

## Ćwiczenie nr XVI

# ROZPUSZCZALNOŚĆ BIAŁEK W WODZIE. WYZNACZANIE PUNKTU IZOELEKTRY- CZNEGO KAZEINY NA PODSTAWIE JEJ ROZPUSZCZALNOŚCI

### I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest poznanie rozpuszczalności białek w wodzie jako funkcji pH i wyznaczenie na tej podstawie ich punktu izoelektrycznego.

### II. Zagadnienia wprowadzające

1. Hierarchiczna budowa białek.
2. Podział białek.
3. Właściwości fizykochemiczne białek.
4. Funkcje białek.
5. Punkt izoelektryczny białek.
6. Budowa i właściwości funkcjonalne białek mleka.

#### Literatura obowiązuja:

1. Praca zbiorowa pod red. Gawęckiego J., Białka w żywności i żywieniu, Wyd. AR w Poznaniu, Poznań 2003.
2. Kączkowski J., Podstawy biochemii, WNT, Warszawa 2004.
3. Obrusiewicz T., Mleczarstwo, cz. II, WSiP, Warszawa 1992
4. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., Biochemia, PWN, Warszawa, 2005
5. Darewicz M., Dziuba J., Struktura a właściwości funkcjonalne białek mleka, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2005, 2 (43), 47 – 60.

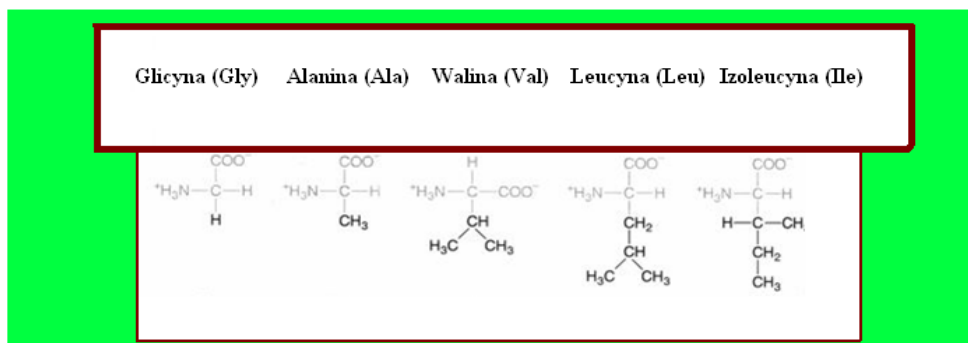
### III. Część teoretyczna

#### III. 1. Hierarchiczna budowa białek

Białko (proteina) – pojęcie po raz pierwszy wprowadzone przez Jonsa Berzeliusa w 1883 r. w celu podkreślenia znaczenia tej grupy związków, z greckiego (*proteios*) oznacza pierwszorzędny, o głównym znaczeniu. I rzeczywiście białka stanowią najważniejszą grupę związków biologicznie czynnych. Są głównym składnikiem skóry, mięśni, ścięgien, nerwów, tkanki łącznej ponadto do tej grupy związków zalicza się takie substancje jak enzymy, hormony, przeciwciała. Białka mogą być magazynowane w komórkach roślin, spełniając funkcje zapasowe (gluten). Białka są zbudowane z cząsteczek L - aminokwasów o wzorze ogólnym R-CH(NH<sub>2</sub>)-COOH i powstają w wyniku polikondensacji tych L-aminokwasów. Reakcja ta zachodzi przy udziale wyspecjalizowanych kompleksów enzymatycznych – rybosomów, we wszystkich komórkach organizmów żywych i jest określana mianem translacji. Aminokwasy są podstawowymi elementami białek. Składają się z: grupy aminowej, grupy karboksylowej, atomu wodoru oraz specyficznego dla każdego aminokwasu łańcucha bocznego. Aminokwasy różnią się jedynie łańcuchami bocznymi – reszta elementów pozostaje niezmienną. Na tej podstawie aminokwasy można podzielić na związki zawierające:

- alifatyczny łańcuch boczny (glicyna, alanina, Walina, Leucyna, Izoleucyna), w tym z drugorzędową grupą aminową (prolina),
- alifatyczny łańcuch boczny z grupą hydroksylową (seryna, treonina),
- aromatyczny łańcuch boczny (fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan),
- zasadowy łańcuch boczny (lizyna, arginina, histydyna),
- kwasowy łańcuch boczny (asparginian, glutaminian),
- amidowy łańcuch boczny (asparagina, glutamina),
- atomy siarki w łańcuchu bocznym (cysteina, metionina),

oraz nietypowe aminokwasy (pochodne) np. hydroksyprolina.



Rys. 1. Aminokwasy z alifatycznym łańcuchem bocznym.

Wszystkie te elementy skupione są wokół centralnego atomu węgla. Centralny węgiel połączony jest z czterema różnymi podstawnikami, co powoduje, że jest on asymetryczny. Związane jest to z dwoma możliwymi ułożeniami grup otaczających węgiel. Te dwie formy nazywa się izomerami optycznymi. W przestrzeni trójwymiarowej nie jest możliwa zamiana ich w siebie bez zniszczenia struktury. Są one wzajemnymi odbiciami lustrzanymi, przy czym wszystkie aminokwasy w naturze występują w formie L. Jedynym aminokwasem, który jest optycznie nieczynny jest glicyna. W roztworze obojętnym aminokwasy występują w formie jonów obojnych, czyli grupa aminowa ( $\text{NH}_2$ ) posiada ładunek dodatni ( $\text{NH}_3^+$ ), a grupa karboksylowa ( $\text{COOH}$ ) – ujemny ( $\text{COO}^-$ ). Gdy pH otoczenia ulegnie zmianie, zmienia się też stan jonizacji cząsteczki aminokwasu. Wraz ze zmniejszeniem stężenia jonów wodoru (wzrostem pH) zaczyna przeważać forma o niezjonizowanej grupie  $\text{NH}_2$ . Gdy wzrasta stężenie jonów wodoru (spadek pH), grupa aminowa ulega jonizacji podczas, gdy grupa karboksylowa przyjmuje formę  $\text{COOH}$ . W białkach występuje zestaw 20 podstawowych aminokwasów. Ten zestaw jest jednolity dla całego świata żywego. Grupy boczne różnić się mogą: kształtem, wielkością, ładunkiem elektrycznym, reaktywnością, zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych i hydrofobowych.

Biorąc pod uwagę właściwości grupy bocznej, aminokwasy można podzielić na: hydrofobowe i hydrofilowe, a w obrębie tej grupy dodatkowo na kwasowe, zasadowe i nienaładowane. Na podstawie kodu genetycznego są syntetyzowane polipeptydy o ściśle określonej sekwencji aminokwasów. W zależności od liczby aminokwasów, można wyróżnić dipeptydy, tripeptydy, itd. Dla peptydów utworzonych z kilku do kilkunastu aminokwasów stosuje się ogólną nazwę – oligopeptydy, natomiast dla cząsteczek zbudowanych z kilkudziesięciu (do ok. 100) aminokwasów – polipeptydy. Białka to związki wielkocząsteczkowe (makromolekularne), których pojedyncze łańcuchy polipeptydowe mogą dochodzić do ponad 1000 cząsteczek aminokwasów. Rodzaj i wzajemne powiązania aminokwasów wchodzących w skład łańcucha polipeptydowego, decydują o charakterze, funkcji i właściwościach fizykochemicznych cząsteczki. Zsyntetyzowany w komórce łańcuch białkowy przypomina unoszącą się swobodnie w roztworze "nitkę", która może przyjąć dowolny kształt (w biofizyce nazywa się to *kłębką statystycznym*), ale ulega procesowi tzw. *zwijania/rozwijania białka* (ang. *protein folding/unfolding*) tworząc mniej lub bardziej sztywną strukturę przestrzenną, zwaną *strukturą* lub *konformacją białka* natywną. Tylko cząsteczki, które uległy zwinięciu do takiej struktury, mogą pełnić właściwą danemu białku rolę biochemiczną.

Ze względu na skalę przestrzenną pełną strukturę białka można opisać na czterech poziomach:

- **Struktura pierwszorzędowa białka**, zwana również strukturą pierwotną - jest określona przez sekwencję (kolejność) aminokwasów w łańcuchu białkowym. Mają ją zarówno polipeptydy, jak i białka; utrzymują ją wiązania peptydowe – kowalencyjne)

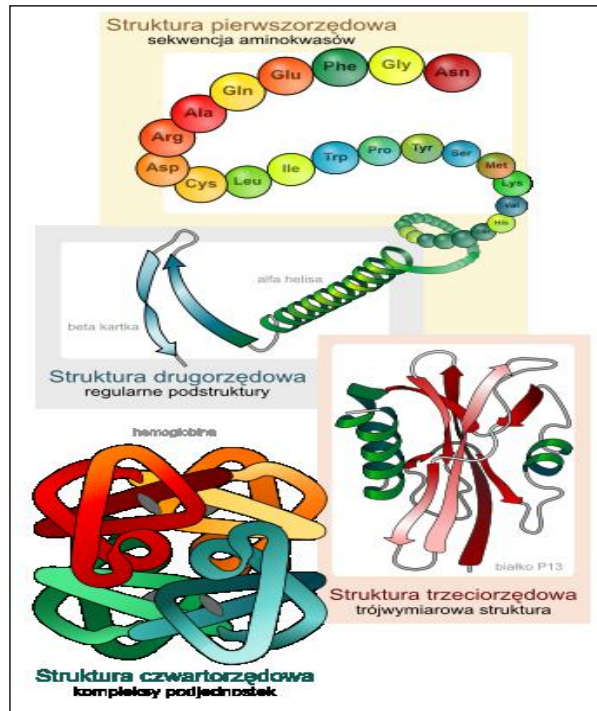
- **Struktura drugorzędowa białka** - są to lokalne struktury powstające w wyniku tworzenia się **wiązań wodorowych** pomiędzy tlenem grupy  $-C=O$ , a wodorem grupy  $-NH$ , dwóch niezbyt odległych od siebie w łańcuchu wiązań peptydowych. Do struktur drugorzędowych zalicza się:
  - **helisę** - gł. *helisę alfa* (ang.  *$\alpha$  helix*)
  - **beta nici** tworzące "pofałdowane kartki" (ang.  *$\beta$ - sheets*)
  - **beta zakręt** (ang. *turn*)

Cały łańcuch polipeptydowy składa się z regularnych układów wiązań peptydowych, a reszty aminokwasowe są skierowane w bok – układ ten samoorganizuje się w strukturę  $\alpha$ -helisy – stabilizacja przez wiązania wodorowe; strukturę „pofałdowanej kartki” przybiera mniejszość białek. Białko, które ma strukturę  $\alpha$ -helisy może przekształcić się w strukturę „pofałdowanej kartki”, polegającą na zmianie układu wiązań wodorowych. Za budowę struktury II-rzędowej odpowiadają wiązania wodorowe między wiązaniami peptydowymi. Wiązania wodorowe stabilizujące helisę  $\alpha$  powstają między grupą karbonylową jednego aminokwasu i grupą iminową aminokwasu umiejscowionego w łańcuchu o trzy jednostki aminokwasowe wcześniej.

- **Struktura trzeciorzędowa białka** - wzajemne położenie elementów struktury drugorzędowej stabilizowane przez oddziaływania *reszt aminokwasowych* oraz tworzenie *mostków dwusiarczkowych*  $-S-S-$ , powstających pomiędzy dwiema resztami cysteiny, dwiema resztami metioniny lub też jeden z metioniny drugi zaś z cysteiny w łańcuchu. Jest to konformacja natywna, jeżeli zmienić trochę układ tej przestrzeni, białko praktycznie przestaje istnieć; jeżeli zniszczymy mostki dwusiarczkowe, a następnie utlenimy grupy tiolowe, by stworzyły nowe mostki dwusiarczkowe, to mimo, że te mostki powstaną, białko nie będzie już działać; struktura ta stabilizowana jest właśnie przez mostki siarczkowe, są to wiązania silne, kowalencyjne, drugi typ oddziaływań to oddziaływania Van der Waalsa. Innym rodzajem oddziaływań są „*mostki solne*” – jeżeli aminokwas ma dodatkową grupę aminową albo karboksylową, to w środowisku fizjologicznego pH organizmu aminokwasy zwykle są zdysocjowane i te różnoimienne ładunki mogą się przyciągać.
- **Struktura czwartorzędowa białka** - przestrzenna budowa białka zbudowanego z kilku łańcuchów polipeptydowych oraz zawierającego w swojej budowie jakąś część nie będącą częścią białka (np.: cukier lub barwnik) - np: hemoglobina może przybierać czwartorzędową budowę białka, gdyż poza kilkoma łańcuchami polipeptydowymi posiada jeszcze barwnik - hem.

Według najnowszej klasyfikacji białka mają tylko trzy rzędy budowy. Budowa trzeciorzędowa odpowiada trzeciorzędowej i czwartorzędowej razem według starej klasyfikacji. Powodem zmiany były trudności w klasyfikacji struktur niektórych

białek oraz brak czwartorzędowej innych. Dopuszcza się stosowanie obu klasyfikacji w okresie przejściowym.



Rys. 2. Hierarchiczna budowa białek.

### III. 2. Podział białek

Białka dzielimy ze względu na ich budowę, właściwości fizykochemiczne oraz funkcje.

1. *Ze względu na budowę białka dzielimy na:* A) *proste* (proteiny) - cząsteczki zbudowane są wyłącznie z łańcuchów polipeptydowych, np. albumina; B) *złożone* (proteidy) - cząsteczki zawierają nie tylko łańcuchy polipeptydowe, ale także składniki niepeptydowe, np.: jony metalu, np. hemoglobina.

A) Białka proste:



### **Albuminy**

Białka rozpuszczalne w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli. Szeroko rozpowszechnione w przyrodzie: znajdują się w surowicy krwi, w limfie, mleku, jajach, mięśniach kręgowców (mioalbumina, miogen), w nasionach roślin strączkowych (legumina w grochu) i zbóż (leukosina w jęczmieniu, życie i pszenicy).

### **Globuliny**

Białka nierozpuszczalne w czystej wodzie, ale rozpuszczają się w rozcieńczonych roztworach soli obojętnych. Bardzo łatwo ulegają ścięciu (denaturacji). Do białek tych należą globuliny surowicy krwi, globulina mleka, fibrynogen osocza, miozyn mięśni, tyreoglobulina (hormon tarczycy), tuberyna (z ziemniaków). Do globulin należą też ciała odpornościowe (immunoglobuliny).

### **Gluteliny**

Rozpuszczalne w rozcieńczonych roztworach kwasów i zasad, a nierozpuszczalne w wodzie i roztworach soli. Zawierają znaczne ilości aminokwasu - kwasu glutaminowego i glutaminy oraz proliny. Występują w nasionach roślin dwuliściennych, ale w największych ilościach w ziarnach zbóż (glutelina w pszenicy).

### **Prolaminy**

Prolaminy zwane też są gliadynami. Rozpuszczają się w 70-80% alkoholu. Występują wyłącznie w ziarnach zbóż.

### **Skleroproteiny**

Występują tylko w organizmach zwierzęcych, głównie w tkankach podporowych i ochraniających. Należą tu przede wszystkim białka tkanki łącznej (kolagen, elastyna), włosów i części zrogowociałych (keratyna). Nie rozpuszczają się ani w wodzie, ani w rozcieńczonych roztworach kwasów i ługów. Skleroproteiny są odporne na działanie enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego ludzi.

### **Histony**

Zasadowe białka jąder komórkowych, w których występują w połączeniach z kwasami nukleinowymi, tworząc nukleoproteidy. Histony są dobrze rozpuszczalne w wodzie i w rozcieńczonych roztworach kwasów.

### **Protaminy**

Białka silnie zasadowe. Występują w plemnikach ryb, gdzie tworzą połączenia z kwasami nukleinowymi. Nie zawierają aminokwasów siarkowych (metionina, cysteina), są dobrze rozpuszczalne w roztworach kwasów.

B) Białka złożone:



### **Chromoproteidy**

Złożone z białek prostych i grupy prostetycznej - barwnika. Należą tu hemoproteidy (hemoglobina, mioglobina, cytochromy, katalaza, peroksydaza) zawierające układ hemowy oraz flawoproteidy.

### **Fosfoproteidy**

Zawierają około 1% fosforu w postaci reszt kwasu fosforowego. Do tych białek należą: kazeina mleka, witelina żółtka jaj, ichtulina ikry ryb.

### **Nukleoproteidy**

Składają się z białek zasadowych i kwasów nukleinowych. Rybonukleoproteidy są zlokalizowane przede wszystkim w cytoplazmie: w rybosomach, mikrosomach i mitochondriach, w niewielkich ilościach także w jądrach komórkowych, a poza jądrem tylko w mitochondriach. Wirusy są zbudowane prawie wyłącznie z nukleoproteidów.

### **Lipoproteidy**

Połączenia białek z tłuszczami prostymi lub złożonymi, sterydami. Lipoproteidy są nośnikami cholesterolu (LDL, HDL, VLDL).

### **Glikoproteidy**

Grupę prostetyczną stanowią cukry, należą tu min mukopolisacharydy (ślina). Glikoproteidy występują też w substancji ocznej i płynie torebek stawowych.

### **Metaloproteidy**

Zawierają jako grupę prostetyczną atomy metalu (miedź, cynk, żelazo, wapń, magnez). Atomy metalu stanowią grupę czynną wielu enzymów.

**2. Podział ze względu na powiązanie budowy z funkcją:** A) część funkcjonalna – zawierająca centrum katalityczne reakcji, B) część strukturalna – najczęściej hydrofobowa, kotwicząca białko w błonie lipidowej.

**3. Podział ze względu na rozpuszczalność w wodzie:** A) hydrofobowe (nierozpuszczalne, fibrylarne) - występują najczęściej w błonach komórkowych, B) hydrofilowe (rozpuszczalne, globularne) - występują najczęściej w cytoplazmie.

**4. Podział ze względu na pełnioną funkcję:** A) enzymy – receptory, B) zapasowe – strukturalne, C) transportujące - przeciwciała (białka ochronne), D) kurczliwe – regulatorowe, E) hormony, F) toksyny.

**5. Podział białek ze względu na kształt cząsteczki:** A) białka fibrylarne – tworzą struktury włókniste, B) białka globularne – tworzą kształty kuliste lub elipsoidalne.

### III. 3. Właściwości fizykochemiczne białek

Białka nie posiadają charakterystycznej dla siebie temperatury topnienia. Przy ogrzewaniu w roztworze, a tym bardziej w stanie stałym, ulegają, powyżej pewnej temperatury, nieodwracalnej denaturacji (ściananie się włókien białka) - zmianie struktury, która czyni białko nieaktywnym biologicznie (codziennym przykładem takiej denaturacji jest smażenie lub gotowanie jajka). Jest to spowodowane nieodwracalną utratą trzeciorzędowej lub czwartorzędowej budowy białka. Z tej przyczyny dla otrzymania suchej, ale niezdenaturowanej próbki danego białka, stosuje się metodę liofilizacji, czyli odparowywania wody lub innych rozpuszczalników z zamrożonej próbki pod zmniejszonym ciśnieniem. Denaturacja białek może również zachodzić pod wpływem soli metali ciężkich, mocnych kwasów i zasad, niskocząsteczkowych alkoholi, aldehydów oraz napromieniowania. Wyjątek stanowią proste białka, które mogą ulegać także procesowi odwrotnemu, tzw. renaturacji - po usunięciu czynnika, który tę denaturację wywołał. Niewielka część białek ulega trwałej denaturacji pod wpływem zwiększonego stężenia soli w roztworze, jednak proces wysalania jest w większości przypadków w pełni odwracalny, dzięki czemu umożliwia izolowanie lub rozdzielanie białek. Białka są na ogół rozpuszczalne w wodzie. Do białek nierozpuszczalnych w wodzie należą tzw. białka fibrylarne, występujące w skórze, ścięgnach, włosach (kolagen, keratyna) lub mięśniach (miozyna). Niektóre z białek mogą rozpuszczać się w rozcieńczonych kwasach lub zasadach, jeszcze inne w rozpuszczalnikach organicznych. Na rozpuszczalność białek ma wpływ stężenie soli nieorganicznych w roztworze, przy czym małe stężenie soli wpływa dodatnio na rozpuszczalność białek. Jednak przy większym stężeniu następuje uszkodzenie otoczki solwatacyjnej, co powoduje выпадanie białek z roztworu. Proces ten nie narusza struktury białka, więc jest odwracalny i nosi nazwę wysalania białek. Białka posiadają zdolność wiązania cząsteczek wody. Efekt ten nazywamy *hydratacją*. Nawet po otrzymaniu próbki suchego białka zawiera ona związane cząsteczki wody. Białka, ze względu na obecność zasadowych grup  $-NH_2$  oraz kwasowych  $-COOH$  mają charakter obojętny - w zależności od pH



roztworu będą zachowywały się jak kwasy (w roztworze zasadowym) lub jak zasady (w roztworze kwaśnym). Dzięki temu białka mogą pełnić rolę bufora stabilizującego pH, np. krwi. Różnica pH nie może być jednak znaczna, gdyż białko może ulec denaturacji. Wypadkowy ładunek białka zależy od ilości aminokwasów kwaśnych i zasadowych w cząsteczce.

### 1. Rozpuszczalność

Rozpuszczalność białek w roztworach jest uzależniona od wzajemnego stosunku aminokwasów hydrofobowych i hydrofilowych. Do nierozpuszczalnych w wodzie należą skleroproteiny tkanki łącznej (rogi, paznokcie, włosy) oraz białka wchodzące w skład błon lipidowych (receptory błonowe). Przykładem rozpuszczalnych w wodzie, są białka osocza krwi (globuliny). Wskutek dużych rozmiarów cząsteczek, ich wodne roztwory wykazują typowe właściwości roztworów koloidalnych. O rozpuszczalności decyduje przede wszystkim zdolność do hydratacji. Białko w stanie stałym zmieszane z małą ilością wody tworzy galaretowaty żel. W miarę dodawania rozpuszczalnika białka rozpuszczają się bardziej i powstaje zol. Charakteryzuje się on wysoką lepkością, obniżonym napięciem powierzchniowym, rozpraszaniem światła, tzw. efekt Tyndalla, aktywnością koloido-osmotyczną oraz podatnością na koagulację, czyli zmianę zol-żel pod wpływem różnych czynników. Czynnikiem poprawiającym rozpuszczalność większości białek są niskie stężenia soli, natomiast pod wpływem wysokich stężeń soli, niektórych kwasów, soli metali ciężkich, rozpuszczalników organicznych, a także wysokiej temperatury ( $>50^{\circ}\text{C}$ ) następuje ich wytrącenie z roztworu.

### 2. Właściwości kwasowo-zasadowe.

Białka wykazują właściwości kwasowo-zasadowe, gdyż ich składniki – aminokwasy posiadają grupy funkcyjne zdolne do jonizacji. Białka ulegają specyficznym reakcjom uwarunkowanym obecnością różnych grup funkcyjnych aminokwasów.

## III. 4. Funkcje białek

Właściwości funkcjonalne białek można rozpatrywać jako:

- a) **właściwości powierzchniowe**, np. zdolność do tworzenia i stabilizowania emulsji (powierzchnia międzyfazowa olej/woda), zdolność do tworzenia i stabilizowania piany (powierzchnia międzyfazowa powietrze/woda) czy rozpuszczalność (oddziaływanie woda/białko);
- b) **właściwości hydrodynamiczne** (oddziaływania międzycząsteczkowe) np. żelifikujące czy właściwości tekstury oraz sensoryczne (smak i zapach).

Właściwości funkcjonalne białek wynikają bezpośrednio ze specyficznych cech ich cząsteczek: wielkości, kształtu, elastyczności, podatności na denaturację, sekwencji aminokwasów oraz ich hydrofilowości i hydrofobowości, ładunku i jego rozmieszczenia, zdolności adaptacji całej cząsteczki lub jej domen składowych do zmiennych warunków środowiskowych, charakteru wzajemnych interakcji białek z innymi składnikami np. żywności, a także najważniejszych cech środowiska: pH, temperatury, ciśnienia oraz siły jonowej. Na kształtowanie się właściwości funkcjonalnych białek w żywności wpływa fakt tworzenia przez nie kompleksowych układów z innymi składnikami żywności [53]. Procesy technologiczne, jakim poddawane są surowce żywnościowe, również odgrywają znaczącą rolę w kształtowaniu właściwości funkcjonalnych białek wykorzystywanych w przemyśle żywnościowym.

Białka odgrywają również zasadniczą rolę we wszystkich procesach biologicznych:

- a) *biorą udział w katalizowaniu wielu przemian w układach biologicznych* - enzymy są białkami,
- b) *uczestniczą w transporcie wielu małych cząsteczek i jonów* - np. 1 cząsteczka hemoglobiny przenosząca 4 cząsteczki tlenu,
- c) *służą jako przeciwciała oraz biorą udział w przekazywaniu impulsów nerwowych* jako białka receptorowe.

Białka pełnią także funkcję mechaniczno-strukturalną. Wszystkie białka zbudowane są z aminokwasów. Niektóre białka zawierają nietypowe, rzadko spotykane aminokwasy, które uzupełniają ich podstawowy zestaw. Wiele aminokwasów (zazwyczaj ponad 100) połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi tworzy łańcuch polipeptydowy, w którym można wyróżnić dwa odmienne końce. Na jednym końcu łańcucha znajduje się niezablokowana grupa aminowa (tzw. N-końiec), na drugim niezablokowana grupa karboksylowa (C-końiec).

### III. 5. Punkt izoelektryczny białek

**Punkt izoelektryczny (pI)** – wartość pH, przy której populacja cząsteczek posiadających grupy funkcyjne mogące przyjmować jednocześnie dodatni i ujemny ładunek elektryczny (np. aminokwasy) zawiera średnio tyle samo ładunków dodatnich co ujemnych, na skutek czego ładunek całkowity całej populacji wynosi zero. Stężenie jonu obojnego przyjmuje wtedy maksymalną wartość, a stężenia form anionowej i kationowej mają jednakowe, minimalne stężenie. W przypadku związków słabo rozpuszczalnych występują wtedy też niezdisocjowane cząsteczki. Sytuacja taka może mieć miejsce w dwóch przypadkach:

- w roztworze istnieją wyłącznie jony obojne (tzw. zwitterjony),
- w roztworze istnieje taka sama liczba anionów i kationów.

**Punkt izoelektryczny** jest oznaczany najczęściej w odniesieniu do białek i aminokwasów, metodami polarymetrycznymi, chromatograficznymi (ogniskowanie chromatograficzne, ang. *chromatofocusing*, CF) i elektroforetycznymi (ogniskowanie izoelektryczne, ang. *isoelectrofocusing*, IEF). Ponadto istnieje możliwość wyznaczenia wartości teoretycznej dla białek na podstawie równania Hendersona-Hasselbacha. Dla aminokwasu zawierającego jedną grupę aminową i jedną grupę karboksylową wartość pI można obliczyć w prosty sposób na podstawie wartości pKa1 i pKa2 danej cząsteczki:

$$pI = \frac{pK_a1 + pK_a2}{2}$$

W pH poniżej pI białka mają ładunek dodatni, zaś powyżej ich ładunek jest ujemny. Ma to duże znaczenie w czasie rozdziału metodą elektroforezy. pH żelu elektroforetycznego zależy od użytego buforu. Jeżeli pH buforu jest wyższe od pI białka, to będzie ono migrować w kierunku anody (ujemny ładunek jest przyciągany do niej). Z drugiej strony jeśli pH buforu jest niższe od pI białka będzie ono się poruszać w kierunku ujemnie naładowanej strony żelu. Białko nie będzie migrować jeśli pH buforu i pI danego białka będą sobie równe.

*W punkcie izoelektrycznym białka wykazują minimum rozpuszczalności, lepkości i ruchliwości, a maksimum prędkości koagulacji.*

### III.6. Budowa i właściwości funkcjonalne białek mleka (kazeina)

Kazeina (sernik) jest białkiem z mleka ssaków. Jest ona najważniejszym białkiem mleka. Stanowi ona około ¾ ogólnej ilości białek mleka. Jej zawartość w mleku waha się najczęściej w granicach od 2,3 do 2,6%. Kazeina jest fosfoproteina, tzn. w składzie elementarnym oprócz węgla (53%), wodoru (7%), tlenu (22%), azotu (15,65%) i siarki (0,85%) zawiera także fosfor (0,85%), który występuje tu w postaci reszt orto- i pirofosforanowych, związanych estrowo jako monoestry lub dwuestry - w określonych miejscach cząsteczek – głównie z aminokwasami seryną i treoniną. Kazeina jest także glikoproteina, bo w łańcuchu białka wbudowywane są też reszty cukrowe. Kazeina nie jest białkiem jednorodnym. Stosując metody elektroforetyczne, w jej składzie wyróżniono 20 frakcji różniących się zawartością fosforu, składem aminokwasów, masą cząsteczkową, udziałem sacharydów i innymi właściwościami. Do głównych frakcji kazeiny należą:

- α<sub>s</sub>-kazeiny (strącają się w obecności jonów wapnia),
- β-kazeiny,
- κ-kazeiny (nie strącają się w obecności jonów wapnia)
- γ-kazeiny będące produktami hydrolizy β kazeiny.

W mleku kazeina występuje głównie w postaci sferycznych, silnie porowatych skupisk, zwanych micelami. Micele kazeinowe charakteryzują się znacznymi rozmiarami (średnica od 25 do 300 nm), dlatego w fazie wodnej mleka tworzą roztwór koloidalny (zól). Zostają one uformowane z podjednostek składających się z monomerów poszczególnych frakcji kazeiny połączonych ze sobą za pomocą mostków utworzonych przez jony wapniowe, fosforanowe, a także cytrynianowe. We wszystkich modelach przyjmuje się, że wewnątrz miceli stanowią monomery  $\alpha$ s,  $\beta$  i inne śladowe frakcje kazeinowe, zaś zewnętrzną powłokę – cząsteczki  $\kappa$ -kazeiny zasocjowane z  $\alpha$ s- lub też  $\beta$ -kazeiną, przy czym cząsteczki tych dwóch frakcji mają być zwrócone na zewnątrz miceli (w kierunku frakcji  $\kappa$ ) tą częścią łańcucha polipeptydowego, która zawiera w przewodzie aminokwasy kwaśne. W strukturze micelarnej kazeiny szczególną rolę przypisuje się glikoproteinie -  $\kappa$ -kazeinie. Obecność tylko jednej grupy fosforanowej w jej cząsteczce czyni ją rozpuszczalną w obecności jonów wapnia, a - sacharydowego fragmentu złożonego z galaktozy, N-acetylogalaktozaminy i kwasu N-acetylneuraminowego zwanego makropeptydem, decyduje o silnych właściwościach hydrofilnych. Poza tym łącząc się z cząsteczkami innych frakcji za pomocą wiązań jonowych i hydrofobowych nie ulega wytrąceniu. W świeżym mleku (pH ok. 6.6) micide kazeinowe mają ujemny ładunek elektryczny (przewaga zdysocjowanych grup kwasowych nad zasadowymi), co warunkuje tworzenie się warstw hydratacyjnych otaczających micide (wiązaną cząsteczek wody). Warstwy hydratacyjne o jednoimiennych ładunkach elektrycznych wzajemnie się odpychają, stabilizując roztwór koloidalny kazeiny.

W roztworze wodnym, przy odpowiednio wysokim stężeniu kazeina występuje w postaci miceli i jej roztwory wykazują zależne od stężenia zmętnienie. Poza tym rozpuszczalność kazeiny jest ściśle związana z pH. Między rozpuszczalnością  $c_p$  (wyrażoną w procentach) a pH występuje następująca zależność:

$$\log\left(\frac{c_p}{100 - c_p}\right) = \frac{pH_{50\%} - pH}{D}$$

Dla pH poniżej punktu izoelektrycznego  $pH_{50\%}$  tj. pH o rozpuszczalności 50% jest 3.9, a  $D = -0.36$ . Dla pH powyżej punktu izoelektrycznego,  $pH_{50\%} = 5.4$ , a  $D = 0.31$  do 0.32.

## IV. Część doświadczalna

### A. Aparatura i odczynniki

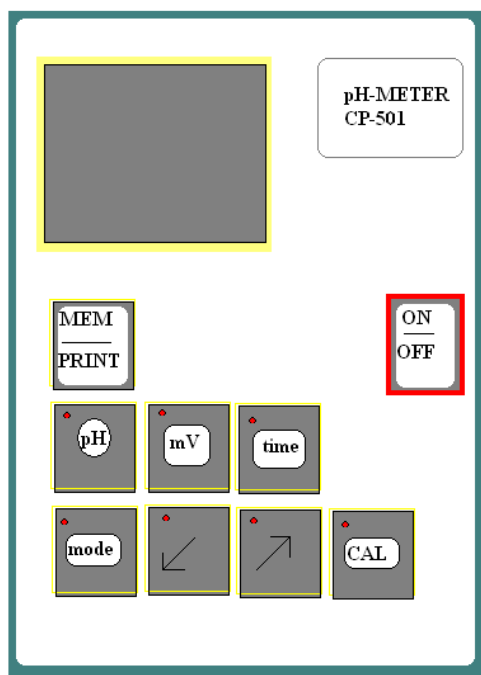
1. Aparatura:
  - Mętnościomierz Hach 2100 AN IS,
  - Mikrokomputerowy pH-metr CP-501,
  - Elektroda zespolona,
  - Mieszadło magnetyczne.
2. Sprzęt:
  - 10 buteleczek o pojemności 100 cm<sup>3</sup>,
  - biureta cyfrowa o pojemności 25 cm<sup>3</sup>,
  - pipeta wielomiarowa o pojemności 5 cm<sup>3</sup>,
  - kuwety do mętnościomierza – 10 szt.,
  - olej silikonowy do czyszczenia kuwet.
3. Odczynniki: roztwór kazeiny o stężeniu 5 g/dm<sup>3</sup> i pH 8-9, roztwór 0.02 M HCl, roztwór 0.1 M HCl, roztwór 0.02 M KOH.

### B. Program ćwiczenia

1. Przygotowanie przyrządów do pomiarów (kalibracja pH-metru).
2. Przygotowanie 10 roztworów kazeiny o pH powyżej 4.8.
3. Pomiar pH i zmętnienia dla tych roztworów.
4. Przygotowanie 10 roztworów kazeiny o pH powyżej 2.0.
5. Pomiar pH i zmętnienia dla tych roztworów.
6. Opracowanie uzyskanych wyników.

### C. Obsługa pH-metr CP-501

1. Włączyć pH-metr CP-501 do sieci i załączyć zasilanie przyrządu za pomocą klawisza ON/OFF (Rys. 3). Przy podłączonym czujniku temperatury przyrząd sam przełącza się na automatyczną kompensację temperatury.
2. Wykonać kalibrację elektrody z użyciem roztworów buforowych. Kalibrację rozpoczyna się od wyboru rozdzielczości oraz metody kalibracji. W tym celu w trybie pomiaru pH nacisnąć klawisz MODE do momentu pojawienia się napisu rES (resolution – rozdzielczość). Klawiszami ↑ lub ↓ wybrać HI (high) wysoką rozdzielczość pomiaru. Następnie przyciskać przycisk MODE do momentu pojawienia się symbolu P.CAL (punkty kalibracji) i klawiszami ↑ lub ↓ wybrać w dolnym wierszu USE. Po wykonaniu tych operacji nacisnąć klawisz pH.



**Rys. 3.** Schemat pH-metru CP-501.

3. Włożyć elektrodę i czujnik temperatury do buforu o  $\text{pH} = 7$  nie dotykając ścianek i dna naczynia, najlepiej stosować statyw.
4. Temperaturę buforów doprowadzić do wartości, dla której wprowadzono wartości tych buforów  $\text{pH}$  do pamięci przyrządu.
5. Nacisnąć i przytrzymać klawisz CAL do momentu pojawienia się na wyświetlaczu symbolu CAL. Dotychczasowe parametry kalibracji wybranej elektrody zostają w tym momencie skasowane, pod wartością  $\text{pH}$  pojawi się symbol P z numerem wykrytego buforu.
6. Odczekać do momentu ustabilizowania wyniku. Po ustabilizowaniu wyniku nacisnąć krótko klawisz CAL. Wynik zapulsuje, co poinformuje o zapamiętaniu wartości.
7. Po zakończeniu kalibracji w pierwszym buforze należy opłukać elektrodę oraz czujnik temperatury w wodzie destylowanej i przystąpić do kalibracji w buforze o  $\text{pH} = 4$  powtarzając czynności opisane w pkt. 3 ÷ 6, a po zakończeniu wyjść z funkcji kalibracji naciskając klawisz pH.
8. Wykonać pomiar  $\text{pH}$ .

Bardzo dokładny pomiar wymaga dłuższego czasu oczekiwania na pełną stabilizację odczytu. Czas ten zależy od rodzaju elektrody. Najszybciej reagujące elektrody wymagają odczekania ok. 10–15 sekund. Dla elektrod standardowych pełna stabilizacja odczytu następuje po okresie oczekiwania ok. 1 minuty.

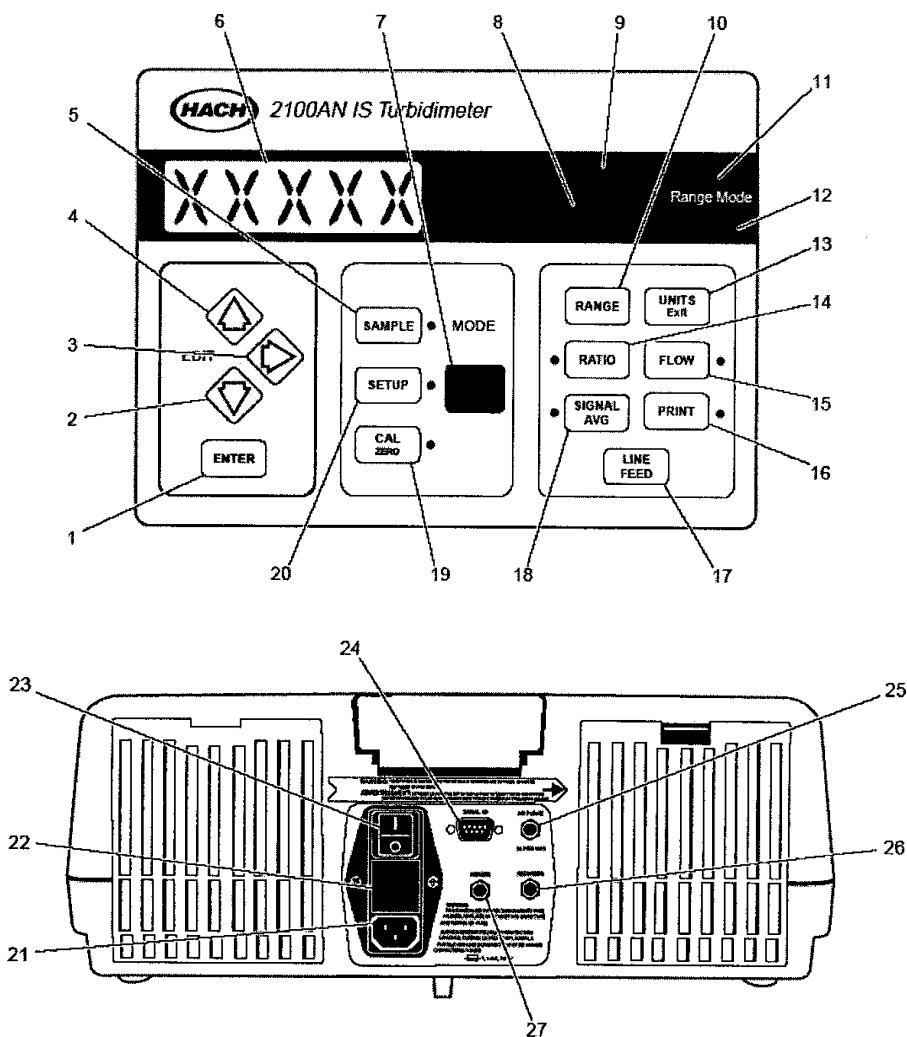
## D. Obsługa mętnościomierza

Mętnościomierz laboratoryjny HACH 2100AN IS jest nefelometrem umożliwiającym pomiar światła rozproszonego lub światła osłabionego zgodnie z międzynarodowymi normami dotyczącymi pomiaru mętności. Na Rys. 4 pokazano płytę czołową i tylną przyrządu wraz z umiejscowieniem wszystkich przycisków sterujących, wskaźników i innych elementów operacyjnych mętnościomierza.

### Kalibracja

Rozwiązania optyczne i elektroniczne zastosowane w mętnościomierzu 2100AN IS zapewniają długotrwałą stabilność i minimalizują potrzebę częstego kalibrowania. Wielodetektorowy układ optyczny kompensuje zmienność występującą w układzie elektronicznym i optycznym pomiędzy kolejnymi kalibracjami.

**Uwaga:** O konieczności kalibracji przyrządu decyduje prowadzący ćwiczenia.



Rys. 4 Schemat mętnościomierza laboratoryjnego HACH 2100AN IS.

1. Uruchomianie przyrządu

W celu włączenia zasilania należy przy zamkniętej pokrywie kuwety pomiarowej nacisnąć włącznik I/O na tylnej ścianie przyrządu. Przyrząd po włączeniu jest od razu gotowy do pracy- nie jest potrzebne nagrzewanie przyrządu.

2. Przygotowanie kuwety do pomiaru

Roztworem z buteleczki napełnić kuwetę do górnej kreski (ok. 30 cm<sup>3</sup> roztworu), trzymając kuwetę w jej górnej części, następnie zakręcić nakrętkę kuwety). Trzymając kuwetę za zakrętkę, przy pomocy ściereczki pokryć zewnętrzne ścianki kuwety olejem silikonowym w celu usunięcia plam i odcisków palców.

3. Umieścić pierwszą kuwetę w komorze pomiarowej przyrządu, tak aby strzałka na kuwecie znajdowała się w linii prostej ze znacznikiem orientacyjnym komory i zamknąć pokrywę.

4. Włączyć uśrednianie sygnału przez naciśnięcie przycisku **SIGNAL AVG**.

5. Wybrać jednostkę pomiarową NTU przez naciśnięcie przycisku **UNITS/Exit**, nacisnąć przycisk **ENTER**, w celu zaktualizowania wskazań.

6. Odczytać i zanotować wynik pomiaru.

7. Kolejno umieszczać następne kuwety w komorze pomiarowej przyrządu – odczekać chwilę na wyświetlenie stabilnego wyniku pomiaru.

8. Odczytać i zanotować wynik pomiaru.

9. Powtarzać pkt. 8 i 9 dla wszystkich przygotowanych kuwet z roztworami.

10. Po zakończeniu wykonywania ćwiczenia kuwety dokładnie umyć i wyłączyć przyrząd wyłącznikiem I/O.

## E. Obsługa biurety cyfrowej





Obsługę biurety rozpoczynamy od odkręcenia czerwonej nasadki na końcówce biurety. Następnie należy:

- włączyć wyświetlacz biurety czarnym przyciskiem z lewej strony w pozycji **On/Off** (na ekranie pojawią się zera),
- ustawić czarny przycisk z prawej strony w położenie **Fill** (strzałka pod zerami na wyświetlaczu ustawiona pod dwoma pierwszymi zerami),
- kręcąc od siebie pokrętką z prawej strony napełnić biuretę (biureta przesuwa się do góry),
- pod plastikową częścią biurety widać metalowe ząbki, a za nimi przezroczysty zbiornik, w którym znajduje się ciecz do miareczkowania. Jeżeli u góry pojemnika widać duży pęcherzyk powietrza wówczas szybkim ruchem do siebie pokrętką z prawej strony usuwamy ciecz z pojemnika. Czynność tę powtarzamy, aż pozbędziemy się powietrza (małe bąbelki mogą pozostać),

**Nie wolno kręcić czarnym pokrętką od siebie jeżeli przycisk nie jest ustawiony na Fill !**

- jeżeli w trakcie powyższych czynności na wyświetlaczu pojawią nam się cyfry, to zerujemy biuretę naciskając przycisk z lewej strony w pozycję **Clear** (na wyświetlaczu pojawią się zera),
- nacisnąć czarny przycisk z prawej strony w pozycję **Titr** (strzałka pod dwoma ostatnimi zerami),
- biureta gotowa do miareczkowania,
- miareczkujemy kolejne próbki kręcąc czarnym pokrętką z prawej strony do siebie,
- w trakcie miareczkowania na wyświetlaczu otrzymujemy objętość cieczy w  $\text{cm}^3$ ,
- po zakończeniu miareczkowania próbki a przed kolejnym miareczkowaniem naciskamy przycisk **Clear** (biureta się zeruje) i ponownie miareczkujemy.
- Biureta całkowicie napełniona zawiera  $25 \text{ cm}^3$  cieczy.
- W trakcie miareczkowania górna część biurety obniża się (widać ile zostało czynnika miareczkującego).
- Gdy w trakcie miareczkowania zabraknie w biurecie cieczy naciskamy przycisk z prawej strony w położenie **Fill** i ponownie napełniamy biuretę (kręcąc pokrętką od siebie).
- Po wykonaniu wszystkich miareczkowań przycisk z prawej strony zostawiamy w pozycji **Fill** i wyłączamy biuretę naciskając czarny przycisk z lewej strony w pozycję **On/Off**.
- Ostatnią czynnością jest zakręcenie czerwonej nasadki na końcówce biurety.

**UWAGA: jeżeli w trakcie posługiwania się biuretą poczujemy zdecydowany opór nie wolno kręcić na siłę – należy zwrócić się do asystenta prowadzącego ćwiczenia !!!**

## F. Sposób wykonania ćwiczenia

### 1. Przygotowanie roztworów kazeiny o określonym pH.

Przygotowanie roztworów kazeiny wykonujemy w dwóch etapach.

**W pierwszym etapie** przygotowujemy roztwory kazeiny o pH wyższym niż jej punkt izoelektryczny (powyżej 4.8). Do dziesięciu buteleczek (zaczynając od nr 1) odmierzamy z biurety kolejno od 47.5 do 43 cm<sup>3</sup> (co 0.5 cm<sup>3</sup>) wody destylowanej i do każdej buteleczki dodajemy po 2 cm<sup>3</sup> roztworu kazeiny. Następnie dodajemy przy ciągłym mieszaniu na mieszadle magnetycznym od 0.5 do 5 cm<sup>3</sup> (co 0.5 cm<sup>3</sup>) 0.02 M roztworu HCl. Dla tak przygotowanych roztworów wykonujemy kolejno pkt. 2 i 3.

**W drugim etapie** przygotowujemy roztwory kazeiny o pH niższym niż jej punkt izoelektryczny (powyżej 2.0). Do dziesięciu buteleczek (zaczynając od nr 1) odmierzamy z biurety kolejno od 45.5 do 41 cm<sup>3</sup> (co 0.5 cm<sup>3</sup>) wody destylowanej i do każdej buteleczki dodajemy po 2 cm<sup>3</sup> 0.1 M HCl i po 2 cm<sup>3</sup> roztworu kazeiny przestrzegając kolejności dodawania. Następnie dodajemy przy ciągłym mieszaniu na mieszadle magnetycznym od 0.5 do 5 cm<sup>3</sup> (co 0.5 cm<sup>3</sup>) 0.02 M roztworu KOH. Dla tak przygotowanych roztworów wykonujemy kolejno pkt. 2 i 3.

### 2. Pomiar pH

W kolejnych buteleczkach (zaczynając od nr 1) umieszczamy elektrodę pH-metru i odczytujemy pH. Wartość pH zapisujemy w odpowiedniej kolumnie i wierszu przedstawionej poniżej tabeli.

### 3. Pomiar zmętnienia

Z kolejnych buteleczek (zaczynając od nr 1) nalewamy do kuwet pomiarowych mętnościomierza badany roztwór i po kolei wkładamy kuwety do celi pomiarowej mętnościomierza. Odczytujemy zmętnienie (w jednostkach NTU) i zapisujemy je w odpowiedniej kolumnie i wierszu przedstawionej poniżej tabeli.

## G. Opracowanie wyników

1. Zmierzone wartości pH oraz zmętnienia (%T) otrzymane dla poszczególnych wartości pH umieścić w **Tabeli 1**.

Tabela 1.

Nr	Woda [cm <sup>3</sup> ]	Roztwór Kazeiny [cm <sup>3</sup> ]	Roztwór HCl [cm <sup>3</sup> ]	Roztwór KOH 0.02M [cm <sup>3</sup> ]	pH	Zmętnienie [NTU]
<b>I etap</b>			<b>0.02 M</b>			
1	47.5	2	0.5	-		
2	47.0	2	1.0	-		
3	46.5	2	1.5	-		
4	46.0	2	2.0	-		
5	45.5	2	2.5	-		
6	45.0	2	3.0	-		
7	44.5	2	3.5	-		
8	44.0	2	4.0	-		
9	43.5	2	4.5	-		
10	43.0	2	5.0	-		
<b>II etap</b>			<b>0.1 M</b>			
1	45.5	2	2	0.5		
2	45.0	2	2	1.0		
3	44.5	2	2	1.5		
4	44.0	2	2	2.0		
5	43.5	2	2	2.5		
6	43.0	2	2	3.0		
7	42.5	2	2	3.5		
8	42.0	2	2	4.0		
9	41.5	2	2	4.5		
10	41.0	2	2	5.0		

- Na wykres nanieść punkty logarytmu zmierzonego zmętnienia jako funkcji zmierzonego pH. pH na osi odciętych (X), a logarytm zmętnienia na osi rzędnych (Y).
- Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny na podstawie uzyskanych wyników pomiaru pH i zmętnienia.
- Punkt izoelektryczny kazeiny można wyznaczyć jedną z poniżej opisanych metod:

#### Metoda 1

Przy pomocy linijki dopasowujemy 2 linie proste do 2 zbiorów naniesionych punktów (lewego – dla wznoszącej się gałęzi i prawego- dla gałęzi opadającej). Wyznamy odciętą punktu, w którym obie proste przecinają się. Punkt ten odpowiada punktowi izoelektrycznemu kazeiny.

### **Metoda 2**

Rysunek wykonujemy przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Excel (lub innego), tworząc 2 oddzielne serie pomiarowe dla gałęzi wznoszącej się i opadającej. Dla obu gałęzi dodajemy linię trendu w postaci linii prostej. Linie trendu przedłużamy do ich przecięcia. Wyznaczmy odciętą punktu, w którym obie proste przecinają się. Punkt ten odpowiada punktowi izoelektrycznemu kazeiny.

### **Metoda 3**

Rysunek wykonujemy przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Excel (lub innego), tworząc 1 serię pomiarową dla gałęzi wznoszącej się i opadającej. Dla obu gałęzi dodajemy linię trendu w postaci wielomianu 2-go stopnia (paraboli). Wyznaczamy maksimum paraboli. Punkt ten odpowiada punktowi izoelektrycznemu kazeiny.