



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ  
ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ

---

## **Βιοχημεία - Αρχές Βιοτεχνολογίας**

### **Εργαστηριακές ασκήσεις**

Γεώργιος Παπαδόπουλος, Καθηγητής Τμ. Τεχνολόγων Γεωπόνων Τ.Ε.

## Άδειες Χρήσης

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons. Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.



## Χρηματοδότηση

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα. Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο ΤΕΙ Ηπείρου**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.



Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.



## ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ

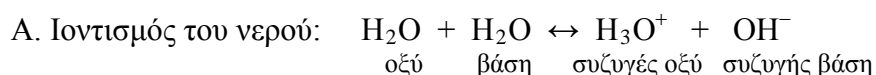
Τμήμα Τεχνολογίας Γεωπονίας

### 1-2. ΙΟΝΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

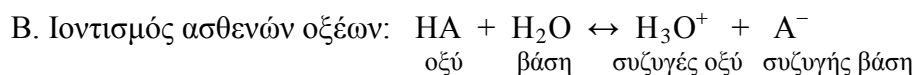
#### A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

##### 1. Ιοντισμός ασθενών ηλεκτρολυτών

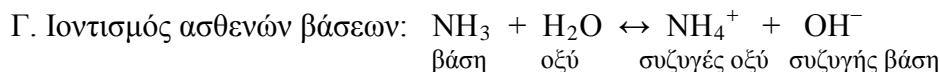
Να θυμηθούμε μερικά πράγματα από τη Γεωργική Χημεία:



στους 25°C η σταθερά του νερού  $K_w = [\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{OH}^-] = 10^{-14} \text{ M}^2$



Η σταθερά διάστασης  $K_a = [\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{A}^-] / [\text{HA}]$ , ορίζεται δε  $\text{p}K_a = -\log K_a$ , κατ' αναλογία με την εξίσωση  $\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$



Η σταθερά διάστασης  $K_b = [\text{NH}_4^+] \cdot [\text{OH}^-] / [\text{NH}_3]$ , ορίζεται δε  $\text{p}K_b = -\log K_b$ , κατ' αναλογία με την εξίσωση  $\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$ .

##### 2. Ρυθμιστικά διαλύματα

Ορισμός: Ρυθμιστικό διάλυμα είναι το διάλυμα στο οποίο αν προστεθεί μικρή αλλά υπολογίσιμη ποσότητα ισχυρού οξέος ή βάσης διατηρεί το pH πρακτικά σταθερό μέσα σε μια περιοχή τιμών του pH. Ένα ρυθμιστικό διάλυμα αποτελείται συνήθως από ένα ασθενές οξύ και την συζυγή του βάση ή μια ασθενή βάση και το συζυγές της οξύ.

Στην εξίσωση για τη σταθερά διάστασης  $K_a = [\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{A}^-] / [\text{HA}]$ , μπορεί με αλγεβρικό μετασχηματισμό να μας προκύψει η:

$$\text{εξίσωση Henderson - Hasselbalch : } \text{pH} = \text{p}K_a + \log([\text{A}^-]/[\text{HA}])$$

σύμφωνα με τους πιο πάνω συμβολισμούς  $\text{HA} = \text{συζυγές οξύ}$ ,  $\text{A}^- = \text{συζυγής βάση}$ . Η αναλυτική παραγωγή της εξίσωσης αυτής, καθώς και η σημασία των ρυθμιστικών διαλυμάτων παρατίθενται από την 3<sup>η</sup> έκδοση της Βιοχημείας του L. Stryer (©: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, κατόπιν άδειας):

## 44

Το  $pK$  του οξέος καθορίζεται ως

$$pK = -\log K = \log \frac{1}{K} \quad (5)$$

Αν παρατηρήσουμε την εξίσωση (4), βλέπουμε ότι το  $pK$  ενός οξέος είναι το  $pH$  όπου το οξύ είναι σε διάσταση κατά το ήμισυ.

## ΕΙΣΙΩΣΗ HENDERSON - HASSELBALCH

Ποια είναι η σχέση μεταξύ  $pH$  και της αναλογίας οξέος προς βάση; Μια χρήσιμη έκφραση μπορεί να δειχθεί από την εξίσωση (4). Ανακατανομή αυτής της εξίσωσης δίνει:

$$\frac{1}{[H^+]} = \frac{1}{K} \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (6)$$

Παίρνοντας τους λογαρίθμους και των δύο πλευρών, η εξίσωση (6) δίνει

$$\log \frac{1}{[H^+]} = \log \frac{1}{K} + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (7)$$

Αντικαθιστώντας  $pH$  για τον λογάριθμο  $1/[H^+]$  και  $pK$  για τον λογάριθμο  $1/K$  στην (7) παίρνουμε

$$pH = pK + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (8)$$

που είναι γενικά γνωστή ως η εξίσωση Henderson-Hasselbalch.

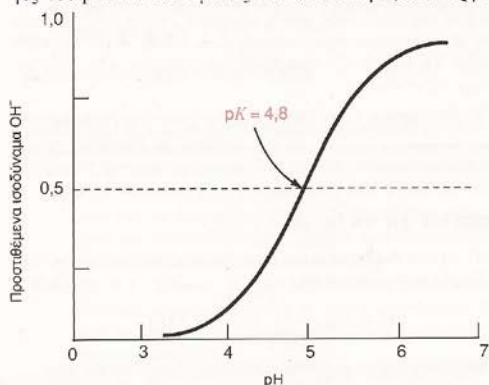
Το  $pH$  ενός διαλύματος μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση (8) αν η μοριακή σχέση  $A^-$  προς  $HA$  και το  $pK$  του  $HA$  είναι γνωστά. Ας πάρουμε ένα διάλυμα 0,1 M οξικού οξέος και 0,2 M οξικού ιόντος. Το  $pK$  του οξικού οξέος είναι 4,8. Επομένως το  $pH$  του διαλύματος δίνεται από

$$pH = 4,8 + \log 0,2/0,1 = 4,8 + \log 2 = 4,8 + 0,3 = 5,1$$

Αντίθετα το  $pK$  ενός οξέος μπορεί να υπολογιστεί αν η μοριακή αναλογία του  $A^-$  προς  $HA$  και το  $pH$  είναι γνωστά.

ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ  $pH$ 

Ένα συζυγές ζεύγος οξέος-βάσης (όπως το οξικό οξύ και το οξικό ιόν) έχει μία βασική ιδιότητα: αντιστέχεται σε αλλαγές του  $pH$  του διαλύματος. Με άλλα λόγια, λειτουργεί ως



Σχήμα 2-55  
Καμπύλη τιτλοδότησης του οξικού οξέος.

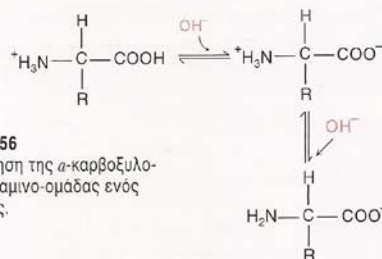
ρυθμιστικό διάλυμα. Σκεφτείτε την προσθήκη  $OH^-$  σε ένα διάλυμα οξικού οξέος ( $HA$ ):



Η γραφική παράσταση της εξάρτησης του  $pH$  αυτού του διαλύματος από την ποσότητα του  $OH^-$  που προστίθεται λέγεται *καμπύλη τιτλοδότησης* (Σχήμα 2-55). Σημειώστε ότι υπάρχει ένα σημείο καμπής στην καμπύλη για  $pH$  4,8 που είναι το  $pK$  του οξικού οξέος. Κοντά σ' αυτό το  $pH$  σχετικά μεγάλες ποσότητες  $OH^-$  δίνουν μικρές αλλαγές στο  $pH$ . Γενικά, ένα ασθενές οξύ είναι καλύτερο ρυθμιστικό διάλυμα για αλλαγές  $pH$  κοντά στο  $pK$  του.

ΟΙ ΤΙΜΕΣ  $pK$  ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Ένα αμινοξύ όπως η γλυκίνη περιέχει δύο ομάδες που ιοντίζονται: ένα  $\alpha$ -καρβοξύλιο και μία πρωτονιωμένη  $\alpha$ -αμινομάδα. Καθώς προσθέτουμε βάση, αυτές οι δύο ομάδες εξισορροπούνται (Σχήμα 2-56). Τα  $pK$  της  $\alpha$ -COOH είναι 2,3 ενώ αυτό της  $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> είναι 9,6. Τα  $pK$  αυτών των ομάδων είναι σχεδόν τα ίδια και στα άλλα αμινοξέα. Μερικά αμινοξέα όπως το ασπαραγινικό περιέχουν επίσης ιοντιζόμενες πλευρικές αλυσίδες. Τα  $pK$  στις ιοντιζόμενες πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων ποικίλλουν από 3,9 (στο ασπαραγινικό), μέχρι 12,5 στην αργινίνη.



Σχήμα 2-56  
Τιτλοδότηση της  $\alpha$ -καρβοξυλο- και της  $\alpha$ -αμινο-ομάδας ενός αμινοξέος.

## Πίνακας 2-4

Τιμές  $pK$  μερικών αμινοξέων.

| Αμινοξύ          | Τιμές $pK$ (25°C)    |  |                  |
|------------------|----------------------|--|------------------|
|                  | $\alpha$ -COOH ομάδα | $\alpha$ -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ομάδα | Πλευρική αλυσίδα |
| Αλανίνη          | 2,3                  | 9,9  |                  |
| Γλυκίνη          | 2,4                  | 9,8  |                  |
| Φαινυλαλανίνη    | 1,8                  | 9,1  |                  |
| Σερίνη           | 2,1                  | 9,2  |                  |
| Βαλίνη           | 2,3                  | 9,6  |                  |
| Ασπαραγινικό οξύ | 2,0                  | 10,0   | 3,9              |
| Γλουταμινικό οξύ | 2,2                  | 9,7  | 4,3              |
| Ιστιδίνη         | 1,8                  | 9,2  | 6,0              |
| Κυστεΐνη         | 1,8                  | 10,8   | 8,3              |
| Τυροσίνη         | 2,2                  | 9,1  | 10,9             |
| Λυσίνη           | 2,2                  | 9,2  | 10,8             |
| Αργινίνη         | 1,8                  | 9,0  | 12,5             |

Πηγή: Από J.T. Edsall and J. Wyman. *Biophysical Chemistry* (Academic Press, 1958), Κεφ. 8.

Από την καμπύλη του Σχήματος 2-55 (τιτλοδότηση οξικού οξέος) μας προκύπτει:

1. Όταν το  $pH = pK_a$  η συγκέντρωση της συζυγούς βάσης είναι ίση με την συγκέντρωση του αδιάστατου οξέος.
2. Σε αυτή την τιμή το διάλυμα παρουσιάζει την μεγαλύτερη δυνατή κλίση ως Δισοδύναμα  $OH^-/\Delta pH$  (σημείο καμπής) άρα και τη καλύτερη ρυθμιστική του ικανότητα.
3. Η ρυθμιστική ικανότητα εκτείνεται το πολύ στο εύρος τιμών  $pH = pK_a \pm 1$ . Βλέπουμε στη προκείμενη περίπτωση το  $pK_a = 4,8$ , οπότε περιμένουμε καλή ρυθμιστική ικανότητα στο εύρος τιμών  $pH = 3,8 - 5,8$ . Προσέξτε λοιπόν στο σχήμα και δέστε ότι μέσα σε αυτό το πλαίσιο η αλλαγή του  $pH$  λόγω έξωθεν προσθήκης μικρής αλλά υπολογίσιμης ποσότητας οξέος ή βάσης θα είναι μικρή. Η αλλαγή φυσικά είναι ακόμη μικρότερη όσο πιο κοντά είμαστε στο  $pK_a$  και όταν είμαστε ακριβώς σε αυτή τη τιμή  $pH$ , τότε είναι η μικρότερη δυνατή.
4. Θα μας προέκυπτε ακριβώς η ίδια καμπύλη τιτλοδότησης στη περίπτωση που ξεκινούσαμε από το ανιόν του οξέος (π.χ. οξικό νάτριο το οποίο δίσταται πλήρως στο νερό) και προσθέταμε διαρκώς ισχυρό οξύ (π.χ. υδροχλωρικό οξύ,  $HCl$ ). Απλά στον άξονα των  $\psi$  θα γράφαμε ισοδύναμο οξέος και στο μηδέν ισοδύναμο οξέος θα αντιστοιχούσε  $pH = 7$ , ενώ στο ένα ισοδύναμο οξέος θα αντιστοιχούσε  $pH = 3,2$ .

Γιατί είναι τόσο σημαντική η ρύθμιση του  $pH$  στους ζωντανούς οργανισμούς;

- Όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα (μιτοχόνδρια, λυσοσώματα, συσκευή Golgi, ενδοπλασματικό δίκτυο, χλωροπλάστες, έχουν το κάθε ένα τη δική του και διαφορετική τιμή  $pH$ , Η οποία και διατηρείται σταθερή λόγω των ρυθμιστικών διαλυμάτων που περιέχει το κάθε τέτοιο διαμέρισμα.
- Το αίμα πρέπει να έχει σταθερό  $pH = 7,4$ . Μεγαλύτερη τιμή οδηγεί σε μια κατάσταση που ονομάζεται αλκάλωση, ενώ χαμηλότερες τιμές  $pH$  στην οξέωση. Και οι δύο αυτές καταστάσεις είναι ασύμβατες με την ζωή. Η δεύτερη μάλιστα μπορεί να αποβεί θανατηφόρα! Επομένως είναι πολύ σημαντικό η παρουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων στο πλάσμα του αίματος που κρατούν το  $pH$  σταθερό.
- Ουσιαστικά όλα τα ένζυμα (βιολογικοί καταλύτες) για να δράσουν χρειάζονται καθορισμένες τιμές  $pH$ . Η σημασία λοιπόν και εδώ των ρυθμιστικών διαλυμάτων είναι μεγάλη.

### 3. Αμινοξέα

Τα αμινοξέα έχουν γενικό τύπο

$$\begin{array}{c} \mathbf{R-CH-COOH} \\ | \\ \mathbf{NH_2} \end{array}$$

Όπου  $R$  μπορεί να είναι μια από 20 διαφορετικές ομάδες (αλειφατική, αρωματική, όξινη, βασική, πολική, θειούχα, υδροξυλούχα).

Έχουν δύο ιοντιζόμενες ομάδες, την  $-COOH$  και την  $-NH_2$ , και η πρώτη μπορεί να διασταθεί σε  $-COO^-$  ( $pK_a = 2,2$ ) ενώ η δεύτερη μπορεί να προσλάβει ένα ιόν υδρογόνου και να γίνει  $-NH_3^+$  ( $pK_a = 9,6$ ). Σε αυτό το εργαστήριο θα τιτλοδοτήσετε τις δύο ιοντιζόμενες ομάδες του απλούστερου των αμινοξέων, της γλυκίνης (όπου  $R = H$ ).

*Ερωτήσεις*

1. Γιατί τα αμινοξέα είναι ρυθμιστικά διαλύματα;
2. Σε ποιά περιοχή του pH είναι ρυθμιστικά διαλύματα;
3. Υπάρχουν αμινοξέα που έχουν περισσότερα από δύο σημεία καμπής, (γιατί;) Σε ποιες /ποια περιοχή του pH θα εκδηλώνουν την ρυθμιστική τους δράση;

**Απαραίτητη βιβλιογραφία**

1. J. Clark, R. Switzer. Πειραματική Βιοχημεία. 2<sup>η</sup> έκδοση. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2000.
2. J.M. Berg, J.L Tymoczko., L.Sryer, Βιοχημεία, 5<sup>η</sup> έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2012.
3. Γρ. Χ. Διαμαντίδη, Εισαγωγή στη Βιοχημεία, 3<sup>η</sup> έκδοση, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 2007.
4. Άσκηση 3 στο Εργαστήριο Γεωργικής Χημείας: Μέτρηση του pH.  
E-class, <http://eclass.gunet.gr/modules/document/document.php?course=LABGU280&openDir=/52678eb6ccy1>

## B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός : Προσδιορισμός της άγνωστης συγκέντρωσης υδατικών διαλυμάτων γλυκίνης με τιτλοδότηση τους με διαλύματα HCl και NaOH γνωστής συγκέντρωσης.

Αρχή της μεθόδου : Υδατικό διάλυμα γλυκίνης τιτλοδοτείται με διάλυμα HCl, συγκέντρωσης 2N, και με διάλυμα NaOH, συγκέντρωσης 2N. Οι τιμές του pH καταγράφονται και κατασκευάζεται η καμπύλη τιτλοδότησης σε χαρτί γραφικής παράστασης («μιλλιμετρέ»). Από την καμπύλη αυτή προσδιορίζονται τα σημεία καμπής.

*Σκεύη - Όργανα*

- α) Ποτήρια ζέσεως
- β) Ογκομετρικές φιάλες
- γ) Προχοΐδα - στήριγμα
- δ) Μαγνητικός αναδευτήρας και μαγνήτης
- ε) Πεχάμετρο (ψηφιακό)

*Αντιδραστήρια*

- α) Γλυκίνη
- β) Πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα
- γ) Διάλυμα HCl, 2N
- δ) Διάλυμα NaOH, 2N

*Πορεία εργασίας*

- α) Παρασκευή υδατικών διαλυμάτων NaOH και HCl 2N.
- β) Παρασκευή υδατικού διαλύματος γλυκίνης (1 g γλυκίνης σε 80 ml H<sub>2</sub>O).
- γ) Στο υδατικό διάλυμα γλυκίνης που σας δίνεται θα βάλετε τον μαγνήτη και θα το τοποθετήσετε στον μαγνητικό αναδευτήρα. Στην συνέχεια θα προσαρμόσετε το ηλεκτρόδιο του πεχάμετρου και την προχοΐδα. Προσθέτετε στο υπό ανάδευση διάλυμα αμινοξέος 1 σταγόνα διαλύματος HCl και καταγράφετε την τιμή του pH. Η προσθήκη ανά μία σταγόνα συνεχίζεται μέχρι να μην αλλάζει το pH του διαλύματος. Συνεχίζετε με ~ 0,5 ml μέχρι το pH = 1. Αντίστοιχα δουλεύετε με το διάλυμα NaOH μέχρι το pH = 11. γ) Η πορεία του σταδίου β) επαναλαμβάνεται με τυφλό διάλυμα 80 ml H<sub>2</sub>O).
- δ) Συμπλήρωση των στηλών του πίνακα και κατασκευή της καμπύλης τιτλοδότησης, pH συναρτήσει μεq οξέος ή βάσης, στήλη (1) με στήλη (5).
- ε) Υπολογισμός της συγκέντρωσης του αμινοξέος από τη καμπύλη τιτλοδότησης. (Υπόδειξη: πώς θα βρούμε πόσα ισοδύναμα οξέος ή βάσης χρησιμοποιήθηκαν για να εξουδετερωθεί η ιοντική ομάδα (καρβοξυλική ή αμινική) της γλυκίνης;).
- στ) Προσδιορισμός από την καμπύλη των σημείων καμπής και σύγκρισή τους με τις θεωρητικές τιμές.









4. Να κάνετε τους ίδιους υπολογισμούς με το 3. για προσθήκη 1 ml υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 10 M, 1 M ή 0,1 M.
5. Κοιτάξετε το βιβλίο Βιολογίας του προηγούμενου εξαμήνου (ή στη Βιβλιοθήκη του ιδρύματος, αν είστε παλιό εξάμηνο) και καταγράψετε το pH κάθε ενός από τα ακόλουθα υποκυτταρικά διαμερίσματα:  
Λυσοσώματα, ενδοσώματα, ενδοπλασματικό δίκτυο, συσκευή Golgi, μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες, εκκριτικά κυστίδια.  
Ποιο είναι το pH του κάθε ενός από αυτά τα διαμερίσματα. Ποιο είναι το εύρος τιμών pH που παρατηρείται σε ένα κύτταρο;
6. Με βάση την απάντησή σας στο 5., μπορείτε να εξηγήσετε γιατί υπάρχουν τέτοιες διαφορές στις τιμές pH του κάθε διαφορετικού υπο-κυτταρικού οργανιδίου;