

I. ТЕМА: Киселинна хидролиза на белтъци. Определяне на аминен азот по метода на Съорензен

II. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТ

Белтъчните вещества са биополимери, построени от голям брой α -аминокиселинни остатъци. В състава им участват около 20 α -аминокиселини, чието съчетание и подреждане обуславя богато разнообразие на природните белтъци.

Белтъчните вещества се разделят на протеини и протеиди. Първите се състоят само от α -аминокиселини, свързани чрез пептидна връзка, а вторите съдържат и други небелтъчни вещества, като въглехидрати, липиди, нуклеинови киселини и други.

При хидролиза на белтъчните вещества става разкъсване на пептидните връзки с присъединяване на вода. В началото на процеса се образуват високомолекулни продукти – пептони, които допълнително се разграждат до полипептиди, пептиди и аминокиселини.



K₁ K₂ K₃



K₁ K₂ K₃

Пълно разграждане на белтъчните вещества до аминокиселини се постига при хидролизата им с 6nHCl при 105°C в продължение на 24 часа при което почти напълно се разгражда триптофанът.

Чрез вариране на условията за хидролиза – температура, време, конц. на киселината – се променя и степента на разграждане на белтъците. Тя се контролира по нарастване количеството на свободните аминокрупи, чрез определяне на аминния азот, по метода на Съорензен.

III. НЕОБХОДИМИ ПРИБОРИ И РЕАКТИВИ:

1. Разтвор на яйчен белтък – белтъците на 2 яйца се разтварят в 1 л. дестилирана вода и се филтруват. Може да се използва и разтвор на казеин – 2 % разтвор във буфер с рН₈.

2. Конц. HCl

3. Облодънна колба от 250 мл.

4. Обратен хладник

5. Пипети от 10 мл.

6. Ерленмайерови колби 100 мл. – 2 бр.

IV. НАЧИН НА РАБОТА

1. В облодънна колба от 250 мл. се поставят 100 мл. от белтъчния разтвор и 25 мл. конц. HCl. След разбъркване на сместа до хомогенизиране се вземат две проби по 10 мл. в ерленмайерови колби от 100 мл. за определяне на аминния азот. Колбата се свързва с обратен хладник и внимателно се загрява при слабо кипене в продължение на 2 часа. Степента на хидролиза на белтъка се контролира като през 40 мин. се вземат проби от 10 мл. хидролизат и се определя качеството на аминния азот в него по метода на Съорензен.

Продължителност на хидролизата /мин/

0

40

80

120

Аминен азот в 10 мл. хидролизат /мг/

2. Принцип на метода на Съорензен

- Определянето на аминните и карбоксилни групи в аминокиселините е свързано с големи трудности, поради амфотерния характер на тези съединения. Във воден разтвор те образуват вътрешно молекулни соли, поради което едно директно титруване на разтвора е невъзможно. Формалдехидът има способността да се свързва с аминокрупите, при което аминокиселините и белтъците губят основните си свойства и карбоксилните им групи могат свободно да бъдат титрувани с основа и от там по косвен начин да се определя и количеството на аминокрупите, респ. на аминния азот.

- Прибори и реактиви:

1. Формалин, неутрален по фенолфталеин
2. 10 % разтвор на NaOH
3. 0,1 n разтвор на NaOH
4. 0,1 % воден разтвор на неутрално червено
5. 1 % разтвор на фенолфталеин в 60° етанол
6. Бюрета от 10 или 25 мл. – 2 бр.

7. Цилиндър 10 мл.

Ход на определянето:

2.1. Титруване на водни разтвори на аминокиселини

20 мл. от изследвания разтвор се неутрализира с 0,1 nNaOH при индикатор неутрално червено до оранжево оцветяване. Прибавят се 10 мл. неутрален формалин, при което разтворът придобива интензивно малинов цвят, поради киселия характер на образувалите се метиленаминокиселини. Неутрализирането на пробата с 0,1 nNaOH продължава при индикатор фенолфталеин, като цветът ѝ от розов преминава в оранжев, жълт и накрая става отново розов. Отчита се количеството на изразходвания разтвор NaOH след прибавяне на формалина. Аналогично се разработва и контролна проба с 20 мл. дестилирана вода.

2.2. Титруване на кисели хидролизати

Към 10 мл хидролизат се прибавят 1-2 капки неутрално червено и се неутрализира с 10 % разтвор на NaOH до жълто оцветяване. Прибавят се 1-2 капки конц. HCl, докато разтворът придобие отново розов цвят, след което се титрува с 0,1 nNaOH до оранжево оцветяване. След прибавяне на 10 мл. формалин и няколко капки фенолфталеин, пробата се титрува с 0,1 nNaOH, като се отчита нейното количество. Контролната проба се изпълнява с 10 мл. вода както в т.2.1.

V. ИЗЧИСЛЕНИЯ:

Аминният азот се определя по формулата

$N=(a-b).F.1,4\text{mg}$, където:

a – мл. 0,1 n разтвор на NaOH, изразходвани за титруване

b – мл 0,1 n разтвор на NaOH, изразходвани за титруване на контролната проба

F – фактор на разтвора на NaOH

1,4 – мг аминен азот, които съответстват на 1 мл 0,1 n разтвор на NaOH