



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny

BIOCHEMIA



Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych
Materiałów Opakowaniowych**

ul. Kłemensa Janickiego 35

71-270 Szczecin



Ćwiczenie 5

Aminokwasy i białka

(podstawowe właściwości i wybrane
charakterystyczne reakcje)

Białka

Białka to podstawowe, wielocząsteczkowe składniki wszystkich organizmów żywych, zbudowane z aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi (wiązanie powstałe pomiędzy grupą karboksylową jednego aminokwasu a grupą aminową drugiego).

Skład chemiczny białek :

- węgiel 52%
- tlen 22%
- azot 16%
- wodór 7%
- siarka 2%
- fosfor od 0% do 1%

Masa cząsteczkowa białek może wynosić nawet kilka milionów. Białka proste-proteiny składają się z łańcuchów polipeptydowych. Białka złożone (proteidy) zawierają dodatkowo składnik nietypowy zwany grupą prostetyczną (lipidy- w lipoproteidach, kwasy nukleinowe – w nukloproteidach węglowodany – w glikoproteidach , itd). Cząsteczki białek mogą mieć kształt kulisty (albuminy, globuliny) lub wydłużony (skleroproteidy) .

Wielkość, kształt, a także biologiczna rola białek wyznaczone są przez ich strukturę pierwszorzędową, czyli kolejność aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym

Białka utrzymują strukturę (głównie uczestniczą w tym lipoproteidy) organizmów żywych i biorą udział we wszystkich procesach zachodzących w organizmach żywych (kataliza enzymatyczna, regulacja hormonalna, regulacja procesów życiowych, odporność).

Do białek należą: enzymy, przeciwciała oraz niektóre hormony.

Zapotrzebowanie dzienne u człowieka wynosi ok. 0,5 g białka na kg ciężaru ciała . W pokarmach wyróżnia się białka pełnowartościowe, w których obecne są wszystkie aminokwasy egzogenne w optymalnych stosunkach (białka zwierzęce) oraz białka niepełnowartościowe , w których brak choćby jednego aminokwasu egzogenne (białka roślinne) .

Białka biorą również udział w skurczach mięśni, są to tzw. białka kurczliwe mięśni . Obejmują one aktyne , która stanowi ok.15% białek mięśni i miozynę, stanowiącą ok. 40% .

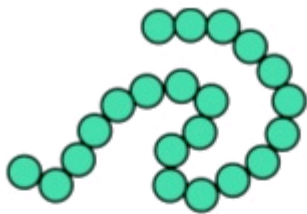
Białka są to polimery aminokwasów białkowych połączone wiązaniami peptydowymi. Są to polipeptydy zbudowane z więcej niż 100 reszt aminokwasowych, posiadające masę cząsteczkową wyższą niż 10000. Budowa białek jest złożona. W celu jej określenia podaje się tzw. struktury:

1. Struktura I-rzędowa określa ona sekwencję aminokwasów w cząsteczce białka czyli kolejne ułożenie aminokwasów w białku.

2. **Struktura II-rzędowa** mówi nam o układzie przestrzennym wynikającym z obecności wiązań wodorowych. Są dwie konformacje łańcucha polipeptydowego. Pierwsza z nich mówi o kształcie łańcucha w formie prawoskrętnej linii śrubowej tzw. α -heliks. Druga nazywana jest strukturą β -harmonijką, mówimy o niej wówczas gdy łańcuchy peptydowe układają się równoległe do siebie i łączą się wiązaniami wodorowymi. Konformację α -heliksu posiadają białka globularne a β białka budulcowe.

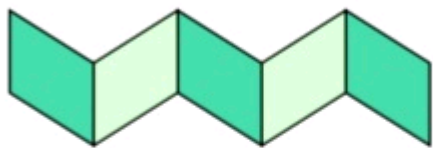
3. **Struktura III-rzędowa** charakteryzuje pofałdowanie łańcuchów peptydowych w przestrzeni (skręcenie łańcucha polipeptydowego). Bardzo ważną rolę odgrywają tutaj wiązania siarczkowe -S-S- tworzące się między resztami cysteiny. Dzięki tym wiązaniom białka są bardziej odporne na czynniki denaturujące. Innymi ważnymi połączeniami wewnątrz białka są siły Wan der Waalsa.

4. **Struktura IV-rzędowa**, określa ilość i wzajemne ułożenie podjednostek cząsteczkowych (pojedynczych łańcuchów) białek. Są to struktury bardzo złożone.



struktura pierwszorzędowa

to sekwencja aminokwasów, ich kolejność, liniowe ułożenie determinowane przez kolejność nukleotydów w DNA



beta harmonijka

struktura drugorzędowa

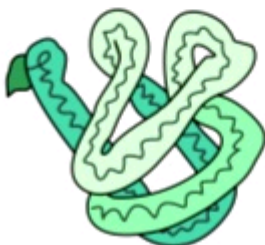
zwinięcie struktury pierwszorzędowej utrwalone za pomocą wiązań wodorowych; ich zerwanie powoduje nieodwracalne zniszczenie białka - denaturację

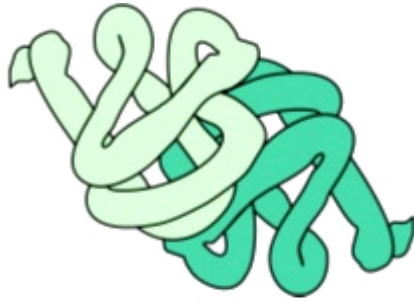


alfa helisa

struktura trzeciorzędowa

struktura warunkująca właściwości białka, stabilizowana przez wiązania powstające pomiędzy oddalonymi od siebie aminokwasami (m.in. wiązania jonowe, mostki dwusiarczkowe); również może ulegać denaturacji





struktura czwartorzędowa

to sposób połączenia się struktur trzeciorzędowych w przestrzeni; dotyczy białek zbudowanych z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego

Podział białek

Podstawowy podział białek:

1. Białka proste - proteiny, które po hydrolizie dają wyłącznie aminokwasy
2. Białka złożone - proteidy, zawierają one oprócz aminokwasów inne niebiałkowe składniki np.: grupę prostetyczną

Białka proste:

1. Protaminy
2. Histony
3. Albuminy
4. Globuliny
5. Prolaminy
6. Gluteiny
7. Skleroproteiny

Białka złożone:

1. Fosfoproteidy
2. Nukleoproteidy
3. Chromoproteidy
4. Metaloproteidy
5. Glikoproteidy
6. Lipoproteidy

Białka ze względu na pełnione funkcje można podzielić na:

- enzymatyczne – najliczniejsza grupa białek (ponad 2000) o zróżnicowanej masie cząsteczkowej
- strukturalne – są odpowiedzialne za mechaniczną stabilność narządów i tkanek (kolagen, elastyna, tubulina, aktyna, α-keratyna); do białek strukturalnych zalicza się także histony pełniące kluczową rolę w upakowaniu DNA w chromatynie
- transportujące – np. hemoglobina uczestniczy w transporcie tlenu i CO₂, niektóre białka osocza (prealbumina) transportujące hormony, transferyna przenosząca żelazo, niektóre białka błonowe np. kanały jonowe pośredniczące w transporcie jonów, nośniki w transporcie metabolitów i jonów, pompy funkcjonujące w transporcie aktywnym jonów i metabolitów
- regulacyjne – np. niektóre hormony (somatotropina, insulina), receptory uczestniczące w percepcji różnych cząsteczek sygnałowych; białkami regulatorowymi są także czynniki transkrypcyjne, regulujące ekspresję genów

– odpornościowe – białka układu immunologicznego (np. immunoglobuliny) chronią organizm przed czynnikami chorobotwórczymi i ksenobiotykami (substancjami obcymi dla organizmu)

– motoryczne – uczestniczą w procesach związanych z ruchem (aktyna, miozyna); kinezyrna funkcjonuje w przemieszczaniu organelli w komórce

– zapasowe – np. owoalbumina w białku jaja stanowi źródło aminokwasów dla rozwijającego się zarodka, ferrytyna wiąże żelazo w wątrobie, kazeina jest białkiem zapasowym mleka, niektóre białka budujące mięśnie mogą być wykorzystywane jako materiał energetyczny; wiele białek roślinnych pełni funkcje zapasową

Ze względu na rozpuszczalność i kształt, białka dzielą się na globularne (kuliste) i fibrylarne (włókienkowate, skleroproteiny). Do białek fibrylarnych należą: -keratyny włosów, wełny, piór, paznokci, kolageny zawarte głównie w tkance łącznej, elastyny, fibroina jedwabiu. Białka globularne obejmują: białka obojętne (albuminy, globuliny), białka kwaśne (prolaminy, gluteiny) oraz białka zasadowe (histony, protaminy).

Właściwości fizyko-chemiczne białek

Białka są na ogół rozpuszczalne w wodzie, niektóre rozpuszczają się w rozcieńczonych roztworach kwasów i zasad a inne w rozpuszczalnikach organicznych. Ulegają hydratacji poprzez wykazanie zdolności do wiązania cząsteczek wody. Początkowo pęcznieją a następnie się rozpuszczają.

Tworzą cząstki koloidalne. Na ich rozpuszczalność ma też wpływ stężenie soli nieorganicznych.

Niewielkie stężenie wpływają dodatnio ale przekroczenie pewnego stężenia powoduje oddzielenie wody i wypadanie ich z roztworu (wysalanie)-jest to proces odwracalny i nie narusza ich struktury, niszczy jedynie ich otoczkę solwatacyjną. Białka ulegają procesowi koagulacji i procesowi odwrotnemu - peptyzacji . Koagulacja jest to przejście zolu w żel, a peptyzacja jest to przejście żelu w zol.

Dzięki obecności w cząsteczce białka ładunków elektrycznych posiadają one właściwość poruszania się w polu elektrycznym. Przy warunkach sprzyjających tworzeniu ładunków (+) białko przesuwa się w stronę katody, natomiast w odwrotnych warunkach przesuwa się w stronę anody. Wykorzystano tą właściwość do rozdzielanie mieszanin białek na drodze elektroforezy.

Denaturacja białka - Denaturacja polega na zniszczeniu (w różnym stopniu) struktury drugo-, trzecio- lub czwartorzędowej białka, czyli natywnej konformacji, czego konsekwencją jest utrata specyficznych biologicznych aktywności białek.

Denaturacja białek zachodzi pod wpływem różnych czynników, zarówno chemicznych jak i fizycznych. Zjawisko to pojawia się pod wpływem wysokiej temperatury, mocnych kwasów lub zasad nieorganicznych, niektórych kwasów organicznych, rozpuszczalników organicznych, takich jak: alkohol lub aceton w temperaturze pokojowej i wyższej oraz kationów metali ciężkich. W zależności od intensywności działania tych czynników (w tym

czasu oddziaływania), wielkość zmian denaturacyjnych może się różnić – od minimalnych do całkowitego zniszczenia oddziaływań stabilizujących konformację białka.

Wysalanie białek

Wysalaniem białek nazywamy proces wytrącenia z roztworu białek rozpuszczalnych w wodzie przez wysokie stężenie soli. Stosuje się w tym celu sole, których jony łatwo tworzą wodziany. Zjawisku wysalania sprzyjają te aniony, które tworzą wiązania wodorowe lub mają dużą elektroujemność. Elektrolity wielowartościowe działają silniej od jednowartościowych. Sole wiążące wodę pozbawiają białka płaszczą wodnego, sprzyjając ich asocjacji w większe agregaty o zmniejszonej rozpuszczalności, które wypadają z roztworu. Stężenie soli potrzebne do wysalania białek zależy od ich właściwości oraz pH środowiska. Najłatwiej wysolić białko w jego punkcie izoelektrycznym, ponieważ cząsteczki na zewnątrz obojętne łatwo asocjują w większe agregaty wypadające z roztworu. Do wysalania najczęściej stosuje się $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , MgSO_4 .

Wysalanie białek jest procesem odwracalnym, usunięcie soli, np. przez dializę, sprawia, że wytrącone białko ponownie rozpuszcza się i wykazuje swe biologiczne właściwości.

Przebieg ćwiczenia 5

Przygotowanie roztworu białka:

0,5g białka sojowego wprowadzić do probówki typu falkon (obj. 50 ml) dopełnić wodą destylowaną zakręcić, wymieszać i umieścić w łaźni wodnej o temp. 37°C na 5 minut.

Doświadczenie 1. Badanie właściwości fizycznych białek – wysalanie białka

Materiał i odczynniki:

- Roztwór białka (wcześniej przygotowany)
- nasycony roztwór $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- woda destylowana
- probówka

Wykonanie doświadczenia:

1. Do probówki wlać 1,5 cm³ roztworu białka
2. Następnie do probówki dodać 1,5 cm³ nasyconego roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Po ok. 5 min. zapisać obserwacje.
3. Dodać do probówki 15 cm³ wody destylowanej i wstrząsnąć. Zapisać obserwacje i wnioski.

Wyjaśnienie do doświadczenia nr 1 znajduje się w części teoretycznej w punkcie pt. „Wysalanie białek”.

Doświadczenie 2. Badanie właściwości fizycznych białek – denaturacja białka

Wykonanie doświadczenia:

1. Przygotować 5 próbek,
2. Do każdej probówki dodać 2 cm³ roztworu białka,
3. Do pierwszej dodać 5 kropli 5% $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$,
4. Do drugiej dodać 5 kropli 5% HgCl_2 ,
5. Do trzeciej dodać 5 kropli 5% H_2SO_4 ,
6. Do czwartej dodać 5 kropli formaliny,
7. Ostatnią probówkę wstawić do wrzącej łaźni wodnej i ogrzewać ok. 20 minut,
8. Na koniec do każdej z probówek dodać 15 cm³ wody destylowanej i wstrząsnąć. Zapisać obserwacje i wnioski.

Wyjaśnienie do doświadczenia nr 2 znajduje się w części teoretycznej w punkcie pt. „Denaturacja białka”.

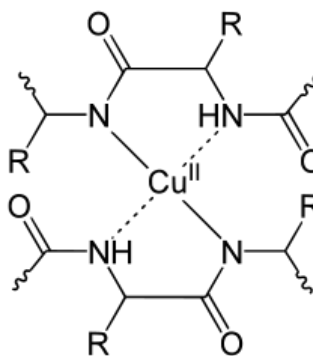
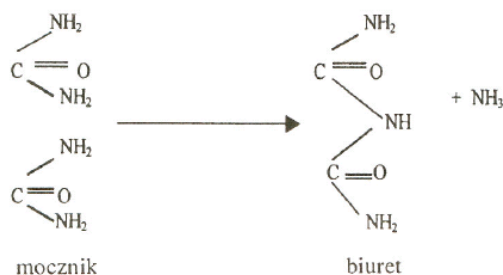
Doświadczenie 3. Wykrywanie białek – reakcja biuretowa

Wykonanie doświadczenia:

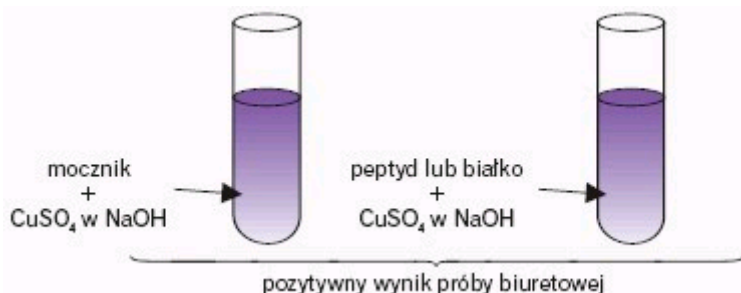
1. Przygotować dwie probówki
2. Do pierwszej probówki dodać 2 cm³ roztworu białka, do drugiej taką samą ilość wody destylowanej.
3. Do obu probówek dodać po 2 cm³ 2 M NaOH oraz kilka kropli CuSO_4 .
4. Wstrząsnąć i zapisać obserwacje.

Wyjaśnienie:

Metoda polega na oznaczaniu natężenia barwy powstałej w wyniku wytworzenia **związków kompleksowych białek z jonami miedzi (II)** w środowisku zasadowym, z maksimum absorpcji przy $\lambda = 540 \text{ nm}$. Intensywność barwy w reakcji biuretowej jest proporcjonalna do liczby wiązań peptydowych. Zależność ta jest wykorzystywana do ilościowego oznaczania białek. Czulość metody – 0,1 mg/ml. Nazwa reakcji pochodzi od biuretu, związku powstającego w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek mocznika, zawierającego w swej cząsteczce wiązania amidowe:



Związek kompleksowy, w którym jon Cu^{2+} jest kompleksowany przez cztery grupy peptydowe

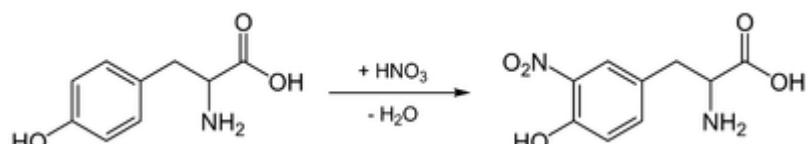


Metoda biuretowa nie nadaje się do oznaczania białek w obecności soli amonowych, gdyż jon amonu daje również barwne kompleksy z jonami miedzi (II). W reakcji przeszkadza także siarczan (VI) magnezu, ponieważ wytracający się w środowisku nierozpuszczalny wodorotlenek magnezu maskuje właściwy odczyn.

Doświadczenie 4. Wykrywanie białek – reakcja ksantoproteinowa

Wykonanie doświadczenia:

1. Przygotować 3 probówki
2. Do pierwszej probówki dodać 2 cm³ roztworu białka sojowego (wcześniej przygotowanego), do drugiej 2 cm³ roztworu glicyny, a do trzeciej 2 cm³ wody destylowanej.
3. Do wszystkich probówek wlać po 1 cm³ 6% HNO₃.
4. Probówki ogrzewać w łaźni wodnej ok. 3 minut aż roztwór zabarwi się na żółto.
5. Probówki ochłodzić pod zimną wodą.
6. Do każdej probówki dodać 1 cm³ 2 M roztworu NaOH
7. Zapisać obserwacje i wnioski.



Schemat reakcji na przykładzie tyrozyny

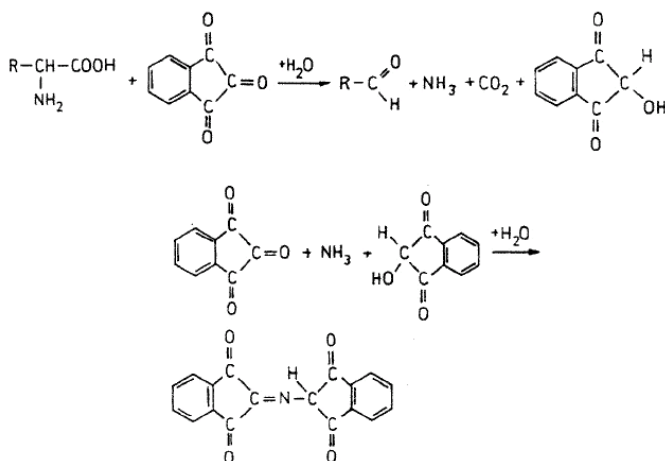
Wyjaśnienie:

Reakcja ta jest charakterystyczna dla **aminokwasów aromatycznych i fenoli**. W wyniku działania stężonego HNO_3 pierścień benzenowy ulega **nitrowaniu**. W wyniku znitrowania aromatycznych ugrupowań powstaje trwałe, żółte zabarwienie.

Doświadczenie 5. Wykrywanie aminokwasu – reakcja ninhydrynowa

Wykonanie doświadczenia:

1. Przygotować 2 probówki.
2. do pierwszej wlać 1 cm^3 roztworu glicyny a do drugiej 1 cm^3 wody destylowanej.
3. następnie do probówki dodać $0,5 \text{ cm}^3$ 0,1% roztworu ninhydryny.
4. probówki ogrzać w łaźni wodnej.
5. Zapisać obserwacje i wnioski



Reakcja aminokwasów z ninhydryną

Wyjaśnienie:

Aminokwasy pod wpływem ninhydryny ulegają utlenieniu do iminokwasów (reakcja poniżej). Kolejne etapy przemian to deaminacja i dekarboksylacja oraz wytworzenie aldehydu skróconego o 1 atom węgla. W wyniku kondensacji utlenionej i zredukowanej w powyższym procesie cząsteczki ninhydryny oraz amoniaku powstaje kompleks o fioletowo-niebieskiej barwie (maksimum absorpcji przy $\lambda = 570 \text{ nm}$), którego natężenie jest proporcjonalne do zawartości azotu aminowego aminokwasu. Reakcja z ninhydryną może służyć do ilościowego oznaczania aminokwasów metoda spektrofotometryczna. Dodatni odczyn ninhydrynowy dają obok aminokwasów, peptydów i białek także sole amonowe, aminocukry i amoniak.

Literatura:

1. Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa pod red. L. Kłyszejko-Stefanowicz. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
2. McMurry John. Chemia organiczna. PWN, Warszawa, 2003.
3. Praktikum z biochemii. Praca zbiorowa pod red. A. Dubina i B. Turyny. Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1999.