



Universiteit Utrecht

Faculteit
Bètawetenschappen
Scheikunde



Melk en essentiële aminozuren

Lesbrief vwo

Lesbrief : Melk en essentiële aminozuren

Versie januari 2015

Gepubliceerd en gedistribueerd door

Universiteit Utrecht
Departement Scheikunde
Onderwijsinstituut Scheikunde
Padualaan 8
3584 CH Utrecht
Nederland
Telefoon: 030-2539339
E-mail: science.vwo.chem@uu.nl

Deze opdracht was een stagopdracht voor de OCEP cursus 2007
Orientatie op Communicatie en Educatieve Praktijk
Stagiaires/ontwikkelaars: Joost Wolters, Erik Lemmens
Stagebegeleider: Iris Caris, Onderwijsinstituut Scheikunde

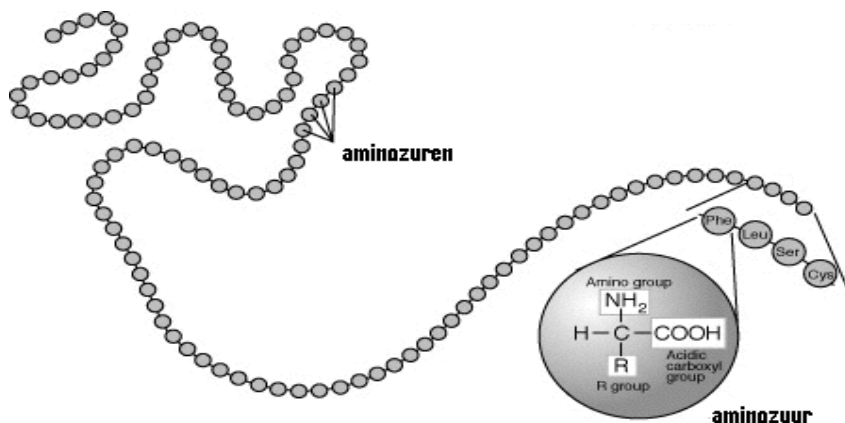
© 2007 Onderwijsinstituut Scheikunde, Universiteit Utrecht, Nederland

Mits deze bron wordt vermeld is het toegestaan om zonder voorafgaande toestemming van bovenstaande uitgever deze uitgave geheel of gedeeltelijk te kopiëren dan wel op andere wijze te verveelvoudigen. Het Onderwijsinstituut Scheikunde stelt het op prijs geïnformeerd te worden over het gebruik van deze uitgave en de ervaringen die ermee zijn opgedaan.

Melk en essentiële aminozuren

Inleiding

Eiwitten vervullen allerlei belangrijke taken in ons lichaam. Deze eiwitten zijn opgebouwd uit aminozuren. Om eiwitten te maken heeft je lichaam alle twintig aminozuren nodig. Sommige van deze aminozuren maakt je lichaam zelf, maar er zijn ook aminozuren die niet door je lichaam zelf gevormd kunnen worden. Om deze zogenaamde essentiële aminozuren binnen te krijgen zijn we afhankelijk van voedsel. Aminozuren komen je lichaam meestal binnen als eiwitten. Deze eiwitten worden bij de spijsvertering afgebroken tot losse aminozuren die je lichaam vervolgens gebruikt om nieuwe eiwitten op te bouwen. De afbraak van eiwitten gebeurt door enzymen in het verteringskanaal die proteasen heten.



Afbeelding 1: de primaire structuur van een eiwit.¹

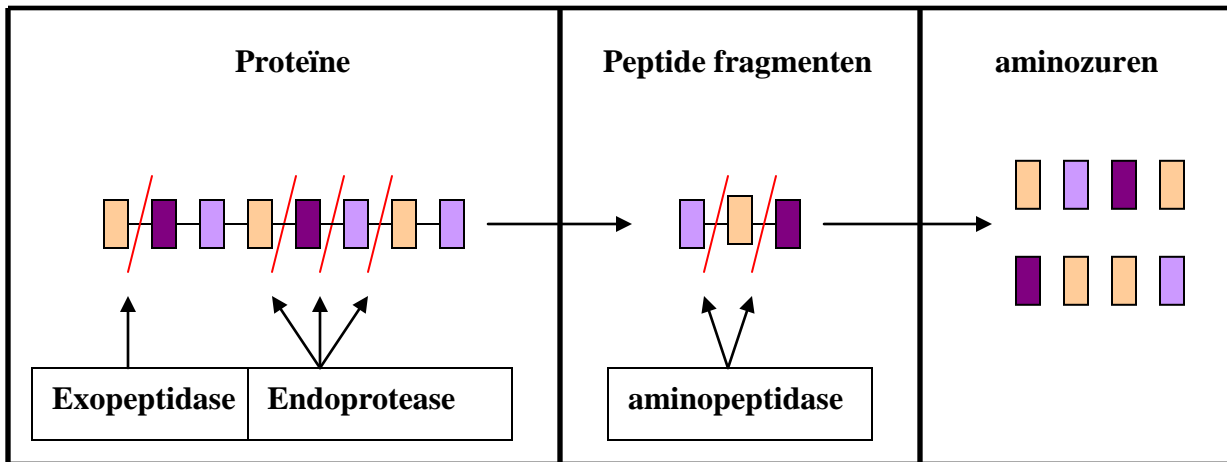
Vertering van eiwitten

Een eiwit – of proteïne – wordt gevormd als een lange reeks aminozuren (Afbeelding 1). Deze reeks aminozuren wordt ‘gevouwen’ tot een functioneel eiwit. De vorm, die door dit vouwen ontstaat, is bepalend voor de functie of regulatie van het eiwit.

De afbraak van eiwitten of proteïnen uit ons voedsel in peptiden en aminozuren gebeurt door proteasen in het verteringskanaal. Proteasen zijn enzymen (-ase) gericht op proteïnen (proteo). Voor de afbraak van eiwitten zijn verschillende soorten proteasen nodig. Als eerst knippen de endoproteasen en exopeptidasen het eiwit in kleinere polypeptiden. Dit zijn kleinere ketens van aminozuren (Afbeelding 2). Alle proteasen knippen alleen op een specifieke plek in de keten, bijvoorbeeld na een bepaald aminozuur. Vervolgens knippen peptidasen deze polypeptiden tot losse aminozuren. Daarna worden deze individuele (essentiële) aminozuren getransporteerd van het verteringskanaal naar het bloed.

Vragen

1. Wat zijn de kenmerkende groepen van een aminozuur? (Binas) Geef een algemene structuurformule van een aminozuur.



Afbeelding 2: het knippen van een eiwit

Melkallergie

Een belangrijke bron voor essentiële aminozuren is melk. Melk is rijk aan eiwitten. De belangrijkste hiervan is caseïne, dat melk zijn witte kleur geeft. Het belang van melk begint al bij de geboorte van een baby. Door moedermelk of via melkpoeder krijgt het pasgeboren kind de essentiële aminozuren binnen.

Soms ontwikkelen kinderen op latere leeftijd een allergie of intolerantie tegen melk, dit wordt koemelkallergie genoemd. Bij kinderen met een koemelkallergie reageert het immuunsysteem heftig op caseïne of een ander eiwit uit melk. Deze kinderen kunnen dus geen melk drinken. Hierdoor verliezen deze kinderen een belangrijke bron van voedingsstoffen.

Alternatieven

Er zijn alternatieven die ervoor zorgen dat kinderen met koemelkallergie toch aan essentiële aminozuren komen. Een ervan is sojamelk. Sojamelk bevat net als melk eiwitten, maar deze zijn anders dan die in melk en veroorzaken dus niet de allergische reactie.

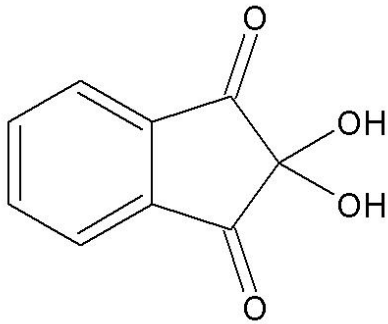
Een andere mogelijkheid is dingen eten of drinken die essentiële aminozuren bevatten als zogenaamde vrije aminozuren. Hierdoor krijg je wel deze aminozuren binnen, maar zonder de eiwitten waar het lichaam allergisch voor is. Een bron van vrije aminozuren is bijvoorbeeld vruchtensap, maar er is ook speciale babyvoeding met vrije aminozuren verkrijgbaar.

Vragen

2. Zou een gebalanceerd dieet van aminozuren de menselijke inname van alle eiwitten kunnen vervangen?
3. Zijn er ook aminozuren die niet in je voeding hoeven te zitten?

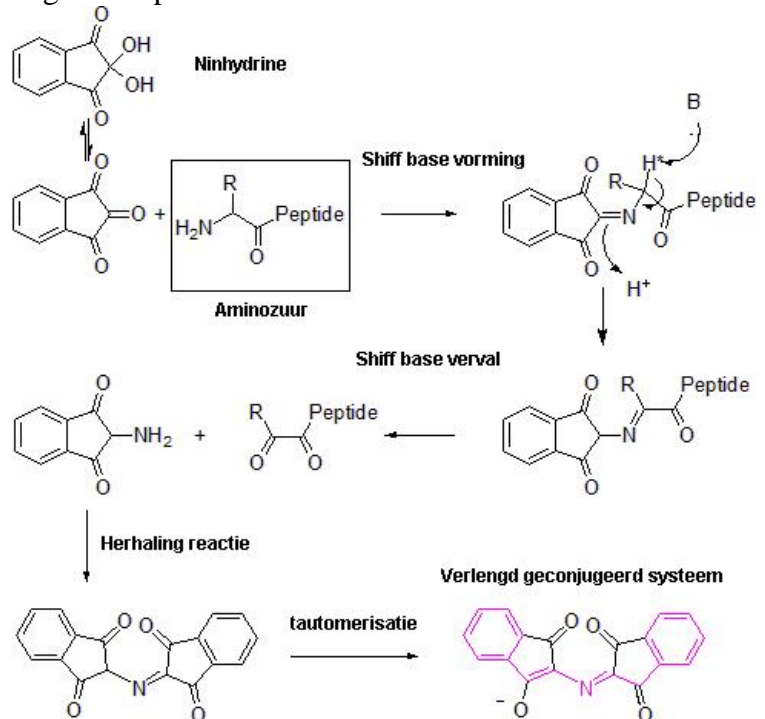
Het aantonen van aminozuren

In de experimenten bij deze lesbrief gaan we aminozuren aantonen. Aminozuren zijn in vaste vorm een wit poeder en in oplossing kleurloos. Je kunt ze in melk of vruchtensap dus niet zien. Er is echter een manier om ze zichtbaar te maken. Dit doe je door kleuring met het stofje ninhydrine.



Afbeelding 3: De structuur van ninhydrine²

Ninhydrine (Afbeelding 3) is een stofje dat gebruikt wordt om ammonium of vrije amines te detecteren. Aminozuren zijn vrije amines en kunnen dus met ninhydrine gedetecteerd worden, doordat ninhydrine met aminozuren een reactie aangaat die een complex oplevert dat paars kleurt. De reactie tussen aminozuren en ninhydrine staat schematisch weergegeven in Afbeelding 4. Het geconjugeerde systeem in het laatste molecuul veroorzaakt de paarse kleur. Deze reactie werkt het beste onder wat hogere temperaturen. Je moet dus verwarmen.



Afbeelding 4: De reactie van ninhydrine met aminozuren

Experiment 1: Vertering van Caseïne in vrije aminozuren

Inleiding

In het volgende experiment gaan jullie kijken naar de omzetting van caseïne in deze vrije aminozuren met behulp van het enzym protease. Met behulp van ninhydrine kunnen de ontstane vrije aminozuren aangetoond worden door een kleuromslag, die ontstaat door het mengsel te verwarmen. Deze kleuromslag is te meten met een spectrofotometer, bij een golflengte van 570 nm.

Spectrofotometer

Atomen kunnen door absorptie van straling in een toestand van hogere energie komen. Elektronen die zich normaal gesproken in het laagst mogelijke energieniveau bevinden, kunnen onder opname van energie overgaan naar een hoger energieniveau. Alleen straling met een bepaalde golflengte, overeenkomend met het energieverschil tussen twee niveaus, kan worden opgenomen.

In organische moleculen (koolwaterstoffen) zijn vooral grote geconjugeerde systemen (alternerend enkele en dubbele bindingen) goed in het absorberen van straling (licht) in het zichtbare gebied. Vandaar de paarse kleur die het complex van ninhydrine met aminozuren geeft.

In de spectrofotometer wordt licht van een bepaalde golflengte door een cuvet met een monster geschoven. Een deel van dit licht wordt door het monster geabsorbeerd (Afbeelding 5). De spectrofotometer meet de intensiteit van het licht dat niet door het monster geabsorbeerd wordt en geeft dit weer als de extinctie (of *absorbance* in het Engels).

De extinctie wordt uitgedrukt in de wet van Lambert-Beer

$$A = \epsilon \cdot d \cdot c$$

Waarbij

A = de (gemeten) extinctie

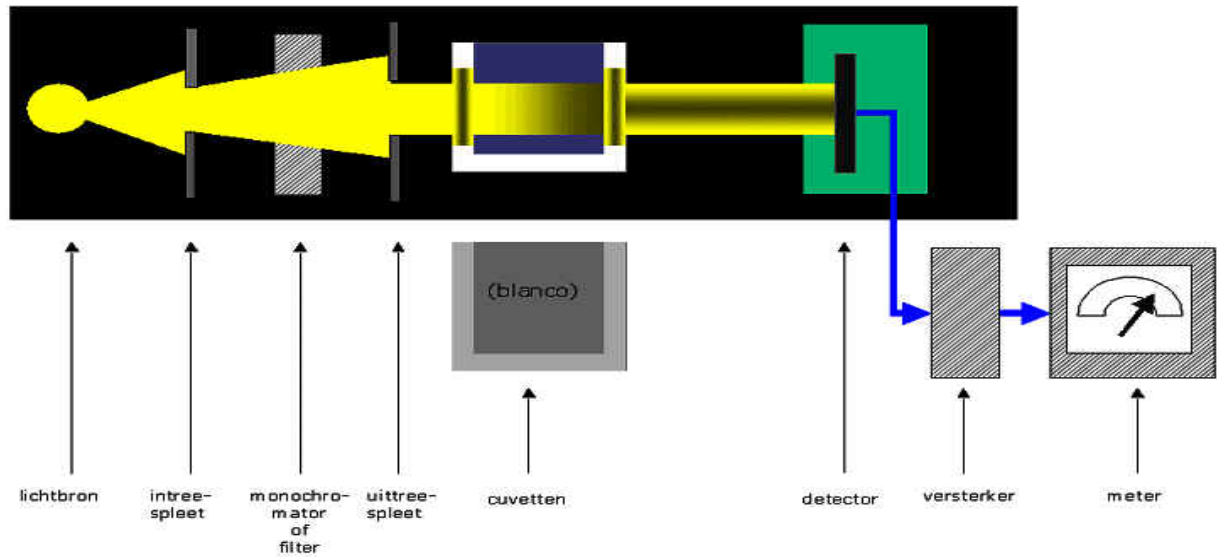
ϵ = de extinctiecoëfficiënt (een stofeigenschap)

d = de weglengte door het monster

c = de concentratie van het monster

Vragen

- 4. Waarom is de extinctie een goede maat voor de concentratie van je monster?**
- 5. Is de concentratie recht evenredig met de extinctie?**



Afbeelding 5: schematische weergave van een spectrofotometer

Experiment

Benodigheden

- 2 maatbekers, 100 ml
- Maatbeker, 400 ml
- Maatcilinder
- Pipetten, 1ml, 10 ml
- Waterbad
- Thermometer
- Centrifuge
- Balans
- Spectrofotometer
- 7 genummerde reageerbuizen
- 1 en 5 ml Finn pipetten

Reagentia

- Caseïne
- Protease
- Ninhydrine
- NaOH 0,1 M
- Ethanol

Uitvoering

1. Maak de caseïne oplossing door 1,5 g caseïne af te wegen in een bovenweger en op te lossen in 100 mL 0,1 M NaOH met behulp van een magnetische roerder. Caseïne geleidelijk toevoegen, anders lost deze niet goed op.
(Wellicht staat deze oplossing klaar)
2. Protease oplossing maken door 0,05 g protease af te wegen en op te lossen in 100 mL demiwater.
(Wellicht staat deze oplossing klaar)
3. Maak de ninhydrine oplossing door 0,5 g ninhydrine af te wegen, breng dit in een maatkolf en oplossen met absolute ethanol tot een eindvolume van 100 ml.
(Waarschijnlijk staat deze oplossing klaar)
4. Meng gelijke volumes protease oplossing en caseïne oplossing in een maatbeker van 100 ml. **(bereken hoeveel oplossing nodig is voor de totale reactie in alle buizen).**
5. Zet de maatbeker op een verwarmingsplaatje en verwarm licht (niet meer dan 40 °C onder licht roeren. Noteer het tijdstip dat de reactie begint.
6. Neem 5 mL reactiemengsel uit de maatbeker en breng dit over in een reageerbuis.
7. voeg aan de reageerbuis 1 ml ninhydrine oplossing toe, plaats de reageerbuis voor 4-7 minuten in een waterbad van 80-100° C.
8. Laat de reageerbuis afkoelen tot kamertemperatuur , en meet vervolgens in een cuvet de extinctie met behulp van een spectrofotometer.

Neem iedere 10 minuten voor minstens een uur een sample (stap 6 t/m 10) **(maak van tevoren een tijdsindeling, rekening houdend met verwarmingstijd in het waterbad).**

Vragen

6. **Waarom wordt het monster afgekoeld tot KT voor het meten van de absorptie?**
7. **Zet de gemeten extincties in een grafiek uit tegen de tijd. Leg uit wat je geobserveerd hebt.**
8. **Zullen proteasen zichzelf of elkaar aanvallen, gegeven dat het enzym zelf een eiwit is? Zo nee, wat maakt deze enzymen dan zo special? Zo ja, wat kan veranderd worden voor het verlengen van hun activiteit?**

Experiment 2: Dunnelaagchromatografie van aminozuren

Inleiding

In dit experiment gaan we vrije aminozuren in vruchtensap aantonen en kijken of er essentiële aminozuren tussen zitten. Hiervoor moeten we de aminozuren eerst van elkaar scheiden met dunnelaagchromatografie en ze vervolgens aantonen. Je zult deze aminozuren echter niet direct op het TLC-plaatje zien, dus moeten we ze kleuren met ninhydrine om ze zichtbaar te maken.

Dunnelaagchromatografie

Het scheiden van de aminozuren gebeurt met dunnelaagchromatografie. In het Engels heeft deze techniek *Thin Layer Chromatography* en wordt daarom vaak afgekort tot TLC. Bij deze scheidingsmethode – die lijkt op papierchromatografie – worden druppeltjes (spots) van je monster op een TLC-plaatje aangebracht en gescheiden met een loopvloeistof die in door je plaatje omhoog trekt en waarin je monster oplost. Je monster wordt meegenomen en de verschillende stoffen die erin zitten worden op verschillende hoogte op je plaatje afgezet.

Als je de hoogte tot waar je loopvloeistof in je plaatje is getrokken meet – het vloeistoffront – en je meet de afstand tot waar een van je stoffen is gekomen, kun je de retentiefactor (R_f) voor die stof uitrekenen met de volgende formule:

$$R_f = \frac{\text{afstand spot}}{\text{afstand vloeistoffront}}$$

Met een monster dat vrije aminozuren bevat, zoals vruchtensap, kun je deze techniek gebruiken om de aminozuren te scheiden en te karakteriseren

Vragen

- 9. Op welke eigenschap worden stoffen in je monster bij dunnelaag- of papierchromatografie gescheiden?**
- 10. Als het type plaatje en de loopvloeistof gelijk zijn, is de afstand die een stof omhoog trekt dan altijd hetzelfde? En de retentiefactor?**

Experiment

Benodigdheden

- TLC-bakje
- TLC-plaatje
- Capillairtjes
- Potlood
- handschoenen
- droogstoof

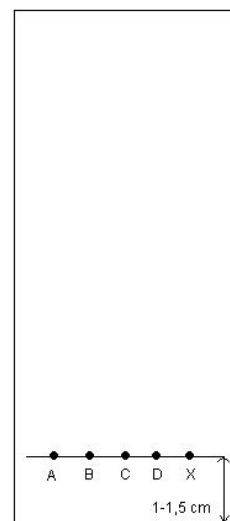
Reagentia

- 4 oplossingen van (essentiële) aminozuren in water (ongeveer 3 mg/mL)
Loopvloeistof (1-propanol en water in de volumeverhouding 2:1)
Oplossing van 1% (m/m) ninhydrine in ethanol
- Vruchtensap (of een ander monster waarin je vrije aminozuren wil vinden)

Uitvoering

Draag het liefst tijdens de gehele proef maar in ieder geval als je met je chromatografie-papiertje of ninhydrine bezig bent handschoenen om te voorkomen dat je het experiment verontreinigt en je handen paars kleuren.

1. Zet met potlood een lijn ongeveer 1-1,5 cm boven onderrand van het TLC-plaatje en zet op deze lijn een aantal puntjes, ongeveer even ver van elkaar en van de rand. Markeer deze puntjes A, B, C, D en X (ofzo, als je straks maar weet welk puntje welke is) zoals in Afbeelding 6.
2. Breng op de eerste puntjes kleine druppeltjes (maar een paar millimeter doorsnede) van de aminozuuroplossingen aan door een capillair in de oplossing te houden en vervolgens op het plaatje te drukken. Hier kun je eventueel eerst even op een ander plaatje mee oefenen.
3. Breng op een van de puntjes op dezelfde manier een druppeltje vruchtensap.
4. Laat eventueel het puntje van je vruchtensap drogen en breng opnieuw een druppeltje aan (van dezelfde oplossing op dezelfde plek), hierdoor vergroot je de concentratie aminozuren en worden je spots beter zichtbaar.



Afbeelding 6: het TLC-plaatje

Gebruik nooit hetzelfde capillair voor verschillende oplossingen

5. Doe een klein laagje (minder dan 1 cm) van de loopvloeistof in het TLC-bakje, zodat de lijn met de puntjes monster boven het vloeistofniveau zitten.

6. Plaats als de aangebrachte puntjes gedroogd zijn het plaatje in het TLC-bakje en doe er een deksel op.
7. Wacht tot de vloeistof tot bijna bovenaan het plaatje gestegen is – dit zal ongeveer 75 minuten duren – en haal het papiertje uit het TLC-bakje. Zorg dat het vloeistofniveau de bovenkant niet bereikt. Als dat gebeurt is het hele experiment mislukt!
8. Markeer met potlood tot waar de vloeistof is gekomen en leg het plaatje te drogen.
9. Plak het plaatje als het droog is vast op een groot vel papier met een stukje tape en besproei het met de ninhydrine oplossing.
10. Droog het plaatje een paar minuten in de droogstoof bij 45-50 °C
11. Kijk of er spots uit je monster overeen komen met die van de losse aminozuren.
12. Meet de afstand van het vloeistoffront tot de lijn waar je je samples opgebracht hebt en de afstand van de spots tot de beginlijn en bereken de R_f van de gekleurde spots.

Vragen

- 11. Waarom is het belangrijk dat je de loopvloeistof niet helemaal tot bovenaan het TLC-plaatje laat lopen?**
- 12. Als je weet dat ninhydrine aminozuren kleurt, waarom zou je het TLC-plaatje en de ninhydrine niet met je blote handen aan mogen raken?**
- 13. Zijn er aminozuren in je vruchtensap die dezelfde retentiefactor hebben als je losse aminozuren?**
- 14. Bevat vruchtensap dus essentiële aminozuren?**

Experiment 3: Ninhydrine in Forensisch onderzoek

Inleiding

Ninhydrine wordt ook gebruikt in forensisch onderzoek om onzichtbare vingerafdrukken zichtbaar te maken. Deze techniek werkt vooral goed bij poreuze materialen zoals papier.

Op je huid zit ook een kleine hoeveelheid vrije aminozuren. Als je iets met je vinger aanraakt komen deze aminozuren op dit oppervlak terecht. Ze vormen daar het patroon van de poriën in je vinger: De vingerafdruk.



Een vingerafdruk aantonen

13. Druk met je vinger of duim stevig op een velletje (filtreer)papier. Zorg dat je dit velletje verder niet met je blote hand aanraakt. **Draag dus handschoenen.**

Afbeelding 7: Een vingerafdruk op een brief, zichtbaar gemaakt met ninhydrine³

14. Plak het velletje papier op een groter vel met een randje tape en bespreek het velletje met een 1% ninhydrineoplossing tot het helemaal bevochtigd is.

Maak het velletje los en droog het een aantal minuten in de droogstoof op 45-50 °C. Je zou nu een vingerafdruk moeten zien.

Bronnen

¹http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid

²<http://en.wikipedia.org/wiki/Ninhydrin>

³<http://nl.wikipedia.org/wiki/Ninhydrine>

http://en.wikipedia.org/wiki/Essential_amino_acids

<http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/uvvisab1.htm>

<http://www.thuisexperimenteren.nl/science/chromatografie/papierchromatografie.htm>

<http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab3a.htm>

<http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab3.htm>