



**ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ**



**ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΑΠΟΛΟΣ**  
**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΧΑΡΙΤΙΝΗ ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ**

**ΑΘΗΝΑ 2006**

**ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ**

**ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΑΠΟΛΟΣ**  
**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΧΑΡΙΤΙΝΗ ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ**

**ΑΘΗΝΑ 2006**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα δημητριακά αποτελούν ένα βασικό είδος διατροφής για τους ανθρώπους και τα ζώα. Επίσης, είναι πολύ σημαντικά για τη βιομηχανία και γενικότερα για την οικονομία μιας χώρας.

Η εργασία με τίτλο “ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ” του Τμήματος Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, αναφέρεται στις πρωτεΐνες που απαντώνται στα δημητριακά καθώς επίσης και στις μεθόδους εξαγωγής και προσδιορισμού των αμινοξέων από τις πρωτεΐνες αυτές με διάφορες τεχνικές. Η εργασία χωρίζεται σε επτά κεφάλαια.

Το πρώτο κεφάλαιο αναφέρεται στη δομή και το μεταβολισμό των αμινοξέων καθώς και τα αμινοξέα ως δομικές μονάδες των πρωτεϊνών.

Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών και η κατάταξη τους.

Το τρίτο κεφάλαιο μιλάει για την περιεκτικότητα διαφόρων τροφίμων σε πρωτεΐνες και αμινοξέα. Επιπλέον, αναφέρεται για τις πρωτεΐνες στη διατροφή των ανθρώπων και των ζώων.

Το τέταρτο και το πέμπτο κεφάλαιο αναφέρεται στη χρωματογραφία και σε διάφορες μεθόδους της, όπου στο πέμπτο κεφάλαιο αναλύεται η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Το έκτο κεφαλαίο μιλάει για τη διαδικασία εξαγωγής των αμινοξέων από τις πρωτεΐνες.

Το έβδομο κεφάλαιο μιλάει για την προετοιμασία των δειγμάτων καθώς και τις συγκεκριμένες μεθόδους για τον προσδιορισμό των αμινοξέων.

Τέλος, το όγδοο κεφάλαιο αναφέρεται στην αλληλουχία των αμινοξέων στις πρωτεΐνες.

Για την πραγματοποίηση της εργασίας αυτής θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αν. Καθηγητή Ιωάννη Καπόλο, ο οποίος με τις γνώσεις του και την καθοδήγησή του συνέβαλε ουσιαστικά στη δημιουργία αυτής της εργασίας. Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ψυχολογική και οικονομική υποστήριξη καθ’ όλη τη διάρκεια των σπουδών μου στη Σχολή.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
ΓΕΝΙΚΑ	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	7
ΑΜΙΝΟΞΕΑ	7
1.1 Δομή και ονοματολογία των αμινοξέων	7
1.2 Τα αμινοξέα: Οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών	9
1.3 Μεταβολισμός αμινοξέος	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	13
ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	13
2.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών	13
2.2 Κατάταξη των πρωτεϊνών	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	18
Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΣΤΗ ΖΩΗ ΜΑΣ	18
3.1 Περιεκτικότητα βασικών τροφίμων σε πρωτεΐνες	18
3.2 Χαρακτηριστικά των ενδοσπέρμιων αποθηκευτικών πρωτεϊνών των δημητριακών	20
3.3 Η πρωτεΐνες στη διατροφή του ανθρώπου	21
3.4 Η πρωτεΐνες στη διατροφή των ζώων	22
3.5 Διαθεσιμότητα των αμινοξέων στα δημητριακά	23
3.6 Διαφορές σε ορισμένα δημητριακά	24
3.7 Επίδραση των μεταλλάξεων στην περιεκτικότητα αμινοξέων σε διάφορα υβρίδια αραβόσιτου	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	26
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	26
4.1 Γενικά για τη χρωματογραφία	26
4.1.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	27
4.1.2 Αέρια χρωματογραφία	27
4.1.3 Χρωματογραφία κατανομής	28
4.1.4 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (S.E.C)	28
4.1.5 Χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής	29
4.1.6 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	31
5.1 HPLC	31
5.2 HPLC στην πρωτεϊνική ανάλυση	31
5.3 Στόχοι των διαχωρισμών με HPLC	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	33
6.1 Προετοιμασία δειγμάτων	33
6.2 Αντιδραστήρια	33
6.2.1 Η νινυδρίνη, η fluorescamine, και η o- phthalaldehyde (OPA)	33
6.3 Μέθοδοι εξαγωγής πρωτεϊνών από τα δημητριακά	33
6.4 Προετοιμασία δειγμάτων για την εξαγωγή λυσίνης και τρυπτοφάνης	35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	36
7.1 Εξαγωγή αμινοξέων από τις πρωτεΐνες	36
7.2 Προσδιορισμός τρυπτοφάνης	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	45
8.1 Η αλληλουχία των πρωτεϊνών	45
8.2 Ανάλυση των ΡΤΗ - αμινοξέων παραγώγων	46
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

## ΓΕΝΙΚΑ

Η παραγωγή κόκκων δημητριακών γίνεται με την καλλιέργεια των αντίστοιχων φυτών (σιτάρι, ρύζι, καλαμπόκι, κριθάρι, βρώμη, σίκαλη, κεχρί, σόργο, λαθούρι, σόγια, κ.ά.). Ο καρπός των δημητριακών αποτελεί βασικό είδος διατροφής για τον άνθρωπο και πρώτη ύλη για πολλούς κλάδους της βιομηχανίας, καθώς και εξαιρετική κτηνοτροφή για τα ζώα της αγροτικής βιομηχανίας (1). Τα δημητριακά διαιρούνται σε φθινοπωρινά και ανοιξιάτικα. Τα πρώτα είναι το σιτάρι (όλα τα είδη και ποικιλίες του γένους *Triticum*), η σίκαλη (*Sicale cereale*), το κριθάρι (όλα τα είδη και ποικιλίες του γένους *Hordeum vulgare*) και η βρώμη (*Avena sativa*). Τα ανοιξιάτικα είναι ο αραβόσιτος (*Zea mays*), το κεχρί (γένος *Panicum*), το σόργο (όλα τα είδη και ποικιλίες του γένους *Sorghum*) και το ρύζι (*Oryza sativa*). Τα δημητριακά που δίνουν σπόρους ακατάλληλους για αλευροποίηση, εκτός από ειδικές περιπτώσεις διαιτητικής, είναι το ρύζι (διατροφή των ανθρώπων), η βρώμη, το κεχρί και το σόργο (διατροφή ζώων), ενώ τα δημητριακά που δίνουν σπόρους κατάλληλους για την παραγωγή αλευριού είναι το σιτάρι, ο αραβόσιτος και η σίκαλη. Το κριθάρι χρησιμοποιείται σε διάφορες βιομηχανίες τροφίμων και κυρίως στην παρασκευή της μπίρας. Γενικά τα δημητριακά χρησιμεύουν επίσης για την παρασκευή ζωοτροφών, οινοπνευματωδών ποτών καθώς και για παραγωγή άχυρου. Δημητριακά καλλιεργούνται παντού (2).

Την πρώτη θέση σε όγκο παραγωγής κατέχει η Ασία και τη δεύτερη η Βόρεια και η Κεντρική Αμερική. Τη μεγαλύτερη σημασία στην παραγωγή δημητριακών έχουν το σιτάρι, το ρύζι και το καλαμπόκι. Το σιτάρι καλλιεργείται κυρίως σε Ευρώπη, Ασία και Αμερική, το ρύζι στην Ασία, το καλαμπόκι στην Αμερική, στην Ασία και στην Ευρώπη και το κεχρί και το σόργο στην Ασία, την Αμερική και την Αφρική. Η απόδοση των καλλιεργειών σε δημητριακά εξαρτάται από το είδος, την ποικιλία, τις φυσικές συνθήκες και το επίπεδο εξέλιξης της γεωργίας. Οι αποδοτικότερες καλλιέργειες είναι το καλαμπόκι και το ρύζι (1).

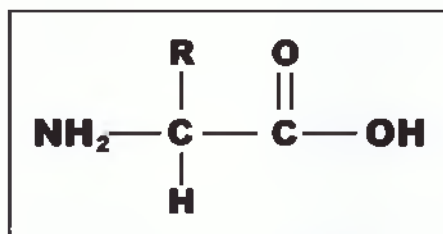
Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να παρουσιάσει εν συντομία τις ιδιότητες των αμινοξέων και των πρωτεϊνών, να δώσει στοιχεία για τις πρωτεΐνες που απαντώνται στα διάφορα δημητριακά και να καταγράψει τις διαδικασίες και μεθόδους που απαιτούνται για τον προσδιορισμό των αμινοξέων που περιέχονται στις διάφορες πρωτεΐνες των δημητριακών.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΑΜΙΝΟΞΕΑ

### 1.1 Δομή και ονοματολογία των αμινοξέων

Τα αμινοξέα είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν αμινομάδες και καρβοξυλικές ομάδες. Τα πιο κοινά αμινοξέα έχουν μια γενική δομή στην οποία μια αμινομάδα και μια καρβοξυλική ομάδα είναι συνδεδεμένες στο ίδιο άτομο άνθρακα. (Σχ. 1).



Σχήμα 1: Δομή αμινοξέος

Το άτομο άνθρακα συνδέεται επίσης με ένα άτομο υδρογόνου και μια ομάδα R που παρέχει σε κάθε αμινοξύ ιδιαίτερες ιδιότητες. Η ομάδα R δίνει σε κάθε αμινοξύ τις συγκεκριμένες ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένου του πώς συμπεριφέρονται κατά τη διάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού. Η δομή της ομάδας R και η ονοματολογία των αμινοξέων παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα 1.

**Πίνακας 1**  
**Δομή της ομάδας R και ονοματολογία των αμινοξέων**

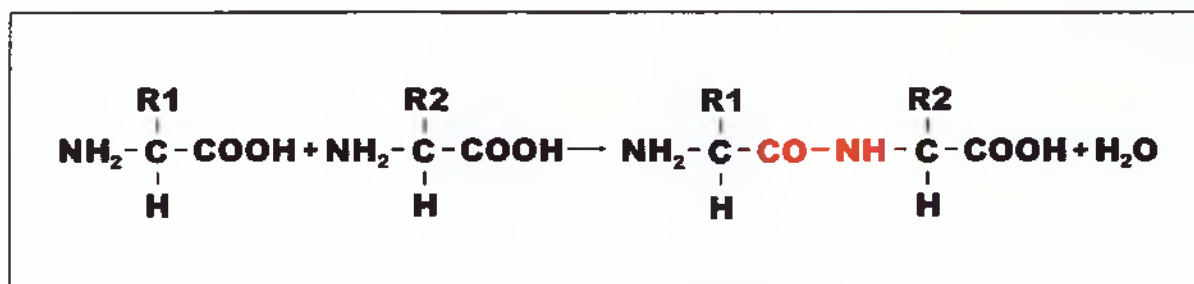
Όνομα	Σύμβολο (3-γράμματα)	Σύμβολο (1-γράμμα)	Μοριακό βάρος σε gr	Πλευρική αλυσίδα (R-ομάδα)
Ασπαραγινικό Οξύ	Asp	D	133	CH <sub>2</sub> -COOH
Γλουταμινικό Οξύ	Glu	E	147	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
Αλανίνη	Ala	A	89	CH <sub>3</sub>
Ασπαραγίνη	Asn	N	132	CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub>
Κυστεΐνη	Cys	C	121	CH <sub>2</sub> -SH
Γλουταμίνη	Gln	Q	146	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CONH <sub>2</sub>
Γλυκίνη	Gly	G	75	H
Ισολευκίνη	Ile	I	131	CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
Λευκίνη	Leu	L	131	CH <sub>2</sub> -CH (CH <sub>3</sub> ) (CH <sub>3</sub> )
Μεθειονίνη	Met	M	149	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>
Φαινυλαλανίνη	Phe	F	165	CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
Σερίνη	Ser	S	105	CH <sub>2</sub> OH
Θρεονίνη	Thr	Ta	119	CHOH-CH <sub>3</sub>
Θρυπτοφάνη	Trp	W	204	CH <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> N
Τυροσίνη	Tyr	Y	181	CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH
Βαλίνη	Val	V	117	CH (CH <sub>3</sub> ) (CH <sub>3</sub> )
Αργινίνη	Arg	R	174	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-C(NH)-NH <sub>2</sub>
Ισπιδίνη	His	H	154	CH <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub>
Λυσίνη	Lys	K	146	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH-NH <sub>2</sub>

Οι συντημήσεις για τα αμινοξέα, όπως και εκείνες της ονοματολογίας πεπτιδίων, είναι τυποποιημένες σε διεθνές επίπεδο. Τα αμινοξέα βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή είτε συνδυαζόμενα σε πεπτίδια (γραμμικές αλυσίδες των αμινοξέων) ή σε πρωτεΐνες, πεπτίδια μεγάλου Μ.Β, (που συνδέονται επίσης με ποικίλα υποστρώματα, π.χ. υδατάνθρακες).



Όλα αυτά τα αμινοξέα μπορούν να προσδιορισθούν με τη βοήθεια χρωματογραφικών τεχνικών, μετά από κατάλληλη προετοιμασία των δειγμάτων.

Τα αμινοξέα μπορούν να συνδεθούν με τη βοήθεια ενός πεπτιδικού δεσμού (Σχ. 2), δηλαδή ενός δεσμού που δημιουργείται ανάμεσα στην αμινομάδα του ενός αμινοξέος και στην καρβοξυλική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος.

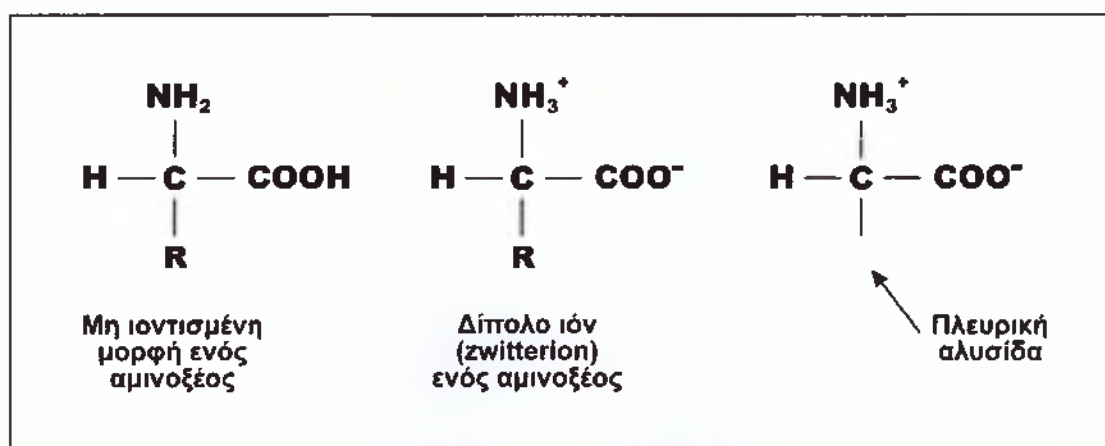


Σχήμα 2: Σύνδεση αμινοξέων για σχηματισμό διπεπτιδίου

Η σύνδεση δύο αμινοξέων διαμορφώνει ένα διπεπτίδιο, τριών αμινοξέων τριπεπτίδιο, και περισσότερων αμινοξέων ένα πολυπεπτίδιο. Μια πρωτεΐνη είναι ένα μεγάλο πολυπεπτίδιο, με περισσότερα από 20 αμινοξέα (3).

## 1.2 Τα αμινοξέα: Οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών

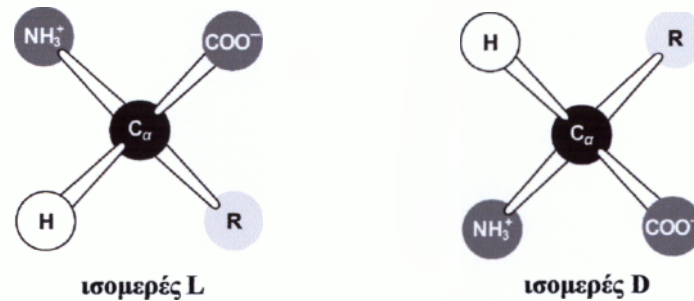
Τα αμινοξέα είναι τα βασικά δομικά μόρια των πρωτεϊνών. Ένα α-αμινοξύ αποτελείται από μία αμινο-ομάδα, μία καρβοξυλο-ομάδα, ένα άτομο υδρογόνου και μία χαρακτηριστική ομάδα R δεσμευμένη στο άτομο του άνθρακα που λέγεται α-άνθρακας γιατί είναι γειτονικός με την καρβοξυλική (όξινη) ομάδα, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3: Τα δομικά μόρια των πρωτεϊνών

Η ομάδα R ονομάζεται πλευρική αλυσίδα (side chain) για λόγους που θα γίνουν αμέσως εμφανείς. Τα αμινοξέα σε διάλυμα με ουδέτερο pH είναι κυρίως διπολικά ιόντα και όχι μη ιοντισμένα μόρια. Στη διπολική του μορφή ένα αμινοξύ έχει πρωτονιωμένη αμινομάδα ( $-\text{NH}_3^+$ ) και δισταμένη καρβοξυλική ομάδα ( $-\text{COO}^-$ ). Ο βαθμός ιοντισμού ενός αμινοξέος ποικίλλει με το pH. Σε όξινα διαλύματα (π.χ pH=1), η καρβοξυλική ομάδα δεν είναι ιοντισμένη ( $-\text{COOH}$ )

ενώ η αμινομάδα είναι ιοντισμένη ( $-\text{NH}_3^+$ ). Σε αλκαλικά διαλύματα (π.χ.  $\text{pH}=11$ ), η καρβοξυλική ομάδα είναι ιοντισμένη ( $-\text{COO}^-$ ) και η αμινομάδα μη ιοντισμένη ( $-\text{NH}_2$ ). Η τετραεδρική δομή τεσσάρων διαφορετικών ομάδων γύρω από ένα άτομο α-άνθρακα δίνει οπτική ενεργότητα στα αμινοξέα. Οι δύο μορφές σε σχέση αντικειμένου και ειδώλου καθρέφτη ονομάζονται ισομερές L και ισομερές D.



Σχήμα 4: Ισομερή L και D των αμινοξέων. Το R συμβολίζει την πλευρική αλυσίδα.

Μόνο τα L αμινοξέα απαντώνται στις πρωτεΐνες. Στις πρωτεΐνες συναντάμε είκοσι είδη πλευρικών αλυσίδων με διαφορετικό μέγεθος, σχήμα, φορτίο, ικανότητα δέσμευσης υδρογόνου και χημική αντιδραστικότητα. Πράγματι, όλες οι πρωτεΐνες, σε όλα τα είδη, από τα βακτήρια έως τους ανθρώπους, δομούνται από το ίδιο σύνολο των είκοσι αμινοξέων. Αυτό το βασικό αλφάβητο των πρωτεϊνών είναι ηλικίας τουλάχιστον 2 δισεκατομμυρίων χρόνων. Η καταπληκτική ποικιλία λειτουργικότητας που εμφανίζεται στις πρωτεΐνες είναι το αποτέλεσμα των πολλών και ποικίλων ιδιοτήτων αυτών των είκοσι δομικών στοιχείων τους. Θα αναλύσουμε τους τρόπους με τους οποίους αυτό το αλφάβητο χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει τις πολύπλοκες τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών που τους επιτρέπουν να επιτελούν τόσες πολλές βιολογικές διεργασίες.

Ας αναλύσουμε αυτό το “ρεπερτόριο” των αμινοξέων. Το απλούστερο αμινοξύ είναι η *γλυκίνη*, που έχει μόνο ένα άτομο υδρογόνου στην πλευρική αλυσίδα. Η *αλανίνη* είναι το επόμενο με μία μεθυλομάδα στην πλευρική της αλυσίδα. Μεγαλύτερες αλυσίδες υδρογονανθράκων (με τρία και τέσσερα άτομα άνθρακα) βρίσκονται στη *βαλίνη*, τη *λευκίνη* και την *ισολευκίνη*. Αυτές οι μεγαλύτερες αλειφατικές πλευρικές αλυσίδες είναι υδρόφοβες, δηλαδή απωθούν το νερό και τους “αρέσει” να ενώνονται η μία με την άλλη. Οι τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών, που είναι διαλυτές στο νερό, σταθεροποιούνται με συνένωση των υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων, που αποφεύγουν έτσι το νερό. Τα διαφορετικά μεγέθη και σχήματα αυτών των υδρογονανθρακικών πλευρικών αλυσίδων τους δίνουν τη δυνατότητα να δημιουργούν συμπαγείς δομές με πολύ λίγους κενούς χώρους. Η *προλίνη* έχει επίσης αλειφατική πλευρική αλυσίδα, αλλά διαφέρει από τα άλλα αμινοξέα της ομάδας επειδή η πλευρική της αλυσίδα δεσμεύεται και στο άτομο του αζώτου και στο άτομο α-άνθρακα. Το αποτέλεσμα είναι μία κυκλική δομή που επηρεάζει πολύ την πρωτεϊνική αρχιτεκτονική. Η προλίνη συχνά εμφανίζεται στα σημεία κάμψης των πρωτεϊνικών αλυσίδων και δεν υπάρχει πρόβλημα στο να βρίσκεται προς την πλευρά του νερού. Τρία αμινοξέα με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες είναι επίσης μέλη του βασικού “ρεπερτορίου”. Η *φαινυλαλανίνη*, η οποία όπως φανερώνει και το όνομά της, περιέχει έναν φαινολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με μία μεθυλενική ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ) ομάδα. Η *θρυπτοφάνη* ή



Οι πλευρικές αλυσίδες της αργινίνης και της λυσίνης είναι οι μεγαλύτερες από το σύνολο των είκοσι ομάδων R στα αμινοξέα. Μεταξύ των αμινοξέων υπάρχουν επίσης και δύο με όξινες πλευρικές αλυσίδες, το *ασπαραγινικό οξύ* και το *γλουταμινικό οξύ*. Αυτά τα αμινοξέα συνήθως λέγονται ασπαραγινικό και γλουταμινικό για να τονισθεί ότι οι πλευρικές τους αλυσίδες είναι σχεδόν πάντα αρνητικά φορτισμένες σε φυσιολογικό pH. Τα μη φορτισμένα παράγωγα του γλουταμινικού και ασπαραγινικού, η *γλουταμίνη* και η *ασπαραγίνη* περιέχουν μία τελική αμιδική ομάδα στη θέση της καρβοξυλομάδας. Επτά από τα είκοσι αμινοξέα έχουν πλευρικές αλυσίδες που εύκολα ιοντίζονται. Άλλες δύο ομάδες που μπορούν να ιοντιστούν στις πρωτεΐνες, είναι η α-αμινομάδα και η τελική α-καρβοξυλομάδα (3).

### 1.3 Μεταβολισμός αμινοξέος

Σήμερα τα δημητριακά παρέχουν ένα πολύ σημαντικό ποσοστό των ανθρώπινων και ζωικών διατροφών παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα είδη σιταριών είναι ανεπαρκή, σε μεγαλύτερη ή μικρότερη έκταση, σε διάφορες ουσιαστικές θρεπτικές ουσίες. Ένα αρχικό πρόβλημα, είναι το χαμηλό επίπεδο ουσιαστικών αμινοξέων (όπως η λυσίνη, η μεθειονίνη, η θρεονίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, η τυροσίνη, η φαινυλαλανίνη, η ιστιδίνη και η τρυπτοφάνη) στις σημαντικότερες αποθηκευτικές πρωτεΐνες των δημητριακών. Στις συνθέσεις ζωικών τροφών βασισμένες στο κριθάρι, η λυσίνη και η θρεονίνη προστίθενται για να δημιουργηθεί μια ισορροπημένη θρεπτική διατροφή. Δευτερεύοντα αμινοξέα όπως η γλουταμίνη και η προλίνη είναι παρόντα σε περίσσεια στις σημαντικότερες αποθηκευτικές πρωτεΐνες και δημιουργούν ένα διαφορετικό πρόβλημα. Αυτά τα αμινοξέα, όταν αφομοιώνονται από το ζώο, απελευθερώνουν μη χρησιμοποιήσιμο άζωτο. Αυτό το άζωτο εκκρίνεται στα ούρα, δημιουργώντας ένα σημαντικό περιβαλλοντικό φορτίο, ειδικά γύρω από τα αγροκτήματα χοίρων.

Για να βελτιωθεί η θρεπτική αξία του κριθαριού, επιδιώκεται η τροποποίηση του μεταβολισμού του αμινοξέος στους αναπτυσσόμενους σπόρους κριθαριού με γενετικό χειρισμό. Για να διοχετευθεί η ροή του αμινοξέος προς την επιθυμητή κατεύθυνση, αυξάνεται η διαδικασία σύνθεσης ασπαραγίνης στα διαφορετικά μέρη του φυτού και η δραστηριότητα της ασπαραγίνης στο σπόρο. Η προσέγγισή μας για να ασχοληθούμε με το πρόβλημα μόλυνσης του αζώτου είναι να παρέμβουμε στην σύνθεση των αποθηκευτικών πρωτεϊνών και στην ελεύθερη διαθεσιμότητα προλίνης στους σπόρους κριθαριού.

Ο πρακτικός στόχος είναι να δημιουργηθεί σπόρος κριθαριού που να είναι θρεπτικά ευεργετικότερος για τα ζώα. Με τη διαδικασία συλλέγουμε επίσης νέα γνώση για το μεταβολισμό των αμινοξέων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του σπόρου (4).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι πρωτεΐνες είναι τα «μοριακά εργαλεία» με τα οποία εκφράζονται οι γενετικές πληροφορίες του κυττάρου: οι πρωτεΐνες καταλύουν ένα εξαιρετικά μεγάλο πλήθος χημικών αντιδράσεων, ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων καθώς και τη διαπερατότητα όλων των κυτταρικών μεμβρανών, ρυθμίζουν τις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών, αναγνωρίζουν και δεσμεύουν άλλα βιομόρια, προκαλούν κίνηση, παρέχουν τη σχετική ακαμψία στον κυτταρικό σκελετό, κ.ά. (5)

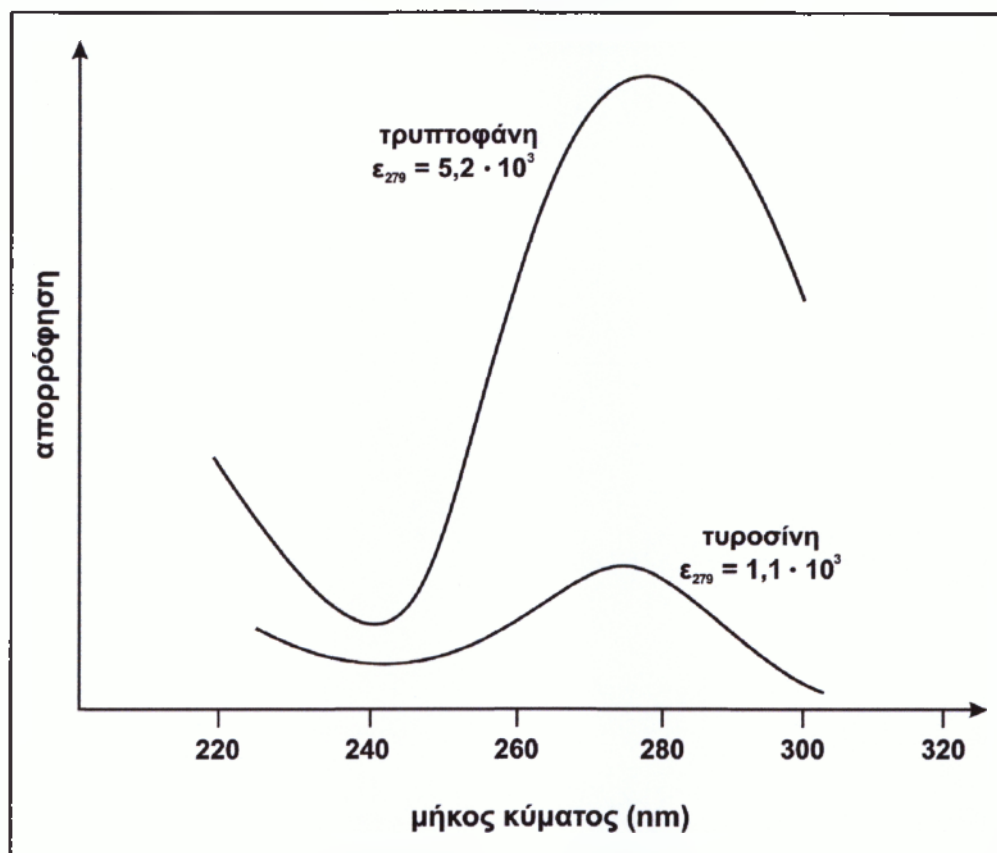
#### 2.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι σχεδόν αδιάλυτες σε οργανικούς διαλύτες και μόνον ορισμένες φυτικές πρωτεΐνες (οι προλαμίνες) είναι διαλυτές σε πυκνά αλκοολούχα διαλύματα.

Η διαλυτότητά τους επίσης στο νερό διαφέρει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη και οι διαφορές αυτές χρησιμοποιούνται ως ένα από τα κριτήρια για την κατάταξή τους. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαλυτότητά τους στο νερό είναι η συγκέντρωση ηλεκτρολυτών (π.χ άλατα) και το pH του διαλύματος. Χαμηλές συγκεντρώσεις ουδέτερων αλάτων ευνοούν τη διαλυτότητά τους (φαινόμενο γνωστό ως salting in), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων οι πρωτεΐνες καθιζάνουν (φαινόμενο γνωστό ως salting out). Επίσης η διαλυτότητά τους σε τιμές pH κοντά στο ισοηλεκτρικό τους σημείο είναι πολύ μικρή. Μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις έχουμε και κρυστάλλωση, όταν παράλληλα η συγκέντρωση αλάτων είναι μεγάλη.

Υπάρχει μια σημαντική απόκλιση στα ποσοστά περιεκτικότητας μεταξύ των δημητριακών και ως ένα βαθμό στο εσωτερικό κάθε είδους. Οι αλβουμίνες κυμαίνονται από 4% στον αραβόσιτο έως 44% στη σίκαλη, οι γλοβίνες από 3% στον αραβόσιτο έως 55% στη βρώμη, οι προλαμίνες από 2% στο ρύζι έως 55% στον αραβόσιτο και οι γλουτελίνες από 23% στη βρώμη έως 78% στο ρύζι. Επίσης τα διαλύματά τους δεν είναι τελείως διαυγή, αλλά απορροφούν και διαθλούν το φως. Ιδιαίτερα τονίζεται η ικανότητά τους να απορροφούν υπεριώδη ακτινοβολία στη ζώνη από 240 έως 290 nm, γεγονός που οφείλεται στην παρουσία των αμινοξέων τρυπτοφάνη, τυροσίνη και φαινυλαλανίνη στο μόριό τους. Ειδικότερα επειδή η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη παρουσιάζουν

ένα χαρακτηριστικό μέγιστο απορρόφησης γύρω στα 280 nm (Σχ.6), χρησιμοποιούμε την ιδιότητα αυτή για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών σε διαλύματα.



Σχήμα 6: Τα φάσματα απορρόφησης, στη ζώνη του υπεριώδους, των αμινοξέων τρυπτοφάνη και τυροσίνη που παρουσιάζουν ένα μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm.

Τα διαλύματά τους παρουσιάζουν το φαινόμενο της ώσμωσης όταν τεθούν μέσα σε μία μεμβράνη ή σάκο, που στη συνέχεια εμβαπτίζεται μέσα σε ένα υδατικό διάλυμα αλάτων, οπότε μια ποσότητα νερού θα εισέλθει στο σάκκο που περιέχει την πρωτεΐνη με αποτέλεσμα την διόγκωσή του. Την ιδιότητα αυτή των πρωτεϊνών εκμεταλλεύονται οι οργανισμοί στις ανταλλαγές ιόντων μεταξύ των κυττάρων τους και στη υδάτινή τους ισορροπία.

Όταν τα μόρια μιας πρωτεΐνης τεθούν σε φυγόκεντρικό πεδίο καθιζάνουν με ταχύτητες που εξαρτώνται τόσο από τη φυγόκεντρη δύναμη που εξασκείται πάνω σε αυτά, όσο επίσης και από το μέγεθος και το σχήμα τους.

Μολονότι οι καρβοξυλικές και αμινικές ομάδες των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης συμμετέχουν στη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού και δεν μπορούν να ιονιστούν, ωστόσο οι πρωτεΐνες είναι μόρια που ιονίζονται και αυτό το οφείλουν στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων τους. Έτσι λοιπόν, το μόριο μιας πρωτεΐνης μπορεί να συμπεριφερθεί ως κατιόν, ως ανιόν, ή ως δίπολο στην περίπτωση που ο αριθμός των θετικών φορτίων ισούται με τον αριθμό των αρνητικών ηλεκτρικών φορτίων. Οι τρεις αυτές μορφές της πρωτεΐνης εξαρτώνται, όπως και στην περίπτωση των αμινοξέων, από το pH του διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη. Το pH στο

οποίο η πρωτεΐνη δεν φέρει καθαρό ηλεκτρικό φορτίο ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο και συμβολίζεται, όπως και στην περίπτωση των αμινοξέων, με το  $pH_i$  ή με το  $pI$ . (5).

## 2.2 Κατάταξη των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες κατατάσσονται ως εξής:

- A. Με βάση το κριτήριο της ενζυμικής δράσης κατατάσσονται σε ενζυμικές και μη ενζυμικές.
- B. Με βάση την προέλευσή τους κατατάσσονται σε βακτηριακές, φυτικές, ζωικές, κ.ά
- Γ. Οι πρωτεΐνες ενός ζωικού οργανισμού κατατάσσονται σε πρωτεΐνες αίματος, γάλακτος, εγκεφαλονωτιαίου μυελού, μυϊκού ιστού, κ.ά.
- Δ. Με βάση τη μορφή του μορίου τους και τη διαλυτότητά τους στο νερό κατατάσσονται:

1. Σε αδιάλυτες ινώδεις πρωτεΐνες ή σκληροπρωτεΐνες. Το μόριο των πρωτεϊνών αυτών έχει τη μορφή ίνας και πρακτικά είναι αδιάλυτες στο νερό. Σε αυτές ανήκουν η φιβροΐνη του μεταξιδίου, το κολλαγόνο, που απαντάται στο συνδετικό ιστό (το κολλαγόνο με θέρμανση στους 120-150 βαθμούς δίνει τη ζελατίνη) και η κερατίνη, που απαντάται στα φτερά των πουλιών, στα κέρατα, στα νύχια, στις τρίχες, κ.ά.

2. Σε υδατοδιαλυτές σφαιρικές πρωτεΐνες ή σφαιροπρωτεΐνες. Τις ονομάζουμε έτσι λόγω της σφαιρικής ή ωοειδούς μορφής του μορίου τους. Είναι υδατοδιαλυτές στο νερό ή σε αραιά αλατούχα διαλύματα. Σε αυτές ανήκουν:

α. Οι αλβουμίνες, που είναι υδατοδιαλυτές ακόμη και σε απεσταγμένο νερό. Έχουν ελαφρώς όξινο χαρακτήρα.

β. Οι γλοβουλίνες, που είναι αδιάλυτες στο νερό, αλλά διαλυτές σε αραιά αλατούχα διαλύματα (π.χ. 5% NaCl).

γ. Οι προταμίνες και ιστόνες, που είναι εύκολα διαλυτές στο νερό και είναι ιδιαίτερα μικρού μοριακού βάρους. Χαρακτηρίζονται από τον έντονο αλκαλικό χαρακτήρα του μορίου τους, με ισοηλεκτρικό σημείο περίπου σε  $pH=11$ . Την ιδιότητά τους αυτή οφείλουν στο μεγάλο ποσοστό συμμετοχής στη σύσταση του μορίου τους των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη (μέχρι 90% σε ορισμένες περιπτώσεις). Λόγω των ελεύθερων θετικών φορτίων που φέρουν, σχηματίζουν εύκολα ιονικούς δεσμούς με μόρια που φέρουν αντίθετο ηλεκτρικό φορτίο (π.χ. όξινες πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα). Ειδικότερα οι ιστόνες βρίσκονται συνδεδεμένες με το DNA των ευκαριωτικών κυττάρων.

δ. Οι γλοβίνες ή σφαιρίνες, που διακρίνονται από τις προηγούμενες λόγω της αυξημένης συμμετοχής της ιστιδίνης στο μόριό τους. Σε αυτές ανήκει το πρωτεϊνικό τμήμα της αιμογλοβίνης και της μυογλοβίνης.

ε. Οι προλαμίνες χαρακτηρίζονται από τη διαλυτότητά τους σε αλκοολούχα διαλύματα (π.χ. 70% αλκοόλη). Περιέχουν υψηλά ποσοστά γλουταμινικού οξέος, γλουταμίνης, καθώς και ασπαργίνης. Αντίθετα η περιεκτικότητά τους σε λυσίνη (βασικό αμινοξύ στη διατροφή των θηλαστικών) είναι πολύ μικρή, όπως συμβαίνει π.χ. στην πρωτεΐνη γλιαδίνη του σιταριού.

στ. Οι γλουτελίνες, όπως και οι προηγούμενες, είναι φυτικής προέλευσης. Είναι διαλυτές σε όξινα ή αλκαλικά αλατούχα διαλύματα, αλλά αδιάλυτες σε αλατούχα διαλύματα ουδέτερου pH. Είναι πλούσιες σε γλουταμικό οξύ, προλίνη και αργινίνη.

**Πίνακας 2**  
**Διαλυτότητα (επί τις εκατό) των πρωτεϊνών των δημητριακών**  
**στο νερό**

<b>ΔΗΜΗΤΡΙΑΚΑ</b>	<b>ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ</b>	<b>ΓΛΟΒΙΝΗ</b>	<b>ΠΡΟΛΑΜΙΝΗ</b>	<b>ΓΛΟΥΤΕΛΙΝΗ</b>
<b>Σιτάρι</b>	9-15	6-7	33-45	40-4
<b>Σίκαλη</b>	10-44	10-19	21-42	25-4
<b>Κριθάρι</b>	12	8-12	25-52	52-5
<b>Βρώμη</b>	10-20	12-55	12-14	23-5
<b>Ρύζι</b>	5-11	10	2-7	77-7
<b>Σόργο</b>	4	9	48	3
<b>Αραβόσιπος</b>	4-8	3-4	47-55	38-4

Ε. Με βάση τη σύσταση του μορίου τους κατατάσσονται:

1. Σε απλές ή ολοπρωτεΐνες όταν το μόριο τους αποτελείται μόνο από αμινοξέα, και
2. Σε ετεροπρωτεΐνες ή συζευγμένες πρωτεΐνες ή σύνθετες όταν το μόριό τους περιέχει πέρα από το πρωτεϊνικό τμήμα και ένα μη πρωτεϊνικό συστατικό. Τα δύο συστατικά συνήθως συνδέονται με ισχυρό δεσμό. Η μη πρωτεϊνική ομάδα μπορεί να είναι υδατάνθρακας, λιπίδιο, νουκλειικό οξύ, μεταλλικό ιόν, χρωμογενές (π.χ. πορφυρινικός δακτύλιος), ή φωσφορική ομάδα. Αντίστοιχα τα προκύπτοντα μόρια αναφέρονται ως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες, νουκλεοπρωτεΐνες, μεταλλοπρωτεΐνες, χρωμοπρωτεΐνες και φωσφοπρωτεΐνες.

Στ. Με βάση το βιολογικό τους ρόλο κατατάσσονται:

1. Σε ένζυμα, που είναι βιολογικοί καταλύτες και καταλύουν σχεδόν το σύνολο των αντιδράσεων ενός οργανισμού, δυναμική έκφραση των οποίων είναι η ζωή.
2. Σε αποθηκευτικές πρωτεΐνες, όπως η γλιαδίνη του καρπού του σιταριού, η οβαλβουμίνη του αυγού, η καζεΐνη του γάλακτος. Με τη μορφή αυτή οι οργανισμοί αποθηκεύουν μεταβολική ενέργεια και αμινοξέα για να καλύψουν τις ανάγκες του αναπτυσσόμενου εμβρύου και νεογνού.
3. Σε τοξίνες, όπως η γκοσσυπίνη και η ρυκίνη. Οι πρωτεΐνες αυτές σε πολύ μικρές ποσότητες είναι τοξικές για τους ανώτερους ζωικούς οργανισμούς.
4. Σε ορμόνες, όπως η ινσουλίνη του πάγκρεας που ρυθμίζει το σύνολο του μεταβολισμού των τροφών, η σωματοτροπίνη, μια ορμόνη της ανάπτυξης, κ.ά. (όλες οι ζωικές ορμόνες δεν είναι πρωτεϊνικής φύσης).
5. Σε πρωτεΐνες του μυϊκού συστήματος, όπως η ακτίνη και η μυοσίνη, τα δύο κύρια συστατικά του μυϊκού ιστού.



6. Σε πρωτεΐνες μεταφοράς, δηλαδή πρωτεΐνες που είναι ικανές να δεσμεύουν και να μεταφέρουν διάφορες ομάδες. Κυριότεροι αντιπρόσωποι, η αιμοσφαιρίνη των ερυθροκυττάρων των σπονδυλωτών που μεταφέρει το οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς και η μυογλοβίνη, επίσης μεταφορέας οξυγόνου στους ιστούς και στη λέμφο.

7. Σε δομικές πρωτεΐνες. Μερικές ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, όπως π.χ. η ακτίνη (η ακτίνη επίσης είναι η κυριότερη συστατική πρωτεΐνη του μυϊκού συστήματος), σχηματίζουν ίνες, το σύνολο των οποίων δημιουργούν ένα τρισδιάστατο δομικό πλέγμα που καθορίζει το σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων και το οποίο επίσης συμμετέχει στην κίνηση και τη μετακίνησή τους. Οι εξωκυτταρικές δομικές πρωτεΐνες επίσης συνδέουν ισχυρά τα κύτταρα των ιστών και των οργάνων μεταξύ τους, ενώ παράλληλα δημιουργούν το απαραίτητο δομικό πλέγμα μέσα στο οποίο τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν. Οι περισσότερες δομικές πρωτεΐνες είναι συνήθως συσσωματώματα απλών πολυπεπτιδικών αλυσίδων που συνδέονται μεταξύ τους με ασθενείς ή ισχυρούς δεσμούς.

8. Σε πρωτεΐνες του προστατευτικού ιστού και των αμυντικών μηχανισμών των οργανισμών. Στην ομάδα ανήκουν η θρομβίνη και το φιβρινογόνο του αίματος που βοηθούν στην πήξη του και έτσι εμποδίζονται απώλειες του από διάφορες πληγές. Επίσης ανήκουν τα αντισώματα ή γ-γλοβουλίνες ή ανοσογλοβουλίνες. Τα αντισώματα είναι συστατικά του συστήματος αναγνώρισης και απομάκρυνσης ξένων προς τον οργανισμό σωμάτων, όπως βακτήρια, ιοί ή άλλοι μικροοργανισμοί, ή ακόμη και μεταμοσχεθέντα όργανα (5).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΣΤΗ ΖΩΗ ΜΑΣ

#### 3.1 Περιεκτικότητα βασικών τροφίμων σε πρωτεΐνες

Όταν τρώμε τρόφιμα που περιέχουν πρωτεΐνη, αυτή διασπάται κατά τη διάρκεια της πέψης σε δομικά αμινοξέα. Αυτά τα αμινοξέα απορροφώνται από τον οργανισμό μας και χρησιμοποιούνται για να παράγουν νέες πρωτεΐνες και άλλες απαραίτητες ουσίες.

Ο οργανισμό μας μπορεί να παράγει μερικά από τα αμινοξέα που απαιτούνται για να κατασκευαστούν πρωτεΐνες, αλλά άλλα πρέπει να ληφθούν από τη διατροφή. Αυτά είναι τα οκτώ αποκαλούμενα “ουσιαστικά” αμινοξέα τα οποία είναι η ισολευκίνη, η λευκίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη, η βαλίνη και η ιστιδίνη, η οποία προστέθηκε το 1986. Οι πρωτεΐνες αποτελούν μέρος της δομής του σώματος, έτσι ώστε απαιτείται ένας συνεχής ανεφοδιασμός σε αμινοξέα. Ο οργανισμός μας είναι σε θέση να βάλει αυτές τις βασικές μονάδες αμινοξέων μαζί, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αλληλουχίες αμινοξέων, για να παράγει συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες μπορούν να παραχθούν μόνο εάν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα είναι διαθέσιμα.

Η θρεπτική αξία των πρωτεϊνικών τροφίμων μπορεί να κριθεί από τη δυνατότητά τους να παρέχουν και την ποσότητα και τον αριθμό ουσιαστικών αμινοξέων που απαιτούνται από το σώμα. Οι διαφορετικές πηγές τροφίμων περιέχουν διαφορετικές ομάδες πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούνται από διαφορετικές αλληλουχίες και αναλογίες αμινοξέων. Γενικά, οι πρωτεΐνες από ζωικές πηγές είναι μεγαλύτερης θρεπτικής αξίας επειδή περιέχουν συνήθως όλα τα ουσιαστικά αμινοξέα. Οι πρωτεΐνες από φυτικές πηγές, όπως τα δημητριακά και τα λαχανικά, μπορεί να είναι ανεπαρκείς σε κάποιο από τα ουσιαστικά αμινοξέα. Στους πίνακες 3, 4, 5, αναφέρεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη σε κάποιες ομάδες τροφών.

Επειδή η ανεπάρκεια είναι διαφορετική σε κάθε τρόφιμο, όταν τρώγονται μαζί συμπληρώνουν το ένα το άλλο και το μίγμα είναι υψηλότερης θρεπτικής αξίας από ότι τα μεμονωμένα τρόφιμα, και είναι τόσο καλό όσο και οι ζωικές πρωτεΐνες. Είναι σημαντικό, ιδιαίτερα για τους αυστηρά χορτοφάγους που δεν καταναλώνουν γαλακτοκομικά ή αυγά.

Το μαγείρεμα μπορεί να αλλάξει τη σύσταση της πρωτεΐνης σε αμινοξέα και αυτό οδηγεί

συνήθως στην επιθυμητή γεύση και την μείωση της ανάπτυξης χρώματος. Πολύ λίγη θρεπτική αξία χάνεται (6).

**Πίνακας 3**  
**Περιεκτικότητα των δημητριακών σε πρωτεΐνη (6)**

<b>Δημητριακά</b>	<b>Πρωτεΐνη σε gr/100 gr Δημητριακών</b>
Κριθάρι	3
Σίκαλη	9
Σιτάρι	45
Καλαμπόκι	4
Σόγια	37
Ρύζι	2

**Πίνακας 4**  
**Περιεκτικότητα των φρούτων σε πρωτεΐνη (6)**

<b>Φρούτα</b>	<b>Πρωτεΐνη σε gr/100 gr Φρούτων</b>
Μήλο	2
Βερίκοκο	5
Ροδάκινο	1
Αχλάδι	2
Ανανάς	5
Δαμάσκηνο	5
Κυδώνι	3
Σταφίδα	1
Φράουλα	6
Πεπόνι	2

Πίνακας 5

Περιεκτικότητα των λαχανικών και των οσπρίων σε πρωτεΐνη (6)

Λαχανικά και Οσπρια	Πρωτεΐνη σε gr/100 gr Λαχανικών και Οσπρίων
Αγκινάρα	5
Σπαράγγι	2
Φασόλι	8
Παντζάρι	2
Μπρόκολο	3
Λάχανο	3
Καρότο	7
Κουνουπίδι	2
Σέλινο	9
Ρεβίθι	8
Φακή	8
Μαρούλι	1
Μανιτάρι	2
Κρεμμύδι	9
Μαϊντανός	5
Ντομάτα	9
Αγγούρι	6
Πράσο	2

### 3.2 Χαρακτηριστικά των αποθηκευτικών πρωτεϊνών των ενδοσπέρμιων των δημητριακών

Από τις πρωτεΐνες των φυτών, οι ενδοσπέρμιες πρωτεΐνες των δημητριακών είναι ίσως οι σημαντικότερες θρεπτικά και λειτουργικά και έχουν ερευνηθεί εκτενώς. Οι πρωτεΐνες των δημητριακών, παρόλα αυτά, είναι πιο δύσκολες στην ανάλυση από αυτές των φυτών και των ζωικών πρωτεϊνών. Οι περισσότερες είναι αποθηκευτικές πρωτεΐνες, αδιάλυτες στο νερό ή σε αλατούχα διαλύματα, αλλά διαλυτές σε αλκοολούχες ουσίες (προλαμίνες) ή μόνο σε οξύ, αλκάλιο, απορρυπαντικά, ή περιοριστικούς παράγοντες (γλουτελίνες). Εξαιτίας των ασυνήθιστων συνθέσεων των αμινοξέων αυτών των πρωτεϊνών (πλούσια σε γλουταμίνη, προλίνη και γλυκίνη), και των δισουλφιδικών δεσμών σε υψηλό μοριακό βάρος καθιστούν πολλές αναλυτικές μεθόδους

άχρηστες. Οι πρωτεΐνες των δημητριακών είναι επίσης ετερογενείς εξαιτίας: 1. της παρουσίας περισσότερων από ενός τύπου γονιδίων σε μια μοναδική κατηγορία και 2. της χαρακτηρισμένης ομολογίας λόγω του διπλασιασμού και της μεταλλαγής ορισμένων προγονικών γονιδίων. Για παράδειγμα, κάθε γλιαδίνη σιταριού και γλουτένη, περιέχει τουλάχιστον 100 πολυπεπτίδια. Τέτοια ετερογένεια σε συνδυασμό με δομική ομοιότητα τοποθετεί τις πρωτεΐνες των δημητριακών μεταξύ των πρωτεϊνών φυτικής προέλευσης που δύσκολα απομονώνονται και χαρακτηρίζονται (7).

### 3.3 Οι πρωτεΐνες στη διατροφή του ανθρώπου

Το σώμα μας έχει την ικανότητα να συνθέτει μερικά αμινοξέα. Εντούτοις, υπάρχουν οχτώ αμινοξέα, όπως προαναφέραμε, τα οποία δεν μπορούν να συντεθούν στο σώμα μας, οπότε πρέπει να παρασχεθούν από τα τρόφιμα που τρώμε. Τα δημητριακά και τα λαχανικά μπορούν να περιέχουν όλα τα ουσιαστικά αμινοξέα που είναι απαραίτητα για τη διατροφή του ανθρώπου.

Μέσα σε μια πρωτεΐνη ή μια τροφή, το αμινοξύ περιορισμού (επίσης αποκαλούμενο αρχικός περιοριστικός παράγοντας) είναι το αμινοξύ που είναι το ανεπαρκέστερο συγκριτικά με την πρωτεΐνη αναφοράς (ή την τροφή). Σημειώνεται ότι ο αρχικός περιοριστικός παράγοντας δεν είναι το αμινοξύ για του οποίου η ποσότητα είναι η χαμηλότερη στην τροφή, γιατί πρέπει να λάβουμε υπόψη την καθημερινή ποσοτική απαίτησή μας σε κάθε αμινοξύ. Τα τρόφιμα από ζωικές πηγές είναι πλήρη σε ουσιαστικά αμινοξέα, σε αντίθεση με τα τρόφιμα από φυτικές πηγές που δεν είναι. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο είναι πραγματικά σημαντικό, ειδικά για τους χορτοφάγους, να είναι γνώστες και να εφαρμόζουν τους συνδυασμούς τροφίμων που συνίστανται στην ένωση των διάφορων ομάδων τροφών, προκειμένου να ληφθεί ένα πρωτεϊνικό μίγμα από το οποίο κανένα ουσιαστικό αμινοξύ δεν θα έλειπε.

Ανέκαθεν, τα δημητριακά υπήρξαν η βάση της ανθρώπινης διατροφής. Εν τούτοις, αν και τα δημητριακά γενικά έχουν έλλειψη λυσίνης, αυτό δεν προκάλεσε σημαντικά προβλήματα στους ανθρώπους. Αυτό συμβαίνει επειδή από ένστικτο, συνδυάζουμε τα δημητριακά με άλλα τρόφιμα που περιέχουν αμινοξέα περιορισμού των δημητριακών. Παραδείγματος χάριν, στην Ινδία συνδυάζεται το ρύζι με τις φακές. Στην Ιταλία και στην Ελλάδα τα ζυμαρικά με το τυρί. Στη Γαλλία το ψωμί με το τυρί, στο Μεξικό το καλαμπόκι και τα κόκκινα φασόλια, κ.ά.

Επομένως, η χορτοφαγία είναι συμβατή με μια ποιοτικά ικανοποιητική καθημερινή πρόσληψη πρωτεϊνών. Συνοψίζοντας, πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι η συνολική λήψη ενέργειας πρέπει να είναι αρκετά υψηλή (πίνακας 6), έτσι ώστε τα αμινοξέα που θα προκύψουν από την πέψη των πρωτεϊνών των τροφίμων, να χρησιμοποιούνται για άλλους λόγους από το να καλύπτουν την ενεργειακή απαίτησή του οργανισμού μας, δηλ. για να μας εξασφαλίσουν τη πρωτεϊκή σύνθεση: δομικές πρωτεΐνες, ενζυματική και ορμονική σύνθεση, κ.λπ. (8)

**Πίνακας 6**  
**Απαιτήσεις σε αμινοξέα ανά mg/g N (άζωτο) (9)**

<b>ΑΜΙΝΟΞΕΑ</b>	<b>ΝΗΠΙΑ</b>	<b>ΗΛΙΚΙΑ 10-12</b>	<b>ΕΝΗΛΙΚΟΣ</b>
Ισολευκίνη	220	230	113
Λευκίνη	500	350	156
Λυσίνη	325	469	138
Μεθειονίνη & Κυστεΐνη	180	213	15
Φαινυλαλανίνη & Τυροσίνη	394	213	15
Θρεονίνη	275	275	81
Τρυπτοφάνη	56	30	44
Βαλίνη	294	256	113

### 3.4 Οι πρωτεΐνες στη διατροφή των ζώων

Οι πρωτεΐνες, ή τα αμινοξέα, που λαμβάνονται από ένα ζώο παρέχουν το άζωτο που απαιτείται για την ανάπτυξη του σώματος, τη συντήρηση του ιστού, την αναπαραγωγή και τη γαλακτοπαραγωγή. Όταν ένα νέο ζώο παίρνει λίγες πρωτεΐνες, η ανάπτυξη του θα περιοριστεί και η λήψη ενέργειάς του θα ανατραπεί. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υποσιτισμό του ζώου. Οι πρωτεϊνικές απαιτήσεις ποικίλλουν με το είδος του ζώου. Τα ενήλικα ζώα έχουν χαμηλότερη πρωτεϊνική απαίτηση από τα νέα ζώα.

Περίπου 10 αμινοξέα, τα οποία είναι η μεθειονίνη, η λυσίνη, η ασπαραγίνη, η γλουταμίνη, η τυροσίνη, η βαλίνη, αργινίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη και η ιστιδίνη, θεωρούνται ουσιαστικά για την ανάπτυξη του ζώου. Ένα ουσιαστικό αμινοξύ μπορεί να οριστεί ως ένα που δεν μπορεί να συντεθεί σε ένα αρκετά γρήγορο ποσοστό για να επιτρέψει τη βέλτιστη ανάπτυξη του νέου (σε ηλικία) ζώου. Οι πηγές πρωτεϊνών ποικίλλουν σε θρεπτική αξία, ανάλογα με το περιεχόμενο και τη διαθεσιμότητα των ουσιαστικών αμινοξέων.

Οι φυτικές πρωτεΐνες σπόρων περιέχουν περισσότερα ουσιαστικά αμινοξέα από τα δημητριακά ή τα υποπροϊόντα τους. Μεταξύ τους, η σόγια είναι ίσως η καλύτερη πηγή αμινοξέων και είναι επίσης μια σημαντική πηγή πρωτεϊνών για τα μη μηρυκαστικά. Οι ζωικές πρωτεΐνες που προέρχονται από το ιχθυάλευρο, το κρέας, τα κόκαλα και τα προϊόντα γάλακτος σε σκόνη είναι συνήθως άριστες πηγές ουσιαστικών αμινοξέων. Εάν υποβληθούν σε κατάλληλη επεξεργασία, οι τροφές από αυτές τις πηγές παρέχουν ένα υψηλό επίπεδο αμινοξέων και είναι πολύ χρήσιμες ως συμπληρώματα για να συμπληρώσουν τα αμινοξέα από τα προϊόντα των δημητριακών. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ποσότητα των μεμονωμένων αμινοξέων συνήθως δεν είναι ανάλογη με το επίπεδο της πρωτεΐνης στη διατροφή. Ένας λόγος για αυτό είναι ότι τα

επίπεδα των πρωτεϊνών καθορίζονται από το ποσό αζώτου στο προϊόν. Αυτό δίνει μια γενικά καλή προσέγγιση του πραγματικού πρωτεϊνικού επιπέδου, αλλά δεν είναι ακριβής. Ένας άλλος λόγος για τη διαφορά μεταξύ του ποσού των αμινοξέων και του επιπέδου πρωτεΐνης είναι ότι δεν παρατίθενται όλα τα αμινοξέα. Αν και ο κατάλογος που έχουμε περιλάβει είναι εκτενής, δεν είναι πλήρης. Ένας τρίτος λόγος για αυτή την απόκλιση είναι ότι τα μεμονωμένα αμινοξέα περιέχουν τις μοριακές ομάδες που χάνονται για να παραχθεί νερό όταν συνδυαστούν με πρωτεϊνικά μόρια. Η ενυδατική αξία του ύδατος των μεμονωμένων αμινοξέων σημαίνει ότι μια ομάδα μεμονωμένων αμινοξέων ισοδύναμων με το περιεχόμενό τους σε ένα πρωτεϊνικό μόριο θα ζυγίσει περισσότερο από το πρωτεϊνικό μόριο. Μερικές αμίνες, όπως η γλουταμίνη και ασπαραγίνη, μετριοούνται και αναφέρονται ως γλουταμινικό οξύ και ασπαραγινικό οξύ. Οι αμίνες περιέχουν ένα πιο υψηλό επίπεδο αζώτου από το αμινοξύ, οδηγώντας κατά συνέπεια σε ένα ψευδώς υψηλότερο πρωτεϊνικό επίπεδο (8).

Γνωρίζοντας τις απαιτήσεις των ζώων σε αμινοξέα, κυρίως των θηλαστικών, και τη σύνθεση των χόρτων σε αμινοξέα, η διατροφή των ζώων με αμινοξέα είναι μια ακριβέστερη προσέγγιση. Πρέπει να εξεταστούν τα επίπεδα λυσίνης, έτσι ώστε να είναι κανονικά, καθώς επίσης και τα άλλα αμινοξέα να είναι σε ικανοποιητικά επίπεδα. Τα επίπεδα θρεονίνης, μεθειονίνης και τρυπτοφάνης πρέπει να ελεγχθούν ώστε να είναι σε ικανοποιητικά επίπεδα. Οι απαιτήσεις των ζώων μπορούν να συμπληρωθούν από πρωτεΐνες όπως είναι το κριθάρι, το σιτάρι, το καλαμπόκι, η σόγια, τα μπιζέλια ή από τα καθαρά αμινοξέα (10).

### 3.5 Διαθεσιμότητα των αμινοξέων στα δημητριακά

Από τα αμινοξέα μέσα στο σιτάρι, τα λιγότερο-διαθέσιμα αμινοξέα, όπως η λυσίνη, εμφανίζονται κυρίως στα λιγότερο εύπεπτα μέρη του σιταριού (aleurone κύτταρα), και τα πιο διαθέσιμα αμινοξέα, όπως το γλουταμινικό οξύ, εμφανίζονται στα ιδιαίτερα εύπεπτα μέρη ενδοσπερμίων (11). Με αυτό προσπαθούμε να υπολογίσουμε τις σχετικές διαφορές στη διαθεσιμότητα ορισμένων αμινοξέων όπως της αργινίνης, η οποία είναι ένα από τα πιο διαθέσιμα αμινοξέα με υψηλή συγκέντρωση στα aleurone κύτταρα. Ομοίως, η χαμηλή διαθεσιμότητα της θρεονίνης, της οποίας η συγκέντρωση ποικίλλει ελάχιστα στα διαφορετικά μέρη του σιταριού (12), δεν μπορεί να υπολογισθεί από αυτή την υπόθεση. Μπορεί να οφείλεται στο ότι άλλοι παράγοντες, όπως η παρουσία δεσμών ανθεκτικών στα ένζυμα και η ιδιαίτερα αργή απορρόφηση, μειώνουν τη διαθεσιμότητα ορισμένων αμινοξέων στα δημητριακά. Εντούτοις, η ανάλογη σημασία αυτών των παραγόντων είναι κατά ένα μεγάλο μέρος άγνωστη. Υπάρχει μια διαφορά μεταξύ των σιταριών αναφορικά με την πεπτικότητα του αζώτου (N) σε σχέση με τα περισσότερα αμινοξέα. Η πεπτικότητα του N στο σιτάρι είναι μεγαλύτερη από το μέσο όρο στα αμινοξέα, αλλά στο κριθάρι, τον αραβόσιτο και ιδιαίτερα το σόργο, το N είναι λιγότερο εύπεπτο από ότι στα περισσότερα αμινοξέα. Αυτή η επίδραση μπορεί να αφορά την ιδιαίτερα χαμηλή διαλυτότητα των πρωτεϊνών στο κριθάρι, αραβόσιτο και σόργο στους οποίους το 43%, 58% και 68% του N αντίστοιχα ήταν αδιάλυτο.

**Σιτάρι.** Γενικά, φαίνεται ότι η πρωτεϊνική πεπτικότητα και η διαθεσιμότητα αμινοξέων μειώνονται όσο η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης του σιταριού μειώνεται. Μια παρόμοια σχέση

αναφέρθηκε για το κριθάρι (13), όπου βρέθηκε η αληθινή πεπτικότητα της πρωτεΐνης. Στη βρώμη και τη σίκαλη εμφανίστηκε να μειώνεται γραμμικά όσο μειωνόταν η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Αυτή η επίδραση μπορεί να εξηγηθεί από τα μεταβαλλόμενα ποσοστά των πρωτεϊνικών μερών της διαφορετικής πρωτεΐνης σε περιεχόμενο, σύνθεση και πεπτικότητα. Γενικά, όσο η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του σιταριού μειώνεται, μειώνεται επίσης το ποσοστό γλιαδίνης, αλλά τα ποσοστά της αλβουμίνης και της γλοβουλίνης αυξάνονται. Η γλιαδίνη εμφανίζεται άφθονη στο αλεύρι σιταριού, ενώ η αλβουμίνη και η γλοβουλίνη εμφανίζονται πιο άφθονες στο υπόλοιπο του σιταριού. Η λυσίνη ήταν σχετικά λιγότερο διαθέσιμη.

Επομένως, καθώς το ποσοστό γλιαδίνης στο σιτάρι μειώνεται, η αναλογία στα μέρη του σιταριού πιθανώς αυξάνεται, και η γενική πρωτεϊνική πεπτικότητα και η διαθεσιμότητα αμινοξέων μειώνεται.

**Σόργο.** Ο μέσος όρος της διαθεσιμότητας των αμινοξέων στο σόργο είναι γενικά από τις υψηλότερες σε σχέση με τα άλλα δημητριακά. Το λιγότερο διαθέσιμο αμινοξύ είναι η λυσίνη 0-88mg. Η διαθεσιμότητα της θρεονίνης κυμαίνεται γύρω στο 0.91mg (14).

**Αραβόσιτος.** Τα αμινοξέα στον αραβόσιτο έχουν βρεθεί γενικά να είναι πιο διαθέσιμα σε σχέση με τα άλλα δημητριακά. Μετά από πειράματα παρατηρήθηκε ότι η μέση διαθεσιμότητα των αμινοξέων, και συγκεκριμένα της λυσίνης, ήταν σε μικρή διαθεσιμότητα, σχετικά με τα άλλα δημητριακά συμπεριλαμβανομένου του σόργου (13).

Αν και η πρωτεΐνη του αραβόσιτου είναι σχετικά χαμηλή σε τρυπτοφάνη, η οποία έχει βρεθεί ότι περιορίζει τον ρυθμό ανάπτυξης των ζώων, υπάρχουν κάποιες εκτιμήσεις της διαθεσιμότητας της τρυπτοφάνης στον αραβόσιτο και άλλα δημητριακά. Αυτό συμβαίνει λόγω της καταστροφής της τρυπτοφάνης κατά τη διάρκεια της συνηθισμένης όξινης υδρόλυσης των πρωτεϊνών για την ανάλυση των αμινοξέων. Σε ένα πείραμα που έγινε διαπιστώθηκε ότι η διαθεσιμότητα της τρυπτοφάνης στον αραβόσιτο ήταν 0,88mg ποσότητα μικρότερη από τη μέση τιμή της περιεκτικότητας της τρυπτοφάνης, και μαζί με τη λυσίνη, τη θρεονίνη και τη βαλίνη, ήταν ένα από τα λιγότερο διαθέσιμα αμινοξέα στον αραβόσιτο (15).

**Κριθάρι.** Μετά από πειράματα διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα περιείχαν περισσότερες αλβουμίνες και γλοβουλίνες και λιγότερη γλουτένη και αδιάλυτες πρωτεΐνες. Επίσης βρέθηκαν υψηλά ποσοστά λυσίνης, ενώ το γλουταμινικό οξύ ήταν χαμηλό.

Προκύπτει, μετά από πειράματα που έγιναν, ότι μέσα σε κάθε δημητριακό υπήρχαν διαφορές στη διαθεσιμότητα μεταξύ των αμινοξέων που συχνά υπερέβη το 0,10mg. Συνήθως τα πιο διαθέσιμα αμινοξέα είναι η μεθειονίνη, η αργινίνη και το γλουταμινικό οξύ ενώ τα λιγότερο διαθέσιμα αμινοξέα είναι η λυσίνη, η θρεονίνη και το ασπαρτικό οξύ. Σε διάφορες μελέτες που έγιναν σημειώθηκε ότι οι παραλλαγές στη διαθεσιμότητα αμινοξέων μέσα στα είδη των δημητριακών μπορεί να οφείλεται στην περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη (16).

### 3.6 Διαφορές σε ορισμένα δημητριακά

Ορισμένες συγκομιδές, π.χ., ο αραβόσιτος, το σόργο, και η βρώμη, απαιτούν την εξειδικευμένη αναλυτική επεξεργασία λόγω του περιεχομένου ελαίου και χρωστικών ουσιών υψηλότερου απ' ό,τι σε κάποια άλλα δημητριακά. Στην περίπτωση του αραβόσιτου, το έλαιο



παρεμποδίζει ορισμένες διαδικασίες εξαγωγής και μπορεί επίσης να προκαλέσει υπερβολικό άφρισμα, π.χ., κατά τη διάρκεια ενός βήματος της ανάλυσης kjeldahl, σε σύγκριση με το σόργο ή τη βρώμη. Οποιοσδήποτε παρούσες χρωστικές ουσίες αποτελούν μια πηγή λάθους σε ορισμένες χρωματομετρικές δοκιμές. Οι περισσότερες από αυτές τις παρεμβολές μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με την απομάκρυνση των χρωστικών με έναν μη πολικό διαλύτη.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι απαραίτητο να αποθηκευτούν τα δείγματα πριν από την ανάλυση. Κάποια δείγματα είναι περισσότερο ανθεκτικά, όπως το σιτάρι ή το κριθάρι, από κάποια άλλα λιγότερο, όπως είναι το καλαμπόκι. Η κακή αποθήκευση, ειδικά σε υψηλή θερμοκρασία και υγρασία, μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια πολύτιμου γενετικού υλικού μέσω των χημικών και βιολογικών αλλαγών. Η επιδείνωση από τα βακτηρίδια, τους μύκητες, και τα έντομα πρέπει επίσης να αποτραπεί. Ο αποδοτικός αερισμός είναι απαραίτητος για την παρατεταμένη αποθήκευση οποιουδήποτε φυτικού ιστού, καθώς επίσης και η ψύξη, ακόμα κι αν είναι μερική, (π.χ., σε 15° C), συστήνεται όποτε είναι δυνατόν (17).

### 3.7 Επίδραση των μεταλλάξεων στην περιεκτικότητα αμινοξέων σε διάφορα υβρίδια αραβόσιτου

Για την ανθρώπινη διατροφή η κύρια πηγή φυτικών πρωτεϊνών είναι οι σπόροι, από δημητριακά και όσπρια. Το περιεχόμενο των συνολικών διαλυτών αμινοξέων στο ώριμο ενδοσπέρμιο άγριου τύπου και αλεύρων αραβόσιτου εξαρτάται από τις μεταλλάξεις οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με χρωματογραφία HPLC και TLC.

Σε κάποια πειράματα μεταλλάξεων αραβόσιτου βρέθηκε ότι η συνολική συγκέντρωση των διαλυτών αμινοξέων σε σχέση με τις μεταλλάξεις ποικίλει ανάλογα με τη μετάλλαξη. Οι μεταλλάξεις στα o11 και o13 γονίδια, οδηγούν σε υψηλότερο περιεχόμενο διαλυτών αμινοξέων, ενώ στα γονίδια o10, f13 και f11 οδηγούν σε χαμηλότερο. Γενικά, οι μεταλλάξεις έχουν παρόμοιες συγκεντρώσεις συνολικών διαλυτών αμινοξέων συγκρινόμενες με αυτές του άγριου-τύπου, με εξαίρεση τις μεταλλάξεις o11 και f11. Η o11 μετάλλαξη οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών διαλυτών αμινοξέων όταν συγκριθεί με το αντίστοιχο υβρίδιο W22. Η f11 μετάλλαξη οδηγεί σε χαμηλότερη συγκέντρωση όταν συγκρίνεται με το αντίστοιχο υβρίδιο Oh43.

Για την μεθειονίνη, οι μεταλλάξεις o2 και o11 καθώς επίσης και το υβρίδιο Oh43 έχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτού του αμινοξέος. Σημαντικές διαφορές δεν παρατηρούνται μεταξύ των μεταλλάξεων για άλλα αμινοξέα όπως η λυσίνη και η θρεονίνη. Οι υψηλές συγκεντρώσεις λυσίνης που λαμβάνονται αρχικά για αυτές τις μεταλλάξεις μπορεί να οφείλονται σε αμινοξέα που ενσωματώνονται στις αποθηκευτικές πρωτεΐνες, αλλά όχι σε αυτές που είναι σε διαλυτή μορφή (18).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

#### 4.1 Γενικά για τη χρωματογραφία

Ο όρος *χρωματογραφία* αποδίδεται σε μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων, οι οποίες βοηθούν τον επιστήμονα να διαχωρίσει ουσίες με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα. Πολλοί από τους διαχωρισμούς αυτούς είναι αδύνατον να πραγματοποιηθούν με άλλο τρόπο. Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα κινείται σε μια *κινητή φάση*, η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Στη συνέχεια, η κινητή φάση εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας *στατικής φάσης*, η οποία είναι καθηλωμένη σε στήλη ή σε μια στερεά επιφάνεια. Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες, όπου στη συνέχεια τα συστατικά αυτά μπορούν να προσδιορισθούν ποιοτικά ή ποσοτικά (19).

Οι περισσότερες διαδικασίες για την ανάλυση αμινοξέος εξαρτώνται από τη χρήση της χρωματογραφίας. Η τεχνική της χρωματογραφίας χάρτου που χρησιμοποιήθηκε αρχικά καθώς επίσης και άλλες ημιποσοτικές τεχνικές έδωσαν πολλές πληροφορίες για την σύνθεση και το μεταβολισμό ενός αμινοξέος. Αυτές οι τεχνικές έχουν αντικατασταθεί, σχεδόν όλες, από τεχνικές στηλών, αν και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδος έχει ακόμη ορισμένες εφαρμογές. Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων χρησιμοποιεί την τεχνική της παραγοντοποίησης μετά τη στήλη, όπου τα αμινοξέα διαχωρίζονται με τη βοήθεια της ιοντοανταλλαγής, και τα παράγωγα σχηματίζονται μετά τη στήλη έτσι ώστε να μπορούν να ανιχνευθούν. Η πιο κοινή διαδικασία παραγοντοποίησης είναι αυτή που χρησιμοποιεί ως αντιδραστήριο τη νινυδρίνη και μετρά τα παράγωγα με προσδιορισμό της οπτικής πυκνότητας. Αντίθετα, η παραγοντοποίηση πριν από τη στήλη, όπως χρησιμοποιείται στην αέρια χρωματογραφία και την υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC), χρησιμοποιεί στήλες για να διαχωρίσει τα παράγωγα των αμινοξέων.

Αυτά τα παράγωγα που θα προκύψουν από τη στήλη, ανιχνεύονται από τους διάφορους ανιχνευτές.

Οι τεχνικές GLC και HPLC είναι συχνά γρηγορότερες από την τεχνική της ανταλλαγής ιόντων, αλλά οι σημαντικοί περιορισμοί τους βρίσκονται συχνά στην προετοιμασία των παραγώγων παρά στις καθαυτού τεχνικές (17).

#### 4.1.1 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι η πιο διαδεδομένη απ' όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Οι λόγοι αυτής της αποδοχής της τεχνικής είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητα της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως, η εφαρμοσιμότητά της σε προσδιορισμούς ουσιών πρωτίστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, το δημόσιο και πολλά επιστημονικά πεδία. Χαρακτηρίζεται από μία μακριά στήλη γεμάτη με υλικό υπό μορφή πολύ λεπτής σκόνης με τεμαχίδια σφαιρικού σχήματος, η οποία εκλούεται με υγρό υπό πολύ υψηλή πίεση και διαθέτει διάταξη συνεχούς ελέγχου και καταγραφής του εκλούσματος (19).

#### 4.1.2 Αέρια χρωματογραφία

Στην αέρια χρωματογραφία το δείγμα εξατμίζεται και εγχέεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης. Η έκλουση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους χρωματογραφίας, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλυτή. Ο μόνος της ρόλος είναι η διακίνηση του αναλυτή κατά μήκος της στήλης. Υπάρχουν δύο τύποι αερίου χρωματογραφίας: η χρωματογραφία αερίου-στερεού και η χρωματογραφία αερίου-υγρού.

Η χρωματογραφία αερίου-υγρού χρησιμοποιείται ευρύτατα σε όλους τους κλάδους των θετικών επιστημών. Η χρωματογραφία αερίου-υγρού βασίζεται στη κατανομή του αναλυτή μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού. Για να εκτιμηθεί η σημασία της χρωματογραφίας αερίου-υγρού, θα πρέπει να διακρίνουμε τους δύο διαφορετικούς ρόλους που παίζει. Ο πρώτος είναι εκείνος ενός εργαλείου, που εκτελεί διαχωρισμούς. Ως προς τον ρόλο αυτόν η μέθοδος είναι πολύ καλή, ιδιαίτερα όταν εφαρμόζεται σε πολύπλοκα οργανικά, οργανομεταλλικά και βιοχημικά συστήματα αποτελούμενα από πτητικές ουσίες ή ουσίες οι οποίες μπορούν να μετατραπούν σε πτητικά παράγωγα. Ο δεύτερος ρόλος είναι διαφορετικός και είναι εκείνος ενός μέσου με το οποίο πραγματοποιείται μια ολοκληρωμένη ανάλυση. Οι χρόνοι και οι όγκοι συγκράτησης χρησιμοποιούνται για ποιοτική ταυτοποίηση, ενώ τα ύψη κορυφών ή τα εμβαδά τους παρέχουν την ποσοτική πληροφορία.

Η χρωματογραφία αερίου-στερεού βασίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης, όπου η συγκράτηση των αναλυτών είναι αποτέλεσμα φυσικής προσρόφησης. Οι εφαρμογές της χρωματογραφίας αερίου-στερεού είναι περιορισμένες λόγω της σχεδόν μόνιμης συγκράτησης δραστικών ή πολικών μορίων και της έντονης εμφάνισης ουράς στις κορυφές έκλουσης. Για το λόγο αυτό, η τεχνική αυτή δεν χρησιμοποιείται συχνά εκτός από τις περιπτώσεις διαχωρισμών

ορισμένων αερίων χαμηλού μοριακού βάρους. Η μέθοδος αυτή έχει την προοπτική μιας ταχύτερης παραγωγής και μιας σχετικά χαμηλής κύριας δαπάνης για τον εξοπλισμό (19).

#### 4.1.3 Χρωματογραφία κατανομής

Η χρωματογραφία κατανομής είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος τύπος από τους τέσσερις τύπους υγρής χρωματογραφίας. Στο παρελθόν, οι περισσότερες εφαρμογές πραγματοποιήθηκαν σε μη ιοντικές πολικές ενώσεις χαμηλού έως μέτριου μοριακού βάρους (συνήθως <3000). Πρόσφατα όμως, αναπτύχθηκαν μέθοδοι (τροποποίηση και σχηματισμός ζευγών ιόντων), οι οποίες διεύρυναν το πεδίο των διαχωρισμών κατανομής και σε ιοντικές ενώσεις. Η χρωματογραφία κατανομής διαιρείται στη χρωματογραφία υγρού-υγρού και στη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης. Οι δύο τεχνικές διαφέρουν ως προς τον τρόπο με τον οποίο η στατική φάση αλληλεπιδρά με το υλικό στήριξης. Στη χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού, η υγρή στατική φάση κατακρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με φυσική προσρόφηση. Στη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης, η στατική φάση δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια του υλικού στήριξης. Η μέθοδος συνδεδεμένης φάσης υπερισχύει, λόγω ορισμένων μειονεκτημάτων στα συστήματα χρωματογραφίας κατανομής υγρού-υγρού. Ένα από τα μειονεκτήματα αυτά είναι η απώλεια της στατικής φάσης λόγω διάλυσής της στην κινητή φάση και η ανάγκη περιοδικής επανεπίστρωσης (επαναφόρτισης) των σωματιδίων του υλικού στήριξης. Επιπλέον, τα προβλήματα διάλυσης της στατικής φάσης δεν επιτρέπουν τη χρήση υλικών πλήρωσης υγρής φάσης για βαθμιδωτή έκλυση.

Από τις μεθόδους HPLC, η χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για την ανάλυση πρωτεϊνών στα φυτά. Η αναλυτική της ικανότητα είναι ίση ή υπερβαίνει αυτή των περισσότερων αναλυτικών μεθόδων. Είναι επίσης γρήγορη, μπορεί να αναπαραχθεί, ευαίσθητη και ποσοτικά προσδιορίσιμη (19).

#### 4.1.4 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (S.E.C.)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών είναι μια τεχνική ιδιαίτερα εφαρμόσιμη σε ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Τα υλικά πλήρωσης, για τη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελούνται από μικρά (περίπου 10μm) σωματίδια σίλικας ή πολυμερούς, που περιέχουν ένα δίκτυο ομοιόμορφων πόρων, μέσα από τους οποίους μπορούν να διαχέονται τα μόρια του διαλύτη και των διαλυμένων σωματιδίων. Όσο βρίσκονται στους πόρους, τα μόρια είναι πρακτικώς παγιδευμένα και απομακρύνονται με το ρεύμα ροής της κινητής φάσης. Μόρια, τα οποία είναι μεγαλύτερα από το μέσο μέγεθος των πόρων του υλικού πλήρωσης, αποβάλλονται και δεν υφίστανται καμία συγκράτηση. Τα μόρια αυτά εκλύονται πρώτα από τη στήλη. Μόρια με διάμετρο σημαντικά μικρότερη από τους πόρους μπορούν να διεισδύσουν ή να διαπεράσουν στο λαβυρινθώδες περιβάλλον τους και έτσι παγιδεύονται για μεγαλύτερο χρόνο. Τα μόρια αυτά εκλύονται τελευταία από τη στήλη. Μεταξύ αυτών των δύο περιπτώσεων υπάρχουν μόρια ενδιάμεσου μεγέθους, των οποίων ο μέσος όρος διείσδυσης στους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης εξαρτάται από τη διάμετρό τους. Η ομάδα των μορίων αυτών υφίσταται κλασμάτωση, η οποία σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των μορίων και εν μέρει με το σχήμα τους. Σε αυτή την

μέθοδο χρωματογραφίας δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ αναλυτή και στατικής φάσης. Αντίθετα, καταβάλλεται προσπάθεια αποφυγής τέτοιων αλληλεπιδράσεων, επειδή οδηγούν σε μείωση των αποδόσεων. Τέλος, υπάρχει ένα ανώτατο όριο χρόνου συγκράτησης, επειδή καμία ουσία δεν παραμένει στη στήλη περισσότερο από αυτές που διαπερνούν πλήρως τους πόρους της στατικής φάσης.

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ήταν η πρώτη των μεθόδων HPLC που δοκιμάστηκε. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών σιταριού στις στήλες τύπου TSK ήταν γρήγορος, ευαίσθητος, αναπαραγωγίμος και ποσοτικός. Τα μοριακά βάρη που υπολογίσθηκαν μ' αυτό τον τρόπο συμφωνούν με εκείνα από άλλες μεθόδους. Αυτή η χρωματογραφία μπορεί να παρέχει γρήγορες, απλές, και ακριβείς μετρήσεις για τον έλεγχο διαφόρων ποιοτήτων π.χ. άλευρα αρτοποιίας με ή χωρίς περιοριστικά παράγωγα. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για τον καθορισμό των μοριακών βαρών των ανασταλτικών παραγόντων και για τον έλεγχο της αλλαγής του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών σιταριού κατά τη διάρκεια της βλάστησης (7, 19).

#### 4.1.5 Χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής

Η χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής κατατάσσεται στις σύγχρονες και αποδοτικές τεχνικές διαχωρισμού και προσδιορισμού ιόντων, που βασίζονται σε ιονανταλλακτικές ρητίνες. Πριν από την εμφάνιση του HPLC, η χρωματογραφία ιοντικής ανταλλαγής (IEC) σε στήλες κυτταρίνης, παρείχε συχνά τους καλύτερους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς των πρωτεϊνών των δημητριακών. Η χρήση στηλών πυριτίου για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, πράγμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι διαχωρισμοί στην κυτταρίνη οφείλονταν και σε άλλους παράγοντες εκτός από τη σύσταση ή ότι οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πάρα πολύ αδύνατες ως ιοντικοί εναλλάκτες για να δεσμεύσουν αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες. Επιπρόσθετα, η άποψη ότι οι πρωτεΐνες μπορεί να δεσμεύονται από το πυρίτιο δεν φαίνεται να ευσταθεί δεδομένου ότι τέτοια σύνδεση δεν έχει παρατηρηθεί στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ή στη χρωματογραφία φάσης.

Την τελευταία δεκαετία έχει επιτευχθεί η δυνατότητα διαχωρισμού των πρωτεϊνών των δημητριακών με πολύ καλά αποτελέσματα με τη χρήση της στήλης Mono-Q (7).

#### 4.1.6 Χρωματογραφία λεπτής-στιβάδας

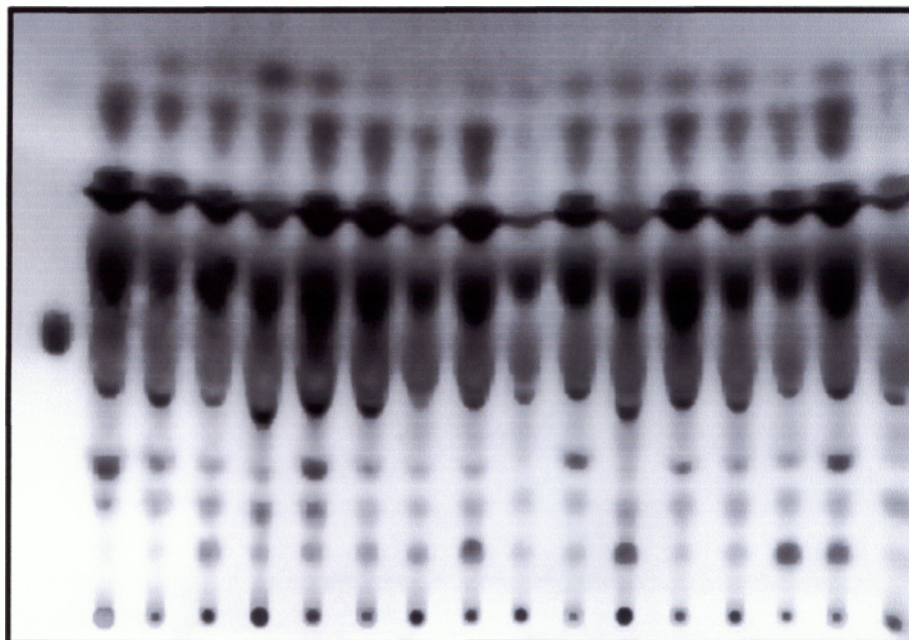
Μια σημαντική χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας είναι, ότι αποτελεί έναν οδηγό εύρεσης βέλτιστων συνθηκών για την εκτέλεση διαχωρισμών με την υγρή χρωματογραφία στήλης. Μερικοί ερευνητές μάλιστα υποστηρίζουν, ότι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας πρέπει να προηγείται των άλλων χρωματογραφικών τεχνικών.

Εκτός από τη χρησιμότητά της για την υποστήριξη των χρωματογραφικών μεθόδων με στήλη, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας αποτελεί και την πιο σημαντική μέθοδο ελέγχου της καθαρότητας προϊόντων της βιομηχανίας φαρμάκων. Επίσης, αποτελεί τη βάση πολλών βιοχημικών και βιολογικών μελετών, καθώς επίσης και μελετών σε βιομηχανικά εργαστήρια. Λόγω των πολλών εφαρμογών της έχει εκτιμηθεί ότι ο αριθμός των αναλύσεων, που γίνονται με

τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, είναι τουλάχιστον ίσος με τον αριθμό αναλύσεων που γίνονται με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (19).

Λόγω της υψηλής δαπάνης του σύγχρονου εξοπλισμού της χρωματογραφίας με ανταλλαγή ιόντων, τα αμινοξέα συχνά διαχωρίζονται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Οι TLC τεχνικές είναι χαμηλού κόστους αν και η κατεργασία κάθε πλάκας μπορεί να είναι μεγάλη, πολλές πλάκες μπορούν να παραχθούν συγχρόνως. Ως εκ τούτου, η παραγωγή μπορεί να είναι αρκετά σημαντική. Η τεχνική έχει βελτιωθεί σε τέτοιο επίπεδο ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί και σε πρωτεϊνικά προϊόντα υδρόλυσης. Τα αποτελέσματα συμφωνούν απολύτως με τις τιμές που λαμβάνονται από τη χρωματογραφία με ανταλλαγή ιόντων (17).

Στη συνέχεια δίνεται ένα χρωματογράφημα λεπτής στιβάδας σε δείγματα προερχόμενα από επεξεργασία διαφόρων τύπων αραβόσιτου (άγρια υβρίδια και μεταλλαγμένα) με έμφαση στον προσδιορισμό της λυσίνης.



Lys (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16)

Σχήμα 7: Χρωματογράφημα λεπτής στιβάδας αμινοξέων προερχόμενων από άγρια υβρίδια αραβόσιτου και μεταλλαγμένα με έμφαση στον προσδιορισμό της λυσίνης.  
(1) N6 ESALQ, (2) W22, (3) Oh43, (4) WT3, (5) B79, (6) B37, (7) o1, (8) o2, (9) o5, (10) o7, (11) o10, (12) o11, (13) o13, (14) fl1, (15) fl2, (16) fl3

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### 5.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Για την ανάλυση αμινοξέων απαιτείται η παραγοντοποίηση πριν από τη στήλη. Ως αντιδραστήριο παραγοντοποίησης χρησιμοποιείται το dansyl chloride δημιουργώντας παράγωγα τα οποία φθορίζουν. Τα παράγωγα που σχηματίζονται διαχωρίζονται στη συνέχεια με τη βοήθεια κατάλληλης αναλυτικής στήλης και ανιχνεύονται από έναν ανιχνευτή φθορισμού με όριο ανίχνευσης της τάξης των picogram. (5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl chloride).

Ως υλικό πλήρωσης της στήλης χρησιμοποιείται  $\text{SiO}_2$  διασυνδεδεμένο με μη πολικές ομάδες υδρογονανθράκων ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιείται μίγμα ακετονιτριλίου/νερού.

Έχει αποδειχθεί ότι το HPLC, που χρησιμοποιεί διάφορες μη πολικές στατικές φάσεις, είναι ανώτερο από τη χρωματογραφία με εναλλαγή ιόντων για το διαχωρισμό των πεπτιδίων. Εντούτοις, λόγω των περιορισμών στο διαχωρισμό των πολικών αμινοξέων, η ιονοανταλλαγή είναι κατώτερη για τις μελέτες πρωτεϊνικής σύνθεσης. Οι διαδικασίες μπορούν να είναι εξαιρετικά γρήγορες και ευαίσθητες. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της HPLC βρίσκεται στη δυνατότητά της να διακρίνει τις μορφές των D και L αμινοξέων. Επομένως, για ορισμένους ερευνητικούς λόγους, η χρήση της είναι ουσιαστική.

Η χρωματογραφία με ανταλλαγή ιόντων, παραμένει η πιο χρησιμοποιημένη μέθοδος ανάλυσης αμινοξέων. Με τις πρόσφατες προόδους, όπως η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων λιθίου αντί νατρίου, η δυνατότητα εφαρμογής υψηλότερων πιέσεων, η χρήση στενότερων στηλών με λεπτά σφαιρικά μόρια ρητίνης, και η χρήση του fluorescamine που αντικατέστησε τη νινυδρίνη, τα νέα όργανα θα μπορούν να οδηγήσουν σε καλούς διαχωρισμούς των κοινών αμινοξέων σε ποσότητες picogram σε δύο ώρες ή λιγότερο.

Είναι απαραίτητο να εισαχθούν εσωτερικά πρότυπα σε κάθε προϊόν υδρόλυσης πρωτεϊνών για να ελεγχθεί η δραστηριότητα των διαλυμάτων της νινυδρίνης. Η norleucine είναι ένα τέτοιο κατάλληλο αντιδραστήριο. Μια εναλλακτική λύση αντί της εισαγωγής εσωτερικών προτύπων, είναι ο υπολογισμός του μεγίστου των κορυφών προτύπων αμινοξέων κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης κάθε τρεις ή τέσσερις αναλύσεις. Ο υπολογισμός των μεγίστων κορυφών μπορεί επίσης να αντικατασταθεί με την ολοκλήρωση των κορυφών. Σε κάθε περίπτωση η μεθοδολογία της ανάλυσης παρέχεται από τους κατασκευαστές του εξοπλισμού (17).

### 5.2 HPLC στην πρωτεϊνική ανάλυση

Μεταξύ των διάφορων τεχνικών πρωτεϊνικής χημείας, οι δύο που έχουν ωφεληθεί από την HPLC είναι ο διαχωρισμός και ο καθαρισμός των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών, και η ανάλυση των αμινοξέων. Η έμφαση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας έχει μετατοπισθεί από τον πλήρη προσδιορισμό της ακολουθίας στην αλληλουχία ενζυματικών ή χημικά παραγόμενων τμημάτων

προκειμένου να προετοιμαστούν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια για την απομόνωση cDNAs για την επόμενη νουκλεϊκή αλληλουχία (20).

### 5.3 Στόχοι των διαχωρισμών με HPLC

Οι πρωτεΐνες επηρεάζουν τη λειτουργική και τη θρεπτική ποιότητα των δημητριακών, που καθιστούν την απομόνωση και το χαρακτηρισμό τους σημαντικό για την αναπαραγωγή, εμπορία και χρησιμοποίηση. Πολυάριθμες μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για τον καθαρισμό αυτών των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια των προηγούμενων δύο δεκαετιών. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), είναι ικανή να αναλύσει τις πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους και δίνει στον χημικό που κάνει τις έρευνες, ακόμα ένα εργαλείο. Για ουσίες με μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 10.000, χρησιμοποιείται συχνά η υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού αν και σήμερα είναι δυνατόν τέτοιες ενώσεις να προσδιορίζονται με χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης. Για ιοντικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους χρησιμοποιείται ευρέως η χρωματογραφία ιονανταλλαγής. Η HPLC έχει αποδειχθεί έγκυρη και προτιμάται για πολλές αναλύσεις (7).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### 6.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα είναι απαραίτητο για την ανάλυση έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σωστά. Η επιλογή των αντιπροσωπευτικών δειγμάτων είναι η σημαντικότερη για τον προσδιορισμό των αμινοξέων επειδή τα δείγματα μπορεί να είναι μικρά και ανομοιογενή για την αξιολόγηση της πρωτεϊνικής ποιότητας. Το δείγμα πρέπει να είναι όχι μόνο αντιπροσωπευτικό αλλά και ομοιογενές (21-23).

### 6.2 Αντιδραστήρια

#### 6.2.1 Η νινυδρίνη, η fluorescamine, και η o- phthalaldehyde (OPA).

Η νινυδρίνη είναι ένα αντιδραστήριο ανίχνευσης των αμινοξέων που είναι ευρέως γνωστό αλλά αφενός δεν έχει υψηλή ευαισθησία (50-100 pmol ποσοτικά) αφετέρου δεν είναι σταθερό. Ακόμα και όταν εφαρμοσθούν ειδικές προφυλάξεις, όπως σκοτεινό περιβάλλον και αδρανής ατμόσφαιρα έχει περιορισμένο χρόνο ζωής.

Η fluorescamine μπορεί να αντιδράσει με τα αμινοξέα για την παραγωγή προϊόντων που φθορίζουν αυξάνοντας την ευαισθησία 10-100 φορές περισσότερο σε σχέση με τη νινυδρίνη. Αυτό το σύστημα απαιτεί δύο αντλίες, μια για το αντιδραστήριο και άλλη μια για το ρυθμιστικό. Μια τρίτη αντλία μπορεί να χρειαστεί για την προσθήκη ενός οξειδωτικού μέσου όπως το υποχλωριώδες νάτριο, το N- chlorosuccinimide ή η chloramine-T εάν τα παράγωγα των αμινοξέων πρόκειται να ανιχνευθούν.

Ένα ιδιαίτερα κατάλληλο αντιδραστήριο, έχει βρεθεί πως είναι η o- phthalaldehyde (OPA), η οποία έχει αυξημένη χρήση τα τελευταία χρόνια που οφείλεται στα υψηλά επίπεδα ανίχνευσης και στη σταθερότητά της στα υδατικά διαλύματα. Επίσης και σε αυτή την περίπτωση απαιτείται ένα σύστημα δύο αντλιών εάν επιδιώκεται η ανίχνευση των αμινοξέων και εάν το οξειδωτικό, συνήθως υποχλωριώδες νάτριο, προστίθεται συνεχώς στη χρωματογραφική στήλη. Προσοχή πρέπει να δοθεί στη βαθμονόμηση του συστήματος δεδομένου ότι μερικά αμινοξέα μπορούν να παρεκκλίνουν από τη γραμμικότητα όπως στην περίπτωση της Lys, ακόμα και με την παρουσία του Brij 35 που είναι γνωστή για να σταθεροποιεί και να ενισχύει την ανίχνευση της Lys. Το OPA όπως και η νινυδρίνη εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία στην οξείδωση από τον αέρα (20).

### 6.3 Μέθοδοι εξαγωγής πρωτεϊνών από τα δημητριακά

Πολυάριθμοι διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί για να εξάγουν τις πρωτεΐνες δημητριακών με το HPLC. Οι περισσότεροι είναι κατάλληλοι, αλλά εάν εφαρμόζονται δείγματα μεγάλου όγκου, ιδιαίτερα υδροφοβικοί διαλύτες μπορούν να αναγκάσουν τις πρωτεΐνες να διαχωριστούν με εκχύλιση πριν από την έναρξη της κλίσης. Οι αλβουμίνες και οι γλοβουλίνες μπορούν να

εξαχθούν με νερό ή με αραιά διαλύματα αλάτων.

Επίσης χρησιμοποιείται 70% υδατικό διάλυμα αιθανόλης, 55% προπανόλη-2, λακτικό αργίλιο pH=3,1, (lactate αργιλίου), 2M ουρίας και 2M διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) για την εξαγωγή της γλιαδίνης του σιταριού. Όλοι είναι κατάλληλοι, αλλά η ουρία και το DMF εξάγουν επίσης και κάποια ποσότητα γλουτένης κάνοντας την ανάλυση φτωχότερη. Τέλος κατά τη διαδικασία της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης χρησιμοποιείται διάλυμα 70% αιθανόλης για την εξαγωγή της γλιαδίνης.

Κατεργασία του δείγματος με NaCl δεν απαιτείται, δεδομένου ότι τα ποσά αλβουμινών και γλοβουλινών είναι χαμηλά και τα περισσότερα διαχωρίζονται με εκχύλιση νωρίτερα από την γλιαδίνη. Η απολίπανση δεν ήταν επίσης απαραίτητη σε μια καλά καθορισμένη διεργασία. Τα μέσα εξαγωγής πρέπει να εφαρμόζονται με βάση την πρωτεΐνη που πρέπει να εξαχθεί. Τέλος η εναλλαγή των μέσων εξαγωγής μπορεί να οδηγήσει σε αποκάλυψη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Είναι μερικές φορές επιθυμητό να εξαχθούν οι πρωτεΐνες δημητριακών με διαλύματα αλκοόλης που περιέχουν περιοριστικούς παράγοντες. Αυτό μπορεί να δώσει πιο σύνθετα αποτελέσματα.

Αν και το DMSO μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως μέσο εξαγωγής των πρωτεϊνών από τα δημητριακά μπορεί να εξαγει ταυτόχρονα και άμυλο οδηγώντας σε προβλήματα στη συνέχεια της ανάλυσης.

Οι πρωτεΐνες του αραβόσιτου και του σόργου μπορούν να εξαχθούν με αλκοόλη, εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα διάλυμα αλκοόλης με έναν περιοριστικό παράγοντα επιτρέποντας την ταυτόχρονη εξαγωγή και τον προσδιορισμό όλων των διαλυτών πρωτεϊνών. Οι προλαμίνες από τη βρώμη και το ρύζι εξάγονται άμεσα με χρήση αλκοόλης και τα παραγόμενα δείγματα χρησιμοποιούνται στη συνέχεια σε διάφορους προσδιορισμούς.

Στην περίπτωση της εξαγωγής των πρωτεϊνών από σόγια για εφαρμογή της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RPC) χρησιμοποιείται ως μέσο εξαγωγής tris-buffer σε pH=7,5 στο οποίο έχει προστεθεί διάλυμα ουρίας 8M και DTT, και οι εξαγόμενες πρωτεΐνες αλκυλοποιούνται με ιωδιούχο οξικό οξύ ή με 4-βινυλοπυρμιδίνη. Αν και ο διαχωρισμός των μη αλκυλοποιημένων πρωτεϊνών είναι παρόμοιος με αυτόν των αλκυλοποιημένων η διαλυτοποίησή τους έχει ενισχυθεί με την προσθήκη SDS στην κινητή φάση. Έχει διαπιστωθεί ότι η οξόνιση των δειγμάτων σταθεροποιεί τις γλουτενικές υπομονάδες.

Στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους, οι πρωτεΐνες μπορούν να εξαχθούν με ένα διάλυμα SDS το οποίο περιέχει ένα ρυθμιστικό παρόμοιο με αυτό της κινητής φάσης. Συνήθως η συγκέντρωση του διαλύματος SDS αυξάνεται σε 1-2% και το δείγμα θερμαίνεται για να εξασφαλίσει μια ολοκληρωμένη σύνδεση με την πρωτεΐνη. Τα δείγματα μπορούν επίσης να εξαχθούν και με άλλους διαλύτες και να εφαρμοστούν άμεσα, με μικρούς όγκους για τη SEC με ένα διάλυμα SDS που περιέχεται στη κινητή φάση.

Αν και οι πρωτεΐνες μπορούν να συσσωματωθούν κατά τη διαδικασία της λιοφιλίωσης (για παράδειγμα, αραβόσιτος που προετοιμάστηκε με λιοφιλίωση) έδωσε φτωχά αποτελέσματα, αυτό το πρόβλημα μπορεί να αντιμετωπισθεί. Παρόλα αυτά η χρήση μιας υψηλότερης

θερμοκρασίας οδηγεί σε διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που σχηματίστηκαν κατά την διάρκεια της λιοφιλίωσης και αποκατάστησε το διάλυμα.

Ένα ενδεχόμενο πρόβλημα στο HPLC είναι η καθίζηση της πρωτεΐνης στη στήλη. Αυτό θα μπορούσε να εμφανιστεί, παραδείγματος χάριν, εάν οι πρωτεΐνες περάσουν από το ισοηλεκτρικό τους σημείο κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης τους με την κινητή φάση ή εάν οι παράγοντες που ευνοούν τη διαλυτοποίηση των πρωτεϊνών δεν υπάρχουν στην κινητή φάση (7).

#### **6.4 Προετοιμασία δειγμάτων για την εξαγωγή λυσίνης και τρυπτοφάνης**

Στην περίπτωση του σιταριού, του κριθαριού και του ρυζιού, ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα αλέθεται, στεγνώνεται, και οδηγείται σε περαιτέρω ανάλυση. Για τις διαγνωστικές εξετάσεις, η περιεκτικότητα σε υγρασία δεν χρειάζεται να καθοριστεί εκτός αν οι ακριβείς συγκρίσεις πρόκειται να γίνουν με τα στοιχεία από άλλα εργαστήρια, ή όταν απαιτεί η δημοσίευση τέτοιων τιμών. Οι μύλοι κυκλώνων Udy ή Weber συστήνονται για τη λείανση αυτών των σπόρων. Λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε έλαια, ο αραβόσιτος, το σόργο, και οι βρώμες τείνουν να φράζουν τους μύλους αυτού του τύπου. Αυτά μπορούν να αλεστούν σε οποιοδήποτε κατάλληλο μύλο, όπως το Krups πρότυπο 75, οι μύλοι Moulinex, ή ακόμα και σε έναν χειροκίνητο μύλο. Μετά από την άλεση και πριν από την ανάλυση, το υλικό μπορεί να απολυμανθεί με διαλύτες όπως το εξάνιο ή ο πετρελαϊκός αιθέρας, μια διαδικασία που βοηθάει επίσης να αφαιρεθούν οι χρωστικές ουσίες που μπορούν να παρεμποδίσουν κάποια χρωματομετρική ανάλυση. Στη συνέχεια το δείγμα μεταφέρετε στον χρωματογράφο για την ανάλυση (24).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### 7.1 Ανάλυση και προσδιορισμός αμινοξέων

Η ανάλυση αμινοξέος είναι μια διαδικασία που καθορίζει τις ποσότητες κάθε μεμονωμένου αμινοξέος σε μια πρωτεΐνη. Υπάρχουν τέσσερα βήματα στην ανάλυση αμινοξέος:

α. Υδρόλυση

β. Παραγοντοποίηση

γ. Διαχωρισμός HPLC

δ. Ερμηνεία και υπολογισμοί αποτελεσμάτων

#### α. Υδρόλυση

Ένα χρησιμοποιούμενο εσωτερικό πρότυπο είναι η norleucine η οποία προστίθεται στο δείγμα. Δεδομένου ότι η norleucine δεν εμφανίζεται φυσικά στις πρωτεΐνες, και είναι σταθερή στην όξινη υδρόλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο. Η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου πρέπει να είναι περίπου ίση με αυτή των περισσότερων αμινοξέων του δείγματος. Το δείγμα, που περιέχει τουλάχιστον 5 nmole κάθε αμινοξέος (δηλ. 10 ug της πρωτεΐνης) μεταφέρεται σε ένα σωλήνα υδρόλυσης και ξηραίνονται υπό κενό. Ο σωλήνας τοποθετείται σε ένα φιαλίδιο που περιέχει 6 N HCl και μια μικρή ποσότητα φαινόλης και η πρωτεΐνη υδρολύεται από τους ατμούς HCl υπό κενό. Η υδρόλυση πραγματοποιείται για 65 λεπτά σε 150°C. Μετά από την υδρόλυση, το δείγμα διαλύεται σε αποσταγμένο νερό που περιέχει EDTA (για να σχηματίσει σύμπλοκα με τα ιόντα μετάλλων) και περίπου 1 nmole κάθε αμινοξέος τοποθετείται σε ένα γυάλινο δειγματοφορέα του αναλυτή. Η υδρόλυση μπορεί να έχει ποικίλα αποτελέσματα στα διαφορετικά αμινοξέα (βλ. Πίνακας 7) (25).

**Πίνακας 7**  
**Αποτελέσματα όξινης υδρόλυσης σε διάφορα αμινοξέα**

Βαλίνη & Ισολευκίνη	Οι δεσμοί δεν σπάνε εύκολα
Θρεονίνη & Σερίνη	Καταστρέφεται αργά από την όξινη υδρόλυση. Η σερίνη είναι ένας κοινός μολυσματικός παράγοντας
Μεθειονίνη	Μερικώς οξειδωμένη κατά τη διάρκεια της όξινης υδρόλυσης
Ασπαραγίνη & Γλουταμίνη	Μετατρέπεται σε ασπαραγινικό οξύ και γλουταμινικό οξύ
Τρυπτοφάνη	Καταστρέφεται εντελώς από την όξινη υδρόλυση
Κυστίνη	Καταστρέφεται από την όξινη υδρόλυση

#### α.1 Υδρόλυση πριν από τη χημική ανάλυση

Όλες οι μέθοδοι απαιτούν την προκαταρκτική επεξεργασία του υλικού δοκιμής για να υδρολύσουν τις πρωτεΐνες στα αμινοξέα. Ένα σημαντικό πρόβλημα της ανάλυσης αμινοξέων στα τρόφιμα είναι η καταστροφή των αμινοξέων κατά τη διάρκεια της όξινης υδρόλυσης. Δυστυχώς, αυτό μπορεί να είναι πολύ μεγάλο πρόβλημα για τα ουσιαστικά αμινοξέα: μεθειονίνη και κυστίνη, λυσίνη, θρεονίνη, και τρυπτοφάνη. Οι πρωτεΐνες και τα πρωτεϊνικά τρόφιμα διαφέρουν στη σύνθεσή τους με αποτέλεσμα οι “ιδανικές” υδρολυτικές διαδικασίες θα χρειάζονταν να είναι, σχεδόν, συγκεκριμένες για κάθε τρόφιμο. Τα αμινοξέα απελευθερώνονται και καταστρέφονται σε διαφορετικά ποσοστά που εξαρτώνται από τη σύνθεση του αμινοξέος και τα χαρακτηριστικά του δείγματος. Η αξιολόγηση της σύνθεσης των αμινοξέων έχει προταθεί ως η ακριβέστερη, όταν προέρχεται από πέντε χωριστές υδρολύσεις: τρεις όξινες υδρολύσεις με διαφορετική χρονική διάρκεια (συνήθως 24, 48 και 72 ώρες) μια ειδική όξινη υδρόλυση μετά από την όξινη οξείδωση για κυστεϊκό οξύ και τη μεθειονίνη, και μια υδρόλυση για τον προσδιορισμό της τρυπτοφάνης. Οι τρεις χρόνοι υδρόλυσης έχουν ως σκοπό να επιτρέψουν την επιλογή των συγκεκριμένων χρόνων υδρόλυσης για ορισμένα αμινοξέα καθώς επίσης και την επέκταση σε χρόνο μηδέν για τα ασταθέστερα αμινοξέα.

Οι χωριστές διαδικασίες για τα αμινοξέα θείου και για την τρυπτοφάνη είναι πάντα ουσιαστικές, λόγω της αστάθειας των αμινοξέων αυτών, και στις περισσότερες περιπτώσεις μια ενιαία εικοσιτετράωρη όξινη υδρόλυση μπορεί να δώσει τις επαρκείς πληροφορίες.

Μια ιδανική ανάλυση για τα προϊόντα δημητριακών θα χρησιμοποιούσε τις τιμές για τη θρεονίνη και τη σερίνη από την υδρόλυση σε χρόνο μηδέν, για την τυροσίνη μετά από 24 ώρες, για την ισολευκίνη και για την βαλίνη μετά από 72 ώρες, και τα υπόλοιπα αμινοξέα ως μέσο όρο

των τριών προσδιορισμών. Τα δείγματα εκτός από τα δημητριακά δεν θα συμπεριφέρονταν απαραίτητως κατά τρόπο παρόμοιο. Η προσοχή πρέπει να επικεντρωθεί στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων από αμινοξέα που περιέχουν θείο μετά από την οξείδωση, επειδή ορισμένα δείγματα τροφίμων μπορούν ήδη να περιέχουν τα μη διαθέσιμα οξειδωμένα αμινοξέα θείου συνεπεία των διαδικασιών που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία τους. Η διαθεσιμότητα, εντούτοις, εξαρτάται από το βαθμό οξείδωσης, της μεθειονίνης sulphoxide που είναι γενικά πλήρως διαθέσιμη ενώ η μεθειονίνη sulphone δεν είναι. Δεδομένου ότι η τρυπτοφάνη καταστρέφεται κατά τη διάρκεια της κανονικής όξινης υδρόλυσης, απαιτείται μια χωριστή αναλυτική διαδικασία, η οποία βασίζεται στην αλκαλική υδρόλυση. Η αλκαλική υδρόλυση για το διαχωρισμό της τρυπτοφάνης, της λυσίνης και της αλανίνης από τα διβασικά αμινοξέα χρησιμοποιείται συνήθως σε πολλά εργαστήρια (17).

Στη συνέχεια (§ 7.2) θα περιγραφεί μια ιδιαίτερη μέθοδος για τον προσδιορισμό της τρυπτοφάνης.

### β. Παραγοντοποίηση

Τα ελεύθερα αμινοξέα δεν μπορούν να ανιχνευθούν με HPLC εκτός αν παραγοντοποιηθούν. Η παραγοντοποίηση εκτελείται αυτόματα στη συσκευή ανάλυσης αμινοξέων με αντίδραση των ελεύθερων αμινοξέων, με το phenylisothiocyanate (PITC) για να παραχθούν τα παράγωγα αμινοξέος phenylthiocarbamyl (PTC). Αυτή η διαδικασία διαρκεί περίπου 30 λεπτά ανά δείγμα.



*Σχήμα 8: Αναλυτής αμινοξέων αποτελούμενος από σύστημα παραγοντοποίησης και σύστημα ανίχνευσης.*

Ένα τυποποιημένο δείγμα που περιέχει ένα γνωστό ποσό (500 pmol) 17 κοινών ελεύθερων αμινοξέων τοποθετείται επίσης, σε μια ξεχωριστή συσκευή ανάλυσης αμινοξέων όπου εκεί το

δείγμα διαχωρίζεται και παραγοντοποιείται. Αυτό θα χρησιμοποιηθεί για να παράγει ένα αρχείο βαθμονόμησης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει την περιεκτικότητα του δείγματος σε αμινοξύ. Μετά από την παραγοντοποίηση, ένα διάλυμα μεθανόλης που περιέχει τα PTC-αμινοξέα μεταφέρεται προσεκτικά στο σύστημα HPLC για το διαχωρισμό.

Ακολουθούν δύο πίνακες με τα αποτελέσματα των μολυσματικών παραγόντων από την παραγοντοποίηση (25).

### Πίνακας 8

**Αποτελέσματα των κοινών μολυσματικών παραγόντων κατά την παραγοντοποίηση. Όλα τα δείγματα προστέθηκαν σε 100  $\mu$ ols προϊόντων υδρόλυσης των προτύπων αμινοξέων. Συγκέντρωση των δειγμάτων αλάτων 50 mM και η συγκέντρωση των καθαρισμένων δειγμάτων 0,1% (v/v).**

Πρόσθετη ουσία	Επίδραση
Οξικό άλας αμμωνίου	Καμία αρνητική επίπτωση στα αποτελέσματα
Οξικό νάτριο	His χαμηλή, Tyr, Val, Ile, Leu, Phe και η Lys ελαφρώς χαμηλά
Οξικό τριεθυλαμμώνιο	His και Thr ελαφρώς χαμηλά
Δισανθρακικό άλας αμμωνίου	His και Tyr χαμηλά, Ile, Leu και Phe επίσης χαμηλά
Βορικό άλας νατρίου	Καμία αρνητική επίπτωση στα αποτελέσματα
Χλωριούχο νάτριο	Καμία αρνητική επίπτωση στα αποτελέσματα
Φωσφορικό άλας νατρίου	Χαμηλές και μεταβλητές παραγωγές των περισσότερων αμινοξέων
Φωσφορικό άλας τριεθυλαμμωνίου	Καμία αρνητική επίπτωση στα αποτελέσματα
TRIS	Η παραγωγή His είναι ελαφρώς χαμηλή
SDS	His και Thr ελαφρώς χαμηλές, αλλά οι παραγωγές Cys και Lys είναι καλές
Triton X100	His και Thr ελαφρώς χαμηλές, αλλά οι παραγωγές Cys και Lys είναι καλές

### Πίνακας 9

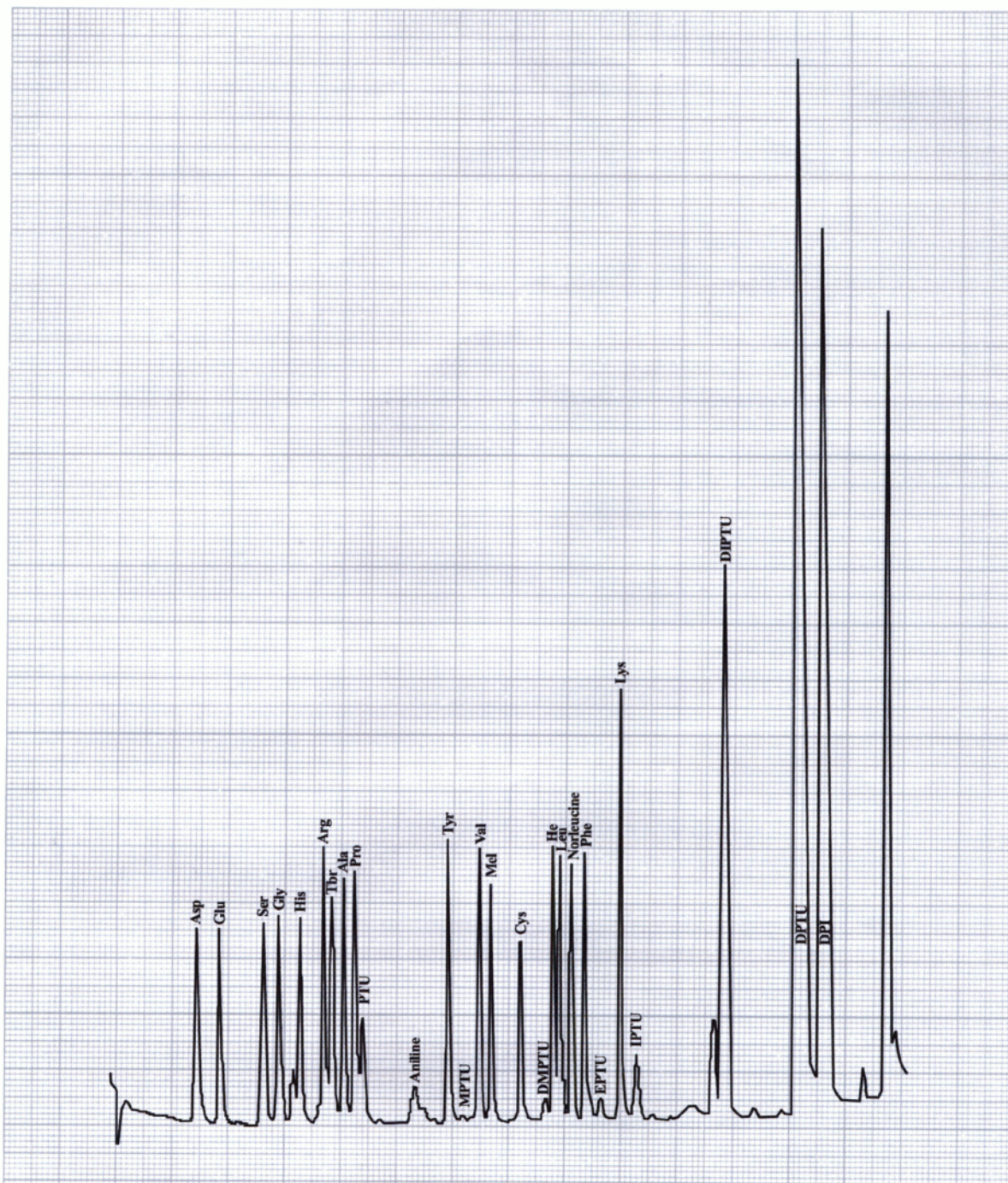
Αποτελέσματα των μολυσματικών υπολειμμάτων των παραγοντοποιημένων αμινοξέων. Όλα τα δείγματα προστέθηκαν σε 100 ppm των προϊόντων υδρόλυσης των προτύπων αμινοξέων. Συγκέντρωση των δειγμάτων 20 ppm.

Μέταλλα	Επίδραση
Αργίλιο	Asp και Glu πολύ χαμηλά, όλα τα άλλα αμινοξέα χαμηλά εκτός από το Pro
Βόριο	Κανένα σημαντικό δυσμενές αποτέλεσμα, His και Thr μπορεί να είναι χαμηλά
Χαλκός	Cys και Lys σχεδόν έχουν χαθεί, His χαμηλή, Asp και το Glu ελαφρώς χαμηλά
Σίδηρος	Glu, Ser, His, Thr, Cys, Lys όλα χαμηλά
Μόλυβδος	Asp, ser, Thr, Lys ελαφρώς χαμηλά
Νικέλιο	Σχεδόν καμία ανάκτηση οποιονδήποτε παραγώγων εκτός από Thr και Pro
Ψευδάργυρος	Όξινα και βασικά αμινοξέα και Cys πολύ χαμηλά, Ser ελαφρώς χαμηλό

#### γ. Διαχωρισμός HPLC

Τα PTC-αμινοξέα διαχωρίζονται σε μια στήλη πυριτίου C<sub>18</sub> και ανιχνεύονται σε έναν ανιχνευτή UV στα 254 nm. Η διάρκεια του διαχωρισμού είναι περίπου 25 λεπτά. Ως διαλύτης έκλουσης που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό είναι ένα ρυθμιστικό που αποτελείται από 50 mM οξικό νάτριο με pH=5,45 (ρυθμιστικό A) και 70% ακετονιτρώλιο/32mM φωσφορικό άλας με pH=6,1 (ρυθμιστικό B). Το διάλυμα έκλουσης αρχικά αποτελείται από ρυθμιστικό A και ρυθμιστικό B με μια αρχική συγκέντρωση 7% ως προς το B και ολοκληρώνεται με μια συγκέντρωση 60% ρυθμιστής B (25). Ένα παράδειγμα φαίνεται στο σχ.9.





Σχήμα 9: Χρωματογράφημα πρότυπον διαλύματος αμινοξέων.

Στήλη: C-18, 2.1 mm x 220 mm.

Διάλυμα: A: 50 mM οξικό νάτριο pH=5.45

B: 70% ακετονιτρίλιο / 32 mM οξικό νάτριο pH=6.1, 7-60%

Ροή: 300  $\mu$ l/minute

Ανίχνευση : 254 nm

#### δ. Ερμηνεία και υπολογισμοί αποτελεσμάτων

Οι χρωματογραφικές κορυφές προσδιορίζονται και ποσοτικοποιούνται χρησιμοποιώντας ένα σύστημα στοιχειακής ανάλυσης που είναι συνδεδεμένο με τον αναλυτή αμινοξέων. Χρησιμοποιείται ένα αρχείο βαθμονόμησης, που παράγεται από τις μέσες τιμές των χρόνων συγκράτησης (σε λεπτά) και των κορυφών (Au) των αμινοξέων σε 10 σειρές. Από ένα γνωστό ποσό κάθε αμινοξέος φορτώνεται επάνω στη συσκευή ανάλυσης, μαζί με έναν συντελεστή αντίδρασης (Au/ρmol) για να υπολογιστεί. Αυτός ο συντελεστής αντίδρασης χρησιμοποιείται για να υπολογίσει το ποσό αμινοξέος (σε ρmols) στο δείγμα. Το ποσό κάθε αμινοξέος στο δείγμα υπολογίζεται με τη διαίρεση της μέγιστης κορυφής για κάθε ένα (διορθώνεται για τις διαφορετικές μοριακές απορροφητικότητες των διάφορων αμινοξέων) από τα εσωτερικά πρότυπα (norleucine) στο χρωματογράφημα και τον πολλαπλασιασμό αυτού με το συνολικό ποσό εσωτερικών προτύπων που προστίθεται στο αρχικό δείγμα. Αφότου έχουν υπολογιστεί τα picogram από το ύψος της κορυφής κάθε αμινοξέος, τα στοιχεία μπορούν να επεξεργασθούν για να παράγουν πιο χρήσιμες πληροφορίες.

- Το mole% αντιπροσωπεύει το ποσό κάθε παρόντος αμινοξέος ως ποσοστό των συνολικών αμινοξέων που ανακτώνται στο δείγμα. Τα mole% μπορούν να είναι χρήσιμα για τα δείγματα στα οποία δεν είναι γνωστή η σύσταση ή το μοριακό βάρος, ή συγκεκριμένα μοριακά βάρη, ή το δείγμα περιέχει μίγματα πρωτεϊνών, ελεύθερων αμινοξέων και άλλων συστατικών.

$$[ \text{ρmol ατομικά για κάθε αμινοξύ} ] / [ \text{συνολικό ρmol όλων των αμινοξέων στο δείγμα} ] \times 100 = \text{mole\% για κάθε αμινοξύ.}$$

- Η σύσταση με βάση το μοριακό βάρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν είναι γνωστό το μοριακό βάρος του δείγματος και επιδιώκεται να βρεθεί η σύσταση του αμινοξέος.

$$[ \text{ρmol του αμινοξέος} ] \times [ \text{μοριακό βάρος υπολειμμάτων του αμινοξέος} ] = \text{picogram του αμινοξέος}$$

$$\text{Άθροισμα [picogram όλων των αμινοξέων]} / [ \text{ρmol του δείγματος που ανακτάται} ] = \text{υπολείμματα αμινοξέος ανά μόριο του δείγματος}$$

- Η σύσταση του υπολείμματος χρησιμοποιείται όταν απαιτείται η σύσταση του αμινοξέος και πολλές φορές είναι γνωστή η εμφάνιση ενός ιδιαίτερου υπολείμματος αμινοξέος στο δείγμα.

$$[ \text{ρmol επιλεγμένου αμινοξέος} ] / [ \text{που είναι γνωστό για τα υπολείμματα επιλεγμένου μορίου αμινοξέος/δειγμάτων} ] = \text{ρmol του δείγματος που ανακτάται}$$

$$[ \text{ρmol αμινοξέος} ] / [ \text{ρmol του δείγματος που ανακτάται} ] = \text{υπολείμματα αμινοξέος ανά μόριο του δείγματος.}$$

- Το ελάχιστο μοριακό βάρος χρησιμοποιείται εάν ούτε η σύσταση ή το μοριακό βάρος μιας καθαρής πρωτεΐνης ή ενός πεπτιδίου δεν είναι γνωστή. 1. Ένα αμινοξύ που προσδιορίζεται βρίσκεται στο μικρότερο ποσό του και αξιολογείται αυτή η περιεκτικότητα και 2. Το ποσό αυτού του αμινοξέος διαιρείται έπειτα σε ποσό όλων των άλλων μεμονωμένων αμινοξέων. Η κατ' εκτίμηση σύσταση που βασίζεται στους προηγούμενους υπολογισμούς χρησιμοποιείται έπειτα για να υπολογίσει το ελάχιστο μοριακό βάρος του δείγματος. Το ελάχιστο μοριακό βάρος του δείγματος είναι μόνο ένας ακέραιος αριθμός του πραγματικού βάρους (25).

## 7.2 Προσδιορισμός τρυπτοφάνης

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω ο προσδιορισμός της τρυπτοφάνης είναι ιδιαίτερα δύσκολος. Στη συνέχεια περιγράφεται η μεθοδολογία για τον προσδιορισμό αυτού του αμινοξέος. Αυτή η διαδικασία έχει αναφερθεί από τους Hugh και Moore και έχει βρεθεί να έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα (26). Χρησιμοποιήθηκαν αλεσμένοι σπόροι δημητριακών. Στο δείγμα προστίθεται 99ml ακετόνης όπου στη συνέχεια προστίθεται 1ml πυκνού HCl. Το μίγμα φυλάσσεται στους 50°C για δύο ώρες. Έπειτα προστίθονται 25 ml 1M οξικού νατρίου για να εξουδετερωθούν τα προϊόντα της υδρόλυσης, και το διάλυμα τοποθετείται στη στήλη χρωματογραφίας, όπου πλένεται με 2L απεσταγμένου νερού και στη συνέχεια με ακετόνη. Το προϊόν στη συνέχεια στεγνώνει και αφυδατωμένο χρησιμοποιείται υπό κενό.

- Ρυθμιστικό κιτρικού νατρίου (για τη φόρτωση): 0,20N pH=4,25 χωρίς απορρυπαντικό Brij 35,

- Ρυθμιστικό κιτρικού νατρίου (για τη χρωματογραφία): 0,21N pH=5,4 για τα βασικά αμινοξέα με την αραιώση 3 μερών ρυθμιστικού με 2 μέρη απιονισμένου ύδατος και τη ρύθμιση του pH.

### Διαδικασία

1. Ζυγίζουμε ακριβώς ένα ομοιογενές δείγμα που περιέχει περίπου 1,5 mg N σε έναν σωλήνα φυγοκέντρου από πολυπροπυλένιο.

2. Προσθέτουμε το μερικώς υδρολυμένο μίγμα των δημητριακών για να γίνει το βάρος του δείγματος στο σωλήνα περίπου 60 mg.

3. Προσθέτουμε 0,2 ml H<sub>2</sub>O, 1,0 ml 5 N NaOH και 2 σταγόνες 1% οκτανόλης σε τολουόλιο. Στη συνέχεια το μίγμα ανακατεύεται.

4. Ο σωλήνας τοποθετείται σε σύστημα υψηλού κενού ενώ το δείγμα ψύχεται σε ξηρό πάγο.

5. Υδρολύουμε για 16 ώρες σε 110 °C.

6. Ανοίγουμε με προσοχή, προσθέτουμε περίπου 1ml ρυθμιστικού κιτρικού νατρίου με pH=4,25 και το μίγμα αναμειγνύεται με τα προϊόντα της υδρόλυσης.

7. Τοποθετούμε μια ογκομετρική φιάλη 10 ml σε ένα λουτρό πάγου και προσθέτουμε 0,42 ml HCl 6N. Μεταφέρουμε τα προϊόντα υδρόλυσης από το σωλήνα στη φιάλη χρησιμοποιώντας 0,5 ml ρυθμιστικού με pH=4,25. Η θερμοκρασία δεν πρέπει να αυξηθεί. Σημείωση: οι ποσότητες και οι κανονικότητες του οξέος και της βάσης πρέπει να είναι ακριβείς, δεδομένου ότι το δείγμα εξουδετερώνεται. Όταν ο συνολικός όγκος είναι περίπου 8 - 9 ml, αφήνουμε το δείγμα να έλθει στη θερμοκρασία δωματίου. Πριν από τη χρωματογραφία (που πρέπει να είναι την ίδια ημέρα αν είναι δυνατόν), τα δείγματα πρέπει να υποβληθούν σε φυγοκέντριση για να καθαρίσουν.

8. Χρωματογραφία:

Ένα δείγμα 1 ml από τα εξουδετερωμένα προϊόντα υδρόλυσης με pH=4,26 προστίθεται στη χρωματογραφική στήλη (0,9 x 12 cm). Χρησιμοποιείται στήλη Beckman PA- 35 ή αντίστοιχη. Η ταχύτητα ροής των ρυθμιστικών είναι 50 ml/hr, σε θερμοκρασία 52 °C. Ως ρυθμιστικό (κινητή

φάση) χρησιμοποιείται κιτρικό νάτριο με  $\text{pH}=5,4$ . Ο διαχωρισμός εξαρτάται από τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου αναλυτή. Ένα παράδειγμα των χρόνων των αποκτηθέντων αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας τους όρους που υποδεικνύονται ανωτέρω είναι: ουδέτερα + όξινα αμινοξέα 20 λεπτά, τρυπτοφάνη 38 λεπτά και λυσίνη 68 λεπτά. Η λυσίνη και η αλανίνη διαμορφώνονται συχνά στην αλκαλική υδρόλυση των πρωτεϊνών, και η χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική τεχνική πρέπει να ελεγχθεί για να είναι σίγουρη ότι η τρυπτοφάνη, η λυσίνη και η αλανίνη μπορούν πράγματι να διαχωριστούν.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

### 8.1 Η αλληλουχία των πρωτεϊνών

Ο καθορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης ήταν μια σημαντική πρόοδος στην κατανόηση των πρωτεϊνικών δομών και των λειτουργιών τους. Οι διαδικασίες για την εύρεση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας περιλαμβάνουν τον έλεγχο του DNA, την επαλήθευση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, την παραγωγή των σύνθετων πεπτιδίων και το χαρακτηρισμό της πρωτεϊνικής τροποποίησης. Επιπλέον, η εύρεση της αλληλουχίας είναι πολύ σημαντική για τον καθορισμό οποιασδήποτε απομονωμένης πρωτεΐνης.

Εντούτοις, το σημαντικότερο εμπόδιο για την εφαρμογή διαδικασιών για την εύρεση της αλληλουχίας δεν είναι η οργανολογία, αλλά μάλλον ο μη επιτυχής καθαρισμός των πρωτεϊνών ή των πεπτιδίων για να είναι κατάλληλα για την ανάλυση.

Ούτε το όργανο της ανάλυσης, το οποίο είναι ευαίσθητο, δεν μπορεί να παράγει χρήσιμα στοιχεία από μολυσματικές ή ανεπαρκείς ποσότητες πρωτεΐνης. Δυστυχώς οι περισσότερες πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν είναι διαθέσιμες σε πολύ χαμηλές ποσότητες. Επομένως, η προετοιμασία των δειγμάτων είναι ο πιο σημαντικός στόχος για να είναι επιτυχής η εύρεση της αλληλουχίας. Οι δυσκολίες που οφείλονται στον καθαρισμό, την αποθήκευση και την αποκατάσταση των πρωτεϊνών είναι τα σημαντικότερα εμπόδια στο βιομηχανικό τομέα και στις βιολογικές δοκιμές των πρωτεϊνών.

Η SDS-PAGE είναι πιθανόν η δημοφιλέστερη και πιο κοινή μέθοδος για το μερικό καθαρισμό των πρωτεϊνών για τις δομικές μελέτες. Η SDS-PAGE είναι γρήγορη και απλή χωρίς την απώλεια πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. Οι μερικώς καθαρισμένες πρωτεΐνες μπορούν να φορτωθούν επάνω σε ένα "mini-gel" όπου παράγονται μικρογραμμάρια της πρωτεΐνης. Η καθαρότητα και η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανακτώνται από 0,7 mm παχύρευστο gel φορτώνεται με 1-2 ugs πρωτεΐνης όπου είναι συχνά επαρκή για τον χαρακτηρισμό της.

Αν και η SDS-PAGE είναι σχετικά απλή, απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή κατά την εργασία με τις ποσότητες της πρωτεΐνης. Η απώλεια των τελικών αμινών (μέχρι 90%) μπορεί να εμφανιστεί λόγω της αλκυλοποίησης από τα αντιδρόντα. Για να ελαχιστοποιηθεί αυτή η παρεμπόδιση των N-τελικών υπολειμμάτων, μόνο οι υψηλά καθαρές χημικά ουσίες και οι διαλύτες υψηλής καθαρότητας πρέπει να χρησιμοποιηθούν. Η χρήση ενός υψηλής ποιότητας gel συστήνεται σε πολύ χαμηλές ποσότητες πρωτεΐνης. Όταν έχουμε μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης, η τεχνική για την παρεμπόδιση των N-τελικών υπολειμμάτων είναι λιγότερο σημαντική. Η SDS-PAGE είναι επίσης χρήσιμη για τον διαχωρισμό μικρότερων πρωτεϊνών και μεγαλύτερων πεπτιδίων όταν δεν ανακτώνται σωστά από το RP-HPLC.

Η Gel ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων είναι ένα ισχυρό εργαλείο ανάλυσης για χιλιάδες

πρωτεΐνες. Χρησιμοποιώντας ένα 2D gel μπορούν να διαχωριστούν όλες οι πρωτεΐνες από ένα ολόκληρο κομμάτι κυττάρων χωρίς προκαταρκτικό καθαρισμό. Δυστυχώς το 2D gel έχει μερικά μειονεκτήματα. Κατ' αρχάς, τα gels δεν είναι πολύ αναπαραγωγίσιμα μεταξύ των εργαστηρίων, καθιστώντας δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Αφετέρου, η ικανότητα του gel να λάβει αρκετή πρωτεΐνη για τη δομική ανάλυση είναι αρκετά χαμηλή (8).

## 8.2 Ανάλυση των PTH - αμινοξέων παραγώγων

Η Edman αποικοδόμηση των πρωτεϊνών είναι η προτιμημένη μέθοδος στην αλληλουχία αμινοξέων. Η διαδικασία είναι βασισμένη σε μια κυκλική μέθοδο όπου κάθε ένα αμινοξύ αφαιρείται με διαδοχικό τρόπο από το N-τελικό άκρο. Κάθε κύκλος είναι ένας συνδυασμός από τρία βήματα 1) σύζευξη του phenylisothiocyanate (PITC) με την N-τελική ομάδα, 2) σχίσσιμο του πεπτιδικού δεσμού με όξινο μέσο και 3) μετατροπή των ασταθών thiazolinone παραγώγων σε πιο σταθερά PTH-αμινοξέα. Τα PTH παράγωγα αναλύονται με HPLC. Οι αρχικές προσπάθειες με χρωματογραφία προσρόφησης σε στήλες πυριτίου ή με χημικά τροποποιημένο πυρίτιο, οδήγησαν σε μέτρια αποτελέσματα, πράγμα που οφείλονταν στους μεγάλους χρόνους ανάλυσης και αυτό οδήγησε στην ανάγκη να χρησιμοποιηθεί μια άλλη μέθοδος προκειμένου να συμπληρωθεί το HPLC.

Με βάση αυτές τις μελέτες, ένα σύνολο κριτηρίων για μια επιτυχή ανάλυση μπορεί να καθοριστεί σε μια προσπάθεια να καλυφθούν οι απαιτήσεις για την εύρεση της αλληλουχίας:

1. Υψηλή ανάλυση και ευαισθησία, προκειμένου να επιτευχθεί, όσο είναι δυνατόν, διαχωρισμός των παραγώγων και ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός.

2. Σύντομος χρόνος ανάλυσης.

3. Δυνατότητα αναπαραγωγής και αξιοπιστία που επιτρέπουν την γρήγορη ανάλυση, την εύκολη αυτοματοποίηση και, το πιο σημαντικό, τη βέβαιη σύσταση κάθε υπολείμματος.

4. Μεταβλητότητα προκειμένου να προσαρμόσουν τις αλλαγές στις παραμέτρους του συστήματος για τα προβλήματα που προκύπτουν από τους μολυσματικούς παράγοντες ή τα ασυνήθιστα παράγωγα (20).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα δημητριακά είναι μια κατηγορία, η οποία έχει μεγάλη κατανάλωση και γενικά είναι η βάση της ανθρώπινης διατροφής, αλλά και της διατροφής των ζώων. Για αυτό το λόγο ο προσδιορισμός των αμινοξέων στα δημητριακά ήταν και είναι σημαντική ανάλυση.

Τα δημητριακά είναι πλούσια σε πρωτεΐνες άρα και σε αμινοξέα, όπου τα αμινοξέα είναι τα βασικά δομικά μόρια των πρωτεϊνών. Η γνώση της περιεκτικότητας των πρωτεϊνών στα δημητριακά είναι πολύ σημαντική, έτσι ώστε το ποσοστό των αμινοξέων να είναι στα σωστά επίπεδα και στο πως επηρεάζουν αυτά τη διατροφική αξία.

Όπως είδαμε η ανάλυση των αμινοξέων είναι μια δύσκολη διαδικασία, η οποία απαιτεί χρόνο και βέβαια γνώση. Η επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος είναι πολύ σημαντική για την ανάλυση, και γενικότερα για τον προσδιορισμό των αμινοξέων, για να είναι τα αποτελέσματα σωστά. Στη συνέχεια ακολουθεί η υδρόλυση, η οποία μπορεί να είναι όξινη (π.χ. ισολευκίνη και μεθειονίνη) ή αλκαλική (π.χ. τρυπτοφάνη), ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες των αμινοξέων που θα αναλυθούν και συνεχίζει με την παραγοντοποίηση. Η παραγοντοποίηση είναι απαραίτητη για να μπορέσουν τα αμινοξέα να ανιχνευθούν στη συνέχεια από την χρωματογραφία. Οι πιο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι χρωματογραφίας είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), η οποία είναι μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι γρήγορη, με αξιόπιστα αποτελέσματα. Η Χρωματογραφία λεπτής-στιβάδας (TLC) είναι επίσης μια μέθοδος με αξιόπιστα αποτελέσματα και χρησιμοποιείται πολλές φορές στη θέση της Χρωματογραφίας ιοντικής-ανταλλαγής, λόγω του χαμηλού κόστους εξοπλισμού.

Η ανάλυση των αμινοξέων είναι μια απαιτούμενη μέθοδος για την εύρεση των ποσοστών των αμινοξέων που υπάρχουν σε κάθε δημητριακό, έτσι ώστε να γίνεται η σωστή πρόσληψη αυτών είτε από τους ανθρώπους είτε από τα ζώα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Εγκυκλοπαίδεια Νέα Δομή, τόμος 10<sup>ος</sup>, Εκδόσεις «Δομή» Εκδοτικός Οργανισμός Τεγόπουλου Μανιατέα, Αθήνα, 1996.
2. Παγκόσμια Σοβιετική Εγκυκλοπαίδεια, τόμος 3<sup>ος</sup>, Εκδόσεις «Παρθενών» Κώστας Γεωργόπουλος, Αθήνα, 1978.
3. [http:// www.aminoacids.com/performicanalysis](http://www.aminoacids.com/performicanalysis)
4. [http://www.agrsci.dk/afdelinger/forskning.afdelinger/gbi/grupper.lmolekylier\\_genetic\\_og\\_bi\\_teknologi/cereals](http://www.agrsci.dk/afdelinger/forskning.afdelinger/gbi/grupper.lmolekylier_genetic_og_bi_teknologi/cereals).
5. Γρηγόρης Διαμαντίδης, Εισαγωγή στη Βιοχημεία, 2<sup>η</sup> Έκδοση, Θεσσαλονίκη, σελ. 17-36, 1994.
6. [http:// www.healthyeatingclu](http://www.healthyeatingclu)
7. Jerold A. Bietz I. Northern, HPLC of Biological Macromolecules, Methods and Applications, Chromatographic Science Series, Volume 51, edited by Karen M. Gooding Fred E. Regnier, Illinois, p. 266-282, 1992.
8. [http:// www.aminoacids.com](http://www.aminoacids.com)
9. Joint FAD/WHO Ad Hoc Expert Committee, Energy and Protein Requirements, WHO Technical Report Series, no. 52 FAO Nutrition Meetings Report Series, Rome, 1973.
10. B. Stefenshyn, M. Cole, L. Fleury and L. Ellwood, Research Summaries: Canola and Peas in Livestock diets, 1998.
11. B. O. Eggum, Nuclear Techniques for Seed Protein Improvement, Vienna: International Atomic Energy Agency, Sauer, W.C., Giovanetti, P.M. & Stothers, S.C., *Can. J. Anim. Sci.* 54, 97, p. 391, 1974.
12. D. J. Stevens, E. McDennott, *J. Sci. Fd Agric.* 14, 284, 1963.
13. B. O. Eggum, Nuclear Techniques for Seed Protein Improvement, Vienna: International Atomic Eppendorfer, W. H. . *J. Sci. Fd Agric.* 28, 152, p. 387, 1977.
14. D. B. Bragg, C. A. Ivy & E. L. Stephenson, *Poult. Sci.* 48, 2135, (1969).
15. J. L. Copelin, C. T. Gaskins & L. F. Tribble, *J. Anim. Sci.* 46, 133, (1978).
16. W. C. Sauer, S. C. Stothers & G. D. Phillips, *Can. J. Anim. Sci.* 57, 585, (1977).
17. <http://www.unu.edu>
18. L. Sodek, C. M. Wilson. *J. Agr. Food Chem.*, 19, p.1144-1150, (1971).
19. Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, Skoog-Holler-Nieman, 5<sup>η</sup> Έκδοση, Κωσταράκης Α.Ε., Αθήνα, 2002.
20. Claude Lazyre, James A. Rooplchemont, Nabil G. Siedah, and Michel Chretien, HPLC of Biological Macromolecules, Methods and Applications, Chromatographic Science Series, Volume 51, edited by Karen M. Gooding Fred E. Regnier, Quebec, Canada, p. 429-437, 1992.



21. AOAC, Official Methods of Analysis of the Association of Official/ Analytical Chemists, 12th ed. William Horwitz Washington, D.C., 1975.
22. M.A. Joslyn, Methods in Food Analysis, 2nd ed. Academic Press, New York and London, 1970.
23. Y. Pomeranz. and C.E. Meloan, Food Analysis: Theory and Practice Avi Publishing Co., Westport, Conn., USA, 1971.
24. E. Villegas and E T. Mertz, Research Bulletin, 20, (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo [CIMMYT]), Mexico, 1971.
25. [http:// www.protein.iastate.edu/aaa.html](http://www.protein.iastate.edu/aaa.html)
26. T.E. Hugh and S.J. Moore, *J. Biol. Chem.*, 247, 2828, 2834, 1972.