

BÍLKOVINY A AMINOKYSELINY

Bílkoviny, odborně **proteiny**, jsou základem všech známých organismů, kde plní funkce stavební (kolagen, keratin, elastin), transportní (hemoglobin), katalytické (enzymy, hormony), ochranné a obranné (imunoglobulin, fibrin, fibrinogen), pohybové (aktin, myosin). Základní stavební částicí bílkovin jsou aminokyseliny. Některé aminokyseliny je schopné tělo vyrábět samo, jiné musí přijímat v potravě (tzv. esenciální aminokyseliny). V bílkovinách jsou aminokyseliny vzájemně vázány aminoskupinami $-NH_2$ a karboxylovými skupinami $-COOH$ amidovou vazbou $-NH-CO-$, která se nazývá peptidová vazba.

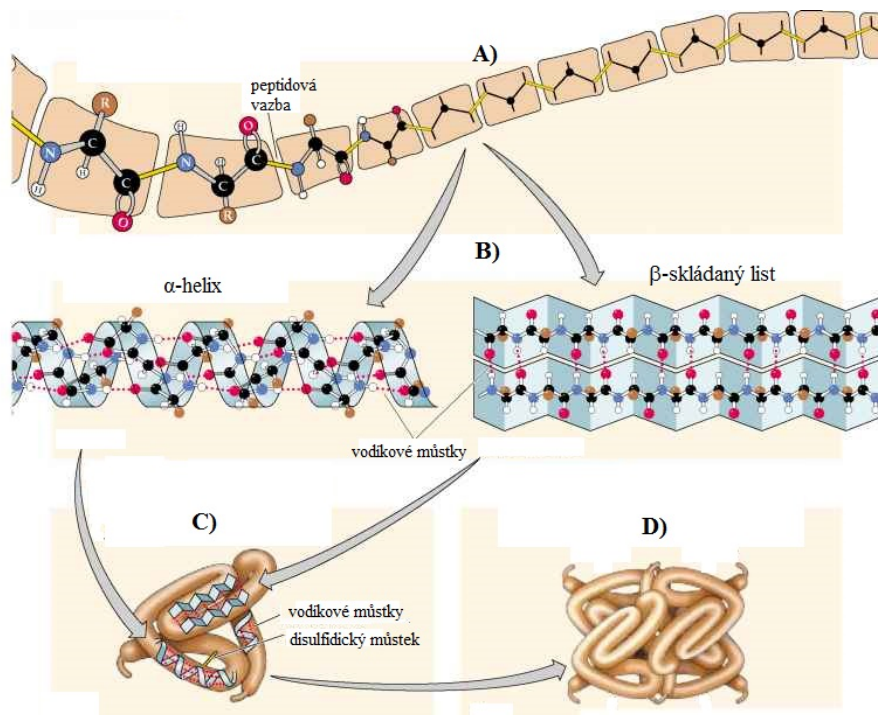
Rozlišujeme primární, sekundární, terciární a u některých složitějších proteinů ještě kvartérní strukturu bílkovinových řetězců.

Primární struktura – pořadí aminokyselin v řetězci proteinu označujeme jako primární strukturu. Primární struktura udává chemické vlastnosti bílkoviny.

Sekundární struktura – je geometrické uspořádání polypeptidového řetězce mezi několika po sobě jdoucími aminokyselinami. Primární struktury jsou uspořádány do tzv. alfa šroubovice (α -helix), skládaného listu (β -sheet), neuspořádaných struktura (random coil).

Terciární struktura – pojem se označuje trojrozměrné uspořádání celého peptidového řetězce. Je tvořena střídáním sekundárních struktur. Podle tvaru a vlastností rozlišujeme strukturu ve vodě rozpustnou globulární s tvarem klubka a fibrilární (myosin) vláknitou ve vodě nerozpustnou. Celá struktura je stabilizována kovalentními vazbami.

Kvartérní struktura – řeší prostorové uspořádání bílkovin. Takovéto uspořádání vykazují jen složitější komplexy bílkovin.



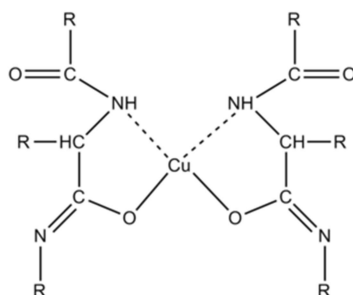
Obrázek 1: struktura bílkovin – A) primární; B) sekundární; C) terciární; D) kvartérní

Úloha č. 5: DŮKAZ BÍLKOVIN/AMINOKYSELIN

A. BIURETOVÁ REAKCE

Princip

Biuretová reakce je reakce, při níž se dokazuje bílkovina pomocí směsi roztoků hydroxidu sodného NaOH a síranu měďnatého CuSO₄. Bílkovina se při důkazu zbarví modrofialově. Biuretovou reakcí dokazujeme peptidové –NH–CO– vazby, kterými se aminokyseliny vzájemně vážou. V alkalickém prostředí dochází k reakci mezi Cu²⁺ a peptidovou vazbou za vzniku komplexu Cu²⁺ a bílkoviny. Vzniká charakteristický barevný – fialový komplex – biuret H₂N–CO–NH–CO–NH₂.



Vzorek

Vaječný bílek, mléko, jogurt,...

Pomůcky

Zkumavky, stojan na zkumavky

Chemikálie

0,1 mol·l⁻¹ NaOH, 0,05 mol·l⁻¹ CuSO₄ · 5H₂O (Fehlingovo činidlo I)

Postup

1. Vaječný bílek zřed'te vodou v poměru 1 : 2 (bílek : voda), důkladně promíchejte a filtrujte přes smotek vaty v nálevce. Na Petriho misku nebo do zkumavky dejte další druhy vzorků.
2. K 1 ml bílkového filtrátu ve zkumavce přidejte 1 ml NaOH a 1 ml CuSO₄ · 5H₂O.
3. Pozorujte vznik modrofialové zbarvení – biuretovou reakci.

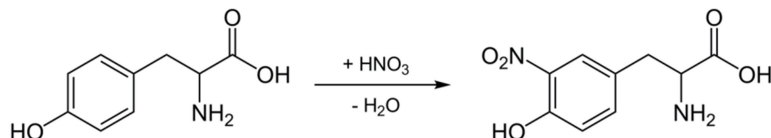
Závěr:

4. Do protokolu uveďte pozorování.

B. XANTOPROTEINOVÁ REAKCE

Princip

Principem xantoproteinové reakce je nitrace aromatických částí aminokyselin, např. tyrosin, tryptofan. K nitraci postačuje např. HNO_3 . Pozitivní reakce se projeví vznikem žlutého zbarvení, které je způsobeno vznikajícími nitrosloucheninami



Pozitivní reakci poskytuje i kolagen, ačkoli nemá aromatické aminokyseliny.

Pomůcky:

Zkumavky, držák na zkumavky, kahan

Chemikálie:

HNO_3 koncentrovaná, 20% NaOH

Vzorek:

vaječný bílek, mléko, jogurt,...

Pracovní postup:

1. Vaječný bílek zřed'te vodou v poměru 1 : 2 (bílek : voda), důkladně promíchejte a filtrujte přes smotek vaty v nálevce. Na Petriho misku nebo do zkumavky dejte další druhy vzorků.
2. Ke 2 ml bílkového filtrátu či jiného vzorku přidejte 1 ml HNO_3 a opatrně zahřívejte na vodní lázni nebo nad kahanem do vzniku žluté sraženiny.
3. Ke sraženině opatrně přidejte zrnko NaOH, kdy nejprve dochází k neutralizační reakci mezi HNO_3 a NaOH.
4. Při nadbytku NaOH pozorujte vznik oranžového xantoproteinu.

Závěr:

Do protokolu uveďte pozorování.

C. DŮKAZ SIRNÝCH AMINOKYSELIN

Princip

Sirné aminokyseliny (cystein) působením zásad uvolňují za tepla sulfan H_2S . sulfan lze dokázat pomocí octanu olovnatého či jiné rozpustné olovnaté soli za vzniku černého sulfidu olovnatého

Pomůcky:

Zkumavky, stojan na zkumavky, držák na zkumavky, kahan

Chemikálie:

Zředěný $(CH_3COO)_2Pb$, zředěný NaOH,

Vzorek:

Roztok vaječného bílku

Pracovní postup:

1. Do zkumavky nalijte 2 ml $(CH_3COO)_2Pb$.
2. Přidávejte roztok NaOH až do rozpuštění sraženiny.
3. Následně přidejte 2 ml roztoku vaječného bílku a obsah zkumavky promíchejte.
4. Zkumavku zahřejte nad kahanem
5. Sledujte vývoj černé sraženiny sulfidu olovnatého

Závěr:

Do protokolu uveďte pozorování.

D. DŮKAZ KASEINU A LAKTOSY V MLÉCE

Princip

Mléko obsahuje 5 % laktosy (mléčný cukr), 4 % bílkovin, 5 % tuku a 88 % vody. Z bílkovin má největší zastoupení (80 %) kasein, který patří mezi fosfoproteiny. Kasein je termostabilní – zvýšením teploty se nesráží. Dále jsou z bílkovin v mléce obsaženy syrovátkové bílkoviny (laktalbumin, laktoglobulin, sérový albumin). Surovátkové proteiny se nachází v mléčném séru po vysrážení kaseinu. Tyto syrovátkové proteiny podléhají denaturaci nad 60 °C. Při zahřívání mléka k varu dochází k denaturaci syrovátkových proteinů (tedy laktalbuminu, laktoglobulinu, sérového albuminu) – tuto denaturaci lze pozorovat jako vznik škráloupu na hladině. Přidáním octa nebo zředěné kyseliny chlorovodíkové k vychladlému mléku dochází k vysrážení kaseinu (fosfoprotein). Kasein se v mléce shlukuje do micel, na jejichž povrchu jsou vázány ionty a hydrofilní sérové bílkoviny, které chrání vnitřní hydrofobní obsah. Snižováním pH dochází k porušování povrchových struktur kaseinových micel, tím dochází k uvolnění kaseinu a jeho denaturaci. Takto uvolněný kasein již není rozpustný, a proto tvoří sraženinu. Tento typ srážení je vratný – neutralizací mléka dojde k opětovnému rozpuštění kaseinu. Tohoto kyselého srážení kaseinu se využívá při výrobě jogurtů nebo tvarohů. V potravinářství slouží ke kyselému srážení kaseinu bakterie mléčného kvašení, které produkují kyselinu mléčnou. Filtrací dochází k oddělení vysráženého kaseinu. Ve filtrátu lze následně dokázat přítomnost laktosy – mléčného cukru. Laktosa patří mezi disacharidy a obsahuje galaktosu a glukosu. Systematický název zní β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopyranosa. Laktosa obsahuje glykosidickou vazbu mezi 1. uhlíkem galaktosy a 4. uhlíkem glukosy. Na glukose je tedy volná hydroxylová skupina na 1. uhlíku – tzv. poloacetalový hydroxyl. Může tedy docházet k oxidaci na tomto uhlíku, a tudíž laktosa patří mezi redukující sacharidy. Laktosa se tedy oxiduje (přesněji 1. uhlík glukosy), Cu^{2+} (obsažené ve Fehlingově činidle) se redukuje na oranžovou sraženinu oxidu měďného. Po přikápnutí Fehlingova činidla ke sraženině kaseinu lze pozorovat tvorbu fialového zbarvení. Dochází k reakci mezi Cu^{2+} a peptidovou vazbou $-\text{CO}-\text{NH}-$ za vzniku komplexu Cu^{2+} a dané bílkoviny. Vzniklý komplex je barevný – fialový. V mléce lze tedy dokázat 3 složky – syrovátkové bílkoviny, které denaturují při teplotě nad 60 °C (škrálop). Dále lze dokázat kasein kyselým srážením (pomocí octa nebo zředěné HCl) a následně pomocí Fehlingova činidla. Provedením Biuretové reakce lze dokázat přítomnost peptidové vazby (fialové zbarvení). Laktosu přítomnou ve filtrátu lze dokázat pomocí Fehlingova činidla – laktosa je redukující disacharid, a proto redukuje Cu^{2+} na oranžovou sraženinu oxidu měďného.

Pomůcky:

Petriho misky, vodní lázeň

Chemikálie:

ocet nebo zř. HCl , Fehlingovo činidlo (Fehlingovo činidlo I – roztok $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Fehlingovo činidlo II – vinan sodno-draselný (Seignettova sůl), NaOH),

Vzorek:

Mléko

Pracovní postup:

1. Do kádinky nalijte 50 ml mléka a opatrně zahřejte k varu. Obsah kádinky nechte vychladnout.
2. Po vychladnutí odeberte z povrchu škrálop a k převařenému mléku přidejte cca 15 ml octa či 5 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové. Vzniká sraženina
3. Obsah kádinky zamíchejte tyčinkou a zfiltrujte jej.
4. Přefiltrováním této sraženiny získáváme bezbarvý filtrát, na filtračním papíře se zachytí bílá sraženina.
5. Část sraženiny zachycené na filtračním papíře přeneste na Petriho misku a přikapejte pár kapek Fehlingova činidla. Po nakapání Fehlingova činidla na část sraženiny zachycené na filtru se objeví fialové zbarvení.
6. Odeberte 5 ml filtrátu do zkumavky a přidejte k němu 5 ml Fehlingova činidla.
7. Zkumavku ponořte do vodní lázně nebo ji zahřejte nad kahanem.
8. Při zahřívání zkumavky obsahující bezbarvý filtrát a Fehlingovo činidlo lze pozorovat vznik oranžové sraženiny. Po nakapání Fehlingova činidla na část sraženiny zachycené na filtru se objeví fialové zbarvení.

Závěr:

Do protokolu uveďte pozorování.

Úloha č. 6: KYSELÁ HYDROLÝZA BÍLKOVIN

(denaturace kolagenu na klíž)

Kolagen je složitá bílkovina, tvořící cca. 25 – 30 % hmotnosti kostí a cca. 36 % hmotnosti kůží. Kosti a kůže jsou tedy hlavní suroviny pro výrobu klihů a želatin, což jsou v obou případech denaturovaný kolagen. Želatina má více zachovanou molekulovou hmotnost a vyšší čistotu, kdežto klíž má více odbouranou molekulovou hmotnost (tzn. nižší Mw) a nižší čistotu.

V obou případech je prvním krokem výroby vyluhování mírně denaturovaného kolagenu z kostí či kůží v mírně alkalickém prostředí (pH cca. 10) na tzv. glutinový roztok.

Protože je tento technologický krok časově náročný, vyjdeme z průmyslově vyrobeného kolagenu.

Pomůcky:

varná baňka 250 ml, zpětný chladič, míchadlo, pipeta, odměrný válec 100 ml, olejová lázeň s regulací teploty lázně, Petriho misky, univerzální indikátorový papírek

Vzorky:

průmyslově vyrobený kolagen

Chemikálie:

Koncentrovaná H_2SO_4 , 2 M NaOH, 2 M H_2SO_4

Pracovní postup:

1. Ve varné baňce připravte suspenzi 5 g průmyslového kolagenu ve 150 ml vody.
2. K suspenzi přidejte 5 kapek koncentrované H_2SO_4 .
3. Za stálého míchání zahřívejte 30 min.
4. Obsah v baňce nechte vychladnout na laboratorní teplotu a zneutralizujte 2 M NaOH, kontrolujte indikátorovým pH papírkem.
5. Do Petriho misky odeberte 10 ml vychladlého vzorku.
6. Vznikne tzv. klihová galerta, podobná rosolu.
7. Pokud rosol nevznikne, vložte roztok do rotační vakuové odparky a zakonzentrujte.
8. Po zmenšení objemu o cca. třetinu zkuste znovu vytvořit tzv. klihovou galertu.
9. Postup opakujte s tím rozdílem, že místo H_2SO_4 přidejte 10 ml 2 M NaOH a po reakci neutralizujte 2 M H_2SO_4 .

Závěr: Pomocí skleněné tyčinky ověřte viskozitu produktu.