

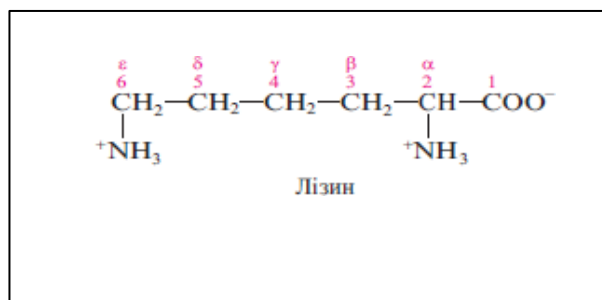
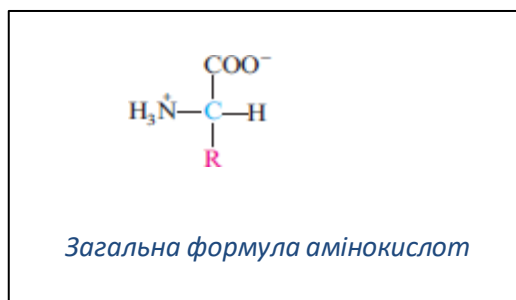
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 16

БІЛКИ ТА АМІНОКИСЛОТИ

Білки – це органічні сполуки, які містять карбон (51-55%), гідроген (6,6-7,3%), кисень (21-23%), нітроген (15-18%), сірку (0,3-2,4%), а деякі білки - фосфор (0,2-2%), залізо та ін. Характерною особливістю елементарного складу білків у всіх організмів є наявність нітрогену.

Білки виконують такі **функції**: ферментативну, структурну, рецепторну, транспортну, захисну, рухову, гормональну, енергетичну тощо.

Білки – це високомолекулярні органічні сполуки (полімери), мономерними одиницями яких є амінокислоти. *Амінокислотами* називають органічні кислоти, у молекулах яких один або кілька атомів водню заміщені аміногрупами. Усі амінокислоти, що входять до складу білків, є α -амінокислотами, тобто їхня аміногрупа (NH_2) перебуває в α -положенні (поряд) з карбоксильною групою (COOH).



Пептидний зв'язок ($-\text{CO}-\text{NH}$) утворюється при взаємодії карбоксильної групи однієї амінокислоти із аміногрупою іншої амінокислоти.

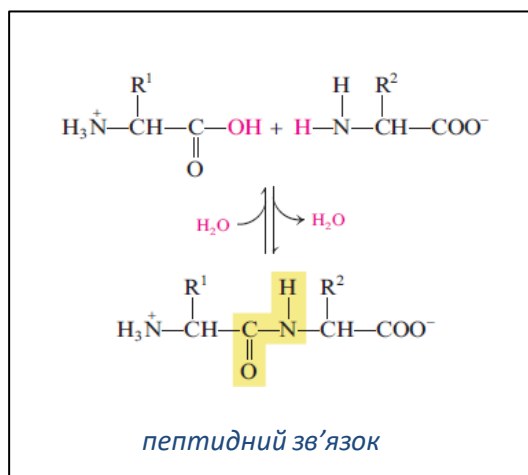
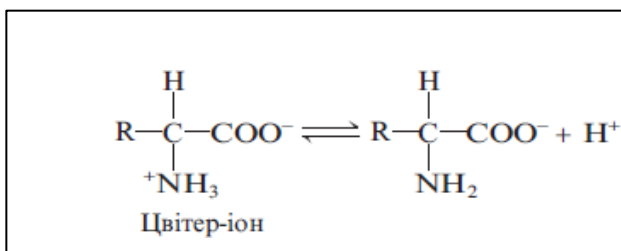
У природі існує понад 150 різноманітних амінокислот, однак лише 20 амінокислот входять до складу білків, які зустрічаються у рослин та тварин. Вищі рослини синтезують усі 20 амінокислот.

Класифікація амінокислот. 1) Розрізняють *замінні* амінокислоти, які синтезуються в організмі (гліцин, аланін, серин, аспарагін, глутамін, пролін, тирозин, цистеїн, аспарагінова та глутамінова кислоти); *незамінні* амінокислоти, які не синтезуються в організмі і потрапляють з їжею (валін, треонін, лізин, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан) та частково замінні амінокислоти (аргінін, гістидин). 2) В залежності від полярності R(радикальних)-груп амінокислоти поділяються на 4 класи: *неполярні (гідрофобні)* – аланін, лейцин, ізолейцин, валін і метіонін; *полярні, але незаряджені* – серин, треонін, цистеїн, аспарагін, глутамін; *позитивно*

заряджені – лізин, аргінін, гістидин; *негативно заряджені* – аспарагінова і глутамінова кислоти. 3) Амінокислоти можуть бути похідними жирних і ароматичних кислот, тому їх поділяють на ациклічні (аліфатичні) та циклічні (гомоциклічні – фенілаланін, тирозин та гетероциклічні – триптофан, гістидин, пролін). 4) Ациклічні амінокислоти в залежності від кількості карбоксильних і амінних груп розрізняють моноаміномонокарбонові (гліцин, аланін, серин, цистеїн, треонін, валін, лейцин, ізолейцин), моноамінодикарбонові (аспарагінова та глутамінова кислоти), діаміномонокарбонові (лізин, аргінін), діамінодикарбонові (цистин) кислоти.

Класифікація білків. 1) В залежності від форми або конформації білки поділяють на – глобулярні (ферменти, гормони) і фібрилярні (кератин, фіброїн). 2) За фізико-хімічними властивостями білки класифікуються на прості (протеїни) та складні (протеїди). При гідролізі простих білків отримують лише амінокислоти, тоді як при гідролізі складних білків - амінокислоти та речовини небілкової природи (вуглеводи, ліпіди, фосфорна кислота, нуклеїнові кислоти тощо). Небілковий компонент складних білків називається простетичною групою. До протеїнів належать гістони та протаміни; альбуміни і глобуліни; глютеліни і проламіни. Розрізняють хромопротеїди (гемоглобін, хлорофіл), фосфопротеїди (казеїноген, вітелін, іхтулін), ліпопротеїди, глікопротеїди (гормони) і нуклеопротеїди.

Властивості білків та амінокислот. У водних розчинах при нейтральному значенні рН амінокислоти існують у вигляді біполярних іонів (цвітер-іонів) (коли R не дисоціюється).



Тому в залежності від зміни рН середовища амінокислоти поведуть себе як кислоти або як основи (амфотерні властивості). У кислому середовищі карбоксильна група нейтралізується і амінокислота реагує як катіон. У

лужному середовищі цвітер-іон амінокислоти втрачає протон і амінокислота реагує як аніон. Значення рН, при якому молекула білка існує в електронно-нейтральній формі, називається *ізоелектричною точкою*.

Під дією різних фізико-хімічних факторів (іони важких металів, концентровані кислоти, луги, високі температури, механічний вплив) змінюється структура і нативні властивості білків. Це явище називається *денатурація*. У денатурованих білків змінюється вторинна, третинна і четвертинна структура, а пептидний зв'язок зберігається.

Більшість білків розчиняються у воді і утворюють колоїдні розчини. Колоїдний стан і великі розміри білкових молекул не дозволяє проходити їм через напівпроникні мембрани. Цю властивість використовують для очищення розчинів білків від низькомолекулярних сполук, а метод очистки білків називається діалізом.

КОЛЬОРОВІ РЕАКЦІЇ НА БІЛКИ ТА АМІНОКИСЛОТИ

Мета роботи. Ідентифікувати наявність амінокислот (циклічних, сірковмісних тощо), пептидних зв'язків у складі білків з використанням кольорових (якісних) реакцій.

1. Біуретова реакція на пептидні зв'язки.

Принцип реакції. Білки в лужному розчині за наявності двохвалентного сульфату міді утворюють комплексні сполуки міді, які забарвлені в синьо-фіолетовий колір, інтенсивність якого залежить від кількості пептидних зв'язків у молекулі білка.

Матеріали та реактиви. 1% водний розчин білка (яєчний або альбумін), 10% розчин NaOH чи KOH, 1% розчин CuSO₄.

Обладнання. Скляні палички, штатив, пробірки, піпетки, крапельниця.

Хід роботи.

Спочатку необхідно приготувати розчин яєчного білка. Для цього білок одного яйця відділяють від жовтка, розчиняють його у 15-20 кратному об'ємі дистильованою водою. Отриманий розчин білка фільтрують через 3-4 шару марлі.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 3 мл розчину білка, 1 мл розчину NaOH і додають 1-2 краплі розчину CuSO₄ та обережно перемішують. Після чого розчин у пробірці має забарвитися у синьо-фіолетовий колір.

2. Реакції на амінокислоти.

А. Реакція з азотистою кислотою.

Принцип реакції.Продуктом взаємодії α -амінокислот з азотистою кислотою, яка утворюється в реакції нітриту натрію та оцтової кислоти, є газоподібний азот.

Матеріали і реактиви. 1% водний розчин білка (яєчний або альбумін), 5% розчин нітриту натрію (NaNO_2), концентрована оцтова кислота (CH_3COOH).

Обладнання. Штатив, пробірки, крапельниця.

Хід роботи.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 5 крапель розчину білка, додають 5 крапель розчину NaNO_2 і 2 краплі розчину CH_3COOH . Суміш у пробірці обережно перемішують, після чого має спостерігатися виділення газу.

Б. Реакція утворення комплексної солі міді.

Принцип реакції. Під час нагрівання амінокислоти з карбонатом міді (CuCO_3) утворюється комплексна сполука міді, яка має синє забарвлення.

Матеріали і реактиви. 1% водний розчин білка (яєчний або альбумін), сухий карбонат міді.

Обладнання. Штатив, пробірки, піпетки, крапельниця, газовий пальник або спиртівка, пробіркотримач.

Хід роботи.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 1 мл розчину білка, додають на кінчику лопатки сухий карбонат міді, далі вміст пробірки обережно нагрівають над полум'ям пальника до кипіння. Розчин у пробірці має забарвитися у синій колір.

В. Ксантинпротеїнова реакція на циклічні амінокислоти.

Принцип реакції. В ароматичних амінокислотах, які містять бензольні кільця, під дією азотистої кислоти відбувається реакція нітрування бензольного кільця з утворенням забарвленої в жовтий колір нітросполуки.

Матеріали і реактиви. 1% водний розчин білка (тирозин-вмісний), концентрована азотна кислота (HNO_3), 10% розчин NaOH .

Обладнання. Штатив, пробірки, піпетки, крапельниця, газовий пальник або спиртівка, пробіркотримач.

Хід роботи.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 3 мл розчину білка та 1 мл концентрованої азотної кислоти. Вміст пробірки обережно нагрівають над полум'ям пальника до появи жовтого забарвлення та охолоджують до кімнатної температури і додають 1-2 краплі 10% розчину NaOH . Після чого суміш у пробірці має забарвитися у помаранчевий колір.

Г. Реакція Фоля на сірковмісні амінокислоти.

Принцип реакції. При нагріванні розчинів цистину або цистеїну у лужному середовищі відбувається гідроліз сульфгідрильної групи з подальшим утворенням відповідних сульфідів натрію або калію. Сульфід натрію можна виявити за допомогою важких металів (іонів свинцю), які утворюють з іонами сірки нерозчинний сульфід свинцю чорного кольору.

Матеріали і реактиви. 1% водний розчин білка (яєчний), реактив Фоля (до 10% розчину ацетату свинцю $Pb(CH_3COO)_2$ додають 10% розчин NaOH до розчинення осаду), 20% розчин NaOH.

Обладнання. Штатив, пробірки, піпетки, скляні палички, водяна баня.

Хід роботи.

У хімічну пробірку за допомогою піпетки вносять 1 мл розчину білка, додають 2 мл 20% розчину NaOH і 1 мл реактиву Фоля. Вміст пробірки ретельно перемішують і поступово нагрівають на водяній бані до появи бурого чи чорного осаду сульфиду свинцю.

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

1. Основні правила поведінки та техніка безпеки в навчальній біохімічній лабораторії. Перша допомога при нещасних випадках.
2. Основні принципи класифікації амінокислот. Навести представників.
3. Написати структурну формулу дипептида (на ваш вибір), позначити пептидний зв'язок.

ВИДІЛЕННЯ БІЛКІВ З РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ.

Мета роботи. Виділити протеїни (прості білки) із пшеничного борошна та ідентифікувати їх за допомогою кольорових реакцій.

Як відомо, білки у живому організмі становлять близько 45% від сухої ваги. Молекули білків відрізняються молекулярною масою, хімічною будовою, фізико-хімічними властивостями тощо, що дозволяє їх розділити та отримати ряд білкових фракцій. Реакції осадження використовуються для

якісного та кількісного визначення білкових сполук. Реакції оборотного осадження використовують для виділення та розділення білків.

Білки за фізико-хімічними властивостями поділяються на прості та складні. До простих білків, або протеїнів належать: альбуміни, глобуліни, протаміни, гістони, глутеліни та проламіни.

Альбуміни — досить поширеними білками у складі клітин рослин та тварин. Це розчинені білки цитоплазми і складові фізіологічних рідин (крові, гемолімфи, молока тощо). Альбуміни добре розчиняються у воді, вони у своєму складі містять багато залишків лейцину (до 15%) і мало - гліцину, також містять лізин, аспарагінову та глутамінову кислоти. Альбуміни висолюються з розчину сульфатом амонію в межах насичення від 65% до 100%.

Глобуліни — також досить поширеними білками і є подібними за своєю хімічною природою до альбумінів. На відміну від альбумінів, глобуліни містять значну кількість гліцину (3-4%) і менш гідрофільні. Глобуліни гірше розчиняються у воді і висолюються 30-50% розчином сульфату амонію. Велика кількість глобулінів входить до складу сироватки крові.

Глутеліни — білки рослинного походження, що містяться переважно у складі насіння злаків. Вони багаті на глутамінову кислоту та лізин, добре розчиняються у розведених розчинах кислот та лугів. До цієї групи належать: білок пшениці — глутенін, білок кукурудзи — глутелін, білок ячменю — гордеїн, білок рису — оризенін тощо.

Проламіни – білки рослинного походження, що містяться в зернах злаків. Вони містять залишки проліну (10—15 %) та глутамінової кислоти (20—25 %). На відміну від глутелінів проламіни розчинні в 70% етиловому спирті. До проламінів належить білок ендосперму пшеничного зерна - гліадин. Разом з глутелінами проламіни є основними компонентами клейковини — субстанції білкової природи, кількість якої надає високу якість борошну та виробам з нього.

Матеріали та реактиви. Пшеничне борошно, біуретовий реактив, насичений розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10% розчин NaCl, 0,2% розчини NaOH, 0,2% розчин оцтової кислоти, 70% розчин етилового спирту.

Обладнання. Паперові фільтри, скляні лійки, порцелянові ступки, штатив із пробірками, водяна баня.

Хід роботи.

До порцелянкової ступки вносять 0,5 г пшеничного борошна та 3 мл дистильованої води. Суміш, що утворилася, ретельно розтирають протягом 5 хвилин. Потім, через 2-3 хвилини, коли нерозчинні часточки борошна осядуть

на дно ступки, рідину, що залишилася, відфільтровують через паперовий фільтр. Залишок борошна у ступці промивають 5 мл дистильованої води. Промивну воду відстоюють 3 хвилини і видаляють. Промитий залишок зберігають для подальшого виділення інших фракцій білка.

Екстракція альбумінів.

Принцип реакції. Альбуміни виділяють з борошна шляхом висолювання з використанням розчину сульфату амонію.

Хід роботи.

Фільтрат, який утворився після першої екстракції білків з борошна, перевіряють на вміст білків. Для цього у пробіру 1 наливають 1 мл фільтрату та проводять біуретову реакцію. В пробірку 2 вносять 1 мл фільтрату, а потім порціями по 0,5 мл - насичений розчин сульфату амонію, до утворення осаду. Фіксують кількість витраченого сульфату амонію та розраховують його приблизну концентрацію у розчині, за якої білок випадав у осад.

Екстракція глобулінів.

Принцип реакції. Глобуліни виділяють з борошна шляхом висолювання з використанням розчину сульфату амонію.

Хід роботи.

Матеріал (залишок борошна), який залишився у ступці після вилучення альбумінів, обробляють 3 мл 10% розчину хлориду натрію та розтирають протягом 5 хвилин у ступці, відстоюють і відфільтровують. У фільтраті глобулінів визначають наявність білків із біуретовою реакцією та проводять реакцію висолювання білків (аналогічно до того, як це описано для альбумінів).

Залишок борошна у ступці промивають 5 мл дистильованої води, промивну воду відстоюють упродовж 3 хвилин і видаляють. Промитий залишок зберігають для подальшого виділення наступних фракцій білка.

Екстракція глутелінів.

Принцип реакції. Екстракцію глутелінів проводять із лужної витяжки пшеничного борошна із подальшим додаванням оцтової кислоти.

Хід роботи.

Матеріал (залишок борошна), який залишився у ступці після вилучення альбумінів і глобулінів, обробляють 3 мл 0,2% розчину NaOH, розтирають, відстоюють і відфільтровують. Потім до 10 крапель лужної витяжки додають по краплях 0,2 % розчин оцтової кислоти до появи осаду глутелінів (розчин стає каламутним).

Екстракція проламінів.

Принцип реакції. Екстракцію проламінів із пшеничного борошна проводять із використанням 70% розчину етанолу.

Хід роботи.

До порцелянової ступки вносять 0,5 г пшеничного борошна та 3 мл 70% розчину етанолу. Суміш, що утворилась, ретельно розтирають протягом 5 хвилин. Вміст ступки відфільтровують. З фільтратом, який містить проламіни, проводять біуретову реакцію та реакцію осадження проламінів водою. Для цього до 10 крапель спиртової витяжки додають по краплинам дистильовану воду до появи осаду проламінів.

Зробити висновки роботи.

Контрольні запитання та завдання.

Основні принципи класифікації білків. Навести представників.