

## Extracția aminoacizilor liberi din diferite preparate biologice

Aminoacizii liberi sunt prezenți în celulele animale și vegetale, făcând parte din principalele căi metabolice desfășurate în celulele vii. Pe lângă cei 20 aminoacizi proteinoși, în celule se regăsesc alte zeci sau sute de tipuri de aminoacizi. Unii dintre aceștia, precum ornitina sau homoserina, sunt metaboliți intermediari în căile de biosinteză a aminoacizilor proteinoși, sau produși finali ai metabolismului primar, atât la plante cât și la animale. Însă, majoritatea aminoacizilor identificați la plante, fungi și microorganisme sunt fie metaboliți secundari, fie precursori ai metaboliților secundari.

Pentru extracția aminoacizilor liberi din celule vom utiliza o soluție apoasă de etanol 75%.

### Reactivi și materiale necesare

- material biologic proaspăt
- soluție apoasă de etanol 75%
- soluție HCl 1%
- soluție ninhidrină 1% în etanol (sau acetonă) 95%
- soluție aminoacizi 500μg/ml

### Mod de lucru

Se mojarază 5 grame de material biologic și se adaugă 40 ml etanol 75% încălzit în prealabil pe baia de apă la 60-70°C. Mojararea continuă energic pentru 10-15 minute. Se filtrează într-o capsulă de evaporare, care se menține apoi pe baia de apă, la 60-70°C, până la evaporarea completă a etanolului. Reziduu obținut se dizolvă în 3 ml de HCl 1%, agitând permanent cu o baghetă de sticlă, timp de 15 minute.



Evidențierea aminoacizilor se face cu ajutorul ninhidrinei, care interacționează cu aminoacizii pentru a forma un compus colorat albastru-violet. Pentru evidențierea aminoacizilor se ia într-o pipetă 1 ml de extract, se adaugă 2 ml apă distilată și 0,5 ml ninhidrină. Se agită și se menține pe baia de apă la 80°C timp de 5 minute. Citirea valorilor absorbantei se va face la lungimea de undă de 570 nm.

Pentru cuantificarea nivelului de aminoacizi liberi, se vor realiza soluții etalon din mai multe tipuri de aminoacid, plecând de la aminoacizi puri, conform tabelului următor. Se citesc extincțiile la 570 nm și se plotează pe un grafic sau hârtie milimetrică. De acordat atenție la limita de solubilitate a unor aminoacizi (de exemplu, pentru Tyr, 0,0453 g/100 mL sau 453 μg/ml, la 25°C, conform PubChem). În principiu, absorbanțele diferiților aminoacizi uzuali sunt similari; în funcție de aminoacizii avuți la dispoziție, se poate realiza o medie (aritmetică sau ponderată) a extincțiilor la diferite concentrații, care va fi comparată apoi extincția probei. De notat faptul că alanina și tirozina au absorbante mai mari, respectiv mai mici, decât media, conform Shih-Wen Sun și colab. (2006).

<b>c%</b>	<b>100µg/ml</b>	<b>200µg/ml</b>	<b>300µg/ml</b>	<b>400µg/ml</b>	<b>500µg/ml</b>
<b>sol. AA 500µg/ml</b>	0,2 ml	0,4 ml	0,6 ml	0,8 ml	1 ml
<b>H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></b>	0,8 ml	0,6 ml	0,4 ml	0,2 ml	-
<b>H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></b>	2 ml				
<b>ninhidrină 1%</b>	0,5 ml				

### **Referințe**

Carratu și colab. (2008) Free Amino Acids in Botanicals and Botanical Preparations Vol. 73, Nr. 5, Journal of Food Science, doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00767.x (a se vedea Tabel 4)

Shih-Wen Sun și colab. (2006) Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification, Journal of Food Composition and Analysis, 19, 112–117, doi:10.1016/j.jfca.2005.04.006 (a se vedea Figura 2)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tyrosine>