

3. Chemické experimenty k téme Bielkoviny

3.1 Bielkoviny vo vajci

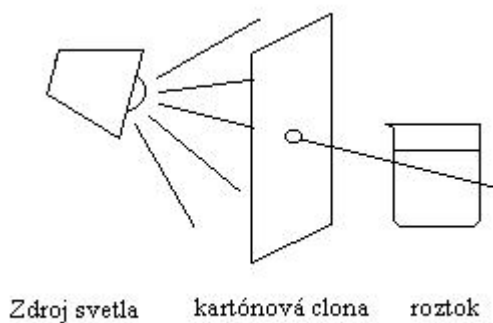
Experiment 1: Koloidný charakter častíc

Pomôcky a chemikálie

Kadičky (priehľadné poháre z tenkého skla), lampa, kartónová clona, sacharóza, voda, roztok vaječného bielka.

Postup práce

Do prvej kadičky nalejeme roztok sacharózy (asi 3 lyžičky cukru na 100 cm³ vody) a do druhej kadičky roztok pripravený z vaječného bielka. Pred zapnutú lampu postavíme kartónovú clonu s malým otvorom a prechádzajúci lúč svetla necháme dopadať postupne na obidve kadičky (Obr.11)



Obr. 11 Schéma experimentu č. 1

Pozorovanie a vysvetlenie

Roztok sacharózy v prvej kadičke je priehľadný, svetlo ním prechádza bez zmeny. Roztok bielka v druhej kadičke čiastočne zabraňuje priechodu svetla. Roztok sa javí ako priesvitný, ale nie priehľadný. Veľkosť molekúl sacharózy (repného cukru) v roztoku v prvej kadičke je nepatrná v porovnaní s vlnovou dĺžkou viditeľného žiarenia (10^{-6} - 10^{-7} m). Preto sa v roztoku cukru viditeľné svetlo neodráža, ani neláme.

Naopak veľkosť častíc v roztoku vaječného bielka je porovnateľná s vlnovou dĺžkou svetla a preto sa žiarenie v danom roztoku čiastočne odráža a čiastočne aj láme. Pre veľkú relatívnu molekulovú hmotnosť (kolíše od 10 000 až do niekoľko miliónov) tvoria bielkoviny koloidné roztoky [1].

Experiment 2 : Štiepenie disulfidických väzieb pôsobením vysokej teploty

Pomôcky a chemikálie

Varič, hrnček, nôž, 2 vajcia, voda.

Postup práce

Na variči uvaríme bežným spôsobom dve vajcia na tvrdo (približne 10 minút). Jedno vajce potom prudko ochladíme v studenej vode a druhé necháme voľne vychladnúť na vzduchu. Pozorujte, čím sa vajcia líšia.

Pozorovanie a vysvetlenie

Z vajca, ktoré sme schladili vo vode, sa škrupina lúpe oveľa ľahšie ako z vajca, ktoré chladlo pozvoľna na vzduchu. Po rozrezaní pomaly chladnúceho vajca objavíme na povrchu žltka zelenkavý povlak, ktorý sa u rýchlo schladeného vajca nenachádza.

Nielen vaječný bielok, ale aj žltok obsahuje bielkoviny (15 – 17 %). Okrem nich sa v žltku nachádzajú hlavne tuky (28 – 36 %) a voda (47 – 50 %). Základnou väzbou, ktorou sú bielkoviny vytvorené z aminokyselín, je peptidická väzba (CO-NH). Okrem tejto väzby sa medzi reťazcami v bielkovinách nachádzajú aj iné typy väzieb. Sú to najmä disulfidické väzby, ktorými sú pospájané rôzne časti jedného alebo viacerých peptidických reťazcov. Tieto priečne väzby sa môžu pôsobením vysokých teplôt rozpadáť a preto sa pri varení vo vajci tvorí sulfán (H_2S). U prudko schladeného vajca sa plyn nahromadí až pod škrupinou, kde plynová vrstvička uľahčuje lúpanie škrupiny. V pozvoľna chladnúcom vajci sa ióny síry viažu s iónmi železa, ktoré sú obsiahnuté vo vaječnom žltku a tvorí sa tmavá vrstva železnatej soli.

Zneškodnenie splodín

Zvýšenú opatrnosť venujeme manipulácii s horúcimi predmetmi. Sulfán sa tvorí iba v nepatrnom množstve, ktoré nie je zdraviu škodlivé [1].

Experiment 3: Dôkaz bielkovín vo vaječnom bielku

Pomôcky a chemikálie

Kadička, lyžička, skúmavky, držiak na skúmavky, kahan, stojan na skúmavky, vajce, voda, vodný roztok modrej skalice ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) ($w = 30 \%$), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) ($w = 96 \%$).

Postup prace

Z vajca oddelíme vaječný bielok a rozpustíme ho v kadičke v 100 cm^3 vody. Do troch skúmaviek nalejeme asi po 5 cm^3 roztoku vaječného bielka. Do prvej skúmavky asi do jednej štvrtiny pridáme malé množstvo roztoku modrej skalice, do druhej skúmavky prilejeme rovnaké množstvo etanolu a obsah tretej skúmavky jemne zahrievame nad kahanom. Pozorujeme zmeny v skúmavkách.

Pozorovanie a vysvetlenie

V roztoku vaječného bielka v prvej skúmavke sa pôsobením modrej skalice vytvorila bledomodrá zrazenina. Roztok v druhej skúmavke sa po pridaní etanolu zakalil a rovnako sa zakalil aj obsah tretej skúmavky, ktorú sme zahrievali.

Bielkoviny obsiahnuté vo vaječnom bielku (obsahuje až 12 % bielkovín, pričom 70 % z nich tvorí vajcový albumín) reagujú citlivo na soli ťažkých kovov, etanol aj na zvýšenú teplotu. Organickými rozpúšťadlami (napr. etanol) a niektorými soľami (napr. CuSO_4) sa bielkoviny vratne zrážajú. V prípade pôsobenia vysokej teploty nastáva u bielkovín denaturácia, pri ktorej sa narúša terciálna štruktúra, aktívne miesta strácajú svoje špecifické priestorové usporiadanie a teda sa znižuje alebo stráca biologická aktivita bielkoviny. Denaturácia je nevratná reakcia. Pôsobením ťažkých kovov, vysokých teplôt sa teda narúša štruktúra bielkovín, pričom tieto už neplnia svoju funkciu v organizme [1].

3.2 Bielkoviny v mlieku

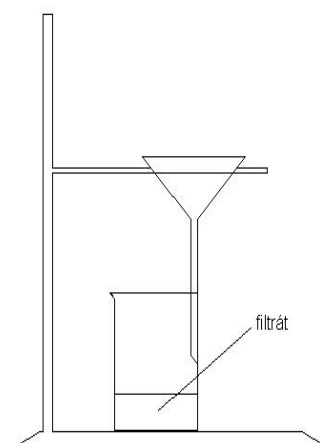
Experiment 4 : Izolácia bielkovín z mlieka

Pomôcky a chemikálie

Kadičky (fľaštičky od detskej výživy), skúmavka, lievik, filtračný papier (filter na kávu), lyžička, držiak na skúmavky, kahan, mlieko, roztok kyseliny octovej (CH_3COOH) ($w = 8\%$) – ocot.

Postup práce

Asi 50 cm^3 mlieka rozriedime v kadičke s rovnakým množstvom vody a prikvapneme k nemu niekoľko kvapiek roztoku kyseliny octovej (octu). Premiešame a vzniknutú zrazeninu odfiltrujeme. Filtrátu zahrejeme nad kahanom a pozorujeme zmeny, ktoré v ňom prebiehajú.



Pozorovanie a vysvetlenie

Prikvapnutím kyseliny octovej sa v mlieku tvorí biela zrazenina. Po jej odfiltrovaní môžeme pozorovať, že sa lepí na papier. Vo filtráte sa pri zahriatí tvorí opäť biela zrazenina (roztok sa zakalí). Kravské mlieko obsahuje 3,3 % bielkovín. Okrem bielkovín sa v mlieku nachádza aj mliečny cukor a mliečne tuky. Z jednotlivých bielkovín sa v mlieku vyskytuje najmä kazeín a albumín. Bielkovina kazeín sa v čerstvom mlieku nachádza viazaná s iónmi Ca^{2+} . Pridaním kyseliny octovej klesne pH na hodnotu, ktorá je označovaná ako izoelektrický bod kazeínu ($\text{pI} = 4,6$) a vyzráža sa biela zrazenina – voľný kazeín, ktorý je takmer úplne bez vápnika. Po jeho odfiltrovaní ostáva vo filtráte ďalšia mliečna bielkovina – mliečny albumín. Tento je rozpustný vo vode, denaturuje a vyzráža sa pri teplote $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zneškodnenie splodín

Produkty pokusu nie sú zdraviu škodlivé. Sklo môžeme umyť vodou priamo do výlevky. Zvýšenú pozornosť venujeme zahrievaniu skúmavky s filtrátom nad kahanom [1].

Experiment 5 : Posun rovnováhy pri zrážaní bielkovín

Pomôcky a chemikálie

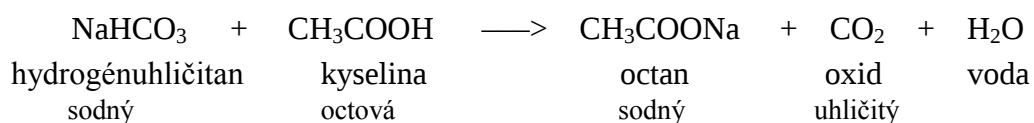
Kadička, lyžička, mlieko, hydrogénuhličitan sodný (NaHCO_3) – sóda bikarbóna, roztok kyseliny octovej (CH_3COOH) – ocot ($w = 8\%$).

Postup práce

Do kadičky s približne 50 cm^3 mlieka nasypeme asi 2 lyžičky hydrogénuhličitanu sodného (sódy bikarbóny). Dobre premiešame a potom prikvapneme roztok kyseliny octovej (ocot). Pozorujeme zmeny.

Pozorovanie a vysvetlenie

Keď je v mlieku rozpustený hydrogénuhličitan sodný, bielkoviny v mlieku sa po pridaní roztoku kyseliny octovej nevyzrážajú. Roztok v kadičke búrlivo pení, ale zrazenina nevzniká. Kyselina octová (ocot), ktorú prikvapkávame do roztoku, reaguje s hydrogénuhličitanom sodným, obsiahnutým v sóde bikarbóne. Preto sa kazeín nezráža.



Pri reakcii vzniká oxid uhličitý, ktorý spôsobuje búrlivé penenie [1].

Experiment 6 : Dôkaz dusíka v bielkovinách

Pomôcky a chemikálie

Skúmavka, vzorka bielkoviny (kazeín, sušené odtučnené mlieko, sušený bielok), koncentrovaná kyselina sírová H_2SO_4 , roztok hydroxidu sodného NaOH ($w = 20\%$), indikátorový papierik (univerzálny, červený lakmus).

Postup práce

Do skúmavky s malým množstvom bielkoviny pridáme niekoľko kvapiek koncentrovanej kyseliny sírovej a opatrne zahrievame 1 – 2 minúty. Po ochladení pridáme postupne približne 2 cm^3 roztoku hydroxidu sodného (výsledná reakcia musí byť zásaditá). Skúmavku zahrejeme a na jej vrchu podržíme indikátorový papierik.

Pozorovanie a vysvetlenie

Účinkom koncentrovanej kyseliny sírovej sa časť dusíka viazaného v bielkovinách uvoľňuje v podobe amoniaku. Ten je len málo rozpustný v zásaditých roztokoch a preto uniká ako plyn, ktorý môžeme dokázať podľa hodnoty pH indikátorovým papierikom.

Zneškodnenie splodín

Sklo vymyjeme vodou do výlevky, je potrebné dodržať pravidlá bezpečnej práce s koncentrovanou kyselinou sírovou [1].

Experiment 7 : Kazeín v mlieku

Pomôcky a chemikálie

Centrifúga, centrifugačné skúmavky, drevené špajdle, mlieko, kyselina chlorovodíková HCl ($w = 10\%$), etanol, éter.

Postup práce

50 cm^3 mlieka centrifugujeme pri 3 000 otáčkach za minútu, približne 10 minút. Na povrchu sa nám vylúči tuk a ten opatrne odoberieme pomocou drevenej špajdle. Mlieko vylejeme do 100 cm^3 kadičky a za stáleho miešania pridávame opatrne 1 cm^3 kyseliny chlorovodíkovej ($w = 10\%$) pokiaľ sa nevytvorí vločkovitá zrazenina (ak použijeme HCl nadbytok, zrazenina sa začne znova rozpúšťať!). Zrazeninu opäť prelejeme do centrifugačnej skúmavky a centrifugujeme pri rovnakých otáčkach. Vrchnú časť (supernatant) zo skúmavky vylejeme a spodnú časť (sediment) – našu zrazeninu premyjeme destilovanou vodou a znovu centrifugujeme za rovnakých podmienok. Vodu zlejeme a vzniknutý kazeín rozmiešame s etanolom ($w = 96\%$). Znova centrifugujeme. Po centrifugácii zlejeme etanol, zrazeninu

premyjeme éterom (už necentrifugujeme) a kazeín necháme voľne schnúť na filtračnom papieri

Pozorovanie a vysvetlenie

Kazeín je hlavná bielkovinová zložka mlieka. Patrí medzi významnú živočíšnu bielkovinu, najviac je obsiahnutý v tvarohu, chráni pečeneové bunky. Nachádza sa v ňom vo forme vápenato-draselnej soli. Okyslením minerálnou kyselinou sa kazeín mení na voľnú kyselinu. Kazeín sa zráža pri pH približne 4,7 [1].

Experiment 8 : Dôkaz prítomnosti aminokyselín obsahujúcich síru v mlieku

Pomôcky a chemikálie

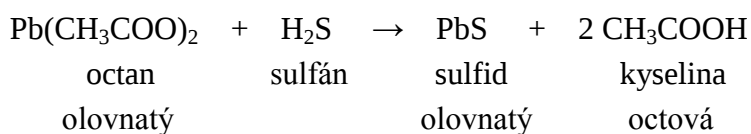
Skúmavka, pipeta, kahan, držiak na skúmavky, roztok octanu olovnatého $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (w = 10%), roztok hydroxidu sodného NaOH (w = 10%).

Postup práce

K 1 cm³ roztoku octanu olovnatého pomaly pridáme roztok hydroxidu sodného, kým sa nerozpustí zrazenina vznikajúceho hydroxidu olovnatého. Pridáme 5 - 6 kvapiek mlieka a roztok v skúmavke zahrejeme. Pozorujeme čo sa deje v skúmavke.

Pozorovanie a vysvetlenie

V skúmavke môžeme pozorovať čierno-hnedé zafarbenie roztoku. Síra obsiahnutá v mliečnych aminokyselinách sa veľmi ľahko uvoľňuje pôsobením NaOH vo forme sulfátu, ktorý vytvára s octanom olovnatým čiernu zrazeninu sulfidu olovnatého PbS [1].



3.3 Bielkoviny v strukovinách

Experiment 9 : Dôkaz prítomnosti bielkovín v semenách hrachu

Pomôcky a chemikálie

Suché semená hrachu, tretia miska, kadička, skúmavky, stojan na skúmavky, kvapkadlo, lievik, filtračný papier, roztok hydroxidu draselného KOH (w = 2 %), kyselina octová (CH_3COOH), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), destilovaná voda.

Postup práce

Suché semená hrachu dôkladne rozotrieme v trecej miske a múčku nasypeme do kadičky. Hrachovú múčku zalejeme 50 cm³ vody a 5 cm³ 2% roztoku KOH. O hodinu prefiltrujeme. Do prvej skúmavky s 5 cm³ filtrátu opatrne prikvapkávajte kyselinu octovú, do druhej skúmavky s 5 cm³ filtrátu prilejte malé množstvo etanolu.

Pozorovanie a vysvetlenie

V slabo alkalickej roztoku sa bielkoviny rozpúšťajú. Keď neutralizujeme filtrát zriedenou kyselinou octovou, bielkoviny sa zrážajú. Keď vo filtráte bude väčšie množstvo kyseliny, bielkoviny sa opäť rozpustia. Na rozdiel od koagulácie varom (koaguláciou sa menia vlastnosti bielkovín - denaturujú - ide o ireverzibilný dej) je v tomto prípade zrážanie bielkovín dej reverzibilný. Keď do filtrátu pridáme etanol, vznikne nerozpustná zrazenina (ireverzibilný dej) [1].

Experiment 10 : Izolácia globulínu z hrachu

Pomôcky a chemikálie

Miska, sklená tyčinka, skúmavka, špachtľa, filtračný papier, nálevka,, fyziologický roztok – vodný roztok NaCl (w = 0,9 %), chlorid sodný (NaCl).

Postup práce

Lyžičku jemne mletej múky z hrachu zmiešame s 5 cm³ fyziologického roztoku na riedku kašu. Prefiltrujeme cez filtračný papier. K 5 filtrátu pridáme destilovanú vodu a pozorujeme zrážanie globulínu. K suspenzii zrazeniny pridáme sa špičku špachtle pevný NaCl, globulín sa opäť rozpustí.

Pozorovanie a vysvetlenie

Pri pokuse môžeme pozorovať zrážanie a rozpúšťanie globulínu. Bielkoviny, označované ako globulíny, sú rozpustné v zriedených soliach, ale nerozpustné vo vode. To je možné využívať pri izolácii.

Zneškodnenie splodín

Pri tomto pokuse nevznikajú zdraviu škodlivé splodiny, sklo vymyjeme vodou do výlevky [1].

Experiment 11 : Dôkaz bielkovín v sójovom mlieku

Pomôcky a chemikálie

Skúmavka, pipeta, koncentrovaná kyselina dusičná (HNO_3), hydroxid sodný (NaOH) ($w = 20\%$), sójové mlieko.

Postup práce

K 2 – 3 cm^3 roztoku bielkoviny pridáme 1 cm^3 koncentrovanej HNO_3 . Pozorujeme vznik žltého sfarbenia.

Pozorovanie a vysvetlenie

Pôsobením chemikálií na bielkoviny dochádza ku zrážaniu – denaturácii bielkovín. Po pridaní kyseliny dusičnej k roztoku bielkoviny dochádza k vytvoreniu žltej zrazeniny.

Zneškodnenie splodín

Pri pokuse nevznikajú škodlivé látky, sklo vymyjeme vodou do výlevky [1].

3.4 Bielkoviny v zemiakoch a múke

Experiment 12 : Farebné reakcie bielkovín

Princíp

Makromolekulu bielkovín tvorí reťazec aminokyselín. Farebné reakcie spôsobujú radikály, ktoré sa na peptidových väzbách nezúčastňujú, preto tieto reakcie nie sú prísne špecifické. Výnimku tvorí biuretová reakcia, ktorá je naopak pre peptidové väzby charakteristická.

Príprava extraktu bielkovín zo zemiakovej hľuzy

Olúpaný surový zemiak postrúhajte a v roztieračke roztierajte niekoľko minút. Kašovitú masu vložíme do handričky a vytlačíme z nej kalnú šťavu. Prefiltrujeme ju cez skladaný filter.

Príprava roztoku bielka

Vajcový bielok dobre rozmiešajme so 150 cm^3 vody a prefiltrujeme cez sklenú gázu. Pri všetkých nasledujúcich pokusoch so zemiakovou šťavou uskutočníme kontrolný pokus s roztokom bielka.

a) Biuretová reakcia

Pomôcky a chemikálie

Skúmavka s extraktom bielkoviny, sklenená tyčinka, roztok CuSO_4 ($w = 1 \%$), roztok KOH. ($w = 20 \%$).

Postup práce

Do 1 cm^3 extraktu v skúmavke pridáme 1 cm^3 roztoku KOH a opatrne po kvapkách pridávame roztok CuSO_4 .

Pozorovanie a vysvetlenie

Obsah skúmavky sa sfarbil na modrofialovo - čo je dôkazom prítomnosti bielkovín. Názov "biuretová reakcia" je odvodený od biuretu, ktorý vzniká zohrievaním močoviny, pričom sa uvoľňuje amoniak. Vznikajúci biuret má tiež peptidovú väzbu, preto aj pri bielkovinách, hoci biuret neobsahujú, je reakcia pozitívna.

b) Xantoproteínová reakcia

Pomôcky a chemikálie

Skúmavka s extraktom bielkoviny, sklenená tyčinka, koncentrovaná kyselina dusičná HNO_3 , vodný roztok amoniaku.

Postup práce

Do 2 cm^3 extraktu pridáme 1 cm^3 kyseliny dusičnej HNO_3 . Roztok zahrejeme. Obsah skúmavky sa sfarbí na žltó, prípadne vznikne žltá zrazenina. Skúmavku ochladíte a roztok zneutralizujeme amoniakom.

Pozorovanie a vysvetlenie

Žltá farba sa zmení na oranžovú. V molekule bielkovín sú viazané aromatické aminokyseliny (tyrozín, tryptofán, fenylalanín) s benzénovým jadrom. Jadro sa kyselinou dusičnou HNO_3 nitruje za vzniku na žltó sfarbených zlúčenín (xanthos – žltý).

c) Raspailová reakcia

Pomôcky a chemikálie

Skúmavka s extraktom bielkoviny, 2 sklenené tyčinky, koncentrovaná kyselina sírová H_2SO_4 , koncentrovaný roztok sacharózy.

Postup práce

Do skúmavky s extraktom pridáme niekoľko kvapiek koncentrovaného roztoku sacharózy a rovnaké množstvo kyseliny sírovej H_2SO_4 .

Pozorovanie a vysvetlenie

Skúmaný extrakt sa sfarbí na červeno (príp. až na purpurovo). Je to preukázaná, aj keď nie celkom špecifická reakcia na bielkoviny.

Zneškodnenie splodín

Produkty vznikajúce pri uvedených pokusoch môžeme vymývať priamo do výlevky vodou [1].

Experiment 13 : Bielkoviny v múke

Pomôcky a chemikálie

Kadička (širšia sklenená miska), husté plátno, papier, múka, voda.

Postup práce

Na husté plátno nasypeme asi 5 lyžičiek múky a zabalíme ju. Balíček preplachujeme vodou dovtedy, kým vzniká mliečnobiely roztok. Pozorujeme, čo ostane na plátne.

Pozorovanie a vysvetlenie

Na plátne ostáva žltkastá hmota, ktorá lepí papier. V pšeničnej múke je asi 10 – 15 % bielkovín. Medzi najdôležitejšie bielkoviny pšenice patrí gliadín a glutenín, ktoré tvoria tzv. lepok, t.j. napučanú, pružnú a ťažnú hmotu, ktorá sa získa vypieraním múky slabým prúdom vody. Lepok je zložený z týchto zložiek: gliadínu (43 %), glutenínu (39 %), z iných bielkovín (4 %), tuku (3 %), cukrov (2 %) a škrobu (6%) [1].

LITERATÚRA

- [1] GANAJOVÁ, M.: *100 Chemických experimentov s vybranými potravinami*. 1. vyd. Košice, 2010. 147 s. ISBN 978-80-89284-64-1.