



OSNOVNA ŠOLA PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO

PODRUŽNIČNA ŠOLA DEBRO

RAZISKAVA UPORABE BIURETSKEGA REAGENTA IN KSANTOPROTEINSKE REAKCIJE ZA DOKAZOVANJE PROTEINOV V REALNIH VZORCIH

(RAZISKOVALNO DELO)

AVTOR: Ana Zabret

RAZRED: 9.

MENTORJA: Marko Jeran, kem. teh.

Milena Žohar, prof. kem. in biol.

KRAJ IN ŠOLSKO LETO: Laško, 2012/2013

Zahvaljujem se mentorjema Marku Jeranu in prof. Mileni Žohar za mentorstvo, pomoč ter napotke pri pisanju raziskovalnega dela. Hvala vama za čas, ki sta mi ga namenila. Vedno sta bila na razpolago, ko sem imela kakšne nejasnosti, za kar se vama še enkrat zahvaljujem.

Zahvaljujem se tudi šoli in ravnateljici ga. Ljudmili Pušnik, ki mi je omogočila sredstva in prostor za izvedbo raziskovalnega dela.

Hvala učiteljici slovenščine Dragici Brinovec za lektoriranje.

Hvala Blanki Gorišek za ponujeno pomoč in nasvete.

Vsakemu posebej še enkrat hvala.

KAZALO VSEBINE:

1. POVZETEK.....	6
2. UVOD	7
2.1 METODE DELA.....	7
3. TEORETIČNI DEL	8
3.1 AMINOKISLINE	9
3.2 PROTEINI.....	11
3.3 METODE DOKAZOVANJA IN DOLOČANJA PROTEINOV	14
3.4 BIURETSKI TEST	15
3.5 KSANTOPROTEINSKA REAKCIJA.....	16
3.6 MODELNI REALNI VZORCI PROTEINOV	16
3.7 HIPOTEZA.....	17
4. EKSPERIMENTALNI DEL	18
4.1 UVOD V EKSPERIMENTALNI DEL	19
4.2 MATERIALI IN UPORABLJEN INVENTAR.....	19
4.3 REAGENTI	20
4.4 PREGLED DELOVANJA BIURETSKEGA REAGENTA IN KSANTOPROTEINSKE REAKCIJE NA VZORCIH VSAKDANJE RABE	20
4.5 VPLIV DELOVANJA ENCIMA BROMELAINA NA POTEK HIDROLIZE BELJAKOVIN.....	20
4.6 DOKAZ BELJAKOVIN OB SPREMEMBI POGOJEV NA MODELNEM VZORCU MLEKA.....	21
4.7 DOKAZ BELJAKOVIN V VZORCU ODPADNE VODE.....	22
5. REZULTATI IN DISKUSIJA.....	23
5.1 OPAŽANJA.....	24
5.2 REZULTATI MERITEV	24
5.2.1 PREGLED DELOVANJA BIURETSKEGA REAGENTA IN KSANTOPROTEINSKE REAKCIJE NA VZORCIH VSAKDANJE RABE	24
5.2.2 VPLIV DELOVANJA ENCIMA BROMELAINA NA POTEK HIDROLIZE BELJAKOVIN.....	26
5.2.3 DOKAZ BELJAKOVIN OB SPREMEMBI POGOJEV NA MODELNEM VZORCU MLEKA.....	28
5.2.4 DOKAZ BELJAKOVIN V VZORCU ODPADNE VODE.....	29
6. ZAKLJUČEK.....	30
7. LITERATURA	31
8. DODATEK	33

8.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ.....	34
--	----

KAZALO TABEL:

Tabela 1: Kvaliteta proteinov izračunana s pomočjo PDCAAS. Če dobljeno vrednost pomnožimo s količino proteinov v hrani, dobimo vrednost EE, torej vrednost dejanske vsebnosti proteinov [1]	14
Tabela 2: Prikaz dokaza s pomočjo biuretskega reagenta in ksantoproteinske reakcije na vzorcih vsakdanje rabe	25
Tabela 3: Prikaz rezultatov delovanja encima bromelaina na potek hidrolize beljakovin	26
Tabela 4: Prikaz delovanja encima bromelaina na potek hidrolize beljakovin po 1440 min	27
Tabela 5: Prikaz beljakovin ob spremembi pogojev na modelnem vzorcu mleka	28
Tabela 6: Prikaz beljakovin v vzorcu odpadne vode	29
Tabela 7: Piktogrami ter H in P stavki [19]	34

KAZALO SHEM:

Shema 1: Shema 1: Prikaz aminske in karboksilne skupine na primeru splošne aminokislina [2].....	9
Shema 2: Delitev beljakovin glede na njihovo zgradbo in lastnosti [2]	13
Shema 3: Dokazni kompleks pri biuretskem testu z nastankom peptidne vezi [3]	15

KAZALO SLIK:

Slika 1: Strukturne formule 20 aminokislin [18]	10
Slika 2: Prikaz ksantoproteinske reakcije (pred in po dodatku nitrinega sredstva, ki povzroči spremembo barve) [2]	16

1. POVZETEK

V raziskovalnem delu smo preučevali vpliv okoljskih pogojev na dokaz beljakovin s pomočjo biuretskega testa in ksantoproteinske reakcije. Dokazni metodi sta hitri in enostavni za uporabo ter dajeta dovolj nazorne rezultate pri vzorcih, ki vsebujejo večjo količino beljakovin. Pokazali smo tudi, da pri hidrolizi beljakovin nastajajo aminokislina, ki smo jih s tovrstnima tehnikama določili. Eksperimentalno delo smo usmerili v vzorce vsakdanje rabe, študirali pa smo vpliv pogojev (temperatura, staranje) na modelnih primerih ananasa, mleka in odpadne vode. Dokazni reakciji lahko uporabimo pri analizi beljakovin ekoloških (odpadne vode) in bioloških vzorcih (vsebujejo biološko-aktivne molekule in se nahajajo v živih bitjih). Dokazni reakciji sta primerni za vzorce, ki vsebujejo večjo količino proteinov, v nizkih koncentracijah se biuretski test in ksantoproteinska reakcija izkažeta kot neuporabni, saj ne dajeta zadovoljivih rezultatov.

Ključne besede: biuretski reagent, ksantoproteinska reakcija, dokaz, biološki in ekološki vzorci, proteini, aminokislina.

2. UVOD

Aminokislina imajo sposobnost vgrajevanja v kompleksnejše molekule, in sicer proteine. Dejstvo je, da je vsak protein, tako v majhni bakteriji kakor tudi v najkompleksnejšem organizmu, sestavljen iz osnovnega nabora dvajsetih preprostih molekul aminokislin. Aminokislina so tako nepogrešljivo vpletene v skoraj vse procese, ki potekajo v kateremkoli živem bitju. Nujno potrebne so za pravilno rast ter razvoj našega telesa, vključujejo se v številne reakcije ter med drugim nastopajo kot ključni elementi imunskega odgovora na vdor tujkov v naše telo.

V raziskovalnem delu smo se osredotočili na dokazne reakcije proteinov v vzorcih. Dokazne reakcije, ki smo jih izvajali so temeljile na obarvanosti raztopine oz. oborine. To vrstne študije smo izvajali z biuretsko in ksantoproteinsko reakcijo. Dokazni reakciji sta hitri in enostavni za izvedbo v osnovnih šolah.

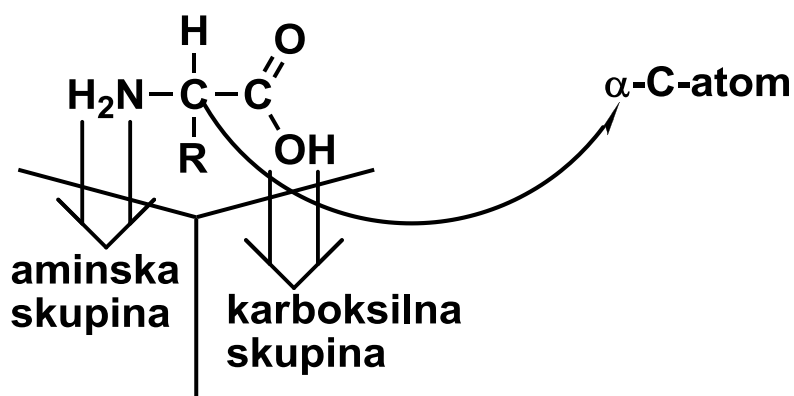
2.1 METODE DELA

Poskusi so bili opravljeni v šolskem laboratoriju. Opremo in vsa delovna sredstva je zagotovila šola. Nekatere izmed uporabljenih kemikalij so bile strupene in tudi zdravju škodljive, zato smo z njimi ravnali v skladu s predpisi o tovrstnih snoveh. V laboratoriju smo imeli na voljo vsa zaščitna sredstva, pri samem delu pa smo upoštevali pravila za varno delo. Vse odpadke smo zbirali v posebnih posodah in jih po potrebi ustrezno nevtralizirali ter oddali pristojnim službam.

3. TEORETIČNI DEL

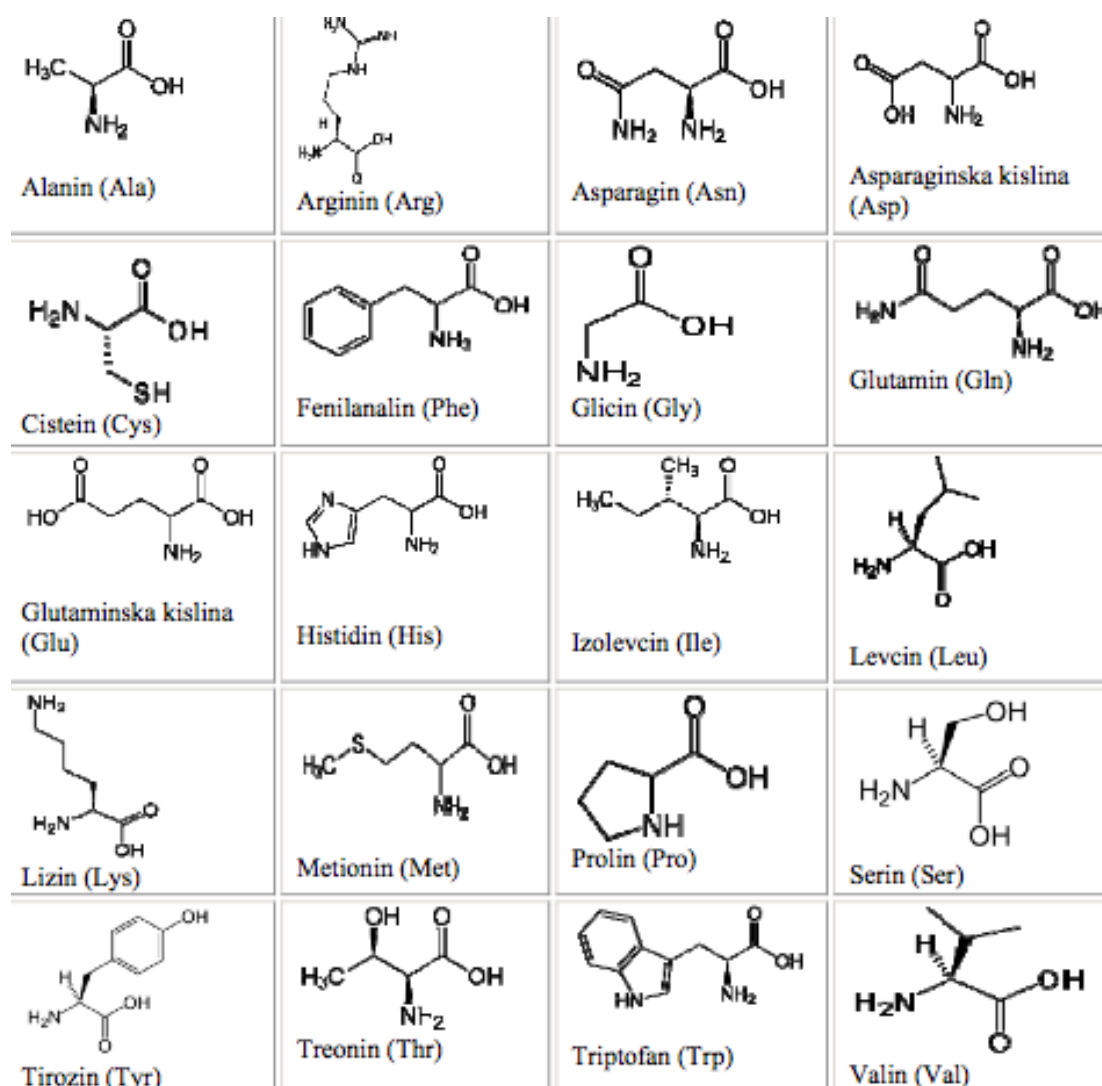
3.1 AMINOKISLINE

Aminokislina so razgibana skupina molekul, ki so udeležene v številnih procesih, pomembnih za normalno delovanje človeškega telesa. Mednje v širšem pomenu uvrščamo vse organske molekule, ki imajo v svoji strukturi vsaj eno karboksilno ter amsko skupino. Tej definiciji ustreza več sto spojin, ki jih posledično uvrščamo med aminokislina. Ime aminokislina v ožjem pomenu besede uporabljamo kot okrajšava za skupino α -amino karboksilnih kislin. Med te uvrščamo dvajset najpomembnejših aminokislin, ki imajo sposobnost vgradnje v proteine, zato jih imenujemo tudi proteinogene aminokislina. K tem 20 aminokislinam po nekaterih novejših študijah dodajajo še dve atipični aminokislina, in sicer selenocistein ter pirolizin. Selenocistein je znan dalj časa ter je pomemben sestavni del nekaterih encimov, (glutation peroksidaza) medtem, ko najdemo pirolizin v (monometil amin transferazah) arheobakterij. α -aminokislina imajo na centralnem α -ogljikovem atomu vezano tako amino ($-\text{NH}_2$) kakor tudi karboksilno skupino ($-\text{COOH}$). Na centralni ogljikov atom sta vezana še vodik ter skupina R, ki jo imenujemo tudi stranska veriga. Narava stranske verige, ki variira od enostavnega vodikovega atoma pa vse do kompleksnega obroča, določa specifične kemijske in biološke lastnosti vsake posamezne aminokislina [2].



Shema 1: Shema 1: Prikaz aminske in karboksilne skupine na primeru splošne aminokislina [2]

Poleg α -aminokislin poznamo še številne druge, prav tako zelo pomembne aminokislina, kot so hidroksiprolin, hidroksilizin, ter ne nazadnje GABA (γ -amino butirna kislina), ki je eden najpomembnejših inhibitornih živčnih prenašalcev v našem telesu.



Slika 1: Strukturne formule 20 aminokislin [18]

Za vseh 20 α -aminokislin je značilno, da so v čisti obliki bele kristalinične snovi z visokim tališčem. Topne so v vodi in netopne v organskih topilih, njihove vodne raztopine pa prevajajo električni tok. Takšen nabor lastnosti je značilen za spojine v ionski obliki, kar nam nakazuje ionski značaj aminokislin.

Znano je, da vsi živi organizmi niso sposobni sintetizirati vseh 20 proteinogenih aminokislin, ki so nujne za ustrezno sintezo proteinskih molekul. Celice v človeškem telesu lahko v različnih procesih sinteze aminokislin sintetizirajo samo 11 α -aminokislin, ki jih imenujemo neesencialne aminokisliline. Preostalih

aminokislin naše telo ni sposobno sintetizirati, zato jih moramo zaužiti s hrano oz. v obliki raznih prehranskih dopolnil. To podskupino imenujemo esencialne aminokislino, saj je njihov zadosten vnos v telo nujen za njegovo normalno delovanje. Druga razvrstitev aminokislin temelji na fizikalno – kemijskih lastnostih α -aminokislin, ki jih določa predvsem stranska veriga vsake posamezne aminokislino. Stranske verige se med seboj razlikujejo po velikosti, polarnosti, kemijski reaktivnosti ter naboju. Izmed teh lastnosti je za razvrstitev najpomembnejša polarnost, pri čemer ta variira od popolnoma hidrofobnih do izrazito hidrofilnih. Aminokislino tako na osnovi lastnosti R- skupine razvrstimo v 5 večjih skupin [18], in sicer:

- **aminokislino z nepolarnimi stranskimi skupinami**, katere so alifatske ali aromatske, za njih pa je značilna tudi nizka reaktivnost (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp). Nahajajo se v notranjosti proteina stran od vodne faze.
- **aminokislino s polarnimi in nenabitimi stranskimi skupinami**, ki se nahajajo na površini proteinov (Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln).
- **aminokislino s polarnimi in nabitimi skupinami verigami pri fiziološkem pH**, pri katerih so lahko stranske skupine kisle ali bazične. Nahajajo se na površini proteinov (Asp, Glu, Lys, Arg, His).

3.2 PROTEINI

Izraz protein je leta 1838 prvič uporabil nizozemski kemik Gerardus Mulder za poimenovanje skupine molekul, ki so široko zastopane v vseh rastlinah in živalih. Z izbiro imena je Mulder tudi pravilno napovedal pomen proteinov, saj ga je izpeljal iz grške besede proteios, kar pomeni glavni oz. prvi v vrsti. V slovenščini, posebej v zvezi s prehrano, proteine pogosto imenujemo tudi beljakovine. Proteini, ki so biološki polimeri aminokislin, imajo veliko različnih struktur in funkcij. Aminokislino, iz katerih so sestavljeni, predstavljajo nabor 21 različnih molekul z značilno kemijsko zgradbo. Strukturo vsakega od proteinov določa njegovo zaporedje aminokislin, ki je zapisano v genih (predelih DNK). Značilna sestava in zaporedje aminokislin omogočata vsakemu proteinu, da se zviže v natančno določeno tridimenzionalno strukturo, ki jo potrebuje za svojo natančno določeno biokemijsko vlogo. Proteini se

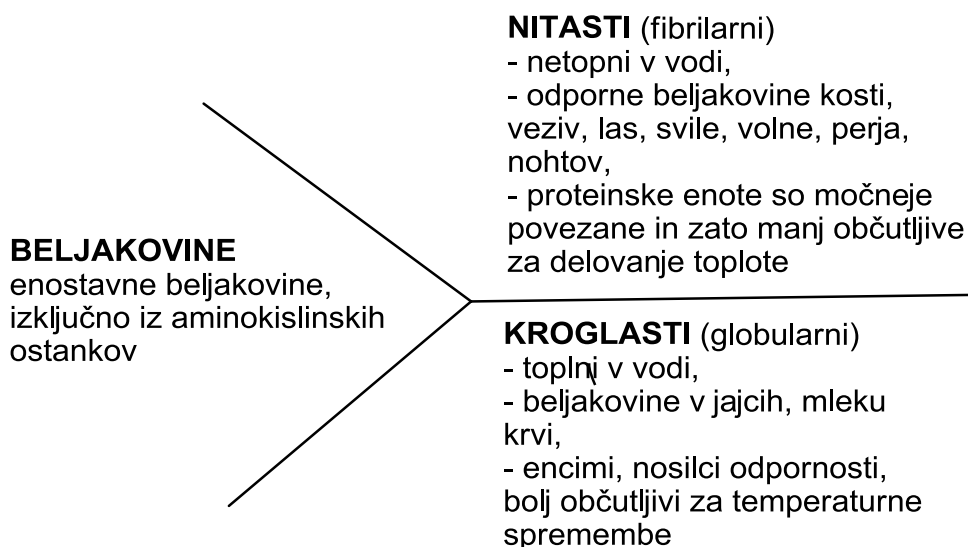
kot skupina bioloških molekul odlikujejo z veliko funkcijsko raznovrstnostjo. Tako nekateri sodelujejo pri krčenju mišic ali pri vzdrževanju čvrstosti struktur, drugi pri prenosu oz. skladiščenju majhnih molekul. Med proteine prištevamo tudi protitelesa (molekule namenjene imunski zaščiti), encime (biokatalizatorje) ter nekatere hormone.

V slovenščini, posebej v zvezi s prehrano, proteine pogosto poimenujemo tudi beljakovine, ki so biološki polimeri aminokislin ter imajo veliko različnih struktur in funkcij. Aminokislina, iz katerih so sestavljeni, so nabor 21 različnih molekul z značilno kemijsko zgradbo. Strukturo vsakega od proteinov določa njegovo zaporedje aminokislin, ki je zapisano v genih. Značilna sestava in zaporedje aminokislin omogočata vsakemu proteinu, da se zvije v natančno določeno tridimenzionalno strukturo, ki jo potrebuje za svojo natančno določeno biokemijsko vlogo.

Proteini so organske spojine, ki so sestavljene iz osnovnih elementov – aminokislin, ki vsebujejo kisik, fosfor, ogljik, žveplo, vodik in dušik. Lahko so živalskega (meso, jajca, mleko) ali rastlinskega (stročnice) izvora [1].

Proteini imajo v krvni plazmi različne funkcije:

- *ščitijo pred infekcijami (vloga protitelesa),*
- *delujejo kot pufri, zato so pomembni pri vzdrževanju kislo – bazičnega ravnovesja, imajo transportno funkcijo, saj so zdravila, nekateri hormoni, vitamini in elektroliti v cirkulaciji vežejo na nekatere proteine (albumini, globulini),*
- *nekateri proteini imajo specifične funkcije, npr. encimi, hormoni, zaviralci encimov, dejavniki koagulacije, itd. [1].*



Shema 2: Delitev beljakovin glede na njihovo zgradbo in lastnosti [2]

Vsak dan potrebujemo približno en gram proteinov na kilogram lastne teže. Če imamo 70 kilogramov, naj bi vsak dan zaužili 70 gramov proteinov. Pri športnikih je potreba po proteinih višja. Potrebe po proteinih so povezane s številnimi, še ne popolno proučenimi dejavniki, med katere spadajo: sestava jedilnika, skupni energijski vnos, intenzivnost in trajanje športne aktivnosti, temperatura okolja, spol, starost. Pri dovajanju proteinov telesu s hrano ni pomembna le količina proteinov v hrani, temveč tudi njihova kakovost. Nekatero proteino presnavljamo bolje, druge slabše. Nekateri proteini so našim beljakovinskim strukturam bližji, drugi manj. Kot merilo velja tako imenovani PDCAAS, kar je oznaka za Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (Tabela 1). Navedeno merilo nam pove, v kolikšni meri lahko neki protein usvojimo in v kolikšni meri profil aminokislino v hrani ustreza profilu telesu lastne aminokislino.

ŽIVILO	g beljakovin na 100 g živila	PDCAAS	EE
JAJCA			
kokošje jajce	12,40	1,00	12,40
kuhano			
MLEČNI IZDELKI			

kefir	3,70	1,00	3,70
mleko	3,30	1,00	3,30
harški sir	30,00	0,85	25,50
ZELENJAVA			
grah, zeleni	6,60	0,70	4,60
čičerika	19,80	0,66	13,10
soja	35,90	0,92	33,00
sojina moka	37,30	1,00	37,30
MESO IN RIBE			
ribe	17,00	0,94	16,00
govedina	21,20	0,92	19,50
nemastna svinjska ribica	21,80	0,87	19,00

Tabela 1: Kvaliteta proteinov izračunana s pomočjo PDCAAS. Če dobljeno vrednost pomnožimo s količino proteinov v hrani, dobimo vrednost EE, torej vrednost dejanske vsebnosti proteinov [1]

3.3 METODE DOKAZOVANJA IN DOLOČANJA PROTEINOV

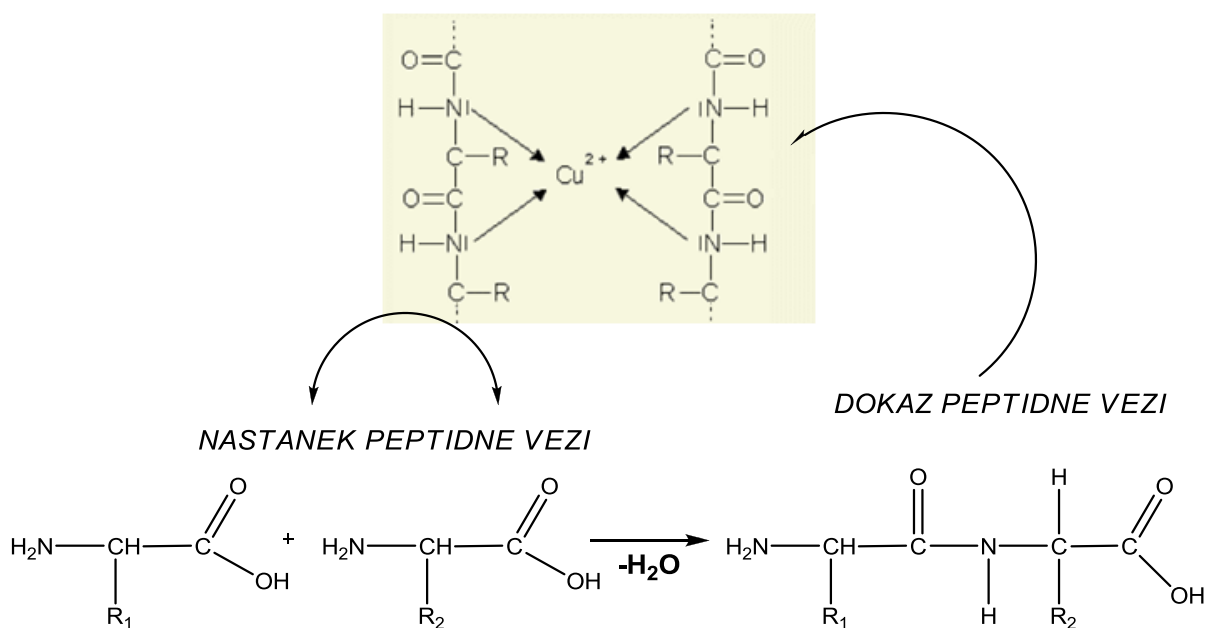
Poznamo več metod določanja proteinov [3]:

- določitev osebnosti celokupnega dušika (Kjeldhalova metoda),
- kemijska reakcija s peptidno vezjo (biuretska reakcija),
- kemijska reakcija z določeno aminokislino in fizikalno – kemijske meritve (npr. Folin - Cicalteu reagent za triozin),
- merjenje UV - absorpcije (za aromatske aminokislino: triptofan, triozin, fenilalanin),
- merjenje motnosti po izkosmičenju topnih beljakovin.

3.4 BIURETSKI TEST

Z biuretsko reakcijo dokazujemo prisotnost peptidne vezi, zato jo uporabljamo za dokazovanje beljakovin oz. peptidov. V srednjem alkalnem okolju [10] se bakrov ion v biuretskem reagentu kordinativno veže z NH- skupinami peptidne vezi [11], kar vodi do nastanka kompleksnih ionov. Prav zaradi nastanka slednjih ionov, se peptidni kompleks obarva modro-vijolično. Ker je za potek biuretske reakcije potrebna prisotnost vsaj 2 peptidnih vezi v molekuli, s to metodo ne moremo določiti aminokislin in dipeptidov [9].

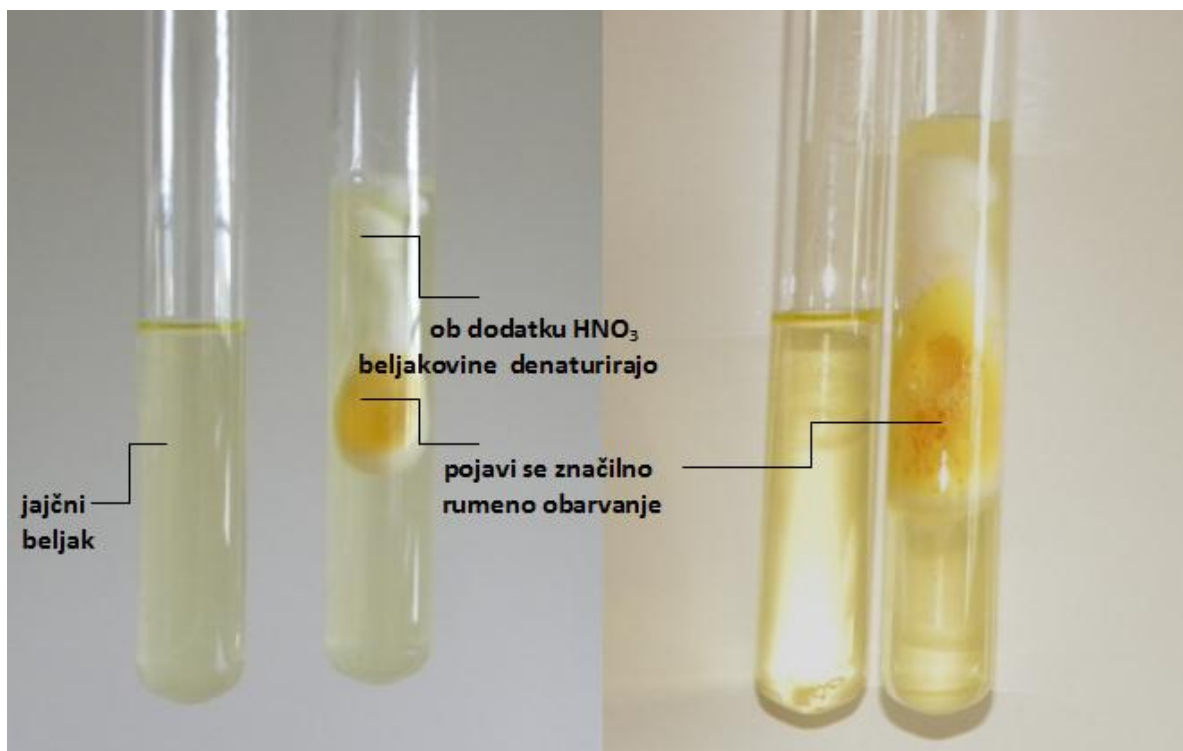
Biuretska reakcija je uporabna tudi za kvantitativno (količinsko) določanje osebosti beljakovin, saj je intenziteta modro – vijolične barve odvisna od števila peptidnih vezi, ki reagirajo z bakrovimi ioni in posledično s tem tudi števila proteinskih molekul v vzorcu [10].



Shema 3: Dokazni kompleks pri biuretskem testu z nastankom peptidne vezi [3]

3.5 KSANTOPROTEINSKA REAKCIJA

S ksantoproteinsko (ksantos – grško rumen) reakcijo dokazujemo beljakovine, ki vsebujejo aromatske aminokisliline (fenilalanin, tirozin in triptofan). Dokazna reakcija lepo uspe z jajčnim beljakom (beljakovina albumin), nohti (beljakovina keratin), semenom ricinusa, itd. Reakcija temelji na nitriranju aromatskega obroča, posledica česar je intenzivno rumeno obarvanje.



Slika 2: Prikaz ksantoproteinske reakcije (pred in po dodatku nitrirnega sredstva, ki povzroči spremembo barve) [2]

3.6 MODELNI REALNI VZORCI PROTEINOV

Eksperimentalno delo smo zasnovali tako, da smo izbrali čim bolj zanimive in različne vzorce iz vsakdanjega življenja, s katerimi smo izvedli študijo. Med izbranimi vzorci pa smo večjo pozornost namenili vzorcem mleka in ananasa.

Podroben opis samih modelnih vzorcev je naslednji:

- *ananas* (je sadež, ki vsebuje veliko biotina, vitaminov E, B12 in C ter več kot 15 mineralnih snovi, največ železa in kalcija) [17],
- *mleko* (ima v povprečju ima 87,50 % vode in 12,50 % suhe snovi, v kateri je: 3,60 – 4,20 % mlečne maščobe, 3,30 % beljakovin, 4,70 % mlečnega sladkorja – laktoze: 0,70 % mineralov – kalcij, fosfor, ter vitaminov – A, D, E, K in vitamini B kompleksa) [15],
- *jajca* (najbolj uporabno in zelo pogosto prisotno živilo v prehrani po vsem svetu, čeprav rumenjak vsebuje veliko holesterola) [16],
- *krompir* (krompir vsebuje do 80,00 % vode, 1,70 % beljakovin, 17,20 % ogljikovih hidratov, 0,10 % maščob, okoli 1,00 % mineralnih snovi – največ vsebuje železa – 0,90 mg/100 g, fosforja 0,60 mg/100 g in veliko vitaminov, razen vitamina A) [14],
- *kruh* (pripravljen iz moke, vode, soli in kvasa);
- *grozdje* (v 100 g svežega grozdja je 69 kalorij; 0,72 g proteinov, 0,16 g maščob, 18,10 g ogljikovih hidratov, sladkorjev in vlaknin, je dober vir vitamina C, fosforjeve kisline, vsebuje pa tudi magnezij, mangan in kalij) [13].

3.7 HIPOTEZA

1. Predvidevamo, da lahko s pomočjo biuretskega testa in ksantoproteinske reakcije spremljamo, kaj se z beljakovinami dogaja ob spremembi različnih pogojev, katerim je izpostavljen vzorec. Na tem mestu se osredotočamo tudi na potek hidrolize beljakovin, za katero predvidevamo, da jo lahko spremljamo na podoben način.
2. Predvidevamo, da je možno ti dve dokazni metodi uporabiti za analizo bioloških oz. ekoloških vzorcev.

Tovrstni rezultati bodo predstavljali izhodišče analiznim kemikom, kakšno analizno metodo uporabiti, ko bodo imeli bolj kompleksne vzorce.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 UVOD V EKSPERIMENTALNI DEL

Biuretski test in ksantoproteinska reakcija sta dokazni metodi, pri kateri se spremeni barva, zato veliko pozornost usmerimo v čistost delovnih površin in inventarja. Onesnažen inventar lahko privede do stranskih reakcij in moti opazovanje dokaza.

4.2 MATERIALI IN UPORABLJEN INVENTAR

a) *INVENTAR*

- čaša, 250 mL, 1 komad,
- čaša, 50 mL, 15 komadov,
- set epruвет s stojalom,
- kapalka, 20 komadov,
- kadička, 1 komad,
- petrijevka, 8 komadov,
- skalpel, 2 komada,
- pribor za segrevanje,
- električni kuhalnik EKP 2419/DK 2420 (proizvajalec Clatronic),
- deska za rezanje,
- termometer,
- tehtnica, tip Kern 440-47 (proizvajalec Kern & Sohn),
- mikroskop (monokularni tip OPTI SFC 100 FL, proizvajalec OPTI-COM).

b) *KEMIKALIJE*

- bakrov sulfat pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$,
- natrijev hidroksid, NaOH,
- kalij - natrijev tartarat tetrahidrat, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4 \text{H}_2\text{O}$,
- dušikova (V) kislina, HNO_3 .

Vse nevarnosti in ustrezna opozorila uporabljenih kemikalij so zbrana v tabeli označeni s številko 8, v poglavju dodatek (8.1).

4.3 REAGENTI

Priprava biuretskega reagenta:

V 250 mL čašo zatehtamo 1,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ in 6,0 g K-Na tartrata, dolijemo 150 mL 10 % raztopine NaOH ter dopolnimo do 500 mL z destilirano vodo.

4.4 PREGLED DELOVANJA BIURETSKEGA REAGENTA IN KSANTOPROTEINSKE REAKCIJE NA VZORCIH VSAKDANJE RABE

V epruveto smo nalili 2 mL (v tekočem agregatnem stanju) ali 1 cm³ (v trdnem agregatnem stanju) vzorca in dodali 4 mL biuretskega reagenta oz. dušikove (V) kisline (za ksantoproteinsko reakcijo). Z zamaškom smo prekrili ustje epruvete in vsebino pretresli. Na koncu smo opazovali barvo dokaza, ki jo je pokazal eksperiment.

4.5 VPLIV DELOVANJA ENCIMA BROMELAINA NA POTEK HIDROLIZE BELJAKOVIN

Pripravili smo želatino po navodilih na vrečki proizvajalca in jo razdelili v pet petrijevk, označenih s številkami 1 – 4. Petrijevke z želatino smo pustili na zraku ali v hladilniku (4 °C) toliko časa, dokler se želatina ni strdila. Sadež svežega ananasa smo narezali (s skalpelom na deski rezanje) na kocke velikosti 1 cm³. Nekaj kock smo zamrznili, nekaj pa smo jih segrevali v 50 mL vode približno 1 minuto. Konzervirani ananas smo narezali na kocke. Pred izvedbo poskusa smo počakali, da se koščki zamrznjenega ananasa ogrejejo oziroma segretega ananasa ohladijo na sobno temperaturo. Koščke ananasa smo nabodli na zobotrebce. Rahlo smo jih pritisnili ob papirnato brisačo, ki je vpila odvečno tekočino. Na to smo koščke ananasa položili na površino strjene želatine kot prikazuje naslednji opis:

Petrijevka 1 : kocka svežega ananasa

Petrijevka 2 : kocka predhodno segretega ananasa

Petrijevka 3 : kocka konzerviranega ananasa

Petrijevka 4 : kontrola (/)

Takoj smo izvedli biuretsko reakcijo po navodilih in rezultate zapisali v preglednico. Petrijevke z želatino in vzorce ananasa smo opazovali v določenih časovnih obdobjih tako, da smo s pomočjo zobotrebca privzdignili košček ananasa in preverili agregatno stanje želatine. Vsa opažanja smo ustrezno zabeležili.

Spremljanje poteka hidrolize želatine z biuretsko reakcijo

Iz petrijev št. 1, 2, 3 in 4 smo s spatulo takoj, ko smo namestili vzorce ananasa odvzeli košček želatine pod koščkom vzorca ananasa in izvedli biuretski test. Rezultate biuretskega testa ob $t = 0$ min smo vnesli v preglednico. Iz petrijev št. 1, 2, 3 in 4 smo z žličko odvzeli košček želatine pod koščkom ananasa in izvedli biuretski test. Rezultate biuretskega testa ob $t = 60$ min smo ponovno vnesli v preglednico. Postopek smo ponovili tudi ob času $t = 120$ min in rezultate ustrezno zabeležili. Postopek smo ponovili še po 1 dnevu (1440 min).

4.6 DOKAZ BELJAKOVIN OB SPREMEMBI POGOJEV NA MODELNEM VZORCU MLEKA

V epruveto smo nalili 1 mL mleka in z njim izvedli biuretski test in ksantoproteinsko reakcijo, po že znanem zaporedju. Vzorci mleka so bili naslednji:

- sveže mleko,
- sveže segreto (10 min na temperaturo 54 °C),
- 4 dni staro na zraku,
- 10 dni staro na zraku,
- 4 dni v zaprti atmosferi pri sobni temperaturi,
- 10 dni v zaprti atmosferi.

Zaprto atmosfero smo izvedli tako, da smo na ustje epruvete dali zamašek in epruveto neprodušno zaprli.

Uporabljeni modelni vzorec mleka je bil: Planinsko mleko 3,5 %, Tuš, Berglandmilch Pasching, Avstrija.

4.7 DOKAZ BELJAKOVIN V VZORCU ODPADNE VODE

V epruveto smo odpipetirali 2 ml vzorca vode iz izliva Jagoški kanal (občina Laško) nato smo izvedli biuretski test in ksantoproteinsko reakcijo v naslednjem zaporedju:

- takoj po odvzemu,
- segreto na temperaturo 50 °C,
- 20 min segrevanja na temperaturo 50 °C (deloma ohlajen vzorec),
- 60 min segrevanja na temperaturo 50 °C (deloma ohlajen vzorec).

Nahajališče izbranega vzorca vode:

Vzorec vsebuje odplake vode, saj je na prvi pogled opazimo motnost. Voda je bila zelo onesnažena, imela pa je tudi neprijeten vonj. Vzorec smo odvzeli dva dni po velikem lokalnem naliveu (poplave) v mesecu novembru. Omenjeni kanal se nahaja v bližini jezera in reke Savinje kamor se tudi izliva.

5. REZULTATI IN DISKUSIJA

5.1 OPAŽANJA

Opazili smo, da so bili v vzorcih prisotni proteini, kar smo dokazala z biuretskim reagentom in ksantoproteinsko reakcijo. V nekaterih vzorcih je bila prisotnost proteinov manjša, v drugih pa večja koncentracija, kar smo opazili po intenzivnosti barve.

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo si zasnovali merilo intenzivnost barvnih dokazov:

- 0 – ni reakcije (ni dokaza)
- 1 – malenkostno obarvanje
- 2 – odtenek temnejša barva
- 3 – močno intenzivna barva

5.2 REZULTATI MERITEV

5.2.1 PREGLED DELOVANJA BIURETSKEGA REAGENTA IN KSANTOPROTEINSKE REAKCIJE NA VZORCIH VSAKDANJE RABE

Številka epruvete	Ime vzorca	Biuretski reagent	Ksantoproteinska reakcija
1.	ananas	2	1
2.	mleko	2	1
3.	jajčni beljak	2	2
4.	jajčni rumenjaki	1	1
5.	surov krompir	1	1
6.	kuhan krompir	2	1

7.	kruh	1	1
8.	grozdje	1	0

Tabela 2: Prikaz dokaza s pomočjo biuretskega reagenta in ksantoproteinske reakcije na vzorcih vsakdanje rabe

Izmed zgoraj v tabeli omenjenih vzorcev so največjo intenzivnost biuretskega dokaza pokazali na ananasu, mleku, jajčnem beljaku in kuhanem krompirju. Za odtenek nižjo intenzivnost so pokazali: jajčni rumenjaki, surov krompir, kruh in grozdje. Tako lahko ugotovimo, da vsebujejo vzorci (jajčni beljak, mleko, ananas in kuhan krompir) večjo količino proteinov kot tisti, ki so imeli za odtenek manjšo intenzivnost (jajčni rumenjaki, surov krompir, kruh in grozdje).

V vzorcu jajčnega beljaka smo dokazali, da ta vsebuje največ aromatskih aminokislin, vzorec grozdja pa jih sploh ne vsebuje. Vzorci ananasa, mleka, jajčnega rumenjaka, surovega krompirja, kuhanega krompirja in kruha vsebujejo srednjo vrednost aromatskih aminokislin.

5.2.2 VPLIV DELOVANJA ENCIMA BROMELAINA NA POTEK HIDROLIZE BELJAKOVIN

Ime vzorca	Biuretski test	Ksantoproteinska reakcija
želatina pod kocko svežega ananasa	0	1
kocka svežega ananasa v želatini	0	2
želatina pod kocko predhodno segretega ananasa	1	0
kocka predhodno segretega ananasa v želatini	2	1
želatina pod kocko konzerviranega ananasa	1	0
kocka konzerviranega ananasa v želatini	0	2

Tabela 3: Prikaz rezultatov delovanja encima bromelaina na potek hidrolize beljakovin

Iz tabele je razvidno, da ima vzorec najvišjo koncentracijo proteinov biuretskega dokaza predhodno segret ananas, medtem ko imata vzorca želatina pod predhodno segretim ananasom in želatina pod konzerviranim ananasom znatno manjšo vrednost. Želatina pod svežim ananasom, sveži ananas v želatini in kocka konzerviranega ananasa v želatini pa ne vsebujejo proteinov po biuretskem testu.

Ksantoproteinska reakcija v vzorcih, ki jih nismo dokazali z biuretskim reagentom pokazala prisotnost proteinov (proteini z aromatskimi aminokislinami). Največjo vrednost proteinov z aromatskimi aminokislinami sta pokazala sveži in konzervirani ananas v želatini. Beljakovin z aromatskimi aminokislinami pa ne vsebujeta želatina pod kocko prehodno segretega ananasa in želatina pod kocko

konzerviranega ananasa. Vzorca želatine pod kocko svežega ananasa in kocka prehodno segretega ananasa v želatino pa so dosegli srednjo vrednost teh proteinov.

SPREMLJANJE POTEKA HIDROLIZE PO 1440 min

Ime vzorca	Biuretski test	Ksantoproteinska reakcija
želatina pod kocko svežega ananasa	0	0
kocka svežega ananasa v želatini	2	0
želatina pod kocko prehodno segretega ananasa	1	0
kocka prehodno segretega ananasa v želatini	1	1
želatina pod kocko konzerviranega ananasa	3	0
kocka konzerviranega ananasa v želatini	3	1
želatina	3	0
zmrznjeni ananas	1	0
zmrznjeno-taljeni ananas	2	0
1440 min star ananas	1	2
1440 min star kuhan ananas	2	1

Tabela 4: Prikaz delovanja encima bromelaina na potek hidrolize beljakovin po 1440 min

V tabeli 4 je prikazano, da so želatina pod kocko konzerviranega ananasa, kocka konzerviranega ananasa v želatini in želatina po 1440 min še vedno imeli najvišjo prisotnost proteinov, kar je vidno iz biuretskega testa. Ravno nasprotno, proteinov nismo opazili v želatini pod svežim ananasom. Zelo visoko prisotnost proteinov biuretskega dokaza so imeli tudi kocka svežega ananasa v želatini, zmrznjeno – taljeni ananas in 1440 min star kuhan ananas, za odtenek manj prisotnih proteinov z biureskim testom pa so imeli želatina pod kocko prehodno segretega ananasa, kocka prehodno segretega ananasa v želatini, zmrznjeni ananas in 1440 min star ananas.

Po 1440 min pa smo ugotovili, da ima največjo prisotnost aromatskih aminokislin 1 dan star ananas, za odtenek manjšo prisotnost pa imajo kocka prehodno segretega ananasa v želatini, kocka konzerviranega ananasa v želatini in 1 dan star kuhan ananas. Pri želatini pod kocko svežega ananasa, kocki svežega ananasa v želatini, želatini pod kocko prehodno segretega ananasa, želatini pod kocko konzerviranega ananasa, v želatini, zmrznjenem ananasu in zmrznjeno-taljenemu ananasu pa ni bilo prisotnosti aromatskih aminokislin.

5.2.3 DOKAZ BELJAKOVIN OB SPREMEMBI POGOJEV NA MODELNEM VZORCU MLEKA

Ime vzorca	Biuretski test	Ksantoproteinska reakcija
sveže mleko	2	3
sveže segreto (54 °C)	3	2
4 dni na zraku	1	0
10 dni na zraku	1	0
4 dni zaprto na zraku	1	0
10 dni zaprto na zraku	2	3

Tabela 5: Prikaz beljakovin ob spremembi pogojev na modelnem vzorcu mleka

Iz tabele je razvidno, da ima največjo prisotnost proteinov mleko segreto na 54 °C, najmanjšo prisotnost proteinov pa ima mleko 4 dni na zraku, mleko 4 dni zaprto na zraku in mleko 10 dni na zraku. Zelo visoko prisotnost proteinov imata tudi mleko 10 dni zaprto na zraku in sveže mleko. Dokazali smo, da imata največjo prisotnost aromatskih kislin mleko 10 dni zaprto na zraku in sveže mleko, za odtenek manj prisotnosti aromatskih aminokislin pa ima segreto mleko na 54 °C. V mleku 4 dni zaprtem na zraku, 4 dni na zraku in mleku 10 dni na zraku pa ni prisotnosti aromatskih aminokislin.

5.2.4 DOKAZ BELJAKOVIN V VZORCU ODPADNE VODE

Ime vzorca	Biuretski reagent	Ksantoproteinska reakcija
odvzet vzorec (slepi primer)	1	0
vzorec pri 50 °C	1	0
vzorec segrevan 20 min na temperaturo vrelišča	1	0
vzorec segrevan 60 min na temperaturo vrelišča	3	0

Tabela 6: Prikaz beljakovin v vzorcu odpadne vode

Izmed zgoraj v tabeli omenjenih vzorcev imajo najmanjšo prisotnost proteinov slepi vzorec (direktno po odvzemu), odpadna voda pri 50 °C in odpadna voda, segreta 20 min na temperaturo vrelišča. Največjo prisotnost proteinov pa je dosegla voda segreta 60 min na temperaturo vrelišča.

Kot vidimo v zgornji tabeli, noben od vzorcev nima prisotnosti aromatskih aminokislin, kar pokaže ksantoproteinski dokaz.

6. ZAKLJUČEK

Pred začetkom samega dela smo si zadali dve hipotezi, ki ju lahko glede na eksperimentalne rezultate potrdimo.

Prva hipoteza je govorila o spremembi okoljskih pogojev, ki lahko delujejo na nek vzorec, ki vsebuje proteine. Rezultat omenjene hipoteze smo opazovali na modelnih vzorcih ananasa in mleka in delno tudi z vzorcem odpadne vode. Ugotavljamo, da pri segrevanju mleka biuretski test najbolj uspe, kar predvidevamo, da je posledica razgradnje beljakovin pri višji temperaturi, samo sveže mleko pa vsebuje dovolj visoko vrednost vrednost beljakovin z aromatskimi aminokislinami, kar nas je presenetilo. Eksperimenti pri katerih smo opazovali vpliv zraka so pokazali srednjo vrednost beljakovin. Spremljanje poteka hidrolize se da dovolj dobro opazovati s pomočjo omenjenih sprememb. Pri hidrolizi beljakovin je dobro vidno, kako se spreminja sestava vzorca pod različnimi pogoji. Opazimo, da pri nekaterih vzorcih ananasa rezultati testov po 1 dnevu narastejo, kar prepisujemo razgradnji, saj se molekule cepijo in nastajajo manjše aminokislone, ki potem naredijo bolj intenziven dokaz. Pri nizki temperaturi so proteini manj aktivni, za to jih naši metodi ne zaznata, ko pa jih segrejemo na sobno temperaturo, pa jih opazimo tako ugotavljamo, da je najbolje uživati sadje, ki je bogato s proteini pri sobni temperaturi.

Druga hipoteza se je navezovala na analizo bioloških oz. ekoloških vzorcev. Tu smo izvedli dokazni reakciji na vzorcih vsakdanje rabe, večjo pozornost pa smo usmerili v ekologijo – vzorec odpadne vode. Tukaj je prav tako s temperaturo dobro viden dokaz. Pri segrevanju v odplakah se proteini cepijo na manjše dele (aminokislone), za to predvidevamo, da je vzorec z najdlje segrevanja pokazal največjo vrednost pri biuretskem dokazu. Aromatskih aminokislin s ksantoproteinsko reakcijo nismo zaznali.

Nekateri vzorci niso pokazali barvne spremembe, je pa v literaturi omenjeno, da vsebujejo proteine, ta dokaz predpisujemo tako imenovani napaki metode. Metoda je namenjena vzorcem z višjo koncentracijo beljakovin, kar pa je nižje od dane meje, pa opazimo kot negativen dokaz.

Biuretski test in ksantoproteinska reakcija sta hitri in nezahtevni metodi, ki bi jih lahko uporabili v sklopu biologije oz. kemije ali izbirnih predmetov v osnovnih šolah. Učenci bi dokaze spremljali in tako ugotavljali prisotnost proteinov v različnih vzorcih, kar bi bila po našem mnenju dodatna zanimivost pri pouku.

7. LITERATURA

- [1] Petrovič, M., Proteini in aminokisliline v prehrani vzdržljivostnega športnika. *Diplomsko delo*, Ljubljana, 2010.
- [2] Milfelner, R.; Rakuša, J., Aminokisliline, *Lekarna 24 ur*, 2011, 65-68.
- [3] Hmelak Gorenjak, A., Živilska kemija z analizo živil in analiza živil, Učbenik, *Izobraževalni center Piramida Maribor, Konzorcij višjih strokovnih šol za izvedbo projekta IMPLETUM*, 2009.
- [4] Tišler M., Nekodirane aminokisliline, *Kemija v šoli in družbi*, 22, 4, 2010, 5-11.
- [5] Kornhauser A., Kemija 8, Organska kemija, *Delovni zvezek*, Ljubljana 1997, 108-125.
- [6] Požek-Novak, T., Biokemija za vsakdanjo rabo: *zbirka poskusov za srednje šolce*, DZS, Ljubljana 1990, 6-27.
- [7] Kornhauser A., Kemija 8, Organska kemija, *Učbenik*, DZS, Ljubljana 1992, 170-191.
- [8] Anderluh, H., Aminokisliline, peptide, protein, delo s protein [online]. Dostopno na URL naslovu: <http://web.bf.unilj.si/bi/biokemija/maribor/Protuvod.pdf> [Citirano 17.02.2013, 18.00].
- [9] Bukovec N., Dolenc D., Šket B. 2005, Kemija za gimnazije 2, *Učbenik*, Ljubljana, DZS, 228-231.
- [10] Alzahrani, Z., 2009/2010, Physical Biochemist Lab [online]. Dostopno na URL naslovu: http://faculty.ksu.edu.sa/Zaenab_Alzahrani/Documents/Experiment_handout_Final_copy.pdf. [Citirano 22.01.2013, 15.00].
- [11] Van der Baan (Potočnik), K., Vrednotenje novih vaj iz biokemije za študente dvopredmetnih programov biologija z vezavami, *Diplomsko delo*, 2007.

- [12] Eduvizija.hr - Aminokisliline i bjelančevine, Dostopno tudi na URL naslovu: <http://www.eduvizija.hr/portal/lekcija/8-razred-kemija-aminokiseline-i-bjelancevine> [Citirano 17.02.2013, 18.10].
- [13] Vizita. si – grozdje, Dostopno tudi na URL naslovu: http://vizita.si/clanek/zdravi_z/grozdje.html [Citirano 17.02.2013, 18.15].
- [14] Wikipedija prosta enciklopedija – krompir. Dostopno tudi na URL naslovu: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Krompir> [Citirano 17.02.2013, 18.19].
- [15] Republika Slovenija – Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, Mleko in mlečni izdelki, Dostopno na URL naslovu: http://www.mko.gov.si/si/delovna_podrocja/hrana_in_krma/mleko_in_mlecni_izdelki/ [Citirano 17.02.2013, 18.23].
- [16] Veganska iniciativa – jajca, Dostopno na URL naslovu: <http://www.veganstvo.net/ali-ves/jajca/> [Citirano 17.02.2013, 18.33].
- [17] Vizita. si – ananas, Dostopno tudi na URL naslovu: http://vizita.si/clanek/zdravi_z/ananas.html, 2009, [Citirano 17.02.2013, 18.36].
- [18] Vrtačnik, M., Zupančič Brouwer, N., 2003, Organska kemija, *Učbenik*, 2. Izdaja, Ljubljana, Tehniška založba, 232-235.
- [19] Baza podatkov kemikalij, <http://www.AppliChem.com>, [citirano 1.2. 2013, 17.30].

8. DODATEK

8.1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIKALIJ




Ime kemikalije	Formula	M (g/mol)	Piktogram	H-stavki	P-stavki	CAS
natrijev hidroksid	NaOH	40,00		H290- H314	P301+P330+P331 -P280- P305+P351+P338	1310-73-2
bakrov sulfat pentahidrat	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	249,68	 	H315- H302- H319- H410	P302+P352-P273- P305+P351+P338	7758-99-8
K-Na tartrat	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	282,23	/	/	/	6381-59-5

Tabela 7: Piktogrami ter H in P stavki uporabljenih kemikalij [19]