

ITIS "G.C.FACCIO" VERCELLI – DIPARTIMENTO DI CHIMICA

Prof. Paolo Rosso

AMINOACIDI E PROTEINE

Introduzione

La fondamentale importanza delle proteine non è in discussione, attraverso queste molecole le cellule svolgono tutte le proprie funzioni. Le proteine sono molecole di grandi dimensioni e di elevato peso molecolare, la struttura è però molto simile sono venti aminoacidi che combinandosi in maniera differente modificano il significato della molecola. Le proteine svolgono numerose funzioni ad esempio enzimi che svolgono funzioni non importanti ma fondamentali per la vita e l'equilibrio della cellula stessa. Gli enzimi sono catalizzatori biologici, ovvero facilitano le reazioni abbassando l'energia di attivazione e aumentando la velocità di reazione. Le proteine sono dei mediatori chimici, ovvero modulano i segnali che le cellule si trasmettono, gli anticorpi che regolano la reazione dell'organismo quando entrano sostanze estranee, le proteine formano la struttura degli organi, della membrana cellulare, sono dei mezzi di trasporto di molecole all'interno e all'esterno della cellula. Molte proteine svolgono un'azione contrattile e quindi favoriscono il movimento degli organismi inferiori. Costituiscono materiali di deposito servono a nutrire gli embrioni animali e vegetali, ormoni svolgono un'azione importante per l'organismo tipo la regolazione del glucosio.

Chimica degli aminoacidi

Sono in numero di 20 tutti possiedono 1 gruppo amminico e acido. Si suddividono in aminoacidi non polari, polari, acidi e basici. Si suddividono ancora in aminoacidi essenziali e non essenziali. Gli aminoacidi presenti nelle proteine appartengono alla serie L infatti molti aminoacidi presentano l'atomo di carbonio alfa asimmetrico, si parla della isomeria ottica e di tutto quello che si è detto per gli zuccheri. Le due forme speculari vengono indicate come isomero D e L. Vi sono anche aminoacidi diversi ovvero la 6 N metilmetionina, la 4 idrossiprolina, la 5 idrossilisina.

La presenza di gruppi acidi e basici contemporaneamente nella molecola causa fenomeni particolari, possono polarizzarsi entrambi i gruppi oppure solo uno dei due. Il grado di ionizzazione dipende dal pH e possono essere dipoli oppure no. Il valore di pH dove si forma il dipolo viene chiamato pI punto isoelettrico. I gruppi funzionali sono deboli il calcolo del pI è dato dalla somma dei due valori di pK diviso per due.

$$PI = pK_1 + pK_2 / 2$$

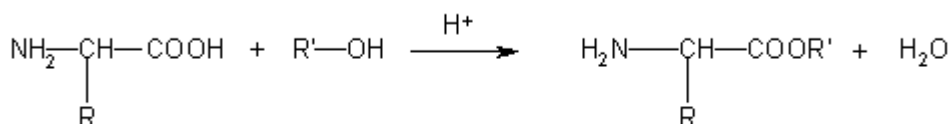
Il grado di ionizzazione dei gruppi acidi e basici è legato al pH della soluzione con la seguente formula:

$$pH = pK_a + \log \frac{\text{conc base coniugata}}{\text{conc acido coniugato}}$$

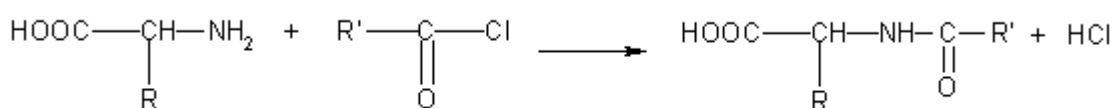
Reazioni degli aminoacidi

Le reazioni riguardano i gruppi acidi e basici. Si possono avere le seguenti reazioni:

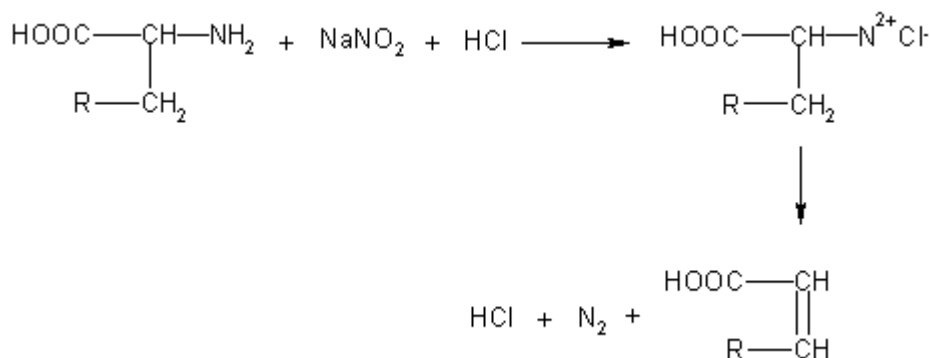
- 1) reazione con alcoli



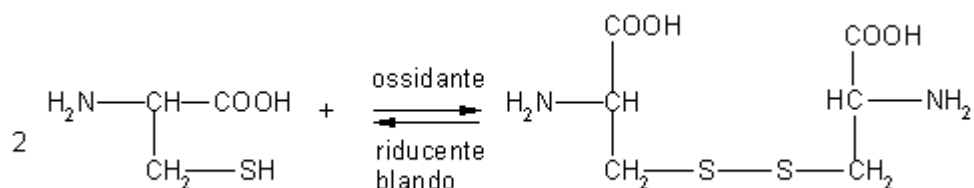
- 2) reazione con alogenuri alchilici,



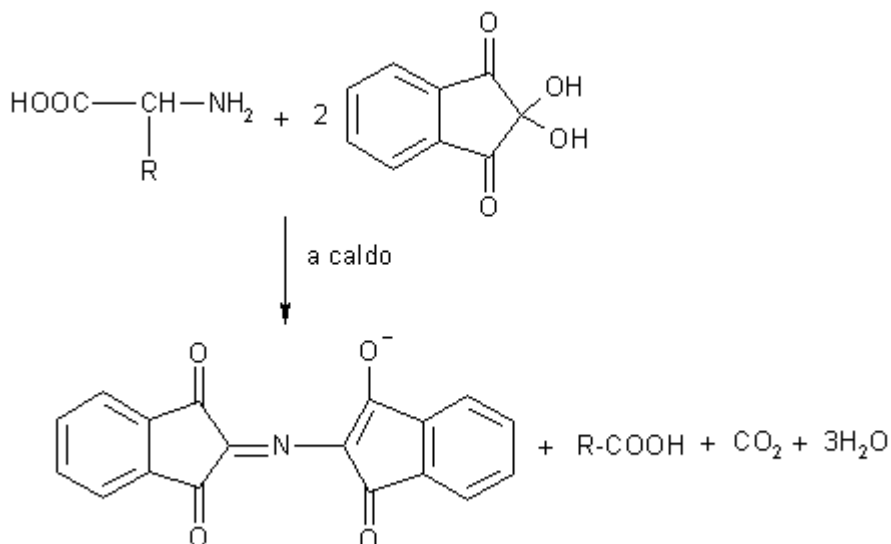
- 3) reazione con nitrito di sodio



4) reazione con ossidanti blandi

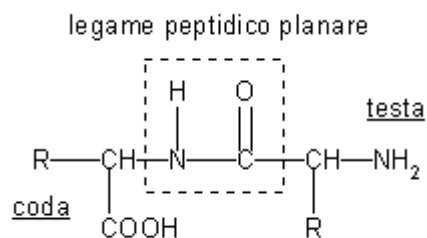


5) con ninidrina è una reazione di riconoscimento, reazione molto sensibile, bastano solo pochi mg di aminoacido per dare la reazione. La colorazione è caratteristica per gli aminoacidi ed è di color marrone. Con il reattivo di Fehling diluito al 0,5% di solfato di rame penta idrato e una soluzione al 2% di idrossido di sodio, non reagiscono gli zuccheri ma bensì le proteine.



Peptidi

Una delle importanti caratteristiche degli aminoacidi è la reazione tra il gruppo acido e amminico di due differenti aminoacidi, per formare il legame ammidico. Questo dimero che si viene a formare si chiama dipeptide. Il gruppo amminico ed il gruppo carbossilico sono i due terminali. La nomenclatura dei dipeptidi è quella di mettere il nome del primo aminoacido seguito dal nome del secondo aminoacido esempio valilvalina oppure cisteilcisteina. Dal modello spaziale di questi composti si può notare che il legame peptidico è una struttura planare, gli snodi ruotano liberamente intorno ai carboni ibridati sp^3 . Vengono così a crearsi delle strutture tridimensionali dove i piano vengono ad essere traslati rispetto al legame.



Proprietà acido base

Tutti gli amminoacidi hanno il gruppo acido e basico che sono deboli ovvero poco dissociati. Questi gruppi concorrono alla formazione di gruppi ionizzati dove una volta è presente la carica positiva altre volte la carica negativa. Vi è un valore di pH dove sono presenti entrambi le cariche quel valore viene detto punto isoelettrico. La ionizzazione degli amminoacidi dipende dal valore del pH, su questa caratteristica sono basate le analisi di separazione degli amminoacidi.

Struttura delle proteine

Le proteine sono dei polimeri naturali, formati dalle unità elementari che sono gli amminoacidi, legati con legami peptidici. La proteina viene ad assumere una struttura tridimensionale che è una sua caratteristica, non solo estetica ma bensì funzionale. Una temperatura troppo elevata, un pH troppo alto, la presenza di sali può determinare nella proteina una perdita della struttura tridimensionale. Il processo a cui va incontro la proteina si chiama di *denaturazione*. Molte volte questo processo è irreversibile, ma per taluni polimeri questo processo è reversibile. La reazione inversa si chiama di *rinaturazione*. Quando si lavora con una molecola proteica si deve lavorare sempre lontano dalle condizioni di denaturazione perché la molecola perde le sue proprietà.

Le proteine presentano quattro gradi di struttura.

1. **struttura primaria** è l'ordine con cui gli amminoacidi si susseguono ovvero la sequenza amminoacidica. Quindi i milioni di proteine sono formate sempre dai venti amminoacidi, però l'ordine di successione è diverso per cui la struttura primaria è diversa.
2. **la struttura secondaria** è data dai legami ad idrogeno e dalle forze di attrazione elettrostatica. In questo modo tratti della proteina tendono ad avvicinarsi conferendo al polimero una forma particolare. I legami ad idrogeno avvengono tra il gruppo carbossile e amminico. Si possono individuare due tipi di struttura secondaria una detta ad **alfa elica** e l'altra a **foglietto beta**. La *prima struttura* consiste in un ripiegamento elicoidale della struttura che si presentano come spiralizzato intorno ad un asse centrale, i legami ad idrogeno avvengono sui gruppi non lineari ma sfalsati di un piano. L'alfa elica è sempre destrorsa, anche se c'è un'elica levogira. Per avere questa struttura essendo i gruppi amminoacidi vicini, l'ingombro sterico gioca un ruolo importante; infatti la presenza di prolina impedisce la formazione della struttura secondaria. Per questo motivo abbiamo proteine che hanno struttura differente in funzione del tipo di amminoacidi presente. La struttura a *foglietto beta* si presenta come un ripiegamento più ordinato a zig zag i gruppi alchilici risultano proiettati sopra o sotto il piano della molecola. Più strutture di questo tipo si possono aggregare parallelamente formando una super struttura secondaria. Possiamo avere anche una struttura a *ripiegamento beta*, dove le interazioni tra il gruppo acido e basico avviene ogni tre amminoacidi.
3. **la struttura terziaria** è dovuta a residui lontani a ritrovarsi avvicinati e quindi legarsi mediante legami ad idrogeno o forze di attrazione elettrostatica. I gruppi idrofobici della molecola vengono segregati all'interno della struttura. Si possono formare legami zolfo zolfo tra i residui di cistina.
4. **struttura quaternaria** molte proteine sono formate da subunità, catene proteiche a forma globulare ovvero ripiegate in se. In questo caso abbiamo delle vere e proprie macro condensazioni e la struttura che si forma viene detta quaternaria. L'emoglobina è un esempio di struttura quaternaria. Si parlerà di siti allosterici che in funzione del loro compito saranno siti attivatori e inibitori allosterici.

I legami che intervengono nelle strutture delle proteine sono di natura:

- *legami covalenti* legami ammidici, ponti di solfuro, responsabili della struttura primaria e terziaria
- *legami a idrogeno* responsabile della struttura secondaria, terziaria e quaternaria
- *interazioni ioniche* possono essere repulsive o attrattive responsabile della struttura terziaria e quaternaria
- *interazione idrofobiche* responsabile della struttura secondaria.

Classificazione delle proteine:

Classificazione in funzione alla loro attività biologica

- *Enzimi* si tratta di una vasta classe di proteine che agiscono come dei catalizzatori
- *Proteine di riserva* sono proteine che servono a nutrire gli embrioni
- *Proteine di trasporto* sono dei vettori ad esempio l'emoglobina

- *Proteine protettive* come gli anticorpi molecole che sono in grado di proteggere l'organismo dall'invasione di determinate molecole
- *Tossine* proteine che vengono sintetizzate da sostanze estranee, ed hanno una elevata tossicità per l'organismo che ne viene colpito.
- *Proteine regolatrici* regolano le varie attività cellulari.
- *Proteine strutturali* servono per formare tessuti di sostegno

Classificazione in funzione alle loro proprietà

- *Proteine semplici* per idrolisi danno luogo agli aminoacidi tipo le albumine globulina, prolamine, proteine basiche.
- *Proteine coniugate* sono legate a gruppi di natura non proteica chiamato gruppo prostetico.
- *Proteine derivate* da prodotti dell'idrolisi acida, basica, enzimatica.

Attività di laboratorio:

Differenti esperienze si possono eseguire in laboratorio sulle proteine.

Analisi delle proteine presenti negli alimenti:

Prendere una piccola porzione di alimento omogeneizzare con un poco di acqua, se la soluzione è torbida filtrare quindi aggiungere qualche goccia dei reattivi scaldando su bagnomaria per qualche minuto. In presenza di proteine avviene una colorazione che varia dal viola all'azzurro, in funzione della provenienza delle proteine animale, vegetale. Il reattivo è formato dalla soluzione A del reattivo di Fehling allo 0,5% e idrossido di sodio al 2%.

Separazione degli aminoacidi e delle proteine con elettroforesi:

Si possono utilizzare come fonte proteica il bianco d'uovo, oppure vegetali, oppure animali, disgregare le proteine in ambiente basico con una concentrazione 5 N, per un tempo di 5 - 6 ore, neutralizzare con acido cloridrico, aggiungere al preparato carbone vegetale, filtrare e concentrare sino a 50 ml. La soluzione che si ottiene contiene aminoacidi derivati dalle proteine. Si prepara lo strumento per l'elettroforesi, le soluzioni tampone a pH =6,1 e pH = 8,5, si preparano le strisce di carta da filtro, quindi si depongono una serie di aminoacidi di riferimento e si procede all'elettroforesi con 350 V per circa 1 ora. Alla fine della corsa si asciugano i fogli di carta in stufa a 100°C, quindi si spruzzano le lastrine con ninidrina il tutto in stufa a 100°C per asciugare le lastrine. Si formano delle macchie di colore marrone, si calcolano gli Rf, una seconda analisi mette invece le proteine che sono state idrolizzate, stessa corsa si calcolano gli Rf e si confrontano con gli aminoacidi noti; si passa quindi alla valutazione quantitativa del tipo di aminoacidi presenti nella proteina.

Separazione degli aminoacidi utilizzando cromatografia su carta

Si possono separare una miscela di aminoacidi utilizzando la cromatografia su carta. Si preparano le strisce di carta specifica per la cromatografia, si procede alla semina degli aminoacidi di riferimento, si prepara la miscela eluente formata da alcol butilico, acido acetico glaciale, acqua in rapporto 6:2:3. Si esegue la corsa, alla fine si mette la striscia in stufa ad asciugare, si spruzza una soluzione di ninidrina, il tutto in stufa ad asciugare e si calcolano gli Rf degli aminoacidi noti. Si passa alla semina delle proteine dissociate ad esempio quelle dell'analisi precedente, si calcolano gli Rf e si confrontano con gli aminoacidi noti. Si calcola la quantità di aminoacidi presente nella proteina naturale.

Separazione degli aminoacidi utilizzando cromatografia su strato sottile

Stessa procedura della precedente ma si utilizza la TLC. La miscela eluente è formata da alcol butilico, acido acetico glaciale e acqua in rapporto 4:1:1, il reattivo è una soluzione di ninidrina.

Da queste tre metodiche si possono trarre le seguenti considerazioni: che differenza esiste tra le metodiche eseguite, quale sensibilità hanno i tre metodi di analisi, quale è il tempo di analisi. Cercare quindi di capire quando utilizzare una metodica rispetto ad un'altra.

Separazione dei fosfolipidi mediante cromatografia su strato sottile

Utilizzando l'uovo è possibile fare la cromatografia dei fosfolipidi dal rosso. Utilizzare una lastrina attivata deporre i campioni precedentemente trattati; la soluzione eluente è formata da cloroformio, metanolo, acido acetico acqua in rapporto 80: 10: 6: 4. La lastrina alla fine della corsa viene irradiata con radiazione UV per visualizzare le macchie. La miscela per lo sviluppo è formata da 20 g di solfato di ammonio al 20% , 100 ml di acqua e 3 ml di acido solforico concentrato. Il tutto in stufa a 200°C per circa 30 minuti. Si formano macchie di colore marrone scuro. Si calcolano gli Rf che sono riassunti nella tabella sotto riportata:

Molecole	R f
Lecitine	0,4
Fosfatidiletanolammine	0,9
Sfingomieline	0,2

Altre analisi utilizzando campioni come la caseina del latte. Tutte queste analisi debbono fornire agli allievi notizie utili sulla manipolazione delle proteine, potendo verificare le possibilità tecniche per descrivere tutta una serie di proprietà di molecole naturali. Oltre allo studio teorico si passa all'applicazione pratica, utilizzando e rielaborando le informazioni assunte a lezione.

Precipitazione della caseina del latte.

Si preleva circa 50 ml di latte aggiunti a 50 ml di acqua distillata. Si scalda a 50°C si aggiungono circa 5 ml di acido acetico al 10%, agitando. Dopo circa 10 minuti si aggiungono 5 ml di acetato di sodio M e si porta la soluzione al pH = 4,5. Si raffredda e si filtra lavando il bicchiere con acqua fredda. Il precipitato si sospende in etanolo 10 ml si filtra nuovamente e si sprema il precipitato. Si lascia asciugare il precipitato e quindi si passa all'idrolisi della proteina con i metodi sopra descritti. Quindi la procedura da seguire è sempre la stessa. Si potrà variare la miscela eluente e vedere i risultati ottenuti.

Le lezioni di teoria sui principi teorici dell'elettroforesi e della cromatografia vengono affrontati nel corso di analisi tecnica.