UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
KATEDRA BIOCHEMII I FIZJOLOGII ZWIERZĄT
Zakład Biochemii
20-033 Lublin, ul. Akademicka 12
tel. 081 445 69 73

Właściwości fizykochemiczne białek
(część teoretyczna)

Punkt izoelektryczny

Dla każdego białka istnieje takie pH, w którym obie grupy funkcyjne są zdysocjowane. Takie pH nazywamy **punktem izoelektrycznym (pH_i).** Białko ma wówczas postać jonu obojnaczego, charakteryzuje się najmniejszą rozpuszczalnością i brakiem migracji w polu elektrycznym.

Oprócz pH_i wyróżnia się też punkt izojonowy, który odnosi się do białek oczyszczonych. Wartości punktu izoelektrycznego i izojonowego są do siebie zbliżone, lecz nie są sobie równe.

Równanie Hendersona –Hasselbalcha

Aby obliczyć pH roztworu słabego elektrolitu stosuje się równanie Hendersona –Hasselbalcha.

Słaby kwas (HA) dysocjuje w środowisku wodnym uwalniając proton (H^+) i anion kwasowy (A^-) według równania:

$$HA \Leftrightarrow H^+ + A^-$$

Stała równowagi takiej reakcji:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Po przekształceniu otrzymujemy:

$$[H^+] = K\frac{[HA]}{[A^-]}$$

Mnożąc stronami przez -1 i logarytmując powyższe równanie otrzymujemy:

$$-\log[H^+] = -\log[K] + \log\frac{[A^-]}{[HA]}$$

Ujemy logarytm $-\log[H^+]$ ze stężenia jonów wodorowych to pH, natomiast ujemny logarytm stałej dysocjacji $-\log[K]$ to pK.

$$pH = pK + \log\frac{[A^-]}{[HA]}$$

Powyższe równanie to równanie Hendersona-Hasselbalcha.

Przykład

Obliczyć pH w probówce 1 z zadania 1 w opisie części praktycznej ćwiczenia.

Dane:

$c^1_{CH_3COOH} = 0,01 mol/dm^3$

$V^1_{CH_3COOH} = 0,6 cm^3 = 0,0006 dm^3$

$c^1_{CH_3COONa} = 0,1 mol/dm^3$

$V^1_{CH_3COONa} = 1 cm^3 = 0,001 dm^3$

$V_{probówki} = (0,6+8,4+1) cm^3 = 10 cm^3 = 0,01 dm^3$

Szukane:

pH=?

Wartość pH w próbówce 1 określona jest poprzez bufor octanowy. Bufor ten składa się ze sprzężonego układu słaby kwas CH_3COOH i jego sól CH_3COONa. Dysocjację kwasu octowego można zapisać:

$$CH_3COOH \Leftrightarrow CH_3COO^- + H^+$$

W naszym przypadku stężenie jonów CH_3COO^- jest równe stężeniu CH_3COONa w roztworze. Równanie Hendersona-Hasselbalcha dla buforu octanowego można więc zapisać:

$$pH = pK + \log\frac{[CH_3COONa]}{[CH_3COOH]}$$

pK kwasu octowego wynosi 4,65.

Stężenie CH_3COOH w roztworze obliczmy w następująco:
Obliczamy dodaną do probówki ilość moli CH_3COOH:

$$n_{CH_3COOH} = c^1_{CH_3COOH} \times V^1_{CH_3COOH}$$

Obliczamy stężenie roztworu CH_3COOH w probówce po dodaniu wszystkich składników roztworu:

$$c^2_{CH_3COOH} = \frac{n_{CH_3COOH}}{V_{probówki}}$$

Stąd stężenie CH_3COOH w probówce można zapisać wzorem:

$$c^2_{CH_3COOH} = \frac{c^1_{CH_3COOH} \times V^1_{CH_3COOH}}{V_{probówki}}$$

Po podstawieniu otrzymujemy:

$$c^2_{CH_3COOH} = \frac{0,01 mol/dm^3 \times 0,0006 dm^3}{0,01 dm^3} = 6\times10^{-4} mol/dm^3$$

Analogicznie przeprowadzamy obliczenia dla CH_3COONa, otrzymując:

$$c^2_{CH_3COONa} = \frac{c^1_{CH_3COONa} \times V^1_{CH_3COONa}}{V_{probówki}}$$

Po podstawieniu:

$$c^2_{CH_3COONa} = \frac{0,1 mol/dm^3 \times 0,001 dm^3}{0,01 dm^3} = 1\times10^{-2} mol/dm^3$$

Podstawiając do równania Hendersona-Hasselbalcha, otrzymujemy:

$$pH = 4,65 + \log\frac{\left[1\times10^{-2} mol/dm^3\right]}{\left[6\times10^{-4} mol/dm^3\right]}$$

$$pH = 4,65 + \log\left[1\times10^{-2}\right] - \log\left[6\times10^{-4}\right]$$

$$pH = 5,87$$

Odpowiedź: pH w probówce 1 wynosi 5,87.

Rozpuszczalność

Większość białek na ogół dobrze rozpuszcza się w wodzie, niektóre rozpuszczają się tylko w rozcieńczonych roztworach soli, kwasów i zasad. O rozpuszczalności białek decyduje przede wszystkim ich powinowactwo do wody (zdolność hydratacji), a ponadto budowa chemiczna, większa lub mniejsza łatwość tworzenia wiązań, obecność w środowisku małych stężeń soli oraz pH roztworu.

Przez hydratację należy rozumieć wiązanie się dipoli wody z grupami polarnymi białka, dzięki czemu cząsteczka białka otacza się płaszczem wodnym.

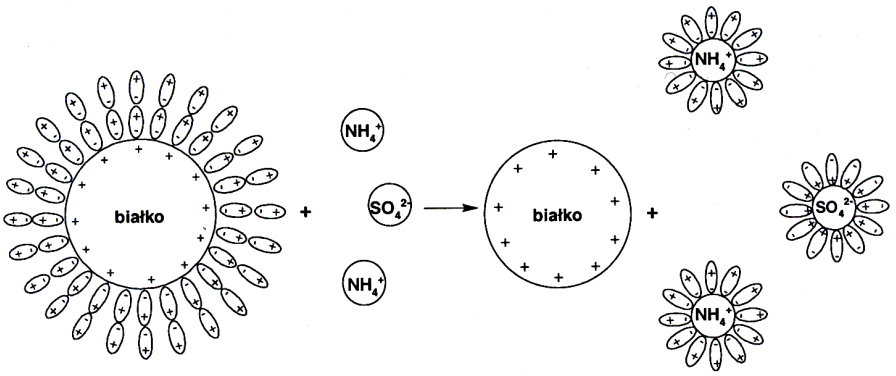
Grupa funkcyjna	-OH	-COOH	-O-	$-NH_4$	=NH	=N-
Liczba cząsteczek wody	3	4	2	3	2	1

Wysolenie

Jest to proces polegający na usunięciu płaszcza wodnego białka po dodaniu do jego roztworu dużych stężeń soli nieorganicznych: siarczanu amonu, siarczanu magnezu, siarczanu sodu. Cząsteczki pozbawione płaszcza wodnego zbijają się w większe konglomeraty i w efekcie wypadają na dno probówki. Białka najłatwiej wysolić jest w punkcie izoelektrycznym.

Stężenie soli potrzebne do wysolenia zależy od właściwości danego białka i od pH środowiska. Stąd metodę tę można użyć do rozdzielenia białek różniących się rozpuszczalnością (oddzielenie albumin od globulin). Wysalanie białek jest procesem odwracalnym. Po obniżeniu stężenia soli, można z powrotem rozpuścić wytrącone białko.

Podobny efekt do wysolenia wywołuje dodanie do roztworu białka etanolu lub acetonu, jeżeli odczynniki te działają krótko i w niskiej temperaturze.



Rys. 1 Mechanizm procesu wysalania białek

Denaturacja

Jest to proces praktycznie nieodwracalny polegający na zniszczeniu struktury przestrzennej białka (II, III, IV-rzędowej) prowadzący do

utraty właściwości biologicznych, fizycznych i chemicznych. Może zachodzić pod wpływem czynników fizycznych tj. temperatura lub promieniowanie jonizujące lub pod wpływem czynników chemicznych tj. stężone zasady i kwasy, mocznik guanidyna, amidy kwasowe, aceton eter.
Ponieważ denaturacja dotyczy struktur przestrzennych proces ten nie dotyczy peptydów. Jest to jedna z różnic pomiędzy białkami a peptydami.

Denaturacja białka nie jest równoznaczna z jego wytrąceniem z roztworu, tj. z koagulacją. Białko zdenaturowane może się nie wytrącić, jeżeli ma ładunek elektryczny, tzn. jeśli znajduje się w środowisku o pH różnym od punktu izoelektrycznego.

Nieodwracalny proces denaturacji może w pewnych warunkach ulec cofnięciu tzw. renaturacji, gdy czynniki denaturujące działają stosunkowo krótko i nie spowodowały daleko posuniętych zmian w strukturze.

Strącanie białek solami metali ciężkich

Przy wartości pH wyższej od pH_i cząsteczki białek reagują z kationami metali ciężkich (Cu^{2+}, Hg^{2+}, Pb^{2+}). Powstają sole o bardzo małej stałej dysocjacji i trudno rozpuszczalne. Dlatego jony metali ciężkich stosowane są do wytrącania białek z roztworu.

Jony Cu^{2+} tworzą z białkami trwałe połączenia kompleksowe o charakterystycznym zabarwieniu (reakcja biuretowa).

Białka z Hg^{2+} tworzą trudno rozpuszczalne sole. Spostrzeżenie to stało się przyczyną stosowania białka jako odtrutki przy zatruciu rtęcią i innymi metalami ciężkimi.