



Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος
Πολυτεχνική Σχολή
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Αγγελική Απ. Γαλάνη

Χημικός PhD, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (ΕΔΙΠ)

ΟΞΕΡΟΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ Προσδιορισμός ισοηλεκτρικού σημείου αμινοξέος

ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΥΛΙΚΟ, ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΑΝΕΙΕΣ 19, 20, 21 ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΓΡΑΦΙΚΗΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗΣ (ΔΙΑΦΑΝΕΙΑ 24), ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΚΘΕΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΦΟΙΤΗΤΩΝ ΚΑΙ ΦΟΙΤΗΤΡΙΩΝ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟΥ ΈΤΟΥΣ 2016-2017 ΘΕΟΔΩΡΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΤΣΙΓΑΡΑ ΕΥΜΟΡΦΙΑ, ΠΥΡΓΙΩΤΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ

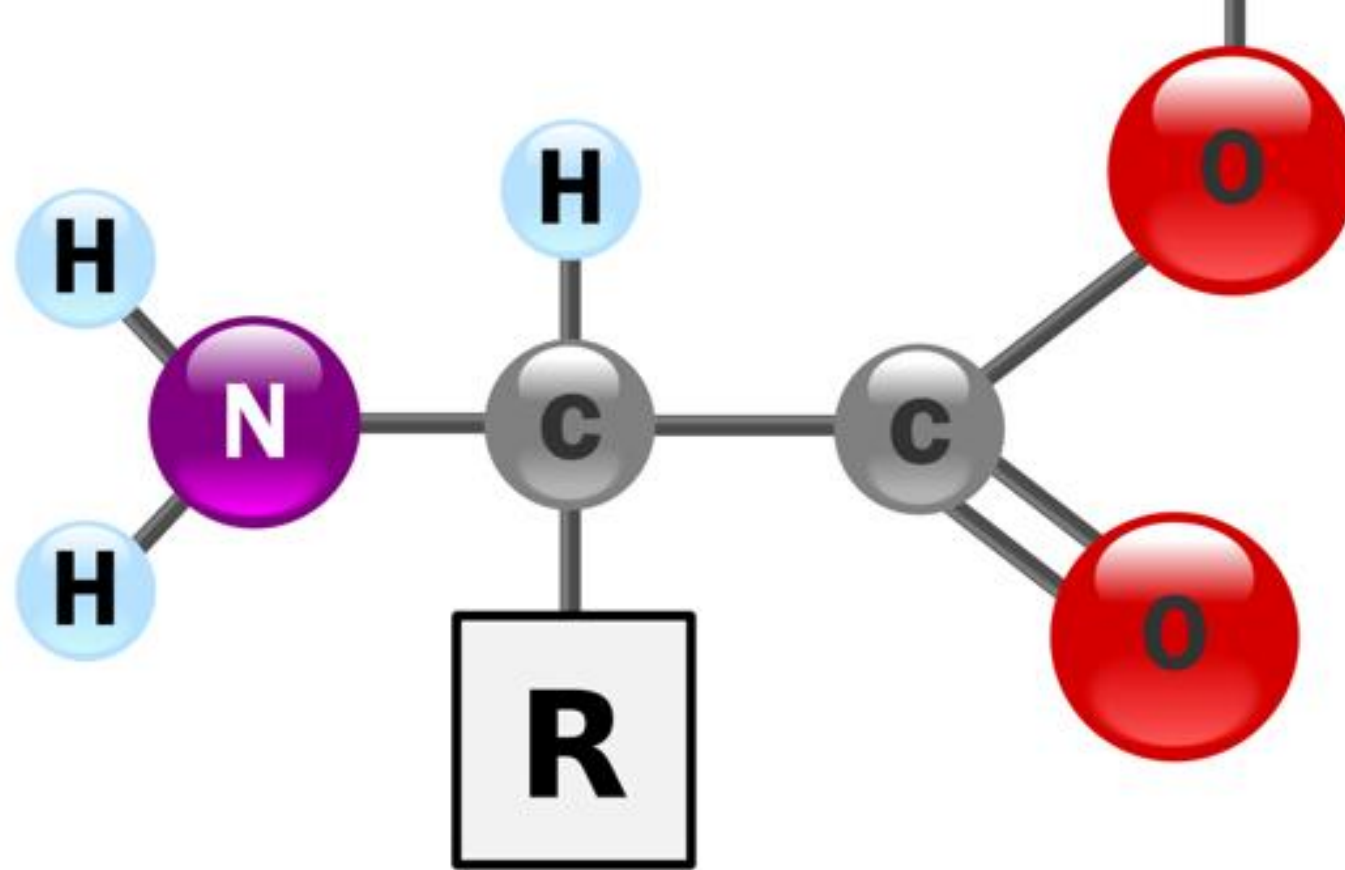
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν δύο λειτουργικές ομάδες, μια βασική αμινομάδα (-NH₂) και μια όξινη καρβοξυλομάδα (-COOH).

Εξαίρεση αποτελεί η προλίνη, που έχει αμινομάδα αντί αμινομάδα

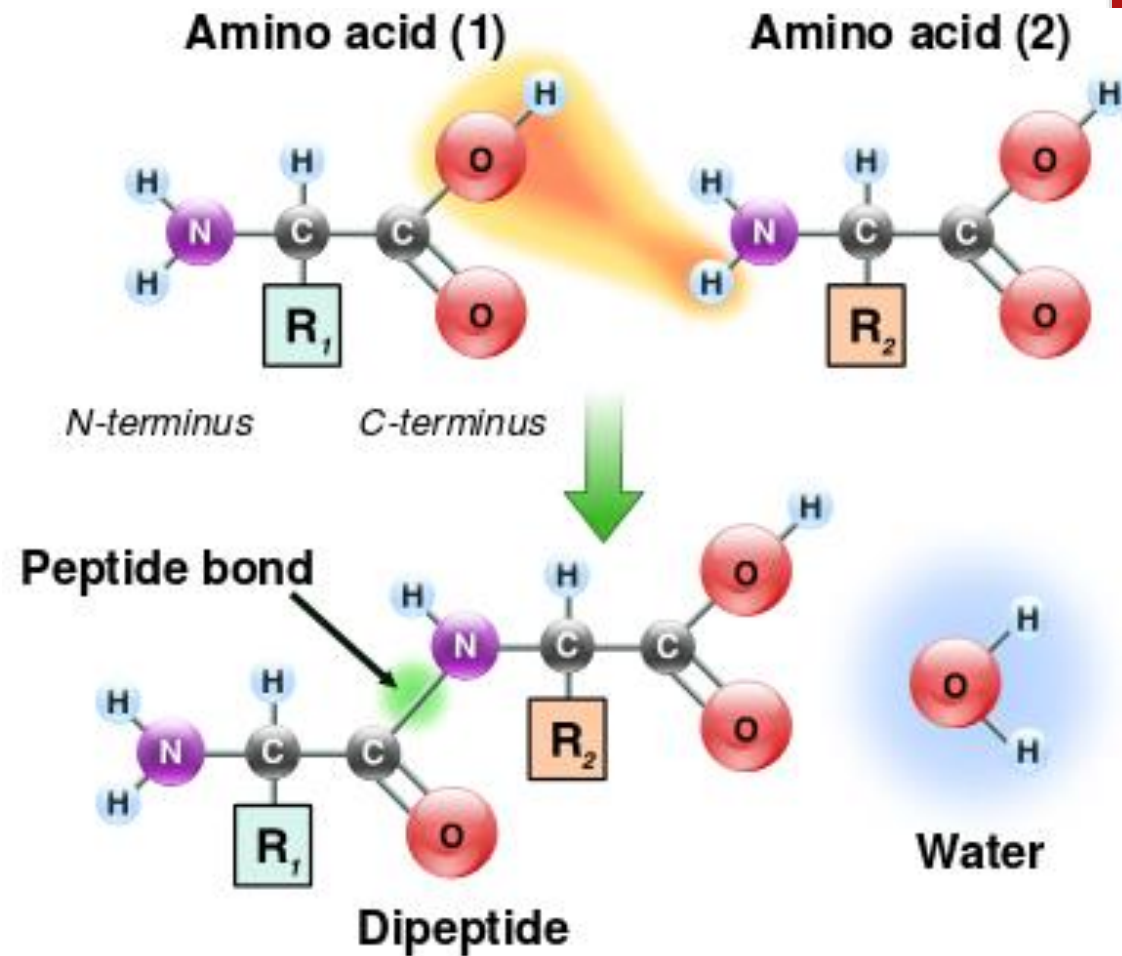
Τα αμινοξέα που βρίσκονται στη φύση είναι πάνω από 200, όμως μόνο 20 παρουσιάζουν ενδιαφέρον, τα οποία είναι οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών. Στα 20 αυτά αμινοξέα, η αμινομάδα βρίσκεται σε α-θέση ως προς την καρβοξυλομάδα.



α - αμινοξέα

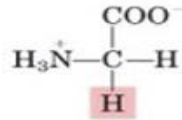
ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ

Τα α-αμινοξέα
συνδέονται μεταξύ
τους με πεπτιδικό
δεσμό και σχηματίζουν
τα πεπτίδια.

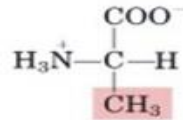


Τα 20 βασικά αμινοξέα

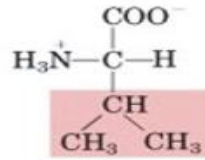
Nonpolar, aliphatic R groups



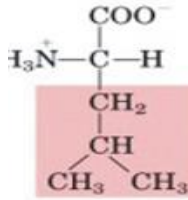
Glycine



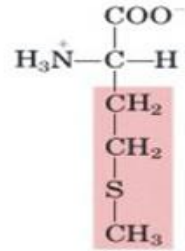
Alanine



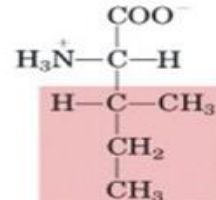
Valine



Leucine

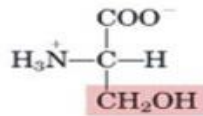


Methionine

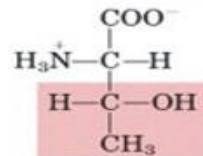


Isoleucine

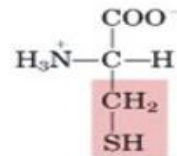
Polar, uncharged R groups



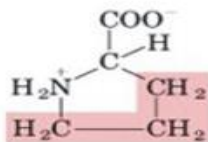
Serine



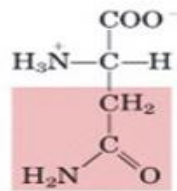
Threonine



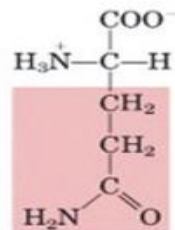
Cysteine



Proline

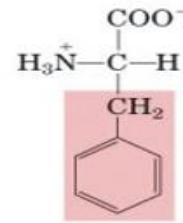


Asparagine

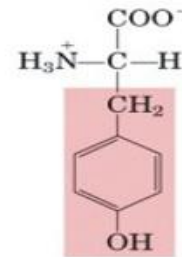


Glutamine

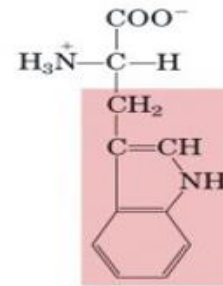
Aromatic R groups



Phenylalanine

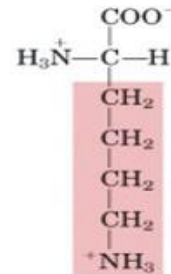


Tyrosine

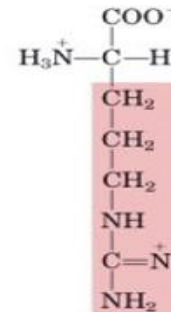


Tryptophan

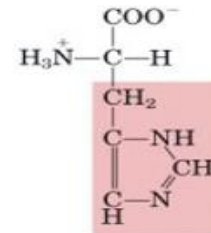
Positively charged R groups



Lysine

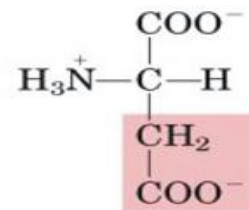


Arginine

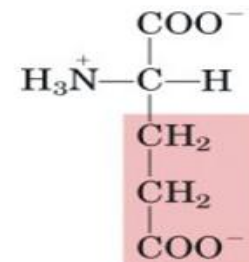


Histidine

Negatively charged R groups



Aspartate



Glutamate

Όσα δεν μπορεί ο οργανισμός να τα συνθέσει από μόνος του και πρέπει να τα πάρει από τροφές.

Απαραίτητα Αμινοξέα

Ιστιδίνη

Ισολευκίνη

Λευκίνη

Λυσίνη

Μεθειονίνη

Φαινυλαλανίνη

Θρεονίνη

Τρυπτοφάνη

Βαλίνη

Μη απαραίτητα αμινοξέα

Αλανίνη

Αργινίνη

Ασπαραγίνη

Ασπαραγινικό Οξύ

Κυστεΐνη

Γλουταμινικό οξύ

Γλουταμίνη

Γλυκίνη

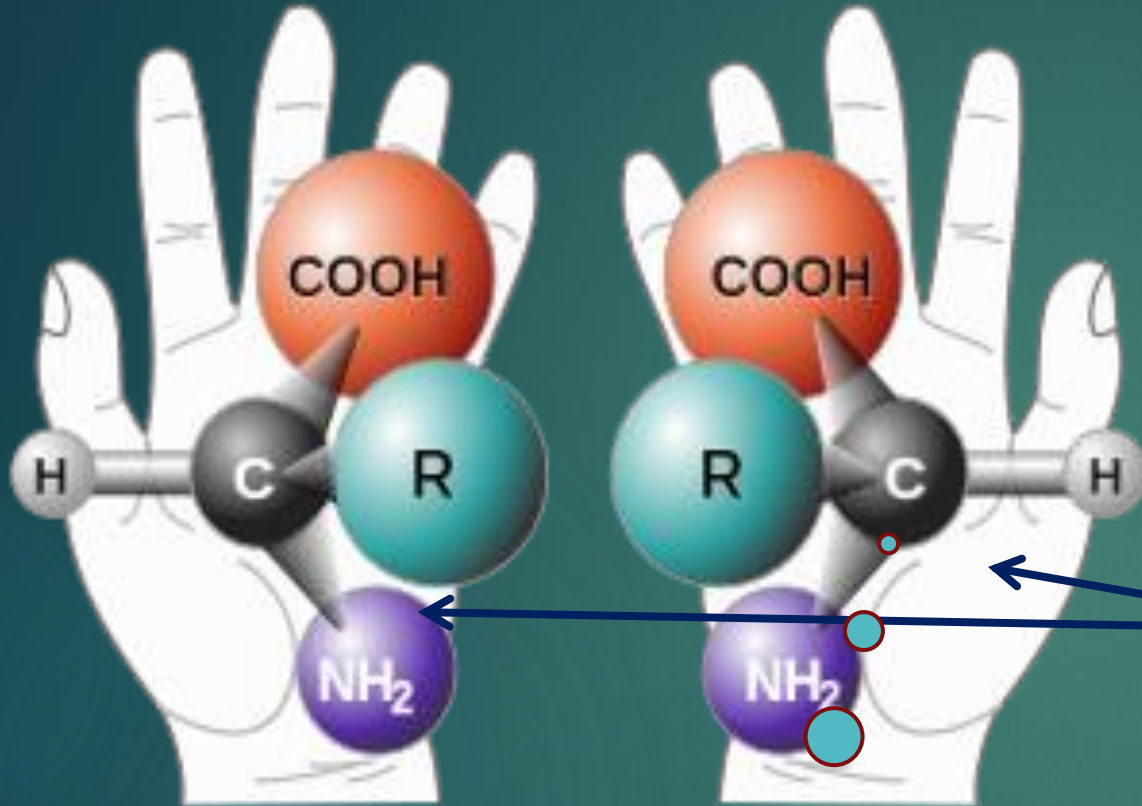
Προλίνη

Σερίνη

Τυροσίνη

Όσα ο οργανισμός μπορεί να τα συνθέσει μόνος του.

Φυσικές ιδιότητες



Όλα τα αμινοξέα, εξαιρουμένης της γλυκίνης, έχουν τουλάχιστον ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα και είναι οπτικά ενεργές ενώσεις. Τα πρωτεϊνικά αμινοξέα ανήκουν στην L-μορφή.

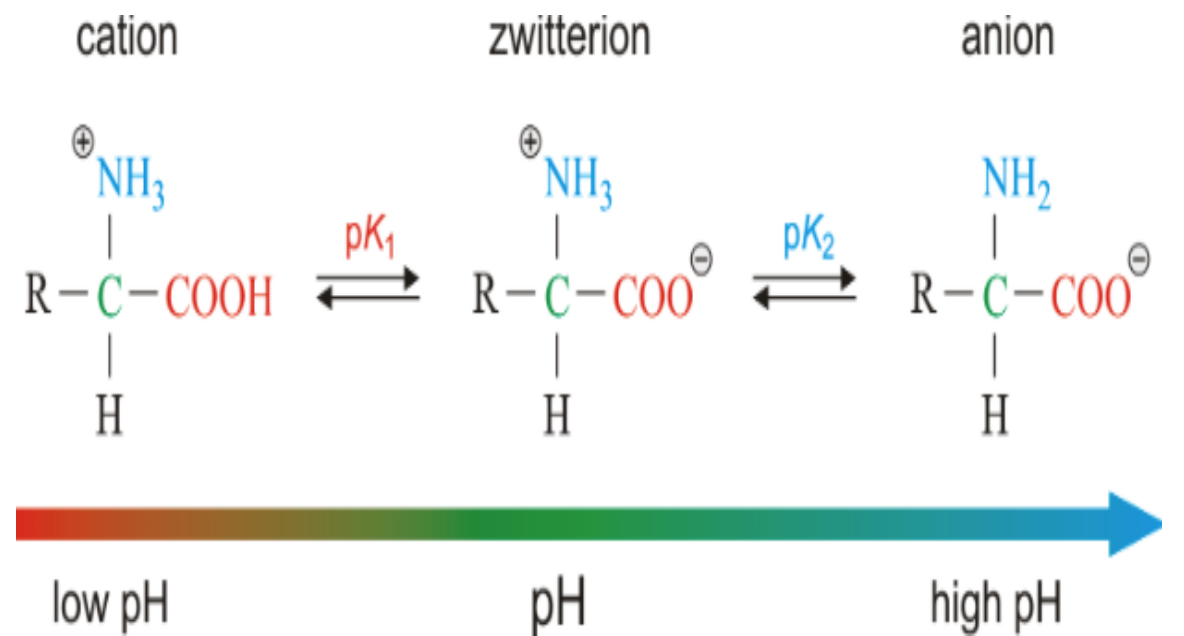
Άτομο άνθρακα με 4 διαφορετικούς υποκαταστάτες.

Έχουν την ικανότητα να στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός, δεξιά ή αριστερά.

Οξεοβασικές ιδιότητες αμινοξέων

9

- Τα αμινοξέα ανάλογα με το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται, έχουν την ικανότητα να ιονιστούν από την αμινομάδα (κατιόν), από την καρβοξυλομάδα (ανιόν), ή και από τις δύο (ισοϊονική μορφή - zwitterion ion).
- Χαρακτηρίζονται ως αμφολύτες, γιατί έχουν την ικανότητα να δρουν άλλοτε ως οξέα (να δίνουν H^+), και άλλοτε ως βάσεις (να δέχονται H^+).



Ισοηλεκτρικό σημείο αμινοξέος pI

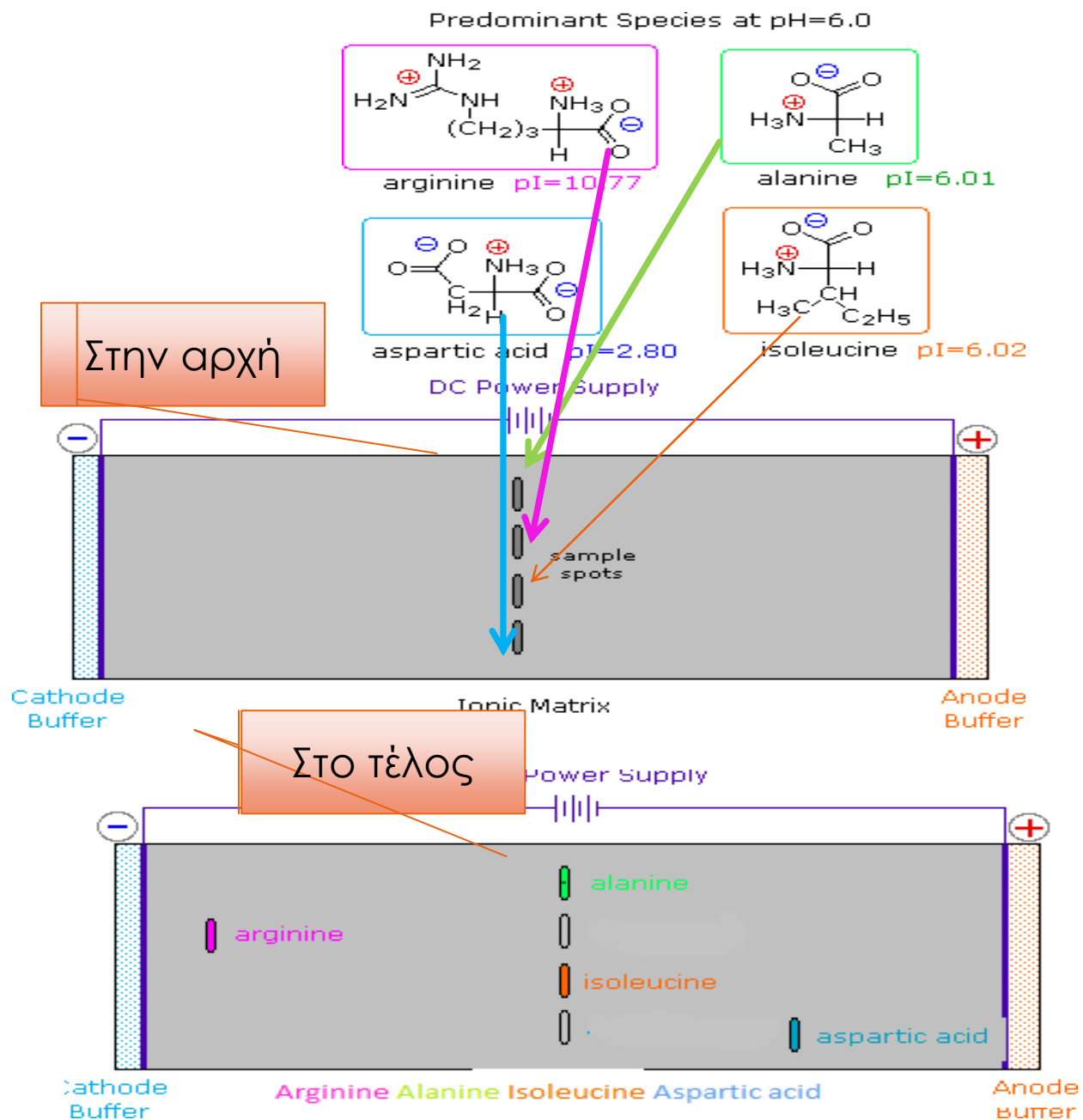
10

Ισοηλεκτρικό σημείο ονομάζεται η τιμή pH κατά την οποία το αμινοξύ βρίσκεται στην ισοϊονική του μορφή.

Σε αυτή την τιμή pH το θετικό φορτίο του αμινοξέος εξισώνεται με το αρνητικό.

Κάθε αμινοξύ έχει διαφορετικό ισοηλεκτρικό σημείο.

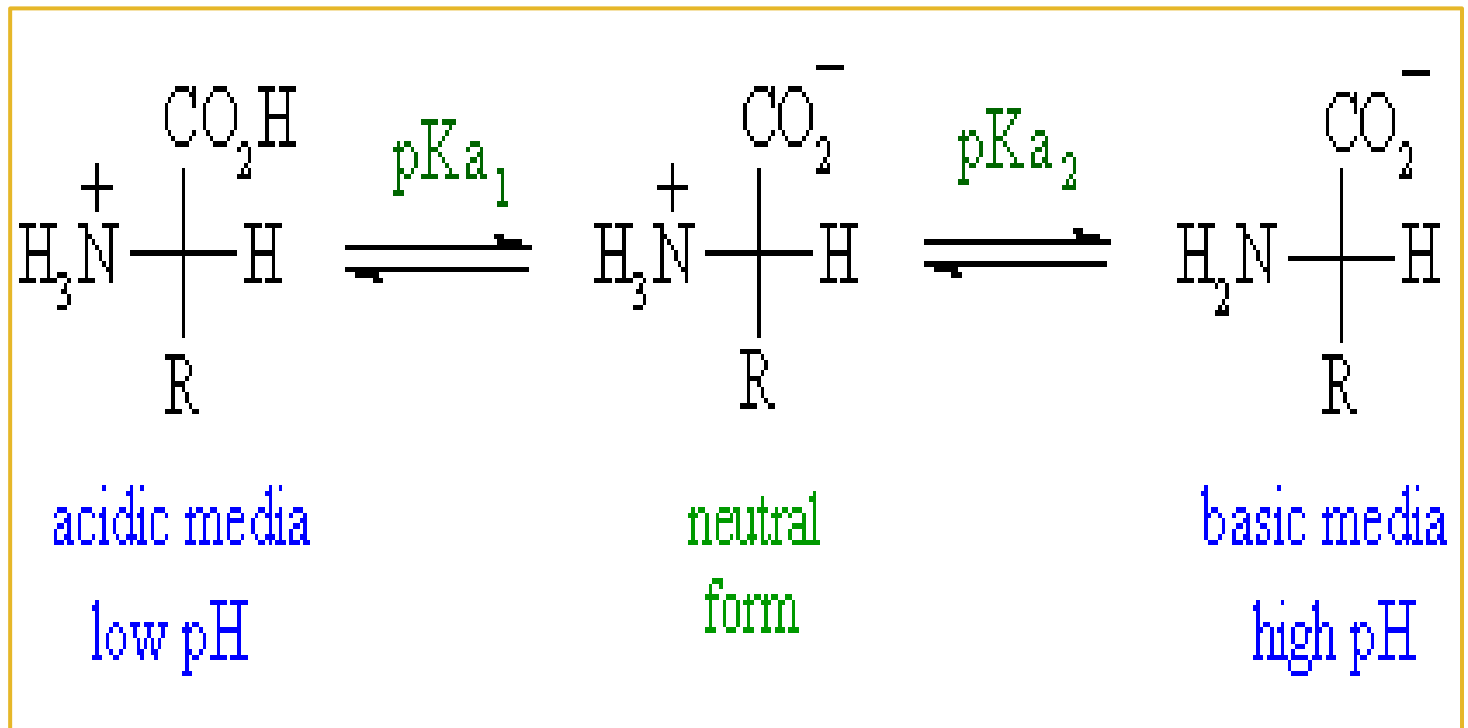
Στη μέθοδο διαχωρισμού των αμινοξέων με ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιούνται οι διαφορές των αμινοξέων στις τιμές pI .



Διαχωρισμός
αμινοξέων με
ηλεκτροφόρηση

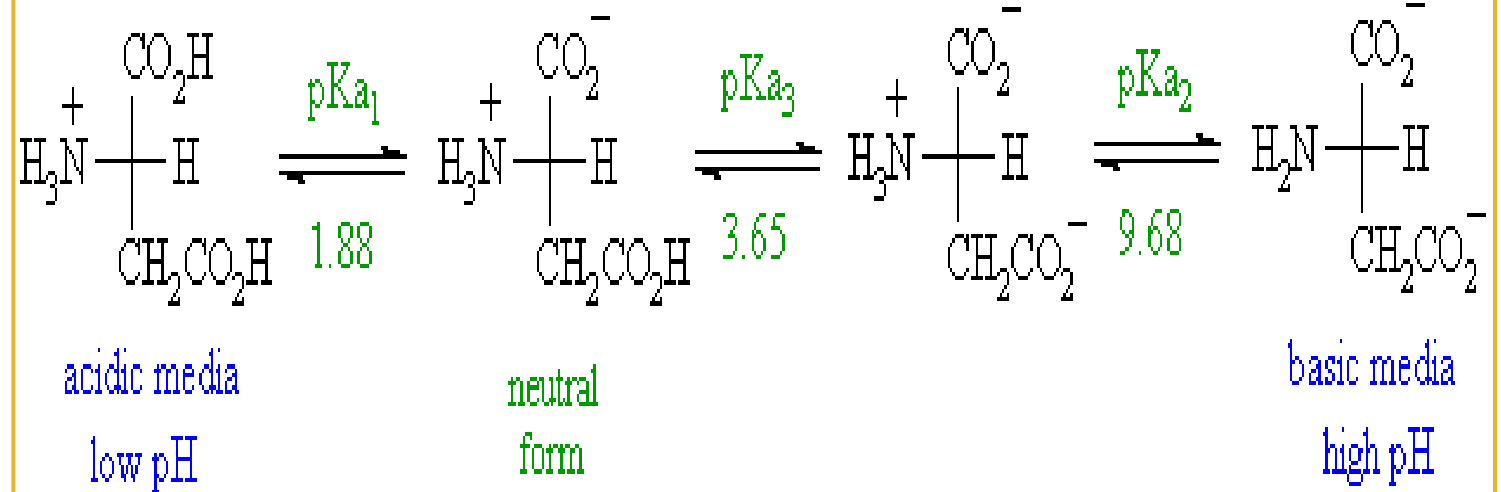
Υπολογισμός
ισοηλεκτρικού
σημείου
για ουδέτερα
αμινοξέα

$$pI = 1/2 (pKa_1 + pKa_2)$$



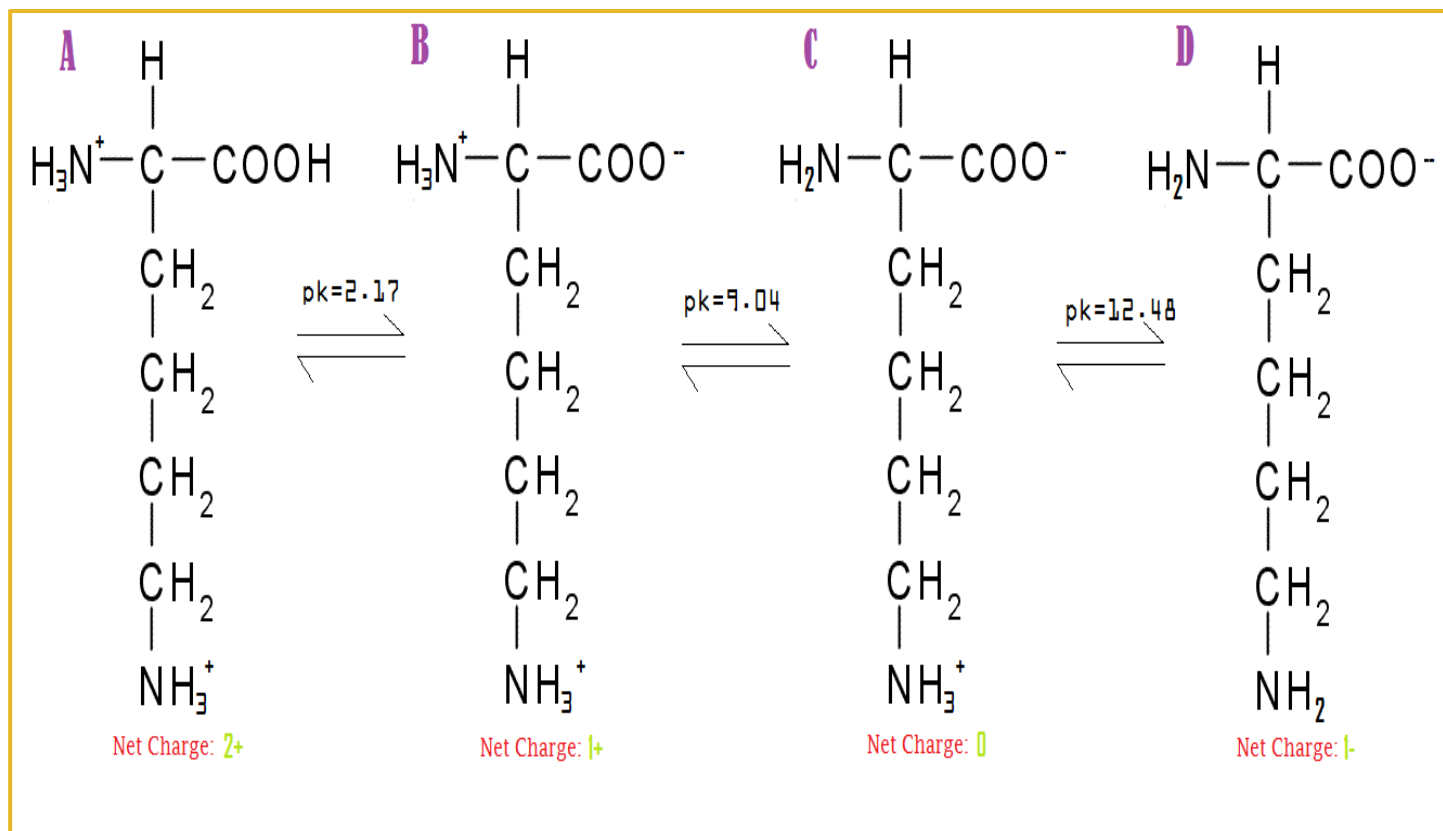
Υπολογισμός
ισοηλεκτρικού
σημείου
αμινοξέων που
περιέχουν
όξινες
πλευρικές
αλυσίδες

$$pI = 1/2 (pK_{a1} + pK_{a3})$$



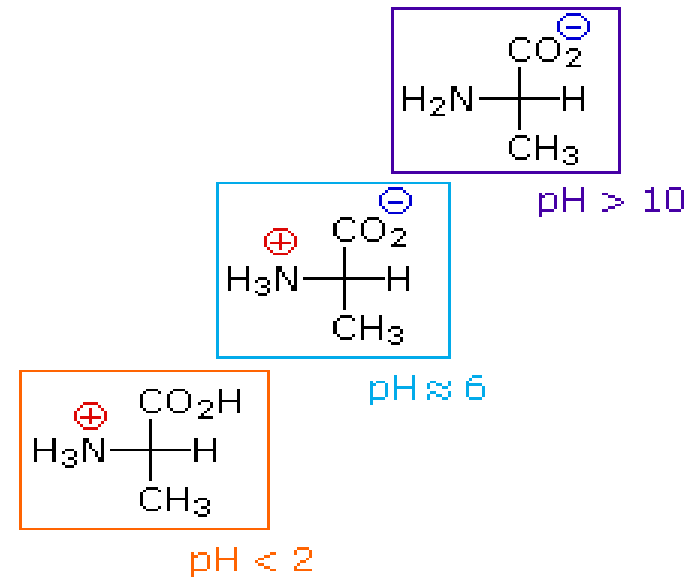
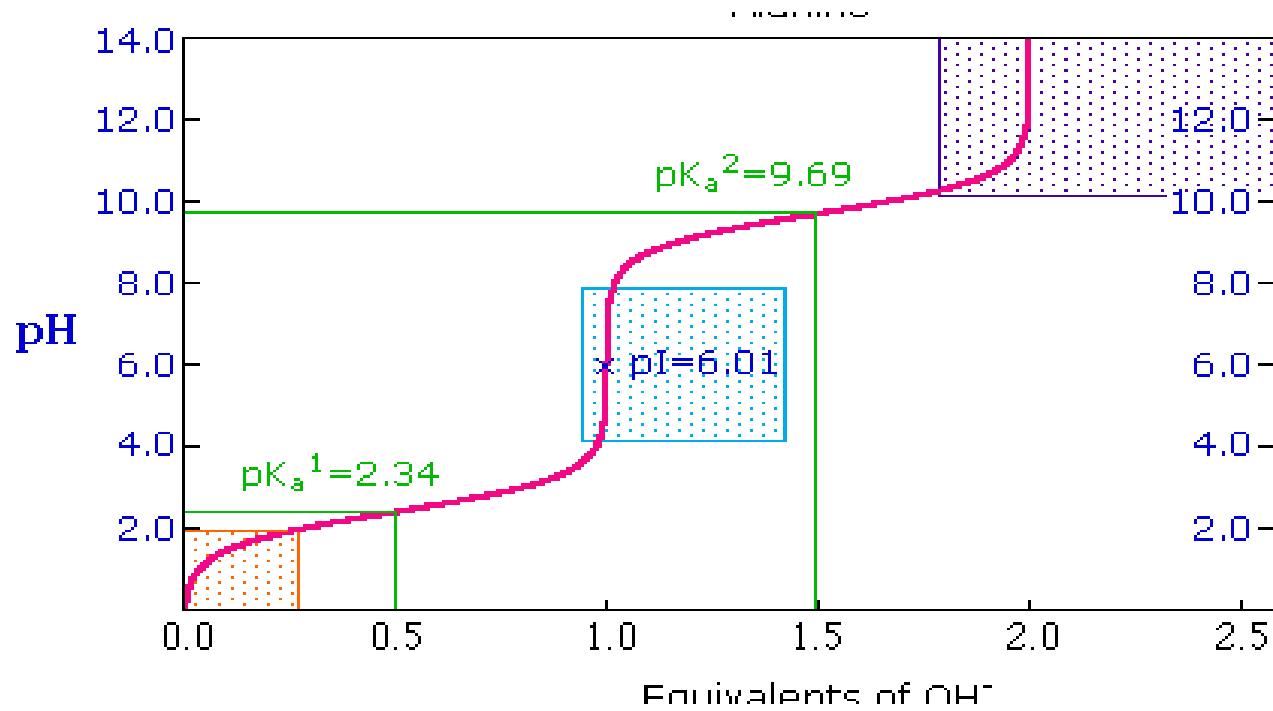
Υπολογισμός
ισοηλεκτρικού
σημείου
αμινοξέων
που περιέχουν
βασικές
πλευρικές
αλυσίδες

$$pI = 1/2 (pK_{a2} + pK_{a3})$$



Amino Acid	Abbreviation		pK ₁	pK ₂	pK _R	pI
	3- Letters	1- Letter	-COOH	-NH ₃ ⁺	R group	
Alanine	Ala	A	2.34	9.69	-	6.00
Arginine	Arg	R	2.17	9.04	12.48	10.76
Asparagine	Asn	N	2.02	8.80	-	5.41
Aspartic Acid	Asp	D	1.88	9.60	3.65	2.77
Cysteine	Cys	C	1.96	10.128	8.18	5.07
Glutamic Acid	Glu	E	2.19	9.67	4.25	3.22
Glutamine	Gln	Q	2.17	9.13	-	5.65
Glycine	Gly	G	2.34	9.60	-	5.97
Histidine	His	H	1.82	9.17	6.00	7.59
Isoleucine	Ile	I	2.36	9.60	-	6.02
Leucine	Leu	L	2.36	9.60	-	5.98
Lysine	Lys	K	2.18	8.95	10.53	9.74
Methionine	Met	M	2.28	9.21	-	5.74
Phenylalanine	Phe	F	1.83	9.13	-	5.48
Proline	Pro	P	1.99	10.60	-	6.30
Serine	Ser	S	2.21	9.15	-	5.58
Threonine	Thr	T	2.09	9.10	-	5.60
Tryptophan	Trp	W	2.83	9.39	-	5.89
Tyrosine	Tyr	Y	2.20	9.11	10.07	5.66
Valine	Val	V	2.32	9.62	-	5.96

From Lehninger Principle of Biochemistry.



Τιτλοδότηση αμινοξέος – Υπολογισμός pI

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια- Σκεύη-Όργανα

Διάλυμα υδροχλωρικής γλυκίνης 0,1 M, διάλυμα NaOH 0,1 M, ποτήρι ζέσεως 100 mL, μαγνήτης ανάδευσης, προχοΐδα, πεχάμετρο, μαγνητικός αναδευτήρας

Πειραματική πορεία

1. Προσθέτονται 10 mL διαλύματος υδροχλωρικής γλυκίνης 0,1M σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL, το οποίο είναι εφοδιασμένο με μαγνήτη και βρίσκεται πάνω σε αναδευτήρα.
2. Μετριέται το pH του διαλύματος.

3. Γεμίζεται μια προχοΐδα με διάλυμα NaOH 0,1 M.
4. Τοποθετείται το ποτήρι ζέσης με το διάλυμα της υδροχλωρικής γλυκίνης και το μαγνήτη ανάδευσης, πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα.
5. Ανοίγεται η ανάδευση σε λίγες στροφές, (ήπια ανάδευση) και προσθέτονται από την προχοΐδα 0,5 mL NaOH .



5. Αφήνεται για λίγο το διάλυμα να αναδευθεί, και μετριέται το pH με πεχάμετρο. Η σωστή ρύθμιση του πεχάμετρο ελέγχεται από πριν με τη χρήση buffers pH=10, 4 και 7.
6. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία έως ότου το pH του διαλύματος της υδροχλωρικής γλυκίνης να πάρει τιμή περίπου 12,5.

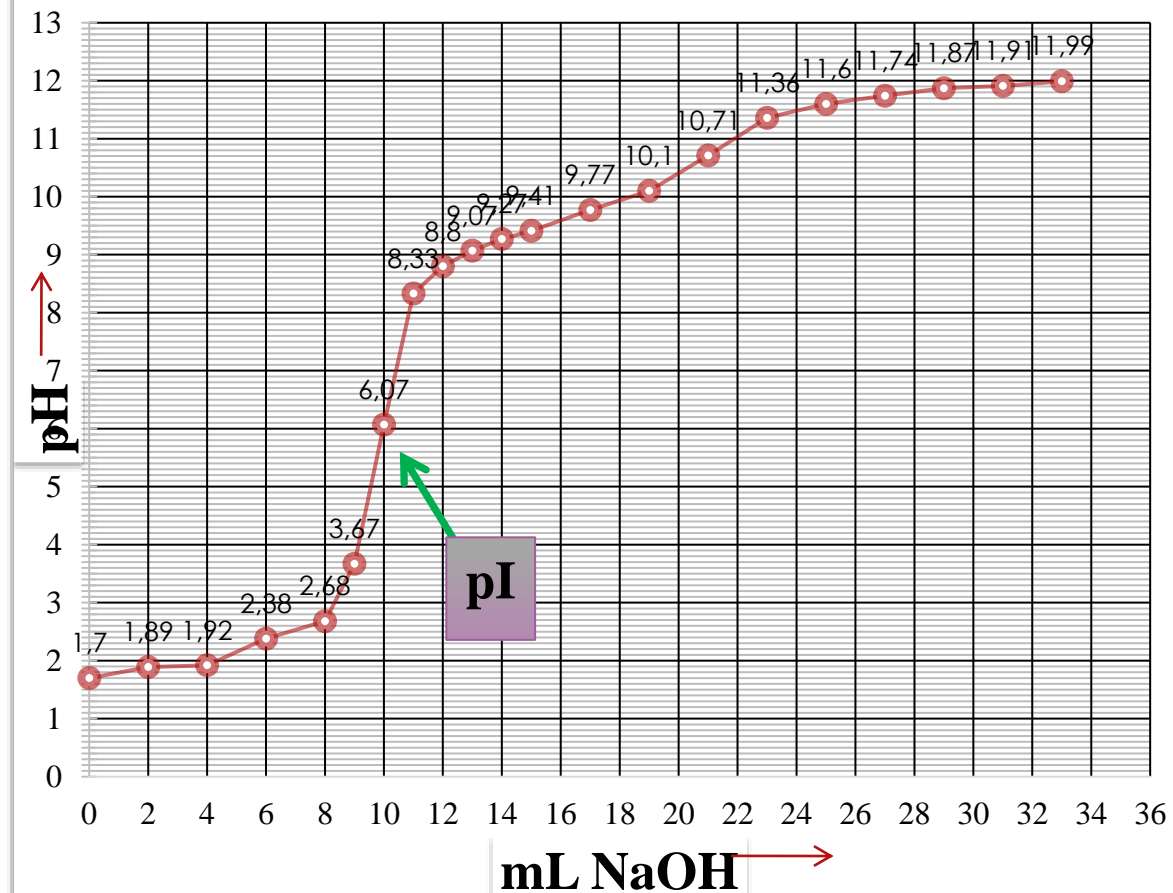
► Προσοχή χρησιμοποιείται διάλυμα υδροχλωρικής γλυκίνης 0,1 M και όχι διάλυμα γλυκίνης 0,1 M, οπότε δε χρειάζεται να γίνει τιτλοδότηση και με διάλυμα HCl 0,1 M για να βρεθεί το ισοηλεκτρικό σημείο της γλυκίνης.

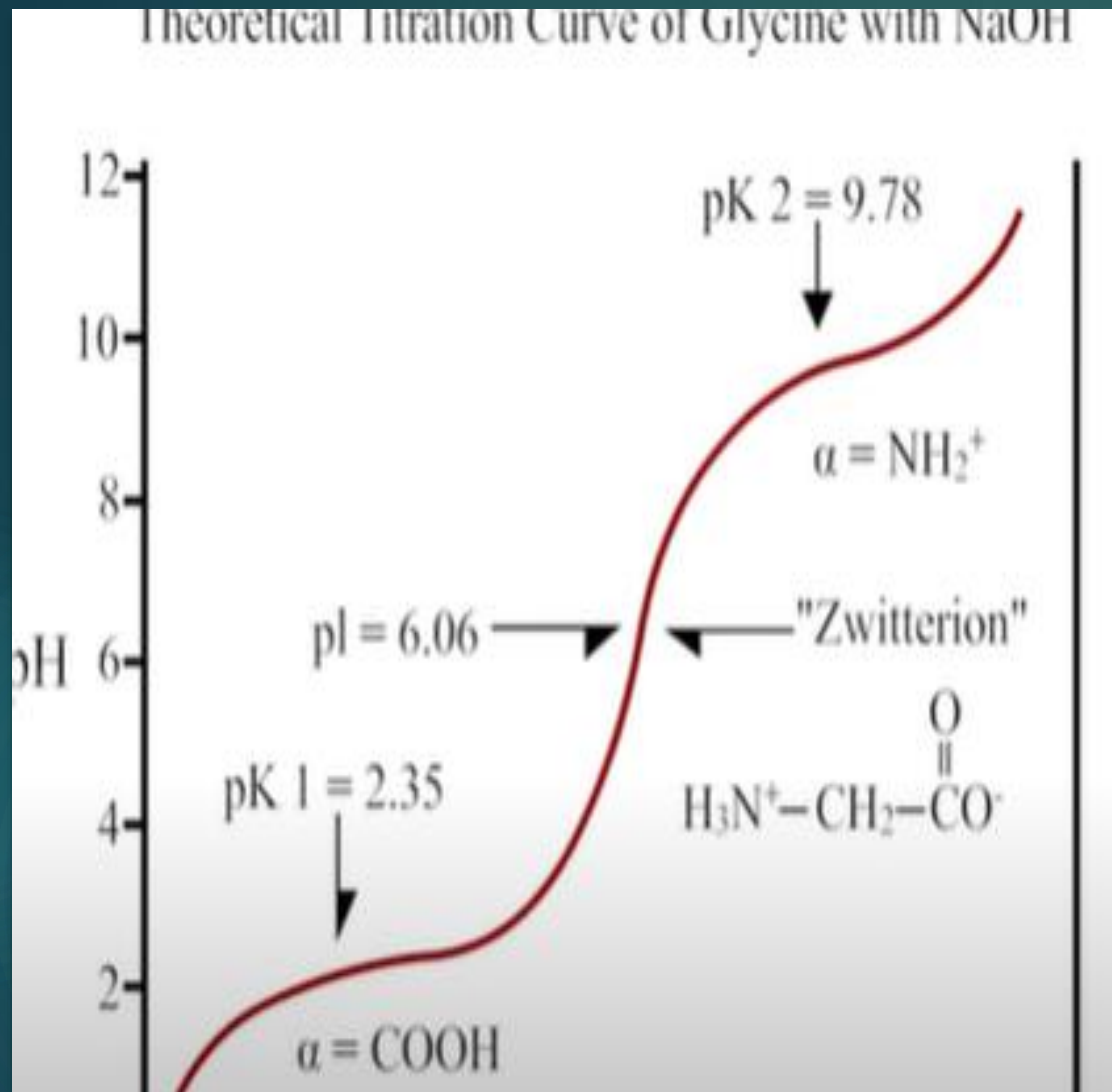
Μετρήσεις - Αποτελέσματα

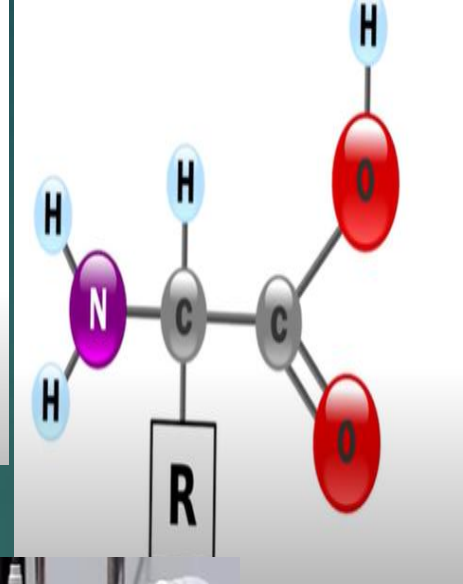
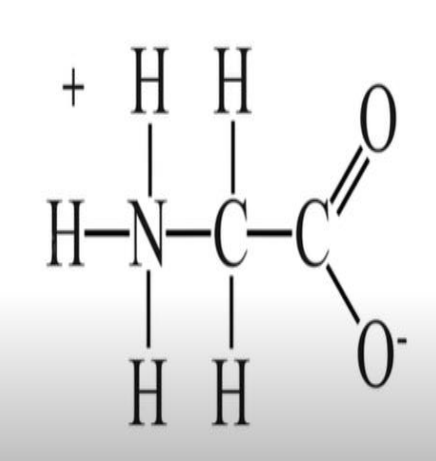
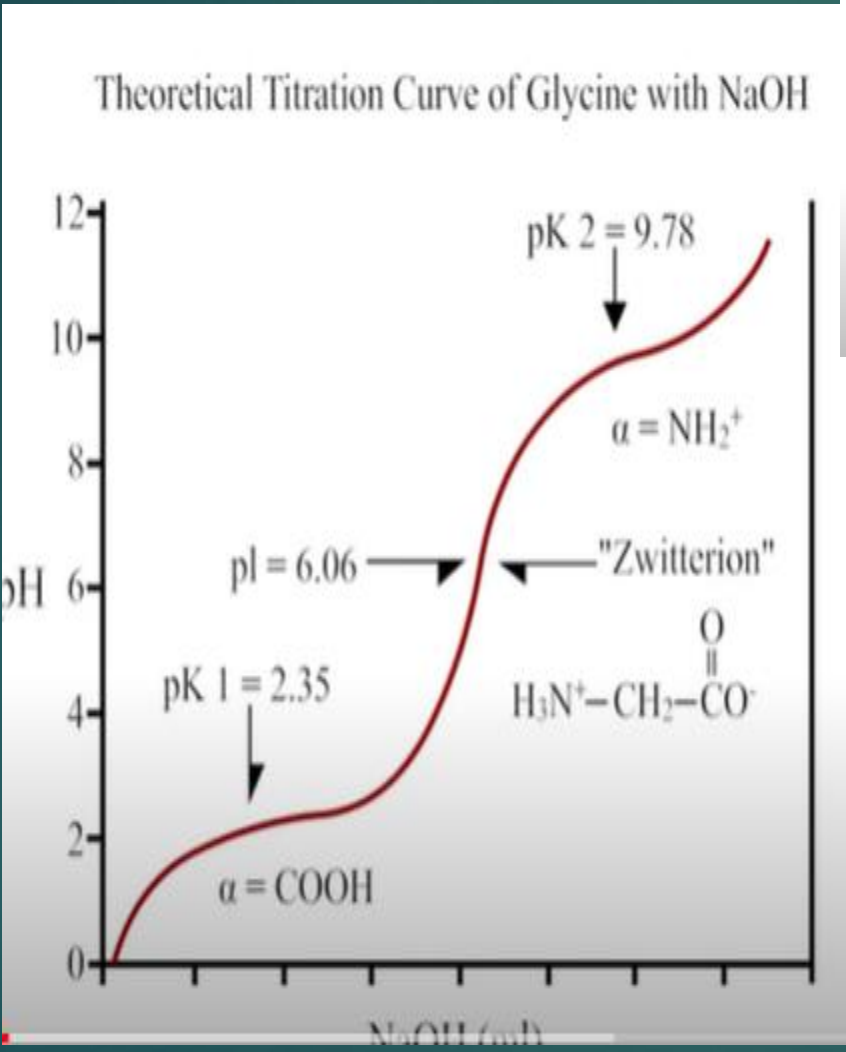
Κατασκευάζεται η γραφική παράσταση των τιμών pH συναρτήσει των mL NaOH και μέσω αυτής υπολογίζεται η τιμή του ισοηλεκτρικού σημείου της γλυκίνης.

ΣΥΝΟΛΙΚΑ ML NAOH 0,1 M	PH
0	
0,5	
1	
1,5	
.	
.	
.	
.	
.	
.	
.	
.	
.	
.	
Όσα χρειαστούν έως τιμή pH περίπου 12,5	

Τιτλοδότηση Γλυκίνης







ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- ▶ Αγγελική Απ. Γαλάνη, « Σημειώσεις Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας», Τμήμα Δ.Π.Φ.Π., Πανεπιστήμιο Πατρών, Ιούνιος 2016.
- ▶ <https://www.youtube.com/watch?v=2vInVzyXluo>
- ▶ Αλεξάνδρου Ν.Ε., Βάρβογλης Α.Γ., « Οργανική Χημεία», Εκδόσεις Ζήτη, 1996.
- ▶ JOHN MCMURRY «Οργανική Χημεία», Μετάφραση Βάρβογλης Αναστάσιος, Ορφανόπουλος Μιχάλης, Σμόνου Ιουλία, Στρατάκης Μανώλης, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2015.
- ▶ Darell Ebbing, Steven Gammon, « ΓΕΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ», Μετάφραση Κλούρας Νικόλαος, Εκδόσεις Π. Τραυλός, 2011.
- ▶ www.biochemist01.wordpress.com/tag/equilibrium-equations
- ▶ www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey5e/Ch27/ch27-1-4.html
- ▶ www.geneinfinity.org/images/aapks.jpg
- ▶ <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/protein2.htm#aacd6>
- ▶ www.chem.fsu.edu/chemlab/bch40531/Protein%20Characterization/AA%20Titration/index.html
- ▶ http://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/amino_acid_titration.pdf