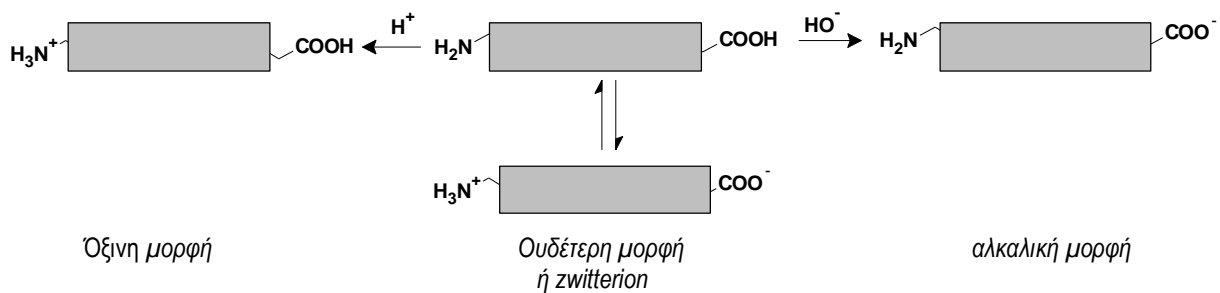


Στόχος της άσκησης: Κατανόηση της χημικής σύστασης των πρωτεϊνών. Η εξοικείωση με τις ηλεκτρικές ιδιότητες των πρωτεϊνών και την επίδραση οξέων και βάσεων στη δομή τους.

1. Γενικά: το φορτίο των πρωτεϊνικών μορίων

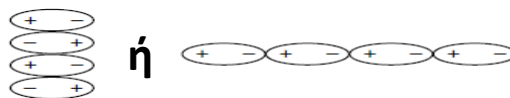
Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια τα οποία αποτελούνται από ενωμένα αμινοξέα. Με αυτό τον τρόπο συγκροτούνται αλυσίδες μεγάλου μοριακού βάρους στις οποίες οι «κρίκοι» (δηλ. τα αμινοξέα) συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Στα δυο άκρα των αλυσίδων υπάρχουν αντίστοιχα δυο *τελικά* αμινοξέα εκ των οποίων το ένα διαθέτει ελεύθερη αμινομάδα (*N-τελικό* αμινοξύ) και το άλλο διαθέτει ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα (*C-τελικό* αμινοξύ).

Συνεπώς, κάθε πρωτεΐνη συμπεριφέρεται σαν *αμφοτερικό* μόριο, όπως ακριβώς και τα ίδια τα αμινοξέα που την απαρτίζουν. Δηλαδή διαθέτουν μια ομάδα που συμπεριφέρεται σαν βάση (αμινομάδα) και μια που συμπεριφέρεται σαν οξύ (καρβοξυλική ομάδα). Συνεπώς, και εδώ όπως και στα αμινοξέα, υπάρχει η έννοια του *ισοηλεκτρικού σημείου*, στο οποίο και οι δυο ομάδες είναι φορτισμένες. Οι πρωτεΐνες όμως είναι πιο σύνθετα μόρια, και το pH παίζει σε αυτές ένα σημαντικό ρόλο.



Όταν είναι *όξινο* ($\text{pH} < \text{pI}$), είναι φορτισμένες μόνο οι αμινομάδες ($-\text{NH}_3^+$), ενώ όταν είναι *αλκαλικό* ($\text{pH} > \text{pI}$), είναι φορτισμένες μόνο οι καρβοξυλικές ομάδες (COO^-). Συνεπώς, στην όξινη και αλκαλική μορφή όλο το μόριο φέρει ένα μόνο είδος φορτίου (θετικό, ή αρνητικό αντίστοιχα) με αποτέλεσμα να ασκείται μια σημαντική ηλεκτροστατική *άπωση* μεταξύ των μορίων.

Αντίθετα, στην περιοχή του ισοηλεκτρικού σημείου (pI) συνυπάρχουν *θετικά* και *αρνητικά* φορτία σε κάθε μόριο (*διπλά φορτισμένη* ιοντική μορφή) με αποτέλεσμα αυτό να προσανατολίζεται σε σχέση με τα γειτονικά προς αυτό μόρια που έχουν αντίστοιχα φορτία, (βλ. παρακάτω σχήμα).



Το αποτέλεσμα είναι να εμφανίζεται ηλεκτροστατική *έλξη* μεταξύ των μακρομορίων των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα αυτές να συσσωματώνονται και τελικά να καθιζάνουν από τα υδατικά τους διαλύματα. Το φαινόμενο λέγεται *κροκίδωση*.

Με τις πρωτεΐνες του γάλακτος η κατάσταση είναι πιο περίπλοκη, επειδή η κύρια πρωτεΐνη του, η **καζεΐνη**, είναι μια *φωσφοπρωτεΐνη* (δηλαδή υπάρχουν φωσφορικές ομάδες που εστεροποιούνται με πλευρικές υδροξυλικές ομάδες (-OH). Στην παρουσία τους οφείλεται το *όξινο* ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών ($pI = 4.6$). Επειδή το παρατηρούμενο pH του αγελαδινού γάλακτος είναι ψηλότερο (6.7 - 6.8) από το pI , οι φωσφορικές ομάδες είναι ιονισμένες (δηλ. βρίσκονται σε μορφή ανιόντων).

Λόγω των παραπάνω, οι φωσφορικές ομάδες της καζεΐνης έχουν κάποιους σημαντικούς ρόλους:

(α) επειδή στο pH (6.7 - 6.8) του γάλακτος απαντώνται σε μορφή ανιόντος, μπορούν και σχηματίζουν άλας (καζεϊνικό ασβέστιο) με τα ιόντα του ασβεστίου που υπάρχουν στο περιβάλλον τους.

(β) η παρουσία των φορτίων στα φωσφορικά ανιόντα σε μια από τις πολλές μορφές καζεΐνης στο γάλα (την *κ-καζεΐνη*) προκαλεί τη δημιουργία *μικκυλίων*, χάρη στα οποία οι καζεΐνες είναι τελικά διαλυτές και γιαυτό το λόγο γάλα δεν περιέχει ίζημα (δηλαδή είναι ένα *σταθερό γαλάκτωμα*).

Όταν προστεθεί στο γάλα μια ποσότητα οξέος (υδροχλωρικού, οξικού, κλπ.) αρχίζουν και πρωτονιώνονται οι φωσφορικές ομάδες, δηλαδή καταστρέφεται το άλας του καζεϊνικού ασβεστίου, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ηλεκτρική ισορροπία στα μόρια της πρωτεΐνης, οπότε εμφανίζεται *έλξη* μεταξύ τους. Αυτός είναι ο λόγος που κροκιδώνεται (ή κοινώς, «*κόβει*») το γάλα όταν προσθέσουμε οξύ.

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Απαιτούμενα υλικά:

Δείγμα: γάλα (κατά προτίμηση φρέσκο, χαμηλά λιπαρά, ή πλήρως αποβουτυρωμένο)

Χημικά: πυκνό (παγόμορφο) οξικό οξύ, αιθανόλη 95%, αιθέρας, NaOH 10%,

Σκεύη: υδροβολέας, κωνική φιάλη 150-250ml, ποτήρι ζέσεως 500 ml (υδατόλουτρο) και 100 ml, θερμόμετρο 0-100°C, ύφασμα με πόρους (τούλι), μεταλλική σπάτουλα, σύστημα διήθησης υπό κενό (χωνί Buchner, κατάλληλη κωνική φιάλη με κωνικό προσαρμοστήρα από καουτσούκ και κυκλικά κομμένο ηθμό)

2.2 Διαδικασία παρασκευής της καζεΐνης:

- i. Ζυγίζεται ποσότητα $m=50.0$ g γάλακτος (με χαμηλά λιπαρά, ή πλήρως αποβουτυρωμένο) σε μια κωνική φιάλη των 250 ml
- ii. Θερμαίνεται η ποσότητα του γάλακτος σε υδατόλουτρο εφοδιασμένο με θερμόμετρο υπό ανάδευση.

- iii. Όταν η θερμοκρασία φθάσει τους 40°C απομακρύνουμε τη φιάλη από το υδατόλουτρο και προσθέτουμε *σταδιακά* 10 σταγόνες πυκνού οξικού οξέος υπό συνεχή ανάδευση (η προσθήκη γίνεται στον απαγωγό). Καταγράφονται οι παρατηρούμενες μεταβολές.
- iv. Όταν ολοκληρωθεί ο σχηματισμός ιζήματος, το ετερογενές μίγμα διηθείται μέσω πορώδους υφάσματος (π.χ. τούλι) που έχει στερεωθεί στην κορυφή ενός ποτηριού ζέσεως των 100 ml. Με τη βοήθεια υδροβολέα εκπλύνονται τα τοιχώματα της φιάλης μέχρι να μεταφερθεί στο ύφασμα όλη η ποσότητα του στερεού προϊόντος.
- v. Αφού έχουμε βεβαιωθεί ότι όλη η ποσότητα του νερού έχει περάσει μέσα στο ποτήρι, το ίζημα επάνω στο ύφασμα μεταφέρεται στην κωνική με τη βοήθεια σπάτουλας και σχολαστικών εκπλύσεων.
- vi. Προσθέτουμε 20 ml αιθανόλης 95% στη φιάλη με το στερεό. Αφού αναδευτεί το μίγμα επί 5 min με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου, αφήνουμε το στερεό να κατακαθίσει στον πυθμένα της φιάλης και στη συνέχεια αποχύνεται προσεκτικά η φάση της αιθανόλης με το λιπαρό συστατικό.
- vii. Ετοιμάζουμε παράλληλα, το σύστημα διήθησης υπό κενό (όπου ο κυκλικά κομμένος ηθμός έχει *προζυγιστεί*).
- viii. Μεταφέρουμε τη φιάλη με το προϊόν στον απαγωγό και προσθέτουμε 25 ml μίγματος αιθανόλης-αιθέρα 50:50. Μετά από ανάδευση 5 min, το μίγμα διηθείται υπό κενό. Ο ηθμός με το ίζημα μεταφέρονται επάνω σε ένα τετράγωνο κομμάτι διηθητικού χαρτιού μέχρι να ξηραθεί.
- ix. Ζυγίζουμε το σύνολο ιζήματος-χαρτιού και υπολογίζουμε την *% απόδοση* της παρασκευαστικής διαδικασίας (ή *% ανάκτηση* του προϊόντος) από τον τύπο:

$$\% \text{ ανάκτηση καζεΐνης} = \frac{(\text{βάρος ιζήματος} + \text{χαρτιού}) - (\text{βάρος χαρτιού})}{m} \times 100$$

Τρ

2.3 Έλεγχος της ταυτότητας της καζεΐνης ως πρωτεϊνικού υλικού

Η καζεΐνη είναι μια πρωτεΐνη και συνεπώς ελέγχεται σύμφωνα με τις ιδιότητες των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν στην αντίστοιχη άσκηση. Συγκεκριμένα, εξετάζονται οι αντιδράσεις της νινυδρίνης, η ξανθοπρωτεϊνική αντίδραση και η αντίδραση της διουρίας.

(α) αντίδραση νινυδρίνης: μια μικρή ποσότητα (10mg) από το στερεό που παραλήφθηκε κατά την προηγούμενη διαδικασία διαλύεται σε 1 ml απιονισμένου νερού και προσθέτουμε μια σταγόνα νινυδρίνης. Τοποθετείται ο σωλήνας στο υδατόλουτρο επί 4-5 λεπτά μέχρι να παρατηρηθεί προϊόν μπλε-μωβ χρώματος.

(β) Ξανθοπρωτεϊνική αντίδραση: ποσότητα (10mg) από το στερεό που παραλήφθηκε κατά την προηγούμενη διαδικασία διαλύεται σε 1 ml απιονισμένου νερού και προσθέτουμε πυκνό νιτρικό οξύ (μέσα στους απαγωγούς, με πολλή προσοχή!). Τοποθετούμε το σωλήνα στο υδατόλουτρο για 5 λεπτά, και σημειώνουμε την αλλαγή του χρώματος. Εμφάνιση κίτρινου χρώματος υποδηλώνει την παρουσία αρωματικών δακτυλίων στα αμινοξέα που συνθέτουν την πρωτεΐνη. Στη συνέχεια

εξουδετερώνουμε το διάλυμα με καυστικό νάτριο 10% (προσθέτουμε σημαντική ποσότητα, ανάλογα με το πόσο νιτρικό οξύ είχε προηγουμένως προστεθεί) μέχρι να σχηματισθεί πορτοκαλί ίζημα.

(γ) αντίδραση διουρίας: μια μικρή ποσότητα (10mg) από την καζεΐνη που παραλήφθηκε κατά την προηγούμενη διαδικασία διαλύεται σε 1 ml απιονισμένου νερού και προσθέτουμε 5 σταγόνες NaOH 10% και 2 σταγόνες αραιού διαλύματος CuSO_4 υπό συνεχή ανάδευση. Η παρατήρηση πορφυρωδούς προϊόντος υποδηλώνει την παρουσία πρωτεΐνης.

Βιβλιογραφία

McMurry John, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2012 (ενιαίος τόμος)

D. L. Nelson, M. Cox, Lehninger, Γενικές Αρχές Βιοχημείας, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ., Πασχαλίδης, Αθήνα 2011

J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry, 5th ed., W. Freeman and Company, 2002

3. ΦΥΛΛΟ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τίτλος άσκησης:

Όνοματεπώνυμο:

ημερομηνία

Αρ. μητρώου:

Εξάμηνο:

3.A Απομόνωση της καζεΐνης από το γάλα

Σκοπός εργασίας		
δοκιμασία	παρατήρηση	Αιτιολόγηση/συμπέρασμα
1. προσθήκη πυκνού οξικού οξέος		
2. προσθήκη αιθανόλης		
3. προσθήκη αιθανόλης-αιθέρα		
4. ζύγιση και υπολογισμός της % απόδοσης		

3.B Χαρακτηριστικές αντιδράσεις καζεΐνης

δοκιμασία	παρατηρήσεις	συμπεράσματα
Αντίδραση νινυδρίνης		
Ξανθοπρωτεϊνική αντίδραση (προσθήκη πυκνού νιτρικού οξέος)		
Αντίδραση διουρίας		

3. Γ Ερωτήσεις:

(α) Από τον κατάλογο των αμινοξέων της άσκησης 5 (Χημικές αντιδράσεις πρωτεϊνών), βρείτε ποια αμινοξέα έχουν περισσότερες από μια *αμινομάδες* και ποια έχουν περισσότερες από μία ομάδες *καρβοξυλικού οξέος*.

(β) Πώς περιμένετε να συμπεριφέρονται αυτές οι ομάδες των αμινοξέων και κατά συνέπεια στις πρωτεΐνες όπου συμμετέχουν **σε ισχυρά όξινο ή ισχυρά αλκαλικό pH ;**