

# ISOLIERUNG VON PEPTIDEN AUS CHEDDAR-KÄSE TRENNUNG VON AMINOSÄURE/PEPTID-Cu(II)-KOMPLEXEN AN SEPHADEX QAE

K. P. POLZHOFER und K. H. NEY  
Unilever Forschungsgesellschaft mbH, Hamburg

(Received in Germany 9 October; Received in UK for publication 8 November 1971)

**Zusammenfassung**—Die Trennung von Aminosäuren und Peptiden als Cu(II)-Komplexe, die bisher auf DEAE-Zellulose durchgeführt wurde, haben wir auf Sephadex QAE-A 25 übertragen und zur qualitativen Analyse von Cheddar-Käse herangezogen.

Die Methode besitzt folgende Eigenarten:

Tri- und höhere Peptide lassen sich quantitativ von den neutralen und basischen Aminosäuren abtrennen.

Die sauren Aminosäuren Glu und Asp können von Tri- und höheren Peptiden nicht abgetrennt werden.

Glu und Asp werden aber von den übrigen Aminosäuren und neutralen Dipeptiden quantitativ abgetrennt.

Neutrale Dipeptide bleiben in der Aminosäurefraktion.

Gln und Asn können nach Abtrennung von Glu und Asp nach Moore und Stein bestimmt werden.

**Abstract**—Separation of amino acids and peptides in the form of Cu(II)-complexes which, to date, had been carried out on DEAE cellulose has now been transferred to Sephadex QAE-A 25 to be used in the qualitative analysis of Cheddar cheese.

The characteristics involved in the method are the following:

Tri- and higher peptides can quantitatively be separated from the neutral and basic amino acids.

The acidic amino acids Glu and Asp cannot be separated from tri- and higher peptides.

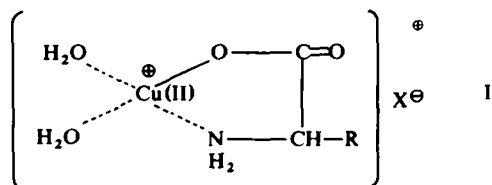
Neutral dipeptides remain in the amino acid fraction.

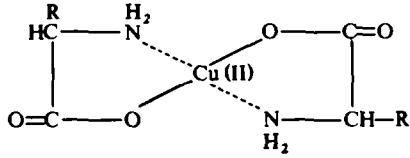
After isolation of Glu and Asp it is possible to determine Gln and Asn by the Moore/Stein method.

## EINLEITUNG

Bei der Isolierung und Reinigung von Polypeptiden aus Naturstoffen ist besonders die Abtrennung von kleinen Mengen Peptiden bei hoher Aminosäure-Konzentration problematisch.<sup>1-6</sup> Erst die von Tommel *et al.*<sup>7,8</sup> angegebene Vorschrift scheint für die Trennung von Aminosäure/Peptid-Gemischen allgemein anwendbar zu sein. Bei dieser Methode wird das Aminosäure/Peptid-Gemisch in die Cu(II)-Chelate übergeführt, die an Cellulose-Austauschern adsorbiert und mit Collidinacetat-Puffern vom pH 8 bzw. 4.5 bzw. mit 0.17 n Essigsäure oder 0.1 n HCl stufenweise eluiert wurden.

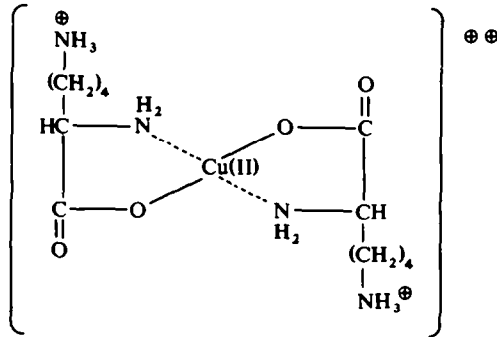
$\alpha$ -Aminosäuren bilden zwei Arten von Cu(II)-Komplexen:<sup>9,10</sup>



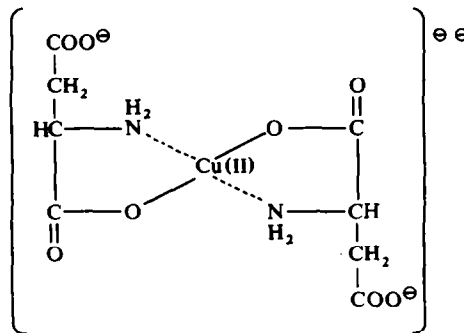


II

II entsteht bevorzugt bei der Komplexbildung mit basischem Kupfercarbonat. Die Kupferkomplexe sind in neutralem oder alkalischem Milieu beständig und zersetzen sich in saurer Lösung durch Protonierung der Amino-Gruppe. Nach Lit.<sup>7,8</sup> wird die Komplexbildung bei pH 8 mit Kupfer(II)-hydroxid-carbonat ( $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$ ) ausgeführt; bei diesem pH liegen neutrale Aminosäuren als Form II vor, basische als III und saure als IV.

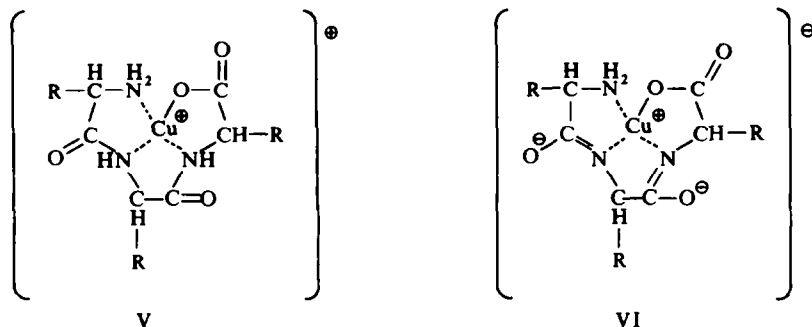


III  
Cu(II) . Lys<sub>2</sub>



IV  
Cu(II) . Asp<sub>2</sub>

Auch kürzerkettige Peptide bilden Cu(II)-Komplexe, die 1 Mol Peptid/Cu<sup>2+</sup>-Ion enthalten.<sup>11-18</sup> In neutralem Medium liegt V vor, in basischem VI.



Die Peptid-Cu(II)-Komplexe höherer Peptide sind komplizierter gebaut und enthalten meist mehr  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen pro Mol Peptid.<sup>19-21</sup>

Bei pH 8 besteht also zwischen den Cu(II)-Komplexen der neutralen und basischen Aminosäuren (Ladung 0 bzw. +) einerseits und den Cu(II)-Chelaten der Peptide (Ladung -) andererseits ein Ladungsunterschied, der zur Trennung der beiden Substanzklassen an einem Anionenaustauscher ausreicht.

Für eine grobe Vorfraktionierung von Aminosäure/Peptid-Gemischen soll die Verwendung von Puffer- oder Temperatur-Gradienten bei der 1. Stufe der Trennoperation vermieden werden; die eigentliche Feinfraktionierung des Peptid-Gemisches soll dann durch Ionenaustauscher-Chromatographie erfolgen.

#### METHODEN UND ERGEBNISSE

##### *Synthetische Peptide und Aminosäuren*

Folgende von uns synthetisierte Peptide wurden für die Herstellung von Testgemischen verwendet: H-Leu-Leu-OH,<sup>22</sup> H-Ala-Met-OH,<sup>22</sup> H-Met-Leu-OH,<sup>22</sup> H-Ala-Leu-Met-OH,<sup>22</sup> H-Asp-Met-OMe,<sup>23</sup> H-Asp-Phe-OMe.<sup>23</sup>

Das Aminosäure-Testgemisch bestand aus äquimolaren Mengen folgender Aminosäuren: Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, CySSCy, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, His, Lys,  $\text{NH}_3$ , Arg. Diese wurden von der Firma Bio-Rad, München, bezogen. Testgemische ohne Tyr, Phe und CySSCy wurden mit Aminosäuren der Fa. Ajinomoto, Hamburg, hergestellt.

##### *Natürliche Aminosäure/Peptid-Gemische*

*Aminosäure/Peptid-Gemische aus Cheddar.* 100 g reifer Cheddar (10 Monate alt) wurden sechsmal mit je 500 ml abs. Äther mit Hilfe des Ultra-Turrax entfettet. Man erhielt 39 g entfetteten Käse. 1.192 g entfetteter Käse wurden mit 50 ml 3%iger wässriger Sulfosalicylsäure während 16 h bei 20° extrahiert. Nach Abfiltrieren der unlöslichen Bestandteile wurde ein Teil der Lösung für die Herstellung der Cu(II)-Komplexe benutzt.

##### *Ionenaustauscher und Pufferlösungen*

Der in Lit.<sup>8</sup> beschriebene Anionenaustauscher Whatman-Cellulose DE 11 hat eine verhältnismässig geringe Kapazität (DEAE\*-Cellulose mit der Kapazität von 1.0mVal/g) und besitzt faserartige Struktur.

\* Diäthylaminoäthylcellulose

Uns schien die Verwendung des von Sephadex entwickelten Anionenaustauschers QAE-A 25 aus folgenden Gründen vorteilhafter zu sein: Sephadex QAE-A 25 besitzt eine Kapazität von 30 mVal/g, kombiniert die Vorteile von Cellulose- und Kunstharz-Austauschern, besitzt durch das Dextrangerüst keine unspezifischen Adsorptionseigenschaften, besteht aus kugelförmigen Teilchen und gestattet eine hohe Durchflussgeschwindigkeit.

Sephadex QAE-A 25 wird in der  $\text{Cl}^-$ -Form geliefert und wurde durch zweistündige Behandlung mit 1 m Natriumacetat-Lösung bei 80° gequollen und in die Acetat-Form gebracht. Nach dreimaligem Dekantieren mit dem Startpuffer\* wurde der Austauscher in die Säule (0.9 × 60 cm; Gelhöhe 48 cm) eingeschlämmt und mit drei Säulenvolumina Startpuffer äquilibriert. Auf die Säulen wurden 1–3  $\mu\text{Mol}$  je Aminosäure bzw. Peptid aufgegeben.

Zur Elution (Durchfluss 15 ml/h · cm<sup>2</sup>) wurden folgende Lösungsmittel verwendet: 0.01 m Collidinacetat-Puffer pH 8, 0.17 n Essigsäure, 0.1 n HCl und 0.5 n HCl. Es wurde immer stufenweise eluiert; auf eine Gradienten-Elution wurde bewusst verzichtet, da nur eine Trennung in Aminosäure- und Peptidfraktion angestrebt wurde.

#### *Komplexierung mit Kupfer(II)-hydroxid-carbonat† (CuCO<sub>3</sub> · Cu(OH)<sub>2</sub>)*

Die Aminosäure-Testgemische, die synthetischen Peptide und die natürlichen Aminosäure/Peptid-Gemische aus Cheddar wurden in Collidinacetat-Puffer aufgenommen und mit Collidin auf pH 8 eingestellt. Die Aminosäure-Konzentration betrug für jede Aminosäure 2–3  $\mu\text{Mol/ml}$ . Die Konzentrationen der Lösung des entfetteten und extrahierten Käses betragen 20 mg/ml. Die alkalischen Lösungen versetzte man mit der vierfachen molaren Menge (bei Käse 100 mg) an CuCO<sub>3</sub> · Cu(OH)<sub>2</sub>, rührte 16 h bei 45°, filtrierte vom überschüssigen CuCO<sub>3</sub> · Cu(OH)<sub>2</sub> ab und gab einen aliquoten Teil der meist blau, grün oder violett gefärbten Lösungen auf den Austauscher.

#### *Entkupferung mit 8-Hydroxychinolin*

Für die direkte Vermessung der Cu(II)-Komplexe bei 620 nm waren die Konzentrationen in den erhaltenen Säuleneluatn meist zu gering. Deshalb wurden die Fraktionen drei- bis viermal mit 8-Hydroxychinolin in Chloroform (6.5 mg/ml) ausgeschüttelt. Die Cu<sup>2+</sup>-Ionen werden bei einem pH von 4–9<sup>8,24</sup> quantitativ als Cu-Hydroxychinolin-Verbindungen extrahiert, die bei 396 nm vermessen werden. Diese Methode ist etwa 100mal empfindlicher als die oben erwähnte.

#### *Aminosäure- und Peptid-Nachweis*

Nach Abtrennung der Cu<sup>++</sup>-Ionen wurden die Aminosäuren bzw. Peptide in den Eluatn mit dem Aminosäuren-Analysator BC-200‡ nach dem Einsäulen-Programm bestimmt.

Überschüssiges 8-Hydroxychinolin stört die Trennungen nicht; es wird erst beim Regenerieren des Austauschers mit 0.4 n NaOH abgelöst.

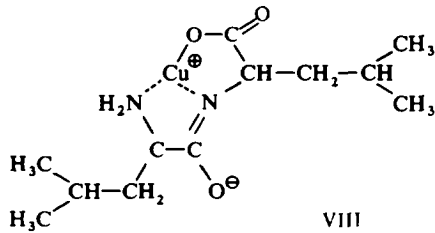
#### *Trennungen von Aminosäure-/Peptid-Cu(II)-Chelaten an Sephadex QAE-A 25 Aminosäure-Testgemisch (s. S. 1723)/H-Leu-Leu-OH*

Bei diesem Versuch wurden Fraktionen zu je 1.8 ml gesammelt. Jede Fraktion wurde mit 8-Hydroxychinolin/CHCl<sub>3</sub> ausgeschüttelt und die gelbe organische Phase bei 396 nm vermessen.

\* 0.01 m wässr. 2,4,6-Collidinlösung wurde mit Eisessig auf pH 8 eingestellt.

† CuCO<sub>3</sub> · Cu(OH)<sub>2</sub>, reinst, Fa. Merck AG, Darmstadt, Kat.-Nr. 2722.

‡ BC-200 Aminosäuren-Analysator, Fa. Bio Cal, München.



Cu(II)·Leu-Leu bei pH8

Dipeptid-Cu(II)-Chelate wie VIII liegen bei pH 8 als neutrale Komplexe vor und können deshalb von den Aminosäure-Cu(II)-Chelaten (ausser Asp, Glu, CySSCy) nicht abgetrennt werden.

*Aminosäure-Testgemisch\*/H-Ala-Met-OH/H-Met-Leu-OH*

Im Eluat wurden alle Aminosäuren ausser Glu und Asp und die beiden Dipeptide nachgewiesen. Glu und Asp konnten aber mit 0.5 n HCl eluiert werden.

Die beiden Dipeptide konnten von den Aminosäuren (ausser Glu und Asp) nicht abgetrennt werden. Tyr und Phe wurden dem Aminosäure-Testgemisch nicht zugegeben, weil sie gleiche Elutionszeiten wie die Dipeptide besaßen.

*Aminosäure-Testgemisch\*/H-Ala-Leu-Met-OH*

Im Eluat wurden alle Aminosäuren ausser Glu und Asp nachgewiesen. Glu, Asp und H-Ala-Met-Leu-OH wurden mit 0.5 n HCl eluiert. Der Cu(II)-Komplex des Tripeptides hatte eine rötlich-violette Farbe und trennte sich während der Elution mit Collidinacetat-Puffer nur etwa 2 cm vom hellblauen Glu- und Asp-Cu(II)-Komplex. Tripeptid-Cu(II)-Komplexe bleiben bei pH 8 an Sephadex QAE haften.

*Aminosäure-Testgemisch\*/H-Leu-Leu-OH/H-Asp-Met-OMe/H-Asp-Phe-OMe/H-Ala-Leu-Met-OH (Abb.1)*

Man eluierte mit 40 ml Collidinacetat-Puffer pH 8 und fand im Eluat alle Aminosäuren ausser Glu und Asp und das Dipeptid H-Leu-Leu-OH (Abb. 2). Asp, Glu, H-Ala-Leu-Met-OH und die Zersetzungsprodukte von H-Asp-Phe-OMe und H-Asp-Met-OMe wurden im HCl-Eluat (25 ml 0.5 n HCl) nachgewiesen (Abb. 3). Die beiden Dipeptidester wurden während der Komplexbildung anscheinend verseift. Sie verhielten sich dann wie saure Dipeptide (negative Nettoladung des Cu(II)-Komplexes) und wurden daher bei pH 8 nicht eluiert.

Reproduzierbarkeit von Aminosäure-Cu(II)-Komplex-Trennungen Es wurden fünf Versuche unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Pro Versuch wurde mit 70 ml Collidinacetat-Puffer pH 8 eluiert. Tab. 1 gibt die Ausbeuten nach Komplexbildung, Trennung an Sephadex QAE-A 25, Extraktion mit 8-Hydroxychinolin und Chromatographie nach Moore und Stein an.

*Bestimmung von freiem Glutamin und Asparagin neben freier Glutaminsäure und Asparaginsäure*

Es ist schwierig, Gln und Asn neben Glu und Asp, Thr und Ser zu bestimmen, da Thr, Ser, Gln und Asn mit den üblichen Puffergemischen nicht aufzutrennen sind.

Mit der beschriebenen Methode ist es aber möglich, Glu und Asp über die Cu(II)-

\* Testgemisch wie auf S. 1723, aber ohne Tyr, Phe, CySSCy, NH<sub>3</sub>.

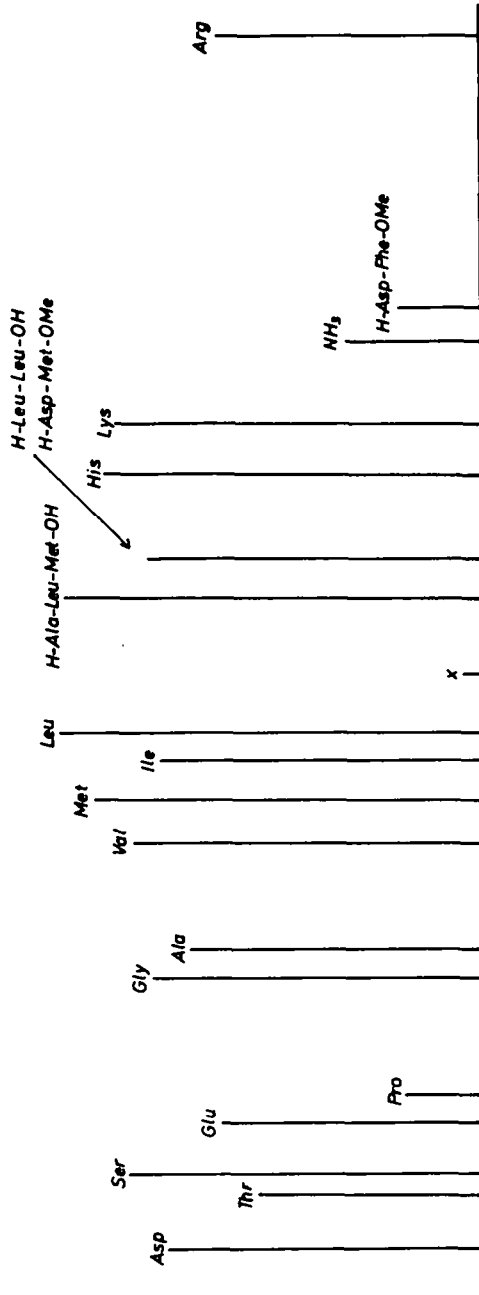


Abb. 1-3 Aminosäuren-Analyse nach Moore und Stein

Abb. 1 Trennung von H-Leu-Leu-OH, H-Asp-Met-OMe, H-Asp-Phe-OMe, H-Ala-Leu-Met-OH und Aminosäuretestgemisch, Ausgangsgemisch

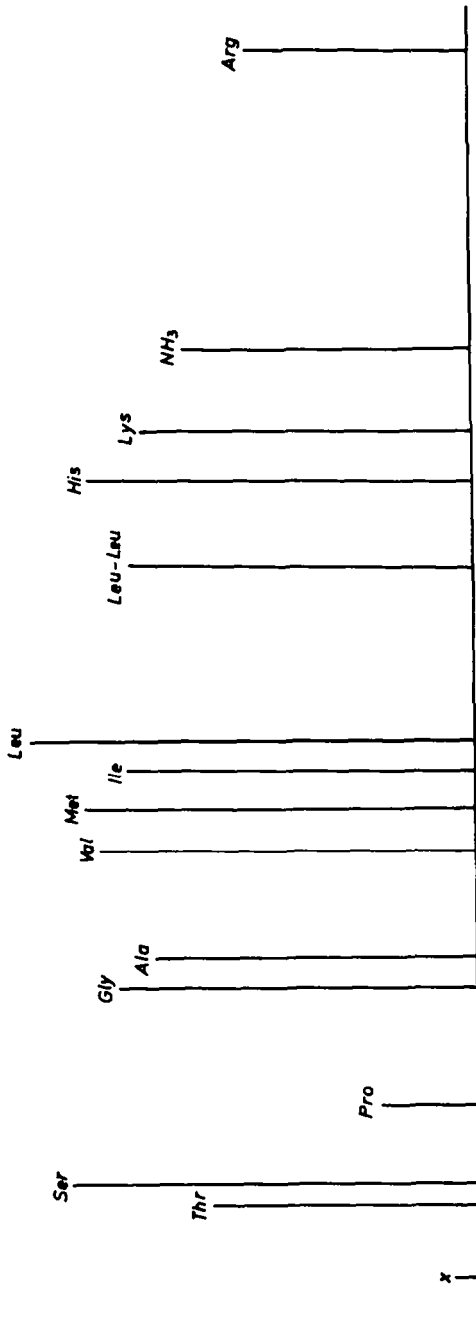


Abb. 2 Trennung von H-Leu-Leu-OH, H-Asp-Met-OH, H-Asp-Phe-OMe, H-Ala-Leu-Met-OH und Aminosäuretestgemisch, Elution mit Collidin-acetat-Puffer pH 8

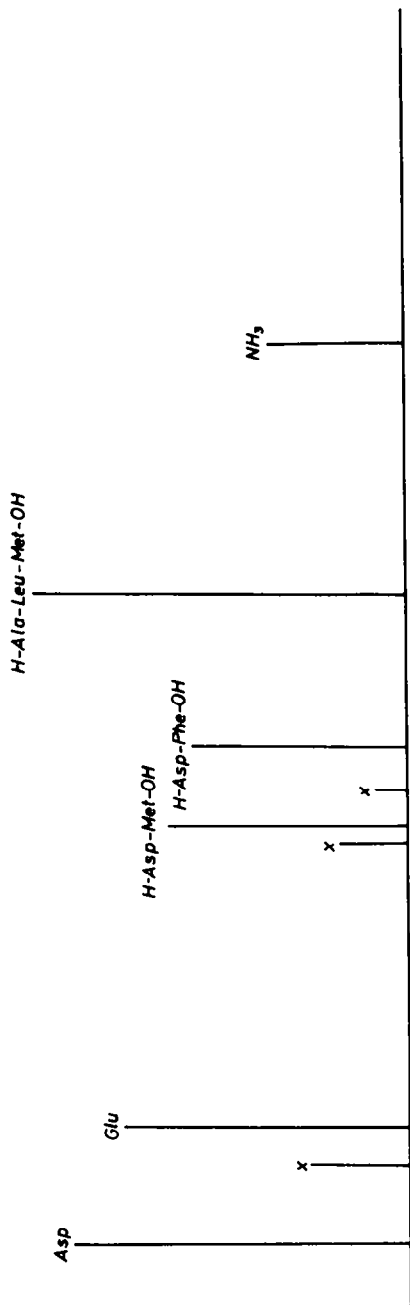


Abb. 3 Trennung von H-Leu-Leu-OH, H-Asp-Met-OH, H-Asp-Phe-OMe, H-Ala-Leu-Met-OH und Aminosäuretestgemisch, 2. Elution mit 0,5 n HCl





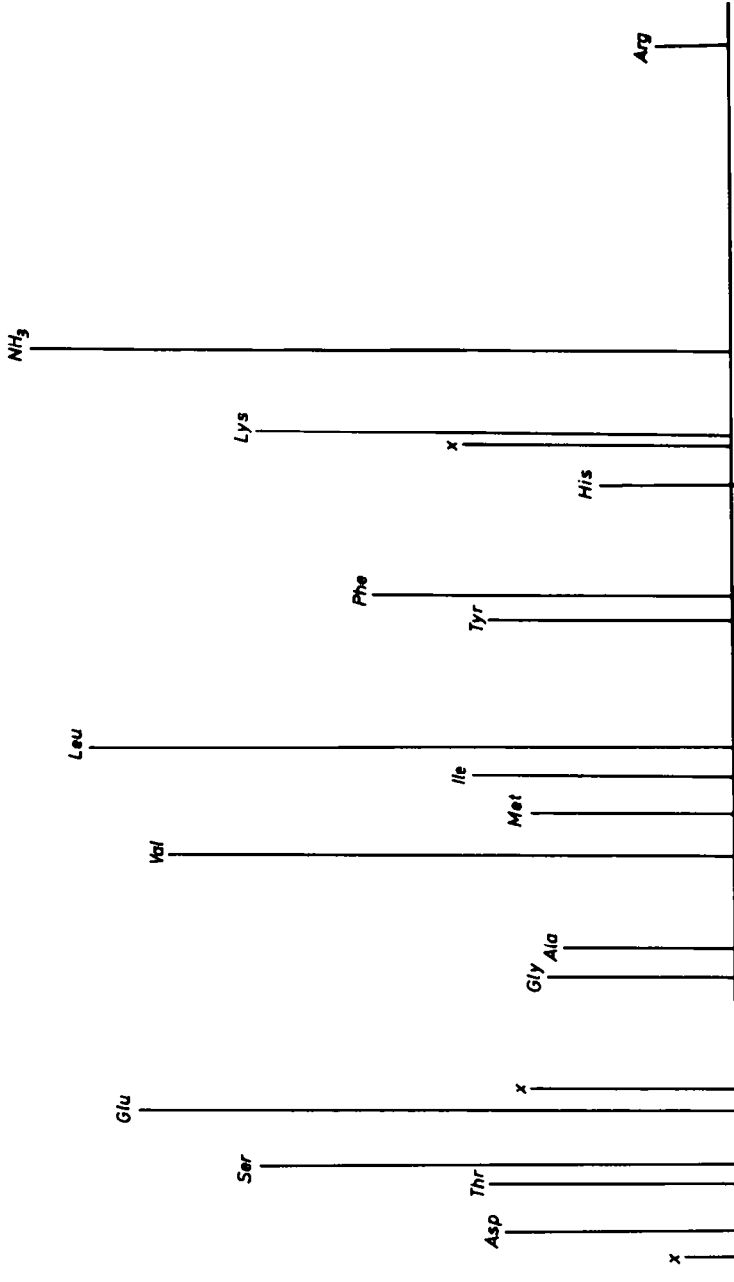


Abb. 4-7 Aminosäuren-Analyse nach Moore und Stein  
Abb. 4 Trennung eines Aminosäure/Peptid-Gemisches aus Cheddar; Ausgangsgemisch

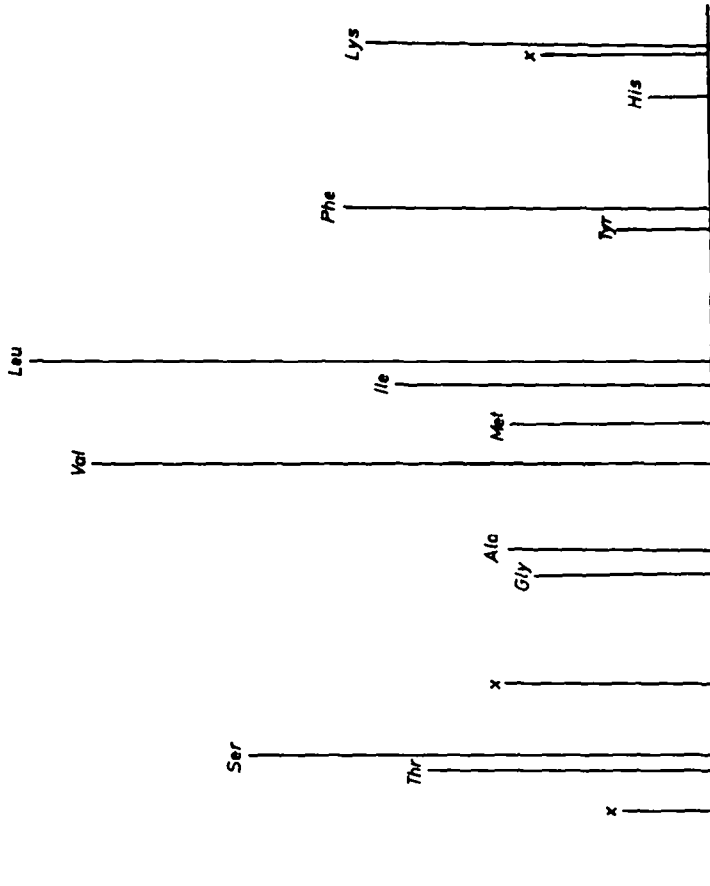


Abb. 5 Trennung eines Aminosäure/Peptid-Gemisches aus Cheddar; Elution mit Collidin-acetat-Puffer pH 8

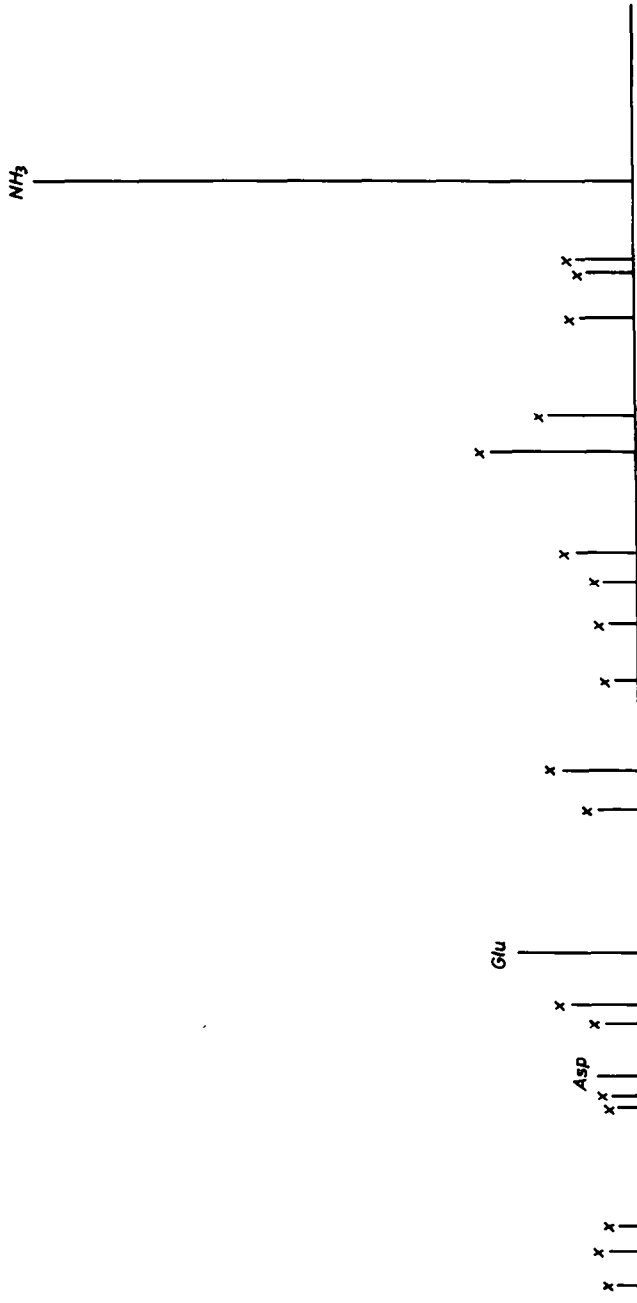


Abb. 6 Trennung eines Aminosäure/Peptid-Gemisches aus Cheddar; 2. Elution mit 0,5 n HCl

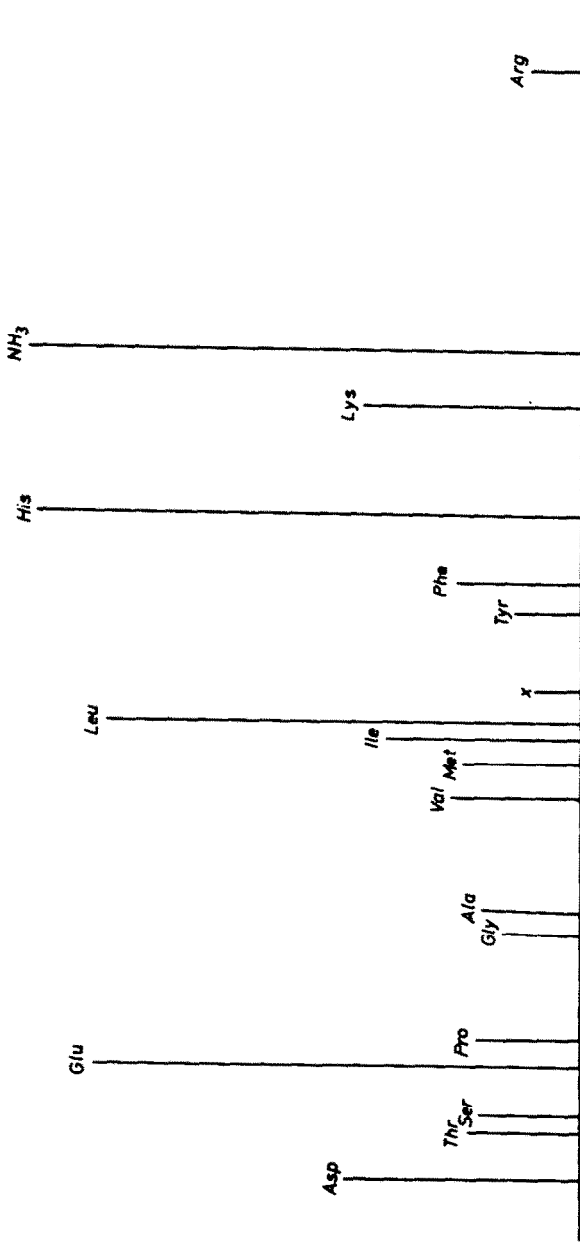


Abb. 7 Trennung eines Aminosäure/Peptid-Gemisches aus Cheddar; Hydrolysat des HCl-Eluates

Komplexe abzutrennen. Das Eluat enthält dann neben den anderen Aminosäuren Gln und Asn, die nach der salzsauren Hydrolyse als Glu ( $\text{Glu}_{\text{Amid}}$ ) und Asp (=  $\text{Asp}_{\text{Amid}}$ ) bestimmt werden können. Freie Glu und Asp werden danach entweder mit 0.5 n HCl vom Sephadex QAE eluiert und bestimmt, oder man analysiert ein Gesamthydrolysat im Hinblick auf  $\text{Glu}_{\text{Gesamt}} = \text{Glu}_{\text{frei}} + \text{Glu}_{\text{Amid}}$  bzw.  $\text{Asp}_{\text{Gesamt}} = \text{Asp}_{\text{frei}} + \text{Asp}_{\text{Amid}}$  und bestimmt freie Glu und freie Asp aus  $\text{Glu}_{\text{Gesamt}} - \text{Glu}_{\text{Amid}}$  bzw.  $\text{Asp}_{\text{Gesamt}} - \text{Asp}_{\text{Amid}}$ .

Asn und Glu wurden mit 20 ml Collidinacetat-Puffer pH 8 eluiert, Glu und Asp mit 20 ml 0.1 n HCl.

#### *Trennung eines Aminosäure/Peptid-Gemisches aus Cheddar (Abb. 4)*

Entsprechend 478 mg entfettetem Käse wurden 20 ml Sulfosalicylsäure-Lösung (s. S. 1723) für die Komplexbildung verwendet und 3 ml (= 60 mg entfett. Käse) der dunkelblauen Lösung auf die Säule gegeben. Mit 70 ml Collidinacetat-Puffer pH 8 eluierte man die Aminosäuren und evtl. vorkommende neutrale Dipeptide (Abb. 5). Glu, Asp und die Peptide wurden mit 20 ml, 0.5 n HCl eluiert (Abb. 6). Ein Totalhydrolysat des salzsauren Eluates enthielt eine Reihe von Aminosäuren (Abb. 7), die im Peptidverband vorlagen.

#### DISKUSSION

Die in Lit.<sup>8</sup> beschriebene Arbeitsmethode zur Trennung von Aminosäure/Peptid-Gemischen über die Cu(II)-Komplexe am Anionenaustauscher scheint zur Vortrennung solcher Gemische aus Käse sehr gut geeignet zu sein. Der grösste Teil der freien Aminosäuren kann von Tri- und höheren Peptiden abgetrennt werden; die im Käse in geringen Konzentrationen vorkommenden Peptide könnten somit angereichert werden. Neutrale Dipeptide bleiben in der Aminosäurefraktion.

Die beschriebene Extraktion der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen mit 8-Hydroxychinolin sollte durch  $\text{H}_2\text{S}$ -Fällung ersetzt werden können.

Die Peptid-Cu(II)-Komplexe (ab Tripeptid) werden bei pH 8 am Austauscher vollständig adsorbiert; statt der Säulenchromatographie sollte deshalb das "Batch-Verfahren" angewendet werden können.

*Danksagung*—Frau B. Goebel danken wir für ihre ausgezeichnete technische Mitarbeit.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> P. R. Carnegie, *Biochem. J.* **78**, 687 (1961)
- <sup>2</sup> P. R. Carnegie, *Nature*, **192**, 658 (1961)
- <sup>3</sup> P. R. Carnegie und R. L. M. Syngé, *Biochem. J.* **78**, 692 (1961)
- <sup>4</sup> G. P. Lampson und H. O. Singher, *Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y.* **103**, 368 (1960)
- <sup>5</sup> C. L. Fromageot, M. Justiz und E. Lederer, *Biochim. Biophys. Acta* **2**, 487 (1948)
- <sup>6</sup> S. Fazakerley und D. R. Best, *Analyt. Biochem.* **12**, 290 (1965)
- <sup>7</sup> D. K. J. Tommel, J. F. G. Vliegthart, Th. J. Penders und J. F. Arens, *Biochem. J.* **99**, 48P (1966)
- <sup>8</sup> D. K. J. Tommel, J. F. G. Vliegthart, Th. J. Penders und J. F. Arens, *Ibid.* **107**, 335 (1968)
- <sup>9</sup> R. K. Gould und W. C. Vosburgh, *J. Am. Chem. Soc.* **64**, 1630 (1942)
- <sup>10</sup> D. P. Graddon und L. Munday, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **23**, 231 (1961–62)
- <sup>11</sup> E. Breslow, *Biochem. Biophys. Acta* **53**, 606 (1961)
- <sup>12</sup> G. F. Bryce und F. R. N. Gurd, *J. Biol. Chem.* **241**, 122 (1966)
- <sup>13</sup> G. F. Bryce, R. W. Roeske und F. R. N. Gurd, *Ibid.* **240**, 3837 (1965)

- <sup>14</sup> M. A. Doran, S. Chaberek und A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2129 (1964)
- <sup>15</sup> H. C. Freeman und J. T. Szymanski, *Chem. Commun.* **23**, 598 (1965)
- <sup>16</sup> H. C. Freeman und M. R. Taylor, *Proc. Chem. Soc.* 88 (1964)
- <sup>17</sup> D. C. Gould und H. S. Mason, *Biochem.* **6**, 801 (1967)
- <sup>18</sup> Th. Peters und F. A. Blumenstock, *J. Biol. Chem.* **242**, 1574 (1967)
- <sup>19</sup> A. C. Jennings, *Austr. J. Chem.* **16**, 989 (1963)
- <sup>20</sup> A. C. Jennings, *Ibid.* **16**, 1006 (1963)
- <sup>21</sup> H. D. C. Jones und D. J. Perkins, *Biochim. Biophys. Acta* **100**, 122 (1965)
- <sup>22</sup> K. P. Polzhofer und K. H. Ney, unveröffentlichte Ergebnisse
- <sup>23</sup> K. P. Polzhofer und K. H. Ney, unveröffentliche Ergebnisse
- <sup>24</sup> R. Bock und F. Umland, *Angew. Chem.* **67**, 420 (1955)