



Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΥΠΟΠΡΟΪΟΝΤΩΝ & ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

Τμήμα Επιστήμης
Τροφίμων & Διατροφής
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



Δημήτρης Π. Μακρής *PhD DIC*

Αναπληρωτής Καθηγητής

Καρδίτσα 2023

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	2
Άσκηση 1^η: Προσδιορισμός σακχαροπεριεκτικότητας σε γλυκολάσπες με την μέθοδο φαινόλης – θειικού οξέος. Προσδιορισμός δυναμικού αλκοολικού τίτλου (ΔΑΤ)	3
Άσκηση 2^η: Προσδιορισμός ολικών πολυφαινολών σε φύλλα ελιάς (Folin – Ciocalteu) – Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης	7
Άσκηση 3^η: Εκτίμηση της αναγωγικής ισχύος εκχυλισμάτων (ferric-reducing antioxidant power - FRAP)	11
Άσκηση 4^η: Προσδιορισμός ανθοκυανινών σε υποπροϊόντα επεξεργασίας φρούτων (μέθοδος διαφορικού pH)	14
Άσκηση 5^η: Προσδιορισμός ολικών καροτενοειδών σε υποπροϊόντα επεξεργασίας τομάτας	17
Άσκηση 6^η: Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών σε τυρόγαλα (μέθοδος Bradford)	20

ΑΣΚΗΣΗ 1^η

Προσδιορισμός σακχαροπεριεκτικότητας σε γλευκολάσπες με την μέθοδο φαινόλης – θειικού οξέος. Προσδιορισμός δυναμικού αλκοολικού τίτλου (ΔΑΤ)

1.1 Εισαγωγή

Οι γλευκολάσπες είναι ένα υποπροϊόν της οινοβιομηχανίας, πλούσιο σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Αυτά τα σάκχαρα προέρχονται από την πρώτη ύλη (σταφύλι) της οινοποίησης. Οι γλευκολάσπες δημιουργούνται κατά το στάδιο της διαύγασης του γλεύκους (λευκή οινοποίηση) και δεν μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για κάποιον άλλο σκοπό από την βιομηχανία και συνήθως απορρίπτονται ως απόβλητο.

Οι γλευκολάσπες είναι ένα υγρό υπόλειμμα που είναι πλούσιο σε σάκχαρα (συνήθως 150 - 250 g L⁻¹), και επομένως μπορούν δυνητικά ν' αξιοποιηθούν για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Αυτή η διεργασία μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω αλκοολικής ζύμωσης της γλευκολάσπης για την δημιουργία αιθανόλης και παραλαβή του τελικού προϊόντος μέσω απόσταξης.

Έχει πολλαπλή τεχνολογική σημασία η εκτίμηση της περιεκτικότητας σε αλκοόλ (αιθανόλη) του προϊόντος που θα παραχθεί από την ζύμωση της γλευκολάσπης. Η εκτίμηση μπορεί να γίνει με βάση τη σακχαροπεριεκτικότητα.

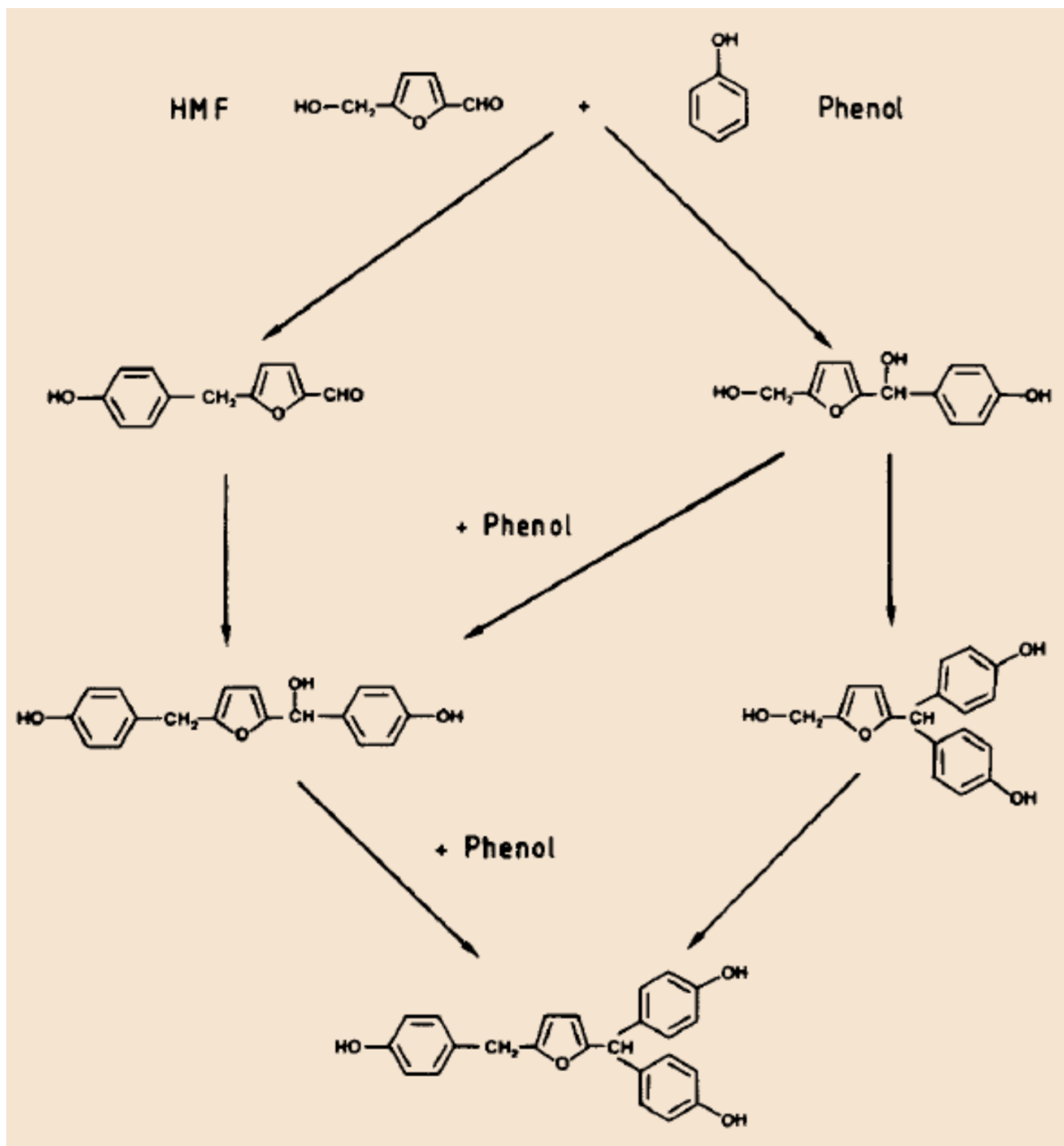
Ο υπολογισμός βασίζεται στη θεώρηση ότι 180 g σακχάρων θ' αποδώσουν 48.5% αιθανόλη και 46.7% CO₂, ενώ ένα 4.8% χρησιμοποιείται για την αύξηση της μάζας των ζυμομυκήτων και την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών.

Ο παράγοντας μετατροπής που χρησιμοποιείται στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι ότι συγκέντρωση σακχάρων 16.83 g/L αποδίδει έναν αλκοολικό βαθμό, δηλαδή συγκέντρωση αιθανόλης 1% (o/o). Με βάση αυτό γίνεται και ο εξής υπολογισμός:

$$\Delta\text{AT (\% o/o)} = \frac{\text{Glu} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) + \text{Fru} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}{16.83 \text{ g/L}}$$

Για να γίνει προσδιορισμός του ΔΑΤ, είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων, που στην περίπτωση της γλευκολάσπης αποτελούνται από γλυκόζη και φρουκτόζη σε αναλογία περίπου 1:1. Ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων πραγματοποιείται με την μέθοδο φαινόλης-θειικού οξέος. Υπό την παρουσία πυκνού θειικού οξέος τα σάκχαρα αφυδατώνονται, δίνοντας ενώσεις που αντιδρούν με φαινόλη για να σχηματίσουν έγχρωμα προϊόντα, τα οποία παρουσιάζουν λ_{max} περίπου στα 495 nm (**Εικόνα 1**).

Η ποσοτική ανάλυση βασίζεται σε καμπύλη αναφοράς που κατασκευάζεται με πρότυπα διαλύματα γλυκόζης.



Εικόνα 1.1: Πιθανές αντιδράσεις φαινόλης με την υδροξυμεθυλφουρφουράλη (προϊόν αφυδάτωσης σακχάρων).

1.2 Υλικά και μέθοδοι

1.2.1 Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

- Διάλυμα φαινόλης 5% (β/ο) σε απιονισμένο νερό
- Πυκνό θειικό οξύ
- Πρότυπα διαλύματα γλυκόζης (25 – 250 mg L⁻¹)
- Απιονισμένο νερό

1.2.2 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Σε σωληνάκι Eppendorf των 2 mL προστίθενται 0.22 mL διαλύματος γλυκόζης και κατόπιν ταχέως 0.65 mL πυκνού θειικού οξέος και 0.13 mL διαλύματος φαινόλης. Το μίγμα αφήνεται ν' αντιδράσει σε υδατόλουτρο στους 90 °C για 5 λεπτά και ακολούθως ψύχεται για άλλα 5 λεπτά. Η απορρόφηση λαμβάνεται στα 495 nm, χρησιμοποιώντας κατάλληλο δείγμα ελέγχου.

1.2.3 Προ-επεξεργασία δείγματος

Οι γλευκολάσπες παρουσιάζουν σημαντική θολερότητα, εξαιτίας των αιωρούμενων σωματιδίων που προέρχονται κυρίως από τεμάχια της πρώτης ύλης (σταφύλι), λόγω της επεξεργασίας που υπέστη (σπάσιμο, πίεση). Για να παραληφθεί δείγμα κατάλληλο προς ανάλυση (διαυγές), θα πρέπει να πραγματοποιηθεί φυγοκέντριση στις 10,000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιείται για περαιτέρω ανάλυση.

1.2.4 Προσδιορισμός

Κατάλληλα αραιωμένη γλευκολάσπη που έχει προηγουμένως φυγοκεντριθεί, αναλύεται εις διπλούν όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 1.2.2. Συνιστάται αραιώση 1:2000 με απιονισμένο νερό.

1.2.5 Στατιστική επεξεργασία

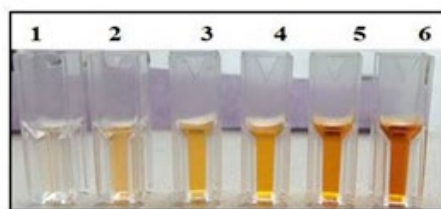
Οι προσδιορισμοί εκτελούνται εις διπλούν και τα αποτελέσματα αναφέρονται ως μέσοι όροι \pm τυπική απόκλιση. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ των τιμών συγκέντρωσης γλυκόζης (C_{gl}) και A_{495} .

1.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

1.3.1 Καμπύλη αναφοράς

Αύξουσα συγκέντρωση σακχάρων δίνει ευθέως ανάλογη A_{495} (**Εικόνα 1.2**). Μέσω γραμμικής παλινδρόμησης εξάγεται η εξίσωση που θα χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Για την γραμμική παλινδρόμηση χρησιμοποιείται φύλλο Excel, όπου στον άξονα των x τοποθετούνται οι τιμές της συγκέντρωσης (εκπεφρασμένες ως $mg L^{-1}$) και στον άξονα των y οι αντίστοιχες τιμές A_{495} .

Phenol-Sulphuric Acid Method



Εικόνα 1.2: Παράδειγμα πρότυπων διαλυμάτων με αύξουσα συγκέντρωση γλυκόζης, μετά την αντίδραση με φαινόλη/θειικό οξύ.

1.3.2 Προσδιορισμός δυναμικού αλκοολικού τίτλου

Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού των ολικών σακχάρων εκφράζονται ως mg ισοδύναμα γλυκόζης L⁻¹ γλευκολάσπης. Για να γίνει η χρήση του τύπου της παραγράφου 1.1 θα πρέπει η συγκέντρωση να μετατραπεί σε g L⁻¹.

Εκτός από τον ΔΑΤ, να προσδιοριστεί και η ποσότητα σε kg καθαρής αιθανόλης που θα παραχθεί από την ζύμωση 1000 L γλευκολάσπης.

1.4 Συμπεράσματα

Να σχολιαστεί η αποδοτικότητα παραγωγής αιθανόλης από γλευκολάσπη, σε σχέση με άλλους ανακυκλώσιμους πόρους.

Βιβλιογραφία

Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.-I., Lee Y.C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry* 339 (2005) 69–72.

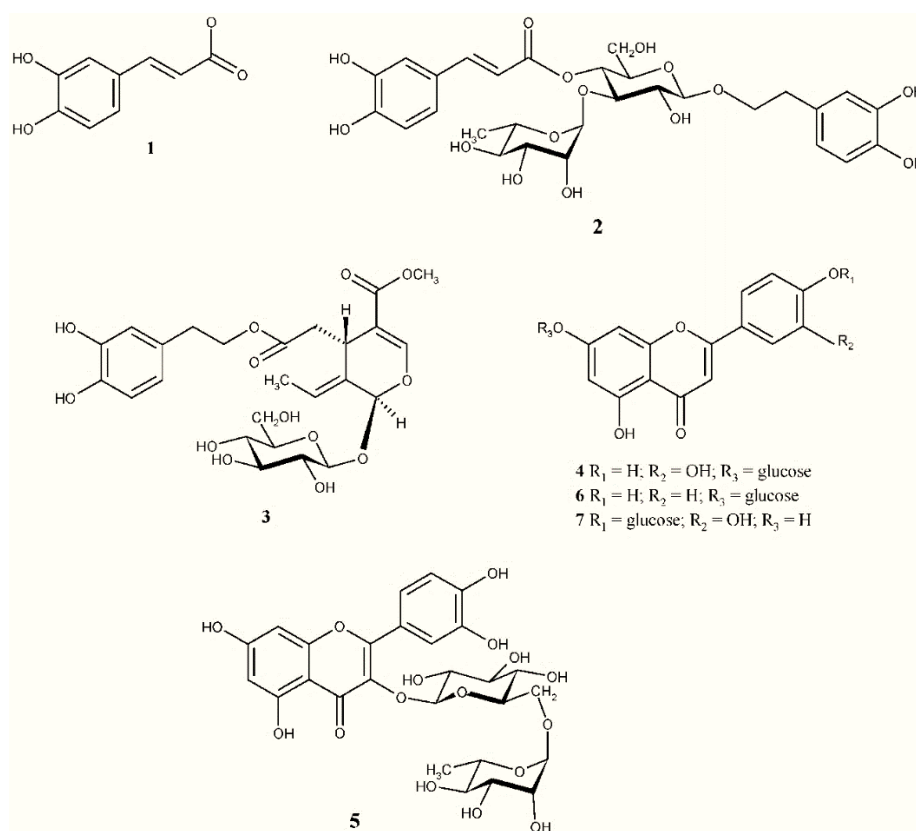
Nielsen S.S. Total carbohydrate by phenol-sulfuric acid method. *Food Analysis Laboratory Manual*. Food Science Text Series, Springer International Publishing, 2017.

ΑΣΚΗΣΗ 2^η

Προσδιορισμός ολικών πολυφαινολών σε φύλλα ελιάς (Folin – Ciocalteu) – Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης

2.1 Εισαγωγή

Τα φύλλα ελιάς περιέχουν έναν εύρος πολυφαινολών. Η κύρια ένωση είναι η ολευρωπαΐνη, της οποίας η περιεκτικότητα μπορεί ν' ανέλθει στο 15% (β/β), επί ξηρού βάρους. Άλλες πολυφαινόλες που έχουν ταυτοποιηθεί στα φύλλα ελιάς είναι η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, ο βερμπασκοζίτης (verbascoside), το καφεϊκό οξύ, και σημαντικές ποσότητες γλυκοζιτών φλαβονών (**Εικόνα 2.1**).



Εικόνα 2.1: Πολυφαινολικές ουσίες που απαντώνται στα φύλλα ελιάς.

Η ανάκτηση των πολυφαινολών από φύλλα ελιάς περιλαμβάνει εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες. Προτιμώνται πολικοί πρωτικοί διαλύτες, όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη, οι οποίοι παρέχουν καλή διαλυτοποίηση των περισσότερων πολυφαινολικών συστατικών. Η μεθανόλη δίνει την υψηλότερη απόδοση σε ολευρωπαΐνη από φύλλα ελιάς.

Οι πολυφαινόλες είναι ευοξειδωτά μόρια και μπορούν ν' αντιδράσουν με οξειδωτικά σώματα, δίνοντας αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι ένα οξειδωτικό μίγμα που αποτελείται από φωσφορο-βολφραμικά και φωσφορο-μολυβδαινικά οξείδια. Η αντίδραση αυτού του μίγματος με πολυφαινόλες καταλήγει στη δημιουργία μίγματος ενώσεων μολυβδαινίου/βολφραμίου, που παρουσιάζει χαρακτηριστική απορρόφηση στην περιοχή 740-770 nm (**Εικόνα 2.2**). Σ' αυτήν την αρχή βασίζεται ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός των ολικών πολυφαινολών.

Ως πρότυπη ουσία για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς έχει καθιερωθεί το γαλλικό οξύ. Συχνά χρησιμοποιείται και το καφεϊκό ή το τανικό οξύ.

REAGENT PROFILE

- **Synonym** : Folin ciocalteu / Folin phenol / Folin denis/
phosphomolybdotungistic acid
- **Color** : Clear bright yellow
- **Storage** : Tightly capped at room temperature

Hexavalent phosphomolybdotungistic acid complexes with the following structures formed in the solution.

$$3\text{H}_2\text{O}_5 \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$$
$$3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$$

Εικόνα 2.2: Χαρακτηριστικά του αντιδραστήριου Folin - Ciocalteu.

2.2 Υλικά και μέθοδοι

2.2.1 Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Διάλυμα Na_2CO_3 (5%, β/ο)
- Πρότυπα διαλύματα γαλλικού οξέος σε μεθανόλη (300 – 3000 mg L⁻¹)
- Απιονισμένο νερό
- Μεθανόλη
- Ακετόνη
- Οξικός αιθυλεστέρας

2.2.2 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Όγκος 0.1 mL πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος, αραιωμένου 1/10 με απιονισμένο νερό, αναμιγνύεται με 0.1 mL αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu και αφήνεται ν' αντιδράσει για 2 λεπτά. Ακολούθως προστίθενται 0.8 mL διαλύματος Na_2CO_3 και το μίγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο, στους 40 °C, για 20 λεπτά. Η απορρόφηση λαμβάνεται αφού ψυχθεί το δείγμα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στα 740 nm, με κατάλληλο δείγμα ελέγχου.

2.2.3 Εκχύλιση πολυφαινολικών ουσιών

Ποσότητα 1 g αποξηραμένων και κονιορτοποιημένων φύλλων ελιάς προστίθεται σε όγκο διαλύτη 50 mL, σε κωνική φιάλη των 100 mL, η οποία πωματίζεται. Η εκχύλιση πραγματοποιείται υπό ανάδευση για 30 λεπτά. Κατόπιν, όγκος εκχυλίσματος 1 mL εισάγεται σε σωληνάκι Eppendorf και φυγοκεντρείται στις 10,000 rpm για 10 λεπτά. Το διαυγές υπερκείμενο εκχύλισμα χρησιμοποιείται για περεταίρω ανάλυση.

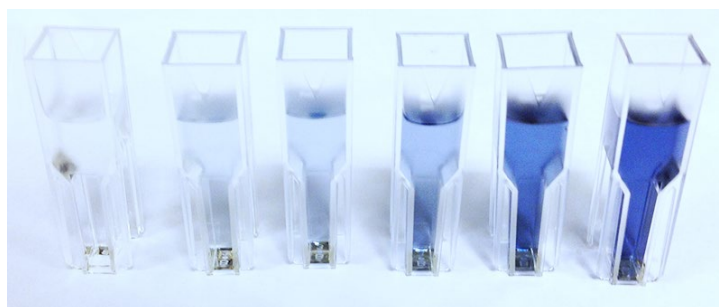
2.2.4 Προσδιορισμός

Κατάλληλα αραιωμένο εκχύλισμα που έχει προηγουμένως φυγοκεντρηθεί, αναλύεται εις διπλούν όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 2.2.2. Συνιστάται αραιώση 1:50 με απιονισμένο νερό.

2.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

2.3.1. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Αύξουσα συγκέντρωση πολυφαινολών δίνει ευθέως ανάλογη A_{740} (**Εικόνα 2.3**). Κατά τ' άλλα, ισχύει ότι περιεγράφηκε στην παράγραφο 1.3.1.



Εικόνα 2.3: Παράδειγμα πρότυπων διαλυμάτων με αύξουσα συγκέντρωση γαλλικού οξέος, μετά την αντίδραση με το αντιδραστήριο Folin - Ciocalteu.

2.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης των εκχυλισμάτων σε ολικές πολυφαινόλες

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού εκφράζονται ως mg ισοδύναμα γαλλικού οξέος L^{-1} εκχυλίσματος και παρουσιάζονται συγκριτικά υπό την μορφή διαγράμματος με κάθετες μπάρες. Με βάση τα αποτελέσματα επιλέγεται ο καταλληλότερος διαλύτης.

Με βάση την απόδοση του επιλεχθέντος διαλύτη, να προσδιοριστεί η μάζα των ολικών πολυφαινολών, εκπεφρασμένη σε kg, που μπορούν να' ανακτηθούν από την επεξεργασία 1000 kg φύλλων ελιάς.

2.4 Συμπεράσματα

Να αναφερθεί η συνάφεια των αποτελεσμάτων με αντίστοιχα που είναι διαθέσιμα στην βιβλιογραφία.

Βιβλιογραφία

Cicco N., Lanorte M.T., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91 (2009) 107–110.

ΑΣΚΗΣΗ 3^η

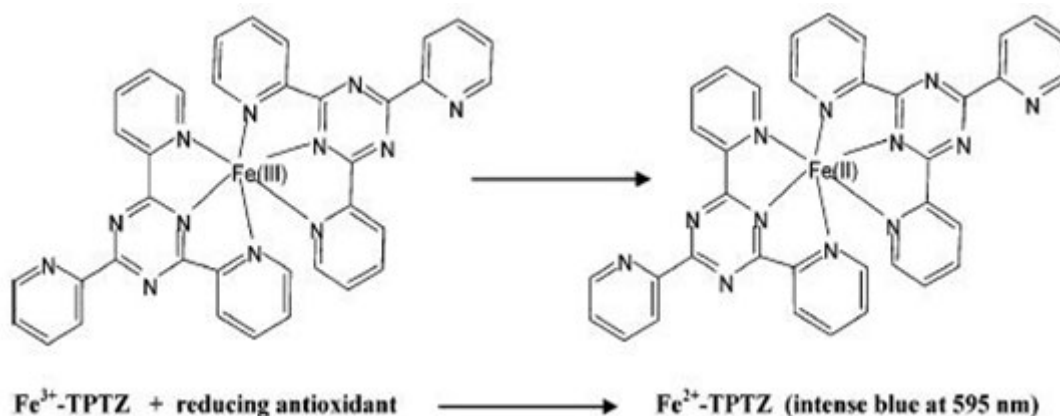
Εκτίμηση της αναγωγικής ισχύος εκχυλισμάτων (ferric-reducing antioxidant power - FRAP)

3.1 Εισαγωγή

Γενικά, ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί «οποιαδήποτε ουσία, η οποία ευρισκόμενη σε σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση από αυτήν ενός ευοξειδωτου υποστρώματος, μπορεί να καθυστερήσει ή ν' αναστείλει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος». Οι σχετικές αντιδράσεις που εμπλέκουν αντιοξειδωτικές ουσίες, είναι αντιδράσεις οξειδο-αναγωγής.

Σ' αυτές τις περιπτώσεις, οι οξειδωτικές ουσίες αντιδρούν με τα αντιοξειδωτικά αντί με το «υπόστρωμα», δηλαδή το αντιοξειδωτικό ανάγει το οξειδωτικό. Δηλαδή, αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ μπορούν να χαρακτηριστούν ως αναγωγικά και η απενεργοποίηση των οξειδωτικών ουσιών ως αντίδραση οξειδο-αναγωγής, κατά την οποία μια ουσία ανάγεται στην θέση κάποιας άλλης. Υπό αυτήν την έννοια, η αντιοξειδωτική ισχύς μπορεί να χαρακτηριστεί ως αναγωγική ικανότητα.

Η ανάλυση FRAP μετράει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών ν' ανάγουν το σύμπλοκο τρισθενούς σιδήρου με 2,4,6-τριπυριδυλ-s-τριαζίνη [Fe(III)-(TPTZ)2]³⁺ σε σύμπλοκο δισθενούς σιδήρου [Fe(II)-(TPTZ)2]²⁺, το οποίο εμφανίζει έντονο κυανό χρώμα σε όξινο περιβάλλον (**Εικόνα 3.1**).



Εικόνα 3.1: Δημιουργία έγχρωμου σύμπλοκου Fe^{2+} με το αντιδραστήριο TPTZ.

3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

- Διάλυμα 2,4,6-τριπυριδυλ-s-τριαζίνης (TPTZ)
- Διάλυμα $FeCl_3$
- HCl (0.05 M)
- Ασκορβικό οξύ

3.2.2 Κατασκευή καμπύλης αναφοράς

Όγκος πρότυπου διαλύματος ασκορβικού οξέος 0.05 mL (0.05 mM – 0.3 mM) προστίθεται σε σωληνάκι Eppendorf των 1.5 mL, μαζί με 0.05 mL διαλύματος FeCl₃. Το μίγμα αναδεύεται επαρκώς και επωάζεται σε υδατόλουτρο, στους 37 °C. Ακολούθως, προστίθενται 0.9 mL διαλύματος TPTZ και η απορρόφηση λαμβάνεται στα 620 nm (A_{620}), μετά την παρέλευση 10 λεπτών. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με γραμμική παλινδρόμηση μεταξύ των τιμών A_{620} και της συγκέντρωσης του ασκορβικού οξέος (C_{AA}).

3.2.3 Παρασκευή εκχυλισμάτων

Χρησιμοποιούνται τα εκχυλίσματα που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.3. Η αραίωση των εκχυλισμάτων, εφόσον κριθεί αναγκαία, γίνεται με απιονισμένο νερό.

3.2.4 Προσδιορισμός αναγωγικής ισχύος

Όγκος κατάλληλα αραιωμένου εκχυλίσματος 0.05 mL προστίθεται σε σωληνάκι Eppendorf των 1.5 mL, μαζί με 0.05 mL διαλύματος FeCl₃. Το μίγμα αναδεύεται επαρκώς και επωάζεται σε υδατόλουτρο, στους 37 °C. Ακολούθως, προστίθενται 0.9 mL διαλύματος TPTZ και η απορρόφηση λαμβάνεται στα 620 nm (A_{620}), μετά την παρέλευση 10 λεπτών. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μM ισοδύναμων ασκορβικού οξέος (AAE) ανά g ξηρού βάρους.

3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.3.1 Καμπύλη αναφοράς

Αύξουσα συγκέντρωση ασκορβικού οξέος δίνει ευθέως ανάλογη A_{620} . Μέσω γραμμικής παλινδρόμησης εξάγεται η εξίσωση που θα χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Για την γραμμική παλινδρόμηση χρησιμοποιείται φύλλο Excel, όπου στον άξονα των χ τοποθετούνται οι τιμές της συγκέντρωσης (εκπεφρασμένες ως μM) και στον άξονα των ψ οι αντίστοιχες τιμές A_{620} .

3.3.2 Προσδιορισμός αναγωγικής ισχύος εκχυλισμάτων

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού εκφράζονται ως μM ισοδύναμων ασκορβικού οξέος (AAE) ανά g ξηρού βάρους και παρουσιάζονται συγκριτικά υπό την μορφή διαγράμματος με κάθετες μπάρες. Με βάση τα αποτελέσματα επιλέγεται το εκχύλισμα με την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

3.4 Συμπεράσματα

Να αναφερθεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων με αντίστοιχα που είναι διαθέσιμα στην βιβλιογραφία.

Βιβλιογραφία

Benzie I.F.F., Strain J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.

Makris D. P., Boskou G., Andrikopoulos N. K., 2007. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 125-132.

Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C., 2008. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1–19.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρασκευή διαλύματος $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (4 mM)

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL φέρονται 108.12 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ και το διάλυμα συμπληρώνεται στον όγκο με HCl (0.05 M).

Παρασκευή διαλύματος TPTZ (1 mM)

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL φέρονται 31.22 mg TPTZ και το διάλυμα συμπληρώνεται στον όγκο με HCl (0.05 M).

Παρασκευή διαλύματος ασκορβικού οξέος (3 mM)

Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL φέρονται 58.7 mg ασκορβικού οξέος και το διάλυμα συμπληρώνεται στον όγκο με απιονισμένο νερό.

ΑΣΚΗΣΗ 4^η

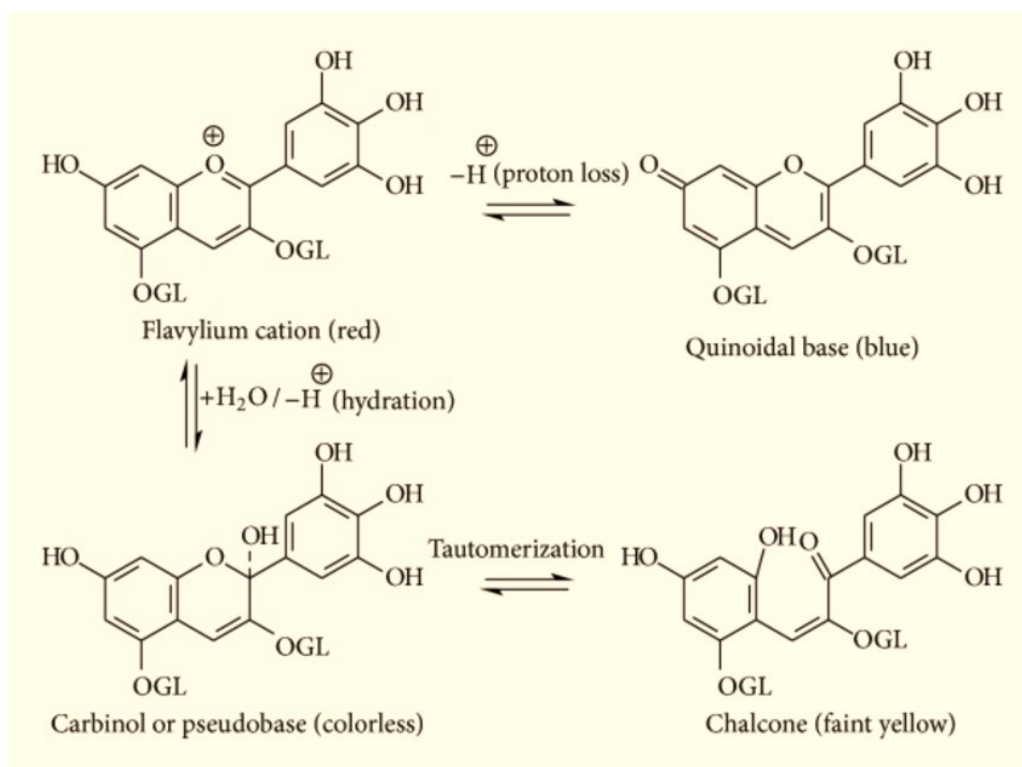
Προσδιορισμός ανθοκυανινών σε υποπροϊόντα επεξεργασίας φρούτων (μέθοδος διαφορικού pH)

4.1 Εισαγωγή

Οι ανθοκυανίνες είναι μια υποκατηγορία φλαβονοειδών, τα οποία χαρακτηρίζονται από τον δομικό σκελετό C₆-C₃-C₆. Οι ανθοκυανίνες ανευρίσκονται ευρέως στα φυτά, με εξαίρεση μερικές βοτανικές οικογένειες. Οι δομική ποικιλομορφία των ανθοκυανινών βασίζεται σε περισσότερες από 30 αγλυκόνες (ανθοκυανιδίνες).

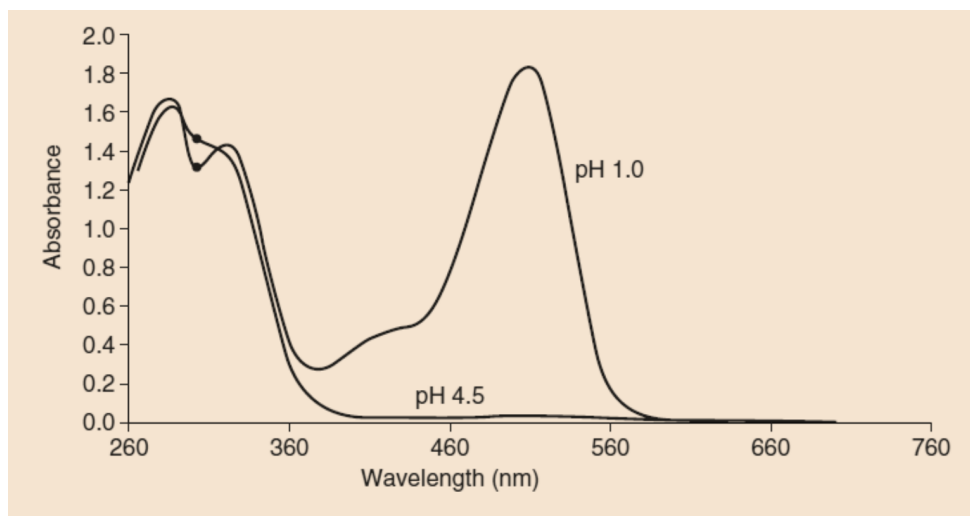
Ανάμεσα σ' αυτές τις αγλυκόνες, έξι ενώσεις είναι οι πιο διαδεδομένες – η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη, η μαλβιδίνη, η πελαργονιδίνη και η πεονιδίνη. Τα διαφορετικά βοτανικά είδη έχουν διακριτά προφίλ ανθοκυανινών. Η περιεκτικότητα των ανθοκυανινών στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά κυμαίνεται από 0.1% έως 1% επί ξηρού βάρους.

Το χρώμα των ανθοκυανινών εξαρτάται άμεσα από το pH. Σε όξινο pH έχουν έντονο κόκκινο χρώμα, σε ενδιάμεσα pH αποχρωματίζονται ή λαμβάνουν άλλες χροιές και σε αλκαλικό είναι πράσινες (**Εικόνα 4.1**).



Εικόνα 4.1: Επίδραση του pH στην δομή των ανθοκυανινών.

Η έγχρωμη μορφή οξονίου δεσπόζει σε pH 1.0 και η άχρωμη μορφή ημικετάλης σε pH 4.5 (**Εικόνα 4.2**). Η μέθοδος διαφορικού pH βασίζεται σ' αυτήν την αντίδραση και επιτρέπει την ακριβή και ταχεία μέτρηση των ολικών μονομερών ανθοκυανινών, ακόμα και υπό την παρουσία πολυμερισμένων χρωστικών ή άλλων ουσιών που μπορεί να παρεμβάλλονται στον προσδιορισμό.



Εικόνα 4.2: Φασματικά χαρακτηριστικά των ανθοκυανινών σε ρυθμιστικά διαλύματα με pH 1.0 και pH 4.5.

4.2 Υλικά και μέθοδοι

4.2.1 Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα pH = 1.0 (KCl 0.025 M)
- Ρυθμιστικό διάλυμα pH = 4.5 (CH₃COONa 0.4 M)

4.2.2 Εκχύλιση ανθοκυανινών από υποπροϊόντα

Ποσότητα 1 g αποξηραμένου και κονιορτοποιημένου υποπροϊόντος φέρεται σε κωνική φιάλη των 50 mL και προστίθενται 20 mL μεθανόλης που περιέχει 0.1% HCl. Το μίγμα αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα για 30 λεπτά. Ακολούθως, όγκος εκχυλίσματος 2 mL φέρεται σε σωληνάκι Eppendorf των 2 mL και φυγοκεντρείται στις 10,000 rpm για 10 λεπτά. Το διαυγές υπερκείμενο εκχύλισμα χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό.

4.2.3 Προσδιορισμός

Όγκος εκχυλίσματος 0.25 mL φέρεται σε σωληνάκι Eppendorf των 1.5 mL και προστίθενται 0.75 mL ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου καλίου (pH = 1.0). Σε δεύτερο σωληνάκι αναμιγνύονται 0.25 mL εκχυλίσματος και 0.75 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικού καλίου (pH 4.5). Τα μίγματα αναδεύονται καλά και αφήνονται να ισορροπήσουν για 10 λεπτά.

Ακολούθως, λαμβάνεται η A₅₂₀ και η A₇₀₀ και των δύο μιγμάτων, χρησιμοποιώντας απιονισμένο νερό ως δείγμα ελέγχου. Η συγκέντρωση των μονομερών ολικών ανθοκυανινών προσδιορίζεται από τον τύπο:

$$TA(mg L^{-1}) = \frac{A \times MW \times F_D \times 10^3}{\epsilon}$$

Όπου $A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$ και F_D ο συντελεστής αραίωσης. Ως ϵ χρησιμοποιείται η τιμή 26,900 (γλυκοζίτης της κυανιδίνης) και μοριακό βάρος (MW) η τιμή 449.2.

4.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού εκφράζονται ως mg ισοδύναμα κυανιδίνης g^{-1} ξηρού υποπροϊόντος και παρουσιάζονται συγκριτικά υπό την μορφή διαγράμματος με κάθετες μπάρες.

Με βάση την απόδοση των εκχυλίσεων, να προσδιοριστεί η μάζα των ολικών ανθοκυανινών, εκπεφρασμένη σε kg, που μπορούν να' ανακτηθούν από την επεξεργασία 1000 kg του κάθε υποπροϊόντος.

4.4 Συμπεράσματα

Να αναφερθεί η συνάφεια αλλά και να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων με αντίστοιχα που είναι διαθέσιμα στην βιβλιογραφία.

Βιβλιογραφία

Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E., 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρασκευή διαλύματος KCl (0.025M)

Σε ποτήρι ζέσεως των 200 mL φέρονται 0.186 g KCl, προστίθενται 95 mL απιονισμένου νερού και το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH = 1.0 με HCl. Ακολούθως, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώνεται στον όγκο.

Παρασκευή διαλύματος CH₃COONa (0.4 M)

Σε ποτήρι ζέσεως των 200 mL φέρονται 5.443 g CH₃COONa•3H₂O, προστίθενται 95 mL απιονισμένου νερού και το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH = 4.5 με HCl. Ακολούθως, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και συμπληρώνεται στον όγκο.

ΑΣΚΗΣΗ 5^η

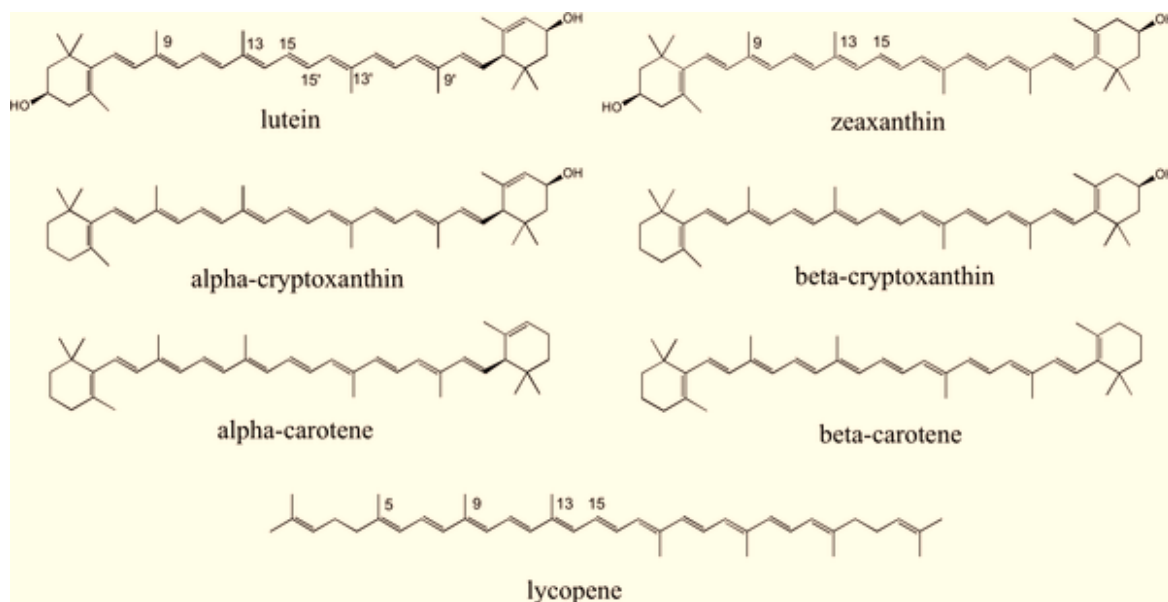
Προσδιορισμός ολικών καροτενοειδών σε υποπροϊόντα επεξεργασίας τομάτας

5.1 Εισαγωγή

Τα καροτενοειδή αποτελούν μια ευρέως διαδεδομένη ομάδα βιοδραστικών ενώσεων, τα οποία βρίσκονται κυρίως στα φυτά, αλλά και σε μικροάλγη και μικροοργανισμούς. Είναι λιποδιαλυτές ουσίες και έχουν πορτοκαλί – κόκκινο χρώμα.

Περιέχουν περισσότερους από 10 συζυγιακούς διπλούς δεσμούς και έχουν την ικανότητα δέσμευσης μονομοριακού οξυγόνου, γεγονός που τα καθιστά αντιοξειδωτικά. Τα καροτενοειδή διαίρονται σε δύο κατηγορίες, τα καροτένια (όπως το β-καροτένιο και το λυκοπένιο) και τις ξανθοφύλλες (β-κρυπτοξανθίνη, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη) (Εικόνα 5.1).

Τα καροτένια είναι μη-οξυγονωμένα καροτενοειδή, έχοντας μια χαρακτηριστική μορφή υδρογονάνθρακα, ενώ ξανθοφύλλες ονομάζονται τα οξυγονωμένα καροτενοειδή.

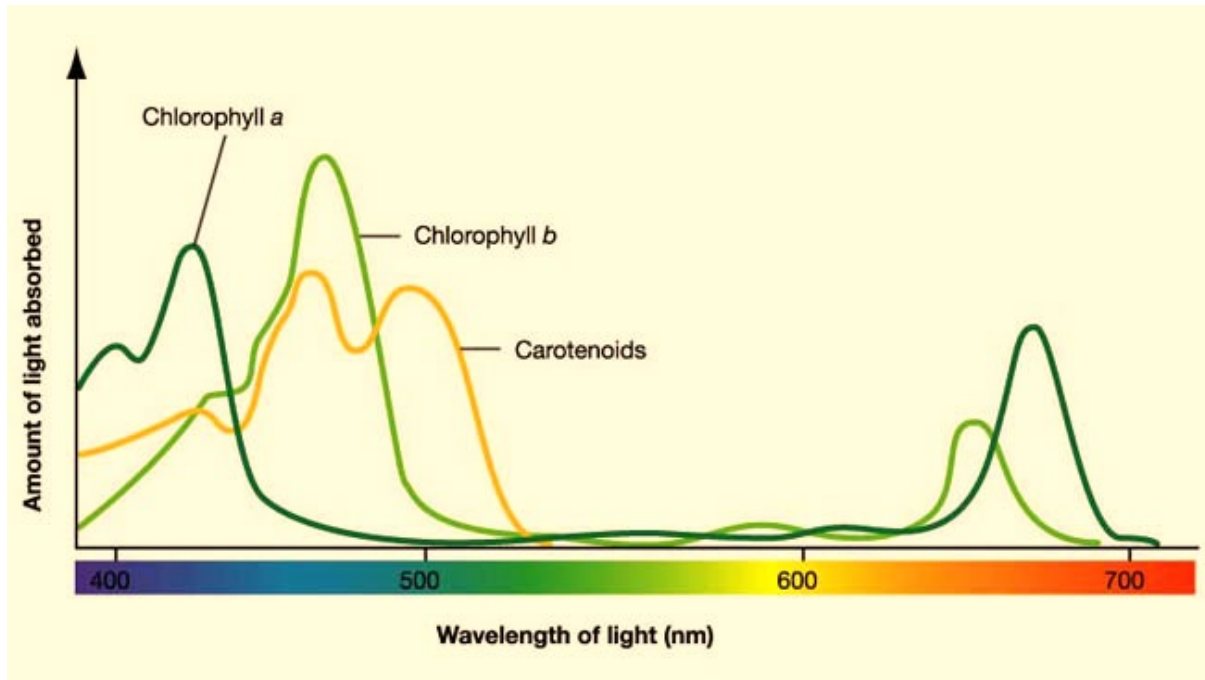


Εικόνα 5.1: Δομές καροτενοειδών που αφθονούν σε εδώδιμους φυτικούς ιστούς.

Η πλειοψηφία των καροτενοειδών επιδεικνύει απορρόφηση στην ορατή περιοχή του φάσματος, μεταξύ 400 και 500 nm. Επειδή οι απορροφήσεις υπακούν το νόμο Beer-Lambert (η απορρόφηση είναι γραμμικώς ανάλογη της συγκέντρωσης), οι μετρήσεις απορρόφησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτικοποίηση καθαρών (standard) καροτενοειδών ή την εκτίμηση της συγκέντρωσης ολικών καροτενοειδών σε μίγματα ή εκχυλίσματα (Εικόνα 5.2).

Εάν το εκχύλισμα αποτελείται από ένα δεσπόζον καροτενοειδές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο μήκος κύματος και η $A^{1\%}$ γι' αυτό το καροτενοειδές. Εάν το εκχύλισμα αποτελείται από διάφορα καροτενοειδή, μπορεί να μετρηθεί η απορρόφηση στα 450 nm και να χρησιμοποιηθεί η $A^{1\%}$ του β-καροτενίου. Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως ισοδύναμα β-καροτενίου. Εναλλακτικά, μια «τυπική» τιμή 2,500 για την $A^{1\%}$ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την σύγκριση σχετικών συγκεντρώσεων μεταξύ διαφόρων εκχυλισμάτων. Η τιμή 2,500 για $A^{1\%}$ είναι κατάλληλη,

μιας και τα κύρια καροτενοειδή, με εξαίρεση το λυκοπένιο, έχουν ϵ μεταξύ 2,460 και 2,710. Εάν πρόκειται όμως ν' αναλυθούν δείγματα από τομάτες ή προϊόντα τομάτας που περιέχουν κυρίως λυκοπένιο, τότε η τιμή 3,450 θα ήταν η πλέον κατάλληλη για $A^{1\%}$.



Εικόνα 5.2: Φάσματα ορατού – υπεριώδους (UV-vis) καροτενοειδών και χλωροφυλλών.

5.2 Υλικά και μέθοδοι

5.2.1 Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

- Μίγμα εξανίου/ακετόνης (8/2)

5.2.2 Απόβλητα επεξεργασίας τομάτας

Δίνεται αποξηραμένο και κονιορτοποιημένο υποπροϊόν βιομηχανικής επεξεργασίας τομάτας.

5.2.3 Εκχύλιση καροτενοειδών

Ποσότητα ξηρού φυτικού υλικού 1 g φέρεται σε γάλινο φιαλίδιο και προστίθενται 10 mL εξανίου/ακετόνης (8/2). Το φιαλίδιο καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και πραγματοποιείται εκχύλιση υπό ανάδευση στις 400 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ακολούθως, το μίγμα διηθείται σε χάρτινο ηθμό, σε ογκομετρική των 25 mL. Ο ηθμός ξεπλένεται με μικρή ποσότητα διαλύτη και τελικά το εκχύλισμα συμπληρώνεται στο όγκο με διαλύτη.

5.2.4 Προσδιορισμός ολικών καροτενοειδών

Όγκος εκχυλίσματος αραιώνεται κατάλληλα και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 503 nm, χρησιμοποιώντας ως δείγμα ελέγχου τον διαλύτη εκχύλισης. Η συγκέντρωση των ολικών καροτενοειδών (C_{TC}) προσδιορίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$C_{TC} (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{A \times F_D}{A^{1\%}} \times C^{1\%}$$

Όπου A είναι η απορρόφηση στα 503 nm, F_D ο συντελεστής αραιώσης, $A^{1\%} = 3,450$ και $C^{1\%} = 10,000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

5.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού εκφράζονται ως mg ισοδύναμα λυκοπενίου g^{-1} ξηρού υποπροϊόντος και παρουσιάζονται συγκριτικά υπό την μορφή διαγράμματος με κάθετες μπάρες.

Με βάση την απόδοση της εκχύλισης, να προσδιοριστεί η μάζα των ολικών καροτενοειδών, εκπεφρασμένη σε kg, που μπορούν να' ανακτηθούν από την επεξεργασία 1000 kg του κάθε υποπροϊόντος.

5.5 Συμπεράσματα

Να αναφερθεί η συνάφεια αλλά και να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων με αντίστοιχα που είναι διαθέσιμα στην βιβλιογραφία.

Βιβλιογραφία

Scott K.J., 2001. Detection and measurement of carotenoids by UV/VIS spectrophotometry. In "Current Protocols in Food Analytical Chemistry - F2.2.1-F2.2.10, John Wiley & Sons, Inc.

ΑΣΚΗΣΗ 6^η

Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών σε τυρόγαλα (μέθοδος Bradford)

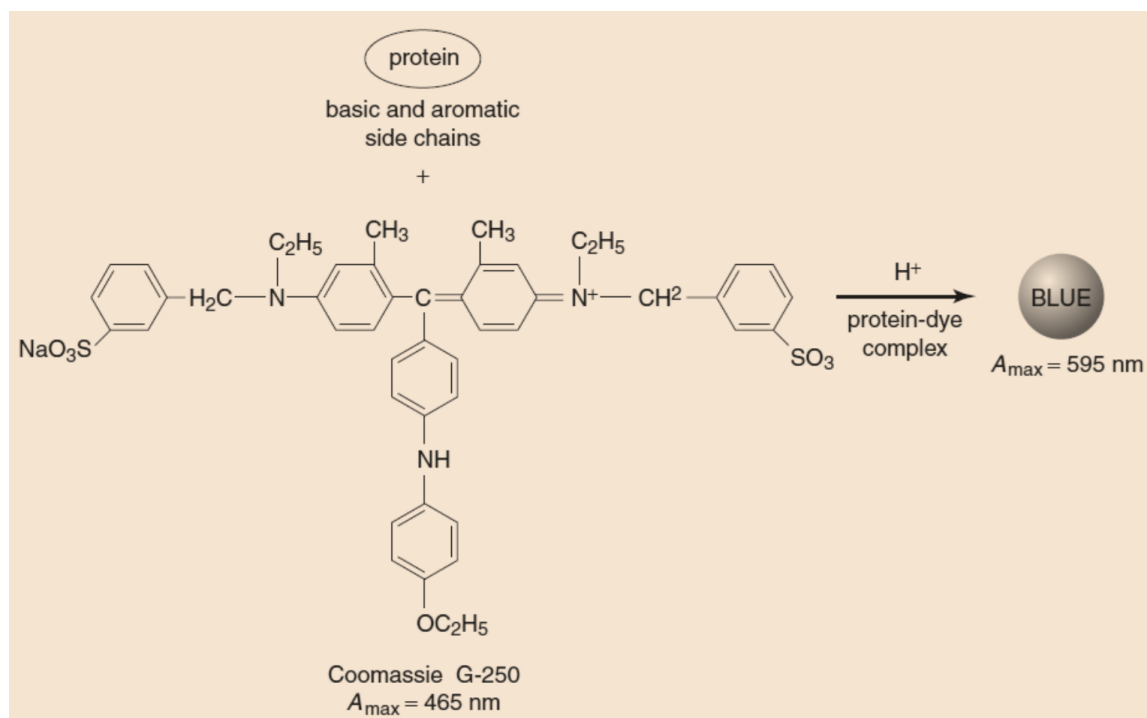
6.1 Εισαγωγή

Το τυρόγαλα (whey) είναι το διάλυμα που προκύπτει κατά τη διαδικασία παρασκευής του τυριού ή της καζεΐνης και απομένει μετά την πήξη του γάλακτος και την απομάκρυνση του στερεού πήγματος. Το διάλυμα είναι όξινο λόγω του γαλακτικού οξέος που περιέχει. Το τυρόγαλα αποτελεί απόβλητο της τυροκομικής βιομηχανίας, ιδιαίτερα επιβλαβές για το περιβάλλον όταν δεν γίνεται σωστή διαχείρισή του. Το τυρόγαλα έχει διάφορες χρήσεις, μεταξύ άλλων στη γαλακτοβιομηχανία ως πρόσθετο στη διαδικασία τυποποίησης γάλακτος, ως διατροφικό συμπλήρωμα, καθώς και ως πηγή πρωτεϊνών.

Η δοκιμή που βασίζεται στην δέσμευση της χρωστικής Coomassie Blue (CB) έχει το πλεονέκτημα να είναι ταχεία και εύκολη στην διεξαγωγή. Επιπρόσθετα, πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και απαιτεί ένα φασματοφωτόμετρο. Εν συντομία, το έτοιμο αντιδραστήριο αναμιγνύεται με δείγμα και κατόπιν σύντομης επώασης λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595 nm, χρησιμοποιώντας απιονισμένο νερό ως δείγμα ελέγχου.

Η ανάλυση βασίζεται στην προσκόλληση της χρωστικής στις πρωτεΐνες, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία σύμπλοκου χρωστικής – πρωτεΐνης, με αυξημένη μοριακή απορρόφηση. Η ανάλυση διεξάγεται σε όξινο pH, στο οποίο η χρωστική είναι πρωτονιωμένη και απορροφά στα 465 nm. Όταν σχηματίζει σύμπλοκο με πρωτεΐνη, συμβαίνει μεταχρωματική απόκριση, και το σύμπλοκο απορροφά περίπου στα 595 nm.

Η υψηλή εξάρτηση της ανάλυσης από το είδος της πρωτεΐνης αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό πρόβλημα στην ευρύτερη χρήση της CB ως μια μέθοδο ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών. Εντούτοις, είναι πολύ χρήσιμη ως μια γενική, ημι-ποσοτική μέθοδος.



Εικόνα 6.1: Αντίδραση CB με πρωτεΐνη προς σχηματισμό έγχρωμου συμπλόκου.

6.2 Υλικά και μέθοδοι

6.2.1 Χημικές ουσίες και αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο Bradford
- Διαλύματα προτεΐνης τυρόγαλου (100 – 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

6.2.2 Τυρόγαλα

Χρησιμοποιείται πραγματικό τυρόγαλα που προέρχεται από βιομηχανική παραγωγή λευκού τυριού.

6.2.3 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς

Όγκος 0.1 mL πρότυπου διαλύματος BSA εισάγεται σε σωληνάκι Eppendorf του 1.5 mL και προστίθενται 0.2 mL αντιδραστηρίου Bradford και 0.7 mL απιονισμένου νερού. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται ν' αντιδράσει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595, χρησιμοποιώντας απιονισμένο νερό ως δείγμα ελέγχου.

6.2.4 Προσδιορισμός

Το δείγμα τυρόγαλου φυγοκεντρείται στις 10,000 rpm για 10 λεπτά και το διαυγές υπερκείμενο χρησιμοποιείται για την ανάλυση. Η ανάλυση διεξάγεται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.2.3, εφόσον το διαυγές δείγμα αραιωθεί κατάλληλα, αν αυτό κριθεί απαραίτητο.

6.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

6.3.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς

Αύξουσα συγκέντρωση πρωτεΐνης δίνει ευθέως ανάλογη A_{595} (**Εικόνα 6.2**). Μέσω γραμμικής παλινδρόμησης εξάγεται η εξίσωση που θα χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Για την γραμμική παλινδρόμηση χρησιμοποιείται φύλλο Excel, όπου στον άξονα των x τοποθετούνται οι τιμές της συγκέντρωσης (εκπεφρασμένες ως mg mL^{-1}) και στον άξονα των y οι αντίστοιχες τιμές A_{595} .

6.3.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού εκφράζονται ως mg ισοδύναμων BSA ανά L τυρόγαλου και παρουσιάζονται συγκριτικά υπό την μορφή διαγράμματος με κάθετες μπάρες. Να προσδιοριστεί η ποσότητα πρωτεΐνης (σε kg) που μπορεί ν' ανακτηθεί από 10,000 L τυρόγαλου.

6.4 Συμπεράσματα

Να αναφερθεί η σύγκριση των αποτελεσμάτων με αντίστοιχα που είναι διαθέσιμα στην βιβλιογραφία.

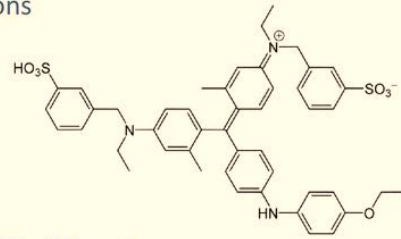
Concentration: Bradford assay

Based on binding of proteins to **Coomassie Brilliant Blue G-250**

Binding due to ionic and hydrophobic interactions

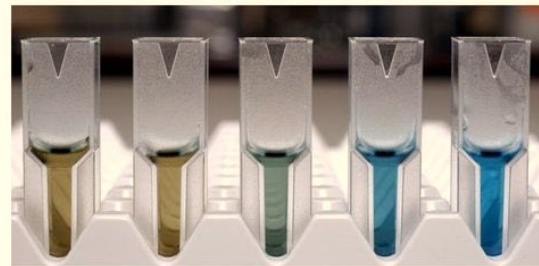
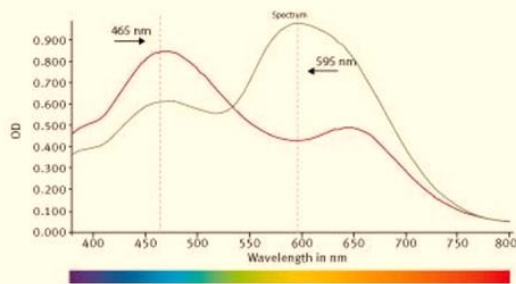
Dependent on protein nature

Approximate concentration can be evaluated using BSA or γ -globulin as standard



Protein concentration measured using the **color shift** of the dye

Absorbance at **595 nm** is measured and compared with a standard solutions



Εικόνα 6.2: Παράδειγμα πρότυπων διαλυμάτων με αύξουσα συγκέντρωση BSA, μετά την αντίδραση με το αντιδραστήριο Bradford.

Βιβλιογραφία

Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254

Krohn R.I., 2001. The colorimetric detection and quantitation of total protein. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* – B.1.1, John Wiley & Sons, Inc.