



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

ΤΜΗΜΑ ΔΕΙΦΟΡΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

**3^η Εργαστηριακή Άσκηση: Αμινοξέα - Οξεοβασικές Ιδιότητες-
Αντιδράσεις Ανίχνευσης Αμινοξέων**

Γαλάνη Αγγελική Χημικός PhD, ΕΔΙ.Π. - Διονυσοπούλου Εύα Βιολόγος PhD, Ε.ΔΙ.Π.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

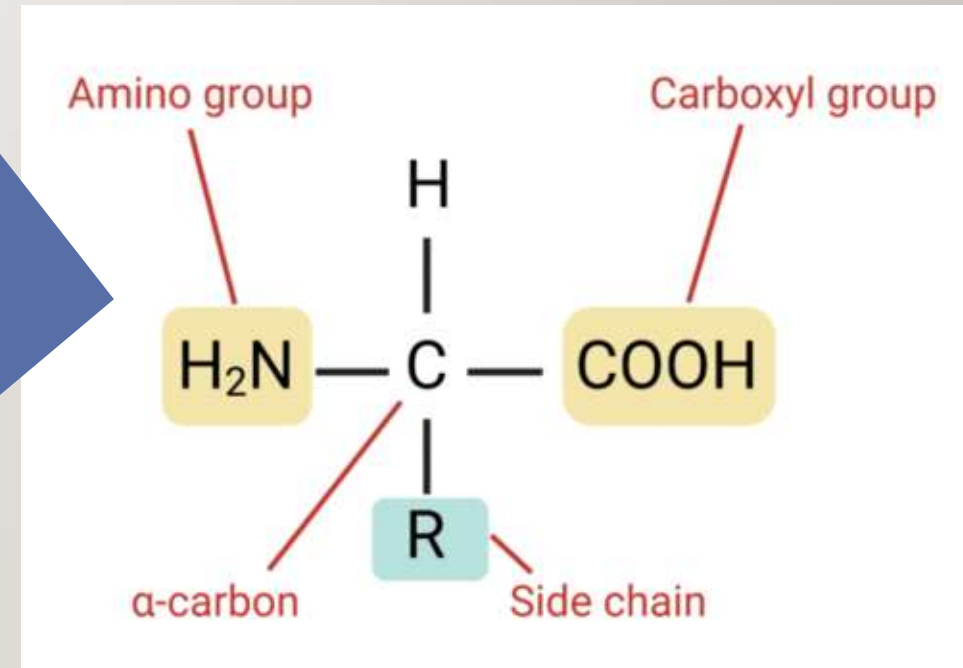


ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Οργανικά μόρια με δύο λειτουργικές ομάδες
- μια βασική αμινομάδα
- μια όξινη καρβοξυλομάδα

20 αμινοξέα παρουσιάζουν μεγάλο βιοχημικό ενδιαφέρον, διότι αποτελούν τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών.

- Σε αυτά ο τετραεδρικός άλφα άνθρακας (Ca), συνδέεται ομοιοπολικά με την αμινομάδα και την καρβοξυλομάδα και βρίσκεται στο κέντρο της δομής.
- Συνδεδεμένα σε αυτόν τον Ca βρίσκονται ένα υδρογόνο και μια διαφορετική για κάθε αμινοξύ πλευρική ομάδα R που δίνει την ταυτότητά του.

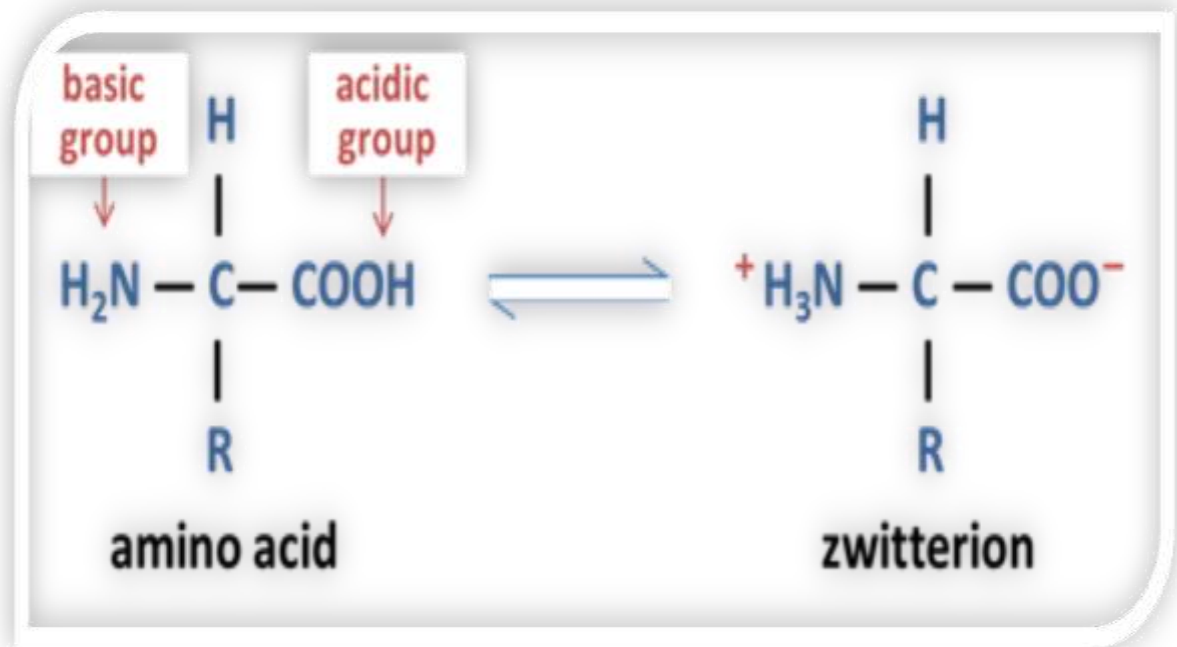


Η εξαιρετικά μεγάλη ποικιλότητα των πρωτεϊνών της φύσης οφείλεται στις ιδιότητες των 20 α-αμινοξέων που απαντώνται στις πρωτεΐνες:

- ✓ ικανότητα πολυμερισμού
- ✓ οξεοβασικές ιδιότητες
- ✓ δομική ποικιλομορφία και χημική λειτουργικότητα πλευρικών ομάδων (-R)
 - ✓ χειρομορφία

Σε ουδέτερο διάλυμα (pH=7) η καρβοξυλομάδα βρίσκεται με τη μορφή COO^- και η αμινομάδα με τη μορφή NH_3^+ .

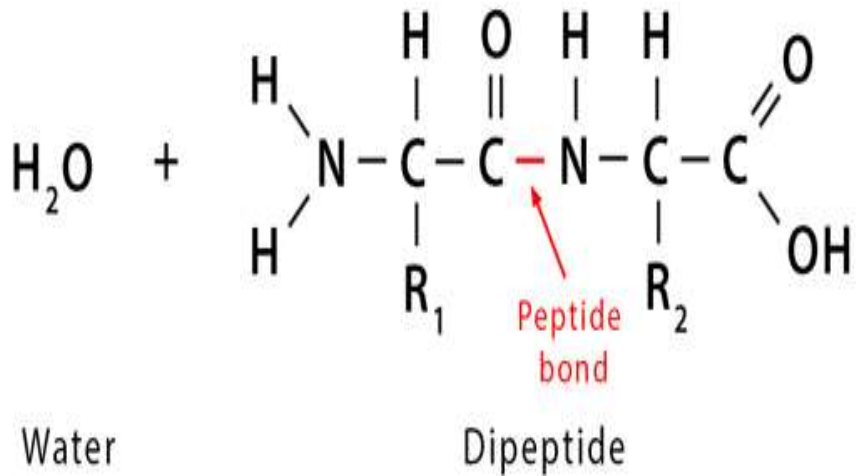
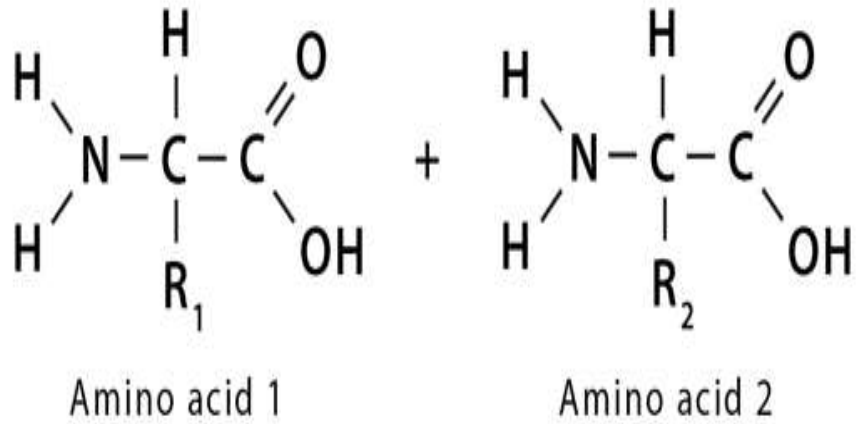
Το αμινοξύ το οποίο σε αυτή την περίπτωση προκύπτει έχει ένα αρνητικό και ένα θετικό φορτίο, άρα είναι ουδέτερο μόριο το οποίο καλείται διπολικό ιόν (zwitterion).





ΤΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΕΙΝΑΙ ΧΕΙΡΟΜΟΡΦΑ ΜΟΡΙΑ

- Ο α-άνθρακας ονομάζεται ασύμμετρος γιατί σε αυτόν συνδέονται 4 διαφορετικοί υποκαταστάτες (εκτός της γλυκίνης στην οποία η ομάδα R είναι H).
- Οι δύο πιθανές απεικονίσεις για τον α-άνθρακα είναι ισομερή μη ταυτόσημων κατοπτρικών ειδώλων, δηλαδή εναντιομερή.



ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ

- Οι αμινομάδες και οι καρβοξυλομάδες των αμινοξέων μπορούν να αντιδρούν μεταξύ τους με κατεύθυνση από την κεφαλή στην ουρά, με αφαίρεση ενός μορίου νερού και σχηματισμό ομοιοπολικού αμιδικού δεσμού που στην περίπτωση των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών ονομάζεται πεπτιδικός δεσμός.
- Η επανάληψη της παραπάνω αντίδρασης, παράγει πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες .

Τα πεπτίδια είναι δυνατόν να ταξινομηθούν σύμφωνα με τον αριθμό αμινοξέων που περιέχουν ως εξής:

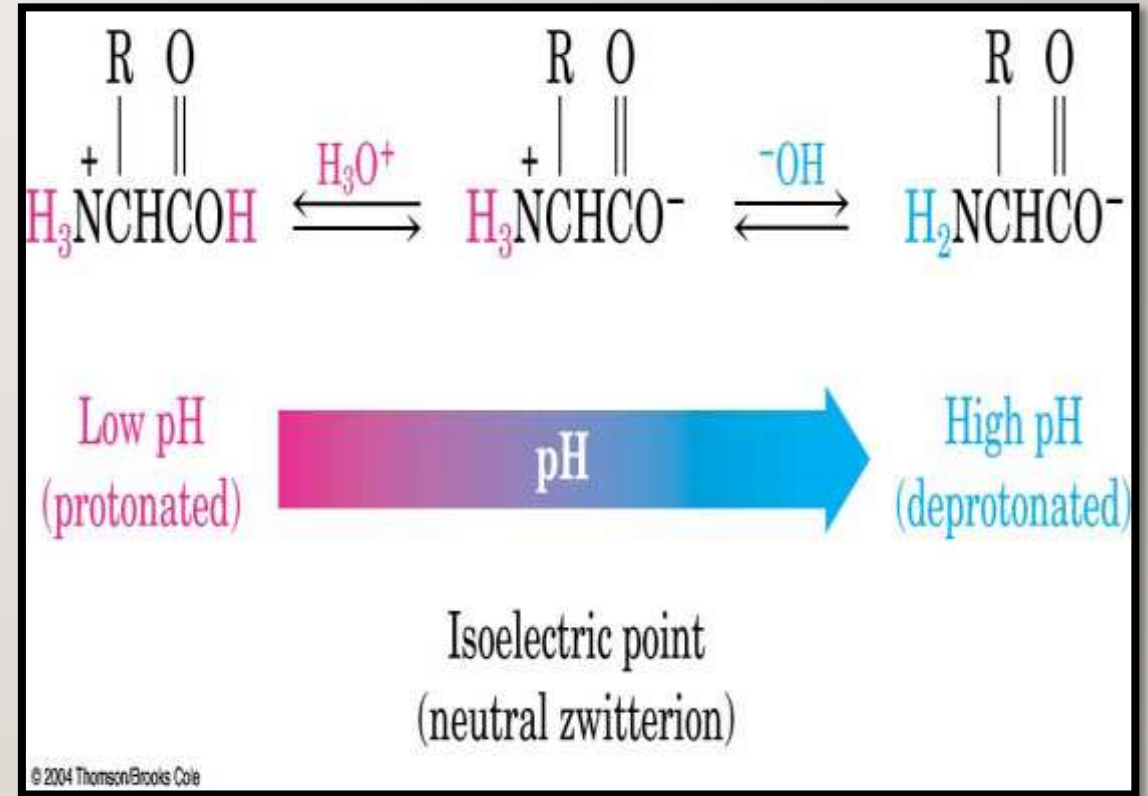
- **Πεπτίδιο:** Μικρά πολυμερή αμινοξέων. Κάθε πεπτίδιο ταξινομείται σύμφωνα με τον αριθμό μονάδων αμινοξέων στην αλυσίδα. **Κάθε μονάδα καλείται κατάλοιπο αμινοξέος.** Ο όρος κατάλοιπο υποδηλώνει ότι απομένει μετά την απελευθέρωση νερού όταν το αμινοξύ σχηματίζει πεπτιδικό δεσμό με την ένωσή του στην πεπτιδική αλυσίδα.
- **Διπεπίδια, τριπεπίδια κλπ.:** Περιέχουν 2. 3...κλπ κατάλοιπα αμινοξέων.
- **Ολιγοπεπίδια:** Πεπτιδικές αλυσίδες με περισσότερα των 12 και λιγότερα των 20 κατάλοιπων αμινοξέων.
- **Πολυπεπτίδιο:** Όταν το μήκος της αλυσίδας υπερβαίνει αρκετές δωδεκάδες αμινοξέων.
- **Πρωτεΐνες:** Μόρια που αποτελούνται από μια ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

ΟΞΕΟΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

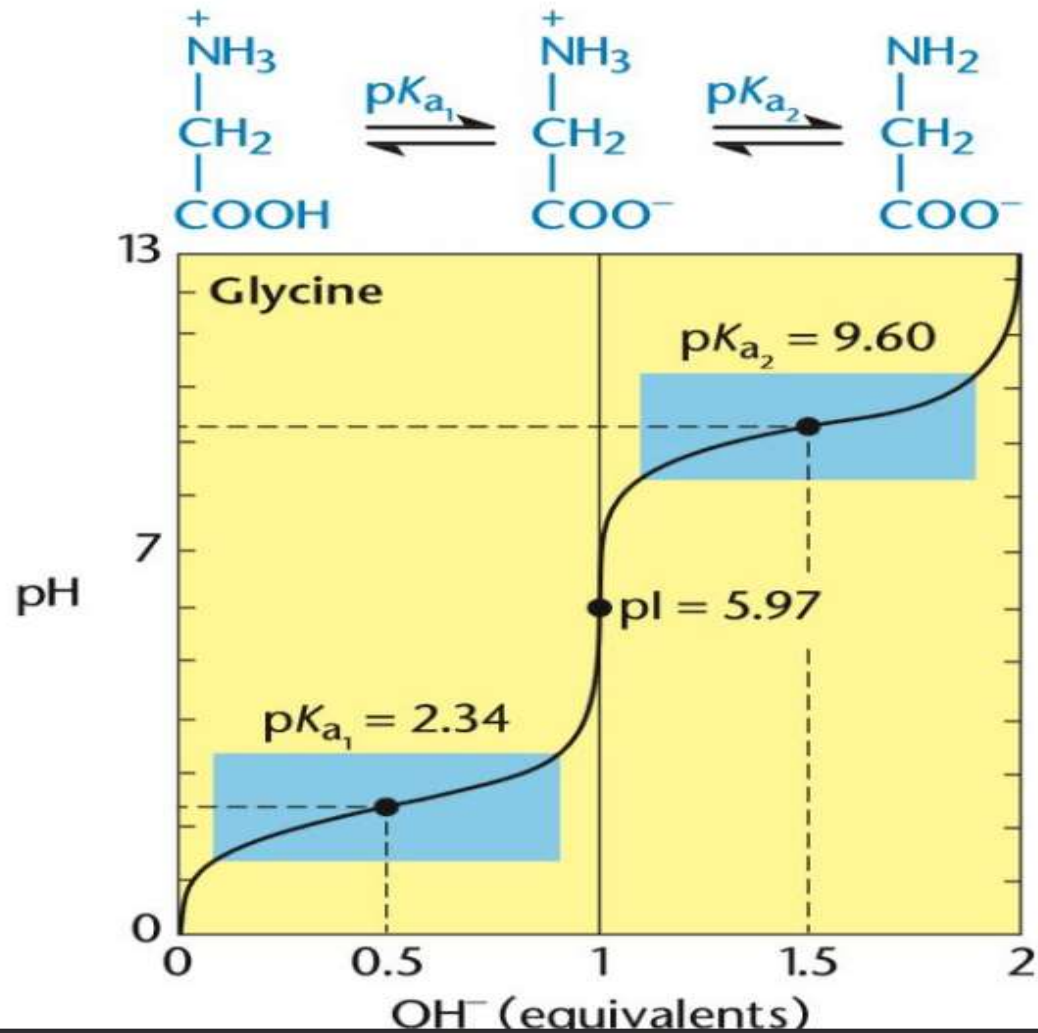
- Τα κοινά αμινοξέα είναι όλα ασθενή πολυπρωτικά οξέα.
- Επειδή οι ιονιζόμενες ομάδες δεν δίστανται ισχυρά, ο βαθμός διάστασης εξαρτάται από το pH του μέσου στο οποίο βρίσκονται.
 - Όλα τα αμινοξέα περιέχουν τουλάχιστον δύο διστάμενα υδρογόνα.
- Οι πλευρικές αλυσίδες πολλών αμινοξέων περιέχουν και αυτές διστάμενες ομάδες

Ισοηλεκτρικό σημείο

- Σε διαλύματα οξέων με χαμηλό pH, τα αμινοξέα πρωτονιώνονται και βρίσκονται με την κατιονική τους μορφή.
- Σε διαλύματα βάσης με υψηλό pH, τα αμινοξέα βρίσκονται με την ανιονική τους μορφή, διότι αποπρωτονιώνονται.
- Ισοηλεκτρικό σημείο αμινοξέος, καλείται εκείνη η ενδιάμεση τιμή pH διαλύματός του, στην οποία το αμινοξύ εξισορροπεί ανάμεσα στην ανιονική και κατιονική του μορφή και βρίσκεται με την ουδέτερη μορφή του διπολικού του ιόντος.



chain has an ionizable group)



3m 15m 4d

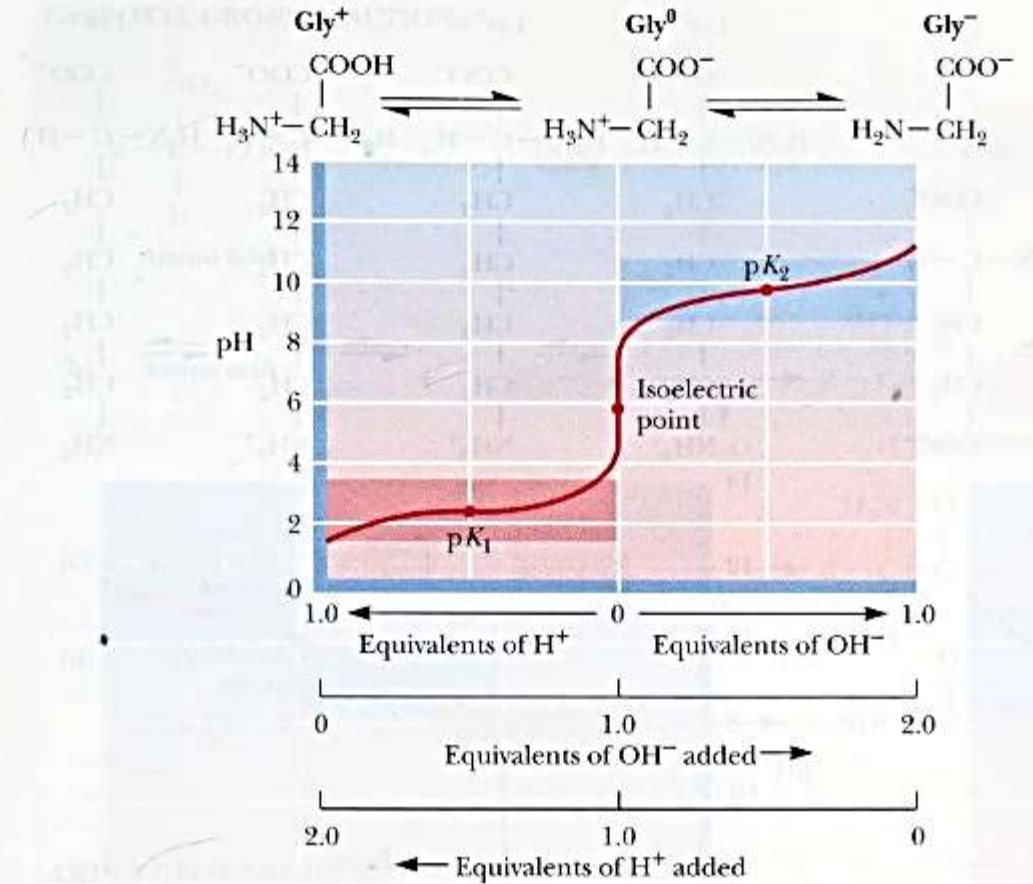
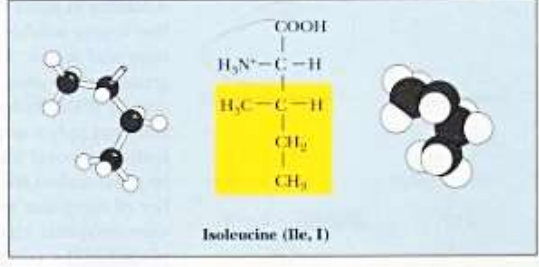
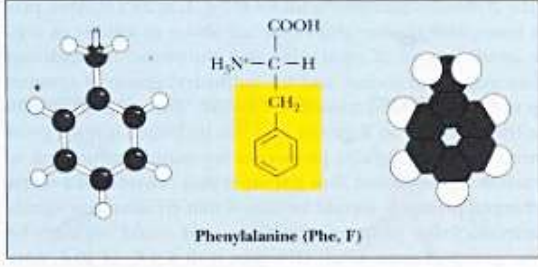
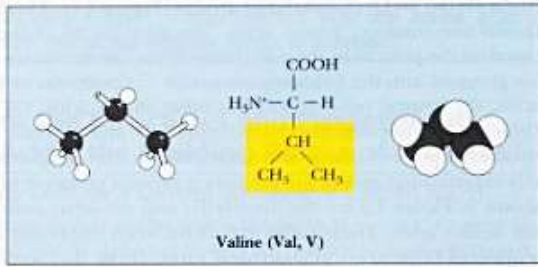
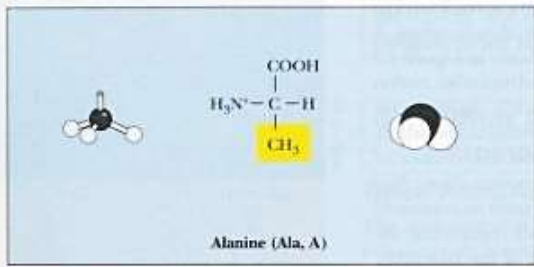
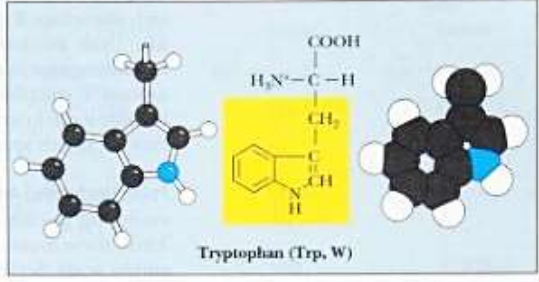
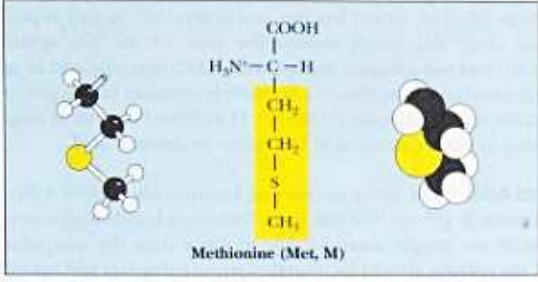
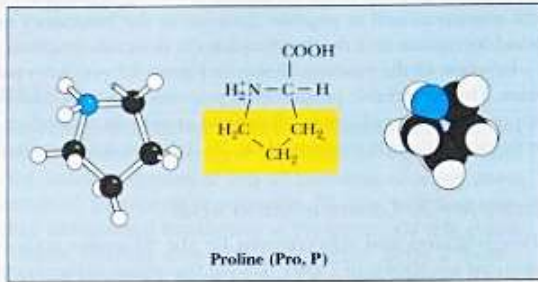
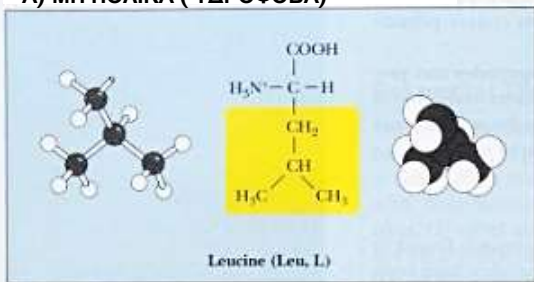


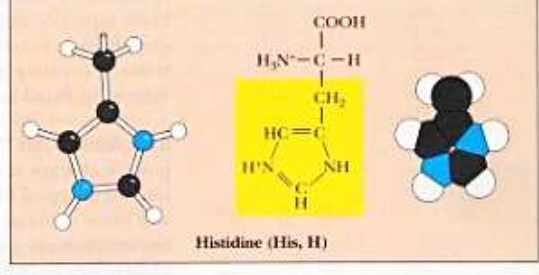
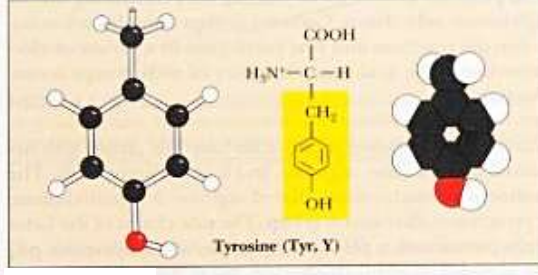
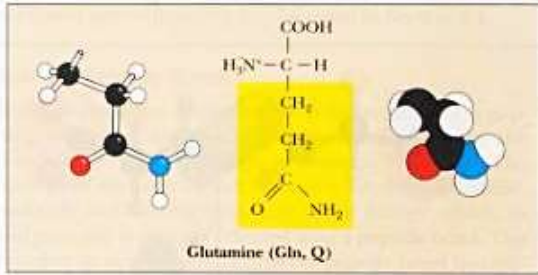
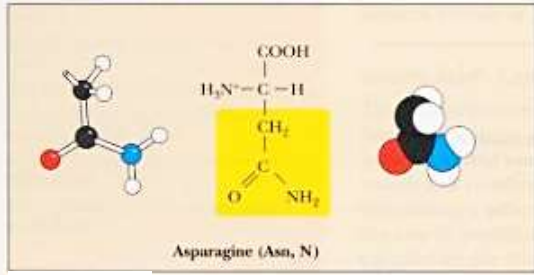
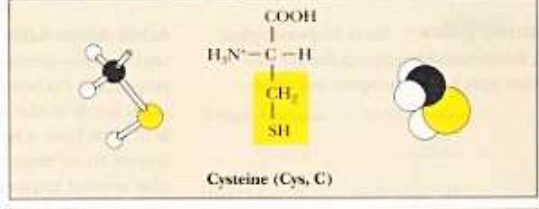
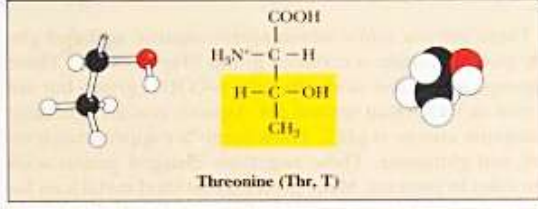
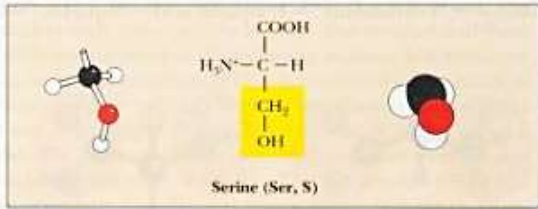
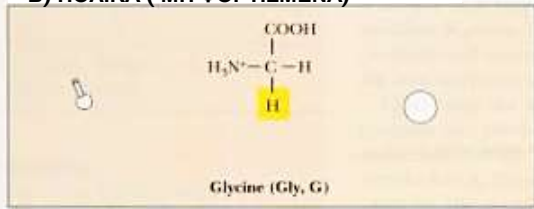
FIGURE 4.7 Titration of glycine, a simple amino acid. The isoelectric point, pI , the pH where glycine has a net charge of 0, can be calculated as $(pK_1 + pK_2)/2$.

Τιτλοδότηση γλυκίνης

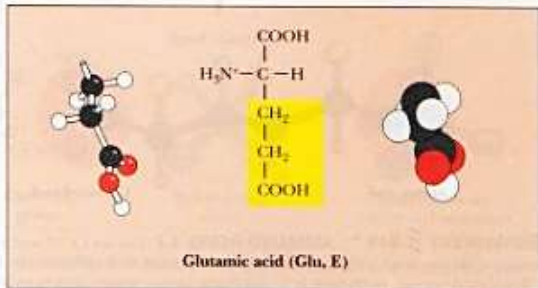
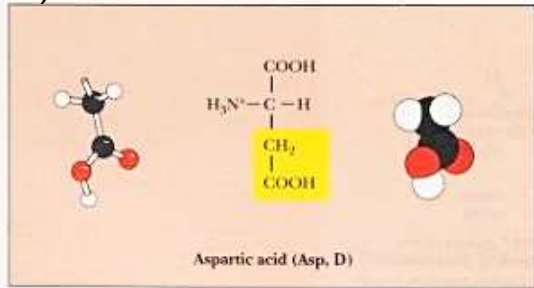
Α) ΜΗ ΠΟΛΙΚΑ (ΥΔΡΟΦΟΒΑ)



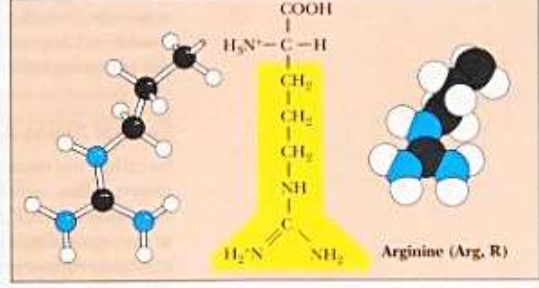
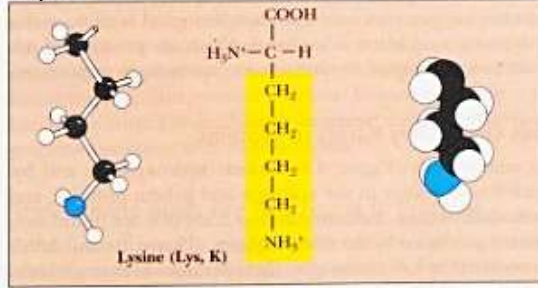
Β) ΠΟΛΙΚΑ (ΜΗ ΦΟΡΤΙΣΜΕΝΑ)



Γ) ΟΞΙΝΑ



Δ) ΒΑΣΙΚΑ



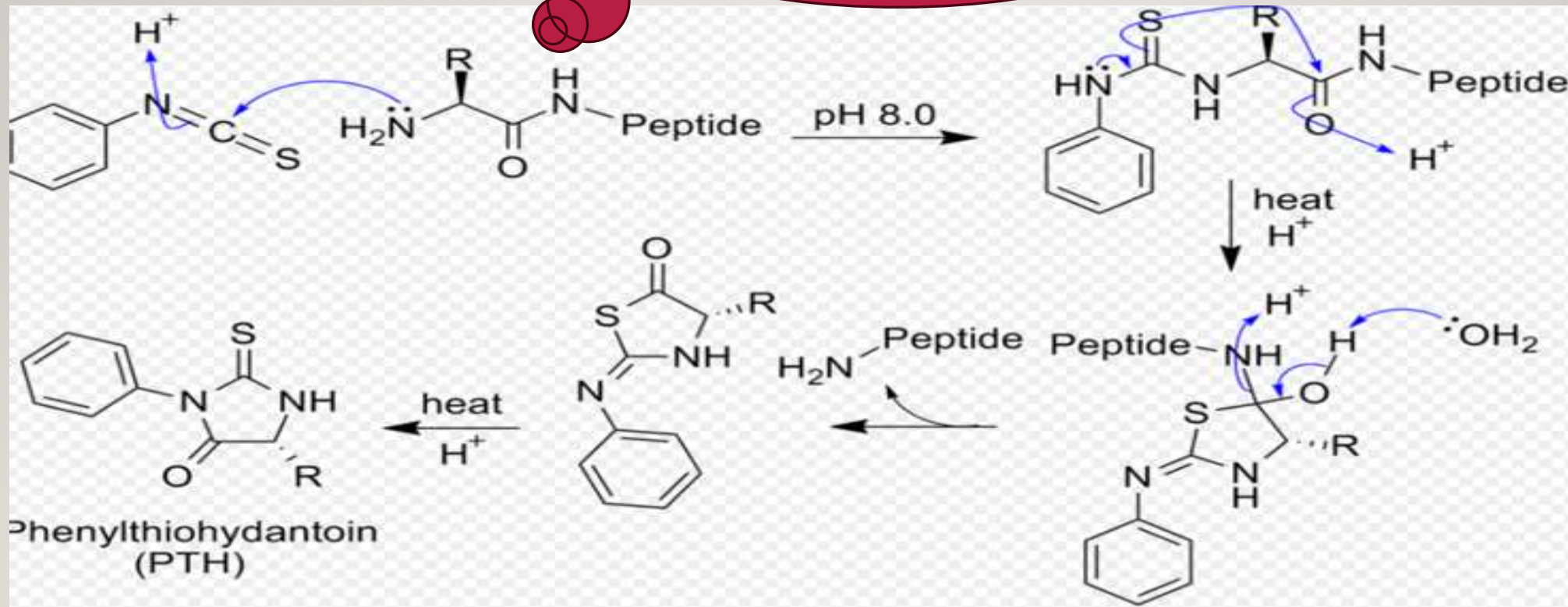
ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ EDMAN

- Υπάρχουν κάποιες αντιδράσεις αμινοξέων πολύ σημαντικές διότι παίζουν βασικό ρόλο στην αποικοδόμηση, την αλληλουχία και τη χημική σύνθεση των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών.
- Σε αυτές συγκαταλέγεται και η αντίδραση με φαινυλοϊσοθειοκυανικό, ή αντιδραστήριο Edman, η οποία τελικά δίνει παράγωγο φαινυλοθειοϋδαντοϊνης (PTH) του αμινοξέος.
- Τα PTH αμινοξέα στη συνέχεια μπορούν να ταυτοποιηθούν και να προσδιοριστούν ποσοτικά με τη χρήση σύγχρονων μηχανημάτων.

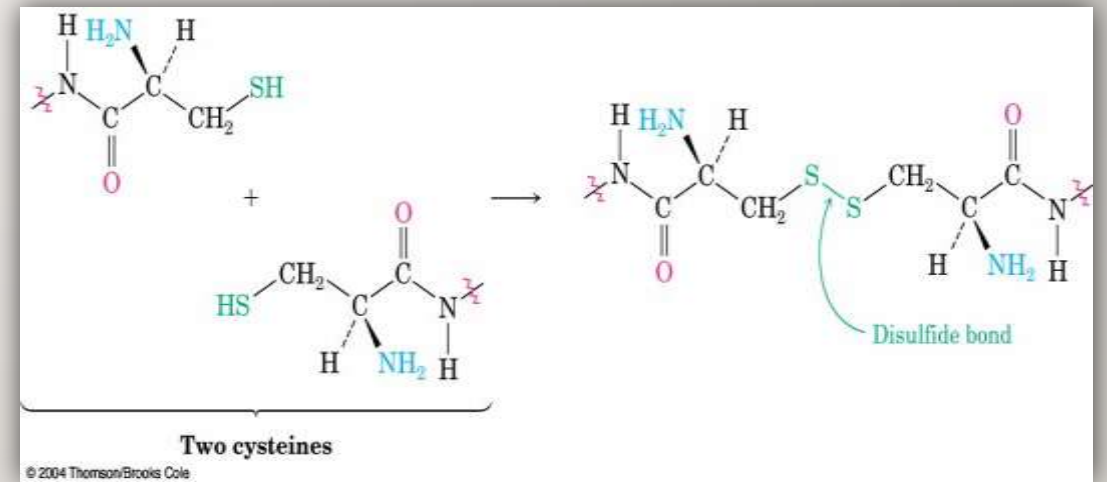
Προστίθεται ισοθειοκυανικό φαινύλιο στο πεπτίδιο και με τον τρόπο αυτό αποσπάται κάθε φορά ένα αμινοξύ από το N- τελικό άκρο του.

Σε αυτό στηρίζεται η εύρεση της αλληλουχίας των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης, που σήμερα βέβαια γίνεται με ειδικά αυτοματοποιημένα όργανα.



ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΙΣΟΥΛΦΙΔΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ

- Μια σημαντική αντίδραση της πλευρικής αλυσίδας των αμινοξέων, είναι ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μέσω αντίδρασης μεταξύ δυο κυστεϊνών.
- Συχνά δισουλφιδικοί δεσμοί ανάμεσα σε υπολείμματα κυστεΐνης δυο διαφορετικών αλυσίδων, συνδέουν τις αλυσίδες.



ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

- Πολλές λεπτομέρειες της δομής και της χημείας των αμινοξέων, αποσαφηνίσθηκαν ή και επιβεβαιώθηκαν με τη βοήθεια φασματοσκοπικών μετρήσεων.
 - **Κανένα αμινοξύ δεν απορροφά στην περιοχή του ορατού.**
- **Αρκετά αμινοξέα απορροφούν στην περιοχή του υπεριώδους** (φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, τρυπτοφάνη).
 - **Όλα τα αμινοξέα απορροφούν στην περιοχή του υπερύθρου.**
- Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των αμινοξέων είναι αρκετά ευαίσθητα στο περιβάλλον τους και οι χημικές μετατοπίσεις των επι μέρους σημάτων NMR έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύσουν τους ιοντισμούς των αμινοξέων οι οποίοι εξαρτώνται από το pH.

ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΙΓΜΑΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Επιτυγχάνεται με βάση τις διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων και ειδικότερα βασίζεται στις διαφορές στη διαλυτότητα και στον ιοντισμό των αμινοξέων.

- ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ
(Η τάση να σχετίζονται με ένα διαλύτη ή φάση σε σχέση με άλλο)

- ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΙ ΒΑΣΗ ΤΟΥ
ΗΛΕΚΤΡΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ

ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής
- Αέρια χρωματογραφία (GC)
- Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC): Η τεχνική επιλογής για τους περισσότερους σύγχρονους βιοχημικούς Υψηλή ανάλυση, ευαισθησία και ταχύτητα αντισταθμίζουν το μειονέκτημα της μικρής χωρητικότητας

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
Αντιδράσεις ανίχνευσης
αμινοξέος

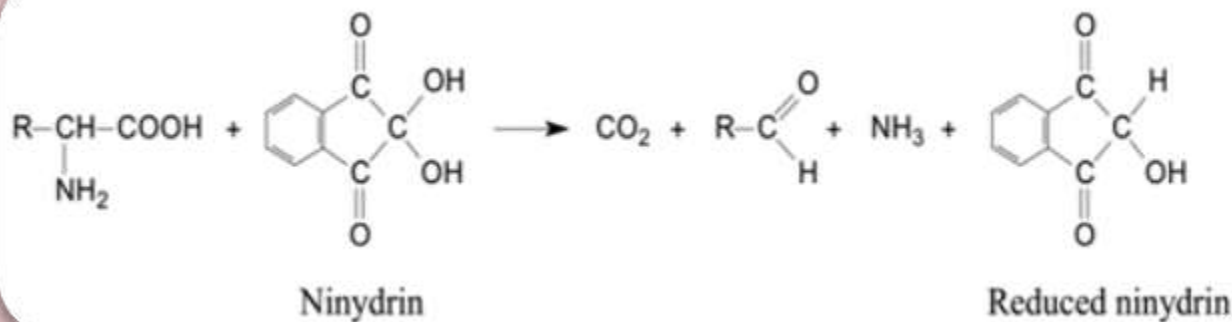


ΔΟΚΙΜΗ ΝΙΝΥΔΡΙΝΗΣ

Νινυδρίνη

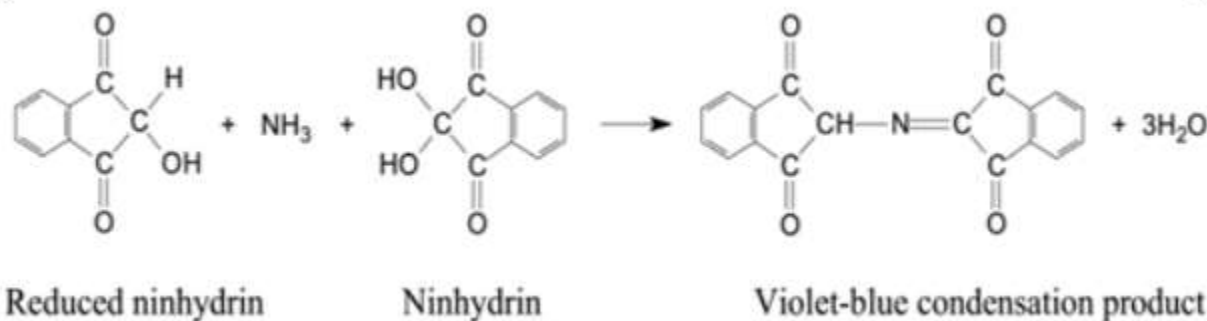
χημικός τύπος : C₉H₆O₄

ονομασία IUPAC: 2,2-διυδροξυινδανο-1,3-διόνη



Η **δοκιμή νινυδρίνης** είναι μια χημική δοκιμή που χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί εάν μια δεδομένη αναλυόμενη ουσία περιέχει **αμίνες ή α-αμινοξέα**.

Σε αυτή τη δοκιμή, η νινυδρίνη προστίθεται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει διάλυμα της αναλυόμενης ουσίας.





Δοκιμή Νινυδρίνης

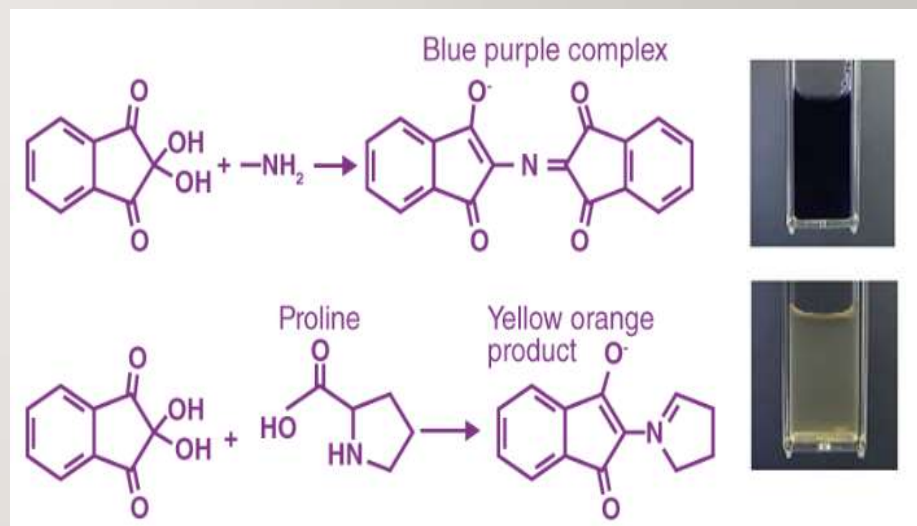


Η ανάπτυξη βαθύ μπλε χρώματος υποδηλώνει την παρουσία αμμωνίας, πρωτοταγών/δευτερογενών αμινών ή αμινοξέων στην αναλυόμενη ουσία.

Για την υδροξυπρολίνη και την προλίνη, λαμβάνεται ένα κίτρινο –πορτοκαλί χρώμα.

Για την ασπαραγίνη, λαμβάνεται καφέ χρώμα.

Εάν δεν παρατηρηθεί αλλαγή χρώματος, η αναλυόμενη ουσία δεν περιέχει αμινοξέα, αμίνες ή αμμωνία.

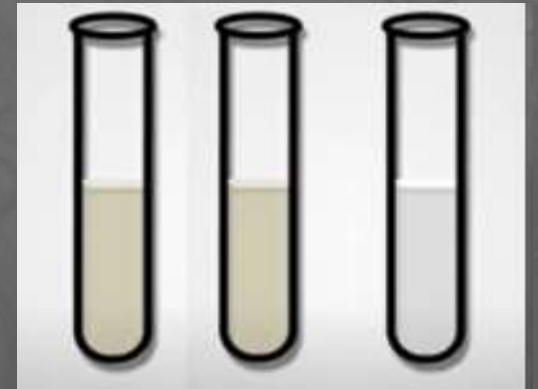


ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΣΚΕΥΗ - ΟΡΓΑΝΑ

- ✓ Διάλυμα νινυδρίνης σε ακετόνη ή αιθανόλη
(0,2 g νινυδρίνης διαλύονται σε 10 mL αιθανόλης ή ακετόνης)
- ✓ Διαλύματα αμινοξέων 1% w/v σε απεσταγμένο νερό
1% τυροσίνη (Tyr), 1% τρυπτοφάνη (Try), 1% ασπαραγίνη (Asn)
1% φαινυλαλανίνη (Phe)
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες
- ✓ Πιπέτες παστέρ
- ✓ Θερμαντικές πλάκες
- ✓ Ποτήρια ζέσεως

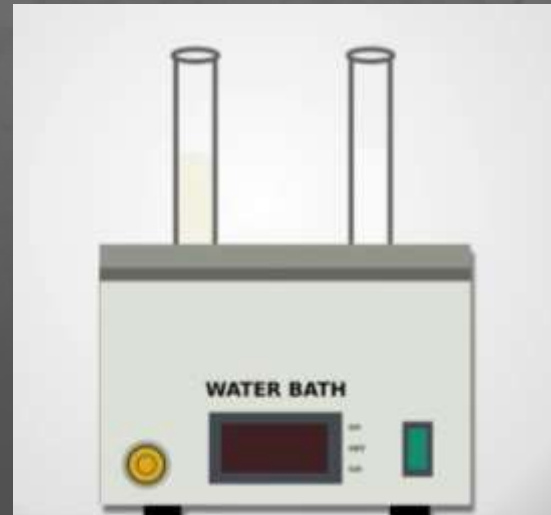
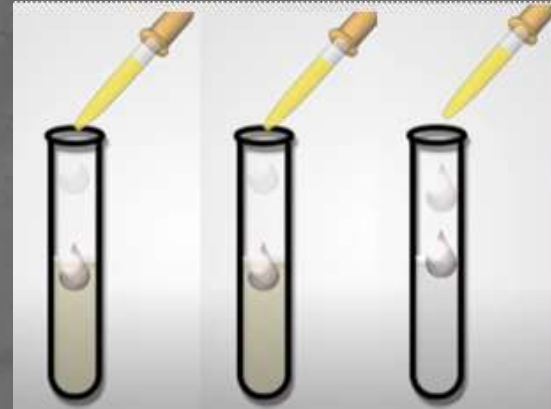
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

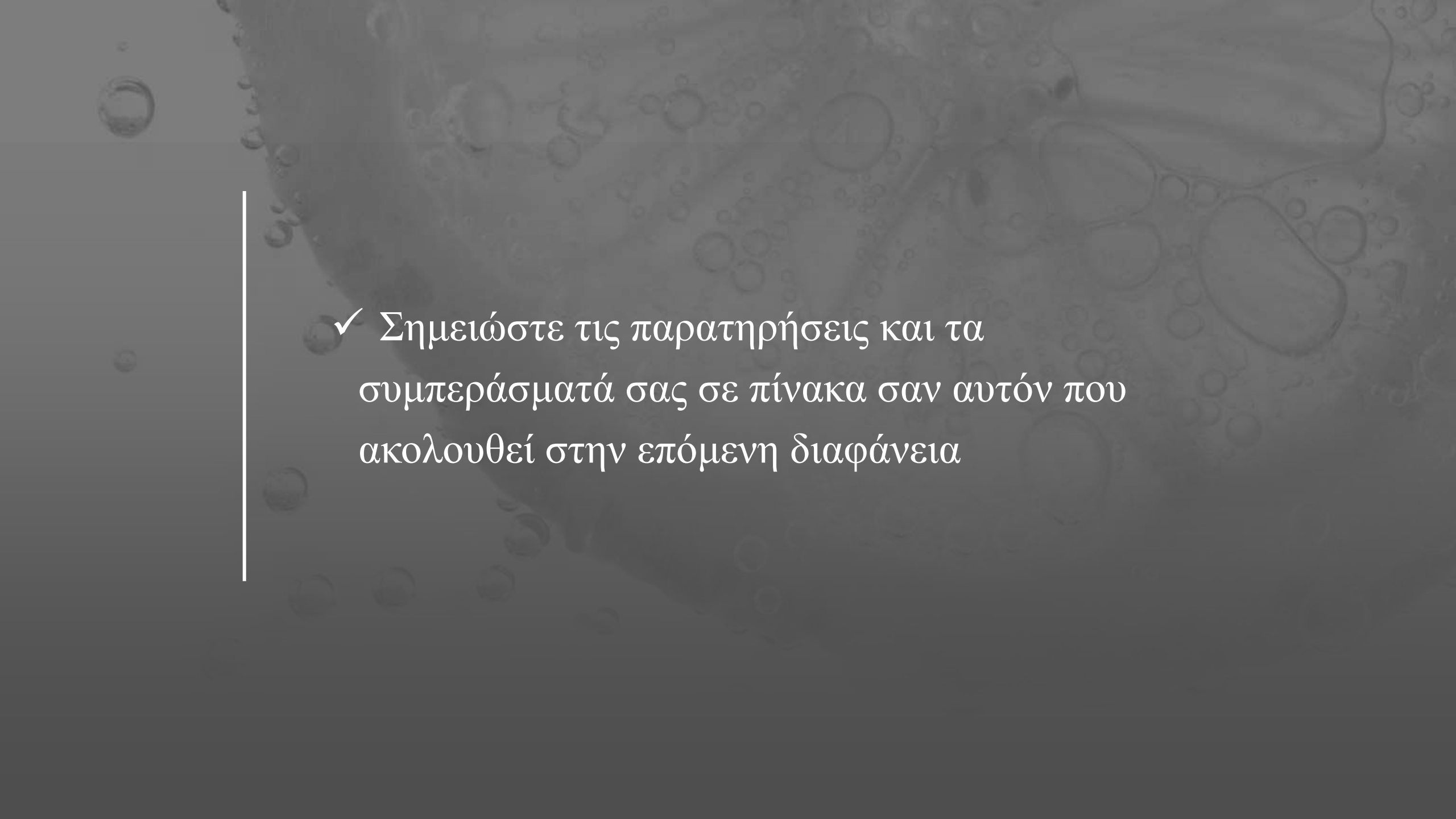
- ✓ Θα σας δοθούν 2 ξεχωριστά δείγματα
- ✓ Αριθμήστε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες και προσθέστε στον πρώτο 1 ml από το 1^ο δείγμα στον δεύτερο 1 mL από το 2^ο δείγμα. Στον τρίτο σωλήνα προσθέστε 1 mL απεσταγμένου νερού και χρησιμοποιήστε τον ως blank



✓ Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα,
ρίξτε μερικές σταγόνες
διαλύματος νινυδρίνης.

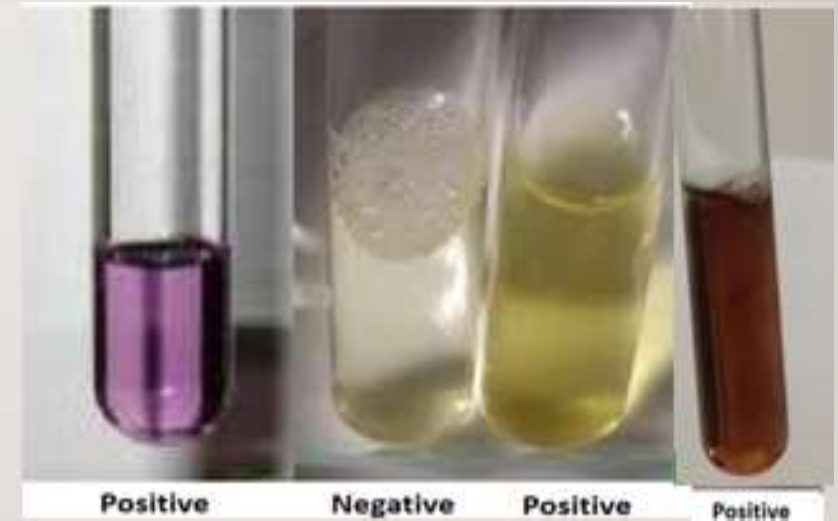
✓ Θερμάνετε τους σωλήνες στους
95°C για 2-5 λεπτά



- 
- ✓ Σημειώστε τις παρατηρήσεις και τα συμπεράσματά σας σε πίνακα σαν αυτόν που ακολουθεί στην επόμενη διαφάνεια

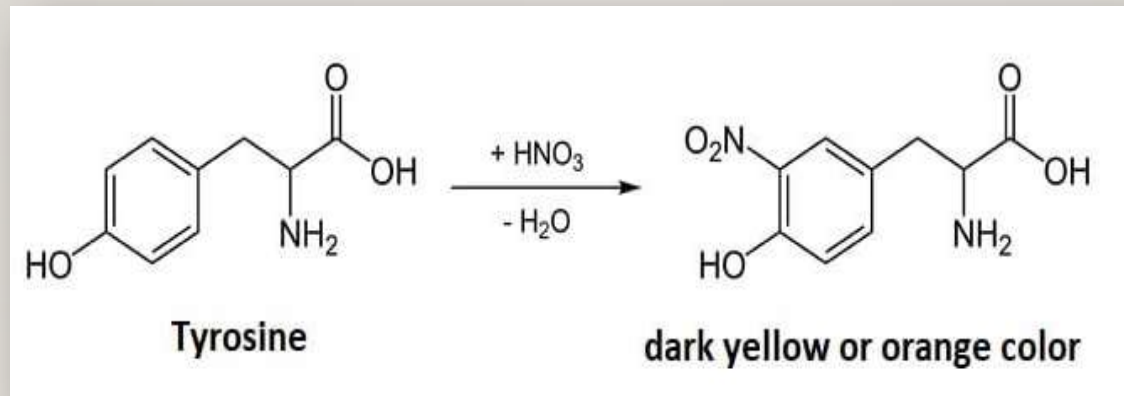
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

	1ος σωλήνας	2ος σωλήνας	3ος σωλήνας
Παρατηρήσεις			
Συμπέρασμα			

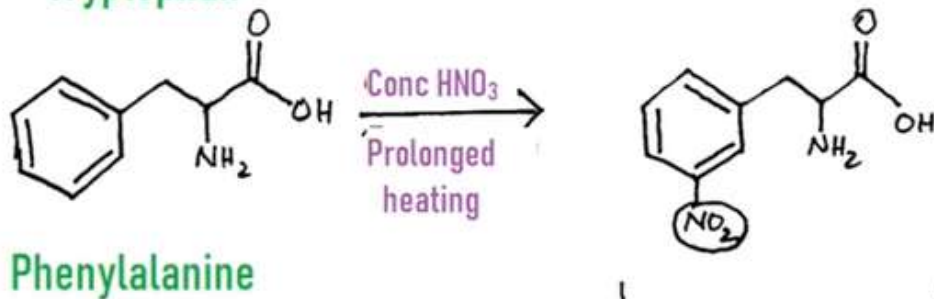
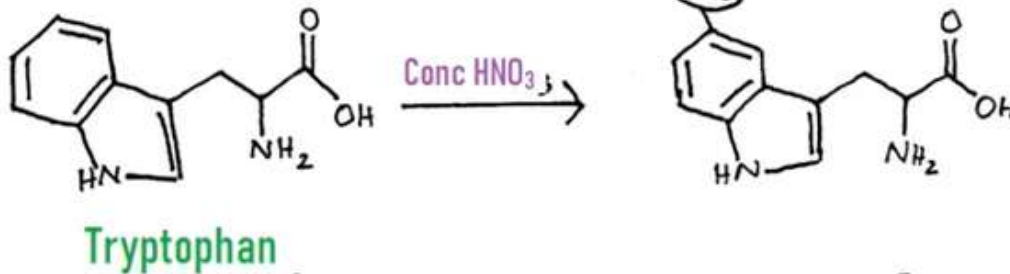
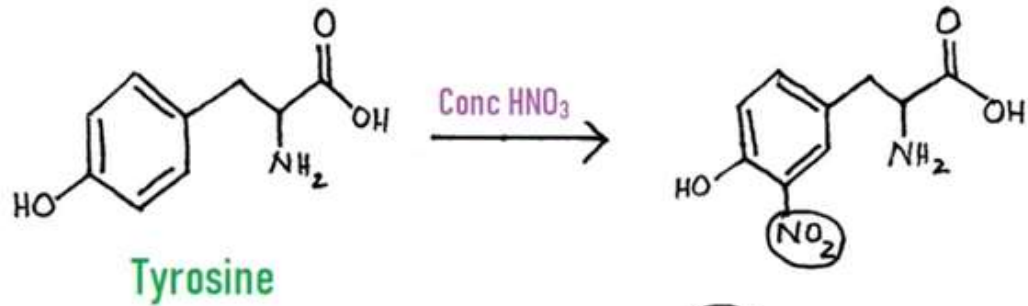


ΔΟΚΙΜΗ ΕΑΝΘΡΩΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

- Την αντίδραση δίνουν τα αρωματικά αμινοξέα, τυροσίνη (Tyr) και θρυπτοφάνη (Trp).
- Πραγματοποιείται με προσθήκη πυκνού HNO_3 σε διάλυμα αμινοξέος, οπότε μετά από θέρμανση παρατηρείται εμφάνιση κίτρινου χρώματος λόγω του σχηματισμού νιτροπαραγώγων.
- Το χρώμα της αντίδρασης ενισχύεται με την προσθήκη NaOH .
- Η φαινυλαλανίνη (Phe), δίνει επίσης την αντίδραση όμως απαιτείται προσθήκη H_2SO_4 μετά την προσθήκη του HNO_3 .



Ξανθοπρωτεϊνικές Αντιδράσεις



Alkali

Eg: NaOH

Ξανθοπρωτεϊνικά
Άλατα
(Πορτοκαλί χρώμα)

Ξανθοπρωτεϊνικά Οξέα
(Κίτρινο χρώμα)



ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΚΕΥΗ - ΟΡΓΑΝΑ

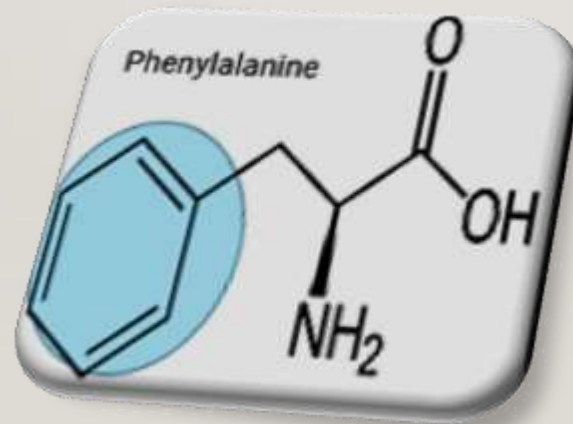
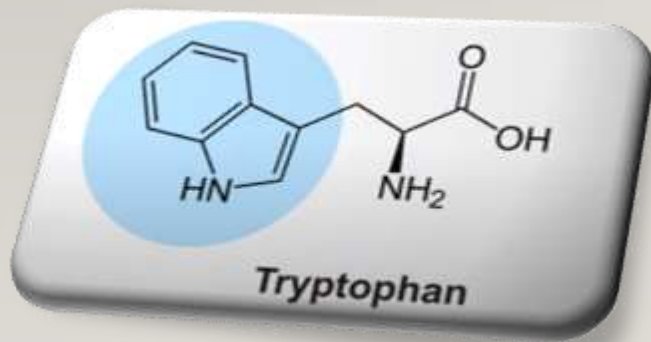
➤ 1% διαλύμα τυροσίνης, 1% διάλυμα Τρυπτοφάνης, 1% διάλυμα φαινυλαλανίνης

➤ πυκνό HNO₃

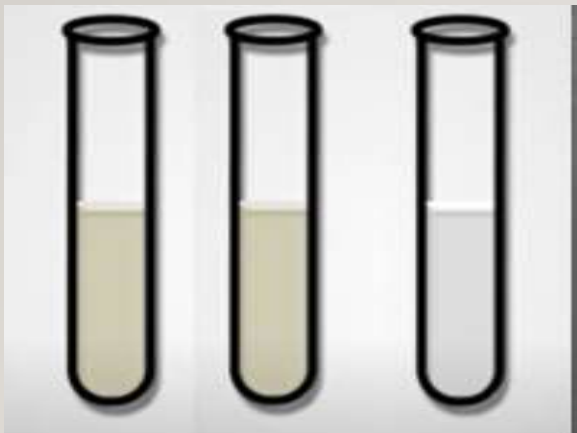
➤ 40% NaOH

➤ Δοκιμαστικοί σωλήνες

➤ Πιπέτες παστέρ



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ



- Αριθμήστε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες.
- Προσθέστε στον πρώτο 1 ml από το 1^ο δείγμα στον δεύτερο 1 mL από το 2^ο δείγμα
- Προσθέστε στον τρίτο σωλήνα 1 mL απεσταγμένου νερού και χρησιμοποιήστε τον ως blank.



Προσθέστε
στον κάθε
σωλήνα 1 mL
πυκνό HNO_3



Αναμίξτε καλά
σε vortex



Θερμάνετε
τους σωλήνες



Ψύξτε κάτω
από τη βρύση
τους σωλήνες

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Στη συνέχεια προσθέστε 2 mL NaOH και στους δύο σωλήνες
- Σημειώστε τις παρατηρήσεις και τα συμπεράσματά σας

	1 ^{ος} σωλήνας	2 ^{ος} σωλήνας
Παρατηρήσεις		
Συμπέρασμα		



**Δοκιμή ξανθοπρωτεΐνης
αρνητική**

**Απουσία αρωματικών
αμινοξέων (τυροσίνης
και θρυπτοφάνης)**

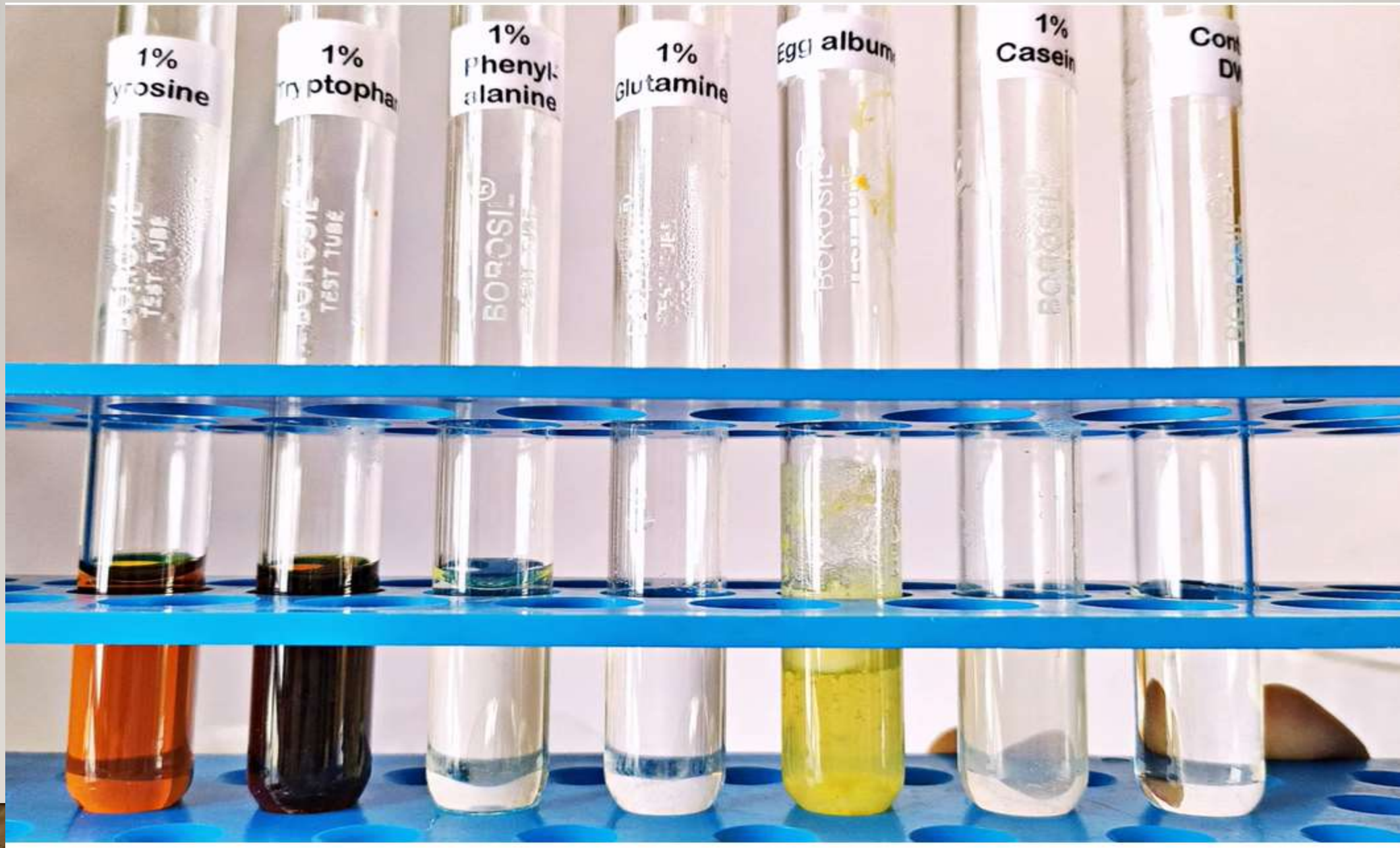
**Απουσία σκούρου
κίτρινου ή πορτοκαλί
χρώματος**



**Δοκιμή ξανθοπρωτεΐνης
θετική**

**Παρουσία αρωματικών
αμινοξέων (τυροσίνης
και θρυπτοφάνης)**

**Παρουσία σκούρου
κίτρινου ή πορτοκαλί
χρώματος**



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Βιοχημεία 6^η ΑΜΕΡΙΚΑΝΙΚΗ -1^η ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΚΔΟΣΗ Reginald H. Garrett, Charles M. Grisham, Εκδόσεις Utopia, 2019
- Τράπαλη, Μ., Καρίκας, Γ.Α., Καρκαλούσος, Γ., & Φούντζουλα, Χ. (2022). *Πειραματική Βιοχημεία* [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <http://dx.doi.org/10.57713/kallipos-97>
- Οργανική Χημεία John McMurry, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- <https://byjus.com/chemistry/ninhydrin-test/>
- <https://www.youtube.com/watch?v=b8dHXanlzX0>
- <https://www.youtube.com/watch?v=VCzu3sCEEIc>
- <http://biocheminfo.com/2020/04/03/ninhydrin-test-principle-reaction-reagents-procedure-and-result-interpretation/>
- <https://biochemden.com/xanthoproteic-test/>
- <https://www.youtube.com/watch?v=s2Qq2F54wr4>
- <https://www.biologyexams4u.com/2012/09/amino-acids-introduction.html>
- [Xanthoproteic Test Practical Experiment - YouTube](#)

<https://www.youtube.com/watch?v=tlzlx5a5OAo>