

HYDROLIZA KERATYN WŁOSÓW

Instrukcja do ćwiczeń opracowana w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Roztwarzanie próbek stałych

Większość technik chromatograficznych wymaga uzyskania próbki w postaci ciekłej, tzw. jej upłynnienia, dlatego wyodrębnienie oznaczanych analitów z próbek stałych często stanowi ogromne wyzwanie. Techniki przygotowania próbek stałych możemy podzielić na trzy kategorie: rozdrabnianie mechaniczne, trawienie enzymami, kwasami, zasadami, oraz ekstrakcję. W przypadku próbek stałych przygotowanie często polega na ekstrakcji np. kwasami, co umożliwia uwolnienie składników do ekstrahenta. Nie dochodzi wówczas do całkowitego zniszczenia matrycy. Inną metodą jest hydroliza próbki, która umożliwia całkowite przeprowadzenie badanej próbki do roztworu, w wyniku czego uzyskuje się często zupełnie klarowną ciecz. Roztworzenie całej matrycy zapewnia całkowitą dostępność do analizowanego pierwiastka lub związku. W wielu przypadkach jest to proces długotrwały, należy wtedy rozważyć możliwość zastosowania najbardziej wydajnego sposobu hydrolizy.

W zależności od rodzaju analizowanego materiału, w celu solubilizacji próbki wykorzystuje się następujące czynności:

- * rozpuszczanie – proces polegający na pokonaniu energii sieci ciał stałych przez energię solwatacji;
- * roztwarzanie – obejmuje procesy zachodzące w roztworze kwasów, zasad, w których to rozpuszczanie próbki zachodzi poprzez reakcje chemiczne;
- * stapianie – proces wysokotemperaturowego rozkładu próbek z topnikami, osiągnięty w temperaturze od 500 – 1200 °C; jest on prowadzony do momentu uzyskania fazy ciekłej w całej objętości próbka/topnik. Produkt poddaje się następnie rozpuszczaniu lub roztwarzaniu;
- * spiekanie – proces polegający na ogrzewaniu substancji w temperaturze bliskiej temperatury topnienia, w wyniku czego pojawia się faza ciekła na granicy ziaren, dając po oziębieniu porowaty spiek. Uzyskany w ten sposób stop lub spiek jest rozpuszczalny w wodzie lub w roztworach kwasów;

* mineralizacja – całkowity rozkład matrycy organicznej:

- mineralizacja sucha (spopielenie) – spalanie próbki w piecu w temperaturach w zakresie 400 – 600 °C w tyglach kwarcowych. Otrzymany popiół składa się głównie z tlenków i węglanów, i ulega rozpuszczeniu w kwasie lub mieszaninie kwasów;
- mineralizacja mokra – rozkład matrycy organicznej odczynnikami utleniającymi. Proces może być wspomagany dodatkowo ultradźwiękami, promieniowaniem UV lub promieniowaniem mikrofalowym.

Aby proces przeprowadzania próbek stałych do roztworu nie stał się źródłem błędów na każdym etapie powinien przebiegać ilościowo, by maksymalnie ograniczać możliwość zanieczyszczeń i strat analitu. Odczynniki powinny charakteryzować się wysoką czystością, a naczynia, w których przeprowadza się roztwarzanie nie mogą być potencjalnym źródłem oznaczanego składnika. Przy doborze odczynników należy rozważyć czy nadają się one do oznaczania danego składnika wybraną techniką (Tabela 1).

Tabela 1. Odczynniki powszechnie stosowane do rozpuszczania lub roztwarzania:

Odczynnik	Przykładowy rodzaj próbki
Woda	Rozpuszczalne sole (zachodzi tylko proces rozpuszczania)
Rozcieńczone kwasy	Pozostałość po spopielenych próbkach, łatwo utleniające metale i stopy, sole
Stężone kwasy (np. HNO ₃)	Trudno utleniające metale i stopy, stale, tlenki metali
Stężone kwasy z dodatkiem silnych utleniaczy	Metale, stopy, gleby, pyły z powietrza, materiały ogniotrwałe, próbki substancji roślinnych
Kwas fluorowodorowy	Krzemiany, próbki skał

W przypadku analiz, których celem jest wykrywanie jonów metali, przy doborze odczynników roztwarzających należy zwrócić uwagę, czy aniony pochodzące od wprowadzanych kwasów nie tworzą nierozpuszczalnych soli z metalami, które ma się na celu oznaczyć. Takie niebezpieczeństwo może wystąpić w przypadku, gdy stosuje się kwas siarkowy lub solny. Przy roztwarzaniu w kwasie azotowym takie ryzyko właściwie nie występuje.

Włosy jako próbka biologiczna

Włosy to nitkowaty, zrogowaciały, wyspecjalizowany wytwór naskórka, występujący wyłącznie u ssaków, na powierzchni ich skóry. Zbudowane są z białka - twardej, spójnej keratyny obecnej w ilości od 65% do 95%. Wyniki analizy włosów wykorzystywane są bardzo często do:

- * monitorowania zmian w żywieniu, wykrywania niedożywienia przez porównanie stosunku izotopów ciężkich do lekkich;
- * farmakoterapii padaczki, gdzie stwierdzono korelację pomiędzy wielkością dziennej dawki karbamazepiny i fenobarbitalu, a zawartością tych leków w segmentach włosów o długości 1 cm;
- * badań epidemiologicznych, do monitorowania skażenia środowiska i narażenia pracowników na ekspozycję na związki występujące przy produkcji aluminium, kładzeniu nawierzchni dróg, spalaniu paliw kopalnych, w transporcie;
- * oznaczania we włosach nikotyny (czasami też jej metabolitu - kotyniny), która jest wiarygodnym markerem pasywnej ekspozycji na tytoń w grupie biernych palaczy;
- * badania matek i ich noworodków na obecność w organizmie amfetaminy i kokainy, oraz w testach na zawartość kokainy, THC lub amfetaminy u osób poddanych terapii odwykowej lub podejrzanych o stosowanie niedozwolonych używek;
- * badań antydopingowych, w których określa się obecność substancji, mających bezpośredni wpływ na wyniki uzyskiwane w trakcie zawodów sportowych.

Keratyny

Keratyny należą do grupy białek włókienkowych, charakteryzujących się złożoną budową strukturalną. Są one podstawowym budulcem cytoszkieletu i wyrostków skóry kręgowców, takich jak: włosy, pióra, kopyta, szczecina, wełna, paznokcie. Kumulacja dużych ilości odpadów keratynowych w środowisku naturalnym wynika z niedostępności tych białek dla drobnoustrojów i enzymów. Aminokwasy budujące keratyny mają w 40% charakter hydrofilowy oraz w 60% hydrofobowy. Ze względu na charakter hydrofobowy keratyny nie rozpuszczają się w roztworach wodnych, oraz wykazują wysoką oporność na hydrolizę przez większość enzymów proteolitycznych pochodzenia roślinnego i zwierzęcego takich jak trypsyna, czy papaina. Najważniejszym aminokwasem wchodzącym w skład keratyny włosa jest cysteina, posiadająca w swojej budowie grupę tiolową (-SH), dzięki której możliwe jest

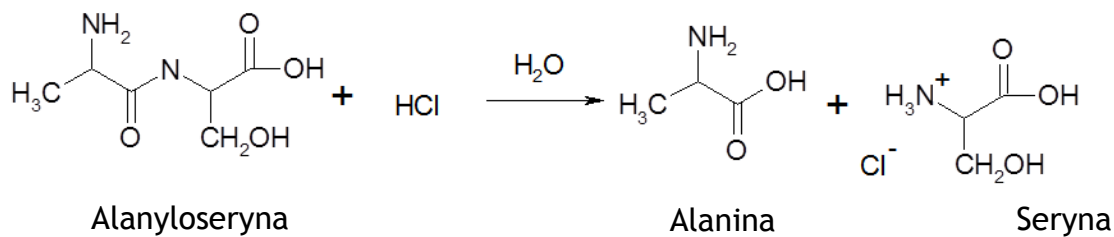
tworzenie mostków disiarczkowych (S–S). Ilość i ułożenie mostków disiarczkowych decyduje o kształcie włosa, nadając mu formę loków, bądź odpowiadając za ich prosty charakter. W keratynie piór cysteina stanowi 7% wszystkich aminokwasów i jej ilość jest 2,5 razy wyższa w stosunku do keratyn naskórka, rogów i paznokci.

Sposoby degradacji białek

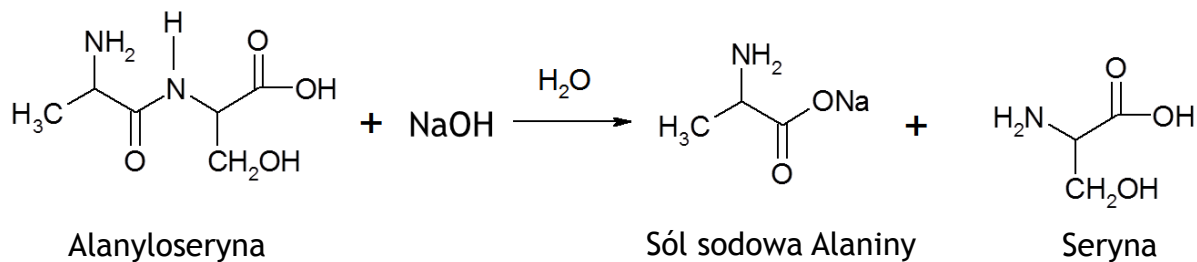
Degradacja białka keratynowego i przeprowadzenie go w formę niskocząsteczkowych peptydów lub aminokwasów jest możliwa przy udziale podwyższonej temperatury, a także z wykorzystaniem enzymów, zasad i kwasów. Wysoki stopień usieciowania keratyn powoduje, że są one nierozpuszczalne w wodzie, stąd też pierwszym etapem obróbki próbki bogatej w keratyny jest otrzymanie ich rozpuszczalnej postaci. W tym celu stosuje się dwie metody skutkujące rozpuszczeniem poszukiwanego białka. Pierwsza z nich powoduje zniszczenie struktury oraz właściwości charakterystycznych dla białka natywnego. Należą do niej hydroliza kwasowa, zasadowa, enzymatyczna, ale również podwyższenie temperatury do 100 – 150°C. Drugą metodą degradacji białka keratynowego, umożliwiającą zachowanie sekwencji aminokwasowej jest zastosowanie reagentów niszczących wiązania S–S.

Degradacja pod wpływem temperatury. Ogrzewanie w temperaturze 130 – 140 °C w środowisku wodnym prowadzi do degradacji keratyn do oligomerów, polipeptydów i aminokwasów. Rozkład aminokwasów następuje w temperaturze około 200 °C. W temperaturze 185 °C pierwsze zmiany w strukturze włókien można zaobserwować już po czasie ogrzewania 30 s.

Degradacja pod wpływem kwasów. Hydroliza kwasowa białek zachodzi głównie z zastosowaniem stężonego kwasu solnego i temperatury przekraczającej 100 °C. Pod wpływem kwasów mineralnych włókna białkowe ulegają degradacji w wyniku rozerwania wiązań peptydowych. Istotnymi czynnikami wpływającymi na stopień degradacji są temperatura, pH, czas reakcji oraz rodzaj stosowanych kwasów. Roztwór uzyskany po hydrolizie kwasowej keratyn zawiera wolne aminokwasy. W wyniku hydrolizy wiązań peptydowych dochodzi do obniżenia mas cząsteczkowych oraz uwolnienia grup końcowych aminokwasów białkowych.



Degradacja pod wpływem zasad. Keratyna jest mniej odporna na działanie zasad niż kwasów. Białko to na skutek działania zasad ulega pęcznieniu, a w konsekwencji degradacji. Wzrost rozpuszczalności keratyn w roztworach o charakterze zasadowym powoduje rozerwanie wiązań peptydowych i mostków disiarczkowych. Rozpuszczalność ta zależy od: stężenia zasady, temperatury procesu oraz czasu oddziaływania czynnika na białko. Pod wpływem działania zasady następuje wzrost plastyczności i spadek wytrzymałości keratyny.



Degradacja enzymatyczna. Enzymy proteolityczne, tj. hydrolazy peptydowe rozszczepiają wiązania peptydowe w białkach z przyłączeniem cząsteczki wody. Ze względu na optymalne pH działania enzymów, przypadające w zakresie pH 10, dominującą rolę zarówno pod względem produktywności, jak i zastosowania, odgrywają proteiny serynowe, zwane popularnie proteinazami zasadowymi. Proteiny serynowe są enzymami o bardzo szerokiej specyficzności substratowej, rozszczepiającymi wiązania peptydowe w białkach i niskocząsteczkowych peptydach. Ta szeroka specyficzność sprawia, że proteiny serynowe służą również do otrzymywania hydrolizatów białkowych w przemyśle spożywczym, paszowym, kosmetycznym i farmaceutycznym. Działanie enzymów na keratynę prowadzi do jej całkowitej biodegradacji spowodowanej enzymatyczną hydrolizą i utlenieniem. U bakterii proces przebiega w trzech etapach. W pierwszym następuje redukcja siarki z mostków S-S cystyny za pomocą reduktaz, w drugim etapie przebiega proteoliza, a w trzecim następuje deaminacja peptydów i utlenienia grup -SH.

Degradacja z udziałem reduktorów. Degradacji białka keratynowego, umożliwiającą zachowanie jego sekwencji aminokwasowej jest możliwa dzięki zastosowaniu reagentów zdolnych do zniszczenia, rozerwania mostków S-S cystyny. Odczynniki najczęściej wykorzystywane w tym celu to: merkaptoetanol, ditiotreitól (DTT), mocznik, tiomocznik.

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest określenie, które ze zbadanych czynników umożliwiają całkowite roztworzenie próbki włosów w jak najkrótszym czasie.

Wymagane środki ostrożności

- W trakcie wykonywania ćwiczenia student powinien nosić odzież ochronną.
- Roztworów nie należy wdychać i pipetować ustami.
- Identyfikacja zagrożeń (Klasyfikacja zgodnie z dyrektywami UE 67/548/EWG lub 1999/45/WE):

Wodorotlenek sodu - C Produkt żrący R35

Kwas solny - C Produkt żrący R34, Xi Produkt drażniący R37

- Pierwsza pomoc:

- w razie kontaktu ze skórą: spłukać dużą ilością wody.
- w razie kontaktu z oczami: przepłukać dużą ilością wody, przy szeroko otwartej powiece.
- jeżeli osoba poszkodowana oddycha, przenieść na świeże powietrze. Jeżeli osoba poszkodowana nie oddycha, zastosować sztuczne oddychanie. Zasięgnąć porady medycznej.
- w przypadku wystąpienia podrażnień skontaktować się z lekarzem.
- w razie spożycia: przepłukać usta wodą.

ODCZYNNIKI

H₂O, 6 mol/L HCl, 1 mol/L NaOH, Trypsyna, 0,01 mol/L DTT

APARATURA

próbki włosów odważone po 2 mg, waga analityczna, łopatka ze stali nierdzewnej, pęseta, ampułki szklane, statyw na ampułki, pipety automatyczne, termostat

WYKONANIE EKSPERYMENTU

1. Podpisać ampułki szklane w następujący sposób: 1. Włosy + H₂O; 2. Włosy + HCl; Włosy + NaOH, Włosy + trypsyna; Włosy + DTT
2. Przenieść naważki włosów (po 2 mg) do ampulek szklanych.
3. Do kolejnych ampulek wprowadzić za pomocą pipety automatycznej po 200 µl roztworów: 1 – H₂O, 2 – HCl o stężeniu 6 mol/L, 3 – NaOH o stężeniu 1 mol/L, 4 – 0,01 mol/L DTT.
4. Zamknąć ampułki szklane nad płomieniem palnika.
5. Ampułki z próbkami umieścić w termostacie.
6. Przeprowadzić hydrolizę w temperaturze 120°C w czasie 1 h, co 10 minut odnotowując wizualne zmiany zachodzące w próbce.

SPRAWOZDANIE

1. W sprawozdaniu opisać przebieg zmian zachodzących w próbkach włosów i na ich podstawie zaproponować schematy reakcji zachodzących w poszczególnych ampułkach.

LITERATURA

- Kunicki – Goldfinger W.; Życie bakterii; Wyd. PWN; Warszawa; 1998
- Libudziński Z. Kowal K.; Mikrobiologia techniczna I i II tom; Wyd. Politechniki Łódzkiej; 2000.
- Klimiuk E., Łebkowska M., Biotechnologia w ochronie środowiska. PWN, 2008.