

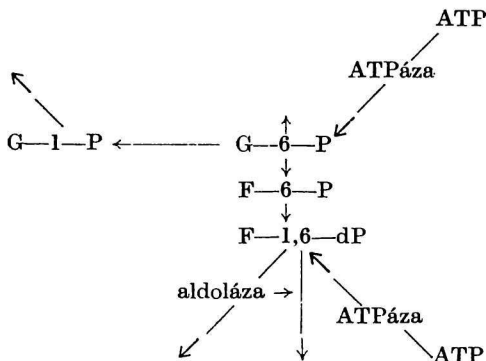
ŠTÚDIUM HARDEN—YOUNGOVHO EFEKTU (IV) SLEDOVANIE HARDEN—YOUNGOVHO EFEKTU PAPIEROVOU CHROMATOGRAFIU

A. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, K. TOMÁŠEK, A. GEBAUEROVÁ

Oddelenie glycidov a biochémie Chemického ústavu Slovenskej akadémie vied
v Bratislave

Vplyvom niektorých látok a vonkajších podmienok dochádza pri kvasničných enzymatických prípravkoch k blokovaniu kvasného procesu. Inhibíciou sa v reagujúcej zmesi hromadia fosforylované estery cukrov (FEC), najmä fruktozo-1,6-difosfát (F-1,6-dP), tzv. Harden—Youngov ester. Tento úkaz sa nazýva Harden—Youngov efekt. Meyerhof [1] vysvetlil Harden—Youngov efekt inhibíciou enzýmu apyrázy, ktorá katalyzuje odštiepovanie zvyškov kyseliny fosforečnej od ATP.

Schéma tvorby FEC a zásahu ATPázy:



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

V predchádzajúcej práci [2] sme Harden—Youngov efekt sledovali kvantitatívne, podľa množstva nahromadeného hydrolyzovateľného fosfátu v zmesi. Pretože pri Harden—Youngovom efekte dochádza najmä k nahromadeniu F-1,6-dP, zdalo by sa pravdepodobnejšie, že ide o inhibíciu aldolázy katalyzujúcej štiepenie F-1,6-dP na dve triózy. Pokúsili sme sa preto papierovou chromatografiou [3] sledovať tvorenie FEC. Pritom sme sa podrobnejšie venovali aj účinku alylizotiokyanatanu ako v prvej práci [2]. Tento totiž ľahko blokuje celý fosforylačný proces, tvorenie FEC, avšak v nízkej koncentrácii môže vyvolať Harden—Youngov efekt.

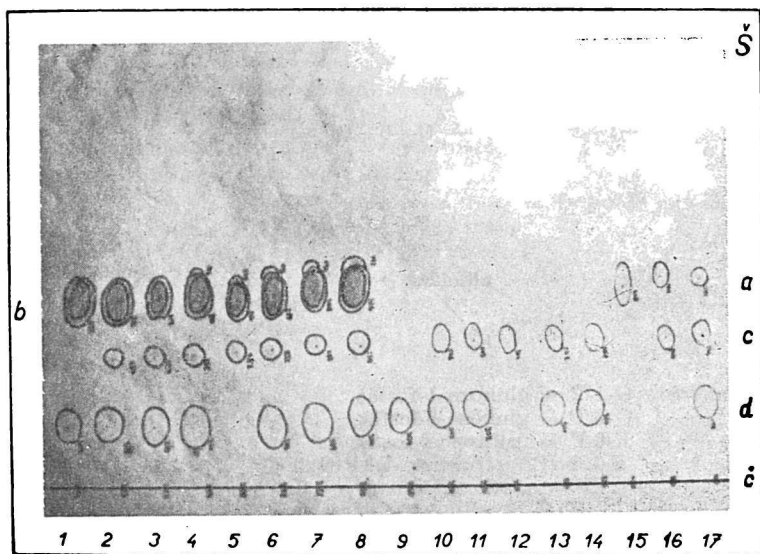
Experimentálna časť

Metodika

Fosforyláciu, ako sme už opísali v prvej časti tejto práce, sme sledovali odoberaním vzoriek v pravidelných intervaloch [2] a stanovením anorganického fosforu kolorimetricky. Paralelne sme odoberali vzorky po 25 ml, deproteinizovali TCHO a filtrovali. Niekedy sa vyzrážal aj anorganický fosforečnan, najmä v prvých vzorkách, kde bol v nadbytku. Vyzrážanie sme uskutočňovali octanom horečnatým s malým nadbytkom amoniaku. Takto upravené filtráty sme potom nanášali na chromatografický papier a spracovali podľa metódy [3]. Tak sme sledovali fosforyláciu za použitia 6% oktylalkoholu, 6% toluénu a 0,01 % alylizotiokyanatanu.

Výsledky pokusov

Výsledky tohto sledovania názorne ukazujú chromatogramy 1 a 2. Pri všetkých vzorkách bola prítomná bližšie neidentifikovaná zlúčenina, ak sa

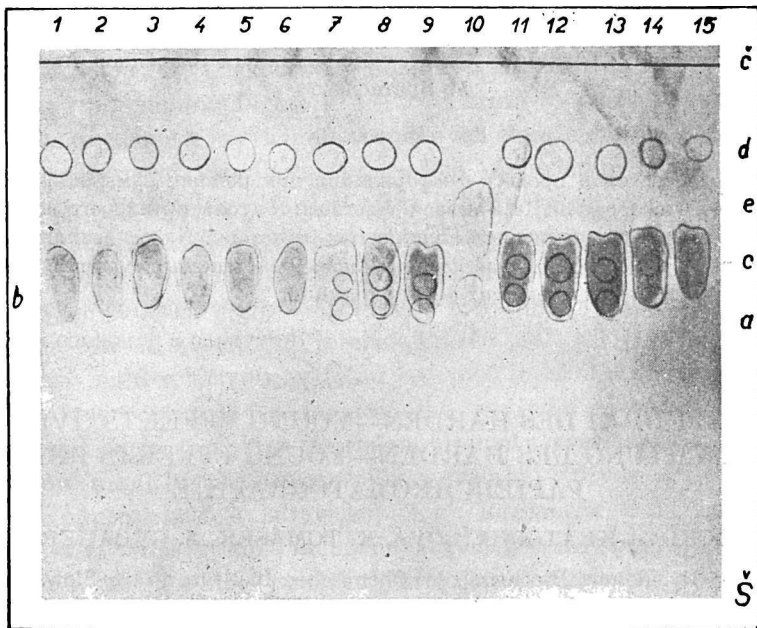


Chromatogram 1. Fosforylácia oktylalkoholom.

Rozpúšťadlo S_{11} , papier Whatman 1, premývaný $n\text{-HCl}$, nasycovaný 12 hod., doba vyvíjania 7 hod. Vzorky: 9—14, 16 a 17 majú vyzrážaný anorganický fosforečnan, 1 a 9 boli odobrané na začiatku pokusu, 2 a 10 po 1 hod., 3 a 11 po 2. hod., 4 a 12 po 3 hod., 5 a 13 po 4 hod., 6 a 14 po 5 hod., 7 a 16 po 6 hod., 8 a 17 po 7 hod., 15 čistý F-1,6-dP; Š = štart, a = F-1,6-dP, b = ortofosfát, c = F-6-P, d = presne neidentifikovaná zlúčenina, pravdepodobne fosforylovaná trióza, č = čelo chromatogramu.

použil oktylalkohol v koncentrácii 6%. Na chromatograme je označená písmenom d. Vo vzorkách, kde chýba, je to zapríčinené len malou koncentráciou nanášanej vzorky. F-6-P sa začína tvoriť už skôr ako za jednu hodinu

fosforylácie. Za tri hodiny sa prejaví už F-1,6-dP v dokonalej miere. Pri zrážaní anorganického fosforečnanu sa môže vyzrážať aj niečo F-1,6-dP, čím jeho koncentrácia poklesne pod hranicu dokázateľnosti v prvých vzorkách alebo vo vzorkách nanášaných v nízkej koncentrácii. Škvrna označená ako *d* by mohla nasvedčovať na fosforylovanú triózu. To by ukazovalo, že oktylalkohol vo vyššej koncentrácii Harden—Youngov efekt nevyvoláva, ak sa použijú tekuté kvasnice, ale že dochádza k celkovej inhibícii riadne prebiehajúceho fosforylačného procesu. Avšak táto škvrna sa objavuje i pri inhibícii toluénom



Chromatogram 2. Fosforylácia toluénom a malou i veľkou dávkou alylizotiokyanatanu. Rozpúšťadlo S_{11} , papier Whatman 1, premývaný $N-HCl$, nasycovaný 10 hod., doba vyvíjania 7 hod. Vzorok: 1—5 fosforylácia s veľkou dávkou alylizotiokyanatanu 0,2 %, 6—9 s 0,01 % alylizotiokyanatanu, 10 čistý F-1,6-dP a G-1-P, 11—15 fosforylácia toluénom. Prvé dve vzorky sú počiatočná zmes, 2, 7 a 14 odobrané po 1 hod., 3, 8 a 13 po 2 hod., 4, 9 a 12 po 3 hod., 5 a 11 po 4 hod., č = čelo chromatogramu, Š = štart, a = F-1,6-dP, b = anorganický fosforečnan, c = F-6-P, d = neidentifikovaná škvrna, asi trióza, e = G-1-P.

a pri menšej koncentrácii alylizotiokyanatanu, ako aj pri veľkej dávke tejto látky, avšak nie v počiatočnej zmesi. Z toho možno usudzovať, že hromadenie FEC charakterizujúce Harden—Youngov efekt je spôsobené len zdanlivo inhibičným zásahom do jedného enzýmu (ATPáza), ako sa domnieval Meyerhof [1].

Súhrn

Sledoval sa fosforylačný proces papierovou chromatografiou. Harden—Youngov efekt sa vyvolal toluénom, oktylalkoholom a malou i veľkou dávkou allylizotiokyanatanu. Podľa výsledkov pokusu sa domnievame, že ide o väčší zásah do rozličných enzýmov fosforylačného procesu.

ИЗУЧЕНИЕ ХАРДЕН—ЮНГОВОГО ЭФФЕКТА (IV)
СЛЕДОВАНИЕ ХАРДЕН—ЮНГОВОГО ЭФФЕКТА ПРИ ПОМОЩИ
БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

A. KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, K. TOMÁŠEK, A. GEBAUEROVÁ

Отделение глицидов и биохимии Химического института Словацкой Академии Наук
в Братиславе

Выводы

В работе был следован процесс фосфорилиции при помощи бумажной хроматографии. Харден—Юнгов эффект был вызван действием толуола, октилового спирта и порций малых и больших количеств аллилизотиокцианатана. На основании результатов можно полагать, что в этом случае идет о сильное действие вышеупомянутых веществ на различные энзимы при процессах фосфорилиции.

Поступило в редакцию 18. 7. 1956 г.

STUDIUM DES HARDEN—YOUNG-EFFEKTS (IV)
BEOBACHTUNG DES HARDEN—YOUNG-EFFEKTS BEI DER
PAPIERCHROMATOGRAPHIE

A. KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, K. TOMÁŠEK, A. GEBAUEROVÁ

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

Zusammenfassung

Es wurde der Phosphorylierungsprozess mittels der Papierchromatographie verfolgt. Die Hervorrufung des Harden—Young-Effekts wurde mittels Toluol, Octylalkohol und einer kleinen und grossen Dosis von Allylisothiocyansäureester durchgeführt. Auf Grund der Versuchsergebnisse vermuten die Autoren, dass es sich hierbei um einen grösseren Eingriff in die verschiedenen Enzyme durch diesen Phosphorylierungsprozess handelt.

In die Redaktion eingelangt den 18. 7. 1956

LITERATÚRA

1. Meyerhof O., *J. biol. Chem.* 180, 575 (1949). — 2. Kocková-Kratochvílová A., Gebauerová A., Hrdinová M., *Čs. Mikrobiol.* 1, 247 (1956). — 3. Tomášek K., *Chem. Zvesti* 11, 615 (1957).

Došlo do redakcie 18. 7. 1956