



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych z Chemii Żywności

Ćwiczenie 1

Struktura, właściwości i wykrywanie białek

Gdańsk, 2024

1. Wprowadzenie

Białka są jednymi z głównych składników żywności oraz niezbędnymi składnikami pokarmowymi. Zawartość białek w produktach spożywczych jest jednym z czynników określających ich wartość odżywczą. Białka zbudowane są z reszt α -L-aminokwasowych, połączonych w łańcuchy polipeptydowe wiązaniami trans-peptydowymi.

1.1. Struktura i właściwości fizykochemiczne białek

Struktura pierwszo-, drugo-, trzecio- i czwartorzędowa

Różnorodność białek wynika ze składu i sposobu uszeregowania reszt różnych aminokwasów w cząsteczce (struktury pierwszorzędowej). Chemiczne właściwości i wymiary reszt aminokwasów powiązanych w określonej sekwencji decydują o konformacji białek (kształcie łańcuchów polipeptydowych - strukturze drugorzędowej), o ich przestrzennym ułożeniu w cząsteczce (strukturze trzeciorzędowej), a także o wzajemnym oddziaływaniu podjednostek przy tworzeniu struktur czwartorzędowych. Białka o określonej konformacji mają charakterystyczne właściwości biologiczne oraz cechy funkcjonalne w żywności.

Denaturacja

Pod wpływem wielu czynników fizycznych i chemicznych następuje nieodwracalne zniszczenie struktury białka zwane procesem denaturacji. Denaturacja białka dotyczy zmian w II, III- i IV-rzędowej strukturze białka natywnego, które prowadzą do utraty aktywności biologicznej lub innej indywidualnej cechy charakterystycznej przy zachowaniu jego struktury pierwszorzędowej. Podczas denaturacji niszczone są wiązania wodorowe, a w obecności odczynników redukujących zerwaniu ulegają wiązania disulfidowe. Denaturacja może być procesem odwracalnym (tzw. renaturacja) lub nieodwracalnym. Podczas denaturacji zachodzą zmiany rozpuszczalności i przesunięcie punktu izoelektrycznego. Rozwinięcie łańcucha peptydowego może prowadzić do wzrostu lepkości, a także zmian absorpcji w nadfiolecie. Obserwuje się również często procesy agregacji i wytrącania, co jest związane ze zmianami stopnia hydratacji i rozpuszczalności białek. Najważniejszymi metodami fizycznymi denaturacji są: ogrzewanie, silne mieszanie, wytrząsanie, naświetlanie promieniowaniem nadfioletowym, rentgenowskim i jonizującym lub działanie ultradźwiękami. Denaturacja chemiczna zachodzi pod wpływem związków, które są zdolne do rozerwania wiązań wodorowych, na przykład pod wpływem roztworu mocznika o stężeniu 6-8 mol/l lub chlorku guanidyny o stężeniu 4 mol/l, na skutek działania kwasów lub zasad (wartość pH poniżej 3 lub powyżej 9), soli metali ciężkich, a także 1% roztworu dodecylsiarczanu sodu (SDS).

Rozpuszczalność w wodzie

Białka na ogół są rozpuszczalne w wodzie. Niektóre z nich mogą rozpuszczać się w rozcieńczonych kwasach lub zasadach, jeszcze inne w rozpuszczalnikach organicznych. Posiadają zdolność wiązania cząsteczek wody. Efekt ten nazywamy hydratacją. Początkowo pęcznieją, a następnie rozpuszczają się tworząc cząstki koloidalne.

Białka ulegają procesowi koagulacji i procesowi odwrotnemu - peptyzacji. Koagulacja jest to przejście zolu w żel, a peptyzacja jest to przejście żelu w zol.

Na rozpuszczalność białek ma też wpływ stężenie soli nieorganicznych. Ich małe stężenie wpływa dodatnio na rozpuszczalność polipeptydów, jednak przy pewnym stężeniu następuje uszkodzenie otoczki solwatacyjnej, co powoduje wypadanie białek. Proces ten nie narusza struktury białka, jest odwracalny i nosi nazwę wysalania białek.

Odczyn białka / punkt izoelektryczny

Podstawowe struktury aminokwasów tworzących białko zawierają różne grupy funkcyjne - kwasowe, zasadowe, pierścienie aromatyczne, grupy alkoholowe, atomy siarki itp., stąd w zależności od pH roztworu, w jakim się znajdują przybierają - jako całość - ładunek ujemny lub dodatni. Ładunek cząsteczki białka w roztworze o określonym stężeniu jonów wodorowych zależy od ilościowego stosunku aminokwasów zasadowych (lizyny, histydyny i argininy) i aminokwasów kwasowych (kwasu glutaminowego i asparaginowego). Od sumarycznego ładunku cząsteczki zależy z kolei jej stabilność w środowisku o różnym pH. W środowisku o wysokim stężeniu jonów wodorowych (niskie pH) cząsteczka białka zyskuje ładunek dodatni, podczas gdy w środowisku o niskim stężeniu jonów wodorowych (wysokie pH) ma ładunek ujemny. Wartość pH, przy którym sumaryczny ładunek cząsteczki wynosi 0, nosi nazwę punktu izoelektrycznego. W punkcie izoelektrycznym białko nie wykazuje ruchliwości elektroforetycznej oraz charakteryzuje się najniższą rozpuszczalnością w wodzie.

Wysalanie białek

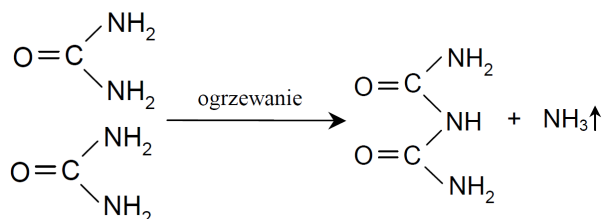
Wysalaniem białek, jak wspomniano, nazywamy proces wytrącenia z roztworu białek rozpuszczalnych w wodzie przez wysokie stężenie soli. Stosuje się w tym celu sole, których jony łatwo tworzą wodziany. Zjawisku wysalania sprzyjają te aniony, które tworzą wiązania wodorowe lub mają dużą elektroujemność. Elektrolity wielowartościowe działają silniej od jednowartościowych. Sole wiążące wodę pozbawiają białka płaszcza wodnego, sprzyjając ich asocjacji w większe agregaty o zmniejszonej rozpuszczalności, które wypadają z roztworu. Stężenie soli potrzebne do wysalania białek zależy od ich właściwości oraz pH środowiska. Najłatwiej

wysolić białko w jego punkcie izoelektrycznym, ponieważ cząsteczki na zewnątrz obojętne łatwo asocjują w większe agregaty wypadające z roztworu. Do wysalania najczęściej stosuje się $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , MgSO_4 . Wysalanie białek jest procesem odwracalnym, usunięcie soli, np. przez dializę, sprawia, że wytrącone białko ponownie rozpuszcza się i wykazuje swe biologiczne właściwości.

1.2. Metody wykrywania białek - reakcje charakterystyczne

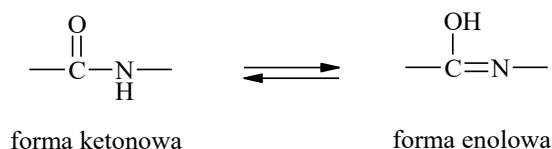
Metoda biuretowa – wykrywanie wiązania peptydowego

Nazwa reakcji pochodzi od biuretu, związku powstającego w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek mocznika, zawierającego w swej cząsteczce wiązania amidowe:

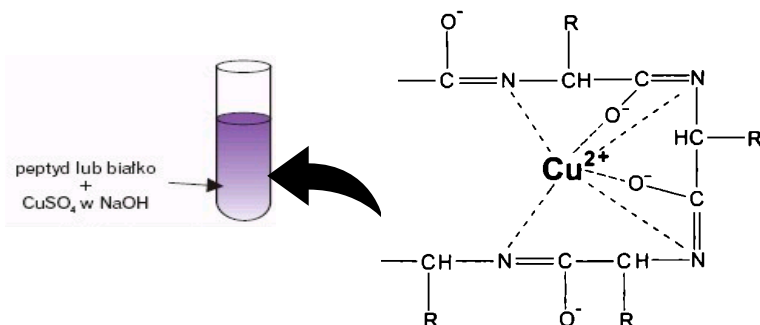


Obecność dwóch wiązań amidowych (peptydowych) w cząsteczce jest warunkiem zajścia reakcji biuretowej.

Wiązania peptydowe obecne w białkach w roztworze alkalicznym ulegają tautomerizacji do formy enolowej (Rys. 1). Następnie jony miedzi (Cu^{2+}) ulegają skompleksowaniu przez enolowe formy wiązań peptydowych, tworząc barwny (fioletowy) produkt, którego absorbancję mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali 546 nm. W kompleksach takich jony miedzi tworzą dwa wiązania jonowe z atomami tlenu oraz cztery wiązania koordynacyjne z atomami azotu (Rys. 2).



Rysunek 1. Tautomerizacja wiązania peptydowego do formy enolowej

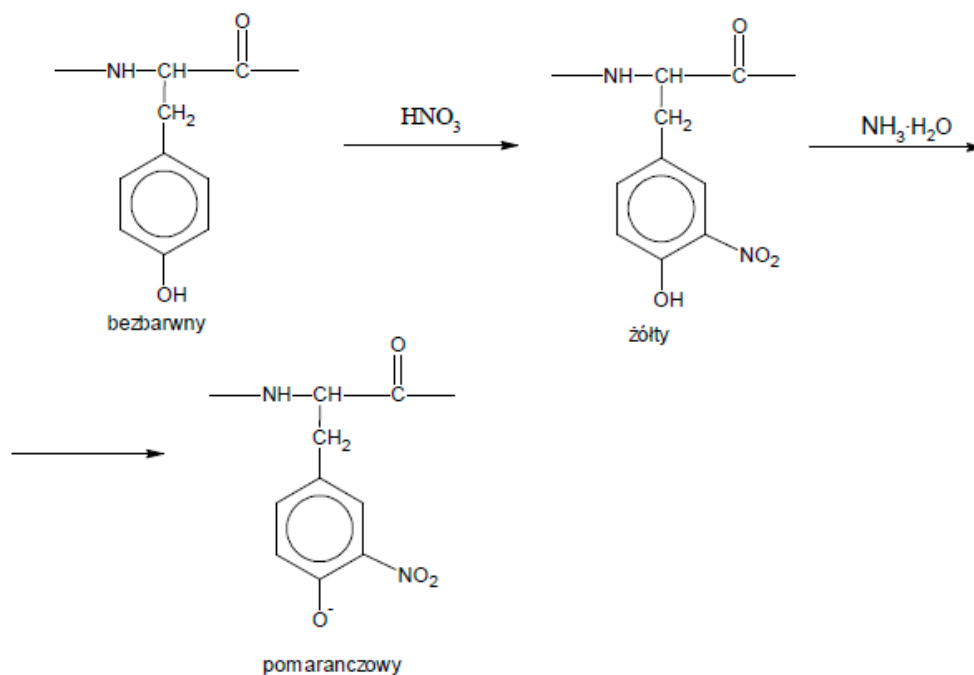


Rysunek 2. Tworzenie kompleksu jonów miedzi (II) z enolową formą wiązania peptydowego

Winian sodowo-potasowy obecny w odczynniku biuretowym, jest czynnikiem kompleksującym, utrzymującym miedź w roztworze, która w środowisku zasadowym mogłaby się wytrącać w postaci wodorotlenku miedziowego. Intensywność powstałego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do ilości wiązań peptydowych i w związku z tym do stężenia oznaczanego białka.

Próba ksantoproteinowa - wykrywanie ugrupowania aromatycznego w aminokwasach obecnych w białku

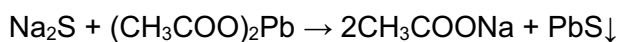
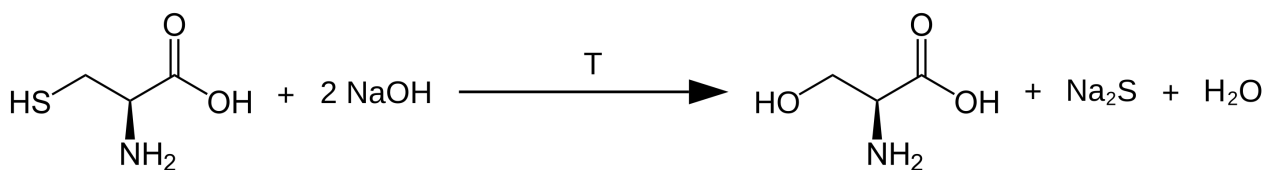
Aminokwasy zawierające pierścień aromatyczny (fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan) pod wpływem stęż. HNO_3 ulegają nitrowaniu (Rys. 3), w wyniku czego powstają pochodne nitrowe o barwie żółtej (próbę tę dają również inne związki aromatyczne, jak fenol, benzen itp.). Po zalkalizowaniu, powstaje sól o barwie pomarańczowej.



Rysunek 3. Reakcja nitrowania aminokwasu aromatycznego (próba ksantoproteinowa) na przykładzie fenyloalaniny

Wykrywanie siarki w aminokwasach – reakcja cystynowa Fola

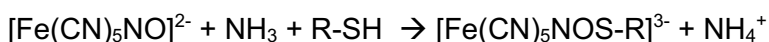
Białka, zbudowane z reszt aminokwasowych zawierających siarkę w grupie hydrosulfidowej: $-\text{SH}$ (cysteina) lub formie wiązania dwusiarczkowego: $-\text{S}-\text{S}-$ (cystyna), podczas ogrzewania w środowisku silnie alkalicznym, ulegają hydrolizie, zaś zawarta w nich siarka ulega uwolnieniu w postaci jonów siarczkowych, które to z jonami Pb^{2+} dają czarny osad PbS . Należy zaznaczyć, że metionina, w której siarka występuje w ugrupowaniu tioeterowym ($\text{C}-\text{S}-\text{C}$) nie daje dodatniego wyniku tej reakcji.



Rysunek 4. Reakcja Fola

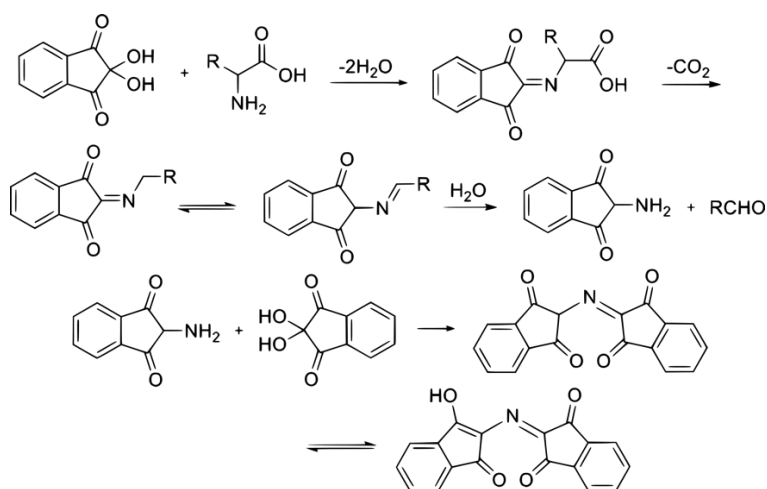
Reakcja z nitroprusydkiem sodu- wykrywanie grup tiolowych w cysteinie

Związki, które zawierają w swej budowie ugrupowania tiolowe, tj. SH, w reakcji z nitroprusydem sodu tworzą kompleksowe połączenia, o czerwono-fioletowym zabarwieniu:



Reakcja ninhydrynowa

Aminokwasy pod wpływem ninhydryny ulegają utlenieniu do iminokwasów. Kolejne etapy przemian to deaminacja i dekarboksylacja oraz wytworzenie aldehydu skróconego o 1 atom węgla. W wyniku kondensacji utlenionej i zredukowanej w powyższym procesie cząsteczki ninhydryny oraz amoniaku powstaje kompleks o fioletowo-niebieskiej barwie (maksimum absorpcji przy $\lambda = 570 \text{ nm}$), którego natężenie jest proporcjonalne do zawartości azotu aminowego aminokwasu. Reakcja z ninhydryną może służyć do ilościowego oznaczania aminokwasów metodą spektrofotometryczną. Dodatni odczyn ninhydrynowy dają obok aminokwasów, peptydów i białek także sole amonowe, aminocukry i amoniak.



Purpura Ruhemanna (ketohydrindylidenodiketohydrindaminian)

Rysunek 5. Mechanizm reakcji ninhydrynowej

Reakcja Libermannna

Reakcją charakterystyczną dla glikoprotein jest tzw. reakcja Libermannna. W trakcie jej przebiegu, podczas ogrzewania ze stężonym roztworem HCl dochodzi do hydrolizy białka, podczas gdy z cukrów powstają pochodne furfuralowe. Te z kolei, z uwolnionymi w czasie hydrolizy fenolami, dają fioletowo zabarwione połączenia.

1.3. Skład chemiczny mleka

Mleko to płynna wydzielina wyspecjalizowanych gruczołów ssaków służąca jako pokarm dla młodych osobników. Skład mleka różnych gatunków zwierząt różni się dość znacznie i został szczegółowo opisany w pozycji 2 spisu literatury. Mniejsze różnice w składzie występują między poszczególnymi rasami i osobnikami. Jest ono źródłem wysokowartościowych białek, łatwo przyswajalnego tłuszczu, soli mineralnych (w tym wapnia, fosforu, potasu) oraz witamin rozpuszczalnych w tłuszczach (A, D, E, K) i w wodzie (z grupy B). Mleko niektórych ssaków nie nadaje się do bezpośredniej konsumpcji przez człowieka, np. mleko fok zawiera 12 razy więcej tłuszczu, a także więcej białka niż mleko krowie. Istotnym składnikiem mleka jest laktoza - disacharyd nadający mleku charakterystyczny słodkawy posmak.

Najczęściej wykorzystywanym przez człowieka jako produkt spożywczy jest mleko krowie. Skład chemiczny mleka krowiego zależy od wielu czynników, jak np. paszy, rasy i wieku zwierzęcia itp. Występują w nim różne składniki (Tabela 1), m.in. substancje mineralne: wapń, fosfor, magnez, chlor, potas, siarka, żelazo i jod. Związki mineralne znajdują się w ilości około 0,7%.

Tabela 1. Skład mleka krowiego (<http://www.nutrilife.pl/index.php?art=25>)

Substancja	Mleko krowie
Białko	3,3 - 4,3 g/100 ml
Tłuszcze	3,9-5,7 g/100 ml
Cukier laktoza	4,5-4,9 g/100 ml
Fosfor	30,7 mmol/l
Wapń	30,11 mmol/l
Ilość kcal/100 ml	61-66 kcal
pH	6,6
Sucha masa	12,6-15,4 g/100 ml

Białka mleka należą do białek pełnowartościowych o wysokiej wartości biologicznej, zawierają bowiem wszystkie aminokwasy egzogenne niezbędne do budowy białka ustrojowego oraz wzrostu człowieka. Pod tym względem ustępują jedynie białku jaja kurzego, będącego „dietetycznym wzorcem”. Doskonale uzupełniają produkty roślinne, jak pieczywo, kasze, maki, warzywa, które zawierają białko niepełnowartościowe. Wartość energetyczna (kaloryczna) mleka - w zależności od zawartości tłuszczu – wynosi około 500 -700 kcal/kg i pokrywa ok. 25% przeciętnego dziennego

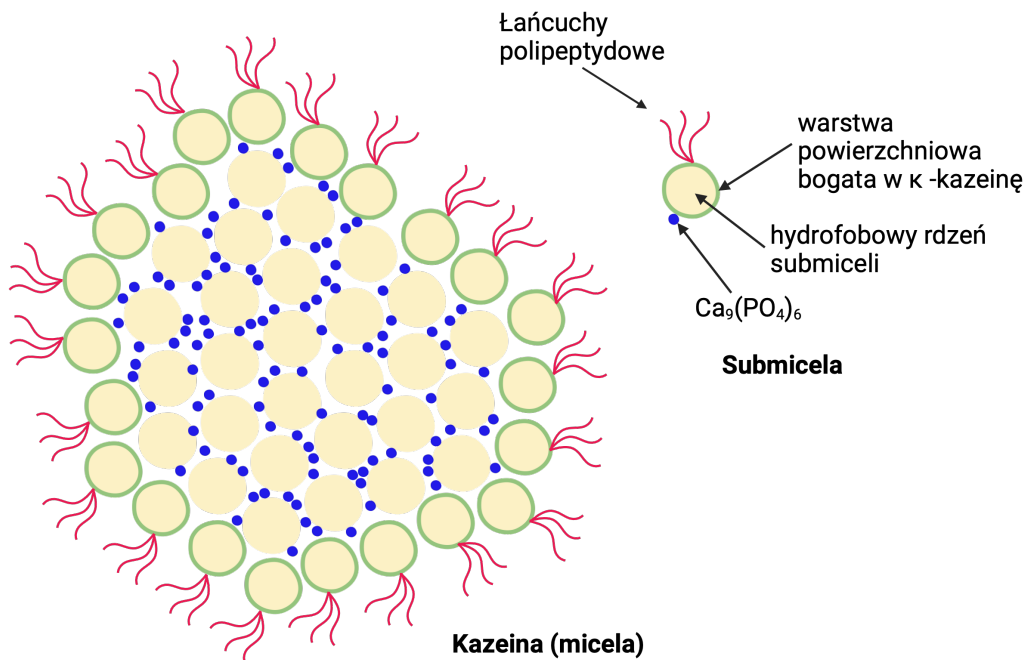
zapotrzebowania człowieka na energię. Jest więc to produkt stosunkowo niskokaloryczny, przy dużej zawartości białka.

Białka mleka dzieli się ze względu na ich budowę, rolę biologiczną i właściwości funkcjonalne na kazeiny, białka serwatki oraz otoczki kuleczek tłuszczowych (Tabela 2).

Tabela 2 Zawartość białek w mleku krowim (<http://www.food-info.net/pl/qa/qa-fp1.htm>)

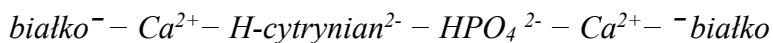
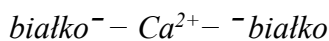
Białko	g/kg białka	Udział w całkowitej zawartości białka
Kazeina		
α -s1-kazeina	10,0	30,6
α -s2-kazeina	2,6	8,0
β -kazeina	10,1	30,8
κ -kazeina	3,3	10,1
Całkowita zawartość kazeiny	26,0	79,5
Białka serwatki		
α -laktoalbumina	1,2	3,7
β -laktoglobulina	3,2	9,8
Albumina surowicy krwi	0,4	1,2
Immunoglobuliny	0,7	2,1
Pozostałe	0,8	2,4
Całkowita zawartość białek serwatki	6,3	19,3
Kuleczki tłuszczowe	0,4	1,2
Całkowita zawartość białka	32,7	100

Kazeiny są heterogeniczną grupą fosfoprotein, złożoną z 20 składników; są to najważniejsze białka mleka krowiego, jego zawartość wynosi 2,4-2,6%. W mleku krowim 40% kazeiny stanowi frakcja α , 30% frakcja β , a dalsze 10% frakcja κ . Kazeiny strącają się z surowego, odtłuszczonego mleka w temp. 20°C przy pH 4,6; w mleku występują w postaci miceli tworzących roztwór koloidalny. Kuliste micelle mają kształt maliny (średnica 20-300 nm), a ich masa micelarna wynosi 107-1010. Micelle posiadają porowatą strukturę i są wyraźnie widoczne pod mikroskopem; cząstki miceli wypełniają mniej niż połowę jej objętości. Taka budowa sprzyja wiązaniu wody, jonów, laktozy i enzymów. W 1 ml mleka jest około $7 \cdot 10^{13}$ miceli, które stanowią łącznie od 5 do 6% objętości mleka. Micelle utworzone są z podjednostek złożonych z 25-30 cząsteczek kazeiny α , β , κ , których domeny hydrofobowe są zwrócone do wnętrza, a hydrofilowe w kierunku rozpuszczalnika (Rys. 6). Podjednostki te, podobnie jak micelle, mają budowę sferyczną, a ich średnica nie przekracza 10-20 nm.



Rysunek 6. Struktura miceli kazeinowej

W miceli podjednostki połączone są mostkami utworzonymi przez jony wapniowe, fosforanowe i cytrynianowe:



Niecała kazeina występuje w mleku w postaci micelarnej, czyli kompleksu fosforokazeinowego. Pewna jej część (do 8-10%) stanowi tzw. kazeinę rozpuszczalną, która występuje w postaci pojedynczych cząsteczek. Pomiędzy kazeiną cząsteczkową i micelarną istnieje stan równowagi, zależny od stężenia jonów wapnia. Wzrost stężenia jonów wapniowych przesuną równowagę w kierunku postaci micelarnej, natomiast gdy stężenie jonów wapniowych maleje, następuje dysocjacja miceli.

Micelle kazeinowe, w świeżym mleku przy pH ok. 6,6 mają ujemny ładunek elektryczny, czyli występuje przewaga zdysocjowanych grup kwasowych nad zasadowymi. Warunkuje to tworzenie się wokół miceli warstw hydratacyjnych o jednoimiennych ładunkach. Warstwy te odpychają się, stabilizując roztwór koloidalny kazeiny.

Micelle kazeinowe cechuje wysoka stabilność podczas ogrzewania świeżego mleka – koagulację cieplną powoduje dopiero długotrwałe ogrzewanie w temp. ponad 100°C. Proces koagulacji kazeiny w mleku można wywołać także wieloma innymi czynnikami:

- Poprzez zakwaszenie mleka do punktu izoelektrycznego, w którym ilość zdysocjowanych grup kwasowych i zasadowych w micelach kazeiny jest jednakowa (w świeżym mleku w temp. 20°C odpowiada wartości pH 4,6). Zakwaszenie mleka może być osiągnięte w wyniku fermentacji mlekowej laktozy, która podczas dłuższego przechowywania mleka pod wpływem bakterii kwasu mlekowego przekształca się w kwas mlekowy. Bezpośrednie dodanie do mleka kwasu mlekowego, siarkowego (VI) czy octowego również powoduje koagulację kwasową kazeiny.
- Dodatek soli metali, takich jak FeCl_3 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, lub wprowadzenie do mleka znacznych ilości soli dysocjujących, np. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , CaCl_2 . Powoduje się wówczas koagulację przez wysalanie.
- Działając na mleko enzymami, np. podpuszczką, chymozyną czy pepsyną. Wytrącanie kazeiny zachodzi na drodze koagulacji enzymatycznej.

Nie wszystkie wymienione metody prowadzą do selektywnego wydzielenia kazeiny. Często temu procesowi towarzyszy wytrącanie się pozostałych białek mleka, np. ogrzewanie mleka w temp. 80°C z wodnym roztworem CaCl_2 pozwala na wytrącenie 90% białek zawartych w mleku w postaci obfitego skrzepu.

Mechanizm kwasowej koagulacji kazeiny można przedstawić w następujący sposób. Przy pH mleka ok. 6,65 ogólny ładunek elektryczny miceli kazeinowych jest ujemny. Otoczone są więc cząsteczkami wody przy czym bieguny dodatnie jej dipoli zwrócone są w kierunku miceli, a ujemne na zewnątrz. W ten sposób micelle otoczone zostają warstwą hydratacyjną o jednoimiennym zewnętrznym ładunku elektrycznym i dlatego wzajemnie odpychają się, co stabilizuje roztwór koloidalny kazeiny, a warstwa hydratacyjna uniemożliwia także bezpośredni kontakt między micelami. Stopień hydratacji miceli zależy m.in. od wartości ich ładunku elektrycznego, Stopień jonizacji tych grup zmienia się przy zmianach wartości pH środowiska. Dodawanie do mleka kwasu octowego do momentu osiągnięcia punktu izoelektrycznego, powoduje utratę przez micelle zdolności wiązania wody, a zatem warstwy hydratacyjne. Siły odpychania między micelami zanikają, następuje wzajemne zbliżenie się w agregaty z wytworzeniem żelu.

Mechanizm koagulacji enzymatycznej kazeiny oparty jest na odłączeniu hydrofilowych fragmentów submicel. Po zewnętrznej części miceli kazeinowej znajdują się submicelle, które charakteryzują się sferycznym nagromadzeniem hydrofilowej frakcji κ -kazeiny (Rys. 6). Skrzep podpuszczkowy powstaje w wyniku odłączenia przez enzym proteolityczny (podpuszczkę) fragmentu κ -kazeiny. Od miceli odłączany jest fragment o silnych właściwościach hydrofilowych,

fragment ten określany jest jako glikomakropeptyd. Fragment κ -kazeiny, który pozostał w submiceli (określany jako para- κ -kazeina) nie posiada właściwości hydrofilowych. W ten sposób micle kazeinowe, po stracie fragmentów hydrofilowych, w efekcie oddziaływań hydrofobowych, łączą się ze sobą dodatkowo tworząc mostki wapniowe. Liczba mostków warunkuje zwięźłość skrzepu, zaś zwiększenie oddziaływań hydrofobowych (związane ze stopniowym traceniem cząsteczek glikomakropeptydu) przyczynia się do separacji serwatki od masy serowej. Na stabilność skrzepu wpływa efektywność enzymatycznego odszczepiania hydrofilowej frakcji κ -kazeiny (glikomakropeptydu) oraz skuteczność tworzenia mostków wapniowych, co w pierwszym przypadku zależy od ilości zdenaturowanej β -laktoglobuliny związanej z κ -kazeiną, w drugim przypadku od zawartości w układzie jonów wapnia.

Białka serwatki

Serwatka, tzw. odciek pozostający po strąceniu kazein z chudego mleka, jest mieszaniną czterech głównych składników stanowiących około 80% frakcji (β -laktoglobuliny, α -laktoalbuminy, immunoglobuliny oraz albuminy osocza) oraz wielu innych występujących w małych ilościach, w tym dużej liczby enzymów. W mleku występują w rozproszeniu i są bardzo trudne do wydzielenia w postaci skrzepu. Białka te nie zawierają fosforu, natomiast są bogate w lizynę. β -Laktoglobulina ulega denaturacji podczas silnego ogrzania, co ma niekorzystny wpływ na wydzielanie skrzepu przy pomocy podpuszczki. α -Laktoalbumina jest bardziej odporna na wysokie temperatury; pasteryzacja (80-90°C) nie powoduje jej koagulacji, stąd pozostaje ona w serwatce. Cząsteczki albuminy osocza w środowisku kwaśnym asocjują. Immunoglobuliny (makroglobuliny) są złożoną mieszaniną białek o dużej masie cząsteczkowej i właściwościach odpornościowych. Pasteryzacja mleka niszczy tę frakcję białek.

W mleku zidentyfikowano około 60 rodzimych enzymów we frakcji kazein, wśród białek serwatki i w białkowej otoczce kuleczek tłuszczowych. Niektóre z nich mają istotne znaczenie w technologii mleczarstwa (m.in. peroksydaza, fosfataza alkaliczna, plazmina, lipazy).

Kazeina wykazuje podobne właściwości chemiczne jak inne białka, dlatego też daje podobne reakcje charakterystyczne na obecność wiązań peptydowych czy pierścieni aromatycznych. Obecność wiązania peptydowego można wykryć za pomocą reakcji biuretovej. Obecność aminokwasów zawierających grupę aromatyczną (fenyloalaninę, tryptofan, tyrozynę) zarówno wolnych, jak i wchodzących w skład peptydów i białek wykrywa się za pomocą reakcji ksantoproteinowej, natomiast obecność wolnych aminokwasów korzystając z reakcji ninhydrynowej.

2. Część eksperymentalna

2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zgłębienie wiedzy na temat właściwości białek obecnych w produktach spożywczych, poznanie wybranych, charakterystycznych reakcji barwnych służących do wykrywania obecności białek w produktach spożywczych oraz poznanie niektórych czynników powodujących wytrącanie kazeiny z roztworu, a także właściwości tego białka poprzez wyznaczenie jego punktu izoelektrycznego, wykrywanie aminokwasów aromatycznych, wolnych aminokwasów oraz jonów wapniowych.

Odczynniki:

- 1 M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)
- 6 M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)
- 10% roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)
- 0,2 M octan sodu (CH_3COONa)
- 2 M kwas octowy (CH_3COOH)
- 1 M kwas octowy (CH_3COOH)
- 0,2 M kwas octowy (CH_3COOH)
- 1 % roztwór glicyny
- 10% wodny roztwór siarczanu miedzi (II) (CuSO_4)
- 0,2 % roztwór CaCl_2
- Nasycony roztwór szczawianu amonu
- Nasycony roztwór siarczanu amonu
- 0,1% roztwór ninhydryny
- Stężony kwas azotowy (V) HNO_3
- Stężony kwas azotowy (V) HCl
- Stężony kwas azotowy (V) H_2SO_4
- 5% wodny roztwór kwasu trichlorooctowego
- etanol

Sprzęt i akcesoria:

- Waga analityczna
- Łopatka do ważenia – 3 szt.
- Statyw do probówek
- Palnik



- Probówki szklane – 25 szt.
- Zlewka poj. 100 ml – 2 szt.
- Łapa do probówek
- Pipety 1 ml – 6 szt.
- Pipety 2 ml – 6 szt.
- Pipety 5 ml – 3 szt.
- Pipety 10 ml – 1 szt.
- Kolba stożkowa 100 ml – 4 szt.
- Kolba stożkowa 200 ml – 5 szt.
- Łapa do kolby stożkowej – 1 szt.
- Kolba ssawkowa próżniowa – 1 szt.
- Pompka wodna – 1 szt.
- Cylinder miarowy 50 ml – 3 szt.
- Cylinder miarowy 100 ml – 1 szt.
- Lejek większy – 3 szt.
- Sączone bibułowe
- Termometr – 1 szt.
- Papierki lakmusowe
- Łażnia z lodem – 1 szt.
- Wrząca łaźnia wodna – 1 szt.
- Płyta grzejna – 1 szt.
- Bagietka szklana – 3 szt.

2.2. Wykrywanie białek – reakcja biuretowa

Analizowane produkty spożywcze:

- Mleko skondensowane
- Mleko sojowe
- Żelatyna
- Białko jaja kurzego
- Roztwór soku z cytryny
- Suplementy białkowe

Wykonanie:

- W przygotowanych probówkach umieścić próbki badanej żywności (w przypadku cieczy ok. 2 ml, w przypadku ciał stałych ok. 0,2 g)
- Do każdej próbki dodać po ok. 2 ml 10% roztworu NaOH
- Zawartość próbek dokładnie wymieszać
- Do każdej badanej mieszaniny wlać po ściance probówki 4 ml 10 % wodnego roztworu CuSO_4
- Probówki odstawić do statywu. Obserwować zmiany.

Jeśli próbka zawierała białko to na granicy faz (badana mieszanina – roztwór CuSO_4) pojawi się fioletowe zabarwienie.

2.3. Badanie odczynu mleka

Analizowane produkty spożywcze:

- Mleko krowie świeże (przechowywane w lodówce)
- Mleko krowie przechowywane w temperaturze pokojowej

Wykonanie:

Papierkiem lakmusowym zbadać odczyn mleka świeżego oraz przechowywanego w temperaturze pokojowej. Porównać wyniki.

2.4. Wytrącanie kazeiny z mleka świeżego

2.4.1. Z użyciem kwasu octowego – CH_3COOH

Proszę nie wyrzucać próbki uzyskanej w eksperymencie 2.4.1 !!!

Do kolby stożkowej 200 ml wlać 25 ml mleka, dodać 25 ml wody o temp. 38°C , a następnie porcjami łagodnie mieszając 1 ml 2 M kwasu octowego. Całość pozostawić na 10 minut, po czym zdekantować ciecz nad osadu przez lejek z sączkiem bibułowym gładkim do drugiej kolby. Osad osuszać między kartkami bibuły **i pozostawić do przygotowania roztworu kazeiny w dalszych etapach ćwiczenia oraz porównania ilości osadu z punktu 2.4.2 oraz 2.4.3.** Pozostała po odsączeniu ciecz nie powinna zawierać kazeiny, może zawierać inne białka takie jak globuliny i albumina (**również pozostawić do dalszych doświadczeń.**)

2.4.2. Z użyciem siarczanu amonu – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Do kolby stożkowej 100 ml wlać 5 ml mleka i dodać 35 ml nasyconego roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Następnie całość pozostawić w łaźni z lodem w temp. 2°C do wytrącenia kazeiny, po czym

zdekantować ciecz znad osadu przez lejek z sączkiem bibułowym gładkim do drugiej kolby poj. 100 ml. Pozostawić osad do porównania względem innych metod strącania. Niewielką ilość osadu pobrać do kolby poj. 100 ml, dodać nadmiar wody w celu sprawdzenia czy reakcja jest odwracalna i osad ulega rozpuszczeniu.

2.4.3. Z użyciem chlorku wapnia – CaCl_2

Do kolby stożkowej 200 ml wlać 25 ml mleka, ogrzać je do temp 80°C , a następnie dodać porcjami łagodnie mieszając 25 ml 0,2% roztworu CaCl_2 . Całość pozostawić na 10 min, po czym zdekantować ciecz znad osadu przez lejek z sączkiem bibułowym gładkim do drugiej kolby poj. 200 ml. Kazeina w tym przypadku wytrąca się w postaci ko-precypitatu z białkami serwatkowymi. Pozostawić osad do porównania względem innych metod strącania. Niewielką ilość osadu pobrać do kolby poj. 100 ml, dodać nadmiar wody w celu sprawdzenia czy reakcja jest odwracalna i osad ulega rozpuszczeniu.

2.5. Denaturacja białek obecnych w żywności

Analizowane produkty spożywcze:

- białko jaja kurzego

Należy przygotować 50 ml 1% wodnego roztworu białka jaja kurzego.

2.5.1. Denaturacja z użyciem kwasów nieorganicznych i organicznych (POD DYGESTORIUM)

Do czterech probówek wlać po ok. 1 ml 1% wodnego roztworu białka jaja kurzego i następnie dodać ostrożnie, po ściance, unikając zmieszania, odpowiednie kwasy wg poniższej tabeli. Sprawdzić, czy na granicy obu faz tworzy się biały pierścień wytrąconego białka. Zapisać obserwacje. Następnie każdą probówkę ostrożnie wstrząsnąć.

Tabela 3. Zawartość probówek w doświadczeniu 2.5.1 oraz obserwacje

Składnik	Numer próbówki				
	1	2	3	4	5
1% roztwór białka	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
HCl st.	0,5 ml	-	-	-	-
HNO_3 st.	-	0,5 ml	-	-	-
H_2SO_4 st.	-	-	0,5 ml	-	-
5% TCA	-	-	-	kroplami	-
Osad (biały pierścień)					
Obecność osadu po wstrząsaniu					

Po zmieszaniu obu warstw wytrącone, zdenaturowane białko rozpuszcza się w nadmiarze stężonego kwasu solnego i siarkowego (sole białek z tymi kwasami silnie dysocjują), nie rozpuszcza się natomiast w nadmiarze kwasu azotowego oraz kwasu trichlorooctowego (TCA). Dzięki temu TCA są stosowane m.in. do odbiałczania płynów biologicznych.

2.5.2. Denaturacja alkoholem

Do probówki z korkiem wlać ok. 1 ml roztworu białka jaja kurzego i stopniowo dodać 1 ml etanolu, wstrząsnąć i odstawić. Zaobserwować czy wytrąca się osad. Następnie dodać 10 ml wody i ocenić odwracalność reakcji (czy osad się rozpuszcza).

2.5.3. Denaturacja termiczna

Do probówki z korkiem wlać ok. 1 ml roztworu białka jaja kurzego i ogrzać w płomieniu palnika. Zaobserwować czy wytrąca się osad. Następnie dodać 10 ml wody i ocenić odwracalność reakcji (czy osad się rozpuszcza).

2.6. Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny

2.6.1. Przygotowanie roztworu kazeiny

Do kolby stożkowej 100 ml odważyć 1 g wytrąconej w punkcie 2.4.1 kazeiny i dodać 50 ml wody ogrzanej do temp 40 °C oraz 4 ml 1 M NaOH. Po rozpuszczeniu kazeiny roztwór zobojętnić wobec papierka lakmusowego dodając 4 ml 1 M kwasu octowego.

2.6.2. Wyznaczanie punktu izoelektrycznego kazeiny

W 6 probówkach sporządzić roztwory buforu octowego o pH wzrastającym od 3,6 do 5,6 według tabeli zamieszczonej poniżej.

Tabela 4. Sporządzenie roztworów buforu octowego o pH wzrastającym od 3,6 do 5,6

Odczynniki, odczyn i obserwacje	Numer probówki					
	1	2	3	4	5	6
0,2 M kwas octowy [ml]	4,6	4,1	3,0	2,0	1,0	0,5
0,2 M octan sodu [ml]	0,4	0,9	2,0	3,0	4,0	4,5
pH	3,6	4,0	4,4	4,6	5,2	5,6
Ocena obfitości osadu (-), (+), (++) , (+++)						

Po wymieszaniu, do każdej probówki dodać 1 ml przygotowanego roztworu kazeiny, dokładnie wymieszać i pozostawić na 40 min. Po tym czasie obejrzeć roztworu w probówkach i wpisać wyniki do tabeli, pamiętając, że punktowi izoelektrycznemu kazeiny odpowiada pH, przy którym

występuje najbardziej obfity osad. Brak osadu oznaczyć znakiem minus (-), osad słabo obfity znakiem plus (+), osad średnio obfity znakiem (++), osad bardzo obfity znakiem (+++).

2.7. Wykrywanie wapnia w kazeinie

Do jednej probówki odmierzyć 1 ml roztworu kazeiny, do drugiej 1 ml **cieczy pozostałej po odsączeniu kazeiny w punkcie 2.4.1** i dodać po 1 ml nasyconego roztworu szczawianu amonu. O obecności wapnia świadczy wytrącanie się białego osadu szczawianu wapnia $(\text{COO})_2\text{Ca}$.

2.8. Reakcje charakterystyczne dla białek

2.8.1. Wykrywanie aminokwasów aromatycznych - reakcja ksantoproteinowa (POD DYGESTORIUM)

Do probówki odmierzyć 1 ml roztworu kazeiny, dodać 1 ml stężonego kwasu azotowego (V) i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 5 min. Ostudzić i dodać stopniowo 3,5 ml 6 M NaOH – **ostrożnie!**

2.8.2. Wykrywanie wolnych aminokwasów – reakcja ninhydrynowa

Przygotować 2 probówki. Do pierwszej wlać 1 ml roztworu kazeiny, do drugiej 1 ml roztworu glicyny. Następnie do probówek dodać po 1 ml 0,1% roztworu ninhydryny i ogrzewać mieszaninę we wrzącej łaźni wodnej przez 3 minuty. Zapisać obserwacje i wnioski. Jeśli bezbarwny roztwór zyskuje niebiesko-fioletowe zabarwienie, to badana substancja zawiera wolne aminokwasy.

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Sprawozdanie z ćwiczenia powinno zawierać:

- Stronę tytułową
- Cel i zakres ćwiczenia
- Schemat wykonanych eksperymentów
- Otrzymane wyniki
- Dyskusję i wnioski w oparciu o literaturę
- Spis literatury

4. Literatura

1. Górską Agata, Łobacz Marta, Ćwiczenia laboratoryjne z chemii żywności Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2009.
2. Koperwas Lidia, Reakcje wykorzystywane do wykrywania wybranych aminokwasów i białek. Dostęp on-line: <http://laboratoria.net/arttykul/14248.html> (dostęp 20.11.2024).
3. Sikorski Zdzisław E. Chemia Żywności, Wyd. 6, WNT, Warszawa, 2012
4. Kumirska Jolanta, Gołębiowski Marek, Paszkiewicz Monika, Bychowska Anna, Analiza żywności, skrypt elektroniczny dla studentów Ochrony Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 2010, ISBN 978-83-7326-711-4, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.
5. Rutkowska Jarosława, Przewodnik do ćwiczeń z chemii żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2008.
6. Ziajka Stefan, Mleczarstwo: zagadnienia wybrane. Wydawnictwo ART, Olsztyn, 1997.
7. Jurczak M.E. Mleko – produkcja, badanie, przerób. Wyd. 2 popr. i uzup. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 1997.
8. Opracowanie Zakładu Biochemii, Katedry Biochemii i Fizjologii Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pt. „Właściwości fizykochemiczne białek” 10.02.2012