

Zakład Biochemii. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr hab. Marian Szymona

Marian SZYMONA, Olga SZYMONA,  
Tomasz KOWALCZYK

### Enzymatyczna synteza i wyodrębnianie D-glukozy-6-fosforanu

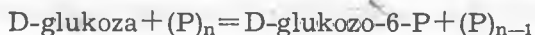
Энзиматический синтез и изолирование D-глюкозо-6-фосфата

Enzymatic Synthesis and Isolation of D-glucose-6-phosphate

Glukozy-6-fosforan (G-6-P) jest jednym z głównych metabolitów przemiany węglowodanowej. Kluczowa pozycja tego estru wynika z faktu, że stanowi on substrat dla co najmniej dla czterech enzymów, a mianowicie G-6-P fosfatazy, G-6-P dehydrogenazy, fosfoglucoizomerazy i fosfoglukomutazy. Należy podkreślić, że wszystkie enzymy mają znaczenie dla diagnostyki lekarskiej. Z tego względu glukozy-6-fosforan znajduje zastosowanie jako odczynnik w laboratoriach analitycznych, a ponadto służy do wytwarzania ekwiwalentów redukcyjnych (NADPH), niezbędnych przy badaniu metabolizmu różnych leków i trucizn.

Glukozy-6-fosforan jest produkowany przez firmy zagraniczne drogą wieloetapowej syntezy i występuje w handlu pod postacią soli barowych, sodowych lub potasowych. W małych ilościach można go otrzymać na drodze enzymatycznej, stosując jako substraty: D-glukozy+ATP, glukozy-1-P lub fruktozy-6-P. W literaturze opisano również metodę nieswoistego fosforylowania glukozy bezwodnym kwasem polifosforowym (2).

Celem niniejszej pracy było otrzymanie glukozy-6-P na skalę preparatywną przy użyciu nieorganicznych polifosforanów ( $P_n$ ) i swoistego enzymu — polifosforanowej glukokinazy (EC 2.7.1.63). Enzym ten katalizuje fosforylację glukozy według równania:



Wstępne wyniki przedstawiono na VIII Zjeździe Naukowym A.E. w Wrocławiu (6).

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Odczynniki specjalne. D-glukoza bezwodna cz.d.a. — POCH (Gliwice). Polifosforan potasu ( $\bar{n}=250$ ) — BDH (Anglia); preparat handlowy przemyto wodą od niskocząsteczkowych zanieczyszczeń (głównie orto-P) i wysuszono. Dowex 50 WX 2 (mesh 200—400) — Serva (RFN). Żywicę przemyto 4-krotnie wodą, następnie ogrzewano z kwasem solnym na łaźni wrzącej przez  $2 \times 1$  godz. (50 g żywicy +  $2 \times 50$  ml 4 N HCl), po czym traktowano kolejno (na lejku Buchnera): wodą, ługiem sodowym (100 ml 2 N NaOH), wodą, kwasem solnym (100 ml 4 N HCl) i wodą — za każdym razem do odczynu obojętnego. Dehydrogenaza G-6-P — Sigma (USA); krystaliczny preparat z drożdży *Torula* dializowano wobec wody. NADP — Reanal (Węgry).

Polifosforanowa glukokinaza. Materiałem wyjściowym do preparacji enzymu był eluat z żelu fosforanowo-wapniowego, otrzymany według procedury opisanej poprzednio (5). Dalsze oczyszczanie obejmowało: 1) zagęszczenie roztworu przy pomocy siarczanu amonowego (75% nasycenia) z dodatkiem albuminy (0,5 mg/ml); 2) odsolenie na kolumnie wypełnionej przez Sephadex G-50 oraz 3) chromatografię jonowymienną. Do tego celu zastosowano DEAE-celulozę (5×3 cm) ekwilibrowaną 10 mM buforem Tris-HCl (pH 7,2), zawierającym 1 mM EDTA, 5 mM 2-merkaptoetanol i 100 mM glukozę. Białka eluowano liniowym gradientem stężenia NaCl (0—0,3 M,  $2 \times 250$  ml). Frakcje najbardziej aktywne zagęszczono przez wysolenie i po rozpuszczeniu osadu odsolono jak wyżej. Tym razem użyto buforu pozbawionego glukozy. Końcowy preparat nie wykazywał fosfoglucoizomerazy i zawierał w 1 ml 25 jednostek międzynarodowych aktywności glukokinazowej. Aktywność tę natychmiast stabilizowano, dodając  $MgCl_2$  i polifosforan w ilościach odpowiednio 5  $\mu$ moli i 20  $\mu$ moli P na 1 ml.

W alternatywnej metodzie posłużono się preparatem stanowiącym przedostatni etap oczyszczania (5). Pulę aktywnych frakcji wzbogacono w białko przez dodanie albuminy (1,5 mg/ml) i zagęszczono przez wysolenie siarczanem amonowym, po czym odsolono i stabilizowano jak w poprzedniej wersji.

Do dializy stosowano zwykły celofan handlowy po uprzednim przemyciu 5%  $NaHCO_3$  (30 min., 100°C), 10%  $CH_3COOH$  (<50°C) i wodą.

Wszystkie odczynniki sporządzano używając wody dejonizowanej.

Metody analityczne. Fosfor nieorganiczny (orto-P i  $P_{lab}$ ) oznaczano metodą Fiske-Subbarowa przed i po 10-minutowym gotowaniu w 1 N  $H_2SO_4$ , fosfor całkowity — po spaleniu próbki za pomocą 10 N  $H_2SO_4$  i  $H_2O_2$  (150—170°C, blok aluminiowy z termoregulacją). Glukoza-6-P oznaczano w spektrofotometrze firmy Zeiss (VSU-2G) na podstawie

przyrostu absorbancji w reakcji z dehydrogenazą G-6-P i NADP przy 340 nm (1). Fruktozo-6-P oznaczano metodą Roe'a z odczynnikiem rezorcynolowym (8).

#### SYNTEZA ESTRU GLUKOZO-6-FOSFOROWEGO

Syntezę G-6-P prowadzono w worku celofanowym, zawierającym na początku inkubacji 50 ml mieszaniny o następującym składzie: 20 mM glukozy, 5 mM  $MgCl_2$ , 200 mM NaCl, 1 g polifosforanu (175  $\mu$ moli P/ml), 5 ml 2% azydki sodu, 0,3 ml 2 N NaOH (do pH 8,6) oraz 60 jedn. m. aktywności glukokinazowej.

Celem utrzymania szybkości syntezy jak najdłużej na poziomie zbliżonym do początkowego, worek celofanowy z mieszaniną umieszczono w zlewce zawierającej 10-krotnie większą objętość roztworu glukozy,  $MgCl_2$  i NaCl w stężeniach jak wyżej. Dzięki temu niskocząsteczkowe produkty reakcji, tj. glukozo-6-P i niewielkie ilości trójpoli-P dyfundowały z worka na zewnątrz, podczas gdy enzym i długołańcuchowy polifosforan pozostawały w worku.

Ponieważ reakcji fosforylacyjnej towarzyszy uwalnianie protonów, optymalny dla enzymu zakres pH 8—9 starano się utrzymać przy użyciu 2 N NaOH. Ług dodawano co kilka godzin do płynu zewnętrznego, a czasem również do worka. Dyfuzję przyspieszano za pomocą mieszadeł: mechanicznego w worku i elektromagnetycznego w płynie zewnętrznym. W ciągu dnia zlewkę z układem syntetyzującym inkubowano w łaźni wodnej o temp.  $37 \pm 3^\circ C$ . Przebieg syntezy śledzono wykonując co pewien czas oznaczenia polifosforanu ( $P_{lab}$ ) w próbkach mieszaniny reakcyjnej, a także estru w próbkach płynu zewnętrznego. W miarę potrzeby dodawano polifosforan i glukozę (*in subst.*) do worka dializacyjnego. Reakcja ulegała zahamowaniu, gdy stężenie G-6-P w worku osiągało wartości bliskie 0,1 M. Dalsza kilkunastogodzinna dializa powodowała spadek tego stężenia w worku do ok. 0,07 M i odpowiedni wzrost w płynie zewnętrznym (do ok. 0,05 M). Aby synteza mogła przebiegać nadal z zadowalającą szybkością, należało płyn zewnętrzny zastąpić nowym. W toku niniejszej procedury wymianę taką przeprowadzono 3-krotnie, uzyskując łącznie 1,3 l dializatu. Jednocześnie objętość worka wzrosła do 175 ml. Ester resztkowy zawarty w tej objętości (10—15%) przedializowano do 1 l wody, następnie zagęszczono i połączono z pulą płynów zewnętrznych.

## WYODRĘBNIANIE GLUKOZO-6-P W POSTACI SOLI BAROWEJ

Pulę roztworów G-6-P doprowadzono do  $pH$  8,2 i dodano 2-krotny w stosunku do fosforu nadmiar baru (12,5 ml 25% octanu barowego na każde 100 ml). Po 30 min. niewielki osad oddzielono filtrując na lejku Buchnera przez podwójny sącze (Filtrak FN 2 Spezialpapierfabrik Niederschlag/Ergeb.) i klarowny płyn ( $pH$  7,7) zagęszczono ok. 2-krotnie przy użyciu wyparki próżniowej w temp.  $60^{\circ}C$ . W wyniku zagęszczenia nastąpiła krystalizacja znacznej części produktu, jednakże maksimum estru można było odzyskać dopiero pod wpływem etanolu (8). W tym celu zagęszczony i schłodzony do  $0^{\circ}C$  preparat potraktowano 2,5-krotną objętością zimnego 96% etanolu. Po upływie kilkunastu godzin biały osad zebrano przez wirowanie (4000 obr./min.) i przemyto kolejno: mieszaniną (v/v) etanol—woda (4:1,  $5 \times 150$  ml), 96% etanolem (150 ml), mieszaniną etanol—eter etylowy (1:1, 150 ml) i samym eterem (150 ml). Końcowy preparat suszono w ciągu doby w temperaturze pokojowej na powietrzu, potem do stałej wagi *in vacuo* nad bezwodnym  $CaCl_2$  lub  $P_2O_5$ .

## ANALIZA PRODUKTU

Oznaczenia enzymatyczne wykazały, że w puli dializatów nagromadziło się 175 mmoli G-6-P, czyli że ponad 85% użytego polifosforanu weszło w skład estru. Powyższa ilość odpowiada 39,1 g siedmiowodnej soli barowej G-6-P. Z ilości tej odzyskano 80%, tj. 32 g produktu zawierającego 47,9% kwasu G-6-P (lub 96% G-6-PBa  $\cdot 7 H_2O$ ).

W puli dializatów znajdowało się również 1,65 mmola fosforu nieorganicznego (2,2% w stosunku do fosforu G-6-P). W preparacie końcowym zawartość procentowa orto-P +  $P_{1ab}$  była 3-krotnie mniejsza i wynosiła — po przeliczeniu na sól barową z uwzględnieniem 80% wydajności — ok. 0,4% masy. Konkretnie znaleziono 0,18% ortofosforanu baru i 0,15% labilnego w kwasie oligofosforanu baru (głównie trójpoli-P).

Ponadto produkt końcowy zawierał, jako zanieczyszczenie, jedno- lub dwuwodną sól barową fruktozo-6-P w ilości ok. 2%. Resztę należy odnieść do wody niekrystalizacyjnej i, być może, śladów innych składników roztworu wyjściowego.

Skreślalność optyczna  $[\alpha]_D^{22}$  wynosiła  $+21,6$  ( $c=1$  w 1 N HCl).

## OTRZYMYWANIE SOLI SODOWEJ G-6-P

Glukoza-6-fosforan sodu otrzymywano w oparciu o pracę Seegera i Horeckera (2) z barowej soli G-6-P. W jednym z doświadczeń 5 g preparatu zmieszano z wodną zawiesiną Dowex 50 (forma wodorowa) i naniesiono na kolumnę tegoż kationitu ( $5,5 \times 4$  cm) celem cał-

kowitego związania baru. Powstały kwas glukozo-6-fosforowy eluowano wodą, stosując jako wskaźniki reakcję Fehlinga i pH. Z kolei kwaśny eluat zateżano na wyparce próżniowej w temp. 35—40°C do konsystencji gęstego syropu, który po rozpuszczeniu w ok. 100 ml 96% etanolu miareczkowano na łaźni lodowej bezwodnym metanolemowym roztworem NaOH (0,1 N) wobec błękitu bromotymolowego jako wskaźnika. Wytrącił się biały osad, który na noc pozostawiono w łaźni lodowej. Osad ten odwirowano w chłodni przy 4000 obr./min., a następnie przemyto kilkakrotnie metanolem (4×25 ml), mieszaniną etanol—eter (v/v) w proporcjach: 4:1 (25 ml), 1:1 (25 ml), 1:4 (25 ml) i samym eterem etylowym (2×25 ml). Preparat wysuszono w próżni do stałej wagi w obecności CaCl<sub>2</sub> lub P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Otrzymano 2,56 g substancji zawierającej 92,8% soli sodowej G-6-P, w tym 79,3% kwasu G-6-P (wartość teoretyczna 85,5%), ponadto 0,84% soli sodowej F-6-P i 0,52% fosforanów nieorganicznych.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

We wcześniejszych badaniach nad polifosforanową glukokinazą (3, 4) ustalono parametry warunkujące maksymalną szybkość reakcji, tj. pH 8—9, 0,2—0,3 M NaCl oraz odpowiednie stężenie substratów (co najmniej 2 mM glukoza, 1 mM polifosforan krótkołańcuchowy i 1 mM MgCl<sub>2</sub>). Stwierdzono również, że o ile szybkość maleje wraz z długością łańcucha polifosforanowego, to wydajność reakcji rośnie wg wzoru:

$$\frac{(\bar{n}-3) 100}{\bar{n}}$$

gdzie  $\bar{n}$  oznacza liczbę reszt P w cząsteczce poli-P. Tak np. w przypadku (P)<sub>10</sub> stopień wykorzystania fosforu wynosi 70%, podczas gdy sól Kurroła, będąca polimerem tysięcy reszt P, jest zużytkowana praktycznie w całości.

W niniejszej pracy uwzględniono powyższe parametry, starając się jednocześnie o stworzenie warunków zbliżonych do chemostatu. Dzięki wielkocząsteczkowemu charakterowi nie tylko enzymu, ale i donatora fosforu (200—300 reszt P na 1 mol) syntezę G-6-P można było prowadzić w worku celofanowym, pozwalającym na wielokrotne dodawanie substratów i usuwanie — drogą dializy — produktów reakcji. Należy podkreślić, że wybrany do tego celu polifosforan reagował z enzymem dość szybko (choć wolniej niż krótkołańcuchowe preparaty), ulegając przy tym wysokiemu zużyciu (ponad 95%).

Zarówno glukozę, jak i polifosforan stosowano w ilościach 100—1000-krotnie przekraczających ich stałe Michaelisa. Tak duże ilości początkowe spadały do poziomu ograniczającego syntezę dopiero po kilku go

dzinach inkubacji i wtedy dodawano następne porcje substratów *in substantia*. Niekorzystnemu dla aktywności enzymu obniżaniu się pH zapobiegano, dodając do płynu zewnętrznego 2 N NaOH ( $pH < 10$ ). Kierunek i szybkość dializy warunkowały gradienty stężeń; i tak, stężenie G-6-P było zawsze większe w worku, a stężenie NaOH — zawsze większe w płynie zewnętrznym.

Pod względem szybkości dializy gorsze wyniki uzyskiwano stosując zamiast zwykłego celofanu wąż dializacyjny firmy Kolle Aktiengesellschaft (Wiesbaden—Biebrich).

W obecności 0,02% azydku sodu drobnoustroje nie rozwijały się, wobec czego proces syntezy można było kontynuować przez wiele dni; enzym pozostawał aktywny, jakkolwiek objętość mieszaniny inkubacyjnej w worku stale rosła.

Wyodrębnianie soli barowej estru z mieszaniny o bardzo prostym składzie (ester, glukoza, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, niewielkie ilości orto-P i P<sub>1ab</sub>...) nie nastęrczało trudności. Dodatek octanu baru w pH 8,2 powodował wytrącenie fosforanów nieorganicznych, a w obecności etanolu — również soli barowej estru. W roztworach zawierających co najmniej 0,06 M G-6-P krystalizacja tej soli zaczynała się już po dodaniu octanu baru, jednakże dla maksymalnego odzysku konieczne było traktowanie nadmiarem 96% etanolu. Aby zmniejszyć zużycie tego rozpuszczalnika, roztwór zagęszczano na wyparce próżniowej do poziomu ok. 0,1 M G-6-P.

Opisana wyżej procedura (z następującym po niej przemyciem i suszeniem) dawała preparaty o 96% czystości (47,9% kwasu G-6-P), co stanowi wartość niższą od proponowanych przez firmy zagraniczne (98%), a to głównie z powodu zanieczyszczenia fruktozo-6-fosforanem. Ester ten powstawał pod wpływem śladów fosfoglukoizomerazy, ujawniającej się w ciągu długiego czasu inkubacji przy dużym stężeniu G-6-P. Dodatkowym, nieswoistym czynnikiem mogącym prowadzić do niepożądanych zmian (z żółknięciem produktu włącznie) okazała się w serii prób zbyt wysoka temperatura i (lub) zbyt wysokie pH bądź to podczas syntezy, bądź zagęszczenia dializatów.

Przeprowadzenie soli barowej w sól sodową lub rekrytalizowanie glukozo-6-fosforanu baru pozwoliło zmniejszyć zawartość F-6-P 2—3 razy. W tym ostatnim przypadku eluat z kolumny kationitu, zawierający co najmniej 0,96 M kwas G-6-P, doprowadzono do pH 8,2 i po schłodzeniu potraktowano zimnym octanem baru jak zwykle, a następnie sączeniem na lejku Buchnera. Mętniejący filtrat odstawiono do chłodni, gdzie w ciągu 48 godz. wykrytalizowało bez etanolu 90% soli barowej siedmiowodnej. Osad zebrano przez wirowanie, przemityo i wysuszono. Tak otrzymany produkt zawierał ok. 0,6% fruktozo-6-fosforanu baru i <0,4% soli barowych orto-P + P<sub>1ab</sub>.

## Wnioski

1. Opisana w pracy metoda pozwala otrzymać glukozo-6-fosforan o czystości niewiele ustępującej preparatom importowanym. Małe domieszki zanieczyszczeń w postaci F-6-P i fosforanów nieorganicznych nie stanowią przeszkody przy oznaczaniu aktywności odpowiednich enzymów (po rekrytalizacji — także fosfoglukoizomerazy). Preparat nadaje się również do wytwarzania ekwiwalentów redukcyjnych *in vitro*.

2. Istnieje możliwość doskonalenia tej metody w zakresie: a — preparacji enzymu (uwolnienia go od śladów fosfoglukoizomerazy); b — toku syntezy (lepsze funkcjonowanie chemostatu, ewentualnie za pomocą unieruchomionego enzymu); c — izolowania soli (większa wydajność przy mniejszym zużyciu odczynników, zwłaszcza etanolu).

3. Zastosowanie optymalnych warunków syntezy i preparacji G-6-P w ilościach odpowiednio większych może spowodować potaniecie metody enzymatycznej w stopniu konkurencyjnym dla innych metod.

4. Należy dodać, że polifosforanowa glukokinaza została użyta już wcześniej do syntezy glukozoamino-6-fosforanu baru (7).

## PIŚMIENNICTWO

1. Bergmeyer H. V.: Methoden der enzymatischen Analyse. Vol. 2, Akademie-Verlag, Berlin 1970.
2. Seegmiller J. E., Horecker B. L.: The Synthesis of Glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate. J. Biol. Chem. **192**, 175, 1951.
3. Szymona M., Ostrowski W.: Inorganic Polyphosphate Glucokinase of *Mycobacterium phlei*. Biochim. Biophys. Acta **85**, 283, 1964.
4. Szymona M., Widomski J.: A Kinetic Study of Inorganic Polyphosphate Glucokinase from *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra. Physiol. Chem. Physics **6**, 393, 1974.
5. Szymona M., Kowalska H., Pastuszek L.: Polyphosphate-glucose Phosphotransferase. Purification of *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra Enzyme to Apparent Homogeneity. Acta Biochim. Polon. **24**, 133, 1977.
6. Szymona M., Szymona O.: Zastosowanie polifosforanów nieorganicznych do enzymatycznej syntezy estru glukozo-6-fosforowego. Prace Naukowe A.E. we Wrocławiu, nr 159/181, Chemia, 349, 1980.
7. Szymona M., Dolar U.: Enzymatic Synthesis and Isolation of D-glucosamine-6-phosphate Barium Salt. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D, **35**, 1, 1980.
8. Umberit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.: Manometric Techniques. Burgess Publishing Co., Minneapolis 1957.

## РЕЗЮМЕ

Граммовые количества глюкозо-6-фосфата синтезировали, применяя полифосфатную глюкокиназу (EC 2.7.1.63) в смеси содержащей длинноцепочный полифосфат, D-глюкозу,  $MgCl_2$  и NaCl, pH 8—9. Инкубационную смесь поместили в целлофановом мешке с целью диализа продуктов реакции до внешнего раствора. Таким образом фермент действовал в условиях сближенных к химостату.

Диализаты концентрировали и накопленный эфир изолировали методом бариево-этаноловой преципитации. Финальный продукт состоял в 96% из  $C_6H_{11}O_9 \cdot 7Ba \cdot 7H_2O$ . Из этой соли получали натриевую соль, применяя Dowex 50 и метаноловый NaOH для нейтрализации глюкозо-6-фосфорной кислоты.

## SUMMARY

Inorganic poliphosphate D-glucose-6-phosphotransferase (EC 2.7.1.63) was used to synthesize small quantities of glucose-6-phosphate in a mixture containing long-chained polyphosphate,  $MgCl_2$ , D-glucose, NaCl and enzyme, pH 8—9. The mixture was put into the cellophane bag to allow dialysis of the reaction products into an external solution, thus enabling the enzyme to act under chemostat-like conditions.

The dialysates were pooled, concentrated by vacuum evaporation and the ester was purified by the barium-ethanol precipitation method. The final product was barium salt heptahydrate and its purity amounted to 96 per cent. It could be converted to sodium salt by using Dowex 50 and subsequent titration of the glucose-6-phosphoric acid with methanolic NaOH.