

ĆWICZENIE 7 – WYZNACZANIE PUNKTU IZOELEKTRYCZNEGO WYBRANYCH BIAŁEK

CEL ĆWICZENIA

- Celem ćwiczenia jest otrzymywanie i wyznaczenie punktu izoelektrycznego kazeiny.

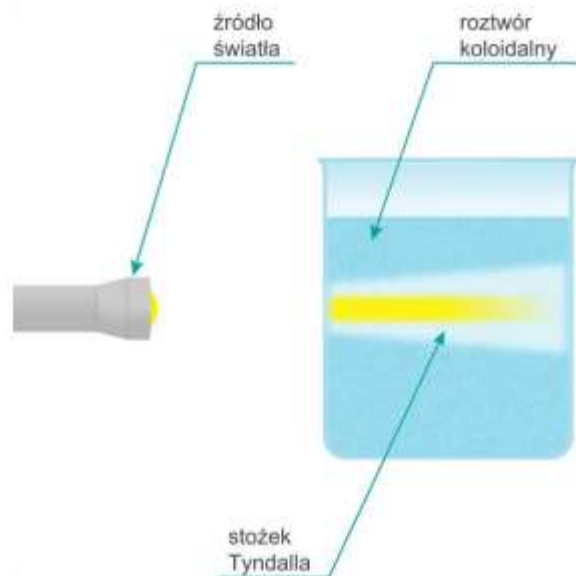
ZAGADNIENIA

- Białko jako koloid (koloidy liofilowe, koloidy hydrofilowe, hydratacja, żol, żel, peptyzacja, koagulacja).
- Efekt Tyndalla.
- Wysalanie białka.
- Denaturacja białka.
- Właściwości amfoteryczne.
- Punkt izoelektryczny.
- Właściwości ochronne koloidów hydrofilowych.

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Białka to biopolimery zbudowane z aminokwasów połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi. Związki te na ogół są dobrze rozpuszczalne w wodzie w efekcie czego tworzą roztwory koloidalne, czyli **zole** (roztwór koloidalny, w którym fazą dyspersyjną jest ciecz), w których fazą dyspersyjną jest woda. Stabilność takiego układu koloidalnego warunkowana jest przez solwatację, czyli otaczanie cząsteczek fazy rozproszonej z cząsteczkami ośrodka dyspersyjnego. Ze względu na duże powinowactwo do rozpuszczalnika, roztwory wodne białka zaliczane są do **koloidów liofilowych**. W tym konkretnym przypadku, z uwagi na to, że rozpuszczalnikiem jest woda, to polipeptydy należą do grupy **koloidów hydrofilowych**.

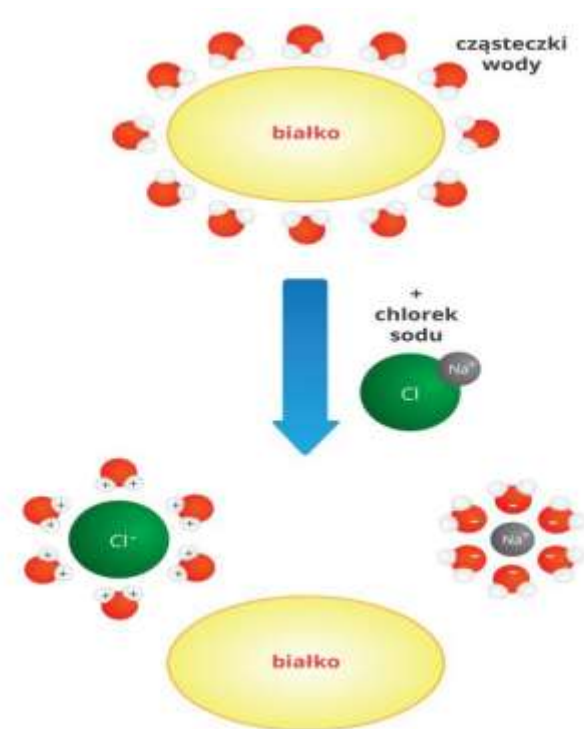
Ze względu na to, że białka to roztwory koloidalne, należy dodać, że wykazują one **efekt Tyndalla**. Zjawisko to polega na rozpraszaniu światła przez roztwór koloidalny z wytworzeniem charakterystycznego stożka świetlnego. Schemat zjawiska Tyndalla zaprezentowano na rysunku 1.



Rys. 1. Efekt Tyndalla

Białka rozpuszczalne w wodzie wiążą cząsteczki wody, co nazywane jest **hydratacją**. Początkowo, następuje pęcznienie polipeptydów, a następnie ich rozpuszczanie, co skutkuje utworzeniem układów koloidalnych. Białka ulegają procesom koagulacji i peptyzacji. **Koagulacja** jest to przejście zolu w **żel** (układ dyspersyjny, w którym faza rozproszona tworzy sieciową, porowatą strukturę przestrzenną wypełnioną fazą rozpraszającą), a **peptyzacja** jest to przejście żelu w zol.

Na rozpuszczalność białek ma również wpływ stężenie soli nieorganicznych. Ich mała zawartość wpływa dodatnio na rozpuszczalność polipeptydów. Natomiast przy większych stężeniach następuje uszkodzenie otoczki solwatacyjnej, co nie narusza struktury białka, jest to proces **odwracalny** i nosi nazwę **wysalania** białek. Do tego procesu wykorzystywane są roztwory soli, których jony tworzą wodziany. Sole mające zdolność wiązania wody, konkurują z białkiem o cząsteczki wody odbierając tym samym cząsteczkom białek płaszcz wodny, co z kolei obniża ich rozpuszczalność i prowadzi do wytrącenia z roztworu. Stężenie soli potrzebne do wysolenia białka zależy od właściwości danego białka i od pH środowiska. Proces wysolenia najłatwiej zachodzi w punkcie izoelektrycznym polipeptydu. Brak ładunków elektrycznych sprzyja łączeniu się cząsteczek w większe agregaty i wydzielaniu się ich z roztworu, w efekcie czego powstaje osad. Do wysalania stosowane są sole metalu lekkiego lub sole amonowe, na przykład chlorek potasu, siarczan amonu. Schemat procesu wysalania białek zaprezentowano na rysunku 2.



Rys. 2. Wysalanie białka.

Pod wpływem wielu czynników fizycznych i chemicznych, na przykład wysokiej temperatury, soli metali ciężkich oraz stężonych roztworów kwasów i zasad, polipeptydy wytrącają się w sposób **nieodwracalny**. Zjawisko to nazywane jest **denaturacją**. Podczas tego procesu następuje nieodwracalne zniszczenie struktury II-, III- i IV-rzędowej białka. Powoduje to utratę aktywności biologicznej lub innej indywidualnej cechy charakterystycznej przy zachowaniu struktury pierwszorzędowej polipeptydu. Podczas denaturacji destrukcji ulegają wiązania wodorowe, a w obecności odczynników redukujących zniszczone zostają wiązania disulfidowe. Podczas procesu denaturacji zachodzą zmiany rozpuszczalności i przesunięcie punktu izoelektrycznego. Często zachodzą także procesy agregacji i wytrącania, co jest związane ze zmianami stopnia hydratacji i rozpuszczalności białek. Do najważniejszych **fizycznych metod denaturacji** należy zaliczyć: silne mieszanie, wytrząsanie, naświetlanie promieniowaniem nadfioletowym, rentgenowskim i jonizującym lub działanie ultradźwiękami. Natomiast **denaturacja chemiczna** zachodzi pod wpływem związków, które są zdolne do rozerwania wiązań wodorowych. Do tego typu substancji należy zaliczyć: kwasy, zasady, jony metali ciężkich (np. sole miedzi, rtęci, baru, kadmu, ołowiu), organiczne aniony, mocznik, amidy kwasowe, detergenty, fenol, chloroform oraz rozpuszczalniki mieszające się z wodą takie jak alkohol, aceton.

Białka wykazują **właściwości amfoteryczne**. W zależności od pH roztworu zachowują się jak kwasy lub zasady. Jest to uwarunkowane obecnością grup polarnych z ładunkiem elektrycznym w łańcuchach bocznych niektórych aminokwasów. Grupy aminowe wiążą kationy wodorowe obecne w roztworze zapobiegając zakwaszeniu, a protony odłączane w trakcie dysocjacji grup karboksylowych zobojętniają jony hydroksylowe zapobiegając jego alkalizacji. Ta właściwość białek ma istotne znaczenie w utrzymaniu równowagi kwasowo-zasadowej tkanek i płynów ustrojowych. Właściwości kwasowe nadają białku głównie grupy karboksylowe reszt kwasów asparaginowego i glutaminowego, które dysocjują uwalniając protony i tworząc ujemnie naładowane grupy -COO^- . Środowisko zasadowe korzystnie wpływa na dysocjację grup karboksylowych i przechodzenie polipeptydów w formę anionową. Właściwości zasadowe białka pochodzą od obecności grup aminowych reszt lizyny, grupy guanidynowej reszt argininy i pierścieni imidazolowe reszt histydyny. W związku z tym, mogą one wiązać protony nadając cząsteczce białka ładunek dodatni. Środowisko kwaśne sprzyja wiązaniu protonów przez wyżej wymienione grupy i przechodzeniu polipeptydu w formę kationową.

Jak już wspomniano, podstawowe struktury aminokwasów budujących łańcuch polipeptydowy zawierają różne grupy funkcyjne, zarówno o charakterze kwasowym, jak i zasadowym. Dlatego też, w zależności od pH roztworu, w jakim się znajdują, całościowo, mogą mieć ładunek ujemny lub dodatni. Ładunek molekuł białka w roztworze o określonym stężeniu jonów wodorowych zależy od ilościowego stosunku aminokwasów zasadowych do aminokwasów kwasowych. Od sumarycznego ładunku cząsteczki zależy z kolei jej stabilność w środowisku o różnym pH. W roztworach o niskim pH (duże stężenie jonów wodorowych) cząsteczka białka ma ładunek dodatni, a w roztworach o wysokim pH (małe stężenie jonów wodorowych) cząsteczka białka ma ładunek ujemny. Szczególnym przypadkiem jest wartość pH, przy którym sumaryczny ładunek molekuły białka wynosi zero i nosi nazwę **punktu izoelektrycznego pI**. W punkcie izoelektrycznym białko nie wykazuje ruchliwości elektroforetycznej oraz charakteryzuje się najniższą rozpuszczalnością w wodzie.

Jak wiadomo, koloidy hydrofilowe chronią koloidy hydrofobowe przed wytrąceniem przez elektrolity. Takie działanie wykazują również białka, co ma duże znaczenie biologiczne. Dzięki temu związki słabo rozpuszczalne lub nierozpuszczalne znajdujące się w płynach ustrojowych, na przykład kwas moczowy, barwniki żółciowe i fosforany wapnia, są utrzymywane przez koloidy w stanie delikatnej zawiesiny. Niewystarczające ochronne działanie koloidów prawdopodobnie może być przyczyną tworzenia się w organizmie człowieka kamieni nerkowych i żółciowych.

APARATURA I ODCZYNNIKI

- 9 zlewek o pojemności 25 cm³
- 2 zlewki pojemności 100 cm³
- 2 kolby stożkowe 100 cm³
- cylinder miarowy o pojemności 25 cm³
- wkrapłacz
- pipety
- lejek
- sączek
- papierek lakmusowy
- waga laboratoryjna,
- termometr
- mleko świeże
- kwas octowy o stężeniu: 0,01 mol/dm³, 0,1 mol/dm³, 1 mol/dm³ i 2 mol/dm³
- 0,5% roztwór kazeiny w 0,1 mol/dm³ octanie sodu
- zasada sodowa o stężeniu 1 mol/dm³

WYKONANIE ĆWICZENIA

Wytrącenie kazeiny

Do zlewki o pojemności 100 ml wlać 25 ml mleka, dodać 25 ml wody redesylowanej o temperaturze 38 °C. Następnie, porcjami łagodnie mieszając, wkraplać 1 ml 2M kwasu octowego. Całość pozostawić na 10 minut, po czym zdekantować ciecz z nad osadu przez lejek z sączkiem bibułowym do drugiej kolby. Osad osuszyć między kartkami bibuły i pozostawić do przygotowania roztworu kazeiny.

Przygotowanie roztworu kazeiny

Do zlewki o pojemności 100 ml odważyć 1 g wytrąconej kazeiny i dodać 50 ml wody redestylowanej ogrzanej do temperatury 40 °C oraz 4 ml 1M roztworu NaOH. Po rozpuszczeniu kazeiny roztwór zobojętnić wobec papierka lakmusowego dodając 4 ml 1M roztworu kwasu octowego.

Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny

Do 9 zlewek o pojemności 25 cm³ odmierzyć podane w tabeli objętości kwasu octowego i wody. Następnie, kroplami dodać po 1 ml 0,5% roztworu kazeiny w 0,1M roztworu octanu

sodu. Po każdej kropli zamieszać zawartość zlewki. Całość pozostawić na 40 minut. Po tym czasie odczytać wyniki oznaczając brak zmętnienia (-) lub różne stopnie zmętnienia (+, ++, +++). Punktwi izoelektrycznemu kazeiny odpowiada pH, przy którym występuje najbardziej obfity osad.

	Numer zlewki								
Roztwór	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,01 M CH ₃ COOH [ml]	0,6	1,3	-	-	-	-	-	-	-
0,1 M CH ₃ COOH [ml]	-	-	0,3	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	-
1 M CH ₃ COOH [ml]	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6
woda [ml]	8,4	7,7	8,7	8,5	8,0	7,0	5,0	1,0	7.4
0,5% kazeina [ml]	1	1	1	1	1	1	1	1	1
zmętnienie									
pH									

OPRACOWANIE WYNIKÓW

Znając skład mieszaniny obliczyć pH każdej próby na podstawie wzoru:

$$pH = -\log[H^+] = -\log \frac{K_{kw} \cdot c_{kw}}{c_{soli}} \quad (1)$$

gdzie: $K_{kw} = 1,85 \cdot 10^{-5}$ [mol/dm³], c_{kw} – stężenie CH₃COOH [mol/dm³], c_{soli} – stężenie CH₃COONa [mol/dm³]. Obliczone wartości pH wpisać do tabeli.

Na podstawie obliczeń pH, podać wartość punktu izoelektrycznego kazeiny.

Porównać otrzymaną wartość punktu izoelektrycznego kazeiny z danymi literaturowymi.

LITERATURA

1. L. Stryer, Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
2. A.T.L. Lehninger, Biochemia. Molekularne Podstawy Struktury i Funkcji Komórki, PWRiL, Warszawa 1979.
3. L. Kłyszajko-Stefanowicz, Ćwiczenia z biochemii, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2011.
4. S. Doonan, Białka i peptydy, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
5. J.M. Berg, J.L. Tymczko, L. Stryer, N.D. Clarke, Biochemia, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007
6. P. Atkins, L. Jones, Chemia ogólna. Cząsteczki, materia, reakcje. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.