

## Ćwiczenie nr B11

# WŁAŚCIWOŚCI AMFOTERYCZNE BIAŁEK

### I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest ocena właściwości kwasowo-zasadowych żelatyny oraz albuminy.

### II. Zagadnienia wprowadzające

1. Rola białek w procesach życiowych oraz ich zastosowanie w biotechnologii.
2. Budowa białek.
3. Struktury drugorzędowe.
4. Czynniki wpływające na stabilność białek.
5. Klasyfikacja białek

#### Literatura obowiązuja:

1. T. Kędryna, M. Gałka-Walczak, B. Ostrowska, *Wybrane zagadnienia z biochemii ogólnej z ćwiczeniami*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków (2001).
2. H. Jakubke, H. Jeschkeit, *Aminokwasy, peptydy, białka*, PWN, Warszawa (1982).
3. B.D. Hames, N.M. Hooper, *Biochemia*, PWN, Warszawa (2002).
4. L. Stryer., *Biochemia*, PWN, Warszawa (1997).
5. K. Kulka, A. Rejowski, *Biochemia*, PWN, Warszawa (1993).

## III. Część teoretyczna

### III. 1. Funkcje i zastosowanie białek

Białka stanowią grupę makrocząsteczkowych związków polipeptydowych o bardzo skomplikowanej budowie i specyficznych właściwościach. Odgrywają ważną rolę w procesach życiowych - czynnościach i budowie komórki. Są głównym materiałem budulcowym skóry, mięśni, ścięgien, nerwów i krwi, a ponadto enzymów, przeciwciał i wielu hormonów.

Białka pełnią funkcję strukturalną (kolagen, elastyna) oraz katalityczną jako enzymy, w obecności których reakcje przebiegają w optymalnych warunkach znacznie szybciej niż gdyby zachodziły w inny sposób. Odpowiedzialne są za transport elektronów podczas oddychania i fotosyntezy, a także produktów metabolicznych i gazów (albuminy). Na przykład hemoglobina transportuje tlen w krwinkach czerwonych a mioglobina w mięśniach. Żelazo jest przenoszone w osoczu krwi przez transferynę, a przechowywane w wątrobie, w kompleksie z innym białkiem - ferrytyną. Stanowią również swoistego rodzaju ochronę komórek przed ciałami obcymi (immunoglobuliny) oraz regulacyjną (kulmudulina). Odpowiadają za regulację genową (histony) i hormonalną (insulina) oraz za prawidłowe działanie mięśni (aktyna, miozyna).

Rozwój biotechnologii i metod optycznych spowodował intensywny wzrost zainteresowania oddziaływaniem białek z organicznymi i nieorganicznymi ciałami stałymi. Szczególnego znaczenia nabrały w ostatnich latach badania zjawiska adsorpcji protein w układach ciecz/ciało stałe. Badania dowiodły, że adsorpcja białek wywołuje szereg problemów zdrowotnych: kardiologiczne, stomatologiczne, urologiczne itp. Z drugiej strony właściwości fizykochemiczne „biologicznie” modyfikowanych powierzchni (BioSS – Biological Surface Science) pozwalają na zastosowanie ich jako biomateriałów, biosensorów i biochipów w diagnostyce, m.in. do kontroli stężenia glukozy we krwi w celu regulowania poziomu insuliny w przypadku pacjentów chorych na cukrzycę oraz wykonywania innych testów serologicznych i w bioelektronice [2].

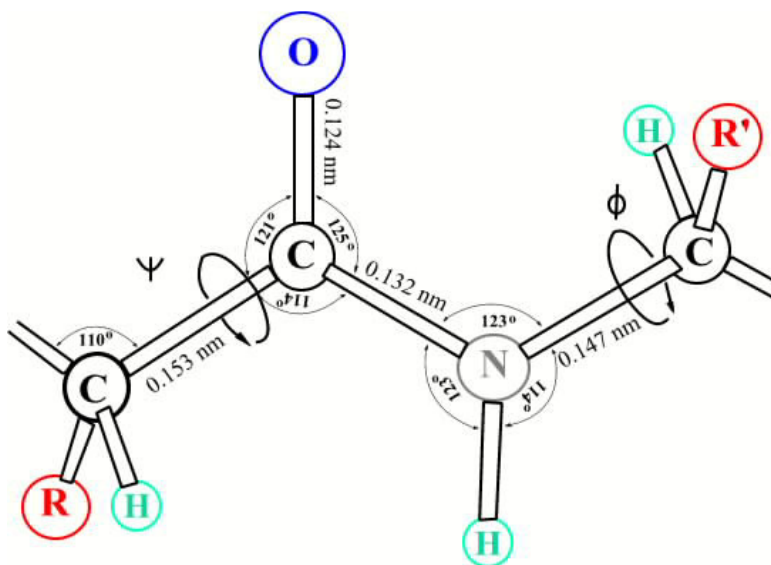
W ostatniej dekadzie XX wieku nastąpił gwałtowny rozwój metod chromatograficznych związany z aplikacją tych technik do rozdziału białek oraz mieszanin związków chemicznych stosowanych w rolnictwie, farmacji i innych gałęziach przemysłu. Stosowane w farmacji leki stanowią często mieszaninę enancjomerów, z których tylko jeden jest aktywny biologicznie [3]. Przykładem leku będącego mieszaniną enancjomerów był talidomid. Enancjomer R ma działanie uspokajające, ale enancjomer S wykazuje działanie teratogenne. Jego obecność w leku powodowała niedorozwój kończyn u dzieci, spowodowany stosowaniem przez ich matki talidomidu w czasie ciąży jako leku uspokajającego. Enancjomery to

związki o identycznych właściwościach fizykochemicznych, lecz różnych konfiguracjach podstawników przy asymetrycznym atomie w cząsteczce. Nie można ich rozdzielić prostymi metodami fizykochemicznymi, dlatego poszukuje się nowych chiralnych faz stacjonarnych, aby poprawić selektywność rozdzielania oraz skrócić czas analizy.

Aktualnie w chromatografii cieczowej trwają prace nad syntezą oraz opisem chiralnych właściwości adsorbentów organicznych (polimery) i nieorganicznych z immobilizowanym białkiem. W skutek oddziaływań polarnych i hydrofobowych części białek z próbką, tworzą się kompleksy, w wyniku czego następuje rozdział enancjomerów. Rozdział jest wypadkową wszystkich efektów związanych z fazą stacjonarną, na której znajduje się substancja aktywna, w tym także metody immobilizacji stacjonarnej, składu i właściwości fazy ruchomej jak również warunków rozdzielania temperatury i pH.

### III.2. Budowa białek

Białka stanowią wielkocząsteczkowe kopolimery zbudowane z różnych L-aminokwasów, związanych ze sobą wiązaniami peptydowymi (rys. 1). Wiązanie peptydowe jest wiązaniem kowalencyjnym powstającym pomiędzy grupami  $\alpha$ -aminową oraz  $\alpha$ -karboksylową sąsiednich aminokwasów. Wiązania w łańcuchu peptydowym ( $\psi$  i  $\phi$ ) wykazują szczególną zdolność do rotacji.



Rys. 1. Geometria wiązania peptydowego. [4,5]

Silne zróżnicowanie łańcuchów bocznych powoduje ich wysokie powinowactwo w stosunku do powierzchni międzyfazowych. Wynika ono z charakteru grup funkcyjnych {aminowe -  $\alpha$  ( $6 < pK_a < 8$ ) i  $\epsilon$  ( $8 < pK_a < 10,5$ ), karboksylowe, tiolowe}, polarności, rozmiaru oraz ładunku danej grupy. Grypy aminowe lokalizują się na powierzchni makrocząsteczek, są czynnikami silnie nukleofilowymi.

Do opisu struktury białka Linderstorm-Lang wprowadził określenia: struktura pierwszorzędowa, drugorzędowa i trzeciorzędowa. Strukturę pierwszorzędową białka wyznaczają liczba, rodzaj i kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym oraz mostków siarczkowych umieszczonych w łańcuchach. Łańcuchy takie mogą być różnie usytuowane w przestrzeni, co stanowi strukturę wtórną białka. W ramach struktury wtórnej rozróżnia się jej trzy poziomy: drugorzędową, trzeciorzędową i czwartorzędową. Strukturą drugorzędową białka określa się regularne pofałdowanie segmentów łańcucha polipeptydowego. Najczęściej występującymi sposobami pofałdowania białka są  $\alpha$  helisa i struktura  $\beta$ . W przypominającej cylinder  $\alpha$  helisie aminokwasy ustawiają się w taki sposób, że powstaje regularna struktura określana jako spiralna (rys. 3a). Jednorodne grupy, tzn. wiązania peptydowe, znajdują się wewnątrz helisy, natomiast boczne łańcuchy reszt aminokwasowych, zawierające różne grupy funkcyjne, skierowane są na zewnątrz makrocząsteczki, co umożliwia im kontakt z cząsteczkami w najbliższym otoczeniu. Tlen karbonylowy każdego wiązania peptydowego jest połączony wiązaniem wodorowym z wodorem grupy aminowej czwartego z kolei aminokwasu, przy czym wiązanie wodorowe przebiega prawie równoległe do osi helisy. Na jeden obrót  $\alpha$  helisy przypada 3,5 aminokwasów, co odpowiada 0,54 nm, natomiast odległość między dwoma aminokwasami wzdłuż osi  $\alpha$  helisy wynosi 0,15 nm. Struktura spiralna powstaje głównie dzięki alaninie, fenyloalaninie, asparaginie, glutaminie, histydynie, leucynie, metioninie, tyrozynie i tryptofanowi. Walina i izoleucyna ze względu na duże rozmiary łańcuchów bocznych nie mogą uczestniczyć w formowaniu stabilnej struktury  $\alpha$  helisy. Seryna, treonina, prolina i hydroksyprolina zakłócają struktury regularne helisy. Dwa pierwsze aminokwasy z powodu dodatkowych wiązań wodorowych tworzonych przez ich grupy hydroksylowe. W przypadku proliny atom azotu wbudowany jest w pierścień heterocykliczny, co wyklucza możliwość obrotu wokół wiązania węgiel-azot (C-N) oraz wytworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Obecność proliny jest powodem, że łańcuch może ulec przegięciu lub nawet utworzyć pętlę [6].

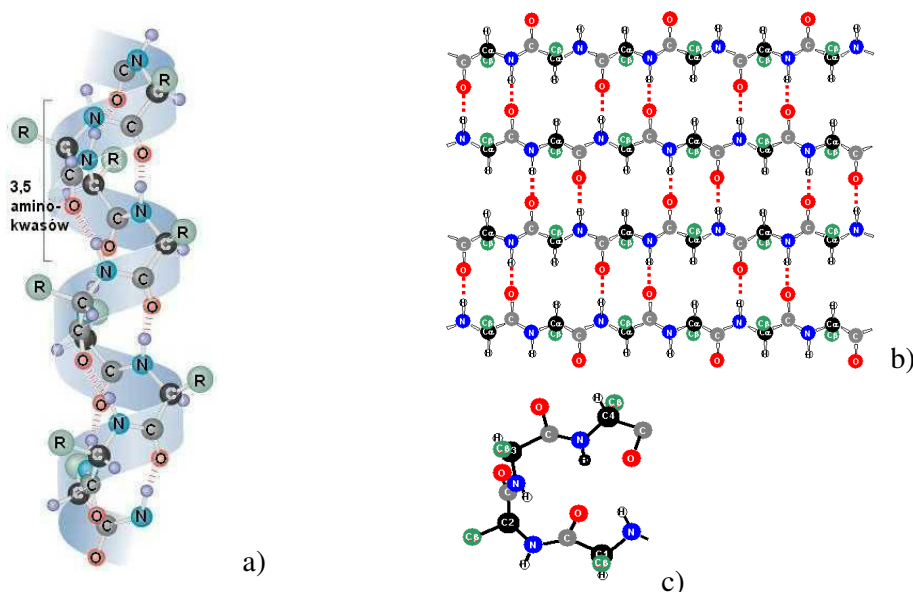
Drugim rodzajem konformacji łańcuchów polipeptydowych budujących białka jest struktura  $\beta$ -warstw, zwana inaczej dywanową lub harmonijkową (rys. 2b). W białkach o typowej strukturze fałdowej łańcuchy polipeptydowe są ułożone obok siebie równoległe albo przeciwrównoległe. W porównaniu jednak z konformacją spiralną łańcuchy są znacznie rozciągnięte, wobec czego nie mogą powstawać wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe. Taką konformację białka stabilizują

poprzeczne mostki wodorowe występujące pomiędzy równoległe biegnącymi w przestrzeni łańcuchami polipeptydowymi. Nie wszystkie białka mają budowę śrubową. W obrębie nawet określonego rodzaju białka stwierdza się obecność obu typów struktury, które bywają przedzielone obszarami nieuporządkowanymi, a rotacje dodatkowo ograniczają efekty związane z pęcznieniem łańcuchów bocznych. Obliczenia teoretyczne wykazały, że konformacje uporządkowanych struktur drugorzędowych ( $\alpha$ -helisa,  $\beta$ -warstwa) stanowią 25% całkowitej liczby możliwych konformacji [8].

W cząsteczkach białek wyróżnić można również element struktury zwany  $\beta$ -zgięciem (rys. 2c). Na  $\beta$ -zgięciu składają się cztery reszty aminokwasów, przy czym drugą resztą najczęściej bywa prolina. Trzecią resztę  $\beta$ -zgięcia stanowi bardzo często glicyna lub aspargina

Struktura trzeciorzędowa dotyczy przestrzennego ułożenia aminokwasów zarówno odległych w sekwencji liniowej, jak i tych, które ze sobą sąsiadują. Końcowa struktura przestrzenna jest determinowana przez sekwencję aminokwasów. W przypadku rozpuszczalnych w wodzie białek globularnych takich jak mioglobina, siłą odpowiedzialną za fałdowanie się łańcucha polipeptydowego jest energetyczny wymóg oddzielenia niepolarnych aminokwasów od hydrofilowego otoczenia przez schowanie ich w hydrofobowym wnętrzu. Łańcuch polipeptydowy fałduje się spontanicznie w ten sposób, że większość jego hydrofobowych łańcuchów bocznych zostaje skierowana do wnętrza powstającej struktury, a większość jego polarnych łańcuchów bocznych znajduje się na jej powierzchni. Biologicznie aktywna (natywna) przestrzenna konformacja białka jest utrzymywana nie tylko dzięki oddziaływaniom hydrofobowym, ale także przez siły elektrostatyczne, wiązania wodorowe i kowalencyjne wiązania dwusiarczkowe. Siły elektrostatyczne obejmują wiązania jonowe między przeciwstawnie naładowanymi grupami i liczne słabe oddziaływania van der Waalsa między ściśle upakowanymi alifatycznymi łańcuchami bocznymi we wnętrzu białka [9,10].

Pojęcie struktury czwartorzędowej wprowadzone przez J.D. Bernol określa stopień asocjacji lub polimeryzacji poszczególnych monomerów białkowych lub łańcuchów polipeptydowych w większe zespoły, zazwyczaj oligomery. Ta struktura jest utrwalana przede wszystkim przez wiązania disulfidowe, a także przez kleszczowe (chelatowe), tworzące się z udziałem grup fenolowych, aminowych, karboksylowych i za pośrednictwem jonów metali, oraz siłami van der Waalsa. Są znane przykłady przekształcania się przez asocjację białka nieaktywnego w aktywne, np. fosforylaza *b* w fosforylaza *a*.



**Rys. 2.** Struktury drugorzędowe białek: a)  $\alpha$ -helisa, b)  $\beta$ -warstwa, c)  $\beta$ -zgięcia . [7]

### III.3. Czynniki wpływające na stabilność białek

Skomplikowana a jednocześnie bardzo delikatna struktura białek zależy od wielu czynników. Niektóre z nich stabilizują formę natywną inne natomiast destabilizują strukturę, powodując denaturację cząsteczek. Entalpia swobodna przejść formy natywnej w formę zdenaturowaną jest funkcją wielu zmiennych, którą obrazuje równanie [11]:

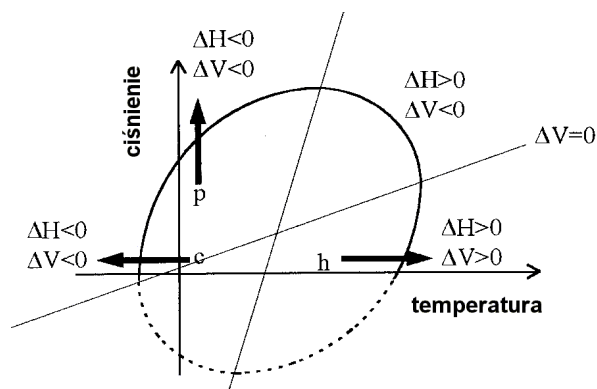
$$\Delta G = \Delta G_0 + f(T, P, c_x, \text{pH}, \dots)$$

i którą można zapisać poprzez parametry charakteryzujące denaturację w określonym rozpuszczalniku [15]:

$$\Delta G = \Delta G_0 - \Delta S_0(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) + \frac{\Delta B}{2}(p - p_0)^2 + \Delta \hat{\alpha}(p - p_0)(T - T_0) + \text{człony wyższego rzędu}$$

gdzie:  $T$  - temperatura,  $p$  - ciśnienie,  $c_x$  - stężenie współrozpuszczalnika,  $\Delta G_0$ ,  $\Delta S_0$  - zmiany entalpii swobodnej i entropii w odniesieniu do temperatury  $T_0$  i ciśnienia  $p_0$ ,  $T$ ,  $p$  - aktualna temperatura i ciśnienie przejść,  $\hat{\beta}$ ,  $\hat{\alpha}$  - różnica współczynników

ściśliwości ( $\hat{\beta} = \beta V$ ) i  $\hat{\alpha}$  - rozszerzalności cieplnej ( $\hat{\alpha} = \alpha V$ ) stanu zdenaturowanego i natywnego,  $\Delta C_p$ - zmiany pojemności cieplnych.



**Rys. 3.** Diagram fazowy stabilności białek. Wnętrze elipsy wyznacza granice istnienia formy biologicznie czynnej białka. [12]

W przypadku, gdy  $\Delta G=0$  wykresy zależności  $p = f(T)$  przedstawiają diagramy fazowe stabilności białek (rys 3). W zależności od warunków białka mogą ulegać denaturacji pod wpływem wysokich ciśnień ( $p$ ), jak również wysokich ( $h$ ) oraz niskich temperatur ( $c$ ).

### III.3.1. Rozpuszczalnik i pH roztworu

Duży wpływ na właściwości i stabilność struktur drugorzędowych białek ma charakter rozpuszczalnika, w szczególności wody. Ze względu na specyficzne właściwości (wysoka: stała dielektryczna, moment dipolowy oraz temperatura wrzenia; mały moment bezwładności), woda bierze udział w: katalizie enzymatycznej, fałdowaniu i stabilności konformacyjnej białek, ich plastyczności (objętości swobodnej i ruchliwości), a także odgrywa ważną rolę w specyficznych oddziaływaniach np. leków przeciwrakowych z DNA. W środowisku wodnym cząsteczki białek otoczone są warstwą hydratacyjną rozpuszczalnika. Powstaje ona w efekcie oddziaływań hydrofobowych, wiązań wodorowych, oddziaływań elektrostatycznych typu dipol-dipol cząsteczek wody z grupami polarnymi (-OH,-SH,-CONH<sub>2</sub>) lub zjonizowanymi grupami (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>,-COO<sup>-</sup>) łańcuchów bocznych, znajdujących się na powierzchni białka oraz sił van der Waalsa. Trwałość wiązań wodorowych pomiędzy polarnymi/zjonizowanymi grupami białek a cząsteczkami wody jest 5-10 razy większa niż w czystej cieczy [13]. Grubość powłoki hydratacyjnej wynosi średnio 4-8 Å. W wyniku oddziaływania następuje uporządkowanie cząsteczek wody wobec niepolarnych składników związane z obniżeniem entropii oraz wzrostem entalpii swobodnej, co jest niekorzystne termodynamicznie. W wyniku tego reszty hydrofobowe są ukryte wewnątrz

cząsteczek białek a grupy hydrofilowe są na powierzchni. Otoczka wodna chroni te cząsteczki przed łączeniem się w większe zespoły, a tym samym przed wytrącaniem z roztworu. Jednocześnie w roztworach wodnych istnieje tendencja do zmniejszania kontaktu z grupami niepolarnymi co może zachodzić poprzez samorzutną agregację. Proces ten związany jest ze zmniejszeniem entalpii swobodnej a tym samym jest korzystny termodynamicznie. Proces hydratacji cząsteczek białek nie jest jeszcze do końca wyjaśniony. Obecnie wśród badaczy przeważa pogląd, że cząsteczki wody w pobliżu białek ulegają ciągłym powolnym zmianom. Dynamika wody jest wynikiem oddziaływania z grupami hydrofilowymi, jak również hydrofobowymi. Czynniki hydrofobowe powodują lokalne zmiany w otaczającej warstwie.

W niektórych przypadkach w wyniku rozciągania cząsteczek białek może dojść do nieodwracalnej agregacji białek. Reaktywność i ruchliwość białek rośnie w miarę wzrostu stopnia wilgotności, w wyniku czego wzrasta prawdopodobieństwo zajścia reakcji denaturacji, agregacji, utleniania, podziału czy usuwania grup amidowych (deamidacji). W warunkach przemysłowych białka produkowane są metodą liofizacji (suszenia sublimacyjnego przy zredukowanym ciśnieniu- „freeze-dried – lyophilized”), która zapewnia minimalny poziom wody.

W obecności niektórych rozpuszczalników organicznych cząsteczki białek ulegają denaturacji. Proces ten związany jest z usuwaniem cząsteczek wody z warstwy hydratacyjnej, co powoduje zmianę zwartej globularnej struktury trzeciorzędowej białek w nieaktywne biologicznie, nieuporządkowane łańcuchy polipeptydowe. Badania zachowania lizozymu w obecności formamidu i dimetyloformamidu (DMF), dimetylosulfotlenku (DMSO) wykazały, że polarne rozpuszczalniki mogące tworzyć silne wiązania wodorowe z fragmentami białka a tym samym zastępować wodę, zwykle powodują denaturację białek. Alkohole powodują zmiany struktury trzeciorzędowych białek (np.  $\beta$ -laktoglobulin lub cytochromu) bez makroskopowej zmiany struktur drugorzędowych, choć metanol powoduje denaturację białek. Stabilność białek w rozpuszczalnikach organicznych można zwiększyć poprzez tworzenie szczelnych warstw hydratacyjnych wokół białka poprzez: dodatek surfaktantu lub czynników silnie hydrofilowych (np. polimerów). Duży wpływ na stabilność oraz właściwości białek ma kwasowość środowiska (wartość pH). W wyniku działania silnych kwasów zmniejsza się stopień dysocjacji grup karboksylowych. Grupy te tracą wówczas ładunek elektryczny, co jest przyczyną rozerwania wiązań jonowych przy jednoczesnej destrukcji wiązań wodorowych. Mocne zasady zubożniają grupy amoniowe w wyniku czego w skrajnych przypadkach może dojść do fragmentacji łańcucha peptydowego na skutek zerwania wiązań peptydowych. Zmiany pH roztworów wpływają silnie na ładunek cząsteczek białek. Zmienność konformacji zależna od pH wynika z nierównomiernego rozmieszczenia ładunków w cząsteczce białka, które powoduje labilność wiązań jonowych. Dlatego nawet niewielkie zmiany pH, przez zmianę siły wiązań jonowych zmieniają strukturę trzeciorzędową cząsteczek. Ma to szczególnie



istotne znaczenie dla białek biologicznie czynnych (np. enzymów), gdyż ich aktywność zależy ściśle od konformacji cząsteczek. Istnieje taka wartość pH, dla której ładunek powierzchniowy białka jest zerowy (pI). W tabeli 2 przedstawiono masy cząsteczkowe i wartości odpowiadające punktowi izoelektrycznemu niektórych białek.

**Tabela 2.** Masy cząsteczkowe i wartości punktów izoelektrycznych wybranych białek. [14]

Białko	Masa cząsteczkowa g/mol	Punkt izoelektryczny
mioglobina	17 000	7
$\beta$ -laktoglobulina	18000 - 36000	5,2
ovomukoidy	28 000	4,1
ovoglikoproteina	30 000	4,1
pepsyna	34 600	<1
kwasy $\alpha_1$ -glikoproteinowy	41 000	2,7
ovalbumina	45 000	4,7
HSA	66 000	4,7
BSA	66 466	4,7-4,9
conalbumina	70 000 - 78000	6,1-6,6
glukoamylaza	97 000	5
ferrytyna	450 000	4,4

Bardzo ważne dla rozpuszczalności białek jest stężenie elektrolitu. Często konieczne jest utrzymanie pewnego stężenia soli, aby w roztworze utrzymać białko o znacznej asymetrii rozmieszczenia ładunku (np. albumina surowicy). Ten efekt zwiększenia rozpuszczalności białka w wyniku dodania soli związany jest z agregacją lub asocjacją cząsteczek białka. Jony soli gromadzą się na powierzchni cząsteczki białka i silnie podwyższają stopień hydratacji, co powoduje podwyższenie rozpuszczalności. Zarówno kationy jak i aniony odgrywają dużą rolę w procesie rozpuszczania białek. Zostały one sklasyfikowane w szereg Hofmeistera [15-17] :

	←	Wzrost efektu wysalania	→
Aniony:		$\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Br}^-$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{ClO}_4^-$ , $\text{I}^-$ , $\text{SCN}^-$	
Kationy:		$\text{NH}_4^+$ , $\text{Rb}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Na}^+$ , $\text{Li}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Ba}^{2+}$	
		→	←
		Wzrost efektu rozpuszczania	

Efekt wytrącenia białka na skutek dodania soli do roztworu (wysalanie) związany jest z odwodnieniem cząsteczki białka, co jest wynikiem koniecznej

hydratacji dużego nadmiaru elektrolitu. Ponieważ różne białka wytrącają się przy różnym stężeniu elektrolitu, metodę wysalania zalicza się do bardzo ważnych metod wstępnego rozdzielania mieszaniny białek w łagodnych warunkach.

### III.3.2. Temperatura i ciśnienie

Jedną z cech charakterystycznych białek jest silna zależność struktury od temperatury. Białka ulegają denaturacji termicznej zarówno w wysokich jak i niskich temperaturach. W wysokich temperaturach następuje rozrywanie wiązań wodorowych oraz hydrofobowych, co prowadzi do zmiany agregacji. Zmiany te prowadzą do agregacji oraz wytrącenia białka (koagulacji). Proces ten zależy od rodzaju i zawartości aminokwasów w strukturze białka. Termiczna stabilność aminokwasów tworzących białka zmienia się w szeregu [18]: Val, Leu>Ile>Tyr>Lys>His>Met>Thr>Ser>Trp>Asp, Glu, Arg, Cys (pełne nazwy aminokwasów zamieszczono w tabeli Z1 w załączniku do skryptu B11).

Proces denaturacji albumin przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie ogrzewania do około 65 °C (maksimum pików na termogramie DSC) następuje częściowe rozwijanie struktur spiralnych, a cząsteczki przegrupowują się w struktury „dywanowe” przy udziale wyłącznie wiązań wodorowych. Powyżej temperatury 65°C stopniowo odsłaniana jest grupa –SH (cys-34) [19], w wyniku czego mogą się tworzyć mostki siarczkowe (S-S) pomiędzy monomerami, a sam proces jest nieodwracalny. Proces ten w dużej mierze zależy od czasu ogrzewania próbki. W zależności od charakteru białka procesy towarzyszące ogrzewaniu mogą zachodzić wieloetapowo.

Zimna denaturacja jest wynikiem oddziaływania niepolarnych grup białek z wodą [20]. Zachodzi ona w obszarze wysokiego ciśnienia (>0,2 GPa). Zmniejszenie temperatury powoduje rozwijanie natywnej struktury białek w wyniku działania niskich temperatur, a tym samym odsłonięcia wewnętrznych grup niepolarnych. Z obniżeniem temperatury zmniejsza się potencjał termodynamiczny hydratacji, co sprawia, że proces ten jest korzystny termodynamicznie. Zmiany te wynikają z osłabienia hydrofobowych oddziaływań, wzrostu wewnątrzpeptydowych oraz bezpośrednich oddziaływań pomiędzy wodą, polarnymi i zjonizowanymi grupami cząsteczek białek. Proces denaturacji w niskich temperaturach jest całkowicie odwracalny w przeciwieństwie do wysokotemperaturowej denaturacji.

Delikatne struktury białek ulegają odkształceniom pod wpływem wysokich ciśnień. Stan ten charakteryzuje się zmniejszeniem objętości w stosunku do formy natywnej. W zakresie niższych stężeń oraz dostatecznych temperatur tworzą się przypadkowe zwoje. W wyniku kompresji cząsteczek białka cząsteczki wody z warstwy hydratacyjnej przenikają do hydrofobowego rdzenia.

### III.4. Klasyfikacja białek

Istnieje kilka sposobów klasyfikacji białek. Ze względu na budowę, białka można podzielić na proste i złożone. Do *białek prostych* zaliczamy te, które zbudowane są wyłącznie z aminokwasów. Natomiast *białka złożone* składają się z cząsteczki białka prostego połączonego z inną, niebiałkową cząsteczką. Cząsteczkami niebiałkowymi wchodzącymi w skład białek złożonych mogą być: barwniki, fosforany, kwasy nukleinowe, lipidy, węglowodany. Grupy niebiałkowe w białkach złożonych noszą nazwę grup prostetycznych.

Białka proste dzieli się na: protaminy, histony, albuminy, globuliny, prolaminy, gluteliny i skleroproteiny, a za kryterium tego podziału przyjęto rozpuszczalność w wodzie, roztworach soli i etanolu oraz charakter wchodzących w ich skład aminokwasów. Pierwsza grupa należy do polipeptydów, pięć następnych do białek globularnych, a ostatnia do fibrylarnych. Cząsteczki białek globularnych mają kształt eliptyczny o niewielkim stosunku długości do szerokości. Składają się one z pofałdowanych i dodatkowo zwiniętych łańcuchach polipeptydowych utrwalonych różnego typu wiązaniami, w większości kowalencyjnymi. Białka te są w większości łatwo rozpuszczalne w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli. Białka fibrylarne są białkami o dużej asymetrii cząsteczek, tzn. dużym stosunku długości do szerokości. Cząsteczki białek fibrylarnych są zbudowane z rozciągniętych łańcuchów polipeptydowych, połączonych ze sobą różnego typu wiązaniami niekowalencyjnymi. Białka te mają trwałą strukturę i są w większości nie rozpuszczalne w roztworach soli. Głównymi przedstawicielami białek fibrylarnych są białka strukturalne i podporowe takie jak: keratyna, miozyna i kolagen. Z kolei białka złożone, w zależności od charakteru grupy prostetycznej, dzieli się na: fosfoproteiny, glikoproteiny (mukoproteiny), chromoproteiny, nukleoproteiny, metalo-, hemo- i lipoproteiny.

#### III. 4.1. Białka proste

**Protaminy**, ze względu na małą masę cząsteczkową (do 5 kDa) są zaliczane do polipeptydów. Są zbudowane tylko z 8 rodzajów aminokwasów, o znacznej przewadze zasadowych- zwłaszcza argininy, natomiast nie zawierają aminokwasów siarkowych. W związku z taką budową protaminy odznaczają się dużą zawartością azotu (ok. 25%). Mają one charakter silnie zasadowy i są rozpuszczalne w wodzie.

**Histony** są typowymi białkami jądra komórkowego, w którym występują w połączeniu z kwasami nukleinowymi jako nukleoproteiny. Ze względu na ich silnie zasadowy charakter mają właściwości podobne do protamin (choć ich skład aminokwasowy jest bardziej zróżnicowany) oraz zawierają małe ilości aminokwasów siarkowych.

**Albuminy** są bardzo rozpowszechnione w cieczech ustrojowych i ziarnach roślin uprawnych. Są rozpuszczalne w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli, ulegają wysoleniu w obecności większych stężeń siarczanu amonu. W ich skład wchodzi wszystkie aminokwasy z przewagą kwaśnych. Do ważniejszych należą: albumina surowicy krwi, ovalbumina, rycyna oraz leukozyna. Podstawową ich funkcją w tkankach jest regulacja ciśnienia osmotycznego cieczy ustrojowych i wiązanie różnych składników (odżywczych, regulacyjnych).

**Globuliny** są największą, najważniejszą i najbardziej rozpowszechnioną grupą białek, a należy do niej większość enzymów i glikoprotein. Występują w cieczech ustrojowych zwierząt oraz wchodzi w skład białek zapasowych nasion roślin, zwłaszcza motylkowatych. Globuliny są nierozpuszczalne w wodzie, a rozpuszczają się w rozcieńczonych roztworach soli i mogą być wysolone przez ich stężone roztwory. W skład globulin wchodzi wszystkie aminokwasy białkowe.

**Prolaminy** stanowią grupę białek rozpuszczalnych w niższych, rozcieńczonych alkoholach alifatycznych i niektórych aromatycznych. Występują tylko w nasionach traw, np. pszenicy. Prolaminy to białka rozpuszczalne w 80% roztworze etanolu lecz nie rozpuszczalne w wodzie i czystym alkoholu etylowym. Przedstawicielami tej grupy białek są: laktoglobulina, edestina, tuberyna.

**Gluteliny** są rozpuszczalne w rozcieńczonych kwasach i zasadach, natomiast nierozpuszczalne w roztworach soli obojętnych i alkoholach. Występują w nasionach roślin jednoliściennych.

**Skleroproteiny** są dużą grupą białek fibrylarnych występujących u zwierząt jako składniki tkanki łącznej i strukturalnej. Są one szczególnie odporne na działanie rozpuszczalników i enzymów proteolitycznych i występują w formie pseudokrystalicznej. Głównymi przedstawicielami tych białek są: keratyna, kolagen i elastyna.

### III. 4.2. Białka złożone

**Glikoproteiny** zawierają związane kowalencyjnie liczne oligosacharydy o łańcuchu zwykle z 2-10 reszt monosacharydu. Dołączenie sacharydów następuje po pełnej syntezie łańcucha peptydowego w ramach tzw. *modyfikacji potranslacyjnej*. Glikoproteiny są bardzo rozpowszechnione u roślin i zwierząt, gdzie stanowią składniki tzw. cieczy ustrojowych i białek błonowych, również enzymów (np.: hydrolaza acetylocholin, glikoamylaza), hormony białkowe, białka surowicy krwi, wszystkie przeciwciała i substancje grupowe krwi, lektyny. Zawartość sacharydów w glikoproteinach waha się od 3% (albumina jaja) do 50% (albumina gruczołu podszczękowego).

**Chromoproteiny** stanowią chemicznie różnorodną grupę białek, których składnikiem niebiałkowym jest substancja barwna. Grupa ta dzieli się na hemoproteiny, zawierające układ hemowy, związany z jonem  $Fe^{2+}$  oraz inne

chromoproteiny, w których występują inne składniki barwne związane z białkiem zwykle odwracalnie. Do chromoprotein należą: hemoglobina i mioglobina, odpowiedzialne za dostarczanie organizmom zwierzęcym tlenu, cytochromy, transportujące elektrony w głównych procesach oksydoredukcyjnych wszystkich organizmów, leghemoglobina uczestnicząca w wiązaniu  $N_2$  przez bakterie oraz niektóre enzymy (peroksydaza, katalaza). Z innych chromoprotein należy wymienić fikobiliny i fikocyjaniny oraz fitochromy, zawierające tetrapirołowe układy otwarte (bez jonu metalu), melanoproteiny, czyli substancje barwne skóry oraz pochodne karotenowe - rodopsyny - uczestniczące w procesie widzenia.

**Metalo**proteiny zawierają różne jony metali związane bezpośrednio z białkiem: należą do nich tzw. ferredoksyny, czyli białka żelazo-siarkowe, a także ferrytyna i ceruloplazmina, flawoproteiny, kompleksy białkowo-chlorofilowe oraz liczne enzymy, w których jon metalu pełni zasadniczą rolę strukturalną lub katalityczną. Znane są białka czynne, zawierające w swoim składzie Mg (fosfatazy), Mn (arginaza), Zn (insulina), Cu (oksydazy), Mo (reduktaza azotanowa) i in.

**Nukleoproteiny** obejmują grupę polipeptydów i białek, głównie zasadowych, które są związane w kompleksy z kwasami nukleinowymi (DNA i RNA) za pomocą wiązań kowalencyjnych. Występują w jądrach komórkowych, gdzie stanowią podstawowy materiał genetyczny komórki, a także w rybosomach, gdzie tworzą kompleksy RNA z białkiem. Ponadto z prawie czystych nukleoprotein są zbudowane wirusy.

**Lipoproteiny** są to białka sprzężone z lipidami. Występują one głównie w bogatych w tłuszcz ziarnach, błonach komórkowych i cytoplazmatycznych, a także w plazmie krwi. Odpowiadają za transport i rozprzestrzenianie lipidów, hormonów, witamin rozpuszczalnych w lipidach itp.

## IV. Część doświadczalna

### A. Aparatura i odczynniki

1. Aparatura:
  - pipety miarowe o pojemności 10 cm<sup>3</sup> – 2 szt.
  - pipety miarowe: 2 i 5 cm<sup>3</sup>
  - kolbki stożkowe pojemność 200 cm<sup>3</sup> – 4 szt.
  - biureta 25 cm<sup>3</sup>,
  - kolbki miarowe: 25 cm<sup>3</sup>, 50 cm<sup>3</sup>, 2 x 200 cm<sup>3</sup>.
2. Odczynniki:
  - 0,05% roztwór zieleni bromokrezolowej rozpuszczonej w 0,002 g/ 100 cm<sup>3</sup> wodorotlenku sodu;
  - 0,05% roztwór błękitu tymolowego rozpuszczonego w 0,0035 g/ 100 cm<sup>3</sup> wodorotlenku sodu;
  - 0,1 M NaOH;
  - 0,1 M HCl;
  - białka: żelatyna i albumina surowicy wołu (BSA – Bovine Serum Albumin)

### B. Wykonanie pomiarów

W kolbkach o pojemności 25 cm<sup>3</sup> przygotować 1 % wodne roztwory żelatyny i BSA .

#### **Uwaga:**

**Roztwory białek silnie się pienią, dlatego należy ostrożnie dodawać wodę i dopiero po całkowitym rozpuszczeniu kryształów uzupełnić do kreski i wymieszać.**

**W celu rozpuszczenia żelatyny w wodzie roztwór należy ogrzać w cieplej wodzie.**

Przygotować dwie kolbki stożkowe: do jednej z nich odmierzyć 5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej do drugiej 5 cm<sup>3</sup> roztworu 1 % żelatyny, oraz do obydwu dodać po 30 kropel zieleni bromokrezolowej (**uwaga: zawsze należy dodawać taką samą liczbę kropel**).

Tak przygotowanych roztworów miareczkujemy za pomocą 0,01 M HCl (przygotowanego wcześniej z 0,1 M HCl) do uzyskania żółtego zabarwienia (w przypadku roztworu białka nie ma ostrej zmiany barwy dlatego należy dodawać odczynnika miareczkującego powoli). Pomiary wykonujemy dwukrotnie dla każdej próbki. W przypadku BSA miareczkujemy 0,025 M HCl.

Do dwóch kolejnych kolbek stożkowych odmierzyć: 5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej do drugiej zaś 5 cm<sup>3</sup> roztworu 1 % żelatyny oraz do obydwu dodać po 30 kropel błękitu tymolowego. Roztwory miareczkujemy za pomocą 0,01 M NaOH (przygotowanego wcześniej z 0,1 M NaOH) do zabarwienia niebieskiego (w przypadku roztworu białka nie ma ostrej zmiany barwy dlatego należy dodawać odczynnika miareczkującego powoli). Pomiary wykonujemy dwukrotnie dla żelatyny jak również roztworu BSA.

### C. Opracowanie wyników

Na podstawie ilości zużytych odczynników miareczkujących oszacować stężenie grup kwasowych oraz zasadowych w każdym białku. Ocenić, kiedy białko występowało w postaci anionowej, a kiedy w kationowej oraz wyjaśnić (korzystając z tabeli Z1 i Z2 w załączniku do skryptu B11), które aminokwasy są odpowiedzialne za zróżnicowanie właściwości kwasowo zasadowych.

#### Literatura:

- [1] D. Sternik, *Badanie właściwości fizykochemicznych adsorbentów modyfikowanych albuminami*, Praca doktorska, UMCS (2007).
- [2] B. Kasemo, *Surf. Sci.*, 500 (2002) 656.
- [3] K. William, E.Lee, *Drugs*, 30 (1985) 333.
- [4] C.A. Haynes, W. Norde, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 2 (1994) 517.
- [5] G. Kupryszewski, *Wstęp do chemii organicznej*, PWN, Warszawa (1988).
- [6] Z.-Y. Peng, L.C. Wu, B.A. Schulman, P.L. Kim, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 348 (1995) 43.
- [7] [www-rpi-edu](http://www-rpi-edu).
- [8] G.N. Ramachandran, V. Sasisekharan, *Adv. Protein Chem.*, 23 (1968) 283.
- [9] B.D. Hames, N.M. Hooper, *Biochemia*, PWN, Warszawa (2002).
- [10] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa (2005).
- [11] Ch. Scharnagl, M. Reif, J. Friedrich, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1749 (2005) 187.
- [12] K. Heremans, L. Smeller, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1386 (1998) 353.
- [13] B. Bagchi, *Chem. Rev.*, 105 (2005) 3197.
- [14] J. Haginaka, *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 235.
- [15] Y. Zhang, P.S. Cremer, *Current Opinion in Structural Biology*, 10 (2006) 658.
- [16] W. Norde, *Adv. Colloids Interface Sci.*, 25 (1986) 267.
- [17] P.M. Wiggins, *Physica A*, 238 (1997) 113.
- [18] R. Jaenicke, *J. Biotechnology*, 79 (2000) 193.
- [19] N. Matsudomi, Y. Yamamura, K. Kobayashi, *Agricultural Biol. Chem.*, 50 (1986) 1389.
- [20] P.L. Privalov, *Biochem. Mol. Biol.*, 25 (1990) 281.
- [21] L.F. Fieser, M.Fieser, *Chemia Organiczna*, PWN, Warszawa (1958).
- [22] E. Villa-Moruzzi, H.E. Meyer, L.M.G. Heilmeyer, *FEBS*, 202 (1986) 3749.

## **Załącznik do ćwiczenia nr B11**



Tabela Z1. Główne aminokwasy występujące w białkach.

Nazwa (skrót)	Struktura	Nazwa (skrót)	Struktura
Aminokwasy obojętne			
alanina (Ala)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	asparagina (Asn)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
cysteina (Cys)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{SH} \end{array}$	glutamina (Gln)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
glycyna (Gly)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{H} \end{array}$	izoleucyna (Ile)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
leucyna (Leu)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	metionina (Met)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{S} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
feniloalanina (Phe)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	prolina (Pro)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{HN} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} \end{array}$
seryna (Ser)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{OH} \end{array}$	treonina (Thr)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$

cd Tabeli Z1

tryptofan (Trp)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{Indole ring} \end{array}$	tyrozyna (Tyr)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{Benzene ring with OH} \end{array}$
walina (Val)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$		
Aminokwasy kwasowe			
kwas asparaginowy (Asp)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	kwas glutaminowy (Glu)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
Aminokwasy zasadowe			
arginina (Arg)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{NH} \\   \\ \text{C}=\text{NH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	histydyna (His)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{Imidazole ring} \end{array}$
lizyna (Lys)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$		

**Tabela Z2.** Zawartość aminokwasów białkach [21,22] (<sup>a</sup>obliczone teoretycznie wartości sumy często przekraczają 100 g ze względu na absorpcję wody w czasie hydrolizy; <sup>b</sup>łącznie z 14,1 g hydroksyprowliny; <sup>c</sup>łącznie z 5,8 g kwasu nukleinowego).

Białka	Aminokwasy g/100g białka																Suma <sup>a,b</sup>		
	alanina	arginina	cysteina i cystyna	feniloalanina	glicyna	histydyna	izoleucyna	kwas asparaginowy	kwas glutaminowy	leucyna	lizyna	metionina	prolina	seryna	treonina	tryptofan		tyrozyna	walina
Albumina jaja		5,6	3,6		1,5			8,1	16,1	5,1	5,1					1,3	4,1		50,5
Albumina surowicy byka		6,2		6,8	2	4,3	2,8	10,6	17	10,2	10,2	0,7			6,4	0,4	5,5	6,5	89,2
Albumina surowicy ludzkiej		6,2	6,3	7,8	1,6	3	1,7	10,4	17,4	11	12,3	1,3	5,1	3,7	5	0,2	4,7	7,7	105,4
Edestyna	3,6	18,3	1	6,2	3,8	3,3	6,9	12,6	19,7	7,2	2,4	2,1	4,1	0,3	3,9	0,9	3,7	6,2	106,2
Fibroina (jedwab)	24,5	1,05		42,3	0,5					0,8	0,4		1,5	12,6	1,5		10,6	3,5	98,9
Globina (końska)	4,2	3,7	1	6,8	5,6	7,6	13,9	10,3	8,5	15,1	8,6		2,3	0,6		1,3	3		92,5
Hormon laktogeny		8,6		4,1	4	4,5	7,2	11,6	13,8	12,5	5,3	3,6	6,2	6,5	4,8	1,2	4,6	5,9	104,4
Hormon wzrostu	3,8	9,1		7,9	2,65	4		9	13,2	12,1	7,1	3			0,88		4,8	3,9	81,4
Insulina		3	12	1	4				21	30	2		10	4	3		12		102
Kazeina	1,9	4,1	0,3	5,4	0,5	3,1	8,3	7,5	22,5	10,1	8,9	2,7	12		4,3	1,3	6,6	6,8	106,3
Keratyna (wełna)	4	10,6	13,7	4	1	1,1	4,5	7,2	15,6	8,1	3,3	0,6	8,1		6,7		5,6	5,7	99,8
Keratyna (włosy)		10,9	14,4	2,7	1,1	1,1	4,7	8	17,9	8,3	3,8	0,5	9,6		6,3		3,5	5,9	97,6
Kalogen (żelatyna)	8,7	8	0,1	2,2	25,5	0,8	1,4	6,7	11,5	4,1	4,1	1	18,1	0,4	1,9		0,4	2,5	110,5 <sup>b</sup>
β-Laktoglobina	5,7	2,6	2,9	3,4	1,1	1,4	5,1	10	16,8	13,4	11	2,8	4,3	3,3	4,2	1,8	3,3	4,8	97,9
Salmina (protamina)	3,6	88,4		6			1,5						7,9	7				4,1	112,5
Wirus mozaiki tytoniowej	2,4	9	0,7	6				2,6	5,3	6,1			4,6	6,4	5,3	4,5	3,9	3,9	82,8 <sup>c</sup>