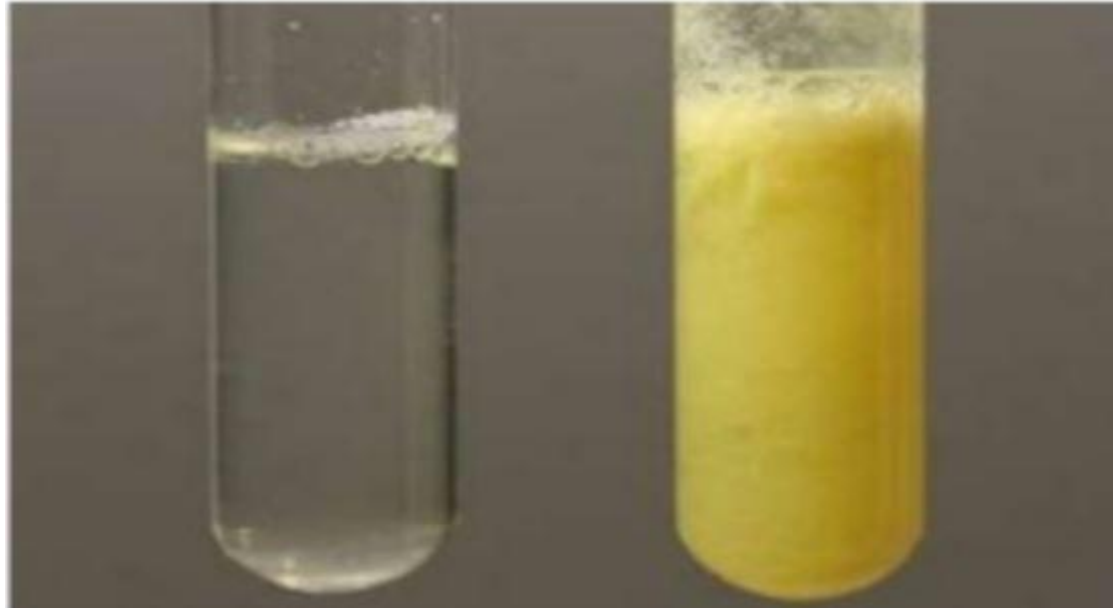


Εργαστήριο Οργανικής Χημείας



Αντιδράσεις Πρωτεϊνών

Κωνσταντίνα Μητάνη
Ακαδημαϊκή Υπότροφος, ΠΘ

Αμφοτερικές ιδιότητες πρωτεϊνών

Ως **δομικά στοιχεία** των πρωτεϊνών, τα αμινοξέα παίζουν **κύριο** ρόλο στην κυτταρική δομή και λειτουργία.

Οι ίδιες οι πρωτεΐνες συμμετέχουν σχεδόν σε **κάθε φυσιολογικό γεγονός** στο κύτταρο.

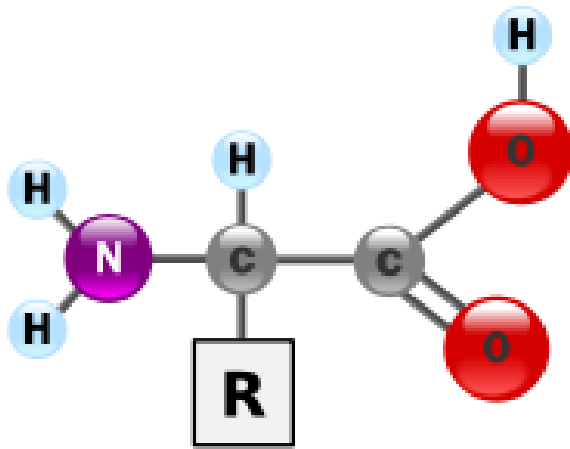
Προκειμένου να κατανοήσουμε τις αμφοτερικές ιδιότητες των πρωτεϊνών και τη συμπεριφορά τους ως **πολύ-ιονικά μακρομόρια**, θα ξεκινήσουμε με τη διερεύνηση των ιδιοτήτων των συστατικών τους, δηλαδή των **αμινοξέων**.

Αμινοξέα

Συμμετέχουν σε **αρκετούς μηχανισμούς** της ενδιάμεσης ανταλλαγής ύλης.

Είναι πρόδρομες ενώσεις πολλών βιολογικά σημαντικών ενώσεων.

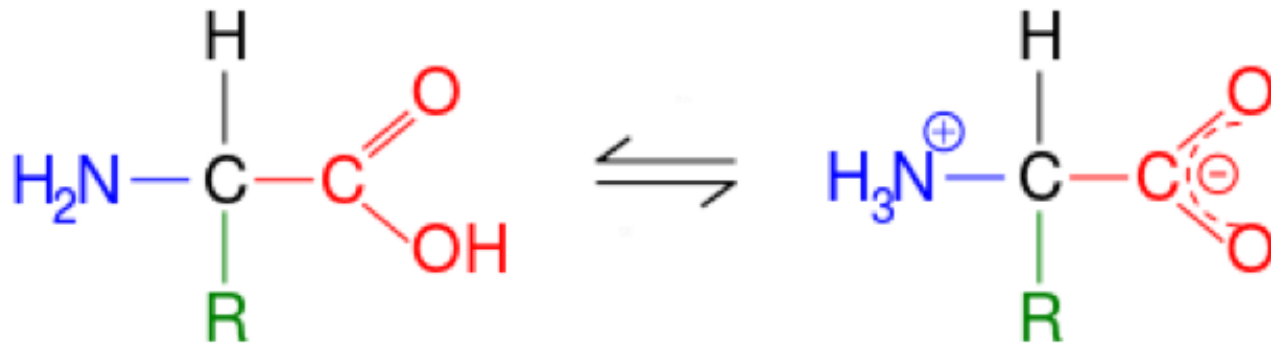
Η χημική δομή περιλαμβάνει ένα **άτομο άνθρακα** το οποίο ονομάζεται **αλφα-άνθρακας** πάνω στο οποίο προσδένονται **τέσσερις υποκαταστάτες**.



- μια αμινική ομάδα (-NH₂)
- μια καρβοξυλική ομάδα (-COOH)
- ένα άτομο υδρογόνου (H)
- και η χαρακτηριστική ομάδα (R), η οποία συνήθως αναφέρεται ως **πλευρική αλυσίδα** και είναι **διαφορετική για κάθε αμινοξύ**. Η ομάδα αυτή χαρακτηρίζει το κάθε αμινοξύ διαφέροντας σε μέγεθος, σχήμα και πολικότητα.

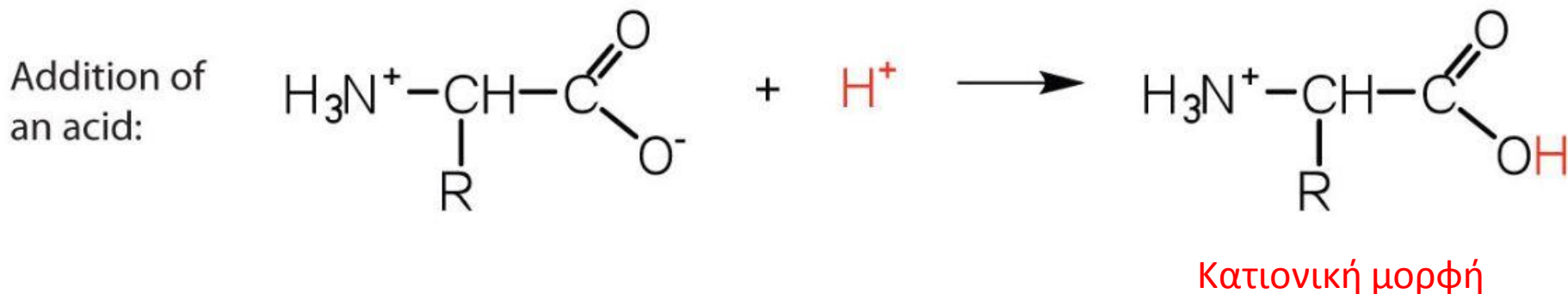
Αμφολύτες

Επειδή τα αμινοξέα περιέχουν μια **όξινη (-COOH)** και μια **βασική (-NH₂)** ομάδα, υφίστανται μια ενδομοριακή οξεοβασική αντίδραση, με αποτέλεσμα να απαντούν υπό μορφή διπολικών ιόντων.



Δεδομένου ότι όλα τα αμινοξέα περιέχουν τουλάχιστον μια αμινομάδα και μια καρβοξυλομάδα, ταξινομούνται ως **αμφοτερικές ουσίες**. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να δράσουν είτε ως οξύ είτε ως βάση.

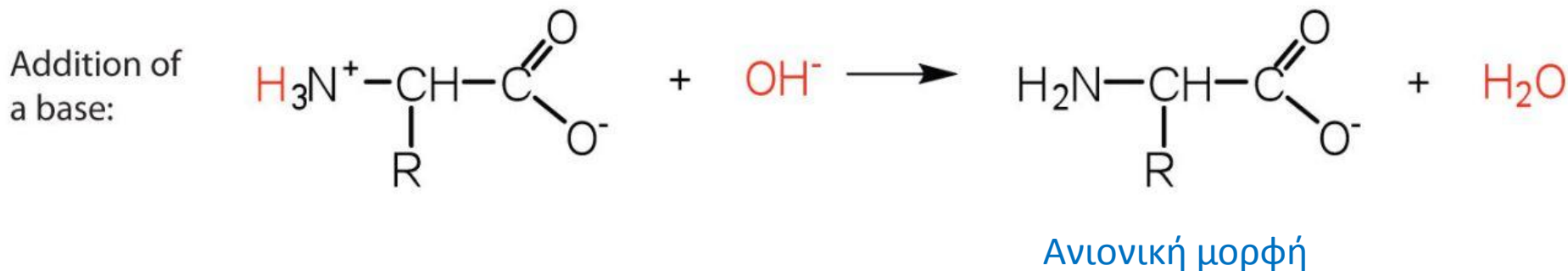
Έτσι λόγω της αμινομάδας αν βρεθούν σε **όξινο διάλυμα** όπου υπάρχουν πολλά πρωτόνια μπορούν να παρουσιάσουν **βασικό χαρακτήρα** και να αντιδράσουν με οξέα ως εξής:



Εφαρμόζοντας την εξίσωση Henderson-Hasselbach θα έχουμε:

$$\text{pH} = \text{pK}_1 + \log \left[\frac{[\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CHR} - \text{COO}^-]}{[\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CHR} - \text{COOH}]} \right]$$

Ενώ **λόγω της καρβοξυλικής** τους ομάδας, αν βρεθούν σε **βασικό διάλυμα** όπου υπάρχουν πολλά υδροξύλια μπορούν να παρουσιάσουν **όξινο χαρακτήρα** και να αντιδράσουν με βάσεις ως εξής:



Εφαρμόζοντας την εξίσωση Henderson-Hasselbach θα έχουμε:

$$\text{pH} = \text{pK}_2 + \log \left[\frac{\text{H}_2\text{N} - \text{CHR} - \text{COO}^-}{\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CHR} - \text{COO}^-} \right]$$

Χρωστικές αντιδράσεις πρωτεϊνών

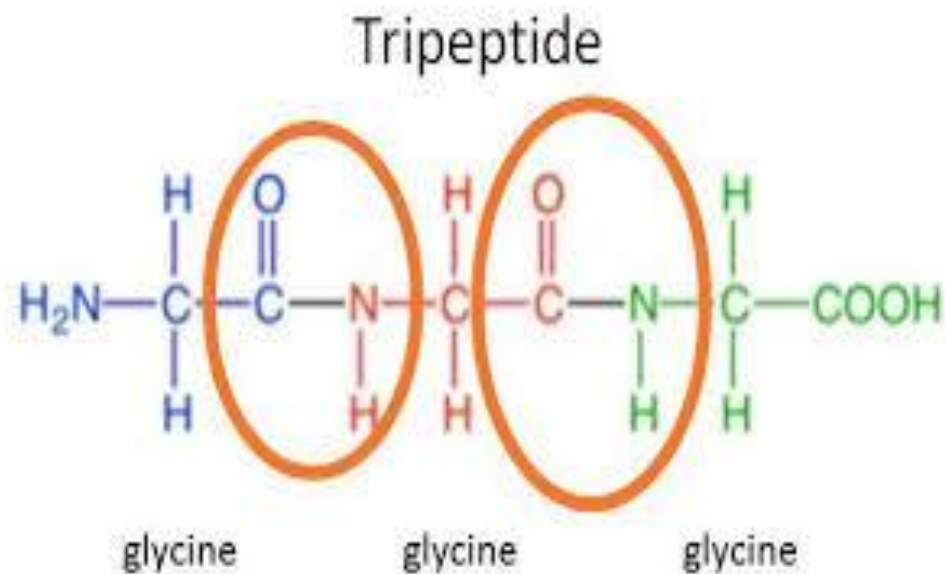
Οι πρωτεΐνες των τροφίμων μπορούν να δώσουν **μία σειρά από αντιδράσεις** με εμφάνιση κάποιου **χαρακτηριστικού χρώματος**, που οφείλεται κάθε φορά στην **παρουσία συγκεκριμένου αμινοξέος ή χαρακτηριστικής ομάδας**.

- ✓ Αντίδραση **Biuret ή Διουρίας**
- ✓ Αντίδραση **Νινυδρίνης**
- ✓ **Ξανθοπρωτεϊνική Αντίδραση**

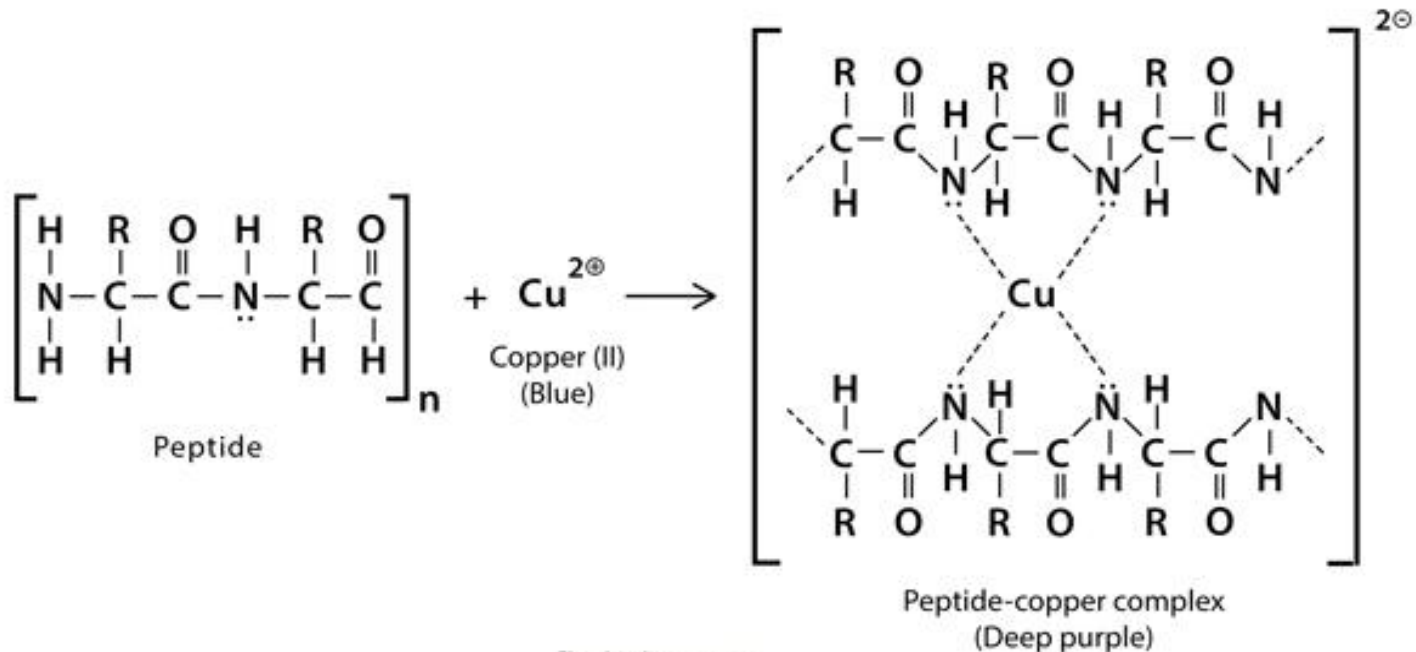
Αντίδραση Biuret ή Διουρίας

Σε αλκαλικό περιβάλλον τα **ιόντα Cu^{2+}** σχηματίζουν **έγχρωμο σύμπλοκο** (ροζ αλλά μερικές φορές εμφανίζεται μωβ λόγω του μπλε χρώματος όσων Cu^{2+} δεν συμμετέχουν στο σύμπλοκο) **με τις αμιδικές ομάδες $-\text{NH}-$** του πεπτιδικού δεσμού.

Για το σχηματισμό του συμπλόκου είναι **απαραίτητη η παρουσία τουλάχιστον δυο ομάδων $-\text{NHCO}-$** δηλαδή δυο πεπτιδικών δεσμών, συνεπώς η αντίδραση γίνεται με όλα τα πεπτίδια που περιέχουν **τουλάχιστον τρία αμινοξέα**.



Biuret Test



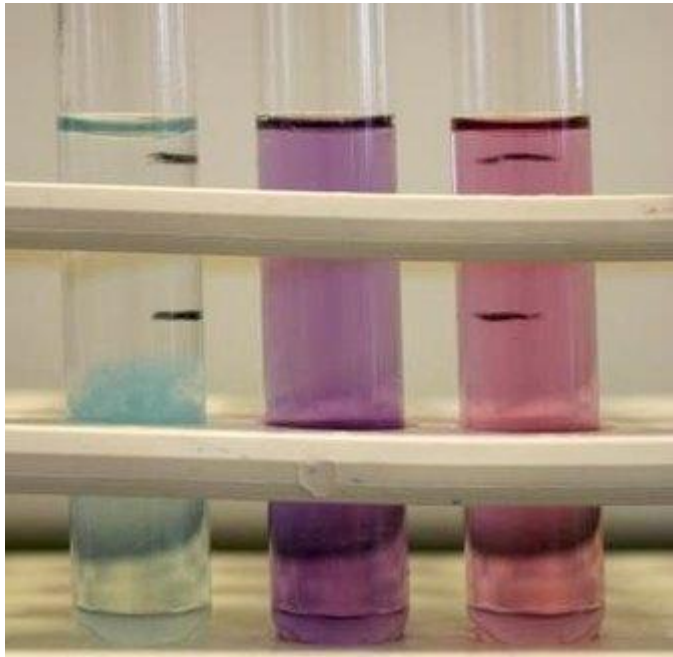
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι **προϊόντα της πλήρους υδρόλυσης των πρωτεϊνών** δηλ. αμινοξέα ασύνδετα μεταξύ τους **δεν δίνουν την αντίδραση της διουρίας.**

Επειδή συχνά **το χρώμα δεν είναι έντονο**, είναι **απαραίτητο να γίνεται και λευκό πείραμα** όπου τίθενται ακριβώς οι ίδιες ποσότητες αντιδραστηρίου και στη θέση του δείγματος τίθεται ίση ποσότητα νερού.

Πειραματική Διαδικασία

Σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα, φέρουμε 0,5 ml πρωτεϊνικού διαλύματος και σε έναν άλλο 0,5 ml απιονισμένου νερού. Προσθέτουμε και στους δυο δοκιμαστικούς σωλήνες 5 ml NaOH 10% με 0,5 ml CuSO_4 1%. Αναταράσσουμε και βλέπουμε το σχηματισμό ιώδους χρώματος ή δακτυλίου.

1 2 3



1) Λευκός Προσδιορισμός

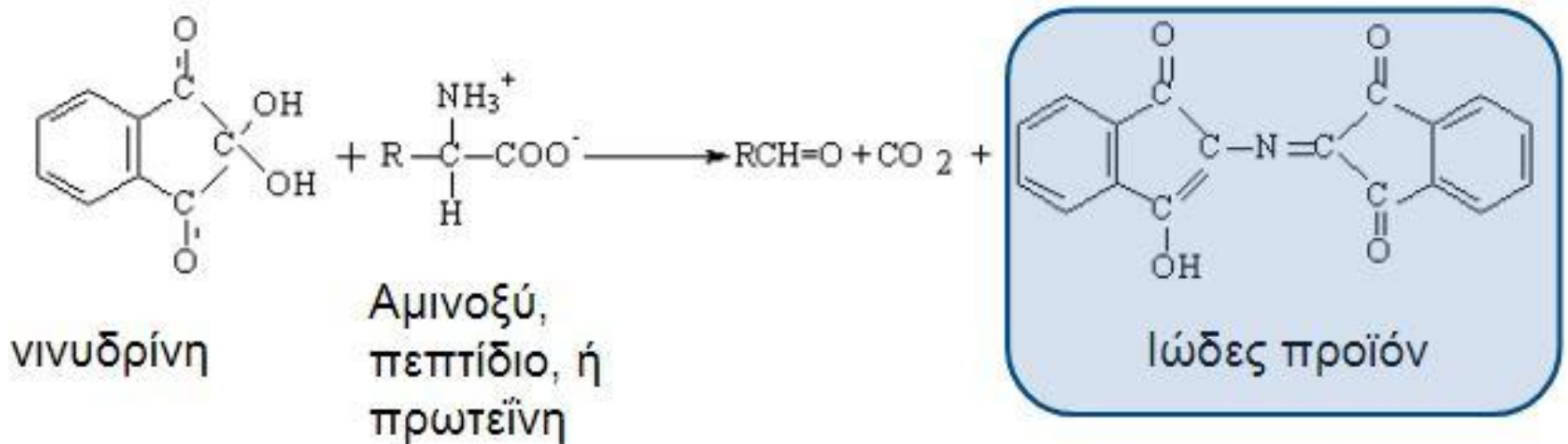
2) Μπλε σε μωβ: Παρουσία πρωτεϊνών

3) Μπλε σε ροζ: Παρουσία

πολυπεπτιδίων μικρής αλυσίδας

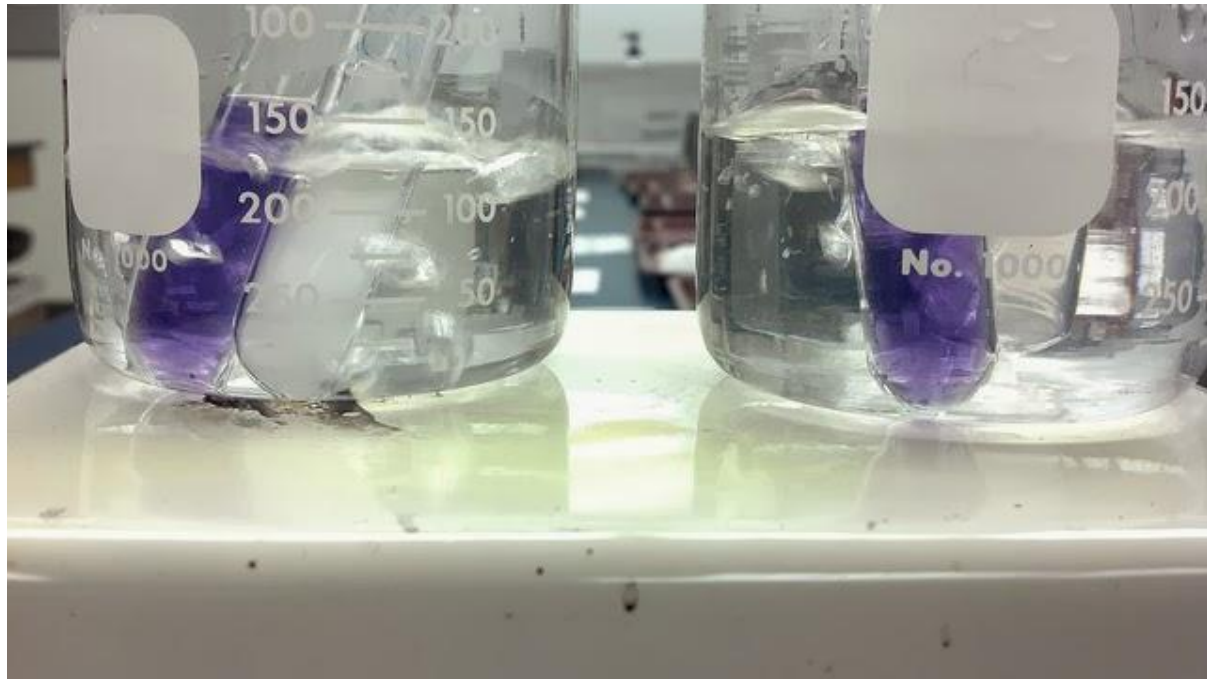
Αντίδραση Νινυδρίνης

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα επειδή έχουν **ελεύθερες αμινομάδες, αντιδρούν με νινυδρίνη** και το διάλυμα αποκτά χαρακτηριστική **κυανή χροιά**. Είναι αντίδραση γενική για όλα τα αμινοξέα, εκτός της προλίνης. Η αντίδραση αυτή επιβεβαιώνει την παρουσία αμινοξέων, **δεν ταυτοποιεί όμως το αμινοξύ** που έχουμε.



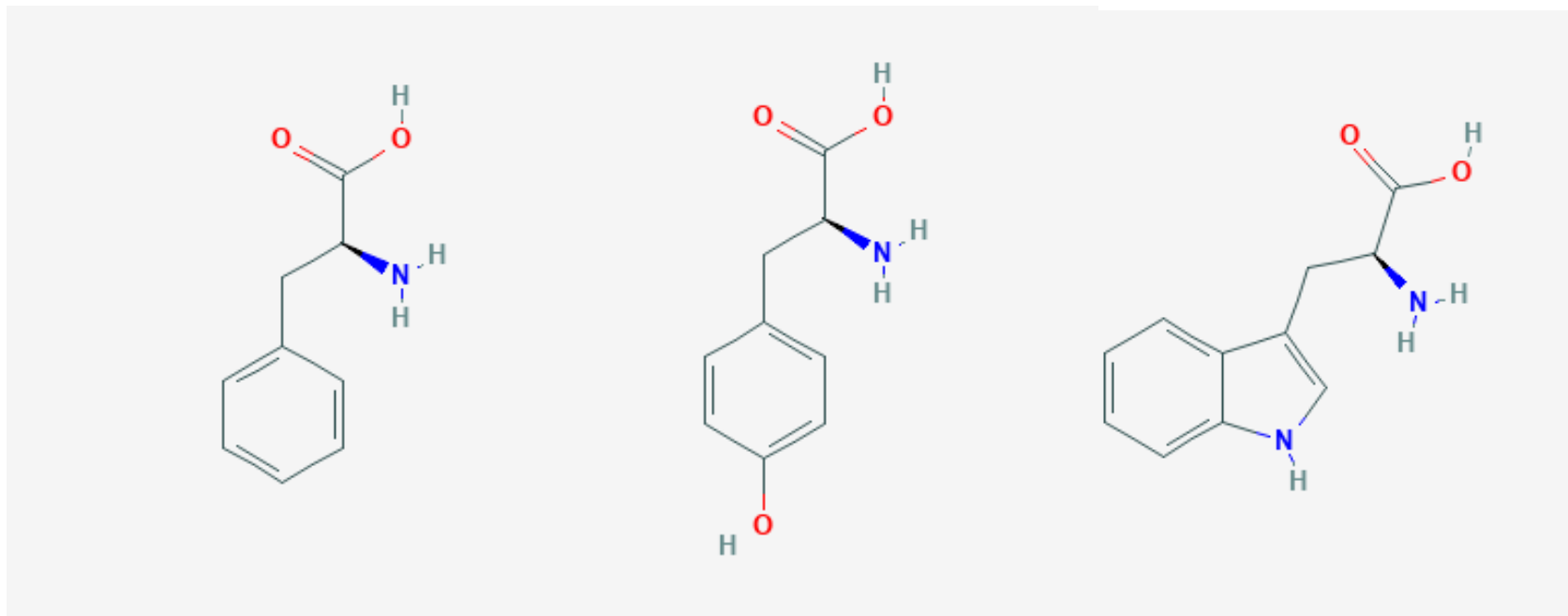
Πειραματική Διαδικασία

Σε δοκιμαστικό σωλήνα, προσθέτουμε 1 ml πρωτεϊνικού διαλύματος και σε ένα άλλο 1 ml απιονισμένου νερού. Προσθέτουμε και στους δυο σωλήνες 1-2 ml δ/τος νινυδρίνης, (0,2% σε αλκοόλη) και θερμαίνουμε ελαφρά σε υδατόλουτρο. Δημιουργούνται έντονοι χρωματισμοί, ανάλογα με τα αμινοξέα που περιέχονται στο διάλυμά μας.



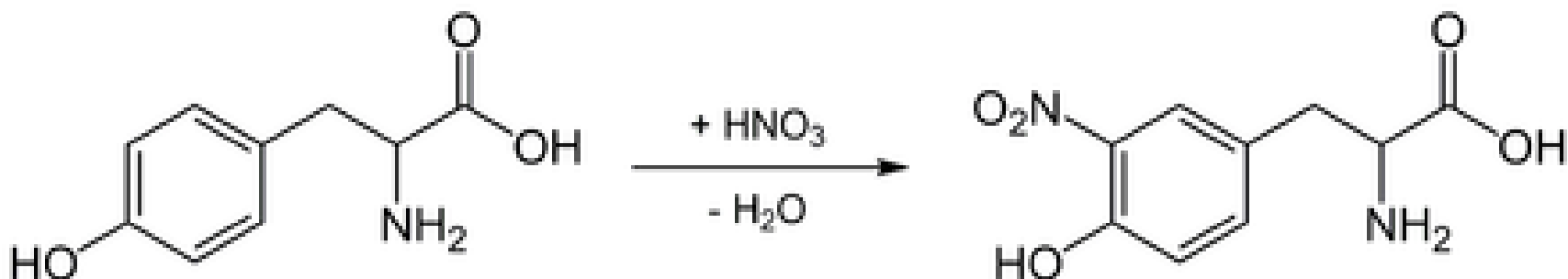
Αντίδραση Ξανθοπρωτεΐνης

Οφείλεται στη **νίτρωση** των **αρωματικών αμινοξέων** Φαινυλαλανίνης, Τυροσίνης, Τρυπτοφάνης.



Με την προσθήκη HNO_3 στο διάλυμα της πρωτεΐνης αυτή καταβυθίζεται και σχεδόν ταυτόχρονα υφίσταται νίτρωση. Το προϊόν της νίτρωσης έχει ξανθοκίτρινο χρώμα λόγω νιτροπαραγώγων αρωματικών αμινοξέων.

Αντίδραση Ξανθοπρωτεΐνης



Η προσθήκη NaOH επαναδιαλύει το ίζημα και το διάλυμα αποκτά ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα. Οι πρωτεΐνες που δεν περιέχουν αρωματικά αμινοξέα δεν δίνουν την αντίδραση. Την αντίδραση αυτή τη δίνουν τα αμινοξέα Φαινυλαλανίνη, Τυροσίνη, Τρυπτοφάνη.

Πειραματική Διαδικασία

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτουμε 2 ml πρωτεϊνικού διαλύματος και σε ένα άλλο 2 ml απιονισμένου νερού. Προσθέτουμε και στους δυο σωλήνες 5 σταγόνες πυκνού HNO_3 και θερμαίνεται ελαφρά σε υδρόλουτρο. Δημιουργείται κίτρινος χρωματισμός εξαιτίας του σχηματισμού νιτροσωμάτων. Το διάλυμα ψύχεται και προστίθενται σταγόνες NaOH 10% μέχρι να επαναδιαλυθεί το ίζημα. Παρατηρείται ανοιχτό πορτοκαλί χρώμα.

