

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПРИКАРПАТСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТЕФАНІКА
ІНСТИТУТ ПРИРОДНИЧИХ НАУК
Кафедра неорганічної та фізичної хімії**

Затверджено
на засіданні кафедри
неорганічної та фізичної хімії
протокол №__ від_____2014 р.

**Методичні вказівки та інструкція
до виконання лабораторної роботи №1**

з курсу “Харчова хімія”

**ВЛАСТИВОСТІ ПРОСТИХ БІЛКІВ. ДОСЛІДЖЕННЯ
ХІМІЧНОГО СКЛАДУ СКЛАДНИХ БІЛКІВ**

Методична розробка
доц. Мідак Л.Я.,
канд. хім. наук,
викладач Кузишин О.В.,
канд. ф.-м. наук

м. Івано-Франківськ
2014

1. Тема: Властивості простих білків. Дослідження хімічного складу складних білків.

2. Мета: поглибити теоретичні знання про біологічну роль білків та їх фізико-хімічні властивості; набути вміння виконувати експеримент з дослідження властивостей простих білків; набути вміння виконувати експеримент з дослідження хімічного складу протеїнів.

Знати:

- предмет харчової хімії; мету, напрямки розвитку харчової хімії;
- класифікацію основних харчових речовин;
- класифікацію сучасних продуктів харчування;
- історичні етапи розвитку та становлення харчової хімії;
- фізіологічне значення білків та наслідки їх надлишку і дефіциту у раціонах харчування; функції білків;
- сучасні уявлення про структуру білків;
- фізико-хімічні властивості білків.

Вміти:

- визначати наявність амінокислот за кольоровими реакціями;
- за структурною формулою амінокислоти давати їй назву за номенклатурою IUPAC;
- записувати формулу амінокислоти за її назвою;
- одержувати пептиди з відповідних амінокислот;
- здійснювати хімічні перетворення амінокислот.

Самостійна робота на занятті.

1. Виконання тестових завдань (перевірка домашньої самопідготовки).
2. Виконання лабораторної роботи.
3. Обговорення та математична обробка експериментальних результатів.
4. Обговорення висновків та оформлення протоколу (залік лабораторної роботи).

3. Теоретичні основи

Білки належать до незамінних, есенціальних речовин, без яких неможливе життя, ріст та розвиток організму. Це зумовлено фізіолого-гігієнічними функціями, які виконують білки харчового раціону в організмі людини:

Важливі функції:

а) каталітична – найсуттєвіша, так як переважна більшість перетворень в організмі здійснюється тільки під впливом каталізаторів – ферментів, які є речовинами білкового походження;

б) структурна – на структурний білок сполучної тканини колаген припадає третина всіх білків організму за масою; структурні білки у тварин утворюють рогові покриви, є основою сполучення між клітинами;

в) рухова – скорочувальні білки у всіх живих організмів побудовані і функціонують за спільним принципом, наприклад, актин і міозин у м'язовому волокні;

г) транспортна – переносять гази (гемоглобін, міоглобін), залишки жирних кислот (альбумін крові), здійснюють активний транспорт багатьох речовин через мембрану;

д) регуляторна – регулюють швидкість біохімічних перетворень, зокрема регулюючи функцію виконують гормони гіпофізу, підшлункової залози, які є білками або похідними амінокислот, нейроолігопептиди забезпечують в головному мозку складні психічні і фізіологічні явища (пептид страху, пам'яті тощо), білки є регуляторами зчитування спадкової інформації з ДНК, рецепторами мембран, які забезпечують трансформацію і передачу в клітину інформації (гормонального сигналу);

е) захисна – деякі білки захищають організм від впливу шкідливих для життєдіяльності факторів. Основну функцію захисту у людини виконує імунна система, яка забезпечує синтез специфічних білків – антитіл у відповідь на бактерії, токсини та ін. чужорідні речовини (антигени);

є) енергетична – у процесі повного окиснення 1 г білка виділяється приблизно 17 кДж енергії, проте білки не відкладаються про запас, а при їх розщепленні вивільняється токсичний продукт – амоніак, на детоксикацію якого витрачається енергія. Половина з амінокислот, які утворюють білки, в організмі людини не синтезується, тому ці амінокислоти повинні поступати з їжею, Використання білків в енергетиці є для організму вимушеним, пов'язаним із незбалансованим вмістом в їжі амінокислот, необхідних для побудови білків.

Таким чином, білки забезпечують більшість життєвих проявів.

Білки – це нітрогенвмісні високомолекулярні органічні сполуки (полімери), які складаються із залишків α -амінокислот (мономери), що послідовно сполучені між собою пептидними зв'язками. Вони є найважливішими компонентами живих організмів. Амінокислоти – похідні карбонових кислот, у яких один із гідрогенів вуглецевого ланцюга заміщений на аміногрупу ($-\text{NH}_2$). Замінні амінокислоти – можуть синтезуватися в організмі людини із інших нітрогенвмісних сполук, наприклад: гліцин, аланін, серин, пролін, тирозин, аспарагінова і глутамінова кислоти, цистин, цистеїн та ін. Незамінні амінокислоти – не можуть синтезуватися в організмі людини. До них належать такі амінокислоти: валін, лізин, лейцин, ізолейцин, треонін, метіонін, триптофан, фенілаланін.

Дуже важливо знати, що повноцінний білок містить у своєму складі усі незамінні амінокислоти. Неповноцінний білок містить у своєму складі не усі незамінні амінокислоти. Кожен білок унікальний за своєю структурою і функціями.

Фізико-хімічні властивості білків: амфотерність білкових молекул – здатність проявляти кислий або основний характер. Ізоелектрична точка білка (ІЕТ) – значення рН середовища, при якому білок не несе сумарного заряду, тобто число негативних зарядів зрівнюється з числом позитивних зарядів. У кислому середовищі сумарний заряд білкової молекули позитивний, тому вона рухається до катоду (-). У лужному середовищі сумарний заряд білкової молекули негативний, тому вона рухається до аноду (+). За значення рН, що відповідає ізоелектричній точці, білок не рухається в електричному полі.

Кожна амінокислота, крім гліцину, містить один чи більше асиметричних атомів карбону, тобто проявляє оптичну активність. За абсолютною конфігурацією амінокислоти в організмі людини належать до L-ряду.

Розчинність білків – велика спорідненість з водою (гідрофільність). Це пов'язано з гідратацією білкової молекули у результаті взаємодії диполів води з йонними ($-\text{NH}_2$ і $-\text{COOH}$) і полярними ($-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{CO}$) групами в білковій молекулі. Вода навколо білкової молекули називається структурованою. Заряд білкової молекули та гідратна оболонка навколо білкової молекули надають стабільності розчинам білків. Розчинність білків у воді зростає при додаванні нейтральних солей незначної концентрації. Йони солей взаємодіють з протилежними зарядами білка, екранують заряджені групи білкових молекул і тим самим зменшують білкову взаємодію. Зворотню дію здійснює підвищення концентрації солей.

Висолювання – процес осадження білка нейтральними солями. При цьому руйнується гідратна оболонка і нейтралізуються заряди білкової молекули. Такі білки зберігають свої природні властивості і функції після видалення солі.

Емульгуючі властивості білка – білок утворює на поверхні крапель жиру (за рахунок гідрофобної взаємодії) тонку плівку, яка притягує воду (за рахунок полярних груп) і протидіє злипанню жирових часток. Казеїн молока емульгує (стабілізує) природну емульсію – молоко.

Денатурація – під дією різних фізичних і хімічних факторів порушується природна просторова структура білкової молекули: руйнуються четвертинна, третинна і вторинна структури (первинна не змінюється). Це призводить до зменшення або повної втрати розчинності, специфічної біологічної активності, зміни оптичних властивостей, в'язкості та ін. Під час денатурації розриваються йонні, водневі і дисульфідні зв'язки, поліпептидний ланцюг розкручується і знаходиться або в розгорнутому стані, або у вигляді хаотичного клубка. Для більшості білків це незворотний процес, але для деяких, наприклад, білків м'язів – зворотний. У міру старіння організму відбувається поступова денатурація білків і зменшення їх гідрофільності. Денатуровані білки продуктів харчування краще розщеплюються ферментами шлунково-кишкового тракту. Цілий ряд технологічних процесів одержання харчових продуктів: випікання хліба, висушування макаронів, овочів, молока, яєчного порошку, виготовлення консервів, кондитерських виробів та ін. пов'язаний з частковою денатурацією білків.

4. Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: розчин яєчного білка, 1% розчин оцтової кислоти, 10% розчин оцтової кислоти, 10% розчин натрій гідроксиду, насичений розчин натрій хлориду, розчини концентрованою сульфатної і нітратної кислот, розчини концентрованих саліцилової і трихлороцтової кислот, розчини купрум(II) сульфату, плюмбум(II) ацетату, аргентум нітрату, розчин казеїну, розчин амоній молібдату в нітратній кислоті, концентрований розчин лугу, 2% розчин тирозину і гліцину.

Зміст роботи

4.1. Реакції осадження білків

Реакції осадження білків вельми різноманітні, проте їх можна розділити на дві групи:

а) *практично необоротні реакції осадження*, під час яких білки зазнають глибоких змін і не можуть бути знов розчинені в первинному розчиннику: в цьому випадку має місце денатурація білка; до необоротних реакцій відносять осадження білка солями важких металів, алкалоїдними реактивами, мінеральними, органічними кислотами і осадження під час нагрівання;

б) *оборотні реакції осадження*, під час яких білки, не піддаються глибоким змінам і тому можуть бути розчинені в первинному розчиннику; молекули білка при цьому зберігають свої первинні, включаючи біологічні, властивості і не піддаються денатурації.

До оборотних реакцій осадження слід віднести реакції осадження білків органічними розчинниками (спиртом або ацетоном) і реакції висолювання білків (осадження під впливом концентрованих розчинів нейтральних солей лужних і лужноземельних матеріалів).

4.1.1. Осадження білків під час нагрівання

Майже всі білки денатурують під час нагрівання за температури від 500°C до 550°C і вище. Механізм теплової денатурації пов'язаний з перебудовою структури білкової молекули, в результаті якої білок втрачає свої нативні властивості і розчинність. Присутність солей і концентрація водневих йонів відіграють важливу роль у випаданні в осад денатурованого під час нагрівання білка. Якнайповніше осадження відбувається в ізоелектричній точці білка, тобто при такій величині рН, коли колоїдні частинки білка найменш стійкі.

У п'ять пронумерованих пробірок наливають по 10 крапель 1%-го розчину яєчного білку. Вміст першої пробірки нагрівають на газовому пальнику. Рідина каламутніє, оскільки частинки денатурованого білку несуть заряд, вони утримуються в зваженому

стані (яєчний альбумін є кислим білком і в нейтральному середовищі заряджає негативно).

У другу пробірку додають 1 краплю 1%-й оцтової кислоти і нагрівають. Випадає осад білку внаслідок того, що білок втрачає заряд і знаходиться в стані, близькому до ізоелектричної точки.

У третю пробірку додають 1 краплю 10%-го розчину оцтової кислоти і зміст нагрівають. Осідання не утворюється навіть під час кип'ятіння, оскільки в кислому середовищі частинки білку перезаряджаються, набуваючи позитивні заряд.

У четверту пробірку додають 1 краплю 10%-го розчину оцтової кислоти і 1 краплю насиченого розчину натрій хлориду. Утворюється осад білка внаслідок адсорбції йонів натрію хлориду (утворення подвійного ізоелектричного шару) і нейтралізації позитивного заряду на частинках білка.

У п'яту пробірку додають 1 краплю 10%-го розчину натрій гідроксиду і нагрівають. Осідання білку не відбувається навіть під час кип'ятіння, оскільки в лужному середовищі негативний заряд на частинці білка посилюється.

4.1.2. Осідження білка концентрованими мінеральними кислотами

Осідження білка концентрованими мінеральними кислотами (окрім ортофосфатної кислоти) пояснюється як явищами дегідратації білкових частинок і нейтралізації їх зарядів, так і з інших причин (денатурацією, утворенням солей).

У надлишку сульфатної або хлоридної кислот, а також при їх тривалій дії, осад денатурованого білка розчиняється, за рахунок перезарядки білка і часткового гідролізу. У надлишку нітратної кислоти цього розчинення не відбувається (супутній нітрат-йон заважає перезарядці білкової молекули).

У дві пробірки наливають по 1 мл концентрованою сульфатної і нітратної кислот. Потім, нахиливши пробірки під кутом 45°, обережно по стінці пробірки (щоб рідини не змішалися) наливають рівний об'єм розчину білка. На межі двох шарів рідини з'являється осад білка у вигляді тонкої плівки. Обережно струшуючи пробірки, виявляють розчинення осаду білка.

4.1.3. Осідження білка органічними кислотами

Механізм осідження білків органічними кислотами пояснюється дегідратацією білкової молекули і зняттям заряду. Осідження трихлороцтовою кислотою дає можливість відокремити білки від пептидів та амінокислот (білковий нітроген відділяється від небілкового). Відбувається необоротна реакція осідження.

У дві пробірки наливають по 5 крапель розчину білка і по 1-2 краплі 10%-го розчину саліцилової і трихлороцтової кислот. В обох пробірках відбувається осідження білка.

4.1.4. Осідження білка солями важких металів

Під дією солей важких металів на розчині білка відбувається денатурація білкової молекули. Осідження дегідратованого білка обумовлене адсорбцією важкого металу на поверхні білкової молекули і утворенням нерозчинних комплексів. Надлишок деяких солей веде до розчинення (пептизації) осаду білків. Такий спосіб осідження дає можливість виділяти білки для дослідження їх біологічної активності.

У три пробірки наливають по 5 крапель 1%-го розчину яєчного білка і по 1 краплі: у першу – 7%-го розчину купрум(II) сульфату, в другу – 5%-го розчину плюмбум(II) ацетату, в третю – 5%-го розчину аргентум нітрату. Спостерігається утворення осаду у всіх трьох пробірках.

У першу пробірку додають ще 5-10 крапель розчину купрум(II) сульфату, в другу – 5-20 крапель плюмбум(II) ацетату, в третю – 5-10 крапель аргентум нітрату. Що відбувається?

4.2. Кольорові реакції білка

У пробірку внести 4-5 крапель розчину білка, стільки ж концентрованого розчину лугу і 1 краплю розчину купрум(II) сульфату. Струсити пробірку. Спостереження. Що доводить дана реакція?

4.3. Ксантопротеїнова реакція на білки й ароматичні амінокислоти

У три пробірки відповідно внести по 3-4 краплі розчину таких речовин: у першу пробірку – розчин білка, у другу – розчин тирозину, у третю – розчин гліцину. У кожену пробірку внести 2-3 краплі концентрованої нітратної кислоти. Нагріти протягом 2-3 хвилин. Спостереження. Остудити вміст пробірок і додати в кожену з них по декілька крапель концентрованого розчину лугу. Спостереження. Що доводить проведена реакція? Написати рівняння нітрування тирозину і фенілаланіну.

4.4. Дослідження хімічного складу складних білків (фосфопротеїдів)

Фосфопротеїди – складні білки, до складу яких входить ортофосфатна кислота. До фосфопротеїдів відноситься казеїн молока.

4.4.1. Визначення фосфатної кислоти в казеїні

До 1 мл розчину казеїну додають 2 мл розчину амоній молібдату в нітратній кислоті. Суміш злегка нагрівають. Утворюється осад фосформолібденовокислого амонію $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$.

4.4.2. Проба на поліпептидний компонент казеїну

Проба на поліпептидний компонент казеїну проводиться за біуретовою реакцією: до 5 крапель розчину казеїну додати 10 крапель концентрованого розчину лугу і 2 краплі 1% розчину купрум(II) сульфату. У присутності білків розчин набуває червоно-фіолетового кольору.

Контрольні запитання

1. Дайте визначення поняттю «білки». Опишіть особливості їх властивостей.
2. Знаходження білків у природі, їх роль.
3. Наведіть кілька прикладів амінокислот.
4. Які кольорові реакції білків Вам відомі?
5. Чому білки коагулюють при нагріванні?
6. Що таке третинна і четвертинна будова білків?
7. З метану добудьте дипептид гліцилаланіну.
8. Яка сполука утворюється при дії метанолу на α -амінопропанову кислоту? Напишіть рівняння реакції.
9. Скільки структурних ізомерів може мати сполука $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$, що відноситься до класу амінокислот?
10. Запропонуйте схему синтезу гліцину з метану.
11. Які властивості покладені в основу класифікації білків? Класифікація білків.
12. Якісне та кількісне визначення білків.
13. Обмін білків. Норми споживання білка. Харчові алергії.
14. Білково-калорійна недостатність і її наслідки. Проблема білкового дефіциту на Землі.
15. Перетворення білків у технологічному потоці.
16. Білки харчової сировини (білки злакових, білки бобових культур, білки олійних культур, білки картоплі, овочів та плодів, білки м'яса та молока). Нові форми білкової їжі.
17. Заходи щодо покращення білкового харчування.

Завдання для самоконтролю

1. Як класифікують амінокислоти?
2. Для гліцину напишіть рівняння реакцій з Натрій гідроксидом, етиловим спиртом та етиламіном.
3. Визначте формулу естеру амінооцтової кислоти, в якому масова частка Оксигену становить 36 %.
4. Опишіть хімічні властивості амінокислот на прикладі аланіну.
5. З метану добудьте дипептид аланілгліцину.
6. Скільки грам гліцину можна добути з 94,5 г хлороцтової кислоти, якщо вихід продукту становить 80%?

Інформаційні джерела

1. Пищевая химия. Нечаев А.П., Траубенберг С.Е., Кочеткова А.А. и др. / Под ред. А.П. Нечаева. – Издание 4-е, испр. и доп. – СПб.: ГИРД, 2007. – С. 17-121.
2. Дуденко Н.В., Павлоцкая Л.Ф., Кривоносов М.В., Кратенко Р.Н. Биологическая химия. – Харьков: Прапор, 1999. – С.22-25.
3. Павлоцька Л.Ф., Дуденко Н.В., Дмитрієвич Л.Р. Основи фізіології гігієни харчування та проблеми безпеки харчових продуктів. – Суми:ВТД «Університетська книга», 2007. – С. 21-27.
4. Пасальський Б.К. Хімія харчових продуктів: Навчальний посібник. – К.: Київ. Держ.торг.-екон.ун-т, 2000. – С.121-140.