

BIAŁKA

1. Właściwości fizykochemiczne białek

Białka, czyli proteiny, są podstawowymi składnikami strukturalnymi wszystkich organizmów żywych, zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych. Są to związki wielkocząsteczkowe, zbudowane z aminokwasów połączonych wiązaniem peptydowym. Białka to wielkocząsteczkowe polipeptydy, których masa cząsteczkowa jest większa niż 10000 daltonów (Da). Peptydy o niższej masie cząsteczkowej nazywane są oligopeptydami.

Skład chemiczny i masa cząsteczkowa to podstawowe parametry określające każdy związek chemiczny. Metodą analizy elementarnej ustalono, że wszystkie białka zawierają węgiel, wodór, tlen, azot oraz w mniejszych ilościach fosfor i siarkę. Czyste białka są w większości bez smaku i zapachu. Niewiele białek udało się otrzymać w stanie krystalicznym, w przeważającej liczbie wydzielono je jako substancje bezpostaciowe.

Tabela 1

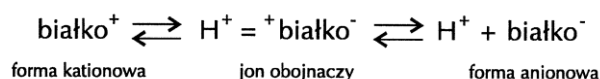
Skład elementarny białek

Pierwiastek	%	Pierwiastek	%
Węgiel	50-55	Azot	12-19
Wodór	6-7	Siarka	0,2-3
Tlen	20-23	Fosfor	0-6

Średnia zawartość azotu w białku wynosi 16%, co pozwala wyliczyć ilość białka mnożąc ilość azotu przez liczbę 6,25 (=100/16). Metoda ta jest szeroko rozpowszechniona pomimo błędu, jaki zawiera, bowiem nie cały azot ma pochodzenie białkowe.

1.1. Właściwości amfoteryczne białek

Natywne białka globularne zachowują się w roztworze jak kwasy lub zasady, a ta ich właściwość uwarunkowana jest przede wszystkim stosunkowo dużą liczbą jonizujących grup reszt aminokwasowych. Stan elektryczny cząsteczki białka zależy więc od pH środowiska. W środowisku kwaśnym, na skutek nadmiaru jonów wodorowych, dysocjacja grup kwasowych cofa się, a cząsteczka białkowa jest kationem. Natomiast w środowisku zasadowym, gdy grupy zasadowe tracą ładunek elektryczny, cząsteczka białka jest anionem.



W białkach mamy więc do czynienia z dysocjacją kwasową i zasadową, przy czym stopień dysocjacji i liczba ładunków zależą od rodzaju aminokwasów zawartych w danej cząsteczce białkowej i odczynu środowiska. Możliwe jest więc osiągnięcie takiego odczynu środowiska, w którym następuje zrównoważenie ładunków dodatnich i ujemnych w cząsteczce białka. Takie stężenie jonów wodorowych, przy którym cząsteczka białka staje się jonem obojętnym, nazywa się punktem izoelektrycznym.

Tabela 2. pH punktu izoelektrycznego białek występujących w żywności

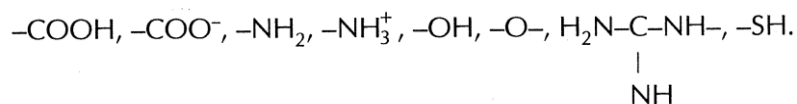
Białko	pH	Białko	pH
Pepsyna	< 1,1	Laktoglobulina	5,2
Albumina jaja	4,6	Hemoglobina	6,8
Kazeina	4,7	Mioglobina	7,0
Żelatyna	4,9	Protamina	12,0

Punkt izoelektryczny białek jest wielkością charakterystyczną. W punkcie tym wartość ładunku elektrycznego białka oraz jego przewodnictwo jest najmniejsze, ponadto białka wykazują również najmniejszą ruchliwość i w związku z tym wiele z nich ulega wówczas wytrąceniu lub też przejściu z postaci zolu w postać żelu. W punkcie izoelektrycznym białka cechuje też najmniejsza lepkość, zdolność pęcznienia i rozpuszczalność oraz wartość ciśnienia osmotycznego. Parametry te można wykorzystywać do rozdzielania białek.

Jeżeli mieszaninę białek umieści się w polu elektrycznym, to zależnie od stanu elektrycznego dane białko będzie poruszać się w stronę anody lub katody lub też zostanie na starcie. Metoda ta nazywa się elektroforezą. Jeżeli ruch białek odbywa się w nośniku, na przykład na bibule, mówimy wówczas o elektroforezie bibułowej. Elektroforeza przebiegać może również w żelach.

1.2. Hydratacja

Niektóre białka są w wodzie rozpuszczalne, inne w rozcieńczonych roztworach soli, a jeszcze inne w roztworach kwasów lub zasad. Wreszcie są białka nierozpuszczalne i do takich należą skleroproteiny. Jednak niewiele z nich tworzy w wodzie roztwory rzeczywiste. Większość w wodzie najpierw pęcznieje, a następnie tworzy **roztwory koloidalne**. Zjawiska takie są możliwe dzięki hydratacji. Mianem hydratacji określa się przyłączanie dipolowych cząsteczek wody przez polarne, czyli hydrofilowe grupy. Do grup o charakterze hydrofilowym w białku należą grupy:



W wyniku oddziaływania grup hydrofilowych, które ulegają orientacji na zewnątrz cząstki białka, następuje otaczanie cząstek białka przez dipole wody. W efekcie tych oddziaływań cząsteczka białka tworzy najczęściej podwójny płaszcz hydratacyjny.

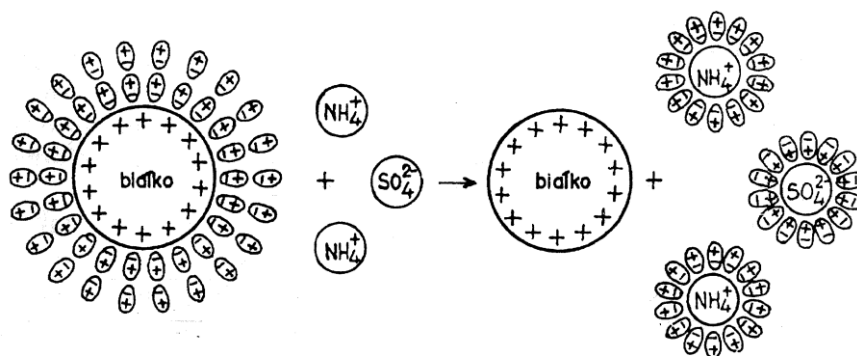
Stopień hydratacji białka zależy od jego rodzaju, pH środowiska, obecności innych substancji wiążących wodę oraz od temperatury. Hydratacja jest procesem odwracalnym; jej odwrotność nosi nazwę

dehydratacji. Dehydratacja wymaga zazwyczaj dostarczania energii, stąd też nie zawsze jest możliwe całkowite usunięcie wody hydratacyjnej z białek. Procesy hydratacyjne i dehydratacyjne szczególnie często występują w produktach spożywczych. Dotyczy to na przykład przygotowania ciasta chlebowego, suszenia mleka, pęcznienia nasion roślin strączkowych.

Jeżeli proces rozpuszczania białka prowadzi się w niewielkiej ilości wody, to wówczas białko wchłania wodę i tworzy żel. Proces ten określa się jako pęcznienie. Cząstki białka hydratowane tworzą jak gdyby rodzaj sieci, w której zamykana jest mechanicznie woda. Ciśnienie powstające podczas pęcznienia jest bardzo duże.

1.3. Koagulacja i denaturacja białek

Jeżeli stopień dyspersji układu koloidalnego ulegnie zmniejszeniu, to zachodzi wówczas zjawisko określane mianem **koagulacji**. Najogólniej polega ono na przejściu zolu w żel. Koagulację mogą powodować najczęściej zmiany ładunku elektrycznego lub dehydratację. Może ją także wywołać ogrzewanie białka, chociaż należy pamiętać, że są białka, które ogrzewane nie ulegają koagulacji, między innymi żelatyna. W pewnych określonych sytuacjach koagulacja może być odwracalna, na przykład powtórne przejście żelu w zol przez rozcieńczenie. Koagulacji w zasadzie nie towarzyszą zmiany w strukturze wtórnej białek (czyli struktury drugo-, trzecio- i czwartorzędowej). Szczególnym przypadkiem koagulacji jest wysolenie. Jest to przeprowadzenie zolu w żel przy zastosowaniu roztworów soli krystalicznych bezpośrednio do zolu białka. Zjawisko to jest związane z odwodnieniem cząstki białka. Jony soli są o wiele bardziej przyciągane przez dipole wody aniżeli białka. Sole powodują, że białko traci płaszcz hydratacyjny i następuje obniżenie rozpuszczalności, w efekcie białko wypada z roztworu.



Rys. 1. Schemat odciągania wody hydratacyjnej od białka w procesie wysalania

Proces wysalania najłatwiej przebiega w pobliżu punktu izoelektrycznego. Wysalanie białek jest procesem odwracalnym. Do wysolenia stosuje się sole metali alkalicznych lub amonowe, przy czym silniej wysalają sole pierwiastków wielowartościowych niż jednowartościowych. Niskie stężenia soli zwiększają rozpuszczalność białek. Natomiast do wysalania białek stosuje się stężone roztwory soli lub też sole krystaliczne.

Różne kationy i różne aniony mają różną zdolność wysalania białek z roztworu. Ich aktywność koagulacyjną można przedstawić w następujących szeregach:

kationy: $\text{NH}_4^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$

$\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$

aniony: cytrynianowy > winiany > SO_4^{2-} > Cl^- > ClO_3^- > CNS^-

Białko otrzymane w wyniku wysolenia zachowuje swoje biologiczne właściwości, dlatego metoda wysalania znalazła zastosowanie do rozdzielania i oczyszczania białek.

Denaturacja to proces utraty aktywności biologicznej białek. Tak zmienione białko nazywa się zdenaturowanym. Podczas denaturacji ulega zniszczeniu struktura wtórna białek (drugo-, trzecio- i czwartorzędowa). Nie zmieniona pozostaje jedynie struktura pierwszorzędowa. W wyniku denaturacji obniża się rozpuszczalność, następuje wzrost lepkości i wzrost kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego. Białka zdenaturowanego nie można wydzielić w postaci krystalicznej. Jest ono bardziej podatne na działanie enzymów proteolitycznych, a tym samym bardziej strawne.

Denaturację wywołują czynniki fizyczne: podwyższona temperatura, promieniowanie ultrafioletowe i rentgenowskie, silne wytrząsanie, wysokie ciśnienie oraz czynniki chemiczne, sole metali ciężkich, mocne kwasy i zasady nieorganiczne, niektóre kwasy organiczne, detergenty (m.in. roztwory siarczanu dodecyłu).

W początkowym etapie denaturacja może mieć niekiedy charakter odwracalny: zjawisko to nazwano renaturacją. Dochodzi do niej po usunięciu czynnika denaturującego, kiedy to odtwarza się struktura natywna (rodzima). Znane są też przypadki odwrócenia denaturacji spowodowanej redukcją wiązań disulfidowych. Na przykład rybonukleaza, zbudowana ze 124 aminokwasów z 4 wiązaniami disulfidowymi, po redukcji podlega ponownemu wytworzeniu właściwych wiązań i przywróceniu aktywności. Denaturacja białek wywołuje:

- zmniejszenie rozpuszczalności w punkcie izoelektrycznym,
- utratę aktywności biologicznej,
- zwiększenie aktywności odsłoniętych grup chemicznych (grupy fenolowe, SH oraz S-S),
- wzrost kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego,
- zwiększenie podatności na działanie enzymów proteolitycznych.

Mechanizmy procesów koagulacji i denaturacji różnią się, nie należy więc mylić tych zjawisk, chociaż zdarza się, że niekiedy koagulację poprzedza denaturacja. Trzeba jednak pamiętać, że białko zdenaturowane może pozostawać w roztworze, natomiast wiele białek można wytrącić z roztworu bez ich denaturacji.

1.4. Metody wytrącania białek

1.4.1. Wytrącanie białka etanolem

Rozpuszczalniki organiczne, takie jak alkohol etylowy lub aceton, odwadniając białko, powodują jego denaturację. Jeśli czas działania jest krótki i wytrącenie następuje w obniżonej temperaturze (około 0°C),

białko nie ulega denaturacji. W temperaturze pokojowej i dłuższym czasie białko ulega denaturacji spowodowanej osłabieniem oddziaływań hydrofobowych.

1.4.2. Wytrącanie białka za pomocą kationów

W środowisku o pH większym od punktu izoelektrycznego białka stają się anionami i reagują z kationami, tworząc z nimi połączenia jonowe lub kompleksy. Powstające sole dysocjują w różnym stopniu, w zależności od jonu. Kationy metali alkalicznych dają sole bardzo dobrze dysocjujące i rozpuszczalne w wodzie, natomiast kationy metali ciężkich tworzą sole słabo dysocjujące i trudno rozpuszczalne. Do wytrącania białek stosuje się jony Zn^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} . Reakcje te są wykorzystywane do wykrywania białek w roztworach oraz do ich usuwania, jeżeli przeszkadzają w oznaczeniach innych substancji, np. cukrów w produktach spożywczych

1.4.3. Wytrącanie białka za pomocą anionów

W środowisku o pH poniżej punktu izoelektrycznego białka zdysocjowane w formie kationów wykazują zdolność do wiązania z anionami. Do wytrącania białek stosuje się kwasy nieorganiczne i organiczne lub ich sole, jak kwas fosfotomolibdenowy, fosforowolframowy, trichlorooctowy, sulfosalicylowy, żelazocyjanek potasowy i inne. Niektóre kwasy organiczne tworzą trwałe nierozpuszczalne połączenia z białkami i są stosowane do odbiałczania płynów biologicznych, przerywania reakcji enzymatycznych itp. Związki te dodane w większym stężeniu denaturują białko. Reakcje z żelazocyjankiem potasu i taniną są czułymi reakcjami pozwalającymi na wykrywanie białka w bardzo małych stężeniach.

1.4.4. Denaturacja białka przez ogrzewanie

W podwyższonej temperaturze następuje rozerwanie wiązań wodorowych, co prowadzi do nieodwracalnej denaturacji białka. Proces denaturacji przebiega w różnych temperaturach w zależności od rodzaju białka. Niektóre ulegają denaturacji już w temperaturze $40^{\circ}C$, inne dopiero po ogrzaniu do $100^{\circ}C$. Tylko nieliczne białka wytrzymują krótkie gotowanie, na przykład żelatyna czy rybonukleaza. Denaturowane termicznie białka wytrącają się w punkcie izoelektrycznym.

2. Reakcje charakterystyczne białek

Do wykrywania białek w różnych materiałach i artykułach żywnościowych służą reakcje charakterystyczne, czyli łatwe do wykonania reakcje chemiczne, które zmianą barwy lub inną łatwo dostrzegalną zmianą sygnalizują obecność substancji białkowej. Są to przede wszystkim reakcje:

- **biuretowa,**
- **ksantoproteinowa,**
- **z solami ołowiu,**
- **Millona.**

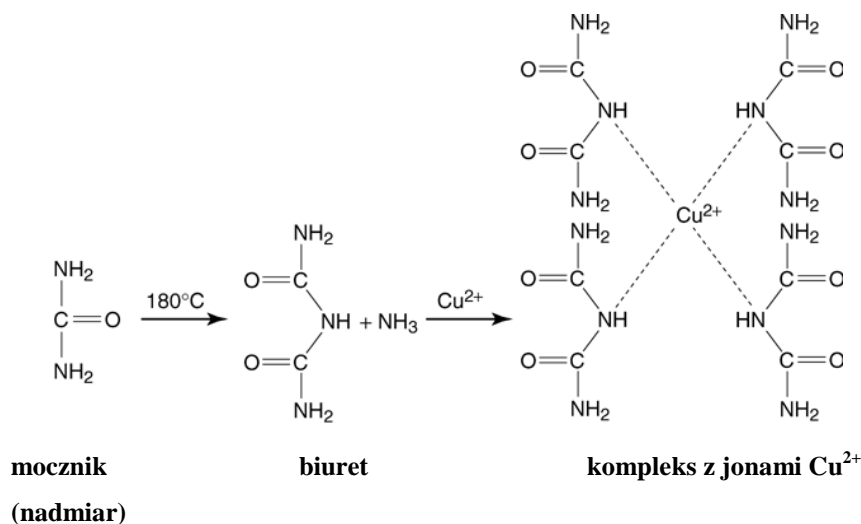
Czułość tych reakcji charakterystycznych oraz metod wytrąceniowych zależy od rodzaju białka znajdującego się w badanej próbce oraz od wielu innych czynników. Można przyjąć, że za pomocą

reakcji biuretowej można wykryć 10 mg białka w 100 cm³ roztworu, przez wytrącenie stężonym kwasem azotowym(V) - 2,5 mg białka w 100 cm³ roztworu, przez wytrącenie heksacyjanożelazianem(II) potasu (żelazocyjankiem potasu) albo kwasem sulfosalicylowym - 2 mg białka w 100 cm³ roztworu, a przez zagotowanie w kwasie octowym w obecności soli - 1 mg białka w 100 cm³ roztworu.

2.1. Reakcja biuretowa

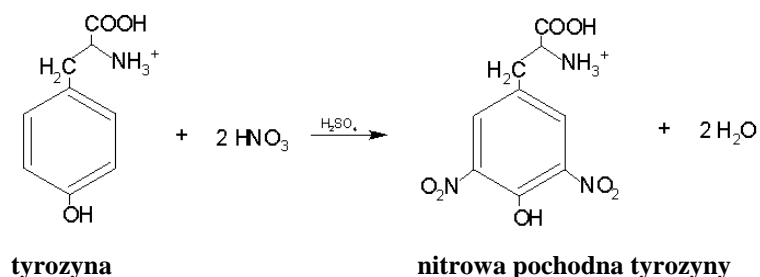
W alkalicznym środowisku w obecności soli miedzi białka tworzą fioletowo zabarwiony roztwór. Barwa ta pochodzi od kompleksowego połączenia miedzi z grupami peptydowymi -CO-NH-.

Barwa tworzącego się związku kompleksowego zależy od długości łańcucha peptydowego: peptydy zbudowane z dwóch reszt aminokwasowych, czyli dwupeptydy dają zabarwienie niebieskie, trójpeptydy - fioletowe, a peptydy zawierające więcej niż trzy reszty aminokwasowe - czerwone. Reakcję biuretową dają oprócz białek także inne związki zawierające grupy -CO-NH-, jak np. biuret H₂N-CO-NH-CO-NH₂ (stąd nazwa reakcji), amid kwasu asparaginowego, histydyna oraz związki zawierające grupy -CS-NH-.



2.2. Reakcja ksantoproteinowa

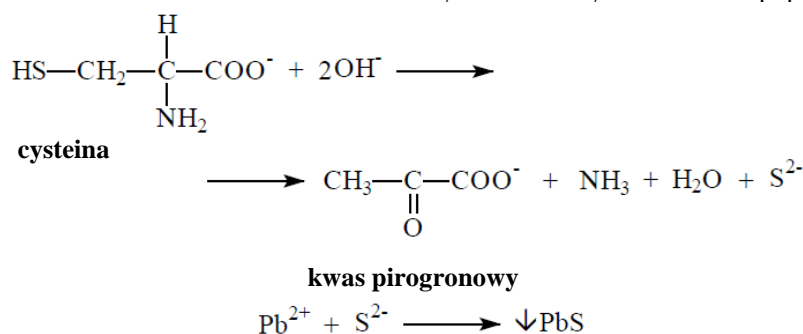
Większość białek podczas ogrzewania ze stężonym kwasem azotowym(V) daje żółte zabarwienie, które po dodaniu zasady lub amoniaku zmienia się na pomarańczowe. Żółta barwa pochodzi od produktów nitrowania wchodzących w skład białka reszt aminokwasów aromatycznych (fenyloalaniny i tyrozyny) oraz tryptofanu, zawierającego również pierścień benzenowy.



Reakcji ksantoproteinowej nie dają te białka, w których nie występują trzy wymienione aminokwasy. Jest to zatem jednocześnie reakcja służąca do stwierdzania obecności aminokwasów aromatycznych w badanym białku lub peptydzie. Reakcję ksantoproteinową dają również proste związki aromatyczne, np. fenole.

2.3. Reakcja z solami ołowiu

Prawie wszystkie białka zawierają aminokwasy siarkowe (cysteinę, cystynę, metioninę), które podczas ogrzewania z alkaliami i octanem ołowiu odszczepiają siarkę pod postacią siarkowodoru. Siarkowódór reagując z octanem ołowiu tworzy czarny osad siarczku ołowiu. Jest to jednocześnie reakcja pozwalająca stwierdzić obecność aminokwasów siarkowych w badanym białku lub peptydzie.



2.4. Reakcja Millona

Wiele białek pod działaniem odczynnika Millona barwi się na czerwono. Odczynnik Millona jest roztworem azotanu rtęci w stężonym kwasie azotowym, zawierającym nieco kwasu azotawego. Czerwone zabarwienie pochodzi od produktów reakcji reszt tyrozyny z kwasem azotowym i rtęcią. Reakcję Millona dają zatem te białka, które zawierają resztę tyrozyny, a nie dają jej białka, w których nie ma tyrozyny, np. żelatyna i protaminy. Jest to zatem jednocześnie reakcja pozwalająca stwierdzić obecność reszt tyrozynowych w badanym białku lub peptydzie.

Opracowano na podstawie:

Ban-Oganowska H. i in. „Ćwiczenia laboratoryjne z biochemii i chemii żywności”, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej im. Oskara Langego we Wrocławiu, Wrocław 2006.

Śmiechowska M i Przybyłowski P „Chemia żywności z elementami biochemii”, Wydawnictwo Akademii Morskiej w Gdyni, Gdynia 2004.

Filipiak M. „Podstawy biochemii dla towaroznawców”, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, Poznań 2009.