

ŠTÚDIUM HARDEN—YOUNGOVHO EFEKTU (II) PRÍPRAVA A IZOLÁCIA FOSFORYLOVANÝCH ESTEROV CUKROV (FEC)

A. GEBAUEROVÁ, K. TOMÁŠEK

Oddelenie glycidov a biochémie Chemického ústavu Slovenskej akadémie vied v Bratislave
Katedra technickej mikrobiológie a biochémie Chemickej fakulty Slovenskej vysokej
školy technickej v Bratislave

Fosforylované estery cukrov (FEC) majú dôležitú úlohu v látkovej premene živočíšnych i rastlinných tkanív, ako aj mikroorganizmov, a to pri oxydatívnych i pri anoxydatívnych procesoch. Keďže príprava FEC chemickou cestou je zložitá, väčšinou sa pripravujú biochemickou syntézou z kvasníc, činnosťou rastlinných a živočíšnych fosforylačných enzýmov. Ak majú byť pripravené za spoluúčasti kvasničných buniek, musia sa najprv nahromadiť vo väčšom množstve. Toto sa dosiahne inhibíciou fosforylačných enzýmov, napr. sušením, toluénom, oktylalkoholom, izotiokyanatanmi a pod. Takto vyvolaný efekt sa nazýva Harden—Youngov efekt. Optimálne podmienky na vyvolanie Harden—Youngovho efektu sme podrobne študovali v predchádzajúcej práci [1]. Po skúsenostiach, ktoré sme získali, pristúpili sme k príprave čistých FEC. V literatúre sa síce často uvádzajú jednotlivé prípravy, avšak pravdepodobne slúžia len pre menšie pokusy, ktoré nevyžadujú veľkú čistotu preparátov a bývajú aj ťažko reprodukovateľné. Pokladáme preto za dôležité uviesť súhrnne na jednom mieste našu vyskúšanú metódu prípravy najdôležitejších FEC.

Experimentálna časť

Príprava bårnatej soli F-1,6-dP

Pri príprave Harden—Youngovho esteru sme vychádzali z nahromadovacej zmesi FEC po vyvolaní Harden—Youngovho efektu. Porovnali sme niekoľko metód, napr. Bernhauerovu [7], Tatrovu [6] a Stepanenkovej [8]. Zistili sme, že sa v podstate všetky opierajú o metódu uvedenú v [3]. Využili sme preto vlastné skúsenosti [1] a nahromadovací pokus sme vykonali v nádobe upravenej Tomáškom [9] (obr. 1).

Do desaťlitrovej banky sa dajú 2 kg pivovarských kvasníc, asi trikrát vedených v prevádzke a odležaných vo vani pod vodou [1], 360 ml toluénu alebo 0,01 % alylizotiokyanatanu, 4 litre vody a 342 g sacharózy. Banka sa zatvorí vrtanou zátkou (pozri obr. 1). Tak môže unikajúci CO₂ prebubľávať fosforečnanový roztok. Pravidelnosť kvasenia sa reguluje pripúšťaním fosforečnanového roztoku (352 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O v jednom litri vody). Počas pokusu sa vpustí celý liter. Pripúšťa sa asi 60 ml priebehom 25—45 minút. Po skončení kvasenia sa pridá roztok kyseliny trichlóroctovej (375 g sa rozpustí v najmenšom objeme vody). Tak sa vyzrážajú bielkoviny, ktoré sa odstredia. Filtrát sa zalkalizuje na pH 8,0 a pridá sa nasýtený roztok octanu bårnateho (280 g). Získa sa zrazenina surovej bårnatej soli v množstve 93,75 g. Zrazenina sa vypiera vodou, alkoholom a vysuší sa vo vákuovom exsikátore. Filtrát sa použije na získanie Robinsonovho esteru.

Vysvetlenie značiek: G-1-P = glukozo-1-fosfát, F-6-P = glukozo-6-fosfát, F-1,6-dP = fruktozo-1,6-difosfát, ATP = adenzíntrifosfát, TCHO = kyselina trichlóroctová, ATPáza = adenzíntrifosfatáza = apyráza.

Čistenie surovej bárnatej soli F-1,6-dP

5 g surovej bárnatej soli F-1,6-dP sa preleje 5 ml vody a 25 ml N-HCl, dobre sa rozmieša, pridá sa 10 % roztok Na_2SO_4 do úplnej sedimentácie BaSO_4 a zrazenina sa odfiltruje. Filtrát sa zneutralizuje na metyloranž za použitia roztoku 5 N-NaOH a prilejú sa 2 ml 25 % roztoku NH_4OH a 10 ml horečnatej zmesi (100 g MgCl_2 + 200 g NH_4Cl sa rozpustí v jednom litri vody a pridá sa NH_4OH až do alkalickéj reakcie). Roztok sa premieša, nechá sa 30—40 minút stáť, načo sa filtruje. K filtrátu sa pridá 25 ml N-HCl a 10 ml 10 % roztoku octanu bárnateho. Usadenina síranu bárnateho sa odfiltruje, k filtrátu sa prileje 40 ml 10 % octanu bárnateho a lúh do slaboruzového sfarbenia fenolftaleínu. Za stáleho miešania sa pridávajú 2/3 objemu etanolu. Takto získaná zrazenina čistej bárnatej soli F-1,6-dP sa premýva etanolom a suší sa vo vákuu nad chloridom vápenatým. Výťažok je 1,3 g čistej bárnatej soli F-1,6-dP. Aj surovú bárnatú soľ F-1,6-dP sme čistili spôsobom, ktorý je založený na využití vlastností kyslých solí F-1,6-dP [9].

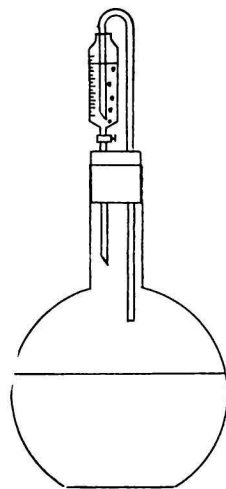
Výťažky dost kolíšu, keďže F-1,6-dP je veľmi nestála zlúčenina. Z 342 g sacharózy sme získali 93 g surovej bárnatej soli a po vyčistení 24 g bárnatej soli F-1,6-dP. Čistotu prípravku sme kontrolovali najmä chromatograficky [10], aby sme sa presvedčili, či nie je prítomný iný FEC alebo anorganický fosfát. Podľa obsahu fosforu metódou Meškovovej a Severina [2] a podľa obsahu fruktózy [5] sme zistili, že preparát je 96 %.

Prevedenie na sodnú soľ

Obsah bárya sme stanovili vážkove, fosfor kolorimetricky a vlhkosť sušením nad fosforpentoxidom pri 40 °C. Presný návažok sme rozmiešali v desaťnásobnom množstve vody a s ekvivalentným množstvom Na_2SO_4 . Suspenziu sme 24 hodín trepali pri 0 °C. Potom sme zrazeninu oddelili. Po pridaní dvojnásobného množstva etanolu (etylalkoholu) k filtrátu sa vyvrážali vločky sodnej soli, ktoré sme oddelili a vysušili.

Príprava Coriho esteru [5, 6, 11, 12, 13, 14]

Najprv sa zo zemiakov pripraví fosforyláza: 1800 g zemiakov sa umyje, očistí, pokrája a na mäsovom mlynčeku z nehrdzavejúcej ocele sa pomelie. Štáva sa vylisuje cez plátno. Potom sa 76 g škrobu rozmieša vo vode, pomaly sa vleje do 4 litrov vriacej vody a energicky sa mieša. Roztok sa 20 minút udržiava pri 100 °C, aby sa získal homogénny maz. Po vychladnutí mazu pri teplote miestnosti sa pridá zmes 850 g pripravenej fosforylázy, 2125 ml 0.25 M fosforečnanového tlmivého roztoku o pH 6,8 (KH_2PO_4 + K_2HPO_4), 10—15 ml toluénu a doplní sa vodou do 8500 ml. Zmes sa pri 30 °C vloží do termostatu na takú dlhú dobu, pokiaľ anorganický fosforečnan neprestane ubúdať [1]. Potom sa enzým inaktivuje zahriatím na 100 °C a po vychladnutí sa nadbytok anorganického fosforečnanu vyvráža pridaním octanu horečnateho a nepatrného nadbytku čpavku. Zrazenina sa odstredí a filtrát sa zahustí vymrazením vody alebo odparením vo vákuu. Ak sa zahusťuje vymrazovaním, rozleje sa do cylindrických nádob o obsahu 250 ml a dá sa do chladničky pri —10 až —20 °C, pokiaľ sa nevymrazia $\frac{3}{4}$ objemu tekutiny. Tekutina sa zleje, pridá sa do nej 85 g octanu bárnateho a 7 litrov metanolu. Vzniknutá bárnatá soľ sa nechá usadzovať 12—15 hodín. Potom sa oddelí odstrednením.



Obr. 1.

Prevedenie na draselnú soľ

Bárnatá soľ sa rozpustí v 1000 ml vody a pH sa kyselinou sírovou upraví na 1,8. BaSO₄ sa odstredí, zrazenina sa trikrát rozotrie a extrahuje 150 ml vody, načo sa pripojí k centrifugátu. Tekutina obsahujúca ester sa 5 N-KOH upraví na pH 8,3 a pridá sa 1,2 objemu etanolu. Vylúči sa surová draselná soľ esteru, ktorá sa nechá 24 hodín usadzovať. Potom sa oddelí odstredením, rozpustí sa v 1000 ml vody, pH sa kyselinou octovou upraví na 5,5 a pridá sa 200 mg sladovej amylázy, ktorá má dextransové znečisteniny vyzrážané alkoholom odstrániť prevedením na maltózu rozpustnú v alkohole. Zmes s amylázou sa nechá 2 hodiny stáť. Nato sa pridá také množstvo TCHO, aby výsledná koncentrácia bola 5 % a 1,5 objemu etanolu. Zrazenina sa odfiltruje, pH vo filtráte sa 5 N-KOH upraví na 8,3 a nechá sa 24 hodín stáť pri 0 °C. Vzniknutá draselná soľ sa odstredí a vysuší vo vákuovom exsíkátore nad chloridom vápenatým.

Čistenie draselnej soli

Draselná soľ sa pri 50 °C rozpustí v 1000 ml vody, rozmieša sa s 3 g aktívneho uhlia a filtruje sa. Potom sa k filtrátu pridá 1000 ml acetónu. Draselná soľ sa nechá vykryštalovať, a to najprv 24 hodín pri teplote miestnosti, potom 2 dni pri teplote 0 °C. Znovu sa pridá 500 ml acetónu a kryštalizácia sa predĺži ešte na tri dni pri 0 °C. Zrazenina sa odstredí a vysuší vo vákuu nad chloridom vápenatým. Výťažok je asi 3 g čistej draselnej soli G-1-P.

Zo 76 g škrobu sme získali 3 g draselnej soli G-1-P, ktorá mala čistotu 97 % podľa obsahu fosforu.

Súhrn

Opisujú sa metódy, pomocou ktorých sa pripravili fosforečné estery cukrov F-1,6-dP a G-1-P. Metódy uvedené v literatúre sa upravili a prispôbili tak, aby výsledky boli uspokojivé, najmä čo do množstva a čistoty prípravkov.

ИЗУЧЕНИЕ ХАРДЕН—ЮНГОВОГО ЭФФЕКТА (II)
 ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ИЗОЛЯЦИЯ ФОСФОРИЛОВАНЫХ ЭФИРОВ
 САХАРОВ (FEC)

А. ГЕБАУЕРОВА, К. ТОМАШЕК

Отделение глицидов и биохимии Химического института Словацкой Академии Наук
 в Bratislave

Кафедра технической микробиологии и биохимии Химического факультета
 Словацкой Высшей технической школы в Bratislave

Выводы

В этой работе дается описание методов, при помощи которых были приготовлены фосфорные эфиры сахаров F-1,6-dP и G-1-P. Методы, которые приводятся в литературе, были обработаны и приспособлены так, чтобы результаты были удовлетворяющие главное, что касается количества и чистоты препаратов.

Поступило в редакцию 18. 7. 1956 г.

STUDIUM DES HARDEN—YOUNG-EFFEKTS (II)
HERSTELLUNG UND ISOLIERUNG PHOSPHORYLIERTER ESTER
DES ZUCKERS (FEC)

A. GEBAUEROVÁ, K. TOMÁŠEK

Abteilung Glycide und Biochemie des Chemischen Instituts an der Slowakischen
Akademie der Wissenschaften in Bratislava

Lehrstuhl für technische Mikrobiologie und Biochemie der Chemischen Fakultät
der Slowakischen Technischen Hochschule in Bratislava

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit beschreiben die Autoren die Methoden, mittels welcher sie die Phosphorsäureester des Zuckers F-1,6-dP und G-1-P hergestellt haben. Die in der Literatur angegebenen Methoden wurden modifiziert und so angepasst, damit die erhaltenen Ergebnisse befriedigten, besonders hinsichtlich der Menge und Reinheit der Präparate.

In die Redaktion eingelangt den 18. 7. 1956

LITERATÚRA

1. Kocková-Kratochvílová A., Gebauerová A., Hrdinová M., Čs. Mikrobiol. 1, 6, 247 (1956). — 2. Meškova N. P., Severin S., *Praktikum po biochímii životnych*, Moskva 1950. — 3. Baman O., Myrbäck K., *Methoden der Fermentforschung*, Leipzig 1942. — 4. Nejfach A. S., Grečiškina V. J., *Biochimija* 16, 444 (1951). — 5. Umbreit W. W., Burris R. R., Stauer W. A., *Manometrické metody izučeníja tlanevogo obmena*, Moskva 1951. — 6. *Závěrečná zpráva VÚFB*, Praha 1952. — 7. Bernhauer K., *Gärungschemisches Praktikum*, Berlin 1932. — 8. Stepanenka N. B., Silajeva J. A., *Biochimija* 14, 544 (1949). — 9. Tomášek K., *Diplomová práca*, Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Bratislava 1956. — 10. Tomášek K., *Papierová chromatografia fosforečných esterov cukrov*. (Pokračovanie práce [9], v tlači.)

11. Hawk P. B., Oser B. L., Summerson W. A., *Practical physiological Chemistry* 12, London, 289. — 12. Mc Cready R. M., Hassid W. Z., *J. am. chem. Soc.* 66, 560 (1944). — 13. Hanes C. S., *Proc. royal Soc. B* 129, 174 (1940). — 14. Kiessling W., *Biochem. Z.* 298, 42 (1938).

Došlo do redakcie 18. 7. 1956