



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



# Wysalanie i denaturacja białek jaja kurzego oraz żelatyny

Instrukcja do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu  
Chemia Bioorganiczna i Bionieorganiczna  
Dla studentów kierunku Chemia specjalność Chemia Bioorganiczna

Opracowanie: mgr inż. Agata Ptaszek

Materiały zostały wykonane w ramach realizowanego na Politechnice Śląskiej projektu nr UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-01 pt.: „Unowocześnienie i rozszerzenie oferty edukacyjnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej – otwarcie specjalności Chemia Bioorganiczna” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

## **CEL ĆWICZENIA:**

Celem ćwiczenia jest wysolenie jak i zdenaturowanie białek różnego pochodzenia przy użyciu różnych substancji chemicznych oraz przeprowadzenie charakterystycznych reakcji dla białek i aminokwasów w celu określenia ich podstawowych właściwości.

## **PODSTAWY TEORETYCZNE:**

Białka to ogromne biocząsteczki występujące w każdym żywym organizmie. Istnieje wiele ich typów i spełniają wiele różnych funkcji biologicznych. Niezależnie od ich funkcji, wszystkie białka zbudowane są ze znacznej liczby jednostek aminokwasowych połączonych w długie łańcuchy. Aminokwasy są to związki dwufunkcyjne, zawierają zarówno zasadową grupę aminową, jak i kwasową grupę karboksylową. Znaczenie aminokwasów jako biologicznych bloków budulcowych wynika z faktu, że mogą się one łączyć w długie łańcuchy przez tworzenie wiązań amidowych między grupą  $-NH_2$  jednego aminokwasu i grupą  $-COOH$  innego. Białka dzielą się zależnie od ich składu na dwie grupy: na białka proste (proteiny) i złożone (proteidy). Białka proste (np. albumina) to te, które w wyniku hydrolizy dają jedynie aminokwasy, natomiast białka złożone, które częściej występują w przyrodzie, dają po hydrolizie oprócz aminokwasów także inne związki, takie jak węglowodany, tłuszcze czy kwasy nukleinowe. Pod względem budowy (trójwymiarowej postaci) rozróżniamy białka fibrylarne i globularne. Białka fibrylarne (włókienkowe) takie jak kolagen i kreatyna, składają się z łańcuchów polipeptydowych ułożonych obok siebie w długie włókna. Ponieważ białka te są odporne i nierozpuszczalne w wodzie, są one w naturze używane do budowy tkanek konstrukcyjnych, takich jak ścięgna, kopyta i inne. Białka globularne (kłębuszkowe) są zwykle zwinięte z zwarty, w przybliżeniu kulisty kształt. Białka te są zasadniczo rozpuszczalne w wodzie i swobodnie przemieszczają się w obrębie komórki.

Ze względu na skalę przestrzenną pełną strukturę białka można opisać na czterech poziomach:

- *Struktura pierwszorzędowa białka* (kolejność aminokwasów w liniowych łańcuchu polipeptydowym)
- *Struktura drugorzędowa białka* (sposób przestrzennego ułożenia łańcucha polipeptydowego, wynikający z geometrycznej budowy wiązania peptydowego oraz wiązań wodorowych, tworzących się między grupami C=O i N-H tego samego lub różnych łańcuchów). Białka posiadają dwie struktury drugorzędowe:
  - $\alpha$ -helisa (skręcona prawostronnie cylindryczna spirala – tzw. linie śrubowe)
  - $\beta$ -harmonijka (struktura pofałdowanej kartki papieru czyli dwa równoległe do siebie łańcuchy polipeptydowe połączone wiązaniami wodorowymi)
- *Struktura trzeciorzędowa białka* (ułożenie w przestrzeni skręconych w cylindryczne spirale łańcuchów polipeptydowych. Budowę takiej makrocząsteczki białka stabilizują wiązania tworzące się między bocznymi resztami aminokwasowymi. Są to: wiązania wodorowe, jonowe, mostki dwusiarczkowe oraz siły Van der Waalsa.)

- *Struktura czwartorzędowa białka* (wzajemne położenie w przestrzeni kilku makrocząsteczek polipeptydów. Przykładem białka o IV-rzędowej strukturze jest hemoglobina).

Białka ulegają m.in. takim procesom jak wysalanie i denaturacja.

- Wysalanie białek

Wykorzystując charakterystyczne właściwości białek, a w szczególności różne ich powinowactwo do wody, można doprowadzić do ich wytrącenia z roztworu. Rozpuszczalność białek zależy od ich pH oraz siły jonowej czy stężenia i wartościowości jonów w roztworze. Po dodaniu elektrolitu do roztworu zawierającego różne białka zmieniają się warunki hydratacji ich cząsteczek. „Odwadniająca” oddziaływanie jonów jest proporcjonalne do siły jonowej roztworu, stąd rozpuszczalność białek maleje wraz ze wzrostem stężenia soli. Wysalanie jako proces polegający na „odwadnianiu” cząsteczek białek i wytrąceniu ich z roztworu w postaci osadu, wymaga odpowiedniego czasu działania soli o większym niż białka powinowactwie do wody. Konieczne też jest oddzielenie wytrąconych białek przez sączenie lub wirowanie, a wreszcie usunięcie wysalającej soli, na przykład przez dializę. Przeważnie wysalanie nie zmienia właściwości biologicznych białek. Najczęściej wysolenie prowadzi się w obecności takich soli jak:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , NaCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (jony tych soli silniej niż cząsteczki białka oddziałują z cząsteczkami wody- niszczenie stabilizującej białko otoczki hydratacyjnej). Na rozpuszczalność białek w wodzie ma także wpływ temperatura, przy której przeprowadza się wysalanie. Dodanie rozpuszczalnika podczas wysalania spowoduje przejście białka w stan koloidu czyli peptyzacji. Frakcjonowanie białek z mieszaniny na drodze wysalania przeprowadza się zwykle przy pH roztworu bliskim wartości punktu izoelektrycznego (pI) danego białka.

- Punkt izoelektryczny to taka wartość pH, przy której cząsteczki (np. aminokwasy) posiadające grupy funkcyjne mogące przyjmować jednocześnie dodatni (np.  $\text{NH}_3^+$ ) i ujemny ( $\text{COO}^-$ ) ładunek elektryczny zawiera średnio tyle samo ładunków dodatnich co ujemnych, na skutek czego ładunek całkowity całej populacji wynosi zero.
- *Denaturacja białek*

Jest to nieodwracalny proces polegający na niszczeniu przestrzennej struktury (II, III, i IV) białek pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych. Do czynników fizycznych zaliczamy: ogrzewanie, silne mieszanie, wytrząsanie, naświetlanie promieniowaniem nadfioletowym, rentgenowskimi i jonizującym lub działanie ultradźwiękami. Natomiast denaturacja chemiczna zachodzi w obecności mocznika, chlorku guanidyny, na skutek działania kwasów i zasad, soli metali ciężkich. Wszystkie te czynniki powodują rozerwanie wiązań wodorowych, jonowych, mostków disiarczkowych, czyli niszczą wiązania, które stabilizują strukturę łańcuchów polipeptydowych.

Aminokwasy są składowymi białek posiadające w swojej budowie zarówno grupę aminową jak i karboksylową, dlatego też charakteryzują się właściwościami amfoterycznymi.

- w środowisku o pH niższym od ich punktu izoelektrycznego (pI) występują jako kationy ( $-\text{NH}_3^+$ ) i mogą wtedy reagować z różnego rodzaju anionami

- w środowisku o pH wyższym od pI tworzą aniony ( $-\text{COO}^-$ ) i reagują z kationami, natomiast w pH równym pI tworzą jony obojętne, czyli elektrycznie obojętne.

Oprócz tego wyróżnia się aminokwasy:

- obojętne (pI przy pH ok. 6,3)
- zasadowe (pI w zakresie zasadowym pH)
- kwaśne (pI w zakresie kwaśnym pH).

Aminokwasy naturalne (czyli takie, które wchodzi w skład białek - wyjątek stanowi glicyna) zawierają węgiel asymetryczny i dlatego są optycznie czynne. Rośliny mogą syntetyzować wszystkie aminokwasy, zwierzęta są zdolne do syntezy tylko niektórych (aminokwasy endogenne), pozostałe (aminokwasy egzogenne) muszą pobierać z pokarmem. Dla większości kręgowców (w tym dla człowieka) aminokwasami egzogennymi są:

- aminokwasy aromatyczne (fenyloalanina, tryptofan),
- aminokwasy o łańcuchach rozgałęzionych (walina, leucyna, izoleucyna) oraz lizyna, treonina i metionina.

Ze względu na charakter reakcji katabolicznych aminokwasy dzieli się na:

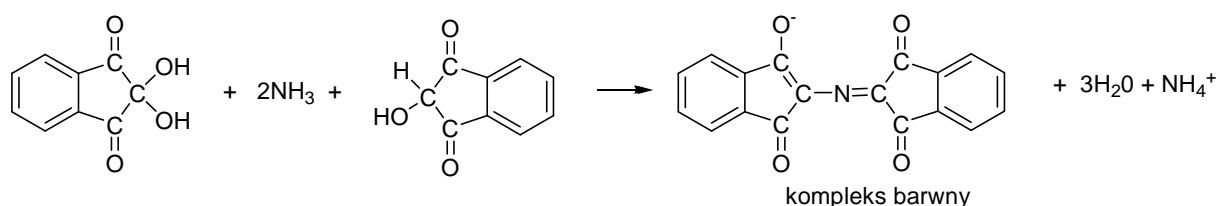
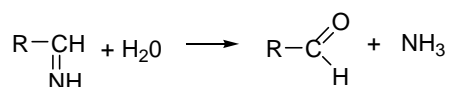
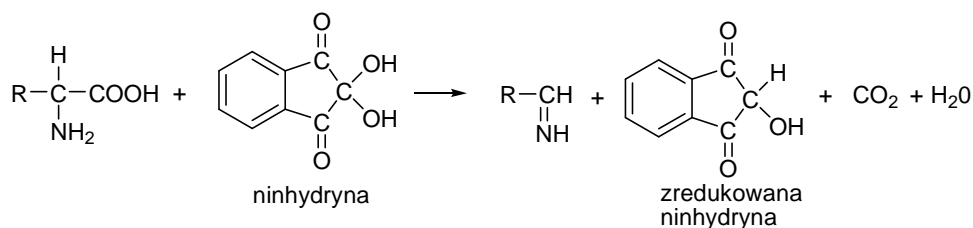
- glikogenne, włączające się w metabolizm cukrów
- ketogenne, dostarczające produktów charakterystycznych dla przemiany tłuszczów

Aminokwasy naturalne występujące w białkach (wbudowane w procesie translacji) to: glicyna, alanina, seryna, cysteina, walina, leucyna, izoleucyna, metionina, treonina, prolina, arginina, lizyna, tryptofan, histydyna, tyrozyna, fenyloalanina, glutamina, kwas glutaminowy, asparagina, kwas asparaginowy.

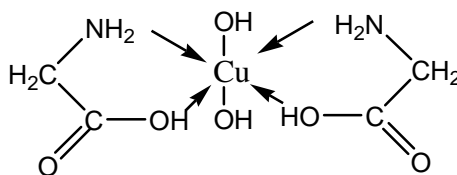
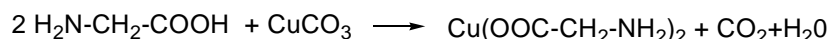
#### Charakterystyczne barwne reakcje białek i aminokwasów :

Istnieje wiele reakcji barwnych, którym ulegają zarówno białka zawierające aminokwasy z wolną grupą  $\alpha$ -aminową oraz same wolne aminokwasy. Reakcje te wskazują na obecność niektórych specyficznych aminokwasów, jak również potwierdzają odpowiednie właściwości chemiczne i fizyczne białek jak i samych aminokwasów. Do tego typu reakcji należą:

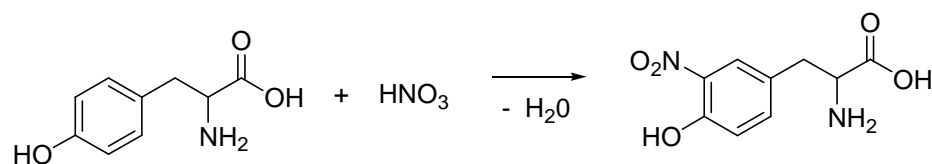
- *Reakcja ninhydrynowa* – reakcja ta polega na utlenieniu ninhydryną aminokwasu do amoniaku, dwutlenku węgla i aldehydu (uboższego o jeden atom węgla). Produktem przejściowym tej reakcji jest odpowiedni iminokwas. W wyniku tej reakcji powstaje fioletowo niebieskie zabarwienie, którego natężenie jest proporcjonalne do zawartości azotu  $\alpha$ -aminowego aminokwasów. To charakterystyczne zabarwienie jest wynikiem kondensacji 2 cząsteczek ninhydryny tj. zredukowanej i utlenionej z amoniakiem. Reakcja ninhydrynowa stosowana jest w metodach gazometrycznych w celu ilościowego oznaczenia  $\text{CO}_2$  lub  $\text{NH}_2$  oraz w metodach spektrofotometrycznych, w których mierzy się natężenie barwy kompleksu ninhydryny z amoniakiem.



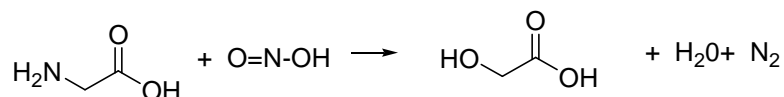
- *Reakcja biuretowa Piotrowskiego* (na wiązania peptydowe) – jest to najbardziej charakterystyczna reakcja pozwalająca wykryć białka. Pozytywny wynik tej reakcji dają wszystkie związki zawierające co najmniej dwa połączone ze sobą wiązania peptydowe. W reakcji tej powstaje niebieski lub fioletowy kompleks wodorotlenku miedzi (II) w wyniku tworzenia się wiązania koordynacyjnego pomiędzy miedzią a dwoma przyległymi wiązaniami –CO-NH- peptydu/białka.



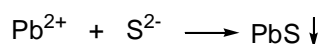
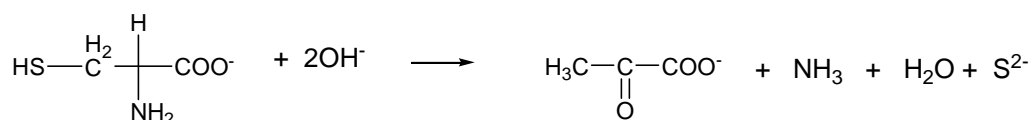
- *Reakcja ksantoproteinowa* – jest to reakcja, której ulegają białka, w skład których wchodzi aminokwasy posiadające w swojej strukturze pierścień aromatyczny, który to w obecności stężonego kwasu azotowego (V) może ulec reakcji „nitrowania” w efekcie dając żółte zabarwienie roztworu.



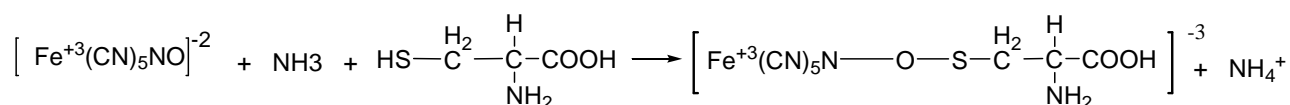
- *Reakcja z kwasem azotowym (III) van Slyke'a* – jest to reakcja  $\alpha$ -aminokwasu z  $\text{HNO}_2$  w wyniku której wydziela się azot cząsteczkowy (wydzielające się burzliwe pęcherzyki gazu). Reakcja ta jest wykorzystywana do gazometrycznej metody ilościowego oznaczania  $\alpha$ -aminokwasów metodą *van Slyke'a*.



- *Reakcja cystynowa* – w reakcji tej białka ogrzewane z ługiem ulegają hydrolizie, a zawarta w cystynie i cystydynie siarka ulega uwolnieniu w postaci jonów siarczkowych, które to z kolei z jonami  $\text{Pb}^+$  dają czarny osad tj.  $\text{PbS}$ . Metionina nie daje takiego wyniku tej reakcji.



- *Reakcja z nitroprusydkiem sodu na obecność grup tiolowych* – nitroprusydek sodu tworzy czerwono-fioletowe kompleksy z grupami tiolowymi.



- *Reakcja McCarthy-Sulivana* – jest to reakcja charakterystyczna dla metioniny. Metionina w środowisku kwaśnym ulega reakcji dając różowo-brunatne zabarwienie.
- *Reakcja Sakaguciego* - jest to reakcja pozwalająca wykryć obecność argininy w badanej próbce. Grupa guanidynowa argininy w zasadowym roztworze z  $\alpha$ -naftolem i  $\text{NaBrO}$  daje czerwony kompleks. Reakcja ta wykorzystywana jest do ilościowego oznaczenia argininy w białkach.
- *Reakcja wykrywania pierścienia indolowego w tryptofanie*- w środowisku kwaśnym tryptofan ulega reakcji z aldehydami (z aldehydem mrówkowym-*Reakcja Voisseneta*) lub (kwasem glioksalowym –*Reakcja Adamkiewicza-Hopkinsa*) dając barwne produkty kondensacji.

## **PRZEBIEG ĆWICZENIA:**

### **Wysalanie i denaturacja białek**

#### Materiały i odczynniki

- białko jaja kurzego
- 0,8% roztwór żelatyny spożywczej
- kawałek białego sera
- 0,9% roztwór chlorku sodu (NaCl)
- nasycony roztwór  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- nasycony roztwór  $\text{MgSO}_4$
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  *in substantia*

#### Szkło oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- probówki (10szt.)
- zlewki
- kolby miarowe
- pipety
- szkiełka zegarkowe
- gaza apteczna
- łaźnia wodna

#### Wykonanie ćwiczenia

##### 1. Przygotowanie roztworu białka jaja kurzego i żelatyny

- Oddzielić białko od żółtka, następnie białko dobrze wymieszać (nie wytrząsać) z 45 ml 0,9% roztworu chlorku sodu (NaCl). Przesączyć przez gazę.
- Sporządzić 0,8% roztwór żelatyny spożywczej w wodzie. (w przypadku słabego rozpuszczania żelatyny należy lekko ogrzać zawartość kolby w ciepłej łaźni wodnej)

##### 2. Oznaczenie nr.1 (wybór rodzaju soli służącej do wysolenia białek oraz określenie ilości wytrąconych osadów)

- Do dwóch probówek odmierzyć po 1ml roztworu białka jaja kurzego. Do pierwszej z nich dodać 1ml nasyconego roztworu  $\text{MgSO}_4$ , zaś do drugiej 1ml nasyconego roztworu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Do kolejnych dwóch probówek odmierzyć po 1 ml roztworu żelatyny. Do pierwszej z nich dodać 1ml nasyconego roztworu  $\text{MgSO}_4$ , zaś do drugiej 1ml nasyconego roztworu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

#### OBSERWACJE:

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- zaobserwować, czy obydwie rodzaje białek są wysalane przy tym samym stopniu nasycenia roztworu określoną solą
- porównać ilość i wygląd wytrąconych osadów
- zastanowić się czy rodzaj soli ma wpływ na stopień wysolenia

3. Oznaczenie nr.2 (badanie wpływu ilości soli i efektu rozcieńczenia na ilość wytrąconego osadu)

- Przygotować 6 probówek. Do trzech z nich wlać po 2 ml roztworu białka jaj kurzego, zaś do następnych trzech po 2 ml żelatyny. Do probówek oznakowanych 2 i 3 oraz 5 i 6 dodać nasycony roztwór  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Dodać również wodę destylowaną w ilościach podanych niżej w tabelce 1. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i zanotować, w których wytrącił się osad.
- Następnie do probówek oznakowanych 3 i 6 dodać jeszcze  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  *in substantia* w takiej ilości, aby nasycić roztwór, czyli aby część soli została nierozpuszczona na dnie probówki. Starannie wymieszać ich zawartość. Z tych probówek, w których wytrącił się osad odlać 1 ml nadsączu do innej czystej probówki i dodać jeszcze raz  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  *in substantia* w celu zaobserwowania czy nastąpi jeszcze dodatkowo wysolenie.

**Tabela 1.** Ilości nasyconego roztworu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i wody destylowanej jakie należy dodać do odpowiednich probówek

Numer probówki	Rodzaj roztworu białek	Nasycony roztwór $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ml)	Woda destylowana (ml)
1	Roztwór białka jaja kurzego	-	8
2		5	3
3		8	-
4	Roztwór żelatyny	-	8
5		5	3
6		8	-

OBSERWACJE:

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- ustalić, czy dodanie  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  *in substantia* wpływa na ilość i postać wytrąconego osadu;
- wytłumaczyć efekt rozcieńczenia



## Określenie podstawowych właściwości białek i aminokwasów za pomocą charakterystycznych barwnych reakcji.

### Wykonanie ćwiczenia

#### 1. Przygotowanie roztworu białka jaja kurzego

- Białko dokładnie oddzielić od żółtka, następnie dodać 100cm<sup>3</sup> 2% NaCl i wymieszać.

#### 2. Oznaczenie nr 1 -Reakcja ninhydrynowa

##### Materiały i odczynniki

- 1% roztwór białka jaja kurzego
- 0,8% roztwór żelatyny spożywczej
- 1% roztwór: glicyny, proliny
- Otrzymany roztwór nieznanego aminokwasu
- 1% roztwór ninhydryny w etanolu
- 2% roztwór chlorku sodu (NaCl)

##### Szkło oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- probówki (6szt.)
- statyw na probówki
- Pipetki plastikowe
- łaźnia wodna

Przygotować 5 czystych probówek następnie wprowadzić kolejno 1ml roztworu: glicyny (1), proliny (2), białka (3), żelatyny (4), nieznanego aminokwasu (5) oraz wody (6). Następnie do każdej probówki dodać po 1ml roztworu ninhydryny i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez ok. 1 minuty.

##### OBSERWACJE:

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- zaobserwować pojawienie się charakterystycznego fioletowo-niebieskiego zabarwienia
- Porównać i zinterpretować uzyskane wyniki w poszczególnych próbach.

#### 3. Oznaczenie nr 2 -Reakcja biuretowa

##### Materiały i odczynniki

- 1% roztwór białka jaja kurzego
- 0,8% roztwór żelatyny spożywczej
- 1% roztwór: glicyny, proliny
- otrzymany roztwór nieznanego aminokwasu
- 0,5% roztwór CuSO<sub>4</sub>
- 0,5% wodny roztwór CuCl<sub>2</sub>
- 6M wodny roztwór NaOH

##### Szkło oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- probówki (10 szt.)
- statyw na probówki
- Pipetki plastikowe
- łaźnia wodna

Przygotować 5 czystych probówek następnie wprowadzić kolejno po 1ml roztworu: glicyny (1), proliny (2), białka (3), żelatyny (4), nieznanego aminokwasu (5) oraz wody (6). Następnie do każdej probówki dodać po 2ml 6M roztworu NaOH i jednej kropli 0,5% roztwór  $\text{CuSO}_4$  i dobrze wymieszać. Następnie dodawać kroplami do każdej probówki pozostałe 0,5 ml roztworu  $\text{CuSO}_4$ . To samo doświadczenia należy wykonać dla tych samych roztworów wyjściowych zamieniając tylko 0,5% roztwór  $\text{CuSO}_4$  na 0,5% wodny roztwór  $\text{CuCl}_2$ .

#### OBSERWACJE:

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- zaobserwować pojawienie się charakterystycznego niebieskiego lub fioletowego zabarwienia
- porównać i zinterpretować uzyskane wyniki w poszczególnych próbach.
- wyjaśnić czy rodzaj użytej soli miedzi ma wpływ na efekt końcowy doświadczenia.

#### 4. Oznaczenie nr 3 - Reakcja ksantoproteinowa

##### Materiały i odczynniki

- 1% roztwór białka jaja kurzego
- 0,8% roztwór żelatyny spożywczej
- kawałek białego sera
- 1% roztwór: glicyny, tyrozyny, tryptofanu
- otrzymany roztwór nieznanego aminokwasu
- stężony kwas azotowy (V)
- 6M wodny roztwór NaOH

##### Szkło oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- probówki (8 szt.)
- statyw na probówki
- Pipetki plastikowe
- łaźnia wodna

Przygotować 8 czystych probówek, do których dodać po 1ml roztworu: glicyny (1), tyrozyny (2), tryptofanu (3), białka (4), żelatyny (5), nieznanego aminokwasu (6), wody (7), a do 8 probówki wsypać kawałek białego sera. Następnie do wszystkich probówek dodać po 1ml stężonego kwasu azotowego (V) i ogrzewać mieszaniny przez ok. 5 minut we wrzącej łaźni wodnej. Po tym czasie wszystkie probówki ostudzić pod bieżącą wodą i OSTROŻNIE dodać po 3ml 6M roztworu NaOH (REAKCJA SILNIE EGZOTERMICZNA).

#### OBSERWACJE:

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- zaobserwować, w których probówkach roztwór zabarwił się na kolor żółtopomarańczowy
- zinterpretować uzyskane wyniki w poszczególnych próbach.

#### 5. Oznaczenie nr 4 - Reakcja z kwasem azotowym (III) van Slyke'a

##### Materiały i odczynniki

- 1% roztwór białka jaja kurzego
- 0,8% roztwór żelatyny spożywczej
- 1% roztwór: glicyny
- otrzymany roztwór nieznanego aminokwasu
- 10% roztwór  $\text{NaNO}_2$
- 2M roztwór  $\text{CH}_3\text{COOH}$

##### Szkło oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- probówki (5 szt.)
- statyw na probówki
- Pipetki plastikowe
- łaźnia wodna

Do 5 czystych probówek dodać po 2 ml 10% roztworu  $\text{NaNO}_2$  i 2 ml 2M roztworu  $\text{CH}_3\text{COOH}$  i dobrze wymieszać. Następnie do pierwszej probówki dodać 1 ml roztworu glicyny (1), do drugiej probówki dodać 1 ml roztworu białka (2), do trzeciej 1 ml roztworu żelatyny (3), do czwartej 1 ml nieznanego aminokwasu (4), a do piątej 1ml wody (5).

##### OBSERWACJE:

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- zaobserwować wydzielanie się produktu gazowego reakcji deaminacji
- zinterpretować uzyskane wyniki w poszczególnych próbach.

#### 6. Oznaczenie nr 5 - Reakcja cystynowa

##### Materiały i odczynniki

- 1% roztwór białka jaja kurzego
- 0,8% roztwór żelatyny spożywczej
- 1% roztwór: glicyny, cysteiny, metioniny
- otrzymany roztwór nieznanego aminokwasu
- 1% roztwór octanu ołowiu (II)  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$
- 6M wodny roztwór wodorotlenku sodu  $\text{NaOH}$

##### Szkło oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- probówki (7 szt.)
- statyw na probówki
- Pipetki plastikowe
- łaźnia wodna

Przygotować 7 probówek, do których należy odmierzyć po 1 ml roztworu glicyny (1), cysteiny (2), metioniny (3), białka (4), żelatyny (5), nieznanego aminokwasu (6) oraz wody (7). Do wszystkich probówek dodać po 2 ml 6M wodny roztworu  $\text{NaOH}$  i 0,5 ml 1%  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ . Następnie wstawić wszystkie probówki do wrzącej łaźni wodnej na 2-3 minuty.

##### OBSERWACJE:

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- zaobserwować, w których probówkach nastąpiło wytrącenie się czarnego osadu  $\text{PbS}$
- porównać i zinterpretować uzyskane wyniki w poszczególnych próbach.

### 7. Oznaczenie nr 6 - Reakcja z nitroprusydkiem sodu na obecność grup tiolowych

#### Materiały i odczynniki

- 1% roztwór białka jaja kurzego
- 0,8% roztwór żelatyny spożywczej
- 1% roztwór: glicyny, cysteiny, metioniny
- otrzymany roztwór nieznanego aminokwasu
- 1% roztwór nitroprusydku sodu
- siarczan amonu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  *in substantia*
- stężony amoniak  $\text{NH}_3$

#### Szkło oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- probówki (7 szt.)
- statyw na probówki
- Pipetki plastikowe
- łaźnia wodna

Przygotować 7 probówek, do których należy odmierzyć 1 ml roztworu glicyny (1), cysteiny (2), metioniny (3), białka (4), żelatyny (5), nieznanego aminokwasu (6) oraz wody (7). Następnie do wszystkich probówek dodać po 1 ml roztworu nitroprusydku sodu po czym dodać siarczan amonu *in substantia* do nasycenia roztworu. Na samym końcu należy próby zalkalizować dodając amoniak pod dygestorium.

#### OBSERWACJE:

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- zaobserwować, w których probówkach roztwór zabarwił się na kolor czerwono-fioletowy oznaczający dodatki wynik na obecność grup tiolowych.
- zinterpretować uzyskane wyniki w poszczególnych próbach

### 8. Oznaczenie nr 7 - Reakcja McCarthy-Sulivana

#### Materiały i odczynniki

- 1% roztwór białka jaja kurzego
- 0,8% roztwór żelatyny spożywczej
- 1% roztwór: glicyny, cysteiny, metioniny
- otrzymany roztwór nieznanego aminokwasu
- 10% roztwór nitroprusydku sodu
- 40% wodny roztwór wodorotlenku sodu NaOH
- stężony kwas solny HCl

#### Szkło oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- probówki (6 szt.)
- statyw na probówki
- Pipetki plastikowe
- łaźnia wodna

Do 6 probówek wprowadzić po 2,5 ml roztworu cysteiny (1), metioniny (2), białka (3), żelatyny (4), nieznanego aminokwasu (5) oraz wody (6). Następnie do każdej probówki dodać 0,5 ml 40% roztworu NaOH i dobrze wymieszać, po czym dodać 0,5 ml 1% roztworu glicyny i także wymieszać, a na koniec dodać 0,3 ml 10% roztworu nitroprusydku sodu. Wszystkie probówki ogrzewać w łaźni wodnej w temperaturze 40-80°C nie dopuszczając do wrzenia. Następnie probówki ostrożnie oziębić pod bieżącą wodą i dodać ok. 0,5 ml stężonego roztworu HCl.

**OBSERWACJE:**

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- zaobserwować, w których probówkach roztwór zabarwił się na kolor różowo-brunatny oznaczający dodatni wynik na obecność metioniny
- zinterpretować uzyskane wyniki w poszczególnych próbach

**9. Oznaczenie nr 8 - Reakcja Sakaguchi'ego na obecność argininy**

**Materiały i odczynniki**

**Szkło oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:**

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• 1% roztwór białka jaja kurzego</li><li>• 0,8% roztwór żelatyny spożywczej</li><li>• 1% roztwór: glicyny, argininy</li><li>• otrzymany roztwór nieznanego aminokwasu</li><li>• 1% roztwór <math>\alpha</math>-naftolu w etanolu</li><li>• 10% wodny roztwór wodorotlenku sodu NaOH</li><li>• roztwór bromianu (I) sodowego NaOBr</li><li>• 40% roztwór mocznika</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• probówki (6 szt.)</li><li>• statyw na probówki</li><li>• Pipetki plastikowe</li></ul> |
|--|---|

Przygotować 6 czystych probówek, do których dodać kolejno 1 ml : glicyny (1), argininy (2), białka (3), żelatyny (4), nieznanego aminokwasu (5) oraz wody (6). Następnie do wszystkich dodać 0,5 ml 10% NaOH oraz 2-3 krople 1% roztworu  $\alpha$ -naftolu w etanolu i każdą mieszaninę dokładnie wymieszać. Do wszystkich prób następnie dodać po ok. 0,25 ml NaBrO, dokładnie wymieszać i dodać po 0,5 ml 40% roztworu mocznika w celu stabilizacji pojawiającej się barwy.

**OBSERWACJE:**

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- zaobserwować, w których probówkach roztwór zabarwił się na pomarańczowoczerwony kolor
- zinterpretować uzyskane wyniki

10. *Oznaczenie nr 9 - Reakcja Voisseneta* (wykrywania pierścienia indolowego w tryptofanie)

Materiały i odczynniki

Szkoło oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny:

- 1% roztwór białka jaja kurzego
  - 0,8% roztwór żelatyny spożywczej
  - 1% roztwór: glicyny, tryptofanu
  - otrzymany roztwór nieznanego aminokwasu
  - 2,5% roztwór aldehydu mrówkowego
  - stężony kwas solny HCl
  - 0,05% roztwór azotynu sodu  $\text{NaNO}_2$
- probówki (6 szt.)
  - statyw na probówki
  - Pipetki plastikowe
  - łaźnia wodna

Do 6 czystych probówek dodać kolejno 1ml : glicyny (1), tryptofanu (2), białka (3), żelatyny (4), nieznanego aminokwasu (5) oraz wody (6). Następnie do wszystkich dodać kroplę aldehydu mrówkowego i 4 ml stężonego HCl. Całość pozostawić na ok. 5 minut (można delikatnie podgrzać mieszaniny). Po tym czasie dodawać kroplami roztwór  $\text{NaNO}_2$ .

OBSERWACJE:

Na podstawie wykonanego doświadczenia :

- zaobserwować, w których probówkach pojawiło się charakterystyczne fioletowe zabarwienie roztworu
- zinterpretować uzyskane wyniki

**OPRACOWANIE SPRAWOZDANIA**

W sprawozdaniu proszę umieścić:

- krótki wstęp teoretyczny ( podając odnośniki literaturowe) na temat:
  - białek (procesu wysalania i denaturacji )
  - aminokwasów( w tym charakterystycznych reakcji dla nich )
- przebieg ćwiczenia i obserwacje dokonane w trakcie doświadczeń
- wnioski końcowe

**PRZYGOTOWANIE DO ZAJĘĆ**

Przed przystąpieniem do ćwiczenia student powinien zapoznać się z niniejszą instrukcją oraz sposobem wykonania ćwiczenia. Powinien również zapoznać się z podstawami teoretycznymi technik laboratoryjnych wykorzystywanych w ćwiczeniu oraz z zagrożeniami mogącymi wystąpić podczas ich wykonywania. Student powinien zaznajomić się również następującymi zagadnieniami i pojęciami:

- Białka i ich budowa, proces wysolenia, proces denaturacji, punkt izoelektryczny, pKa, aminokwasy podział i właściwości, charakterystyczne reakcje dla aminokwasów i białek uwzględniając schematy reakcji.

Ponadto powinien znać i przestrzegać ogólne zasady BHP. Powinien znać i wiedzieć jak zapobiegać zagrożeniom wynikającym z pracy z odczynnikami chemicznymi oraz aparaturą wykorzystywaną w ćwiczeniu. Należy przynieść 2 jaja na całą grupę.

### **LITERATURA**

- L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z Biochemii*,  
A. Kozik, M. Rapała-Kozik, I. Guevara-Lora *Analiza instrumentalna w biochemii. Wybrane problemy i metody instrumentalnej biochemii analitycznej*,  
A. Dubin, B. Turyna *Praktikum z biochemii dla studentów biologii i biotechnologii*,  
E. Białicka-Florjańczyk: *Ćwiczenia laboratoryjne z chemii organicznej* Wydawnictwo SGGW, Warszawa (2005)  
M. Mroczkiewicz, A. Fryszkowska, R. Ostaszewski, *Biotechnologia*, 2 69 (2005) 32-47  
J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa (2005)  
C. Ratledge, B. Kristiansen, *Podstawy biotechnologii*, PWN, Warszawa (2011)  
L. Pauling L, R.B. Corey, H.R. Branson The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **37** (5) (1951) 235–40.