

PROTEIN

II. Proprietățile fizico-chimice ale proteinelor

Proteinele se deosebesc după proprietățile lor fizico-chimice:

- **Masă moleculară**
- **Sarcină electrică**
- **Termolabilitate**
- **Solubilitate**

Masa moleculară a proteinelor

Proteinele sunt compuși
macromoleculari

- cu masă moleculară mare – de la 5 000
la 1 000 000 Da (daltoni) în dependență
de numărul de aminoacizi constituenți și
de numărul de protomeri.

Masa moleculară a proteinelor, Da

Denumirea proteinei	Sursa proteinei/Izolată din	Masa moleculară
Lactalbumină	lapte	17.000
Insulina	pancreas	12,000
Hemoglobina	globule roșii	68.000
Miozina	mușchi	850.000
Pepsină	stomac	36.000
Peroxidaza	rinichi	44.000

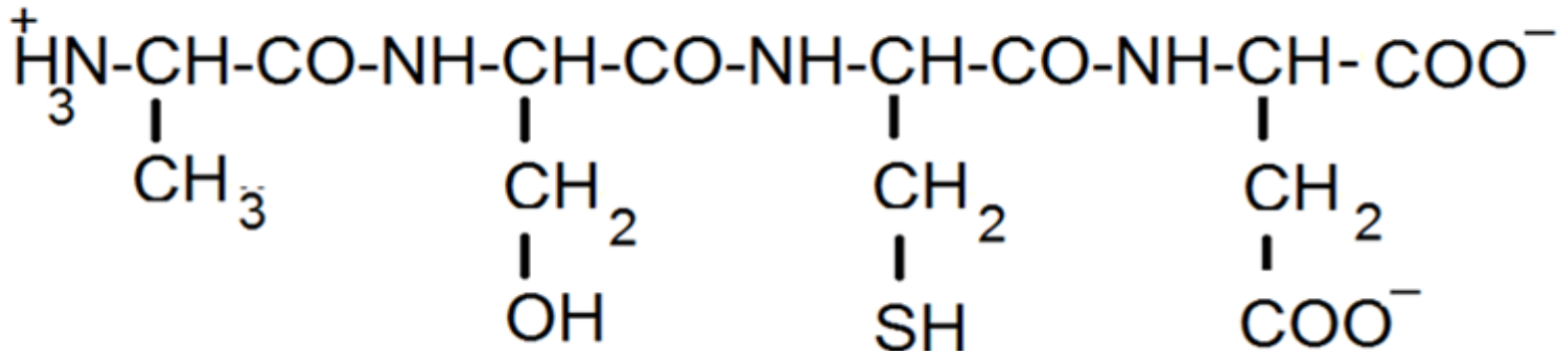
Sarcina electrică a proteinelor

- Proteinele prezintă polielectroliți amfoteri
- Sarcina electrică a proteinelor este determinată de 2 factori:
 1. de componența aminoacidică
 2. de pH mediului

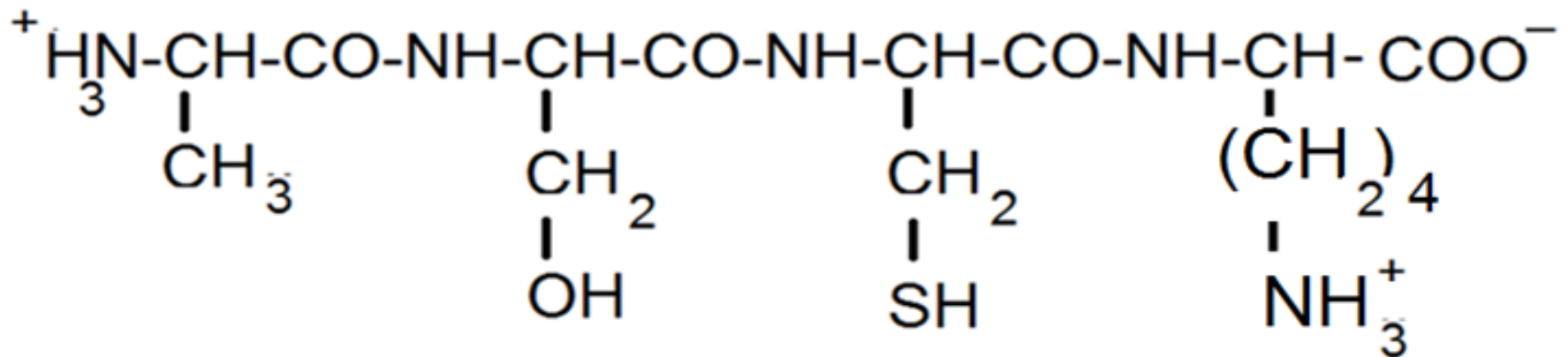
Sarcina electrică a proteinelor :

1. depinde de componența aminoacidică, prezența și raportul radicalilor aminoacizilor, ce posedă sarcină electrică;

Dacă proteina posedă mai mulți aminoacizi încărcați negativ (Glu și Asp)– în mediul apos sarcina ei sumară va fi negativă (de exemplu –



- Dacă proteina are în componența sa mai mulți aminoacizi cu sarcină pozitivă în radical (Lys, Arg și His)– sarcina ei sumară va fi pozitivă (de exemplu - histonele).



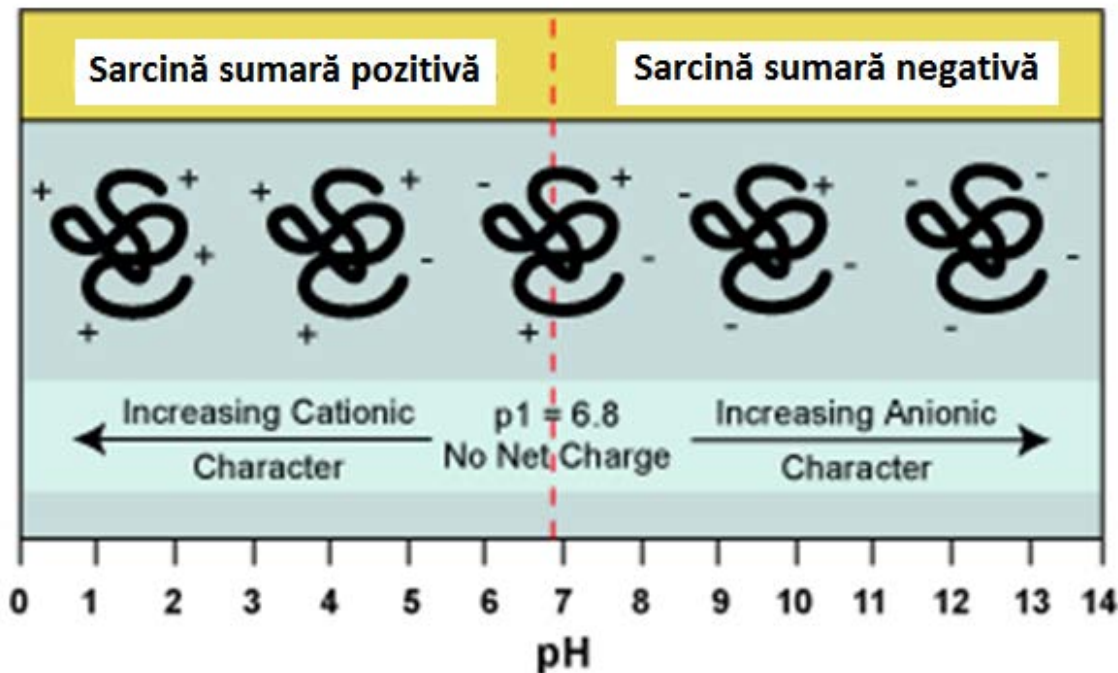
Sarcina electrică sumară a proteinelor :

2. depinde de pH-ul mediului

În mediul acid concentrația de protoni H^+ este înaltă și neutralizează grupele COO^- ale aminoacizilor - sarcina negativă descrește, proteina se încarcă pozitiv - devine cation, și în câmpul electric migrează spre catod.

Sarcina electrică sumară a proteinelor :

În mediul basic concentrația de OH^- este înaltă și neutralizează sarcina pozitivă a grupelor amino NH_3^+ , astfel sarcina pozitivă se micșorează, proteina se încarcă negativ, devine anion și în câmpul electric migrează spre anod.



Starea și punctul izoelectric

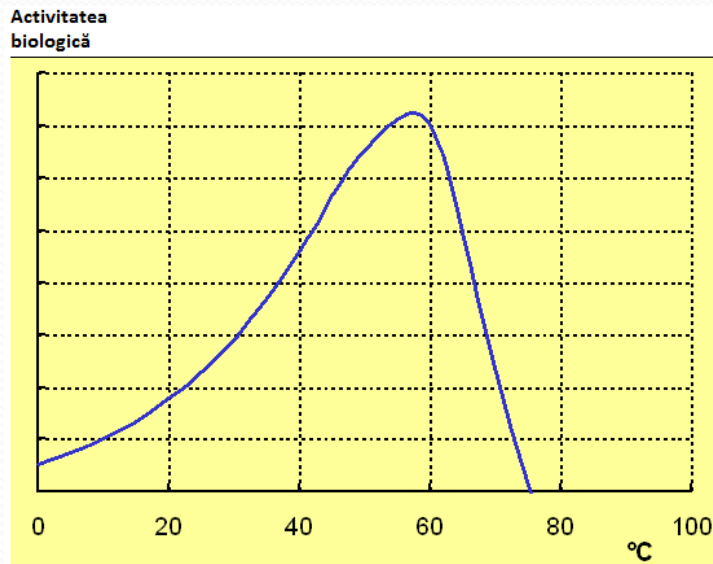
- Starea proteinei când sarcina ei electrică sumară este *egală cu zero* se numește **stare izoelectrică**.
- Valoarea pH-ului la care proteina se află în stare izoelectrică se numește **punct izoelectric**.
- Proteinele, care se află în stare izoelectrică au solubilitate scăzută și pot ușor să se precipite.

Punctul izoelectric

- Proteinele, în care prevalează aminoacizi acizi, cu radicali încărcăți negativ (Glu, Asp) – vor avea punctul izoelectric în mediul acid;
- Proteinele, în care prevalează aminoacizi bazici, cu radicali încărcăți pozitiv (Lys, Arg, His) – vor avea punctul izoelectric în mediul bazic;

Termolabilitatea

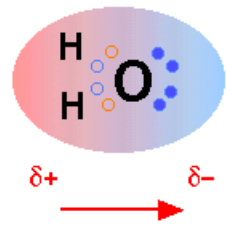
- este proprietatea proteinelor de a-și menține activitatea biologică în limite înguste de temperatură (aprox. de la 10 la 40°C)
- dacă temperatura este mai înaltă de 50-60°C proteina denaturează – își pierde conformația sa nativă. Are loc distrugerea tuturor nivelelor de organizare structurală a proteinei (cu excepția celui primar).



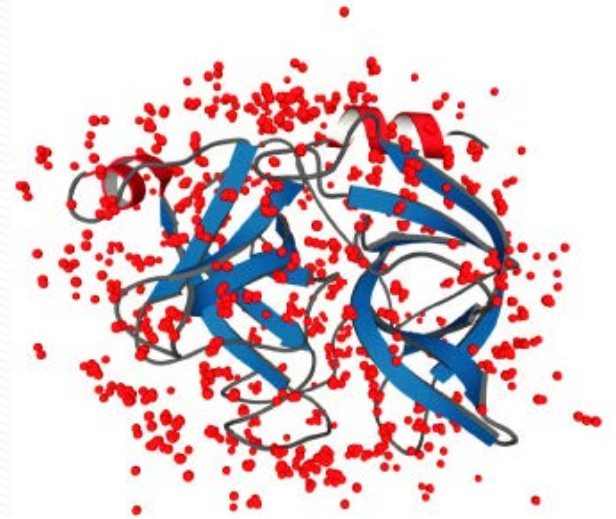
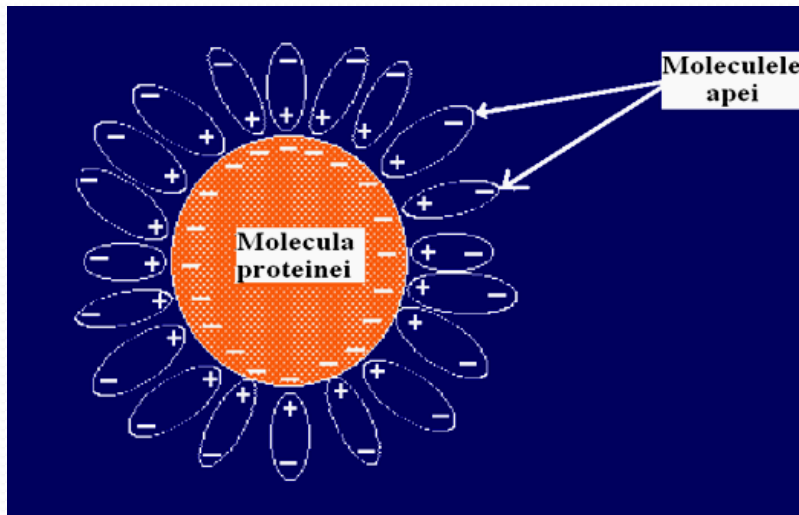
Termolabilitatea

- există câteva excepții – **proteinele termostabile** (tripsina, lizozima, taq-polimeraza) – stabile la temperaturi înalte.
- dacă temperatura este joasă - structura proteinei nu se modifică, însă proteina devine biologic inactivă.

Solubilitatea proteinelor

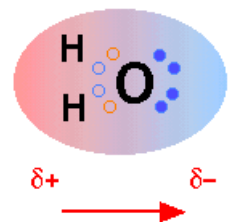


- Majoritatea proteinelor sunt compuși hidrofili și sunt solubile în apă.
- Apa interacționează cu grupările polare ale proteinelor și formează o **membrană apoasă** la suprafața proteinei .



Membrana apoasă

- Se formează la interacțiunea grupelor ionogene ce fixează dipolii de apă:
- Grupa -COO^- fixează 4 molecule de H_2O ,
- Grupa -NH_2 fixează 3 molecule de H_2O ;
- Grupele -OH și -NH – a câte 2 molecule de H_2O .
- Apa ce intră în componența membranei apoase e numită “apă legată”



Solubilitatea proteinelor depinde de:

- 1. prezența grupelor polare, inclusiv cu sarcină electrică;**
- 2. prezența membranei apoase;**
- 3. forma moleculei – proteinele globulare sunt mai solubile decât cele fibrilare;**

Solubilitatea proteinelor depinde de:

4. **Solvent** – de exemplu: albuminele sunt solubile atât în apă, cât și în soluții saline de diferite concentrații, iar globulinele nu sunt solubile în apă, și sunt solubile numai în soluții saline slabe.
5. **pH-ul mediului** – pH-ul influențează asupra sarcinii proteinei; în punctul isoelectric solubilitatea scade.
6. **Temperatură**

Clasificarea soluțiilor în funcție de

- masa moleculară (M) și
- diametrul (Φ) al particulelor fazei dispersate

Soluțiile proteice formează soluții coloidale:

MOLECULARE: $M < 10^3 \text{ Da}$,

$\Phi < 10 \text{ \AA}$

COLOIDALE: $10^3 \text{ Da} < M < 10^8 \text{ Da}$,

$10 \text{ \AA} < \Phi < 10^3 \text{ \AA}$

SUSPENSII: $M > 10^8 \text{ Da}$,

$\Phi > 10^3 \text{ \AA}$

- Spre deosebire de soluțiile coloidale obișnuite, soluțiile proteice nu necesită prezența stabilizatorului. Soluțiile proteice sunt stabile și cu timpul nu se precipită.

Proprietățile soluțiilor proteice ca soluții coloidale:

- Proprietăți optice – efectul Tindal
- Viteză mică de difuzie
- Proprietăți osmotice (oncotice)
- Viscositate înaltă
- Capacitatea de a forma geluri – rețele structurale cu apă în interior

Proprietățile optice

- La iluminarea laterală a soluției proteice raza de lumină în ea devine vizibilă, formând conul de lumină- **efectul Tindal**. Acest efect de dispersie a luminii se explică prin difracția razelor de lumină de către particule în soluție.
- Capacitatea proteinelor de a dispersa lumina este folosită:
 1. la determinarea cantitativă a proteinelor prin metoda nefelometrică
 2. la studierea microscopică a structurilor celulare.

Viteză mică de difuzie

- Difuzie – deplasarea spontană a moleculelor substanței dizolvate datorită gradientului de concentrație (de la zone cu concentrații mai mari spre cele cu concentrații mai mici).
- **Viteza de difuzie a proteinelor depinde mai mult de forma moleculei, decât de masa ei.**
- Repartizarea intracelulară a proteinelor are loc prin difuzie. Deoarece viteza de difuzie e mică, are loc limitarea vitezei proceselor dependente de proteinele difuzabile.

Proprietăți osmotice

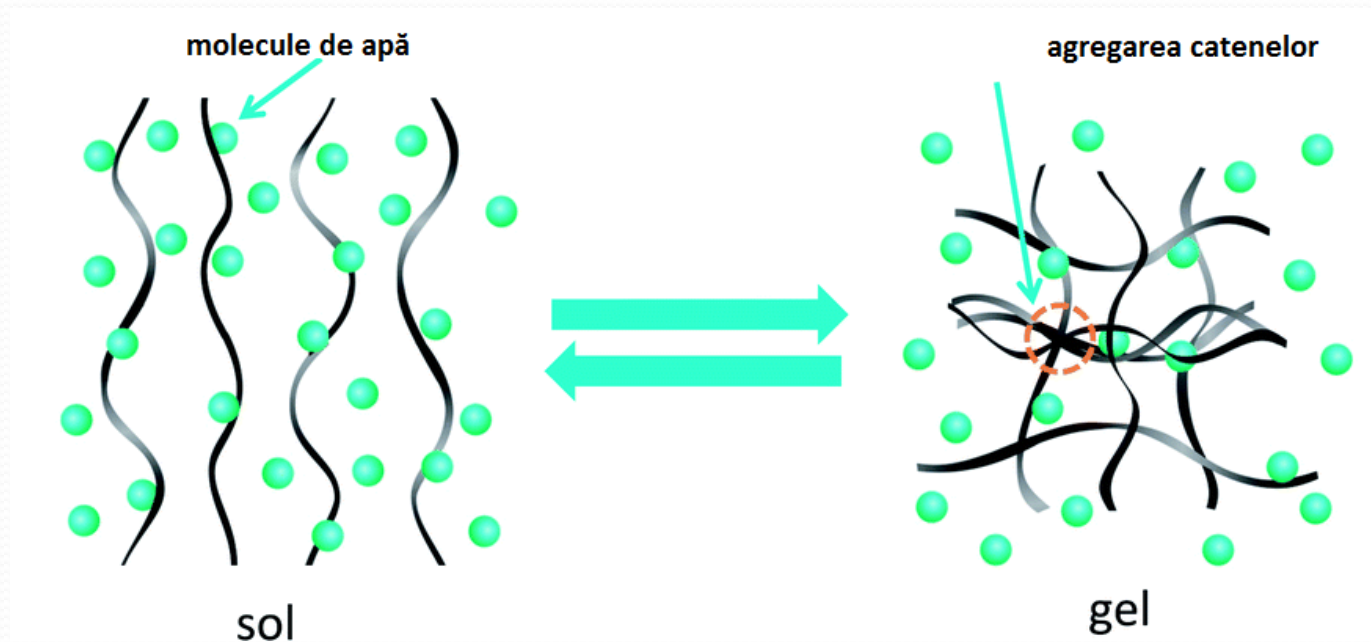
- proteine fiind macromolecule – nu difundează prin membrane semipermeabile ceea ce are ca urmare apariția fenomenului de **osmoză** (deplasarea moleculelor de H_2O prin membrană în soluția proteică). Deplasarea apei este limitată de presiunea hidrostatică (presiunea coloanei de apă) și se numește **presiune osmotică**;
- Presiunea osmotică depinde de concentrația molară a proteinei și de temperatură.
- Presiunea osmotică determinată de proteine se numește **presiune oncotică**.

Viscozitate mare

- **Viscozitatea – forța de coeziune între moleculele proteice - e dependentă de masa și forma moleculelor**
- Mărirea concentrației proteinei conduce și la mărirea viscozității soluției
- Proteinele fibrilare sunt mai vâscoase comparativ cu cele globulare.
- Viscozitatea e dependentă de:
 1. temperatură (la temperatură înaltă viscozitatea scade);
 2. prezența electroliților (de ex. sărurile de Ca^{2+} măresc viscozitatea prin formarea punților de Ca^{2+})

Capacitatea de a forma geluri

- Moleculele proteinei interacționează între ele formînd rețele structurale în interiorul cărora se imobilizează apa.
- Gelatinizarea are loc mai ușor în soluțiile proteinelor fibrilare



- Formarea de gel se observă la coagularea sîngelui (formarea rețelei de fibrină).
- La învechirea gelurilor are loc **sinereza** – expulzarea apei, datorită contracției mol din rețea și eliminarea apei.

Formarea gelului depinde de :

- concentrația soluției;
- temperatură (crește la scăderea temperaturii);
- concentrația ionilor de hidrogen (în punctul izoelectric se observă o viteză maximă de formare a gelului);
- prezența electroliților (ionul SO_4^{2-} contribuie în mod preferat la transformarea solului în gel).

Xerogel-

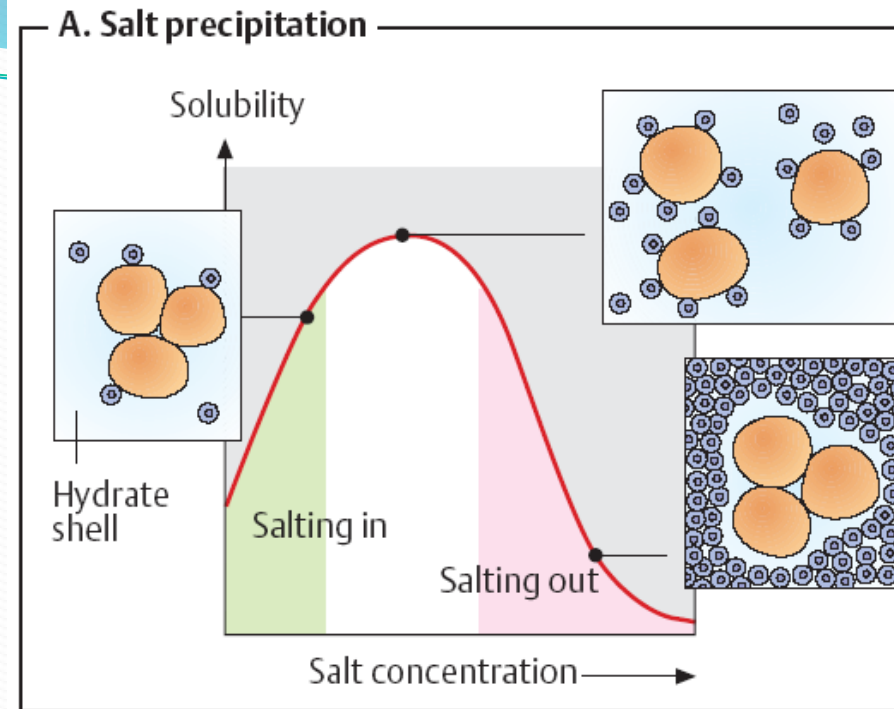
- este gelul secat (uscat) - lipsit de apă.
- se capătă prin secare liofilă a soluțiilor coloidale
- **Secarea liofilă** constă în îndepărtarea apei în vid din soluția coloidală înghețată.
- se păstrează un timp mai îndelungat ceea ce are importanță practică în industria de preparare a medicamentelor de origine proteică.
- Ex: diferite proteine (albumina, gama-globulinele și altele).

Metodele de purificare, fractionare și studiere a proteinelor :

- **Salifierea**
- **Dializa**
- **Electroforeza**
- **Gel-filtrarea**

Salifierea

- este metoda de precipitare a proteinelor din soluție sub acțiunea concentrațiilor mari de săruri neutre (sulfat de amoniu ș.a.)
- este un proces reversibil
- proteina nu-și pierde activitatea.



Mecanismul salifierii::

- distrugerea membranei apoase
- înlăturarea sarcinii electrice.

Salifierea

- Solubilitatea proteinelor este strict dependentă de concentrația sărurilor în soluție (*forța ionică a mediului*).

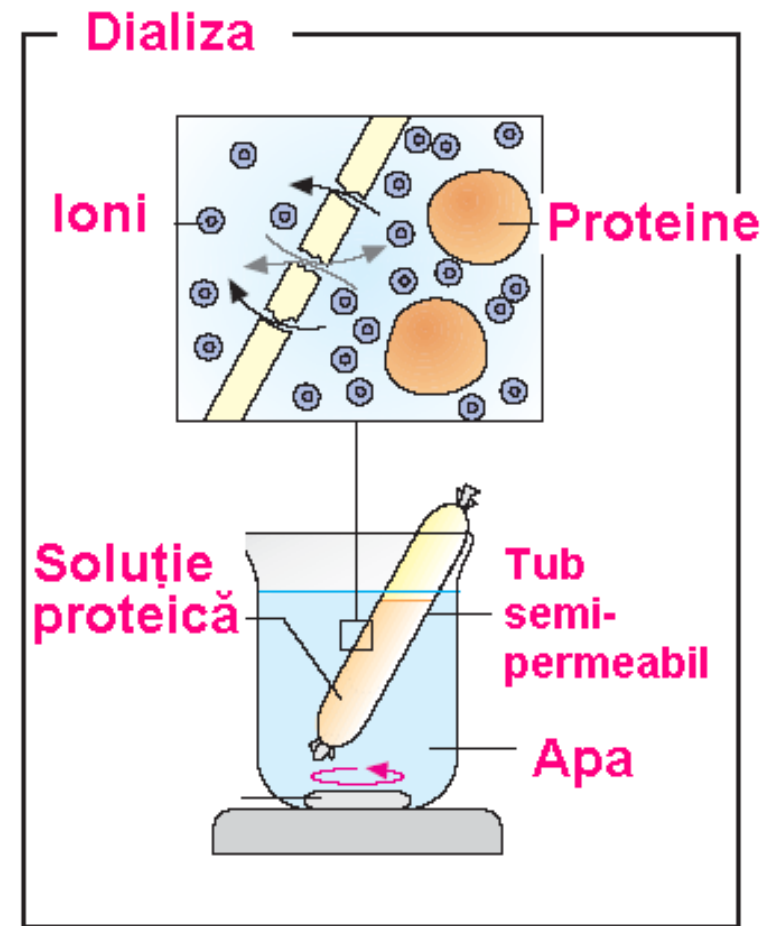
Proteinele sunt de regulă slab solubile în apă pură. Solubilitatea lor crește odată cu creșterea forței ionice a soluției, deoarece tot mai mulți ioni anorganici înalt hidratați se leagă de suprafața proteinei, prevenind agregarea moleculelor (**salting in**).

- În soluții cu o forță ionică foarte înaltă (la concentrații înalte de săruri) sarea distruge membrana apoasă a moleculei proteice și astfel duce la agregarea și precipitarea proteinelor (**salting out**). Deaceia, adăugarea sărurilor (de exemplu a sulfatului de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) face posibilă separarea proteinelor din amestec conform gradului lor de solubilitate (fractionare).

- Asupra vitezei de precipitare a proteinelor prin salifiere acționează un șir de factori ca: hidrofilitatea proteinei, masa moleculară, sarcina electrică; de aceea salifiere diferitelor proteine are loc în concentrații diferite de săruri.
- De exemplu, albuminele se precipită în soluție saturată de sulfat de amoniu, pe când globulinele - în soluție semisaturată

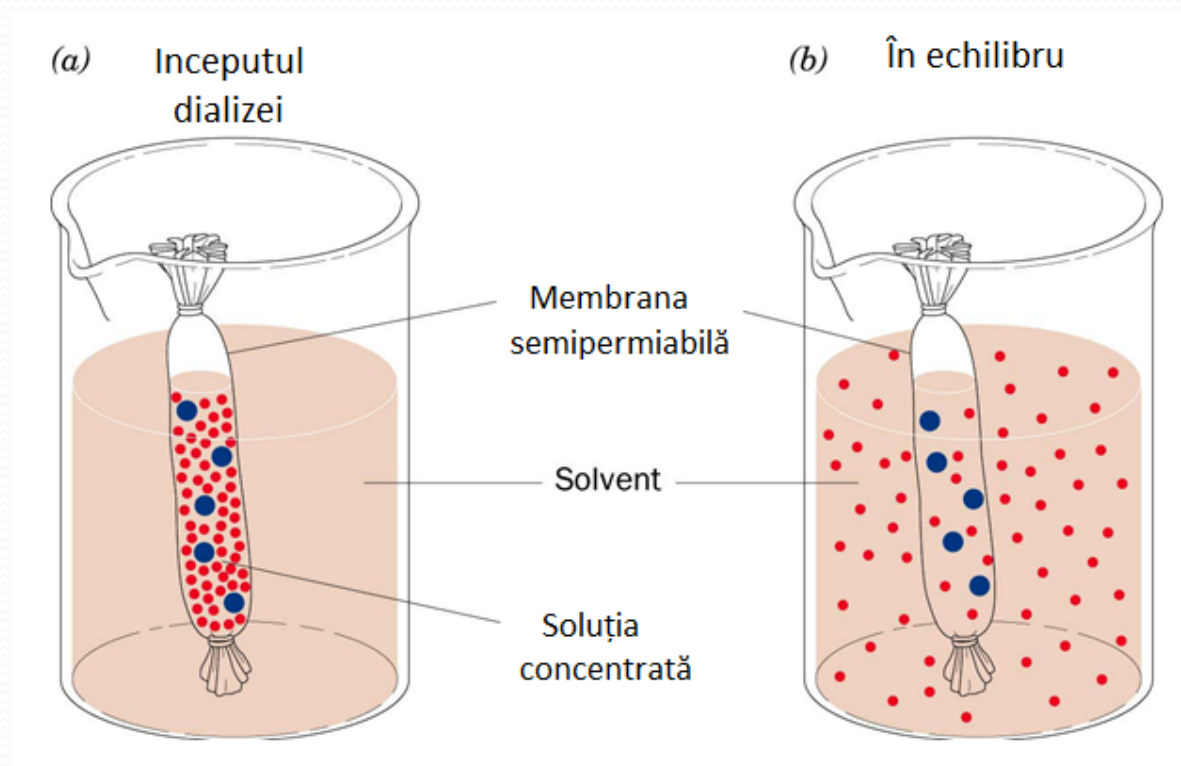
Dializa-

- – metoda de separare și purificare a substanțelor macromoleculare și soluțiilor coloidale de substanțe micromoleculare cu ajutorul membranelor semipermeabile (celofan, pergament etc.).
- Prin porii acestor membrane pot trece numai substanțele micromoleculare, ce au masă moleculară și dimensiuni mici.



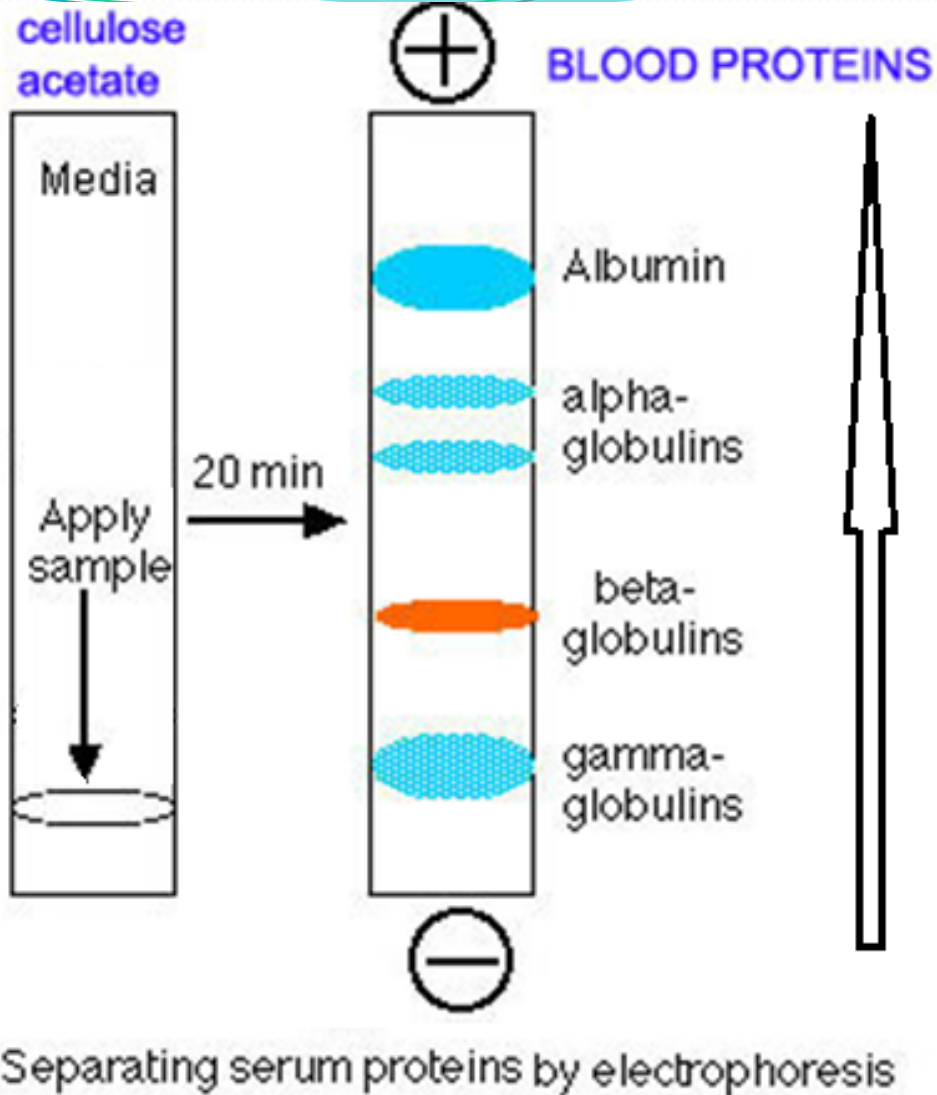
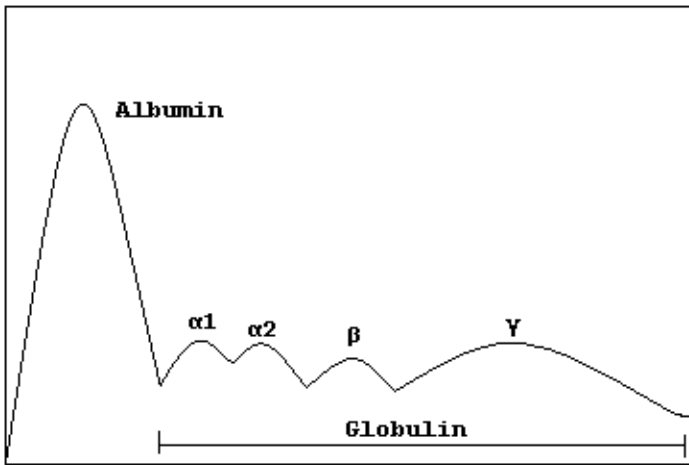
Dializa

Datorită dimensiunilor sale mari, moleculele proteice nu sunt capabile să treacă prin porii **membranelor semipermeabile**, pe când compușii micromoleculari sunt capabili. Astfel, dializa poate fi folosită pentru a înlătura componentele micromoleculare din soluțiile proteice:



Electroforeza

este o metodă utilizată pentru a separa din amestec diferite componente individuale (fracții), bazată pe capacitatea acestora de a se deplasa în câmpul electric. Electroforeza proteinelor plasmei sanguine permite separarea lor în 5 fracții distincte majore: albumine, alfa1, alfa2, beta și gama-globuline.



Gel filtrarea (gel-cromatografia)

Este una din principalele metode cromatografice de purificare a proteinelor.

Necesită:

- faza staționară: sita moleculară
- faza mobilă: tampon

- Sitele moleculare sunt formate din granule de gel polizaharidic inert hidratat. Granulele posedă pori de diferit diametru.
- Micromoleculele cu dimensiuni mici pătrund prin acești pori, macromoleculele - nu.
- Viteza migrării micromoleculelor prin coloană este mai mică decât a macromoleculelor - fapt ce permite purificarea proteinelor de substanțele micromoleculare.
- Viteza migrării proteinelor prin coloană este în funcție de masa și dimensiunile lor – se mișcă mai repede cele ce au masa și dimensiuni mai mari

