**Лабораторна робота № 8**

**Тема:** Приготування розчинів білків.

**Мета:** Ознайомити студентів з основними хімічними методами добування білків.

**Хід роботи:**

**Дослід 1. Приготування розчинів білків для проведення реакцій.**

**а) Нерозбавлений білок курячого яйця.**

Відокремлюють білок трьох курячих яєць від жовтків. Вважаючи, що маса білка в одному яйці в середньому дорівнює 33 г, одержують близько 100 мл нерозбавленого розчину білків курячого яйця. Цей розчин містить 88% води, 1% вуглеводів і 0,5% мінеральних речовин; інше припадає на білок. Таким чином, отриманий нерозбавлений білок курячого яйця являє собою приблизно 10%-ний розчин білка.

**б) Розведений розчин яєчного альбуміну.**

Білок одного курячого яйця після відділення від жовтка добре збивають і потім змішують у колбі при струшуванні з десятикратним об’ємом дистильованої води. Розчин фільтрують через подвійний шар змоченої водою марлі чи шматок випраної полотнини, поміщених у лійку. Відфільтровують розчин яєчного альбуміну; в осаді залишається яєчний глобулін. З огляду на те, що концентрація альбуміну в білку курячого яйця складає близько 6%, отриманий розведений розчин яєчного альбуміну є приблизно 0,5%-ним.

**в) Білки м'яса.**

Поміщають у склянку 40–50 г пропущеного через м'ясорубку знежиреного м'яса, додають 80–100 мл 10%-ного розчину хлориду натрію і залишають суміш стояти 15–20 хв. при частому помішуванні. Відфільтровують через паперовий складчастий фільтр чи через подвійний шар марлі. У розчині міститься головним чином м'язовий альбумін і глобулін.

**г) Білки молока.**

До 50 мл свіжого молока додають рівний об’єм насиченого розчину сульфату амонію. При цьому випадають в осад глобуліни і казеїн. Відфільтровують через складчастий паперовий фільтр розчин альбумінів.

**д) Рослинний альбумін.**

25 г. пшеничного борошна змішують з 100 мл дистильованої води і суміш струшують протягом 1 години. Розчин центрифугують і надосадову рідину фільтрують через складчастий фільтр. Відфільтрований прозорий розчин містить переважно альбуміни пшеничних зерен.

**Дослід 2. Розділення альбумінів і глобулінів методом діалізу і висолювання.**

**а) Отримання сольової витяжки білка.**

***Принцип.*** Альбуміни і глобуліни є найбільш поширеними в природних об'єктах білками. За звичай вони зустрічаються разом, і відділення їх один від одного основане на різній їх розчинності у воді і різній здатності до висолювання мінеральними солями.

Альбуміни розчинні у воді і в концентрованих розчинах солей (осідають лише при більш ніж 50%-ному насиченні розчину сіллю), а глобуліни розчинні тільки в розчинах солей середньої концентрації (8 – 15%-них). В розчинах з більш високою

і більш низкою концентрацією солі розчинність глобулінів зменшується.

*Устаткування та реактиви.* Ступка фарфорова; воронка скляна; стакан скляний лабораторний з носиком на 1 л; колодієвий мішечок для діалізу; марля; фільтри паперові; хлорид натрію (10%-ний); нітрат срібла (1%-ний); сульфат амонію; гідроксид натрію (10-ний); сульфат міді (1%-ний); сульфат амонію (насич.); м'язова тканина.

***Хід роботи.*** 10 г подрібненої (пропущеної через м'ясорубку) м'язової тканини розтирають при помішуванні в ступці протягом 10 – 15 хвилин з 40 – 50 мл 10%-ного розчину хлориду натрію. Утворюється однорідна напіврідка маса, яку фільтрують через подвійний шар марлі. Перші каламутні краплі фільтрату зливають знову на фільтр і повторно фільтрують до отримання фільтрату без зважених частинок. Фільтрування йде повільно. Одержують близько 15 – 20 мл прозорого опалесціюючого забарвленого в рожево-червоний колір розчину. В отриманій сольовій витяжці білка містяться глобуліни і альбуміни, які далі розділяють методом діалізу або висолювання.

**б) Діаліз сольової витяжки м'язової тканини.**

***Принцип.*** Метод діалізу оснований на нездатності великих білкових частинок проникати крізь пори напівпроникних перетинок (штучні колоїдні і целофанові мембрани, природні тваринні і рослинні перетинки), тоді як інші молекули і іони легко проходять через них. Методом діалізу користуються для очищення розчинів високомолекулярних сполук від солей та інших речовин. Білковий розчин, очищений цим методом, називається діалізованим.

*Устаткування та реактиви.* Прилади, які використовуються для діалізу, називаються діалізаторами. Найпростішим діалізатором може бути мішечок целофану або колодію, поміщений в стакан з дистильованою водою. Для більш повного і швидкого здійснення діалізу вода в стакані повинна бути проточною або періодично замінюватися новою.

***Хід роботи.*** Вирізують з целофану круг діаметром 9 – 12 см. Складають його у формі мішечка, вставляють в отвір скляну трубку (завдовжки 5 – 6 см і діаметром 0,5 – 0,8 см) так, щоб верхній кінець трубки виступав з мішечка на 2 – 3 см, а нижній був занурений всередину на 1/3 мішечка. Мішечок туго зав'язують на трубці шнурком. До роботи діалізатор слід зберігати наповненим водою і зануреним за допомогою тримача для пробірок в стакан з водою. Мішечок повинен бути підвішений так, щоб він не торкався стінок і дна стакана. Перед роботою воду з діалізатора виливають.

За допомогою воронки з тонко відтягнутим кінцем вливають в діалізатор 10 мл (не більше половини об'єму мішечка) отриманого фільтрату сольової витяжки і занурюють мішечок в літровий стакан з дистильованою водою. Через 5 – 10 хвилин відбирають піпеткою деяку кількість води із стакана і переконуються в наявності там хлорид-іонів (реакція з розчином нітрату срібла) і у відсутності білка (біуретова або міллонова реакція на білки). Змінивши воду в стакані, якщо реакція на хлорид-іони яскраво була виражена, продовжують діаліз, час від часу перевіряючи реакцію на хлорид-іони і білок і міняючи воду через кожні 5 – 10 хвилин.

Через 1,5 – 2 години проба на хлорид-іони стає негативною або дуже слабою.

Це свідчить про завершення діалізу, тобто про майже повну дифузію солі з діалізатора в зовнішній розчинник. У мішечку до цього часу прозорий раніше фільтрат каламутніє, унаслідок випадання в осад глобулінів, нерозчинних в дистильованій воді.

Мішечок виймають із стакана і вміст його фільтрують через паперовий фільтр. На фільтрі залишаються глобуліни, у фільтрат переходять альбуміни. Проробляють біуретову реакцію і доводять наявність обох білків в осаді і фільтраті.

Для осадження альбумінів до фільтрату додають порошкоподібний сульфат амонію до насичення розчину. За таких умов альбуміни випадають в осад. Останній фільтрують через сухий паперовий фільтр. При повному насиченні сульфатом амонію в розчині не залишається білка в чому можна переконатися, провівши біуретову реакцію на білки з невеликою порцією фільтрату.

**в) Висолювання м'язових білків**.

***Принцип.*** Розділення білків сольової витяжки здійснюють також методом висолювання, який оснований на здатності альбумінів і глобулінів осідати при різній концентрації солей.

***Хід роботи.*** До сольової витяжки, отриманої з м'язової тканини, додають рівний об'єм насиченого розчину сульфату амонію. Випадає осад глобулінів. Розчин фільтрують і фільтрат насичують, додаючи сульфат амонію. Випадає осад альбумінів.