



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny



BIOCHEMIA

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

**Centrum Bioimmobilizacji
i Innowacyjnych
Materiałów Opakowaniowych**

ul. Kłomensa Janickiego 35

71-270 Szczecin



Ćwiczenie 6

Aminokwasy

Aminokwasy są to związki dwufunkcyjne, których cząsteczki zawierają grupy karboksylowe i aminowe:

- grupa aminowa: NH_2
- grupa karboksylowa COOH

Nomenklatura aminokwasów:

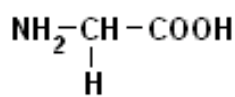
Naturalne aminokwasy posiadają nazwy zwyczajowe tworzone poprzez dodanie do nazwy macierzystej przedrostka amino-:

np. $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ kwas aminooctowy (glicyna)

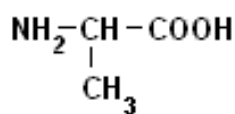
Nazewnictwo zwyczajowe tworzy się podobnie jak fluorowco- lub hydroksokwasów; np. $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ kwas aminoetanowy, kwas α -aminooctowy

Podział aminokwasów w zależności od możliwości syntezy aminokwasu w organizmie na:

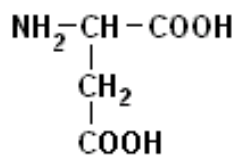
· endogenne (organizm potrafi je syntetyzować)



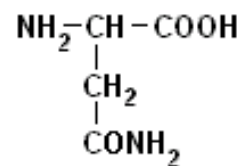
Glicyna



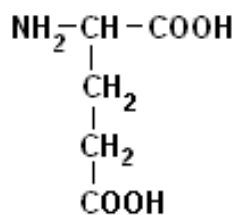
Alanina



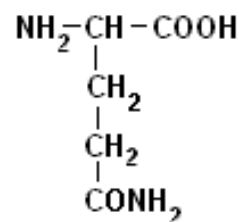
Kwas asparaginowy



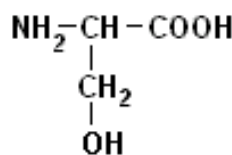
Asparagina



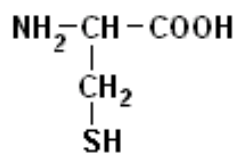
Kwas glutaminowy



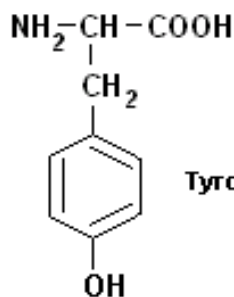
Glutamina



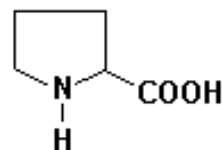
Seryna



Cysteina

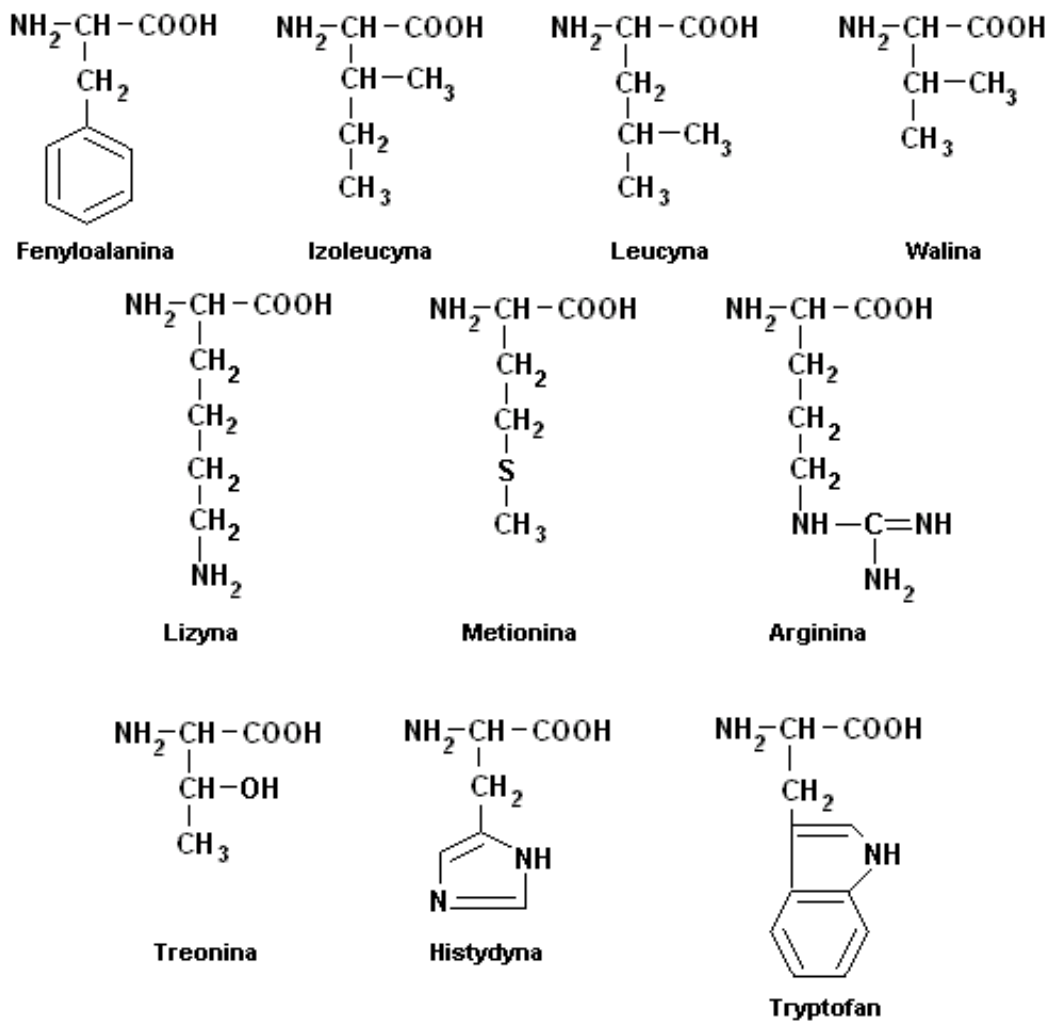


Tyrozyna



Prolina

egzogenne (muszą być dostarczane z zewnątrz wraz z pożywieniem)



Metody otrzymywania aminokwasów

1) Hydrolityczny rozkład białka:

- enzymatyczny - przy użyciu enzymów proteolitycznych
- hydroliza kwasowa - działanie wyższej temperatury na preparaty białkowe znajdujące się w 6M HCl lub 25% H₂SO₄. Rozkładowi ulegają tryptofan i treonina.
- hydroliza zasadowa - w obecności stężonego NaOH lub Ba(OH)₂. Rozkładowi ulegają cysteina i arginina

2) Reakcja fluorowców kwasów z amoniakiem

3) Reakcja aldehydów z cyjankiem amonowym (reakcja cyjanohydrynowa)

Właściwości fizyczne

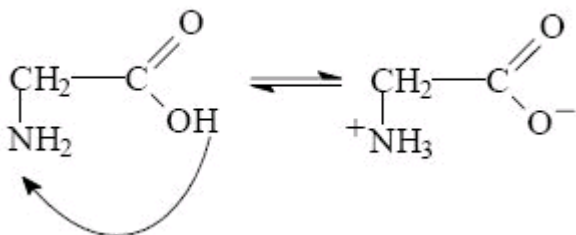
Aminokwasy występują przede wszystkim jako substancje stałe, krystaliczne. Posiadają słodki smak. Rozpuszczalność w wodzie jest dobra, posiadają wysokie temperatury topnienia, natomiast nie rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych.

Właściwości chemiczne

1) Aminokwasy jako substancje amfoteryczne, w roztworach wodnych aminokwasy wykazują odczyn prawie obojętny, ulegają dysocjacji. **Jon obojnaczy** to wewnątrzcząsteczkowe zobojętnienie grupy aminowej (-NH₂) resztą karboksylową co powoduje utworzenie wewnętrznej soli amoniowej. Taka sól posiada jednocześnie ładunek dodatni jak i ujemny, ilości tych jonów równoważą się. W zależności od środowiska w jakim znajduje się aminokwas (środowisko kwaśne H⁺ lub środowisko zasadowe OH⁻) może występować w formie kationu bądź anionu.

Gdy będzie to środowisko kwaśne wówczas grupa ujemna aminokwasu przyjmuje H⁺ co powoduje cofnięcie dysocjacji grupy karboksylowej i wówczas dany aminokwas posiada ładunek dodatni.

W przypadku odwrotnym (środowisko zasadowe) następuje przesunięcie reakcji w kierunku powstawania anionu (odłączenie koordynacyjnie związanego protonu i przyłączenie z jonem OH⁻ powstanie wody).

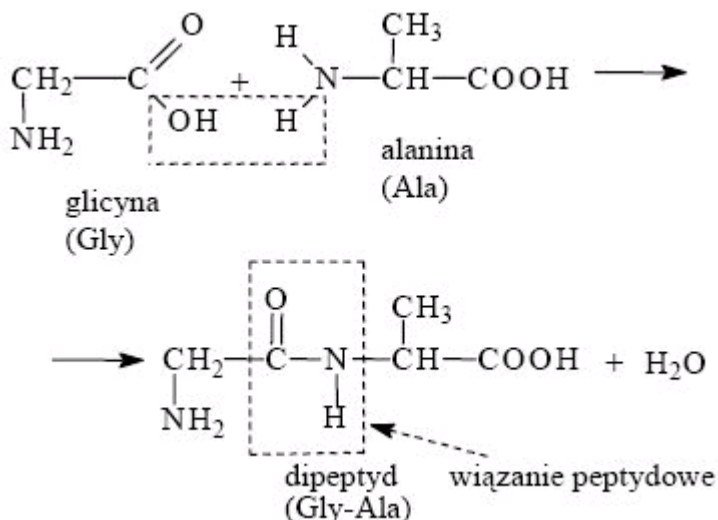


Punkt izoelektryczny - pI:

Dla każdego aminokwasu istnieje takie pH, w którym nie obserwuje się wędrówki jonów w polu elektrycznym. W punkcie izoelektrycznym aminokwas występuje jako jon obojnaczy. Aminokwasy ze względu na swoją amfoteryczność (występowanie jonu obojnego) dają jonowo zbudowane sole pod wpływem kwasów jak i zasad.

Odpowiednio dobierając stężenia CH₃COOH i CH₃COONa przygotowuje się szereg próbek z roztworami o różnych wartościach pH. Dodaje się do nich jednakową ilość kazeiny. Wartość **pH** w próbce, w której wystąpi najobfitszy osad, odpowiada **pI** kazeiny.

2) Tworzenie wiązań peptydowych



Wiązanie peptydowe łączy grupę α -aminową jednego aminokwasu z grupą α -karboksylową drugiego aminokwasu. Występuje ono w dwóch formach izomerycznych: cis i trans. W wiązaniu peptydowym wyróżnić można dwie formy mezomeryczne (rezonansowe), nadające wiązaniu węgiel-azot częściowy charakter wiązania podwójnego. Efekt ten wzmacnia siłę wiązania oraz silnie hamuje rotację wokół wiązania C-N, dzięki czemu wiązanie jest płaskie. Możliwa natomiast jest rotacja wokół wiązań z grupami bocznymi.

3) Reakcje grupy karboksylowej:

- **reakcja estryfikacji**- polega ona na reakcji aminokwasu wraz z alkoholem powstają wówczas estry (nie posiadają one właściwości amfoterycznych), a wykazują właściwości aminy
- **dekarboksylacja** - aminokwasy mogą przekształcić się w aminy gdy na nie zadziałamy podczas ogrzewania roztworem $Ba(OH)_2$
- **tworzenie kompleksów** - α -aminokwasy tworzą kompleksy z kationami metali (głównie miedzi). Powstają wówczas barwne sole kompleksowe.

4) Reakcje grupy aminowej:

- **Deaminacja** - aminokwasy posiadające I-rzędową grupę aminową pod wpływem kwasu azotowego (III) utleniają się do hydrokwasu i uwalniają grupę aminową w postaci azotu. Są różne rodzaje deaminacji:
 - hydrolityczna
 - hydrolityczna z dekarboksylacją
 - przez redukcję
 - desaturatywna
- Utlenianie; Utlenianie aminokwasów prowadzi do powstawania ketokwasów.
- Zasady Schiffa; Aminokwasy, które są powiązane w postaci zasady Schiffa mogą ulegać różnym przemianom biochemicznym tj. transaminacja, dekarboksylacja.

Wykrywanie aminokwasów

1. Reakcja ninhydrynowa

Aminokwasy w tej reakcji wraz z ninhydryną dają fioletowo-niebieskie zabarwienie.

2. Reakcja ksantoproteinowa

Reakcja ta służy do wykrywania aminokwasów aromatycznych (fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan). Dodanie stężonego kwasu azotowego (V) powoduje występowanie żółtego zabarwienia, spowodowanego powstaniem pochodnych nitrowych aminokwasów.

Przebieg ćwiczenia 6

Doświadczenie 1. Oznaczanie punktu izoelektrycznego pI kazeiny

Przygotowanie roztworu kazeiny:

Do zlewki (50 cm³) odważyć 0,25 g kazeiny i dodać 25 cm³ wody (ogrzejanej do 40°C) oraz 5 cm³ 1 M roztworu NaOH. Mieszać aż do rozpuszczenia się kazeiny, po czym wprowadzić 5 cm³ 1 M roztworu CH₃COOH i uzupełnić do kreski wodą. Otrzymuje się w ten sposób lekko opalizujący roztwór kazeiny w 0,1 M roztworze CH₃COONa.

Opis ćwiczenia

1. Przygotować 9 suchych probówek.
2. Do pierwszej odmierzyć 3,2 cm³ 1 M roztworu CH₃COOH i 6,8 cm³ wody, a do następnych ośmiu po 5 cm³ H₂O.
3. Po dokładnym wymieszaniu zawartości w probówce pierwszej, przenieść z niej 5 cm³ do drugiej, a z tej, po wymieszaniu, 5 cm³ do trzeciej itd. Do każdej probówki dodać po 1 cm³ roztworu kazeiny i lekko wymieszać. Obserwować roztwory natychmiast po zmieszaniu i po 30 min.

Nr probówki	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ilość ml 1 M CH ₃ COOH pozostałego w probówkach	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0062

Po upływie 30 minut należy zapisać obserwacje oraz obliczyć pH dla wszystkich probówek. Następnie wyznaczyć punkt izoelektryczny dla kazeiny.

Opracowanie wyników

1. Obliczyć pH roztworów buforowych w poszczególnych probówkach wykorzystując równanie Hendersona-Hasellbacha:

$$\text{pH} = -\log K_a + \log \frac{[\text{zasada}]}{[\text{kwasa}]}$$

gdzie:

stała dysocjacji dla CH₃COOH $K_a = 1,753 \times 10^{-5}$

W obliczeniach należy również uwzględnić stężenie octanu sodu dodawanego z kazeiną (0,1M).

Literatura:

1. Hłyńczak A. J. Dziennik do ćwiczeń z biochemii Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego, Szczecin, 2002.
2. Ćwiczenia z biochemii. Praca zbiorowa pod red. L. Kłyszejko-Stefanowicz. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2003.
3. McMurry John. Chemia organiczna. PWN, Warszawa, 2003.