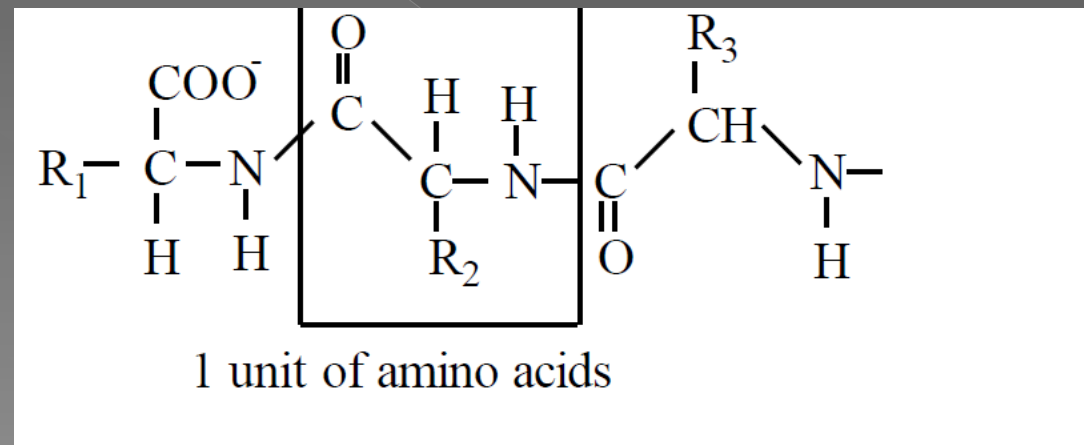
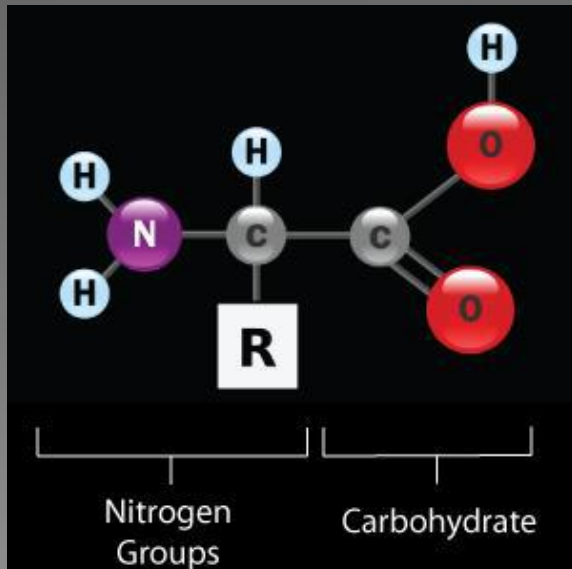


# 4<sup>η</sup> ΔΙΑΛΕΞΗ

## Προσδιορισμός Πρωτεϊνών

# Γενικά....

- Οι πρωτεΐνες είναι σύνθετα μακρομόρια με μεγάλο MB
- Ως δομικούς λίθους έχουν τα αμινοξέα που ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικό δεσμό
- Εμφανίζουν μεγάλο βιοχημικό ενδιαφέρον καθώς τις χρησιμοποιεί ο οργανισμός για την ανάπτυξη και συντήρησή του
- Ένα τυπικό μόριο πρωτεΐνης περιέχει 200-300 αμινοξέα



# Κατάταξη πρωτεϊνών

Διακρίνονται σε:

- ◉ **Ινώδεις** (αδιάλυτες στο νερό) & **σφαιρικές** (υδατοδιαλυτές)
- ◉ **Απλές** (αποτελούνται μόνο από αα) & **Σύνθετες** όταν περιέχουν και μη-πρωτεϊνικά τμήματα, όπως λίπη, σάκχαρα, μέταλλα
- ◉ **Δομικές** (όταν αποτελούν δομικά συστατικά του κυττάρου) & **Λειτουργικές** (όταν συμβάλλουν σε λειτουργίες του οργανισμού)

# Χρήσεις πρωτεϊνών τροφής...

- ◉ Διατήρηση & αναπλήρωση πρωτεϊνών οργανισμού
- ◉ Σύνθεση απαραίτητων ενζύμων, ορμονών
- ◉ Παροχή ενέργειας
- ◉ Παροχή απαραίτητων αα (Lys, trp, met, leu, ile, val) που δεν μπορεί να συνθέσει ο οργανισμός
- ◉ Καθορισμός της εμφάνισης, της υφής και της σταθερότητας πολλών τροφίμων (τρουφερότητα κρέατος)
- ◉ Χρήση ως πτητικές ουσίες, γαλακτωματοποιητές, μέσα αφρισμού
- ◉ Ενζυμική δράση σε βιοχημικές αντιδράσεις

# Αξιολόγηση πρωτεϊνών

- **Χημική αξία**: αξιολογεί την ποιότητα των αα της πρωτεΐνης πχ. Τα αα του αβγού έχουν χημικό βαθμό 100
- **Πεπτική αξία**: το ποσό του αζώτου μιας πρωτεΐνης που απορροφάται από τον οργανισμό κατά την πέψη
- **Βιολογική αξία**: το % της πεπτόμενης πρωτεΐνης που παραμένει στο σώμα και χρησιμοποιείται από τον οργανισμό
- **Θρεπτική αξία**: βιολογική αξία x πεπτική αξία

Η βιολογική αξία μιας πρωτεΐνης καθορίζεται από την περιεκτικότητα της σε απαραίτητα αα. Η πεπτική αξία αναφέρεται στα ποσοστά του πρωτεϊνικού αζώτου που απορροφούνται από τον οργανισμό.

# Μέθοδοι προσδιορισμού...

- Εφαρμόζονται μέθοδοι προσδιορισμού του οργανικού αζώτου, που με κατάλληλους συντελεστές υπολογίζεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη.
- Τέτοιες μέθοδοι είναι ειδικές μέθοδοι καύσης που το οργανικό άζωτο προσδιορίζεται είτε ως  $\text{NH}_3$  (**Μέθοδος Kjeldhal**) ή με την μορφή του  $\text{N}_2$  (**Μέθοδος Dumas**).
- Επίσης χρωματογραφικές (αζωτούχα συστατικά: αα, παράγωγα γουανιδίνης), φθορισμομετρικές (μεθυλιωμένα παράγωγα ξανθίνης: καφεΐνη, θεοβρωμίνη) ή υγροχρωματικές (βιογενείς αμίνες: ισταμίνη, τυραμίνη) μέθοδοι

# Εκτίμηση γνησιότητας ή ποιότητας τροφίμων

- ◉ Η περιεκτικότητα σε προλίνη αποτελεί κριτήριο γνησιότητας του πορτοκαλοχυμού
- ◉ Η περιεκτικότητα σε υδροξυπρολίνη είναι δείκτης ποιότητας των κρεατοσκευασμάτων
- ◉ Η περιεκτικότητα σε ισταμίνη είναι δείκτης ποιότητας ορισμένων ιχθυοκομικών
- ◉ Η περιεκτικότητα σε τυραμίνη είναι δείκτης ποιότητας τυριών

# ΜΕΘΟΔΟΣ ΚJEDHAL

- Το δείγμα υποβάλλεται σε υγρή καύση με πυκνό θειικό οξύ
- Το οργανικό δεσμευμένο άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία που δεσμεύεται από περίσσεια οξέος
- Το μίγμα ψύχεται και προστίθεται πυκνό καυστικό νάτριο
- Ελευθερώνεται αμμωνία που δεσμεύεται από γνωστή περίσσεια πρότυπου δ/τος οξέος
- Από την ποσότητα της αμμωνίας υπολογίζεται η εκατοστιαία περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο και ακολούθως ανάγεται σε πρωτεΐνες.



# ΜΕΘΟΔΟΣ ΚJEDHAL

## ⦿ 1<sup>ο</sup> Στάδιο (Υγρή πέψη ή χώνευση):



## ⦿ 2<sup>ο</sup> Στάδιο (Απόσταξη NH<sub>3</sub>):



## ⦿ 3<sup>ο</sup> Στάδιο (Εξουδετέρωση):



# Υπολογισμοί...

$$\odot n_{\text{HCl}} = n_{\text{NH}_3} + n_{\text{NaOH}}$$

$$n_{\text{NH}_3} = n_{\text{HCl}} - n_{\text{NaOH}}$$

$$n_{\text{NH}_3} = n_{\text{N}}$$

$$m_{\text{N}} = n_{\text{N}} \times 14$$

$$\% \text{N}_{\text{τροφ.}} = m_{\text{N}} / m_{\text{τροφ.}} \times 100$$

$\% \text{ πρωτ.} = \% \text{ N} \times \mathbf{6,25}$  (Γενικός συντελεστής μετατροπής του οργανικού N σε πρωτεΐνες)

# ΜΕΘΟΔΟΣ ΚJEDHAL

**Συσκευή KJELDAHL**



**Συσκευή πέψης αζώτου**



**Αποστακτική μονάδα**

# ΜΕΘΟΔΟΣ KJEDHAL

## ◎ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

1. Είναι μία από τις πλέον τυποποιημένες μεθόδους
2. Διαθέτει υψηλή ακρίβεια & πιστότητα

## ◎ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:

1. Δεν παρέχει το ποσοστό της πραγματικής πρωτεΐνης
2. Διαφορετικές πρωτεΐνες χρειάζονται διαφορετικοί συντελεστές διόρθωσης
3. Η χρήση πυκνού θειικού οξέος δημιουργεί κινδύνους
4. Χρονοβόρα τεχνική

# ΜΕΘΟΔΟΣ DUMAS

- ◉ Ποσότητα δείγματος καίγεται στους  $900^{\circ}\text{C}$
- ◉ Απελευθερώνονται  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$
- ◉ Τα  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  δεσμεύονται σε ειδικές στήλες
- ◉ Τα υπόλοιπα αέρια συνδέονται ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας
- ◉ Η βαθμονόμηση γίνεται με ανάλυση υλικού που έχει γνωστή συγκέντρωση αζώτου (πρότυπο), πχ. EDTA : 9,59 % N
- ◉ Ακολουθούν παρόμοιοι υπολογισμοί με την Kjeldhal

# ΜΕΘΟΔΟΣ DUMAS

## ● Πλεονεκτήματα:

1. Πολύ ταχύτερη μέθοδος (κάτω από 4 λεπτά)
2. Δεν απαιτεί τοξικές ουσίες ή καταλύτες
3. Μπορούν να μετρηθούν πολλά δείγματα ταυτόχρονα
4. Εύκολη στην εφαρμογή

## ● Μειονεκτήματα:

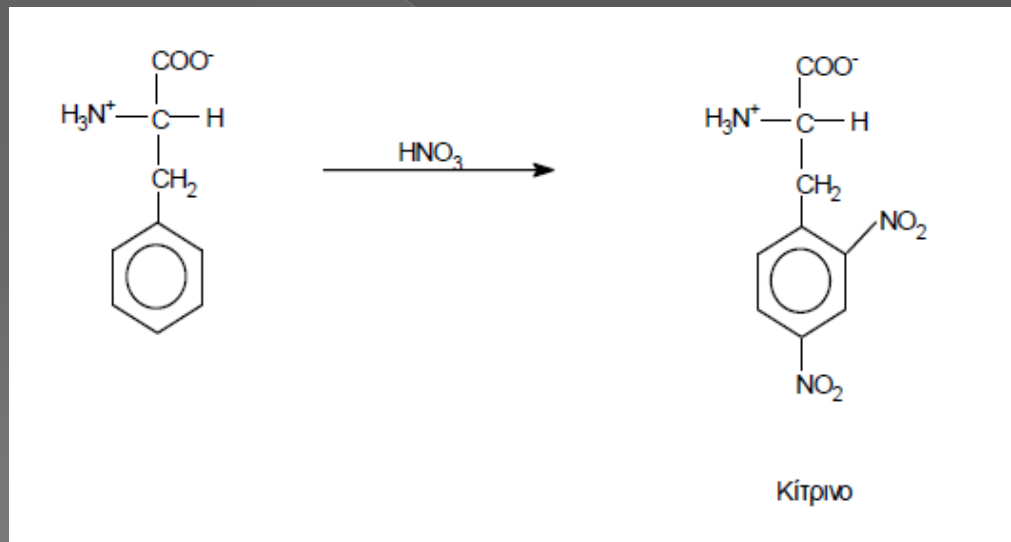
1. Υψηλό αρχικό κόστος
2. Δεν παρέχει το ποσοστό της πραγματικής πρωτεΐνης
3. Διαφορετικές πρωτεΐνες χρειάζονται διαφορετικούς συντελεστές διόρθωσης
4. Το μικρό μέγεθος του δείγματος καθιστά δύσκολη την απόκτηση αντιπροσωπευτικού δείγματος

# Προσδιορισμός αριθμού φορμόλης ( ελεύθερες αμινοομάδες αα)

- Σε ποσότητα δείγματος προστίθεται περίσσεια δ/τος φορμαλδεύδης
- Τα υδρογονοκατιόντα που ελευθερώνονται , λόγω αντίδρασης της τελευταίας με τις αμινομάδες των ελεύθερων αα, προσδιορίζονται αλκαλιμετρικώς.
- Από ένα μόριο αα ελευθερώνεται ένα υδρογονοκατιόν , ενώ από 4 μόρια προλίνης ή υδροξυπρολίνης ελευθερώνονται 3 υδρογονοκατιόντα. Το μόνο αα από τον οποίο δεν ελευθερώνονται υδρογονοκατιόντα είναι η ιστιδίνη.
- Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια γνησιότητας των φρουτοχυμών
- Επιτρέπει την διάκριση του φυσικού από το τεχνητό ξύδι

# Ξανθοπρωτεινική αντίδραση (για αρωματικά αα)

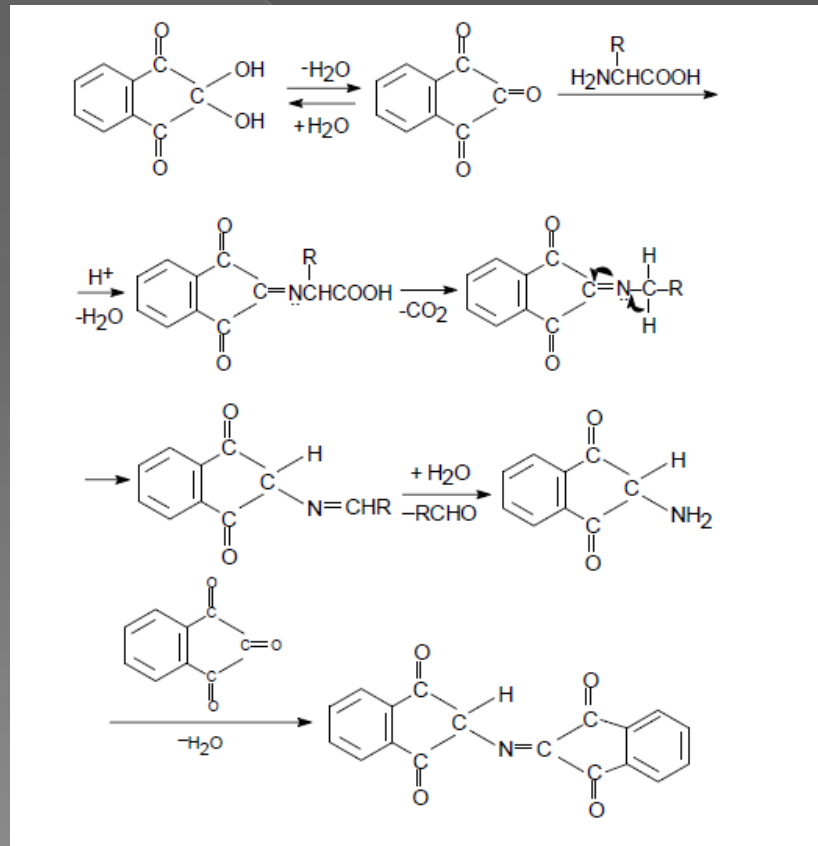
- περιλαμβάνουν νίτρωση αρωματικών πυρήνων και σχηματισμό αναλόγων πικρικού οξέος με κίτρινο χρώμα.





# Αντίδραση νινυδρίνης

- Σχηματισμός μπλε και ιώδους χρωματισμού, εκτός της Pro που σχηματίζει κίτρινα παράγωγα, ενώ συγχρόνως σχηματίζεται αλδεΐδη και εκλύεται διοξείδιο του άνθρακα



# Μέθοδοι με χρήση φασματοσκοπίας UV-VIS

## 1. Απορρόφηση στα 280nm (Trp & Tyr)

Μειονέκτημα: DNA, RNA απορροφούν στα 280nm

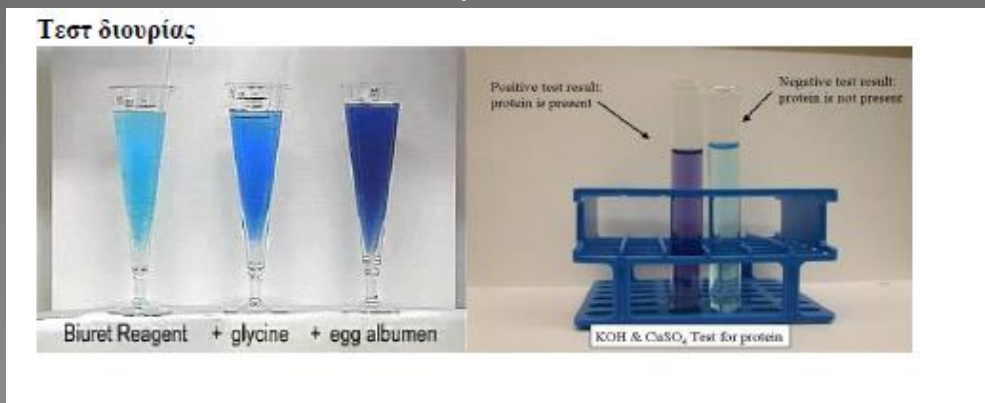
Πλεονέκτημα: Απλή, μη-καταστρεπτική, δεν απαιτούνται ειδικά αντιδραστήρια

## 2. Μέθοδος διουρίας

$\text{CuSO}_4 + \text{KOH} \rightarrow$  προϊόντα με ιώδες χρώμα (450nm)

Πλεονέκτημα: Δεν επηρεάζεται από ουσίες που απορροφούν σε χαμηλά μήκη κύματος

Μειονέκτημα: Είναι λιγότερο ευαίσθητη



# Μέθοδοι με χρήση φασματοσκοπίας UV-VIS

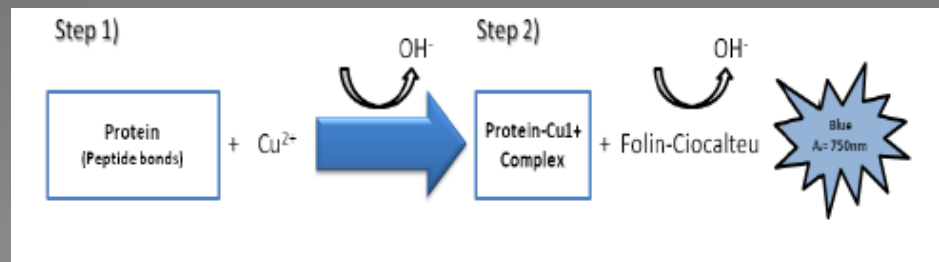
## 3. Μέθοδοι δέσμευσης χρωστικών

- Οι πρωτεΐνες αντιδρούν με ορισμένες συνθετικές χρωστικές (Amidoblack, 10B, Orange G, Acid Orange 12) προς αδιάλυτα σύμπλοκα
- Τα σύμπλοκα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση και απόχυση και μετριέται η απορρόφηση του δ/τος της χρωστικής

Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίζεται με πρότυπες καμπύλες. Χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών στα δημητριακά.

## 4. Μέθοδος Folin-Lowry

Γίνεται χρήση του αντιδραστηρίου διουρίας και του αντιδραστηρίου **Folin-Ciocalteu** ( $N + Cu^{2+}$  σύμπλοκο, με γαλαζωπό χρώμα που απορροφά στα **500-750nm**)



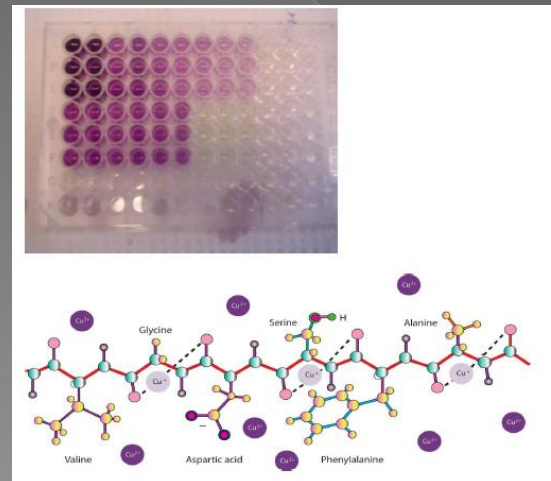
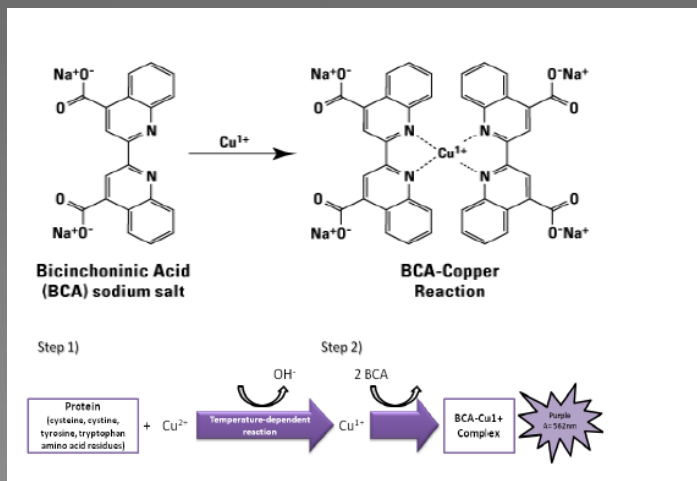
# Μέθοδοι με χρήση φασματοσκοπίας UV-VIS

## 5. Μέθοδος Smith

Πεπτιδικοί δεσμοί ανάγουν τα δισθενή ιόντα χαλκού σε μονοσθενή 2 μόρια δικιχονινικού οξέος και ιόντων χαλκού δίνουν χαρακτηριστικά σύμπλοκα μωβ χρώματος, στα **562 nm**. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με μέτρηση απορρόφησης και σύγκρισης με πρότυπα.

**ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:** Υψηλή ταχύτητα & ευαισθησία

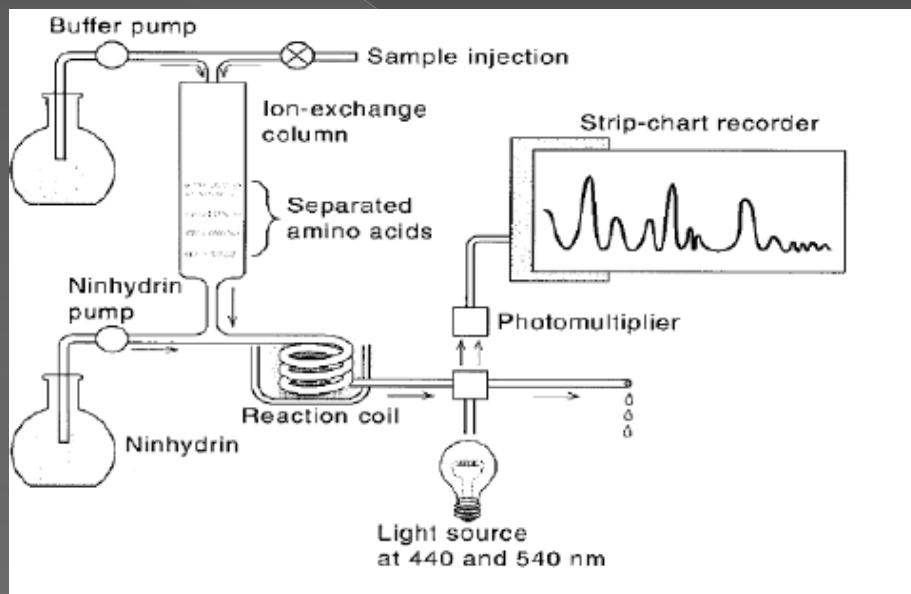
**ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ:** Η απορρόφηση εξαρτάται από το είδος της πρωτεΐνης που αναλύεται & δεν εξαγονται εύκολα ποσοτικά αποτελέσματα, λόγω της επεξεργασίας των τροφίμων



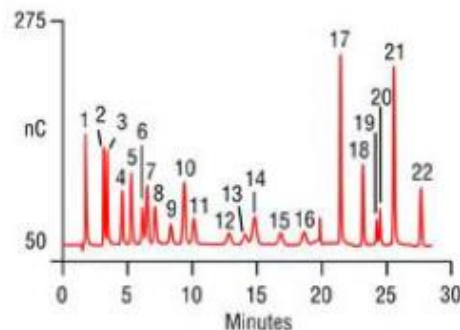
# Συνδυασμός χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών μεθόδων

1. Διάσπαση πεπτιδίου σε αα με υδρόλυση
2. Ανάλυση δείγματος με αναλυτή αα
3. Έκλουση αα από χρωματογραφική στήλη σε διαφορετικούς χρόνους (fingerprint)
4. Αντίδραση αα με νινυδρίνη και εμφάνιση συμπλόκων με χαρακτηριστικό μωβ χρώμα
5. Ο ανιχνευτής προωθεί το σήμα στο φασματοφωτόμετρο
6. Λαμβάνεται χρωματογράφημα απορρόφησης ανάλογα με τον χρόνο έκλουσης

# ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ



Χρωματογράφημα ανάλυσης αμινοξέων



- Peaks:
- |               |                   |
|---------------|-------------------|
| 1. Arginine   | 12. Isoleucine    |
| 2. Ornithine  | 13. Leucine       |
| 3. Lysine     | 14. Methionine    |
| 4. Glutamine  | 15. Norleucine    |
| 5. Asparagine | 16. Taurine       |
| 6. Alanine    | 17. Histidine     |
| 7. Threonine  | 18. Phenylalanine |
| 8. Glycine    | 19. Glutamate     |
| 9. Valine     | 20. Aspartate     |
| 10. Serine    | 21. Cystine       |
| 11. Proline   | 22. Tyrosine      |