

Gai biziaren analisi kimikoa: Aminoazidoak eta Proteinak



Ioritz Arburua eta Iosu Burgaña

Aurkibidea:

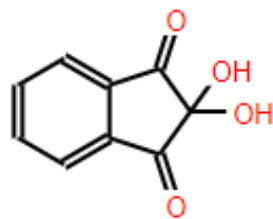
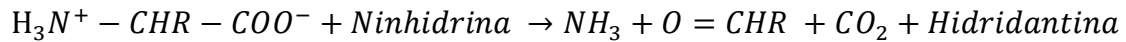
1. Aminoazido askeen detekzioa
 - a. Kolorazio-erreakzioa. Ninhidrinaren erreakzioa
2. Proteinen detekzio eta kuantifikazioa
 - a. Proteinen detekzioa Biuret erreakzioaren bidez
 - b. Proteinen kuantifikazioa metodo espektrofotometriko bidez (kolorazio-erreakzioa)
3. Elikagaien analisi biokimikoa: esnearen proteinen banaketa

1. Aminoazido askeen detekzioa: Kolorazio-erreakzioa.

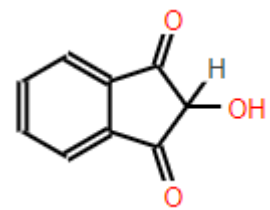
Ninhidrinaren erreakzioa

Oinarri Teorikoa:

Erreakzio hau aminoazidoen detekziorako erabiltzen da. Ninhidrinak aminoazidoaren amino taldearekin erreakzio bat ematen du:

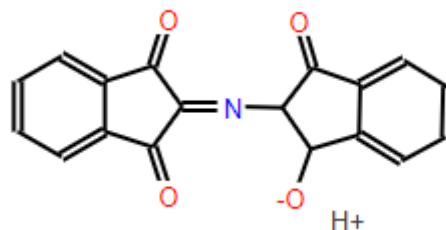
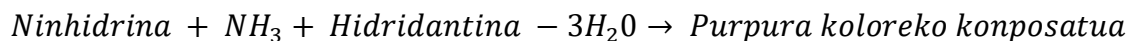


Ninhidrina



Hidridantina

Era berean, Ninhidrina eta Hidridantinak amoniakoarekin erreakzionatzen dute:



Purpura koloreko konposatua

Modu honetan, erreakzioa gertatzen bada, saiodian kolore moreko likido bat eskuratuko dugu emaitza positiboa izan dela esango diguna.

Erreaktiboak:

- Ninhidrina (%0,2) etanolean

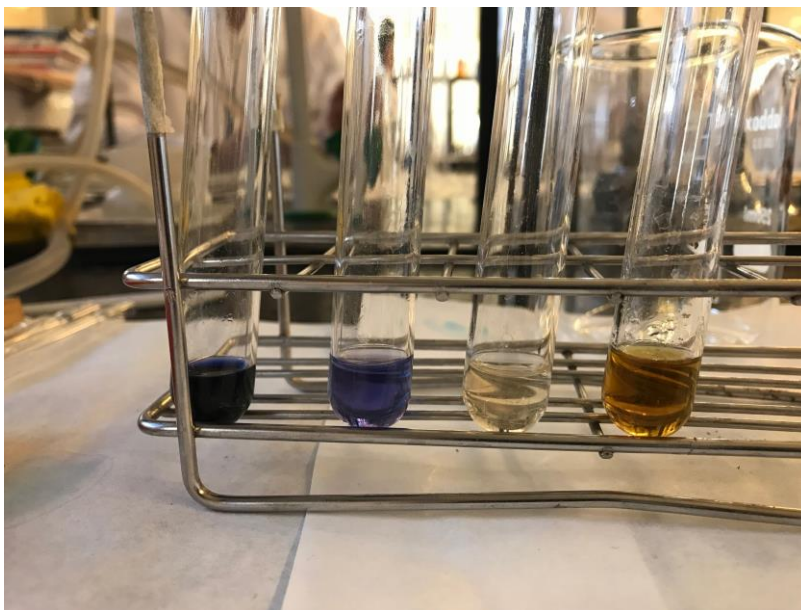
Aztergaiak:

- Glikokola %1
- Tirosina %1
- Kaseina %2
- Prolina %1

Prozedura:

Aztergaiaren 1 mL hartu eta ninhidrina disoluzioaren 0,4 mL gehitu. Irakiten jarri eta kolorazio urdin/more bat lortu beharko da.

Emaitza esperimentalak:



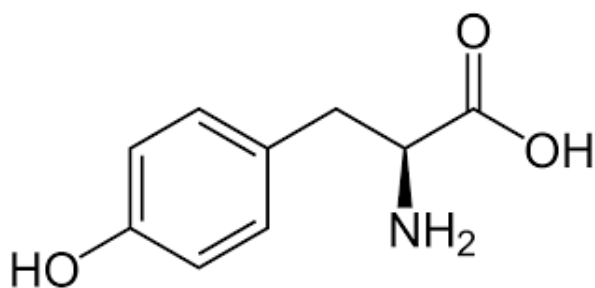
1. irudia: lortutako emaitzen argazkiak

1go irudian lehenago aurkeztutako aztergaiak agertzen dira eskuinetik ezkerrera. Emaitzak honakoak izan dira: glikokola positiboa, tirosina positiboa baina kolore argixeagoa, kaseina negatiboa eta prolina negatiboa.

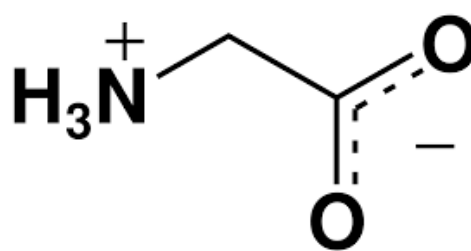
Galderak:

1. Zeintzuk izan dira positiboak? Zergatik?

Emaitza positiboak glikokola eta tirosina izan dira. Bi kasuetan emaitzak positiboak izan dira bi aminoazidoek beraien amino taldea libre zeukatelako eta hori dela eta ninhidrinarekin erreakzionatu ahal izan dutelako.



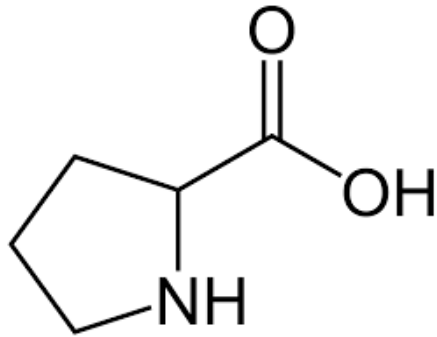
Tirosina



Glizina (glikokola)

2. Noiz da negatiboa erreakzioa? Zergatik?

Erreakzioa negatiboa izan da prolina eta kaseinaren kasuan. Prolinaren kasuan emaitza negatiboa izan da amino taldea ez dagoelako libre, ziklo baten parte delako. Kaseinaren kasuan aldiz, hau hain molekula handia denez, ninhidrina eta hidridantinarekin arteko erreakzioa oso ahula izan da. Hori dela eta, kaseinaren kasuan disoluzioa ez da ez morez tintatu ezta kolorez aldatu ere.



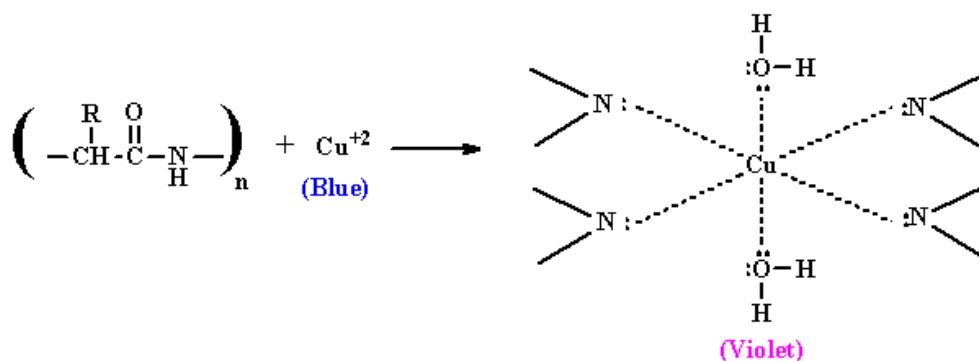
Prolina

2. Proteinen detezio eta kuantifikazioa:

2A. Proteinen detekzioa Biuret erreakzioaren bidez

Oinarri Teorikoa:

Aminoazido eta proteinak, inguru basiko batean baldin badaude, Cu^{2+} ioiarekin koloredunak diren konposatuak ematen dituzte. Erreakzio honetaz baliatuz, disoluzio batean proteinarik dagoen edo ez jakin dezakegu



Biuret erreakzioa

Erreaktiboak:

- CuSO_4 0,02M
- 0,2N NaOH

Aztergaiak:

- %0,5 gelatina
- %1 albumina
- %2 kaseina
- %1 glikokola

Prozedura:

Soluzio bakoitzetik mL bat hartu eta 0,02 M CuSO_4 3 tanta gehitu. Hau egin ondoren, NaOH 0,2N 1 mL erantsi (kaseinari ez) eta astindu. Disoluzioak kolore morea hartu beharko luke.

Emaitzak:

Saiodiaren zenbakia	Soluzioa	Kolorazioa
1	Gelatina	Bioleta
2	Albumina	Bioleta
3	Kaseina	Arroxa
4	Glikokola	Urdin gardena

Galderak:

1. Zeintzuk dira aminoazidoak, peptidoak eta proteinak?

Gelatina, albumina eta kaseina proteinak dira. Aldiz, glikokola aminoazido bat da glizina izenarekin ere ezagutzen dena

2. Aipa itzazu azterturiko proteina. daukaten elikagaiak:

Gelatina sarritan bere baitan jaten da gelatina deritzon postrean.



Albumina, arrautzearen xuringoan aurkitzen den proteina bat da.



Kaseina, esnean dagoen proteina bat da. Gaztanbera edo mamia bezalako jakietan oso ugaria da esnetik prezipitatzen baitugu.



Glikokola edo glizina, animalia iturriko jaki guztietan aurki daiteke bai eta zenbait barazkietan ere, besteak beste soia, berenjena edota espinakak.



2B. Proteinen detekzioa metodo espektrofotometrikoaren bidez (kolorazio-erreakzioa)

Oinarri Teorikoa:

Espektrofotometria konposatu batek argiaren zein kantitate adsorbitzen duen kalkulatzeko datza. Konposatuak espektro elektromagnetikoaren zati ikuskorraren zati bat adsorbitzen badute, guk kolore bat daukatela ikus dezakegu eta zein uhin luzeerako irradiazioa adsorbitzen duten arabera kolore bat edo beste izango dute. Ondorioz, argiak koloreduna den konposatu bat zeharkatzen duenean, bere zati bat konposatuak xurgatuko du

Bidaltzen edo adsorbatzen den erradiazioaren intentsitatea eta uhin luzeeraren datuak jasotzen baditugu, aukera daukagu konposatuaren kontzentrazioa jakiteko. Hori gauzatzeko, derrigorrezkoa da konposatua koloreduna izatea bereaz edo kolorazio erreakzio bat gauzatzea.

Proteinek berez ez dute argi ikuskorra xurgatzen baina ikusi dugunez Biuret erreakzioaren ostean kolore urdineko disoluzioak lortzen ditugu beraz hauek bai xurgatzen dutela argia.

Erreaktiboak:

- CuSO_4 0,02M
- 0,2N NaOH
- 4,9 g/L -ko behi seroalbumina

Aztergaiak:

- Kontzentrazio ezezaguneko behi seroalbumina

Tresnak:

- Espektrofotometroa

Prozedura:

5 saiodi hartu eta honako era honetan bete:

Saiodia	Behi seroalbumina kop. (mL) 4,9 g/L	Ur distilatu mL kopurua	Biuret erreaktibo mL kopurua	Lagin biologikoaren mL kopurua
1	0	4	4	0
2	1	3	4	0
3	2	2	4	0
4	3	1	4	0
5	4	0	4	0
6	0	0	4	4

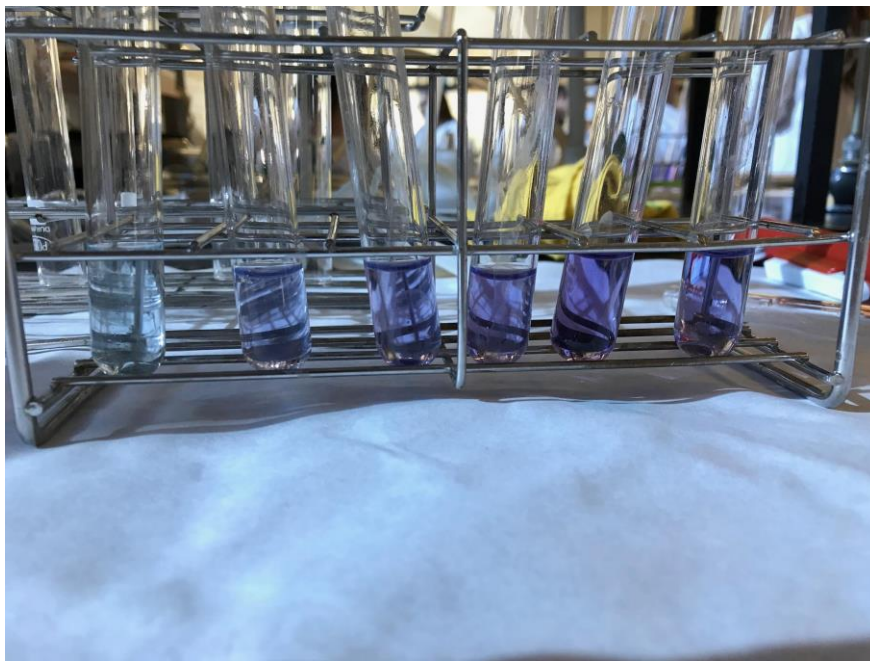
Behin disoluzioak prestatuta daudelarik, saiodiak ongi astindu eta kolorea ongi sortzera utzi 20 minutuz. Honen ostean, adsorbantzia 595 nm-tan neurtuko da espektrofotometroaren laguntzaz, 1 saiodia gure lagin "xuria" izango da, hau da gure adsorbantziaren 0-a. Azkenik, lortutako datuekin, excel taula batean datuak bildu:

Saiodia	Adsorbantzia	Proteina-kontzentrazioa (g/L)
1		
2		
3		
4		
5		

Behi seroalbumina kontzentrazioa adsorbantziarekiko irudikatuz zuzen bat kalibratuko dugu. Gure lagin biologikoaren datuak bertan txertatuta, honen kontzentrazioa kalkula dezakegu.

Emaitzak:

Saiodia	Adsorbantzia	Proteina kontzentrazioa (g/L)
0	0,001	0
1	0,123	0,61
2	0,220	0,92
3	0,243	1,23
4	0,301	1,53
Ezezaguna	0,228	????

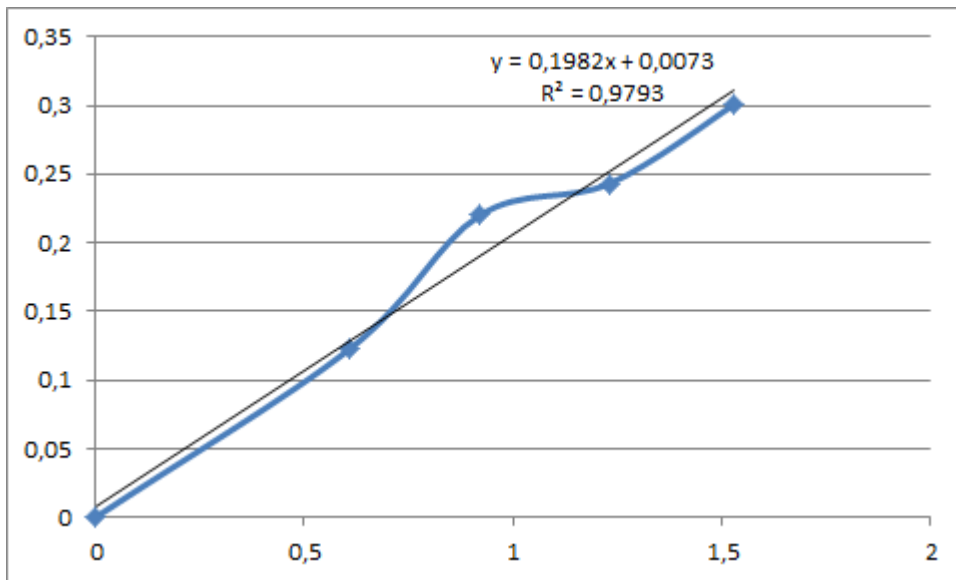


2.irudia: lortutako emaitzak eta kalibratzeko erabilitako saiodia

Galderak:

1. Zein da lagin biologiko ezezagunaren kontzentrazioa?

Gure datuak erabiliaz, excel programarekin grafiko bat egin genuen adsorbantzia kontzentrazioaren menpean eta honako hau eskuratu genuen:



Zuzen honen ekuazioa erabiliz, gure lagin ezezagunaren kontzentrazioa jakiten ahalko dugu:

$$\text{Laginaren adsorbantzia} = 0,1982 \times \text{Kontz.} + 0,0073$$

$$0,228 = 0,1982 \times \text{Kontz.} + 0,0073$$

Hemendik kontzentrazioaren balioa askatuz, kontzentrazioa = 1,1135 g/L-koa dela ematen digu.

Emaitza honek zentzua dauka guk kualitatiboki saiodiak konparatuz ikusi bait genuen aztergaiaren kolorearen intentsitatea 2 eta 3 saiodien artean zegoela eta emaitza kuantitatiboak berdina dio.

3. Elikagaien analisi biokimikoa: Esnearen proteinen banaketa

Oinarri Teorikoa:

Helburu nagusia egokiak diren hainbat erreakzio gauzatzuz behi-esnearen proteinak banatzea da. Orokorrean esnearen konposizioa horrelakoa izan ohi da:

Behi esnearen ohiko konposizioa:

- Ura: %80-88
- Proteinak: %3,5
 - Kaseina: %2,5
 - Laktoglobulina: %0,3
 - Laktoalbumina: %0,12
 - Beste proteinak: Entzimak (lipasak, proteasak, amilasak,...), Inmunoglobulinak,...
- Karbohidratoak: Laktosa: %5
- Lipidoak: %3,5
- A, D, E, K, C bitaminak (kantitate gutxi)
- Gatz mineralak: %0,9

Prozedura:

- **Kaseinaren banaketa:** hauspeakin-ontzi batean 40 mL esne jarri eta 60 mL ur gehitu. Ondoren azido azetikoa tantaz-tanta bota homogenezatzen den bitartean hauspeakin bat sortu arte. 5 minutuz utzi eta ondoren iragazi iragazkina (A iragazkina) guztiz gardena izan arte. A iragazkina gorde beranduago erabiliko delako.
- **Kaseinaren identifikazioa:** A hauspeakin pixka bat jarri bi saioditan eta NaOH 0,2N 2 mL gehitu. Saiodi hauei ninhidrina eta biuret frogak egin eta aurreko ataletako kaseinaren emaitzekin aldaratu
- **Laktoalbumina eta laktoglobulinaren identifikazioa:** A iragazkitik 3 edo 4 mL isuri saiodi batera. Berotzen jarri eta NaOH 0,1N tantaka-tantaka gehitu homogenezatzen den bitartean ingurune neutro/azidoa bihurtu harte (pH paperaren laguntzaz). Une horretan koagulu bat agertuko da flotaka dauden partikulen antza izango duena. Hauspeakinik ez sortzekotan, iragazkin gehiago gehitu eta errepikatu. Edukina iragazi eta iragazkina (B iragazkina)

jaso. Segidan, iragazkin pixka bat saiodi batera sartu eta ur mL bat gehituta Biuret-en froga gauzatu

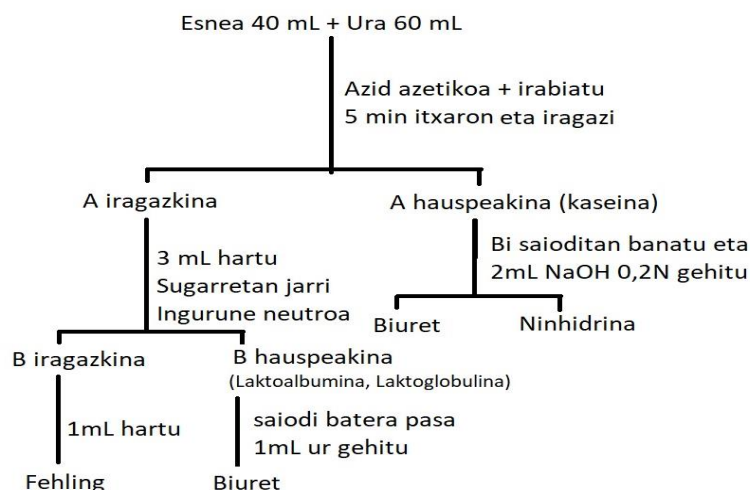
- **Laktosaren presentziaren ebidentzia:** B iragazkinaren mL bat erabiliz, Fehling froga egin Karbohidratoen atalean egin zen bezala.

Galderak:

1. Zer gertatu da esnearekin azido azetiko gehitu ondoren?
Azido azetiko gehitu ostean, hauspeakin bat sortu da.
2. Zerez osatuta dago koaguloa?
Hauspeakinari Ninhidrina eta Biuret frogak egin ondoren lortutako emaitzak honakoak izan dira: ninhidrina negatiboa eta biuret arrosa. Ondorioz, proteina baten aurrean gaude eta aurreko ataletako kaseina emaitzekin alderatuz emaitza berberak direla jabetu gara. Hori dela eta, hauspeakina kaseinaz osatuta dagoela esan dezakegu esnearen proteina nagusia delako.
3. Zer gertatu da bigarren hauspeakinari Biuret froga egiterakoan? Zerez osatuta dago bigarren hauspeakina? Zergatik?
Bigarren hauspeakinari Biuret froga egin diogunean emaitza positiboa lortu dugu kolore morekoa. Ondorioz, koagulua proteinaz osatuta dagoela esan dezakegu. Laktoalbumina eta Laktoglobulina izango dira, esnearen beste bi proteina nagusiak
4. B iragazkinari Fehling froga egin ostean emaitza positiboa ala negatiboa ateratu da?
Bigarren koaguluari Fehling froga egin ondoren emaitza positiboa lortu dugu. Honek esan nahi du bigarren koagulan karbohidrato presentzia dagoela, Laktosa izango da.

5. Egin ezazu osagaiak banatzeko egindako pausuen eskema bat:

Zuhaitz formako eskema





3. irudia: emaitza esperimentalak