

Właściwości fizykochemiczne białek

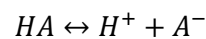
Punkt izoelektryczny

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 obojnego, 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:



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:

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

Ujemny 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 próbówce 1 z zadania 1 w opisie części praktycznej ćwiczenia.

Dane:

$$C_{CH_3COOH}^1 = 0.01 \text{ mol/dm}^3$$

$$V_{CH_3COOH}^1 = 0.6 \text{ cm}^3 = 0.0006 \text{ dm}^3$$

$$C_{CH_3COONa}^1 = 0.1 \text{ mol/dm}^3$$

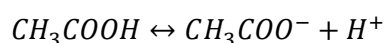
$$V_{CH_3COONa}^1 = 1 \text{ cm}^3 = 0.001 \text{ dm}^3$$

$$V_{probówki} = (0.6 + 8.4 + 1) \text{ cm}^3 = 10 \text{ cm}^3 = 0.01 \text{ dm}^3$$

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:



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 próbówki ilość moli CH_3COOH :

$$n_{CH_3COOH} = C_{CH_3COOH}^1 * V_{CH_3COOH}^1$$

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

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

Stąd stężenie CH_3COOH w próbówce można zapisać wzorem:

$$C_{CH_3COOH}^2 = \frac{C_{CH_3COOH}^1 * V_{CH_3COOH}^1}{V_{probówki}}$$

Po podstawieniu otrzymujemy:

$$C_{CH_3COOH}^2 = \frac{0.01 \text{ mol/dm}^3 * 0.0006 \text{ dm}^3}{0.1 \text{ dm}^3} = 6 * 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$$

Analogicznie przeprowadzamy obliczenia dla CH_3COONa , otrzymując:

$$C_{CH_3COONa}^2 = \frac{C_{CH_3COONa}^1 * V_{CH_3COONa}^1}{V_{\text{próbówki}}}$$

Po podstawieniu:

$$C_{CH_3COONa}^2 = \frac{0.1 \text{ mol/dm}^3 * 0.006 \text{ dm}^3}{0.01 \text{ dm}^3} = 1 * 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$$

Podstawiając do równania Hendersona-Hasselbalcha, otrzymujemy:

$$pH = 4.65 + \log \left[\frac{1 * 10^{-2} \text{ mol/dm}^3}{6 * 10^{-4} \text{ mol/dm}^3} \right]$$

$$pH = 4.65 + \log[1 * 10^{-2}] - \log[6 * 10^{-4}]$$

$$pH = 5,87$$

Odpowiedź: pH w próbówce 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

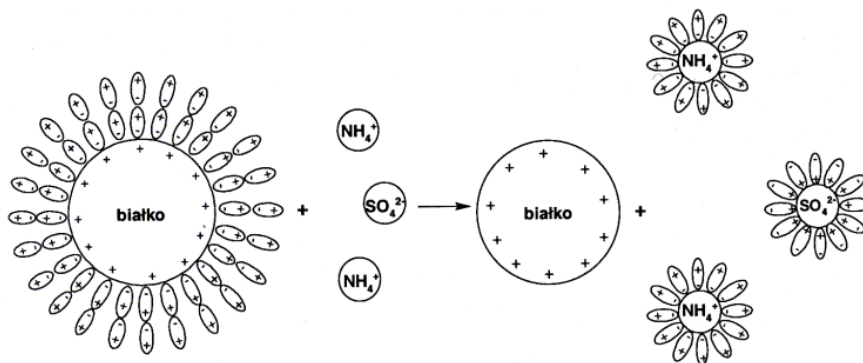
Wysolenie

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 wysoliczyć jest w punkcie izoelektrycznym.

Stężenie soli potrzebne do wysolenia zależy od właściwości danego białka i od pH środowiska. Stąd metodę tę można użyć do rozdzielania 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.