Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie. Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

Oczyszczanie kwasu fitynowego techniką chromatografii jonowymiennej. Oznaczanie zawartości kwasu fitynowego oraz fosforu nieorganicznego w ziarniakach zbóż.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się metodyką rozdzielania mieszanin związków techniką chromatografii jonowymiennej oraz z metodami oznaczania fosforanu nieorganicznego i kwasu fitynowego.

WPROWADZENIE

Kwas fitynowy (sześciofosforan inozytolu, 1,2,3,4,5,6-heksafosforan *mio*-inozytolu, IP6) jest związkiem naturalnym, rozpowszechnionym w tkankach roślinnych i zwierzęcych. Związek ten wraz z niższymi fosforanami inozytolu zaliczany jest do cząsteczek sygnałowych, pełniących wiele istotnych funkcji w metabolizmie podstawowym komórki. IP6 i jego pochodne biorą udział m. in. w procesach naprawy i rekombinacji DNA, w eksporcie mRNA do cytoplazmy, w endocytozie, transporcie pęcherzykowym. Ze względu na obecność sześciu zjonizowanych reszt fosforanowych, kwas fitynowy może wiązać kationy metali głównie: Mg^{2+}, Zn^{2+} i Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+} oraz Fe^{2+} i Fe^{3+}. Kompleksy kwasu fitynowego z Fe^{3+} mają właściwości antyoksydacyjne ponieważ blokują całkowicie tworzenie rodnika hydroksylowego i hamują peroksydację lipidów. W ostatnich latach duże zainteresowanie budzi postulowana aktywność protekcyjna (właściwości antyoksydacyjne) i terapeutyczna fitynianu w chorobie nowotworowej jelita grubego. Kwas fitynowy jest rozkładany przez fitazę, fosfohydrolazę heksafosforanu**.** *mio*- inozytolu. Enzym ten występuje we wszystkich grupach organizmów żywych. Większość fitaz oprócz kwasu fitynowgo hydrolizuje ATP, ADP i ufosforylowane pośredniki metabolizmu glukozy, czy sztuczny substrat fenylofosforan. Fitazy zazwyczaj hydrolizują pięć z sześciu grup fosforanowych kwasu fitynowego.

U roślin kwas fitynowy stanowi, obok niewielkich ilości niższych fosforanów inozytolu, główną formę zapasową fosforu w dojrzałych ziarniakach zbóż i nasionach roślin strączkowych. Nieznaczne ilości fitynianu występują również u innych roślin m.in. w bulwach ziemniaka, korzeniach marchwi oraz w częściach nadziemnych niektórych traw. Jego zawartość zależy od gatunku i odmiany oraz warunków wzrostu i nawożenia rośliny. W rosnących ziarniakach zbóż kwas fitynowy jest syntetyzowany i gromadzony głównie w ostatnim stadium dojrzewania. W całych ziarniakach jego zawartość może stanowić 0,3 do 1% suchej masy, natomiast w okrywie nasiennej i zarodku kilkakrotnie więcej. Przypuszcza

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie. Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

się, że kwas fitynowy, gdy występuje w wysokich stężeniach może być wykorzystywany jako donor reszty fosforanowej do syntezy ATP. Kwas fitynowy uważany jest za związek wspomagający magazynowanie kationów w nasionach, niezbędnych dla rosnącej siewki. Podczas kiełkowania ziarniaków zmniejsza się zawartość fitynianu natomiast gwałtownie wzrasta aktywność fitazy. Kwas fitynowy w wysokich stężęniach może być wykorzystywany jako donor reszty fosforanowej do syntezy ATP, a także wspomagać magazynowanie w nasionach kationów niezbędnych dla rosnącej siewki.

W znaczących ilościach (0,5 - 10 mg/g) fitynian występuje w mąkach żytnich, pszennych oraz innych przetworzonych produktach zbożowych. Związek ten uważany jest za czynnik antyodżywczy, nie podlega on trawieniu w przewodzie pokarmowym zwierząt monogastrycznych oraz człowieka. W jelitach (ze względu na panujące tam pH) kwas fitynowy tworzy trudno rozpuszczalne związki z jonami metali, co zmniejsza ilość dostępnych w pożywieniu soli mineralnych. Spożywanie pokarmów bogatych w kwas fitynowy może doprowadzić m.in. do niedoboru żelaza w organizmie lub krzywicy. Ponadto kwas fitynowy w niskim pH (żołądek) tworzy kompleksy z białkami, co utrudnia ich trawienie. Te antyodżywcze własności kwasu fitynowego można złagodzić powodując jego częściową defosforylację do niższych estrów fosforanowych inozytolu. Defosforylacja fitynianu w dużym stopniu zachodzi podczas technologicznego procesu przygotowania ciasta (fermentacji) wskutek działania fitazy zawartej w drożdżach.

Ekstrakcja i oznaczanie kwasu fitynowego oraz niższych estrów fosforanowych inozytolu

Ekstrakcję kwasu fitynowego z otrąb zbożowych (śruty?) prowadzi się w rozcieńczonych roztworach kwasów, najczęściej trichloroctowego, solnego lub siarkowego. Efektywność tego procesu zwykle zależy od intensywności i czasu wytrząsania prób podczas ekstrakcji. Kwas fitynowy oczyszcza się z ekstraktów kwasowych między innymi metodami chromatografii cieczowej, nisko-lub wysokociśnieniowej.

Na przykład różne mieszaniny związków różniących się ładunkiem możemy rozdzielić techniką chromatografii jonowymiennej. Ten typ chromatografii polega na odwracalnym wiązaniu obdarzonych ładunkiem cząsteczek ze złożem jonowymiennym. Złoża stosowane w chromatografii jonowymiennej mogą mieć ładunek ujemny - kationity, (ładunek jest związany z matrycą o charakterze polianionowym), lub dodatni - anionity (ładunek związany z matrycą polikationową). Kationity maja zdolność wiązania i wymiany kationów, anionity – anionów. Do izolacji związku naładowanego ujemnie zastosujemy anionit, zaś związek naładowany

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie. Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

dodatnio będziemy oczyszczać na kationicie. Reguły postępowania przy użyciu tej techniki wynikają z zasady działania jonowymieniaczy. Zwykle dobiera się warunki tak, aby interesujące nas związki wiązały się z jonitem. Następnie ustala się takie warunki, żeby wymywanie związanych substancji miało charakter różnicowy, a interesujący nas związek był w miarę wolny od zanieczyszczeń innymi składnikami mieszaniny. W tym celu elucję związku prowadzi się przy pomocy rosnącego lub skokowego gradientu siły jonowej (ten drugi sposób wykorzystamy na ćwiczeniu). Najczęściej do elucji używa się NaCl. Chromatografia jonowymienna może być także prowadzona w różnych pH ponieważ związki takie jak aminokwasy lub białka, o wyraźnie zróżnicowanych ładunkach można eluować buforami o różnych pH. Podstawowym parametrem charakteryzującym jonowymieniacz jest pojemność (capacity) określająca ilość grup czynnych, dostępnych dla rozdzielanych substancji przypadających na 1 gram nośnika.

Na ćwiczeniach oczyszczanie ekstraktu śruty zbożowej będzie prowadzone techniką chromatografii cieczowej, jonowymiennej na złożu DEAE –Sephacel, zawierającym jako grupę funkcyjną resztę **die**tylo**a**mino**e**tylową $-OCH_2CH_2\ NH^+(CH_2CH_3)_2$. Atom azotu tej grupy jest zjonizowany w przedziale pH 2-9 i w tym zakresie ma zdolność jonowymienną. W opisanej metodzie wykorzystuje się znaczące różnice w sile wiązania ujemnie naładowanych: jonów fosforanowych i sześciofosforanu inozytolu ze złożem anionitowym. Anionit do oczyszczania fitynianu musi być w formie chlorkowej, co znaczy, że grupa funkcyjna tego anionitu jest związana z Cl^-. Po naniesieniu na złoże ekstraktu śruty zbożowej, związany ze złożem jon Cl^- będzie wymieniany na fitynian i na niższe estry fosforanowe inozytolu, a tylko w nieznacznym stopniu na ortofosforan. Przemywanie kolumny wodą prowadzi do usunięcia większości fosforanu nieorganicznego, a związane ze złożem pozostałe jony fosforanowe wymywa się 0,1 M NaCl. Związany silnie z anionitem kwas fitynowy i mniej ufosforylowane pochodne inozytolu eluuje się ze złoża 0,75 M NaCl.

Ilość kwasu fitynowego w wycieku z kolumny będzie oznaczana przy użyciu odczynnika Wade. Różowa barwa odczynnika Wade pochodzi od kompleksów jonów żelaza Fe^{3+} z kwasem sulfosalicylowym (maksimum absorpcji λ = 500 nm). W obecności fitynianu jony żelazowe łączą się z nim powodując rozpad kompleksu Fe^{3+}–sulfosalicylan, co skutkuje spadkiem intensywności różowej barwy odczynnika. Różnica absorbancji pomiędzy próbą materiałową (woda z odczynnikiem Wade) a pełną, jest miarą ilości fitynianu. Jest to metoda prosta, jednak nie należy jej stosować w przypadku oznaczeń ekstraktu z niedojrzałych ziarniaków ze względu na obecność w takim materiale innych związków powodujących rozpad kompleksu Fe^{3+}–sulfosalicylan.

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie. Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

W surowym ekstrakcie z ziarniaków będzie oznaczany fosforan nieorganiczny. Pozwoli to na porównanie występujących w ziarniakach ilości wolnych jonów fosforanowych i tych związanych w formie fitynianu. Fosforan nieorganiczny będzie oznaczany metodą molibdenianową wg Pipera i Lovela, pozwala ona na wykonywanie oznaczeń również na preparatach nieodbiałczanych. Gdy wolny jon fosforanowy reaguje z odczynnikiem molibdenianowym tworzy wypadający z roztworu kompleks heteropolikwasu tetratri-molibdeniano-fosforowego. Wytrącaniu osadu zapobiega albumina i chlorowodorek guanidyny. Żółta barwa roztworu zwiększająca absorbancję jest wynikiem oddziaływania pomiędzy wiązaniami peptydowymi albuminy i kompleksem fosforomolibdenianowym .

WYKONANIE ĆWICZENIA

Ekstrakcja związków fosforu z śruty zbożowej (2 osoby)

1 gram drobno zmielonej śruty pszenżyta przenieść do suchej kolby stożkowej, dodać 20 ml 3% TCA, po wymieszaniu przykryć korkiem. Ekstrakcję prowadzić na wytrząsarce przy 150 rpm przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Ekstrakt odwirować (10 min, 15 000 obr./min), supernatant ostrożnie zlać znad osadu i pozostawić do badań. W razie konieczności uzyskany ekstrakt dodatkowo przesączyć przez sączek z bibuły.

Przygotowanie kolumny do rozdziału chromatograficznego

Plastikową kolumnę chromatograficzną umieścić pionowo w statywie, zacisnąć zacisk przy jej wylocie i nanieść pipetą 3 ml złoża DEAE – Sephacel, uprzednio przemytego wodą destylowaną. Po opadnięciu anionitu zwolnić zacisk u wylotu kolumny i odsączyć wodę znad złoża, spłukać ze ścianek kolumny jego pozostałości. Nad powierzchnią złoża pozostawić kilkumilimetrową warstwę wody. Tak przygotowany anionit należy przemyć 3 razy po 5 ml 1,5 M NaCl, a następnie przepłukać wodą (3 objętości kolumny).

Złoże nie może wysychać, dlatego zawsze musi pozostawać nad nim niewielki słup cieczy.

Oczyszczanie ekstraktu

Do zlewki odmierzyć 1 ml odwirowanego ekstraktu, dodać 9 ml wody i doprowadzić pH do ok. 3,5 za pomocą 0,1 M NaOH (ok. 1,6 ml). Tak przygotowany roztwór w całości nanieść na kolumnę, odsączyć płyn znad złoża do zlewki, i przemyć 3-krotnie 5 ml wody w celu usunięcia fosforanów nieorganicznych. Następnie dodać 3 porcjami po 5 ml 0,1 M NaCl, co umożliwi usunięcie z jonitu pozostałości ortofosforanów. Podstawić pod wylot kolumny cylinder na 20 ml i eluować kwas fitynowy wraz z niższymi estrami fosforanowymi inozytolu

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie. Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

3 porcjami po 5 ml 0,75 M NaCl. W razie potrzeby objętość eluatu uzupełnić do 20 ml roztworem chlorku sodu używanym do elucji.

Oznaczanie kwasu fitynowego

Do dwóch probówek Eppendorfa – próby pełne, odmierzyć po 1 ml wycieku z kolumny oraz 0,35 ml odczynnika Wade. Do kolejnych dwóch probówek – próby kontrolne dodać po 1,0 ml wody oraz 0,35 ml odczynnika Wade. Wszystkie próby mieszać intensywnie przez 5 sekund na worteksie, następnie wirować 5 minut przy 4000 obr/min. Zmierzyć absorbancje wszystkich prób przy długości fali 500 (520) nm w fotometrze wyzerowanym na wodę.

Oznaczanie fosforanu nieorganicznego

Do dwóch probówek Eppendorfa odmierzyć po 0,3 ml surowego ekstraktu i po 0,9 ml odczynnika molibdenowego. Do równolegle wykonywanej próby kontrolnej należy odmierzyć 0,3 ml wody oraz 0,9 ml odczynnika molibdenowego. Próby natychmiast dokładnie wymieszać i po 10 minutach mierzyć absorbancję przy długości fali 420 nm w fotometrze wyzerowanym na próbę kontrolną.

Opracowanie wyników :

Oznaczanie fitynianu: od odczytu średniej wartości absorbancji prób kontrolnych odjąć średnią wartość absorbancji prób pełnych, dla uzyskanej różnicy odczytać z krzywej wzorcowej ilość mikrogramów fitynianu. Pamiętając, że do ekstrakcji związków kwasorozpuszczalnych z 1 g śruty użyto 20 ml kwasu trójchlorooctowego, do oczyszczania wzięto tylko część ekstraktu, a fitynian oznaczano w 1 ml wycieku z kolumny, obliczyć zawartość kwasu fitynowego w mg/gram śruty pszenżyta.

Oznaczenie fosforanu nieorganicznego: z krzywej wzorcowej odczytać ilość mikrogramów fosforu, po uwzględnieniu faktu, że do oznaczenia fosforanu wzięto 0,3 ml z 20 ml ekstraktu, obliczyć zawartość fosforu w mg /gram śruty pszenżyta.

Literatura:

Gonzalez B, Banos-Sanza JI, Villatea M, Brearley CA, Sanz-Aparicio J (2010) Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase is a distant IPK member with a singular inositide binding site for axial 2-OH recognition. *PNAS* **107:** 9608-9613.

Latta M, Eskin M (1980) A Simple and rapid colorimetric method for phytate determination. *J. Agric. Food Chem* **28:** 1313-1315.

Piper Lovel

Raboy V (2003) myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* **64:** 1033–1043.

Przedruk materiałów dydaktycznych w całości lub w części możliwy w celu przygotowania do ćwiczeń z biochemii realizowanych w Katedrze Biochemii, WRiB SGGW w Warszawie. Inne wykorzystanie tych materiałów bez zgody pracowników Katedry Biochemii jest zabronione.

Węglarz L, Parfiniewicz B, Dzierżewicz Z, Wilczok T (2003) Kwas fitynowy jako potencjalny czynnik przeciwnowotworowy jelita grubego. *Gastroenterologia Polska*, **10**: 441-448.