycinbildung aus Purinderivaten über die Lebensmittelanalytik hinausgeht. In anderen Disziplinen wie biochemischer, klinisch-chemischer und mikrobiologischer Analytik sollte diesem Phänomen auch Beachtung geschenkt werden. Vor allem bei vergleichenden Aminosäureanalysen von nicht speziell vorgereinigten Proben biologischen Ursprungs könnte die Glycinbildung aus purinhaltigen Beimengungen zu Fehlinterpretationen führen.

Zusammenfassung

Glycin entsteht als Abbauprodukt aus Adenin und Hypoxanthin bzw. aus den entsprechenden Derivaten, wenn diese den für die Proteinhydrolyse üblichen Bedingungen unterworfen werden. Andere Purinderivate und RNS bilden nur geringe Mengen Glycin. In Modellversuchen wurde gezeigt, daß Beimengungen von Purinderivaten die Aminosäureanalysen von Proteinen erheblich verfälschen können. Bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Totalhydrolysaten von Lebensmitteln, welche ansehnliche Mengen Purinderivate enthalten, z. B. Fleisch und Fisch, kann deshalb ein zu hoher Glycingehalt vorgetäuscht werden.

Résumé

Adénine et hypoxanthine ainsi que leurs dérivés respectifs donnent de la glycine après être exposés à des conditions d'hydrolyse acide normalement employées pour la détermination des acides aminés. D'autres dérivés de purines ne donnent que peu de glycine. Il est démontré dans des essais modèles que la présence de dérivés de purines fausse les analyses des acides aminés d'une protéine. Par conséquent, les analyses des acides aminés d'aliments, riches en nucléotides de purines, comme la viande et le poisson, peuvent conduire à de faux résultats dus à la formation de glycine par hydrolyse des nucléotides.

Summary

Adenine and hypoxanthine as well as their derivatives form glycine when subjected to acid hydrolysis conditions commonly used for the determination of the amino acid composition of proteins. Other purine derivatives and RNA yield only small amounts of glycine. Model experiments have shown that the presence of purine derivatives, can bias the amino acid analysis of proteins. As a consequence, amino acid analysis of food, samples like meat and fish, which are rich in purine nucleotides, can result in too high glycine values.

Literatur

1. *Solms, J.*: In: Aroma- und Geschmacksstoffe in Lebensmitteln, S. 199–221 (J. Solms und H. Neukom, Hrsg.). Forster-Verlag, Zürich 1967.
2. *Gutzeit-Walz, Renate* und *Solms, J.*: Geschmacksverstärkung in Nucleotid-Aminosäuren-Modellsystemen. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **146**, 86–90 (1971).
3. *Rothenbühler, E.*: Vorkommen und Bedeutung gebundener Aminosäuren in Hefe. Diss. ETHZ Nr. 6620. ADAG Administrativ Druck AG, Zürich 1980.
4. *Fischer, E.*: Untersuchungen in der Puringruppe, S. 69. Verlag Julius Springer, Berlin 1907.
5. *Hoppe, W. Z.*: Aminosäureanalysen in biologischem Material. I. Mitteilung: Einfluß von Hydrolysenbedingungen sowie von Kohlenhydraten und Purinbasen. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **147**, 14–20 (1971).
6. *Watanabe, K., Shimuzu, T.* and *Konosu, S.*: Formation of glycine from purine derivatives in the fish muscle extracts during acid hydrolysis. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* **40**, 73 (1974).

Dr. R. Amadò
Dr. E. Rothenbühler
Frau Eva Arrigoni
Prof. Dr. J. Solms
Inst. für Lebensmittelwissenschaft ETHZ
ETH-Zentrum
CH-8092 Zürich