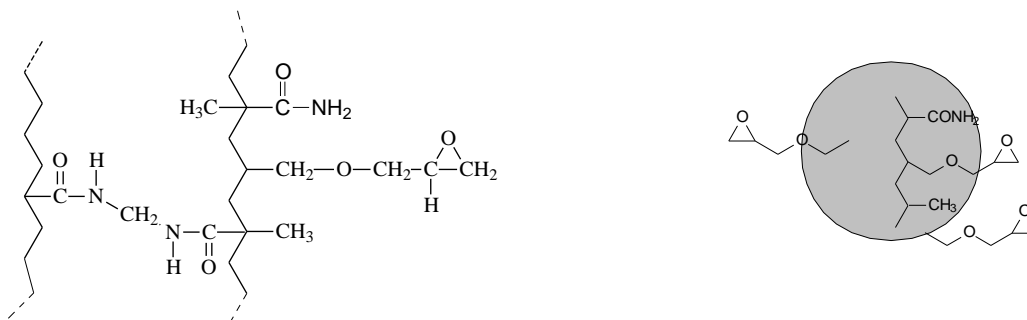


#### Zadanie 4 (10 pkt)

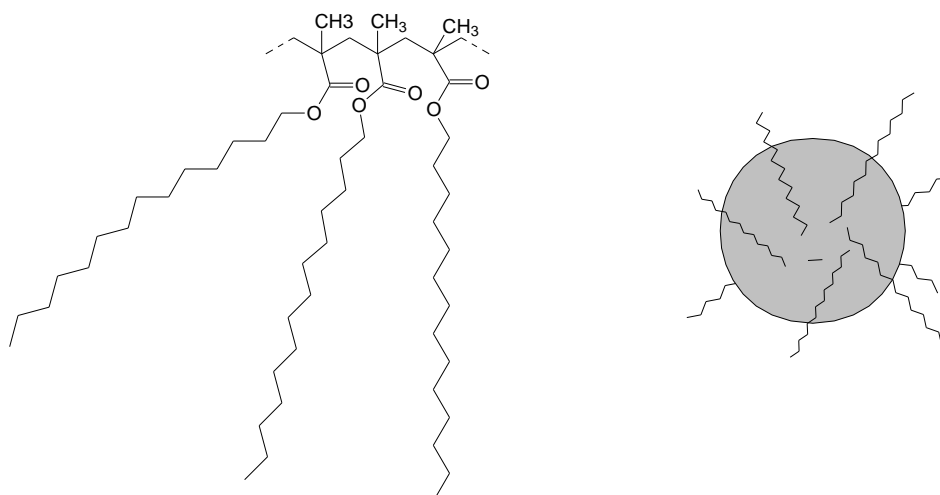
Do przygotowania próbek immobilizowanych enzymów użyto dwóch rodzajów polimerów:

polimeru **1** otrzymanego z metakrylamidu, eteru alliloglicydylowego i *N*-metyleno-*bis*-metakrylamidu (Rysunek 1),

polimeru **2** otrzymanego z metakrylanu tetradecylu (Rysunek 2).



Rysunek 1. Fragment łańcuchów polimeru 1; obok schematyczny rysunek kuleczki polimeru z „wystającymi” podstawnikami



Rysunek 2. Fragment łańcucha (poli)metakrylanu tetradecylu (polimer 2); obok schematyczny rysunek kuleczki polimeru o wybitnie hydrofobowej powierzchni

Przygotowano 30 ml roztworu białka enzymatycznego w roztworze buforu fosforanowego w poniżej opisany sposób.

Do ok. 36 ml buforu fosforanowego o pH=7,4 dodano 2,7 g surowego preparatu białka enzymatycznego (lipaza z *Burkholderia cepacia*). Zawiesinę wymieszano na mieszadło i odwirowano. Na dnie próbówki osiadł nierozpuszczalny w wodzie osad. Roztwór z nad osadu ostrożnie przeniesiono do cylindra miarowego – otrzymano 30 ml roztworu zawierającego rozpuszczone białko enzymatyczne. Pobrano z niego próbkę o objętości 1 ml do oznaczenia białka „przed immobilizacją”.

Metodami analitycznymi (metoda Lowry’ego) oznaczono i wyliczono, że ilość białka, która przeszła do roztworu z wyjściowej porcji surowego enzymu wynosiła 113671,80 µg

Pozostały roztwór białka rozcieńczono dziesięciokrotnie do objętości 290ml i podzielono na dwie równe porcje.

Kuleczki **polimeru 1** zawieszono w jednej porcji roztworu białka i wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 20 godzin. Następnie kuleczki odsączono, przemyto wodą i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej, przesypano do pojemniczka, szczelnie zamknięto i umieszczono na półce lodówki w temp. 4 °C. Zmierzone objętość przesączu i wody użytej do przemycia kuleczek-otrzymano wynik 155 ml. Pobrano 1ml roztworu aby oznaczyć zawartość białka obecnego w przesączu. Po wykonaniu analiz i obliczeń okazało się, że w przesączu znajduje się **195,81** µg/ml białka.

Kuleczki **polimeru 2** zawieszono w drugiej porcji roztworu białka i wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 7 godzin. Potem kuleczki odsączono i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej, przesypano do pojemniczka, szczelnie zamknięto i umieszczono na półce lodówki w temp. 4 °C. Zmierzone objętość przesączu i pobrano 1ml roztworu aby oznaczyć zawartość białka obecnego w przesączu. Po wykonaniu analiz i obliczeń okazało się, że na nośniku osiadło **34351,06** µg białka.

Niestety student, który wykonał wyżej opisaną pracę, zagapił się trochę i nie podpisał od razu identycznych pojemniczków z lipazą immobilizowaną na dwóch rodzajach polimerów. Po dwóch dniach kuleczki w pojemniku z prawej strony (**P**) wyglądały identycznie jak kuleczki w pojemniku z lewej strony (**L**).

Musiał ustalić eksperymentalnie jaka jest zawartość obu pojemników.

Próbkę kuleczek z prawej strony (**P**) zawiesił w buforze fosforanowym o pH 7,4, dodał niejonowy związek powierzchniowo czynny (Triton X-100) i ogrzewał całość w temperaturze 35 °C przez 4 godziny.

Identyczny proces przeprowadził zawieszając w roztworze buforu z Tritonem próbkę kuleczek z lewej strony (**L**).

Odsączył polimerowe kuleczki, dodał do każdego przesączu kilka kropel roztworu maślanu *p*-nitrofenylu w bezwodnym rozpuszczalniku organicznym. Roztwór (**L**) nie zmienił barwy, roztwór (**P**) zabarwił się na żółto. Podobnie potraktował odsączone kuleczki polimerowe.

Zawiesina kuleczek (**P**) w porcji buforu nie zmieniła barwy po dodaniu roztworu maślanu, zawiesina kuleczek **L** zabarwiła się na żółto. Student-gapa odetchnął z ulgą, ponieważ po dodatkowym dniu pracy mógł podpisać właściwie pojemniczki z immobilizowaną lipazą.

#### Pytania

- A. Na jakiej zasadzie lipaza z *Burkholderia cepacia* związała się z polimerem 1 i z polimerem 2? (3 pkt.)

Z polimerem 1 lipaza związała się w wyniku reakcji chemicznej z utworzeniem wiązań kowalencyjnych. Reaktywne pierścienie oksiranu przereagowały z resztami

aminokwasowymi białka enzymatycznego zawierającymi wolne grupy OH (mogły też reagować grupy NH<sub>2</sub>).  
Z polimerem 2 lipaza związała się słabymi oddziaływaniami hydrofobowymi - adsorpcja

B. Oblicz procentową zawartość białka enzymatycznego w wyjściowym surowym preparacie. (1pkt)

Masa próbki enzymu „surowego” 2,7 g. Z treści zadania wynika, że próbkę rozpuszczano w wodzie i otrzymano roztwór zawierający 113671,80 µg białka.  
Obliczenia:

$$113671,80 \mu\text{g} = 0,11367180\text{g}$$

Zawartość białka enzymatycznego:

$$\frac{0,11367180[\text{g}]}{2,7[\text{g}]} \cdot 100\% = 4,21\%$$

*Dla uczniów to polecenie nie było zrozumiałe, choć mnie wydawało się najprostsze. Dla studentów odważających codziennie enzymy czystości „technicznej” jasne jest, że większość masy stanowią inne białka i dodatki, a sam enzym rozpuszczalny w wodzie stanowi niewielką część masy preparatu. Moją intencją było zwrócenie uwagi na konieczność ujednoczenia jednostek masy – wszystko w gramach albo mikrogramach i obliczenie zawartości procentowej.*

*Gdyby etap II odbywał się w realu pewnie zauważyłabym ich konsternację i wytłumaczyła głośno jak wygląda przygotowywanie roztworów białka. Przy czym ten punkt nie miał wpływu na dalsze obliczenia nawet jeżeli ktoś źle zrozumiał i źle policzył*

C. Oblicz stężenie białka(w µg/ml) w wyjściowym supernatancie używanym do dalszej pracy. (1 pkt)

Z treści zadania wynika, że otrzymano 30 ml roztworu i że zawierał on 113671,80 µg enzymu.

$$m=113671,80 \mu\text{g}$$

$$v = 30 \text{ ml}$$

$$c = \frac{113671,80}{30\text{ml}} = 3789,06 \mu\text{g/ml}$$

Z jakiegoś powodu większość tego nie zrobiła poprawnie, a to już wpływało na dalsze odpowiedzi

D. Porównaj wydajność immobilizacji białka enzymatycznego na obu nośnikach (% białka, który został związany). (3pkt)

Z treści zadania wynikało, że z 30 ml zabrano 1 ml do oznaczeń, zostało 29 ml o stężeniu 3789,06 µg/ml. Jest nawet podpowiedź wprost :

„Pozostały roztwór białka rozcieńczono dziesięciokrotnie do objętości 290ml” – nikt tego nie zauważył

Należało obliczyć zawartość białka w tych 29 ml rozcieńczonych potem do 290 ml

$$c = 3789,06 \mu\text{g/ml}$$

$$v = 29 \text{ ml}$$

$$m = c \cdot v [\mu\text{g}] \quad 3789,06 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot 29 \text{ ml} = 109\,882,74 \mu\text{g}$$

Roztwór podzielono na pół czyli każda połówka zawierała

$$109\,882,74 / 2 = 54941,37 \mu\text{g} \text{ białka}$$

O **polimerze 1** wiemy, że w roztworze pozostało  $195,81 \mu\text{g/ml} \cdot 155 \text{ ml} = 30350,55 \mu\text{g}$  białka. Czyli na kuleczkach polimeru 1 związało się kowalencyjnie

$$54941,37 \mu\text{g} - 30350,55 \mu\text{g} = 24\,590,82 \mu\text{g}$$

$$\text{Wydajność immobilizacji} = \frac{24590,82}{54941,37} \cdot 100\% = 44,76\%$$

O **polimerze 2** wiemy, wprost z treści zadania, że osiadło na nim **34351,06**  $\mu\text{g}$  białka

$$\text{Wydajność immobilizacji} = \frac{34351,06}{54941,37} \cdot 100\% = 62,52\%$$

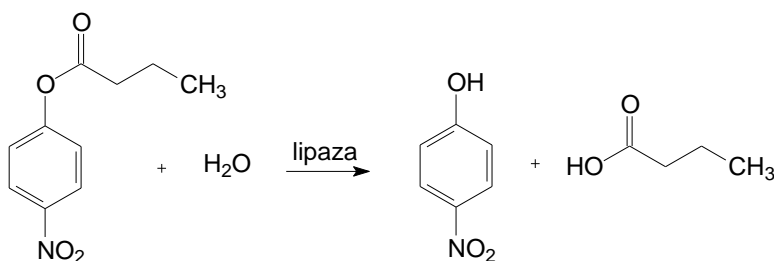
Na polimerze 2 osiadło (zaadsorobowało się) więcej białka z wyjściowego roztworu.

E. Jak został podpisany pojemnik P a jak pojemnik L; odpowiedź uzasadnij. (2 pkt)

**Pojemnik P:** kuleczki polimeru 2 (enzym osiadł na tym polimerze na zasadzie adsorpcji, został zmyty do roztworu przez związek powierzchniowo czynny, dlatego roztwór zawierający enzym katalizował hydrolizę maślanu p-nitrofenylu do barwnego p-nitrofenolu a zawiesina kuleczek nie)

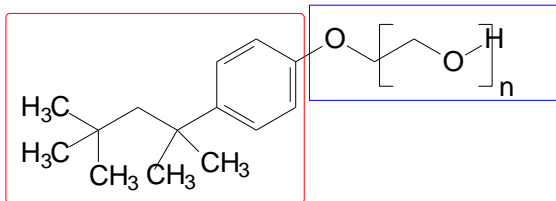
**Pojemnik L:** kuleczki polimeru 1 (enzym związał się z tym polimerem na stałe wiązaniami kowalencyjnymi, dlatego roztwór zpc nic z kuleczek nie zmył i roztwór nie katalizował hydrolizy maślanu p-nitrofenylu, za to zawiesina kluczek z enzymem tak)

### Wskazówka 1.

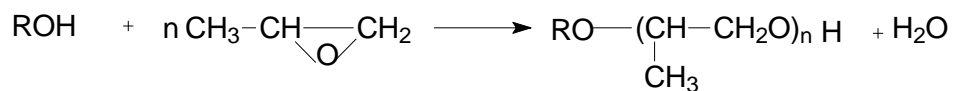


Rysunek 3. Hydroliza maślanu p-nitrofenylu; reakcja biegnie w nadmiarze wody w roztworze buforu o pH lekko zasadowym w temperaturze pokojowej; ester jest bezbarwny, p-nitrofenol jest intensywnie żółty

## Wskazówka 2.



Rysunek 4. Cząsteczka Tritonu X-100;  $n = 10$ . Jest to niejonowy związek powierzchniowo czynny. Na czerwono zaznaczono podstawnik alkiloarylowy czyli część hydrofobową, na niebiesko łańcuch polieterowy czyli część hydrofilową cząsteczki.



Rysunek 5. Metoda otrzymywania podstawionych polieterów (jak np. w łańcuchu Tritonu); jeden substrat zawiera grupę OH, drugi substrat zawiera reaktywny trójczłonowy pierścień oksiranu