

## ĆWICZENIE II - BIAŁKA

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z właściwościami fizykochemicznymi białek i ich reakcjami charakterystycznymi.

### Odczynniki:

- wodny 1% roztwór siarczanu(VI) miedzi(II),
- 10% wodny roztwór wodorotlenku sodu
- stężony kwas azotowy(V),
- 20% wodny roztwór wodorotlenku sodu,
- wodny 0,5% roztwór octanu ołowiu(II),
- wodny 20% roztwór wodorotlenku sodu,
- alkohol n-propylowy,
- chlorek sodu krystaliczny,
- wodny 5% roztwór siarczanu(VI) miedzi(II),
- wodny 3% roztwór azotanu(V) srebra(I),
- stężony kwas chlorowodorowy (kwas solny),
- stężony kwas siarkowy(VI),
- wodny 3% roztwór kwasu trichlorooctowego,
- wodny 20% roztwór kwasu sulfosalicylowego,
- 10% wodny roztwór taniny,
- sproszkowany siarczan(VI) magnezu,
- kwas octowy 1%,
- 1 mol/dm<sup>3</sup> kwas octowy.

### Sprzęt laboratoryjny:

- statyw na probówki,
- probówki,
- uchwyt do probówek,
- palnik gazowy z węzłem,
- bagietki szklane 20 cm,

## 1. Reakcje charakterystyczne białek

### 1.1. Reakcja biuretowa

#### Wykonanie:

- Do probówki wlać ok. 1 cm<sup>3</sup> roztworu badanej próbki i dodać ok. 2 cm<sup>3</sup> 10% roztworu wodorotlenku sodowego oraz 2 krople 1% roztworu siarczanu(VI) miedzi(II).
- Zawartość probówki zmieszać.

#### Wynik:

Fioletowoczerwone zabarwienie mieszaniny w probówce świadczy o obecności substancji białkowej.

#### Uwaga

W sprawozdaniu napisać równania przebiegających reakcji.

## 1.2. Reakcja ksantoproteinowa

### Wykonanie:

- A. Do probówki wlać ok.  $1\text{ cm}^3$  roztworu badanej próbki i dodać 6 kropli stężonego kwasu azotowego(V). Wydziela się osad denaturowanego białka.
- B. Mieszaninę ostrożnie ogrzać w płomieniu palnika.
- C. Zawartość probówki ochłodzić w strumieniu zimnej wody i dodać ok.  $2\text{ cm}^3$  20% roztworu wodorotlenku sodu.

### Wynik:

Żółte zabarwienie pojawiające się podczas czynności B, które po dodaniu wodorotlenku sodu (p.C) przechodzi w pomarańczowe, świadczy o obecności substancji białkowej.

### Uwaga

W sprawozdaniu napisać równania przebiegających reakcji.

## 1.3. Reakcja z solami ołowiu

### Wykonanie:

- A. Do probówki wlać ok.  $1\text{ cm}^3$  0,5% roztworu octanu ołowiu(II) i dodawać kroplami 20% roztwór wodorotlenku sodu, aż do rozpuszczenia się wytrąconego początkowo osadu. Następnie dodać 6 kropeł roztworu badanej próbki.
- B. Zawartość probówki ostrożnie ogrzać w płomieniu palnika.

### Wynik:

Czarne lub ciemne zabarwienie zawartości probówki świadczy o obecności białka w próbce.

### Uwaga

W sprawozdaniu napisać równania przebiegających reakcji.

## 2. Denaturacja białek

### 2.1. Denaturacja białka alkoholem

#### Wykonanie:

- A. Do probówki wlać ok.  $1\text{ cm}^3$  roztworu badanej próbki, dodać szczyptę soli i wymieszać przez wstrząsanie.
- B. Do probówki stopniowo dolewać  $4\text{ cm}^3$  alkoholu n-propylowego i silnie wstrząsać, a następnie odstawić na 15 minut.

#### Wynik:

Wytrącenie się osadu świadczy o obecności białka w próbce.

### 2.2. Denaturacja białka solami metali ciężkich

#### Wykonanie:

- A. Do każdej z trzech probówek wlać od 2 do  $3\text{ cm}^3$  roztworu badanej próbki.
- B. Do pierwszej probówki dodawać kroplami roztwór octanu ołowiu(II).

- C. Po wytrąceniu się osadu w pierwszej probówce dodać nadmiar octanu ołowiu(II). Osad powinien się rozpuścić.
- D. Do drugiej próbki dodawać kroplami roztwór siarczynu(VI) miedzi(II).
- E. Po wytrąceniu się osadu w drugiej probówce dodać nadmiar roztworu siarczynu(VI) miedzi(II). Osad powinien się rozpuścić.
- F. Do trzeciej próbki dodać roztwór azotynu(V) srebra(I).

**Wynik:**

Wytrącenie się osadu denaturowanego białka świadczy o jego obecności w badanej próbce.

### **2.3. Denaturacja białka mocnymi kwasami nieorganicznymi**

**Wykonanie:**

- A. Do trzech próbek wlać po ok. 1 cm<sup>3</sup> stężonych kwasów, do próbki nr 1: kwasu chlorowodorowego, nr 2: kwasu siarkowego(VI), nr 3: kwasu azotowego(V).
- B. Do próbek z kwasami wlać ostrożnie po ok. 1 cm<sup>3</sup> badanej próbki, tak aby ciecze nie zmieszały się. Sprawdzić, czy na granicy obu faz tworzy się biały pierścień wytrąconego białka.
- C. Każdą próbkę ostrożnie wstrząsnąć.

**Wynik:**

Biały pierścień, tworzący się na granicy zetknięcia obu cieczy po dodaniu roztworu próbki, świadczy o obecności białka w badanej próbce. Po zmieszaniu obu warstw wytrącone, zdenaturowane białko rozpuszcza się w nadmiarze stężonego kwasu solnego i siarkowego, nie rozpuszcza się natomiast w nadmiarze kwasu azotowego.

### **2.4. Denaturacja białka kwasami organicznymi**

**Wykonanie:**

- A. Do dwóch próbek wlać po 2-3 cm<sup>3</sup> roztworu badanej próbki.
- B. Do pierwszej próbki z roztworem próbki dodać 8 kropli roztworu kwasu trichlorooctowego.
- C. Do drugiej próbki z roztworem badanej próbki wlać 8 kropli roztworu kwasu sulfosalicylowego.

**Wynik:**

Wytrącenie się osadu białka świadczy o jego obecności w badanej próbce.

### **2.5. Denaturacja białka taniną**

**Wykonanie:**

Do próbki wlać około 2 cm<sup>3</sup> roztworu białka i dodać 1 cm<sup>3</sup> odczynnika taninowego. Obserwować, czy pojawia się zmętnienie lub osad.

**Wynik:**

Zmętnienie lub osad świadczy o obecności białka w roztworze. Taninę wykorzystuje się do oznaczania zawartości białka w roztworach bardzo rozcieńczonych – poniżej 100 µg. Metoda taninowa polega na spektrofotometrycznym oznaczeniu zmętnienia.

## 2.6. Termiczna denaturacja białka

### Wykonanie:

- A. Do probówki wlać ok.  $2\text{ cm}^3$  roztworu badanej próbki i ogrzać do temperatury powyżej  $60^{\circ}\text{C}$ , np. do wrzenia.
- B. Do probówki wlać ok.  $2\text{ cm}^3$  badanej próbki oraz jedną kroplę 1% kwasu octowego i następnie ogrzać do temperatury powyżej  $60^{\circ}\text{C}$ , np. do wrzenia.

### Wynik:

Wytrącanie się osadu denaturowanego białka świadczy o jego obecności w badanej próbce.

### Uwaga

Dodatek kwasu octowego ma na celu doprowadzenie białka do punktu izoelektrycznego, w którym wytrąca się ono łatwiej i pełniej.

## 3. Wysalanie białka

### 3.1. Wysalanie białka siarczanem(VI) magnezu

#### Wykonanie:

- A. Do probówki wlać ok.  $3\text{ cm}^3$  roztworu badanej próbki, dodawać małymi porcjami stały siarczan(VI) magnezu aż do stanu nasycenia, to jest do momentu, w którym kolejna dodana porcja siarczanu(VI) magnezu już się nie rozpuści.
- B. Jeżeli nie wytrącił się osad, to dodać kilka kropel 1% kwasu octowego.

#### Wynik:

Wytrącenie się osadu skoagulowanego białka świadczy o jego obecności w badanej próbce.

## 4. Wyznaczanie punktu izoelektrycznego białek mleka

Białko jest elektrolitem amfoterycznym. Umieszczając białko w roztworach o odpowiednich stężeniach jonów  $\text{H}^+$  dochodzi się do takiego stężenia, w którym cząsteczka białka będzie elektrycznie obojętna. Takie pH nazywa się punktem izoelektrycznym (pI). Białko w punkcie izoelektrycznym ma obniżoną rozpuszczalność i wypada z roztworu.

#### Wykonanie:

W statywie umieszcza się 9 suchych probówek. Do probówki 1 odmierzyć  $3,2\text{ cm}^3$  kwasu octowego oraz  $6,8\text{ cm}^3$  wody destylowanej. Do pozostałych probówek wlać po  $5\text{ cm}^3$  wody destylowanej. Następnie  $5\text{ cm}^3$  roztworu z probówki 1 przenosi się do probówki 2, po wymieszaniu pobiera się  $5\text{ cm}^3$  roztworu i przenosi do probówki 3 itd. Z ostatniej probówki (9) odrzuca się końcowe  $5\text{ cm}^3$ . W ten sposób uzyskujemy skalę rozcieńczeń o wartościach pH:

Nr próbówki	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ilość $\text{cm}^3$ 1 $\text{mol/dm}^3$ kwasu octowego	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,012	0,006
pH	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	5,0	5,3	5,6	5,9
Osad									
Przeźroczystość roztworu nad osadem									

Następnie do wszystkich próbek dodaje się po  $1 \text{ cm}^3$  mleka i miesza zawartość próbek. Odstawić próbki na 30 minut, po czym zanotować obserwacje dotyczące nasilenia zmętnienia i ilość wytworzonego osadu. Wskazać próbkę, w której pH roztworu odpowiada punktowi izoelektrycznemu.