

ŠTÚDIUM PREPARÁTOV INVERTÁZY POMOCOU ELEKTROFORÉZY NA PAPIERI

M. TIBENSKÁ, E. LIŠHÁKOVÁ, Š. BARICA

Ústredný výskumný ústav potravinárskeho priemyslu, pobočka v Bratislave

Prípravou, čistením a vlastnosťami invertázy sa zoberali mnohí autori [1]. Z novších prác, ktoré sa zapodieávajú jej čistením, treba spomenúť obsiahle práce E. D. Fischera a jeho spolupracovníkov [2, 3], týkajúce sa najmä odstránenia bielkovín a inaktívneho polysacharidu. Opakovanou adsorpciou na $\text{Al}(\text{OH})_3$ získali síce veľmi čistú vysokoaktívnu invertázu, avšak na úkor jej stability. Elektroforézou sledovali jej čistotu. Odstránený polysacharid sa po kyslej hydrolyze chromatograficky identifikoval ako polymanan, v ktorom manóza je viazaná α -1,3 väzbou. K rovnakému výsledku dospel aj J. A. Ciffonelli so spolupracovníkmi [4]. V inej svojej práci [5] rozoberá závislosť aktivity invertázy od prítomnosti aminoskupín.

C. Neuberg [1] cituje Willstätterove práce o obsahu stopových množstiev fosforu v invertázových preparátoch. Nerozvádza však, či fosfor považuje za súčasť enzýmu alebo len ako sprievodný balast.

Pri riešení problému prípravy koncentráту invertázy zvolili sme si okrem merania aktivity preparátu a stanovenia celkového dusíka aj metódu elektroforézy na papieri. Touto metódou sme porovnávali povahu dusíkatých látok a pohyb invertázy, resp. jej aktívnych centier v elektrickom poli. Ako štandard sme používali obchodný preparát fy Bayer. Dosiahnuté výsledky majú slúžiť ako podklad pre získanie čistého enzymatického koncentrátu, zbaveného balastných dusíkatých látok pomocou preparatívnej elektroforézy.

Experimentálna časť

Elektroforézu na papieri sme robili podľa O. Mikeša [6]. Pre prácu sme použili pyridín—octový tlmivý roztok o hodnote pH 4,5 (4 ml ľadovej kyseliny octovej a 3 ml pyridínu, doplnené do 1000 ml) a papier Whatman 3. Porovnávali sme preparáty invertázy získané v laboratóriu s preparátom fy Bayer. Na papier sme nanášali množstvá zodpovedajúce rovnakému množstvu sacharózových jednotiek. Elektroforetické oddeľovanie trvalo 80 minút pri potenciálovom spáde 24 V/cm a 22—40 mA. Po detekcii elektroforegramu ninhydrínom sme na základe získaných indikácií rozstrihali nevyfarbené časti papiera, číslami sme označovali ninhydrín-pozitívne látky a indexom nevyfarbené medzióny. Podľa označenia sme jednotlivé pásiky eluovali do rovnakých objemov dvoj-percentného roztoku sacharózy, upraveného na pH 4,5 fosforečnanovým tlmivým roztokom. Malé množstvá nanesej aktívnej látky nás nútili predĺžiť dobu inverzie na 12 hodín.

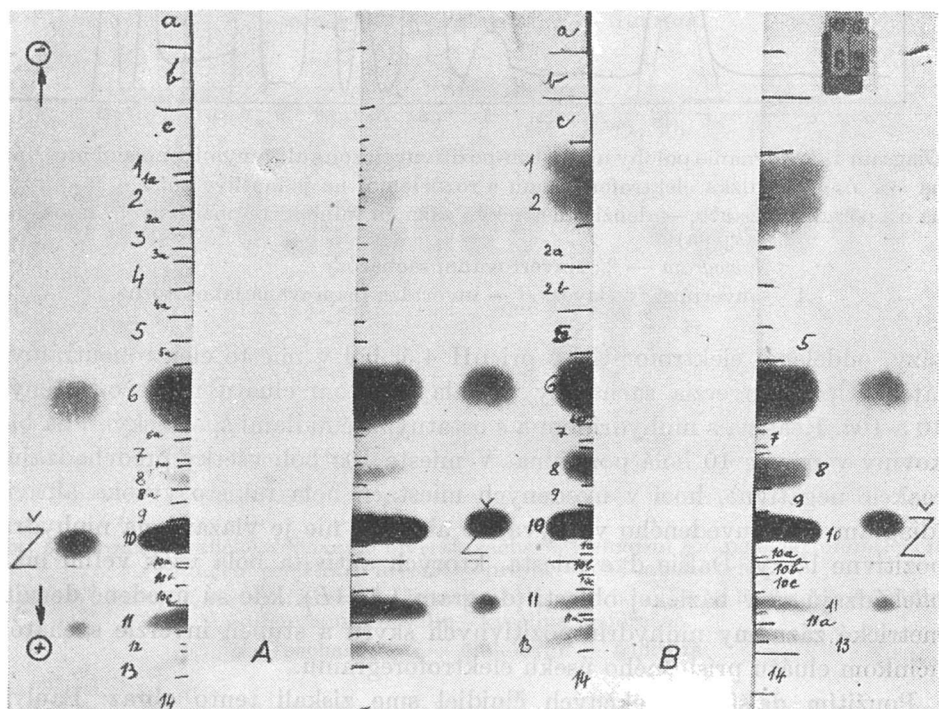
Účinok invertázy v eluátoch sme sledovali chromatograficky. Chromatogramy sme vyvíjali sústavou butanol—kyselina octová—voda (4 : 1 : 1). Cukry sme odkryli roztokom difenylamín—anilín—kyselina fosforečná v acetóne [7]. Farebnú intenzitu sme zaznamenávali denzitometricky v odrazenom svetle a kvantitatívne vyhodnotili meraním plôch.

Na detekciu ostatných zložiek preparátov invertázy sme použili brómfenolovú modrú, amidočern 10 B, Paulyho činidlo, floroglucín a Faiglovo činidlo [7].

Elektroforézou na papieri sme porovnávali sériu preparátov pripravených v laboratórnom meradle rozličnými postupmi [9]. Opísaný preparát invertázy vykazoval zo všetkých preparátov, pripravených laboratórnym spôsobom, najvyššiu aktivitu.

Výsledky a diskusia

Odkrytím elektroforegramu ninhydrínu sa ukázalo, že rozloženie ninhydrín-pozitívnych zložiek v sledovanom preparáte je v podstate zhodné s preparátom fy Bayer, ktorý sme používali ako štandard (obr. 1, diagram 1). Rozdiel sa prejavil v oblasti označenej číslami 1, 2, 3, 4 pri Bayerovom preparáte (obr. 1A) v porovnaní s preparátom laboratórne pripraveným (obr. 1B). Pri preparáte fy Bayer sa na uvádzaných miestach nachádzajú štyri slabé ninhydrín-pozitívne zóny, kým pri laboratórne pripravenom preparáte sa v tej istej výške oddelili len dve s ninhydrínom silne reagujúce zložky (obr. 1B, zóny 1, 2). Inverznú schopnosť jednotlivých zón a medzizón sme po ich elúcii stanovili chromatograficky (obr. 2 a 3). Najväčší podiel aktívnej zložky inver-



Obr. 1. Elektroforegram invertázy.

A — preparát invertázy fy Bayer, B — preparát invertázy pripravený laboratórne,
Z — hydrolyzát želatíny; detekcia ninhydrínom, papier Whatman 3.

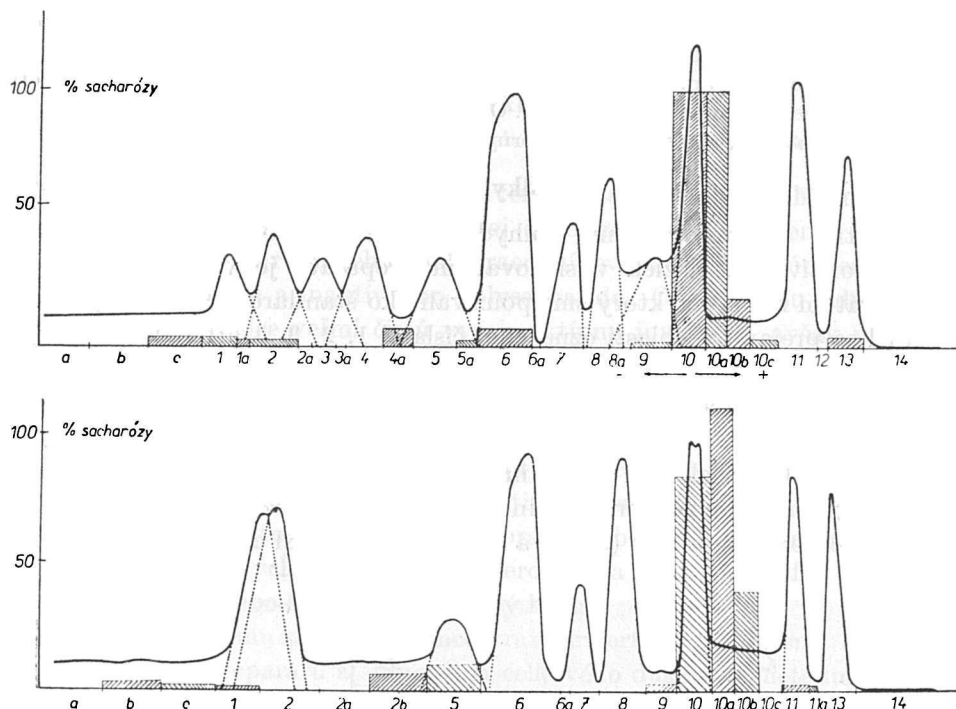
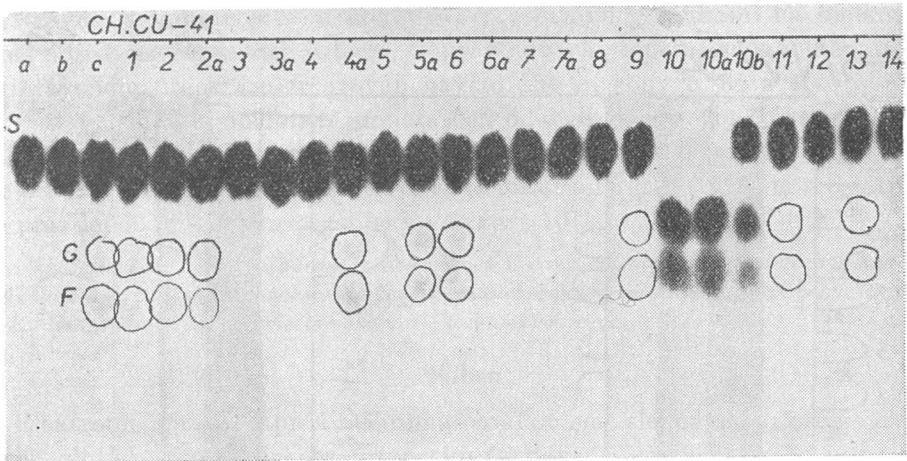


Diagram 1. Porovnanie polohy ninhydrín-pozitívnych zón s aktívnymi centrami inverzázy na osi úsečiek: dĺžka elektroforegramu s rozdelením na jednotlivé zóny na osi poradnic: *krivka* — denzitometrický záznam ninhydrín-pozitívnych látok (absorpcia)
histogram — % zinvertovanej sacharózy
A — inverzáza fy Bayer, *B* — inverzáza pripravená laboratórne.

tázy, oddelenej elektroforeticky pri pH 4,5, bol v mieste elektroneutrálnych látok. Úplná inverzia sacharózy nastala účinkom eluátu miest označených 10 a 10a. Reakcia s ninhydrínom a s ostatnými činidlami špecifickými na bielkoviny v mieste 10 bola pozitívna. V mieste 10a boli všetky predchádzajúce reakcie negatívne, hoci v uvedených miestach bola takisto vysoká aktivita (diagram 1). Z uvedeného vyplýva, že aktivita nie je viazaná na ninhydrín-pozitívne látky. Ďalšie dve miesta, ktorých aktivita bola však veľmi malá, nachádzajú sa v bázičkej oblasti (diagram 1A, 1B), kde sú uvedené denzitometrické záznamy ninhydrín-pozitívnych škvrín a stupeň inverzie sacharózy účinkom eluátu príslušného úseku elektroforegramu.

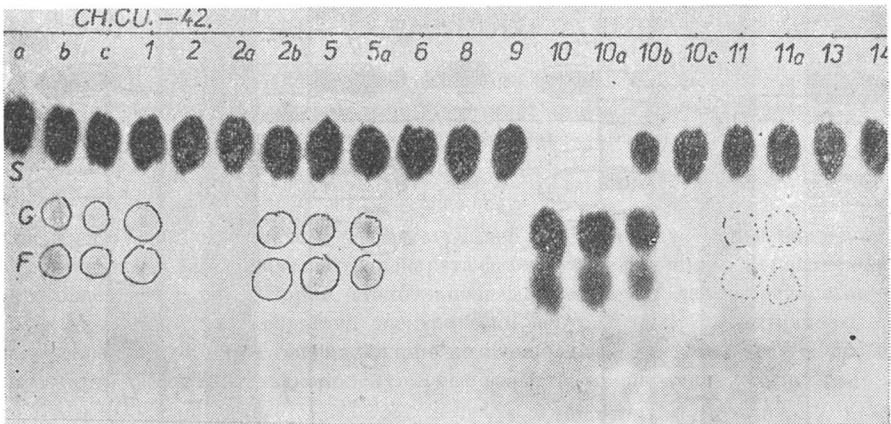
Použitím ďalších detekčných činidiel sme získali tento obraz: Paulyho činidlo vyvoláva v mieste ninhydrín-pozitívnej škvrny č. 6 oranžové sfarbenie. Na tom istom mieste vznikla slabo ružová reakcia s α -nitrozo- β -naftolom, ktorý takisto reaguje s tyrozínovými peptidmi. Toyosaku Minagawa [8]



Obr. 2. Chromatografické sledovanie inverzie sacharózy eluátmi zón po elektroforetickom rozdelení preparátu invertázy fy Bayer.

Papier Whatman 1, sústava: butanol—kyselina octová—voda (4 : 1 : 1), detekčné činidlo: difenylamín—anilín—kyselina fosforečná.

S — sacharóza, *G* — glukóza, *F* — fruktóza.

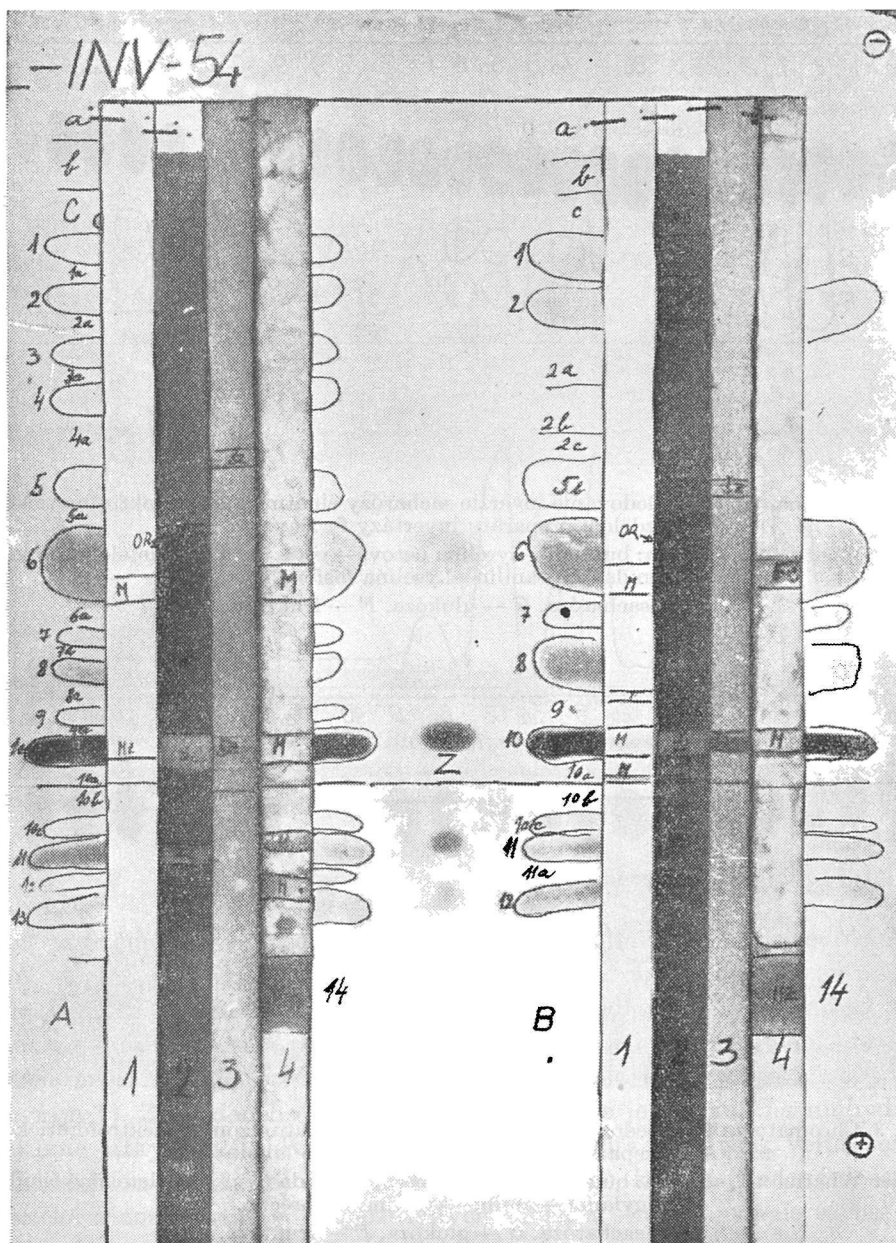


Obr. 3. Chromatografické sledovanie inverzie sacharózy eluátmi zón po elektroforetickom rozdelení preparátu invertázy pripraveného laboratórne.

Papier Whatman 1, sústava: butanol—kyselina octová—voda (4 : 1 : 1), detekčné činidlo: difenylamín—anilín—kyselina fosforečná.

S — sacharóza, *G* — glukóza, *F* — fruktóza.

pokladá tyrozín za súčasť aktívnej zložky molekuly invertázy. Pri laboratórne pripravenom enzýme je oblasť č. 6 enzymaticky inaktívna a v mieste č. 10, kde je skoncentrovaný hlavný podiel aktívnej zložky, tyrozínová reakcia s uvedenými činidlami nenastala (obr. 4).



Obr. 4. Elektroforegram detegovaný rozličnými činidlami.

A — invertáza fy Bayer — detekcia ninhydrínom, *B* — invertáza pripravená laboratórne — detekcia ninhydrínom, *Z* — hydrolát želatíny — detekcia ninhydrínom.

1 — pás detegovaný brómfenolovou modrou, *2* — detekcia Paulyho činidlom, *3* — detekcia difenylamín—anilín—kyselina fosforečná, *4* — detekcia Faiglovým činidlom.

Reakcia s brómfenolovou modrou a s ostatnými činidlami na bielkoviny bola pozitívna v miestach č. 6 a č. 10 pri obidvoch preparátoch a v laboratórne pripravenom preparáte zreagovali navyše ešte aj zóny č. 8a a 10b (obr. 4).

Fosfáty sme pri obidvoch preparátoch odkryli Faiglovým činidlom v miestach č. 6, 10 a 14. V preparáte fy Bayer bola na fosfor pozitívna aj zóna č. 11. Je pravdepodobné, že v miestach č. 14 je fosfát anorganický, kým v ostatných je pravdepodobne fosfor organicky viazaný [10].

Ďakujeme inž. F. Rendošovi, pracovníkovi Ústavu chémie dreva, celulózy a umelých vlákien SAV, za láskavé umožnenie vyhodnotenia chromatogramov na registračnom fotometri a K. Smetanovi za svedomitú vykonanie technických prác.

Súhrn

Elektroforézou na papieri a chromatografiou sme sledovali rozloženie aktívnych zložiek enzymatického prípravku fy Bayer a enzymatického prípravku laboratórne získaného. Najväčší podiel aktívnej zložky preparátov je v danom tlmivom roztoku elektricky neutrálny. Táto aktivita nie je viazaná na prítomnosť ninhydrín-pozitívnych látok. Uvedený poznatok nám dovoľuje odstrániť balastné nízkomolekulové látky preparatívnu elektroforézou.

ИЗУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ИНВЕРТАЗЫ ПРИ ПОМОЩИ БУМАЖНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

M. ТИБЕНСКА, Е. ЛИШАКОВА, Ш. БАРИЦА

Центральный исследовательский институт пищевой промышленности,
отдел в Братиславе

Выводы

Электрофорезом на бумаге и хроматографией мы следовали разложение активных составных частей энзиматического препарата фирмы Баер и энзиматического препарата, приготовленного в лаборатории. Наибольшая часть активной части препаратов в данном буферном растворе является электрически нейтральной. Эта активность не является связанной на присутствие нингидрин-позитивных веществ. Эти сведения позволяют нам удалить балластные низкомолекулярные вещества препаративным электрофорезом.

Поступило в редакцию 7. I. 1960 г.

STUDIUM VON INVERTASE-PRÄPARATEN MITTELS PAPIERELEKTROPHORESE

M. TIBENSKÁ, E. LIŠHÁKOVÁ, Š. BARICA

Zentrales Forschungsinstitut für die Nahrungsmittelindustrie, Zweigstelle in Bratislava

Zusammenfassung

Durch Papierelektrophorese und Chromatographie untersuchten die Autoren die Trennung der aktiven Bestandteile eines enzymatischen Präparats der Fa. Bayer und

eines laboratoriumsmässig erhaltenen enzymatischen Präparats. Der grösste Anteil des aktiven Bestandteils der Präparate ist in der gegebenen Pufferlösung elektroneutral. Diese Aktivität ist nicht an die Anwesenheit ninhydrin-positiver Stoffe gebunden. Diese Erkenntnis erlaubt die Beseitigung niedrigmolekularer Ballaststoffe durch präparative Elektrophorese.

In die Redaktion eingelangt den 7. 1. 1960

LITERATÚRA

1. Neuberg C., Roberts I. S., *Invertase*, New York 1946. — 2. Fischer E. D., Kohtès L., *Helv. Chim. Acta* 34, 1123—1128 (1951). — 3. Fischer E. D., Kohtès L., Felling J., *Helv. Chim. Acta* 34, 1132—1138 (1951). — 4. Ciffonelli J. A., *Dissert. Abstr.* 14, 457—458 (1954); *ref. J. Sci. Food Agric.* 5, 178*ii* (1954). — 5. Ciffonelli J. A., Smith F., *J. Am. Chem. Soc.* 77, 5682—5684 (1955); *ref. C. A.* 50, 4300*i* (1956). — 6. Mikeš O., *Chem. listy* 51, 138 (1957). — 7. Hais I., Macek K., *Papírová chromatografie*, Praha 1959. — 8. Toyosaku Minagawa, *Proc. Japan. Acad.* 22, 123—129 (1946). — 9. Barica Š. a spolupracovníci, nepublikované práce. — 10. Rexová L., nepublikované práce.

Do redakcie došlo 7. 1. 1960

Adresa autorov:

Inž. Marta Tibenská, inž. Erna Lišháková, inž. Štefan Barica, Bratislava, Miletičova 14/b, Ústredný výskumný ústav potravinárskeho priemyslu.