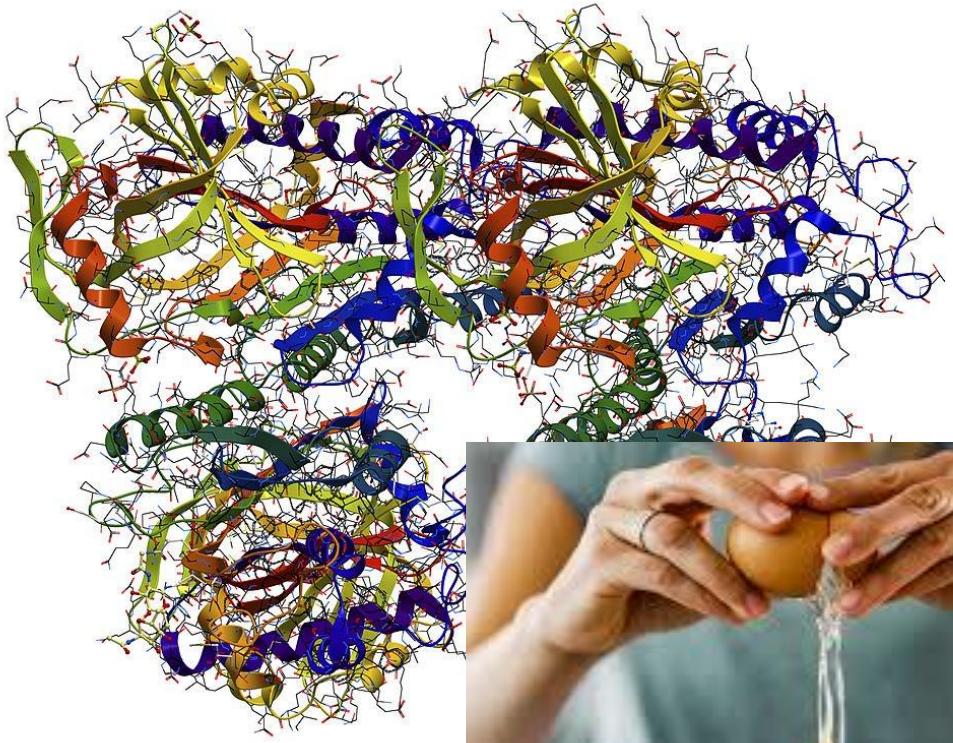
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

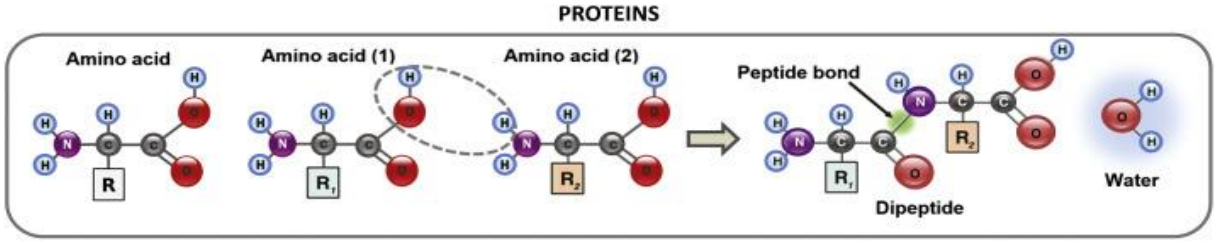


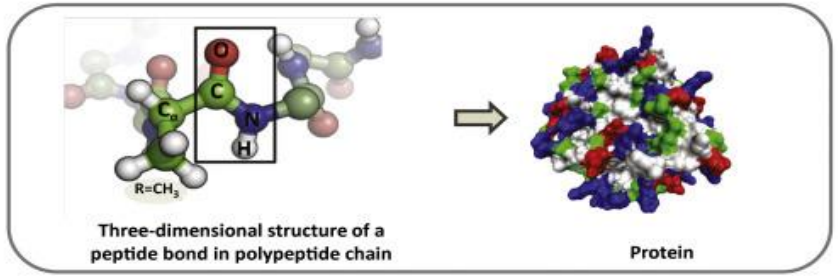


# Πρωτεΐνες (Ι)

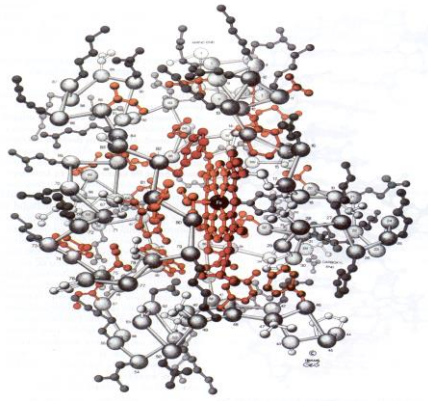
Αμαλία Γιάννη

# Πρωτεΐνες



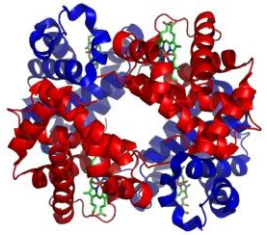

- Σε στοιχειακό επίπεδο, οι πρωτεΐνες περιέχουν 50-55% άνθρακα, 6-7% υδρογόνο, 20-23% οξυγόνο, 12-19% άζωτο και 0,2-3% θείο (w/w).



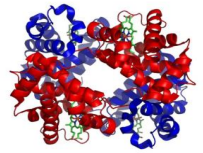
- Πολύπλοκα πολυμερή που αποτελούνται από είκοσι διαφορετικά αμινοξέα.
- Τα συστατικά αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους σε γραμμική αλληλουχία με υποκατεστημένους αμιδικούς (πεπτιδικούς) δεσμούς.
- Ο αμιδικός δεσμός είναι εν μέρει διπλός δεσμός ο οποίος καθορίζει τις περαιτέρω μοναδικές δομικές ιδιότητες των πρωτεϊνικών πολυμερών.
- Η λειτουργική ποικιλότητα των πρωτεϊνών στηρίζεται στην πληθώρα των τρισδιάστατων διαμορφώσεων που μπορούν να προκύψουν από τη διευθέτηση της αλληλουχίας των αμινοξέων στις πρωτεΐνες.

# Βιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών

- **Ενζυμικοί καταλύτες**
- **Δομικές πρωτεΐνες:** κολλαγόνο των τενόντων και των χόνδρων, ελαστίνη των συνδέσμων, κερατίνη σε τρίχες, φτερά και νύχια, φιβροΐνη στο μετάξι
- **Συσταλτικές πρωτεΐνες**: ακτίνη, μυοσίνη
- **Μεταφορικές πρωτεΐνες:** αλβουμίνη ορού, τρανσφερίνη, αιμοσφαιρίνη
- **Αποθεματικές πρωτεΐνες:** ωαλβουμίνη, πρωτεΐνες σπόρων, φερριτίνη, γλουτένη
- **Αμυντικές πρωτεΐνες:** αντισώματα ανοσοσφαιρίνες Igs, τοξίνες
- **Ορμόνες:** ινσουλίνη, αυξητική ορμόνη, ανορεξιογόνα πεπτίδια
- **Άλλοι ρόλοι:** μεταφορείς ηλεκτρονίων (κυτοχρώματα), αντλίες ιόντων, ιδιότητες ρυθμιστικού (buffer), πρωτεΐνες μεμβρανών υποδοχέων



# Πρωτεΐνες τροφίμων



- Ως **πρωτεΐνες τροφίμων** μπορούν να οριστούν όσες βιολογικά παραγόμενες πρωτεΐνες που είναι εύπεπτες, μη τοξικές, θρεπτικά επαρκείς, λειτουργικά χρησιμοποιήσιμες σε προϊόντα τροφίμων, επαρκώς διαθέσιμες και γεωργικά βιώσιμες.

Κύριες πηγές πρωτεϊνών τροφίμων: γάλα, κρέατα, πουλερικά, ψάρια, αβγά, δημητριακά, όσπρια και ελαιούχοι σπόροι.



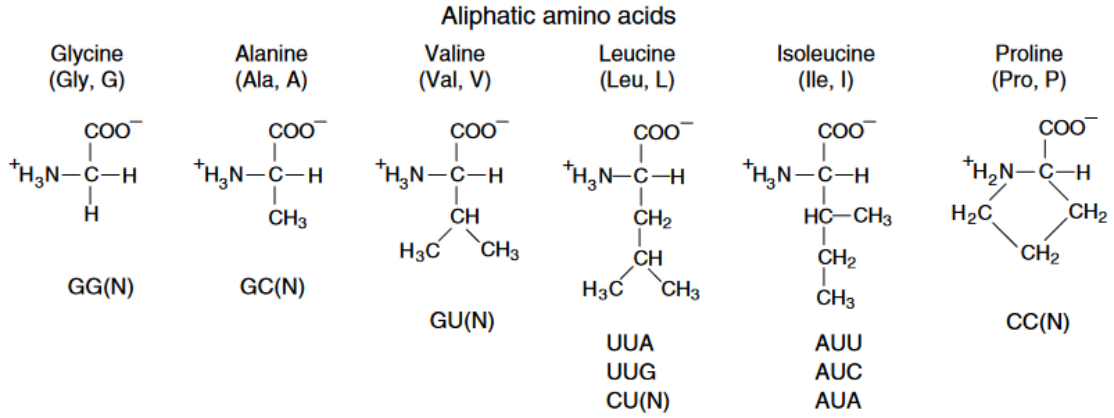

Η συμπεριφορά των πρωτεϊνών στα τρόφιμα εξαρτάται από τις ιδιότητές τους και κατ' επέκταση από τη σύστασή τους σε αμινοξέα και ειδικότερα τη συγκεκριμένη αλληλουχία που είναι μοναδική για κάθε πρωτεΐνη.

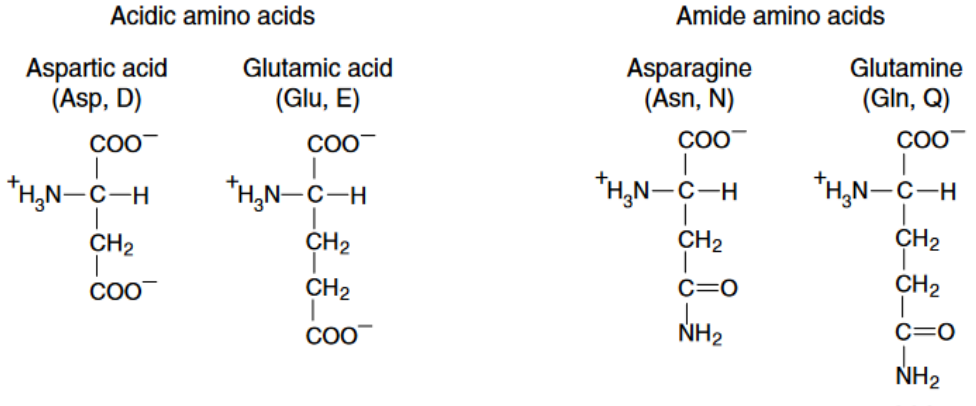
Ιδιότητες πρωτεϊνών τροφίμων: αφριστικές, γαλακτοματοποιητικές, δέσμευσης νερού, σχηματισμού πηκτών, ενζυμική δράση, κροκίδωση-θρόμβωση

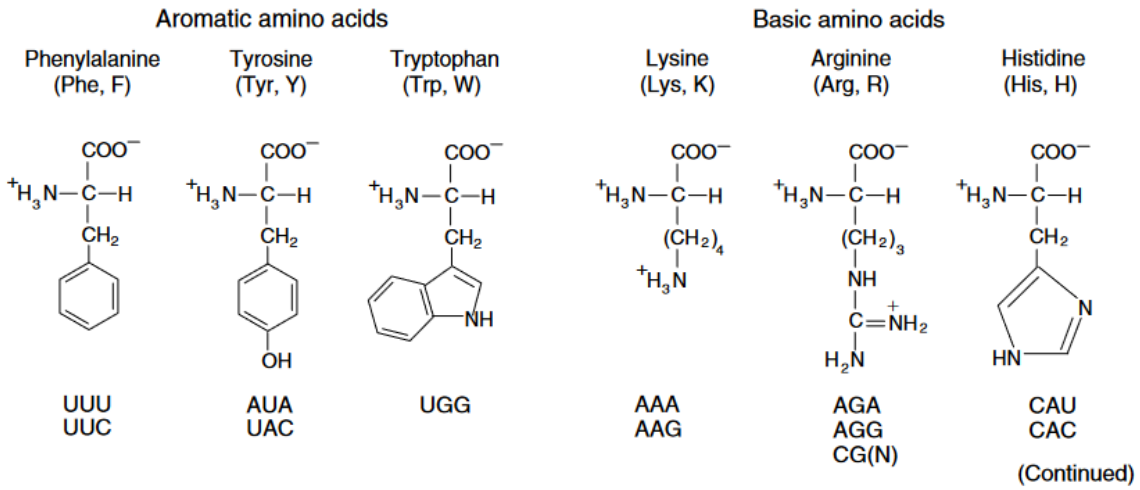
# Αμινοξέα

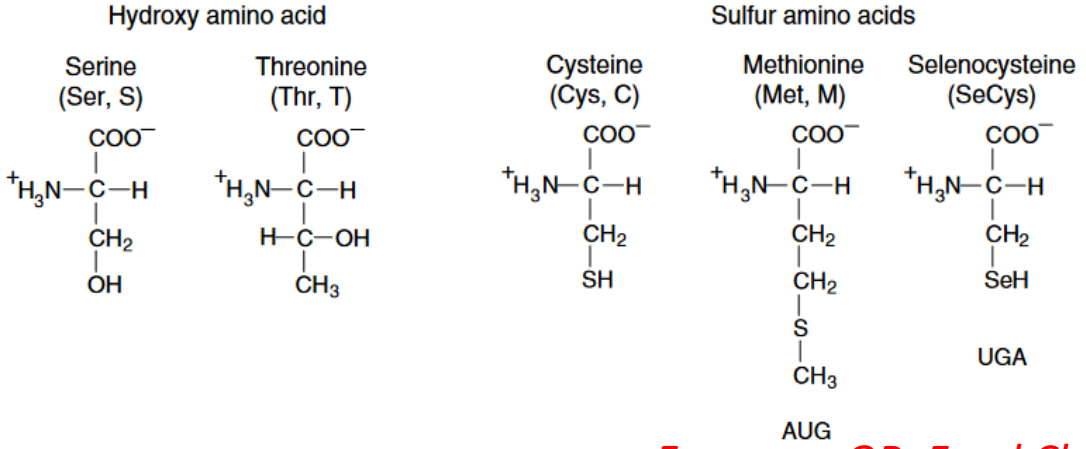



Όλες οι πρωτεΐνες σε όλα τα είδη από τα βακτήρια και τα φυτά μέχρι τον άνθρωπο δομούνται από αυτά τα 20 αμινοξέα.



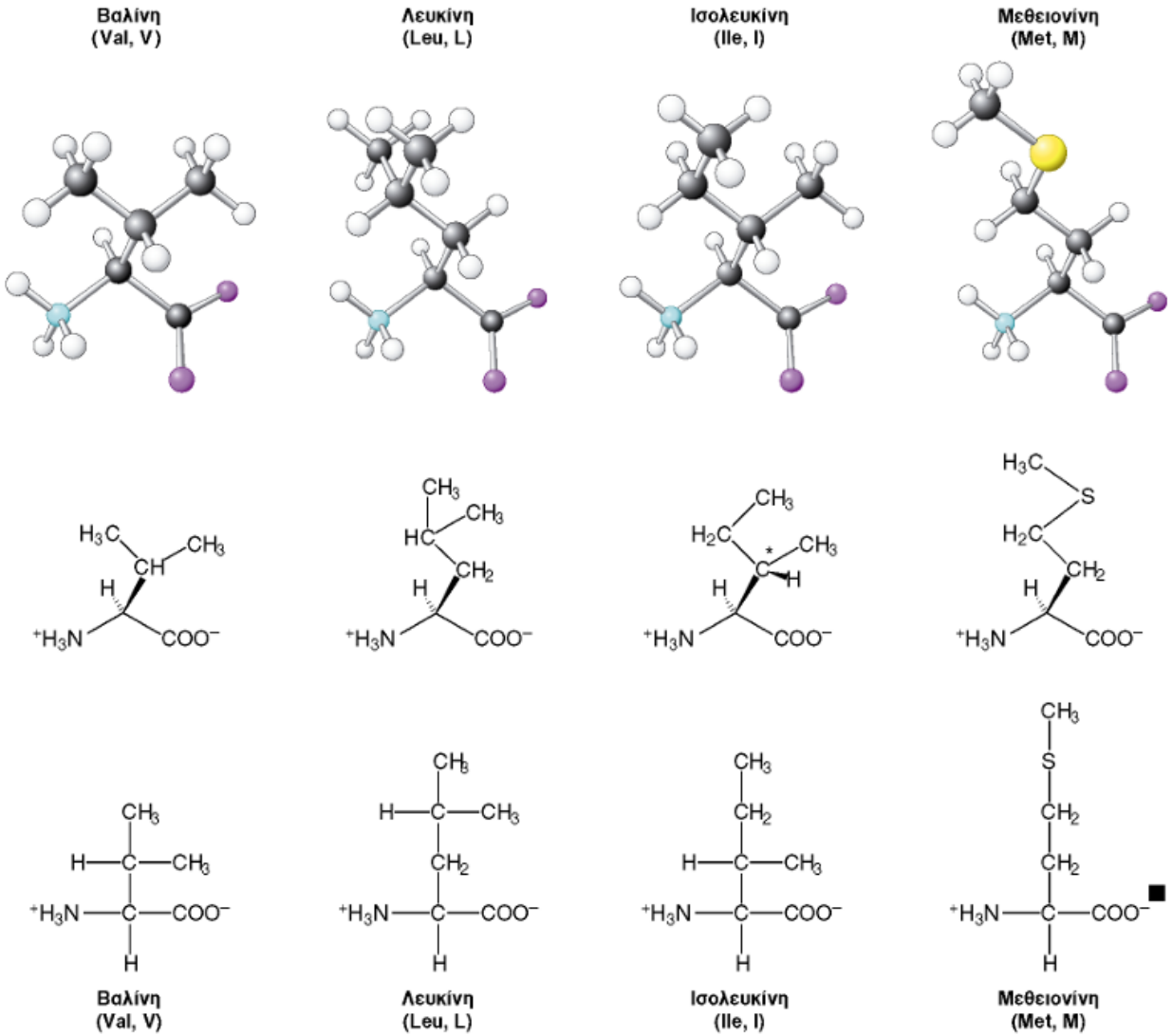



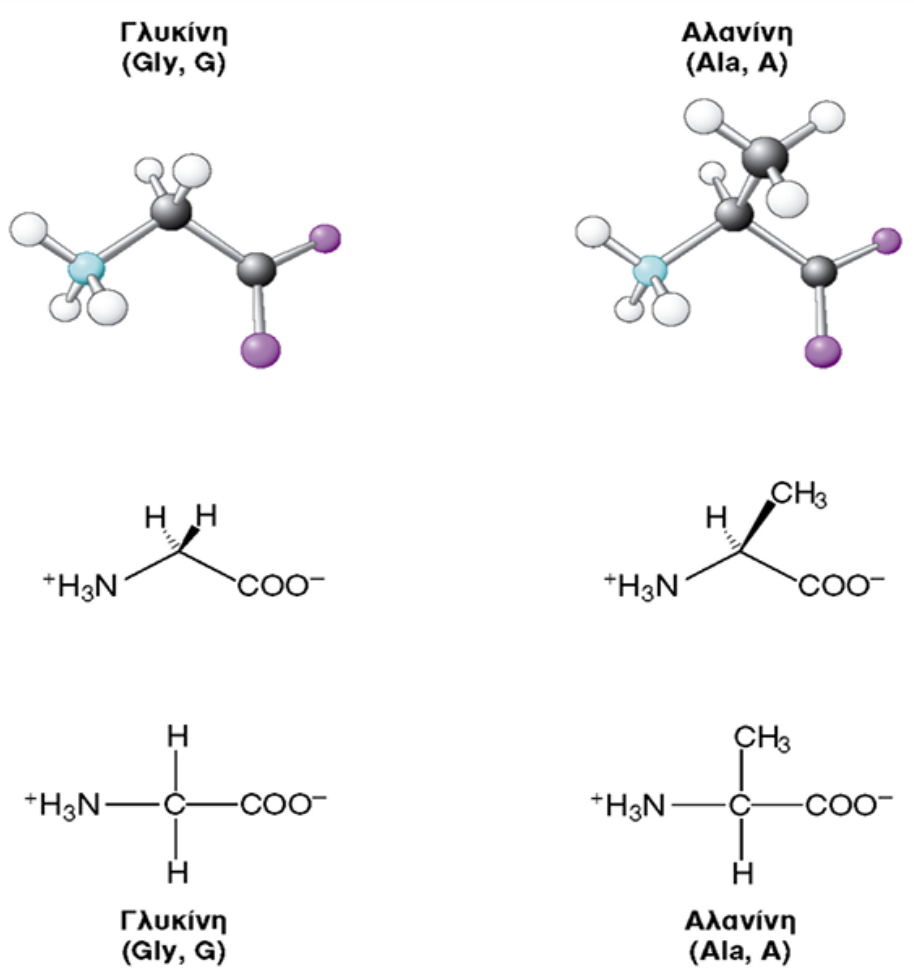




*Fennema OR. Food Chemistry*

# Υδρόφοβα αμινοξέα

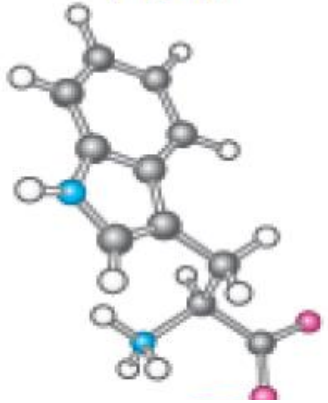



Οι πλευρικές αλειφατικές αλυσίδες είναι υδρόφοβες και έχουν την τάση να συναθροίζονται παρά να έρχονται σε επαφή με το νερό.

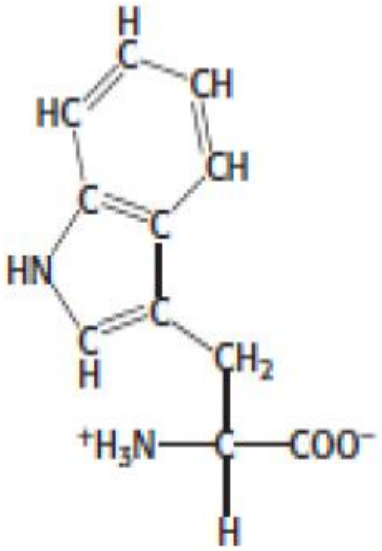
# Υδρόφοβα αρωματικά αμινοξέα

Θρυπτοφάνη
(Trp, W)

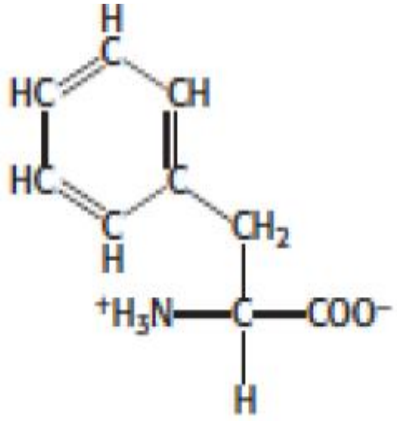


Φαινυλαλανίνη
(Phe, F)

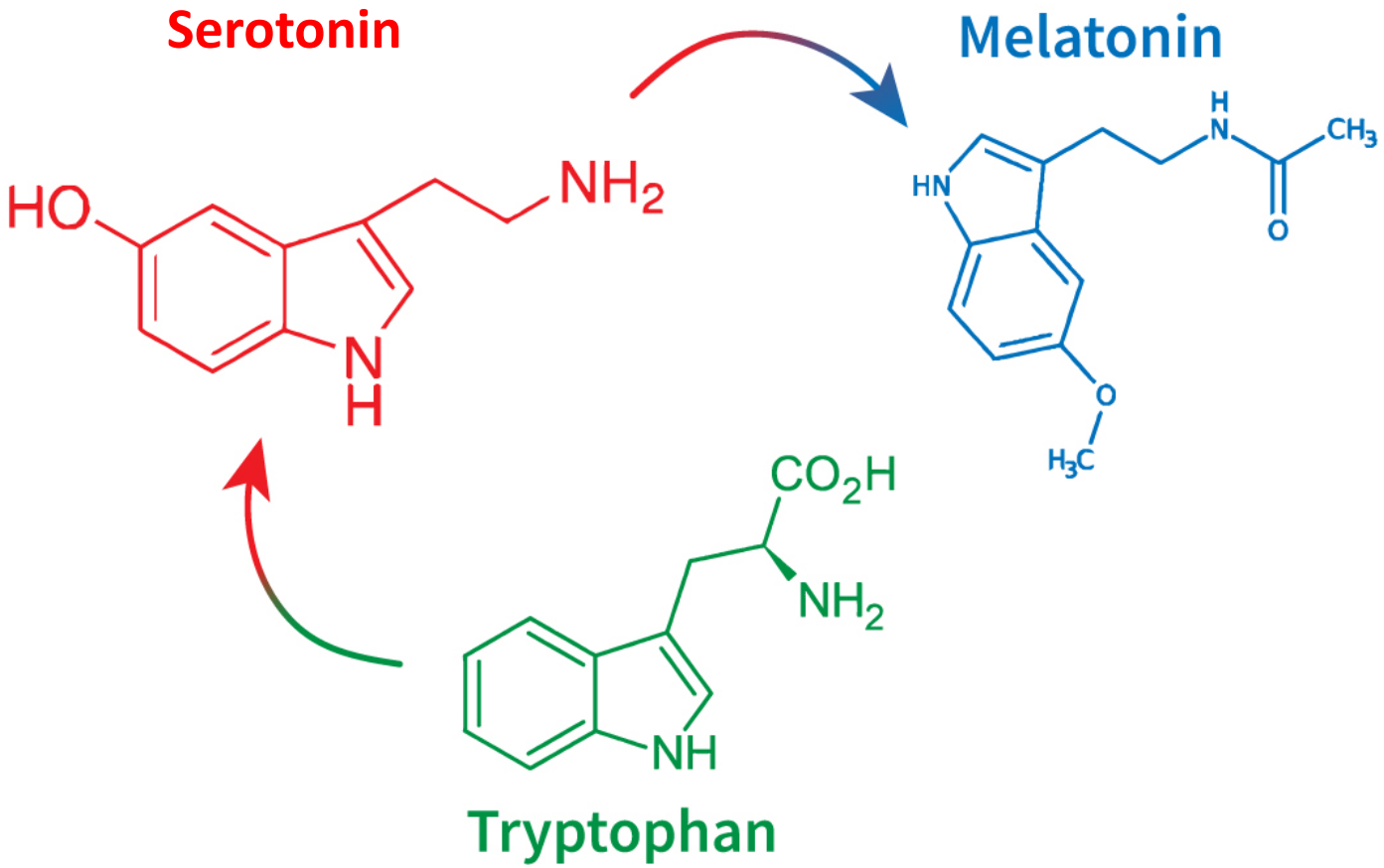





Θρυπτοφάνη
(Trp, W)



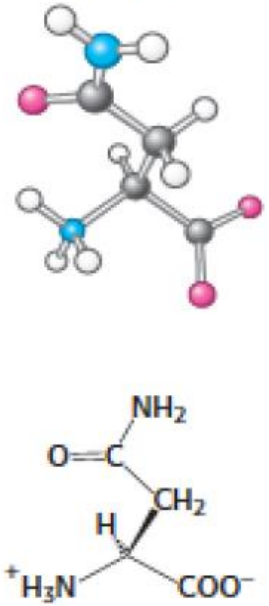

Φαινυλαλανίνη
(Phe, F)



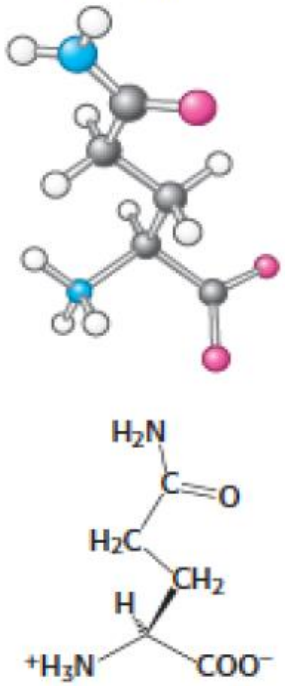

Από την **θρυπτοφάνη** παράγεται η **σεροτονίνη** που παίζει καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία του νευρικού συστήματος με συμμετοχή στη ρύθμιση του συναισθήματος (διάθεση, άγχος, χαλάρωση, παρορμητικότητα, θυμός), του ύπνου, της όρεξης, του πόνου αλλά και σε άλλες βασικές λειτουργίες του σώματος. Από την σεροτονίνη παράγεται η **μελατονίνη**. Η σύνθεση και η έκκρισή της ρυθμίζονται από τον κύκλο φωτός-σκότους: αυξάνονται κατά τη διάρκεια της νύχτας και αναστέλλονται με την έκθεση στο φως. Η μελατονίνη συμβάλλει στη ρύθμιση του κιρκάδιου ρυθμού και προάγει την προετοιμασία του οργανισμού για τον ύπνο.

# Πολικά αμινοξέα- χωρίς φορτίο

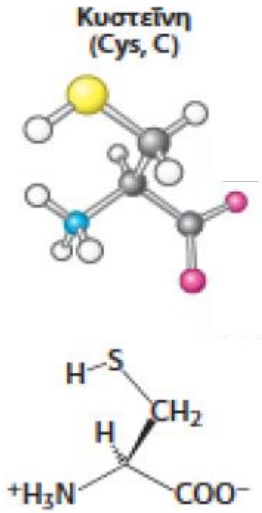
Ασπαραγίνη (Asn, N)



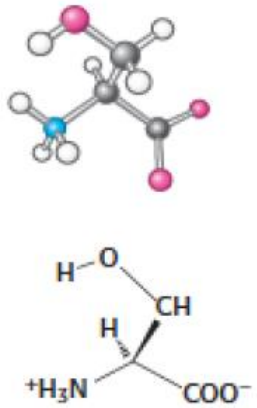
Γλουταμίνη (Gln, Q)



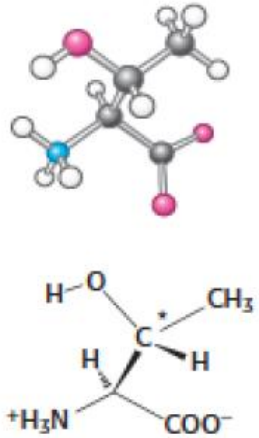
Κυστεΐνη (Cys, C)



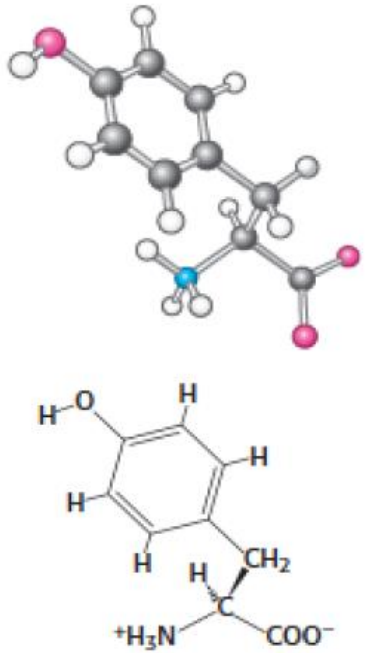
Σερίνη (Ser, S)



Θρεονίνη (Thr, T)



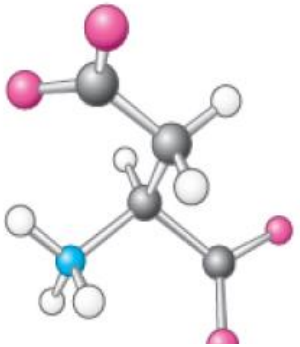
Τυροσίνη (Tyr, Y)

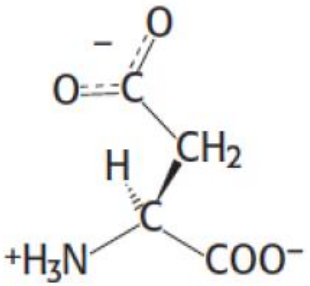


Από την **τυροσίνη** παράγεται η ένωση **μελανίνη** που μας προστατεύει από την UV ακτινοβολία.

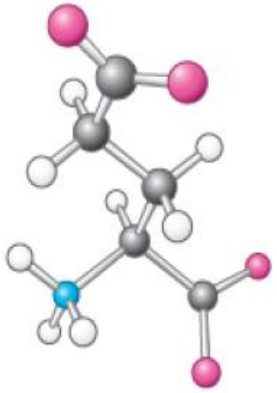
# Φορτισμένα αμινοξέα

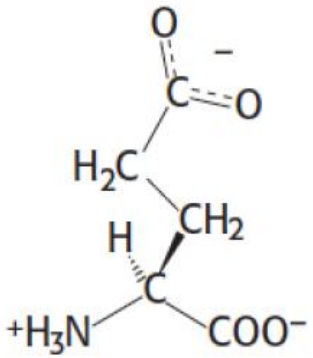
Ασπαραγινικό
(Asp, D)





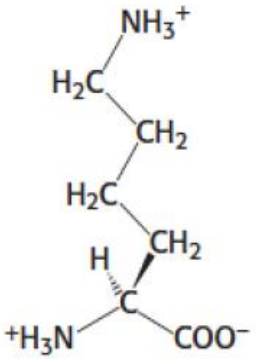

Γλουταμινικό
(Glu, E)



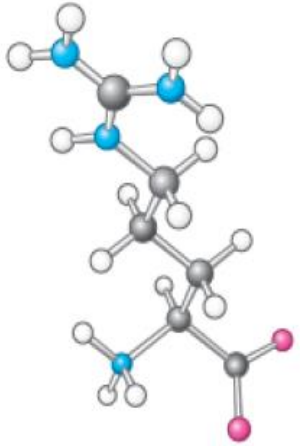


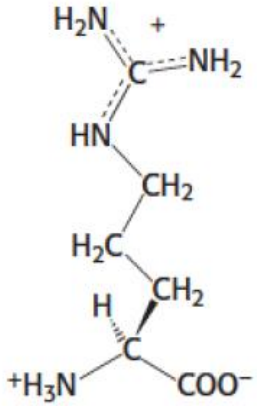

Λυσίνη
(Lys, K)



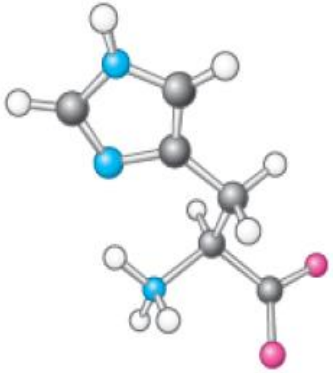


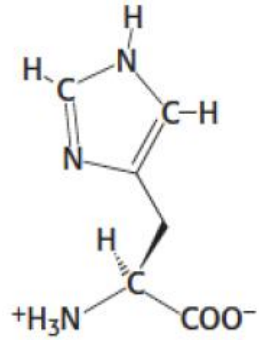

Αργινίνη
(Arg, R)





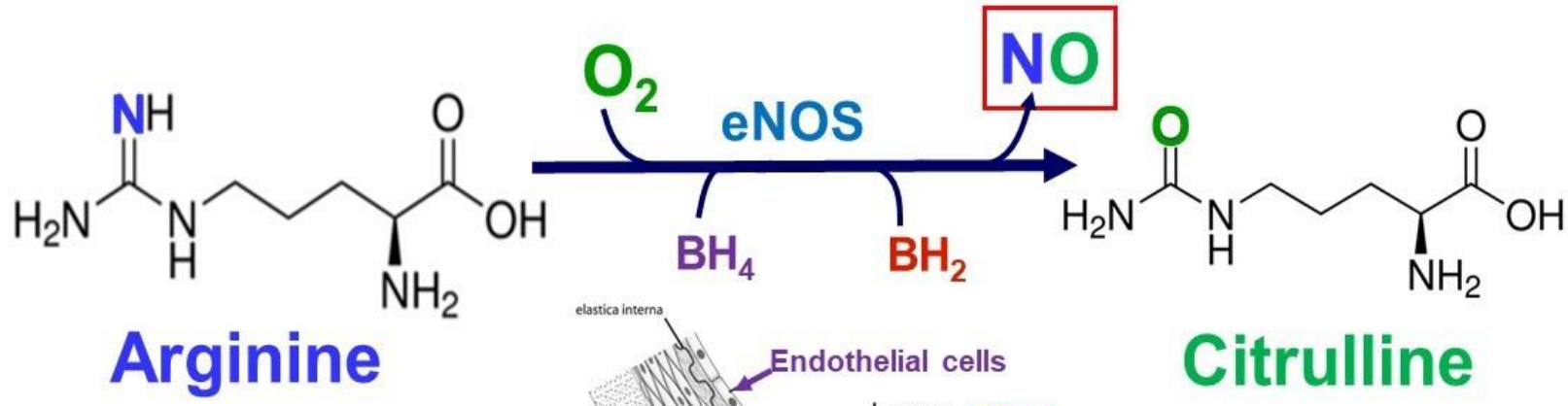

Ιστιδίνη
(His, H)





# Nitric Oxide Synthase

## Endothelial Relaxing Factor = Vasodilator




Nitrates long used to treat angina -> NO

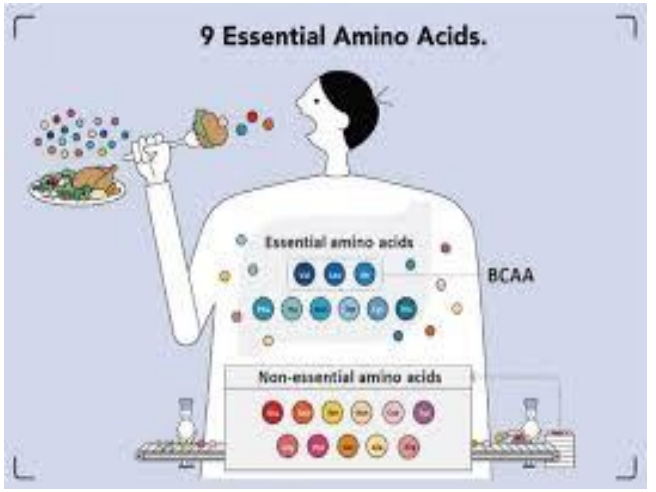
Από την **αργινίνη** παράγεται ο αγγειοχαλαρωτικός παράγοντας **NO**.

# Ταξινόμηση αμινοξέων με βάση τον ρόλο τους στη διατροφή

**Απαραίτητα:** Βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη μεθειονίνη, θρεονίνη, λυσίνη, ιστιδίνη.

**Μη απαραίτητα:** Γλυκίνη, αλανίνη, προλίνη, σερίνη, κυστεΐνη, τυροσίνη, ασπαραγίνη, γλουταμίνη, ασπαραγινικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, αργινίνη.

Ωστόσο, ανάλογα με τις συνθήκες κάποιο μη απαραίτητο αμινοξύ μπορεί να γίνει απαραίτητο, όπως στην περίπτωση νεογνών που γεννιούνται πρόωρα ή στην περίπτωση που κάποιο όργανο δυσλειτουργεί (κίρρωση ήπατος, νεφροπάθειες).

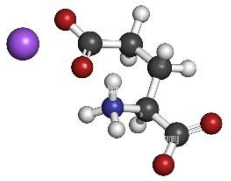



Σύμφωνα με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους ταξινομούντα σε:

**Αμινοξέα με γεύση umami**: γλουταμινικό οξύ

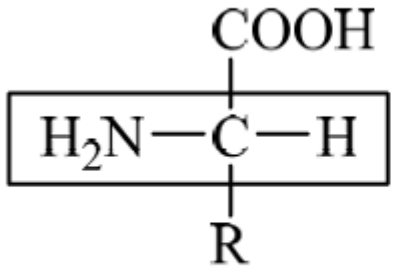
**Αμινοξέα με πικρή γεύση:** Βαλίνη, μεθειονίνη, λευκίνη, ισολευκίνη φαινυλαλανίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη.

**Αμινοξέα με γλυκειά γεύση:** θρεονίνη, σερίνη, γλυκίνη, αλανίνη, προλίνη.

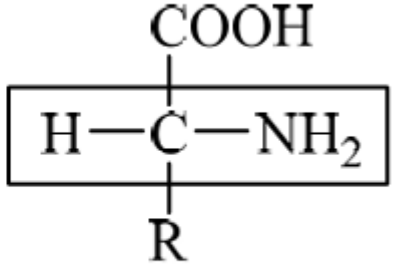


# Αμινοξέα- Φυσικές και Χημικές Ιδιότητες

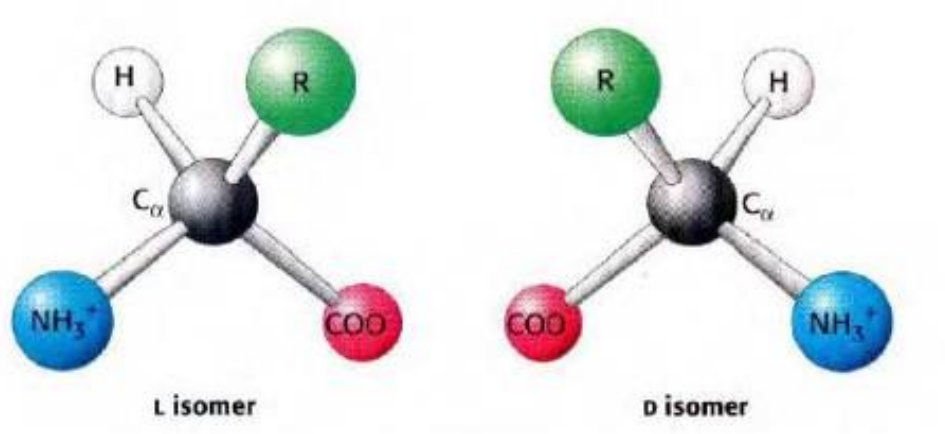
- Αμινοξέα = δίπολα σε κρυσταλλική μορφή: διαλυτότητα σε $H_2O$, υψηλό Σημείο Τήξεως και διπολική ροπή
- Αντιδρούν με οξέα και βάσεις: Δρουν ως ρυθμιστικά δ/τα (σημαντικό για τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων)
- Οι συνήθεις πρωτεΐνες περιέχουν L-αμινοξέα



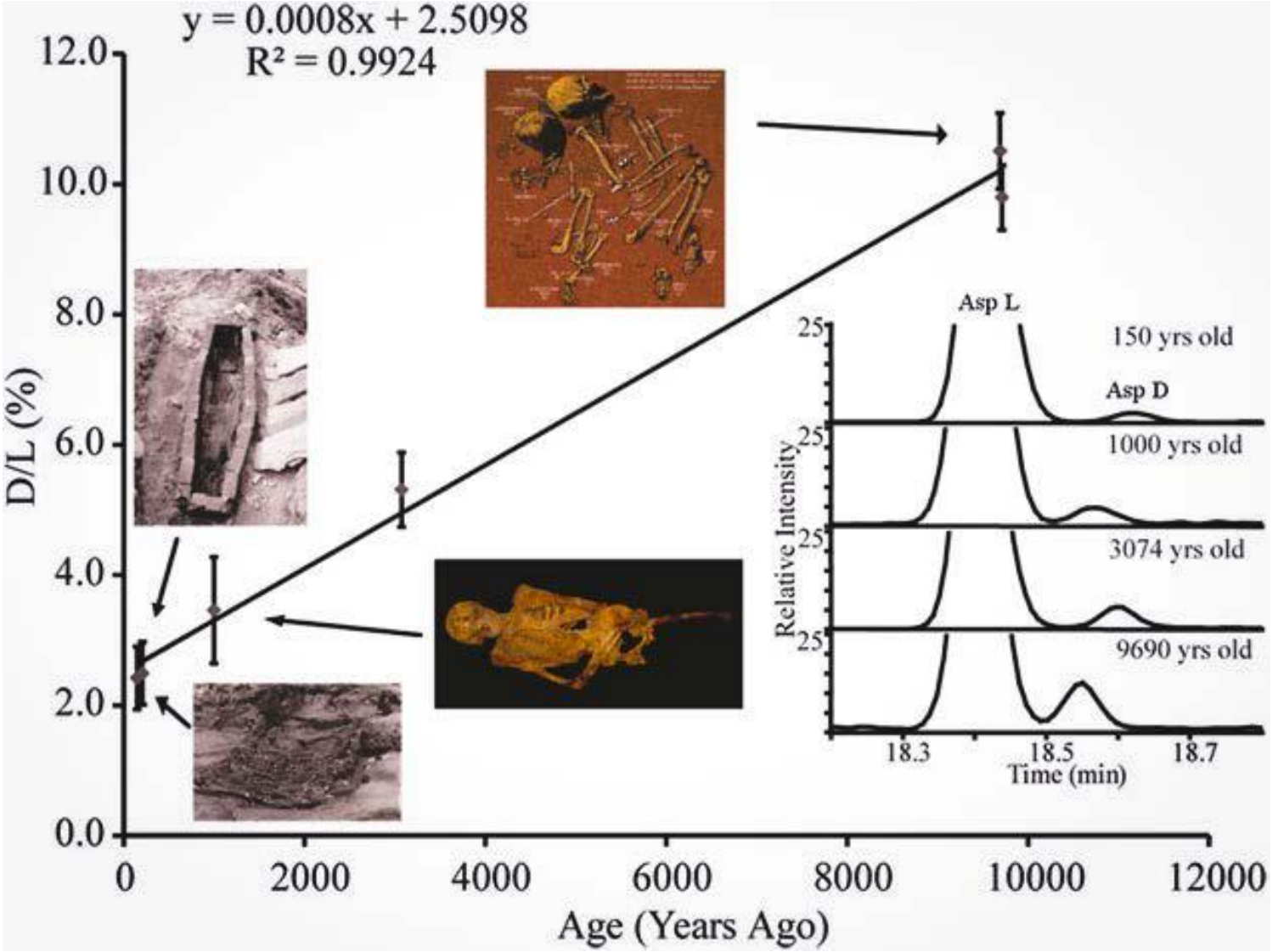

L-ισομερές



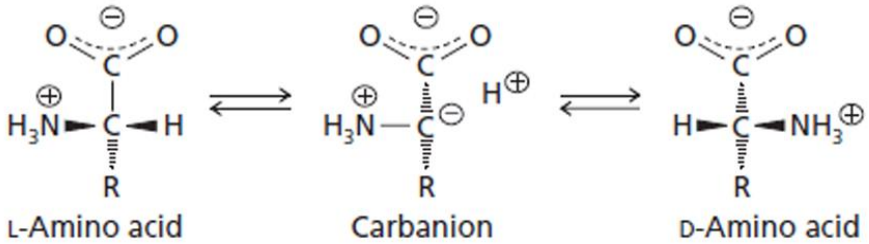

D-ισομερές



# Ρακεμοποίηση αμινοξέων στην αρχαιομετρία



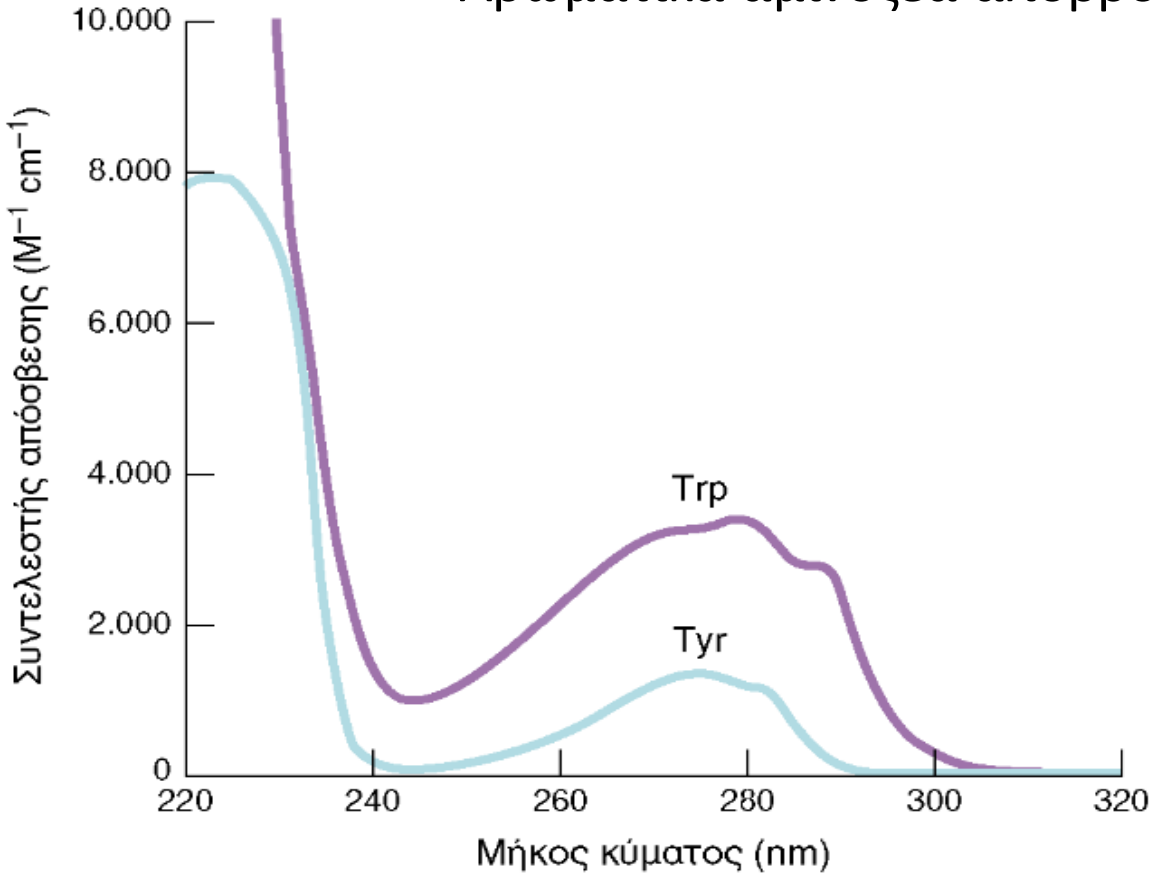

Ion electropherograms (inset) of the D and L isomers of aspartic acid on the calibration curve obtained primarily from $^{14}C$, showing the progression of racemization with time (minor migration time fluctuations were observed). Photographs of samples are also included.

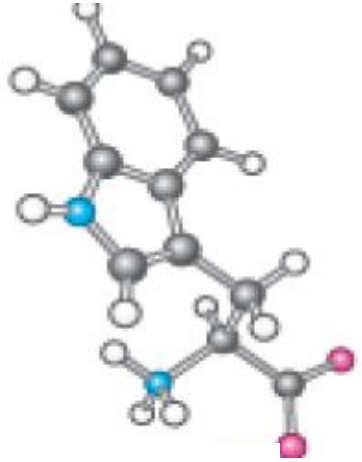


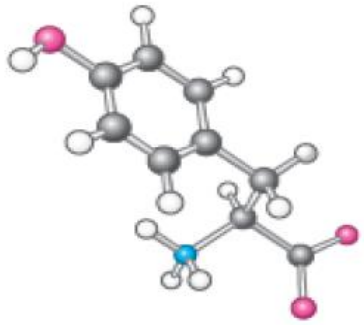

Bravenec, A.D., Ward, K.D. and Ward, T.J., 2018. Amino acid racemization and its relation to geochronology and archaeometry. *Journal of separation science*, *41*(6), pp.1489-1506.

# Φάσματα απορρόφησης αρωματικών αμινοξέων

Αρωματικά αμινοξέα απορροφούν στο UV (280nm)

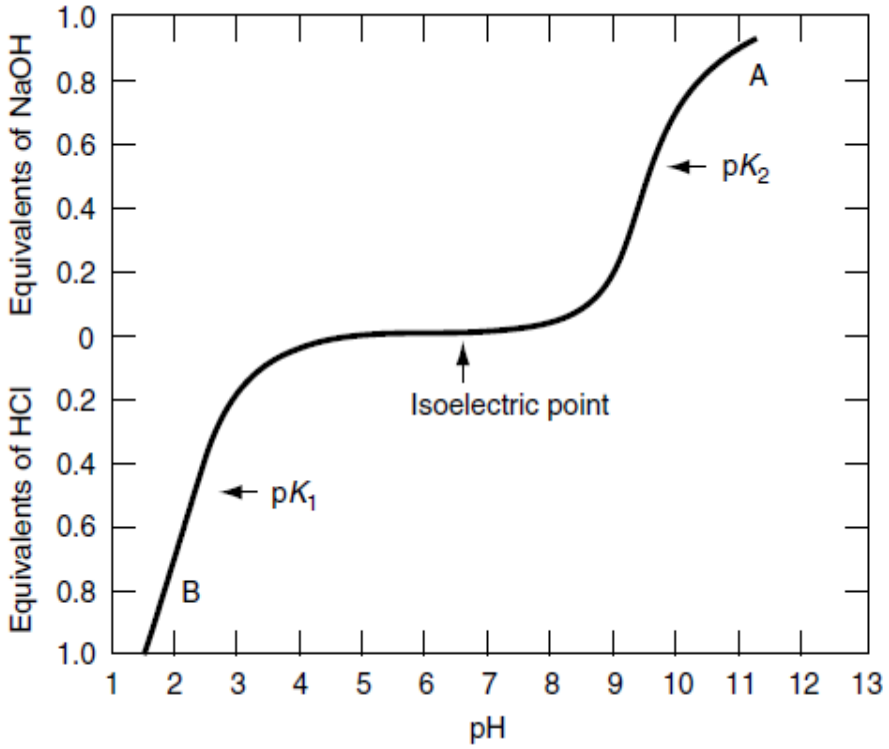




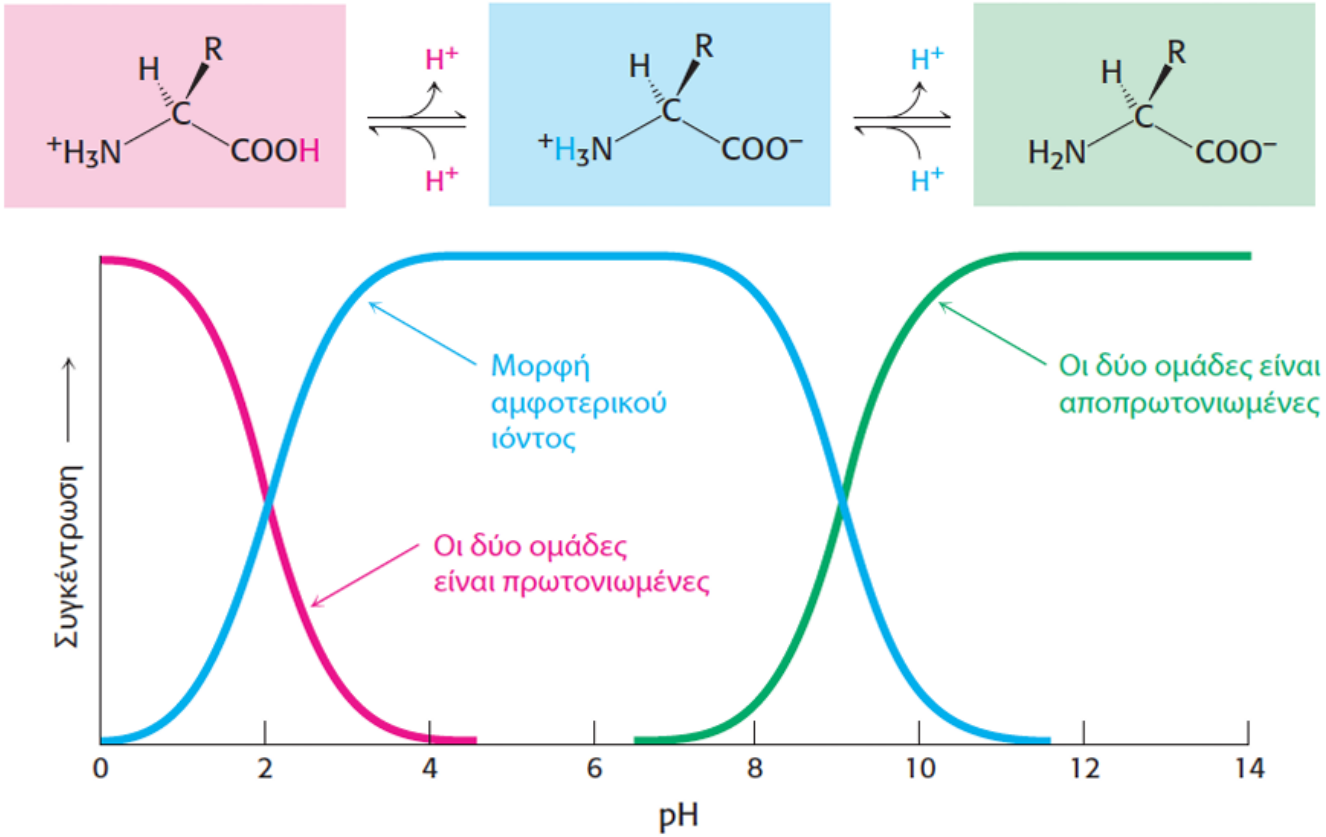
Φάσματα απορρόφησης αρωματικών αμινοξέων: θρυπτοφάνης (μωβ) και τυροσίνης (γαλάζιο).

# Αμφολυτικός χαρακτήρας και ισοηλεκτρικό σημείο αμινοξέων



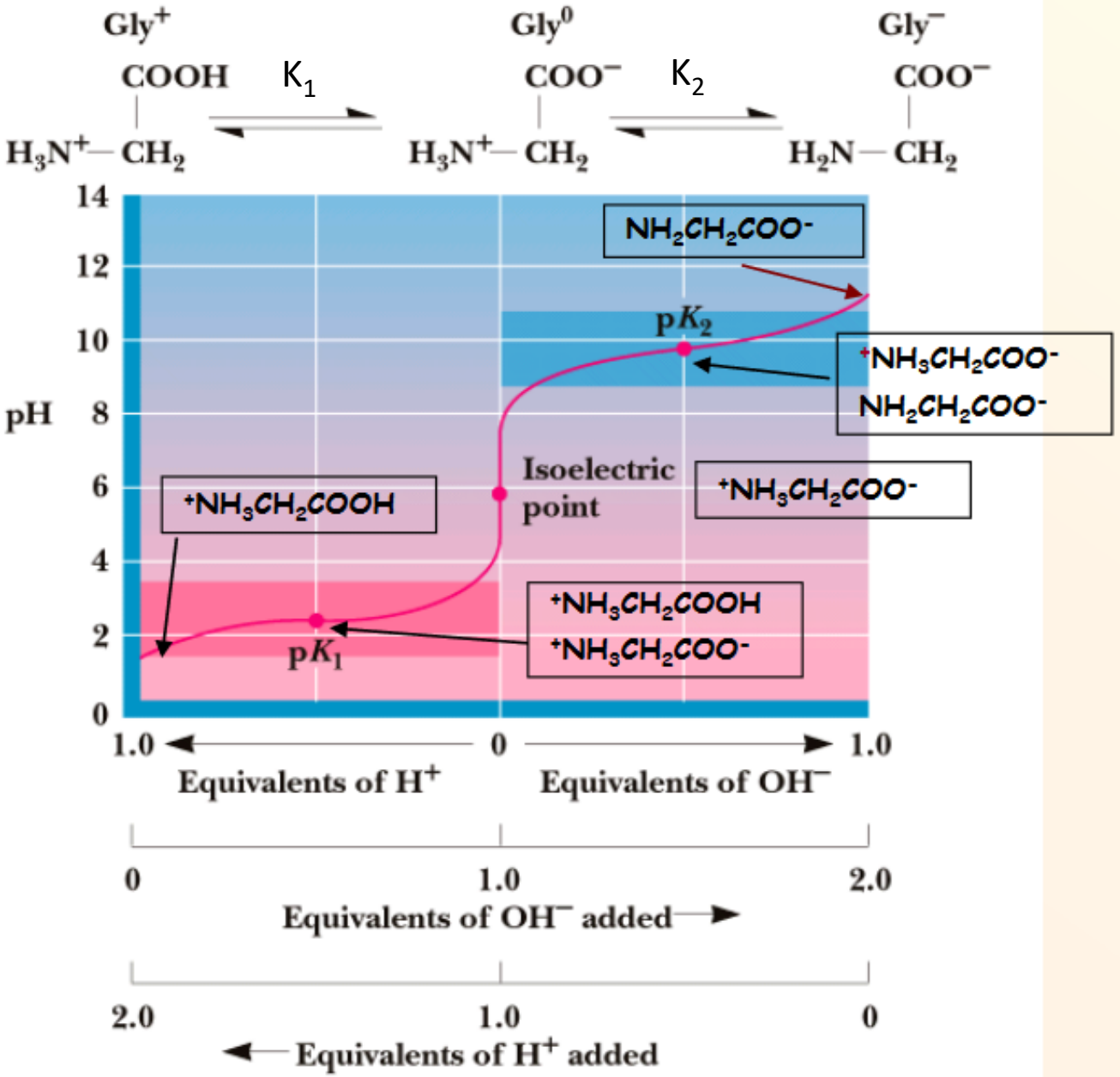

- **ελάχιστη διαλυτότητα**
- **ακίνητα κατά την ηλεκτροφόρηση**

$$pI = (pK_1 + pK_2)/2$$



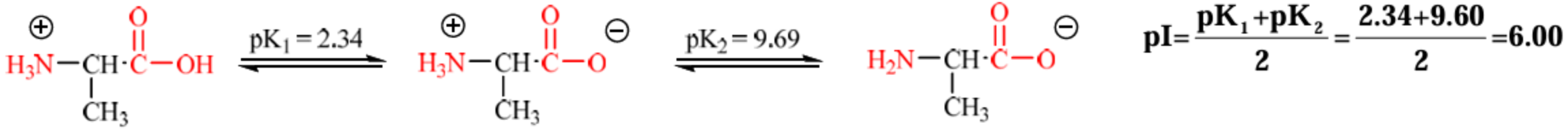

Όταν ένα αμινοξύ είναι ουδέτερο (θετικά και αρνητικά φορτία ίσα) τότε βρίσκεται στο **ισοηλεκτρικό του σημείο (pI)** και έχει τη μορφή **διπολικού ιόντος** (zwitterion).
Το διπολικό ιόν συμπεριφέρεται είτε ως οξύ είτε ως βάση κατά Brönsted-Lowry ανάλογα με τις συνθήκες.

# Τιτλοδότηση γλυκίνης



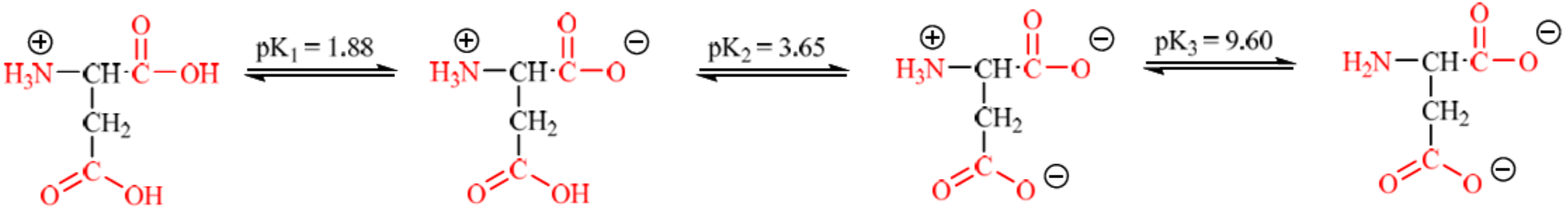

Γύρω από ουδέτερο pH και η α-αμινομάδα και η α-καρβοξυλομάδα ιοντίζονται και το μόριο γίνεται δίπολο. Όταν το διπολικό ιόν τιτλοδοτείται με οξύ η καρβοξυλομάδα δέχεται πρωτόνιο. Το pH όπου $[COO^-]=[COOH]$ είναι το $pK_1$. Ομοίως όταν το διπολικό ιόν τιτλοδοτείται με βάση η ομάδα $NH_3^+$ χάνει ένα πρωτόνιο. Το pH όπου $[NH_3^+]=[NH_2]$ είναι το $pK_2$.

## Ala (A)



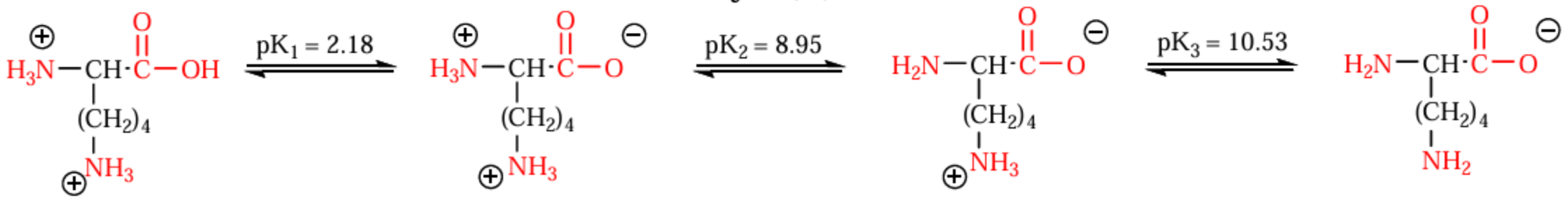

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} = \frac{2.34 + 9.60}{2} = 6.00$$

## Asp (D)




$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2} = \frac{1.88 + 3.65}{2} = 2.76$$

## Lys (K)




$$pI = \frac{pK_2 + pK_3}{2} = \frac{8.95 + 10.53}{2} = 9.74$$

Ουδέτερα αμινοξέα

| Amino acid | $pK_{a1}$* | $pK_{a2}$* | pI |
|---|---|---|---|
| Glycine | 2.34 | 9.60 | 5.97 |
| Alanine | 2.34 | 9.69 | 6.00 |
| Valine | 2.32 | 9.62 | 5.96 |
| Leucine | 2.36 | 9.60 | 5.98 |
| Isoleucine | 2.36 | 9.60 | 6.02 |
| Methionine | 2.28 | 9.21 | 5.74 |
| Proline | 1.99 | 10.60 | 6.30 |
| Phenylalanine | 1.83 | 9.13 | 5.48 |
| Tryptophan | 2.83 | 9.39 | 5.89 |
| Asparagine | 2.02 | 8.80 | 5.41 |
| Glutamine | 2.17 | 9.13 | 5.65 |
| Serine | 2.21 | 9.15 | 5.68 |
| Threonine | 2.09 | 9.10 | 5.60 |

*In all cases $pK_{a1}$ corresponds to ionization of the carboxyl group; $pK_{a2}$ corresponds to deprotonation of the ammonium ion.

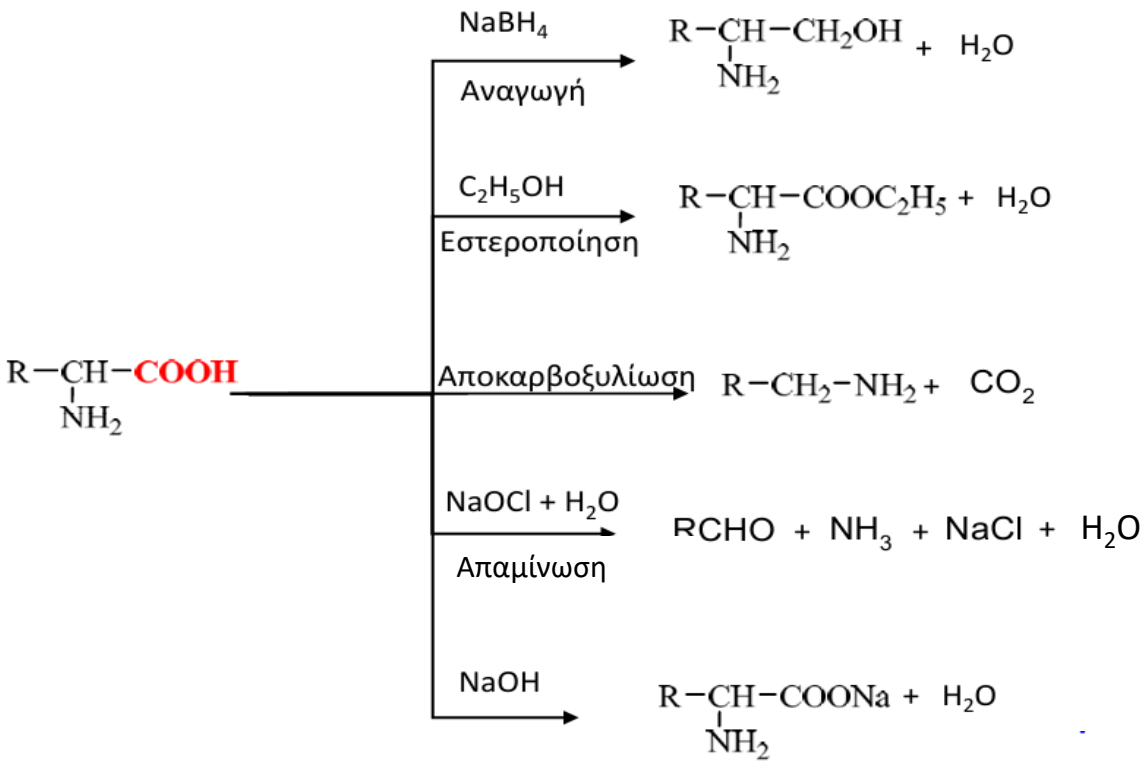
Όξινα αμινοξέα

Βασικά αμινοξέα

| Amino acid | $pK_{a1}$* | $pK_{a2}$ | $pK_{a3}$ | pI |
|---|---|---|---|---|
| Aspartic acid | 1.88 | 3.65 | 9.60 | 2.77 |
| Glutamic acid | 2.19 | 4.25 | 9.67 | 3.22 |
| Tyrosine | 2.20 | 9.11 | 10.07 | 5.66 |
| Cysteine | 1.96 | 8.18 | 10.28 | 5.07 |
| Lysine | 2.18 | 8.95 | 10.53 | 9.74 |
| Arginine | 2.17 | 9.04 | 12.48 | 10.76 |
| Histidine | 1.82 | 6.00 | 9.17 | 7.59 |

*In all cases $pK_{a1}$ corresponds to ionization of the carboxyl group of $RCHCO_2H$ ($NH_3^+$).

# Αμινοξέα- Αντιδράσεις καρβοξυλομάδας

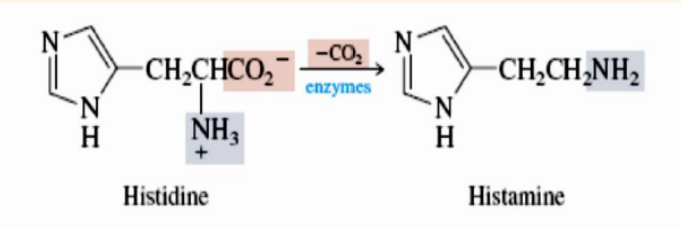



## i. Αντιδράσεις καρβοξυλομάδας -COOH

1. Αναγωγή προς –OH (ταυτοποίηση C-άκρου)
2. Εστεροποίηση
3. <u>Αποκαρβοξυλίωση</u> (ενζυμικώς, με θέρμανση, ή με χημικά μέσα)

   Ενδιαφέρον έχει η μετατροπή **ιστιδίνης** προς ***ισταμίνη***

   (*ισταμίνη* = **βιογενής αμίνη**, ισχυρός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας, ερεθίζει λείους μυς, διεγείρει ροή γαστρικού υγρού)




4. <u>Αντίδραση με βάσεις.</u> Παρασκευή ***γλουταμινικού νατρίου*** (Glu + NaOH)

   = ενισχυτικό γεύσης τροφίμων, ειδικά κρέατος και κρεατοσκευασμάτων

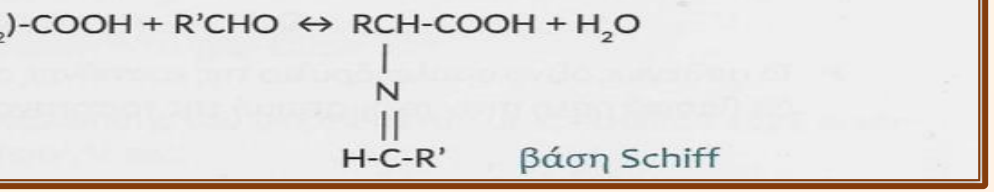
5. **Απαμίνωση**

# Αμινοξέα- Αντιδράσεις αμινομάδας

**ii. Αντιδράσεις αμινομάδας -$NH_2$**

1. Αντίδραση με νινυδρίνη (Ανίχνευση αμινοξέων: ιώδες χρώμα, εξαίρεση= προλίνη και υδροξυπρολίνη: κίτρινο χρώμα) ⇒ ποιοτικός & ποσοτικός προσδιορισμός αμινοξέων
2. Αλκυλίωση (φθορο-δινιτροβενζόλιο ⇒ ταυτοποίηση N-τελικού αμινοξέος)
3. Αντίδραση με $HNO_2$ (εκλύεται $N_2$ ⇒ ποσοτικός προσδιορισμός αμινοξέων κατά Van Slyke)
4. Αντίδραση με φορμόλη ⇒ ποσοτικός προσδιορισμός κατά Sorensen
5. <u>Βάσεις Schiff</u> (R-$CHNH_2$-COOH + R'-CHO μη ενζυμική αμαύρωση)

Η αντιστρεπτή αντίδραση με αλδεΰδες δίνει ευαίσθητες ουσίες (βάσεις Schiff) που σχηματίζονται στα πρώτα στάδια της μη ενζυμικής αμαύρωσης

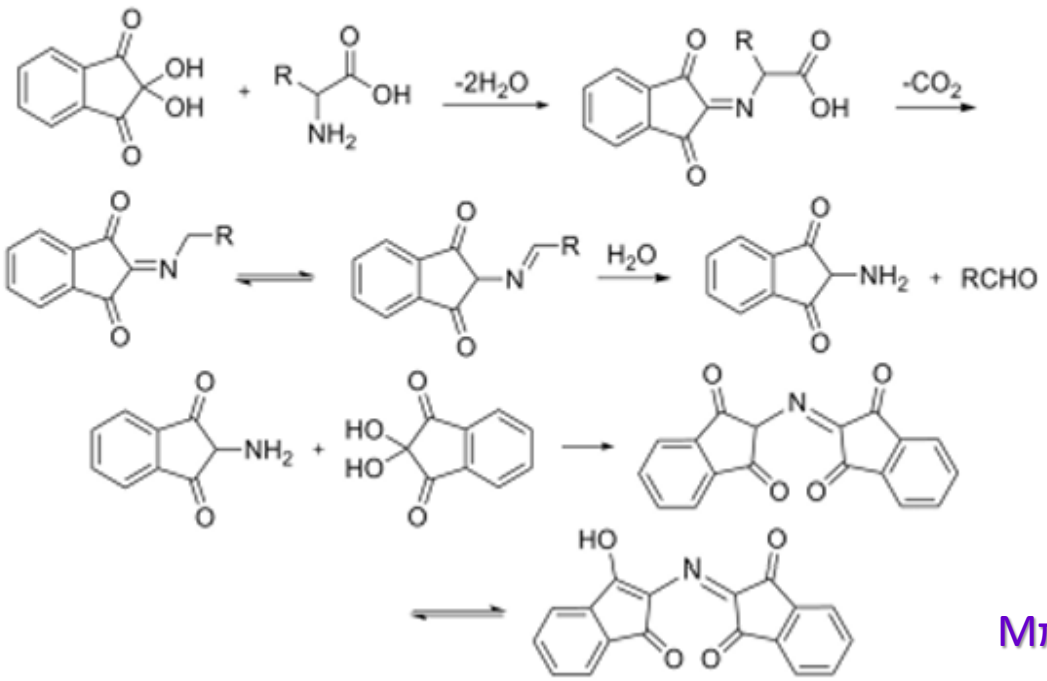



→ Αντιδράσεις Maillard

**iii. Αντιδράσεις υδροξυλομάδας -OH → εστεροποίηση (Ser, Thr, Hyp)**

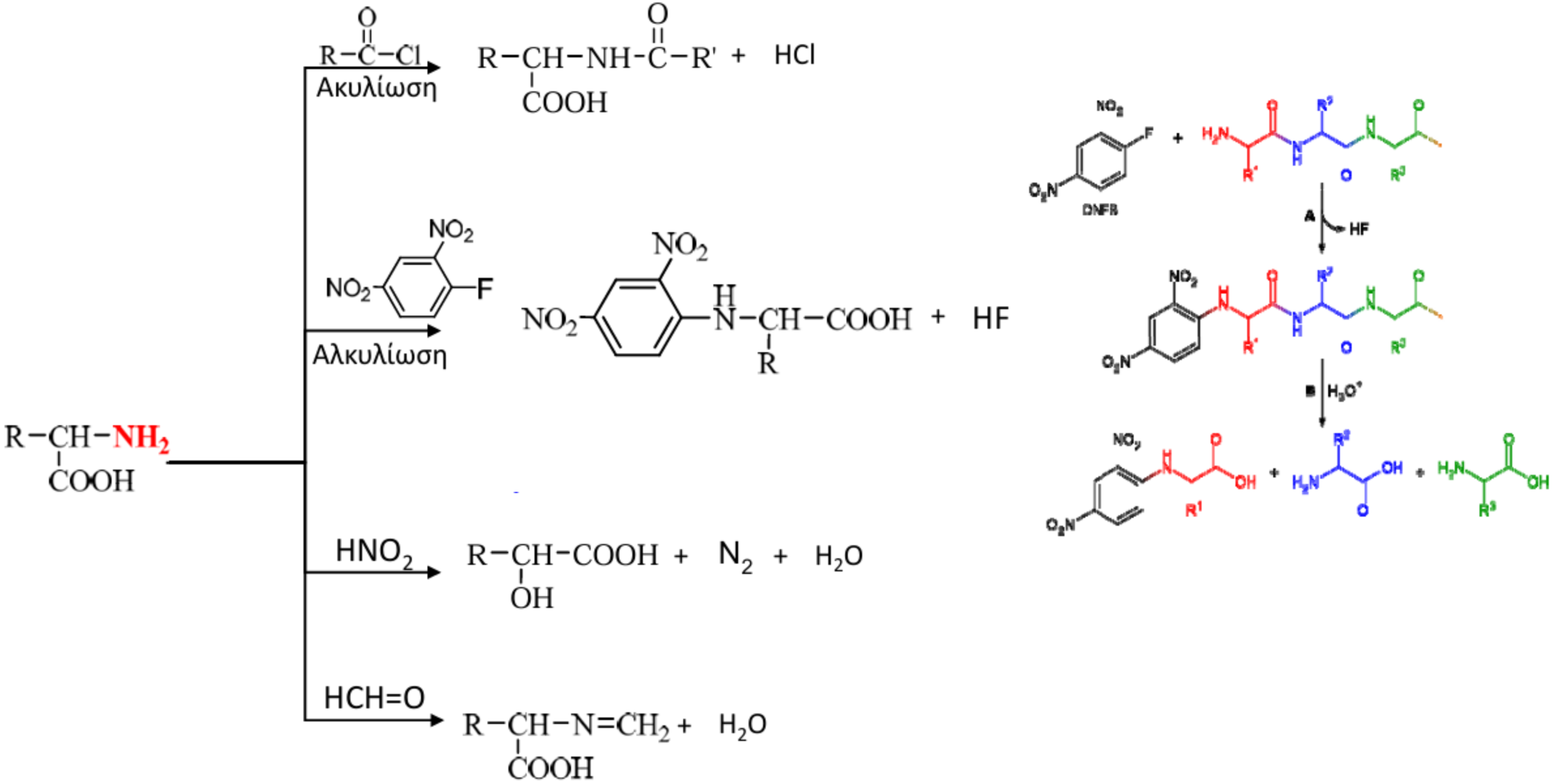
**iv. Αντιδράσεις σουλφυδρυλικής ομάδας -SH (Cys) → οξείδωση ⇒ δισουλφιδικές γέφυρες θείου (S-S) ⇒ δημιουργία σταυροδεσμών (cross-linking)**

# Αντίδραση Νινυδρίνης

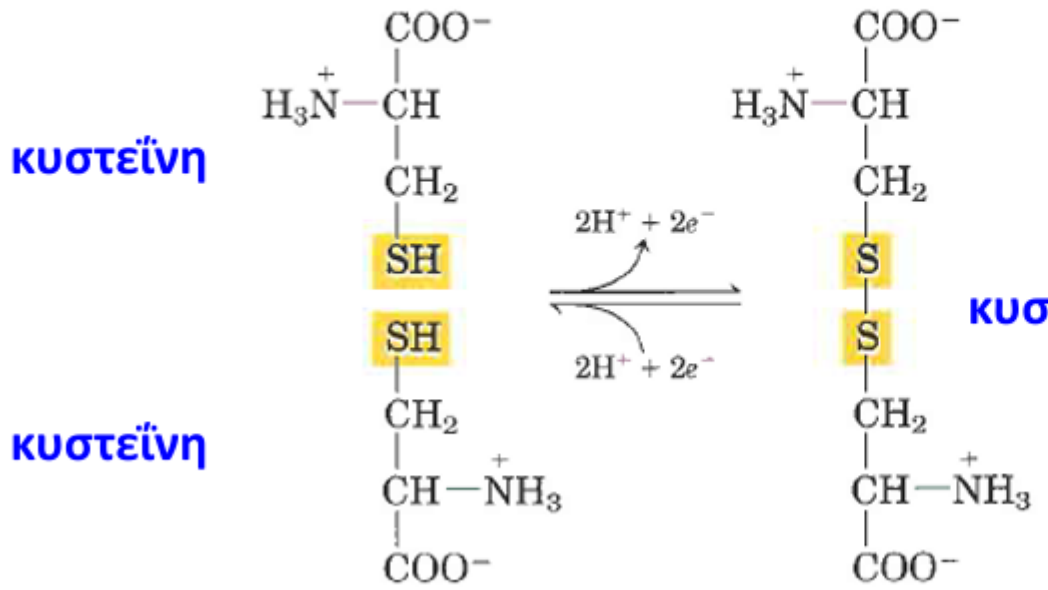



Με νινυδρίνη και θέρμανση τα α-αμινοξέα δίνουν μπλε/ιώδες χρώμα και η αντίδραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό τους σε διάλυμα. Η προλίνη και η υδροξυ-προλίνη δίνουν κίτρινο παράγωγο.

Μπλε/ιώδες


R–CH–NH2
COOH
R–C(=O)–Cl
Ακυλίωση
R–CH(COOH)–NH–C(=O)–R' + HCl
NO2
NO2
F
Αλκυλίωση
NO2
NO2
H
N–CH(R)–COOH + HF
HNO2
R–CH(OH)–COOH + N2 + H2O
HCH=O
R–CH(COOH)–N=CH2 + H2O
DNFB
A
HF
B
H3O+
OH

# iv. Αντιδράσεις σουλφυδρυλικής ομάδας



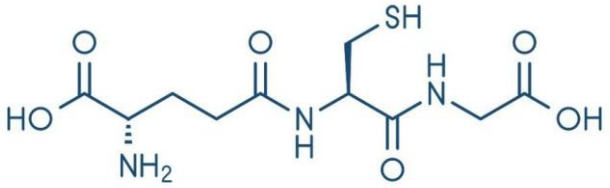

Σημασία για την αρτοποιητική ικανότητα του αλεύρου

# Πεπτίδια

## Γλουταθειόνη (GSH)

Τριπεπτίδιο που αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη, κυστεϊνη και γλουταμινικό οξύ.

Έχει αντιοξειδωτική δράση και προστατεύει τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες.



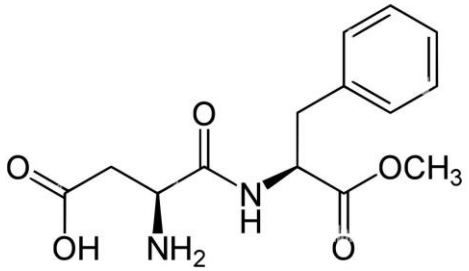




## Ασπαρτάμη

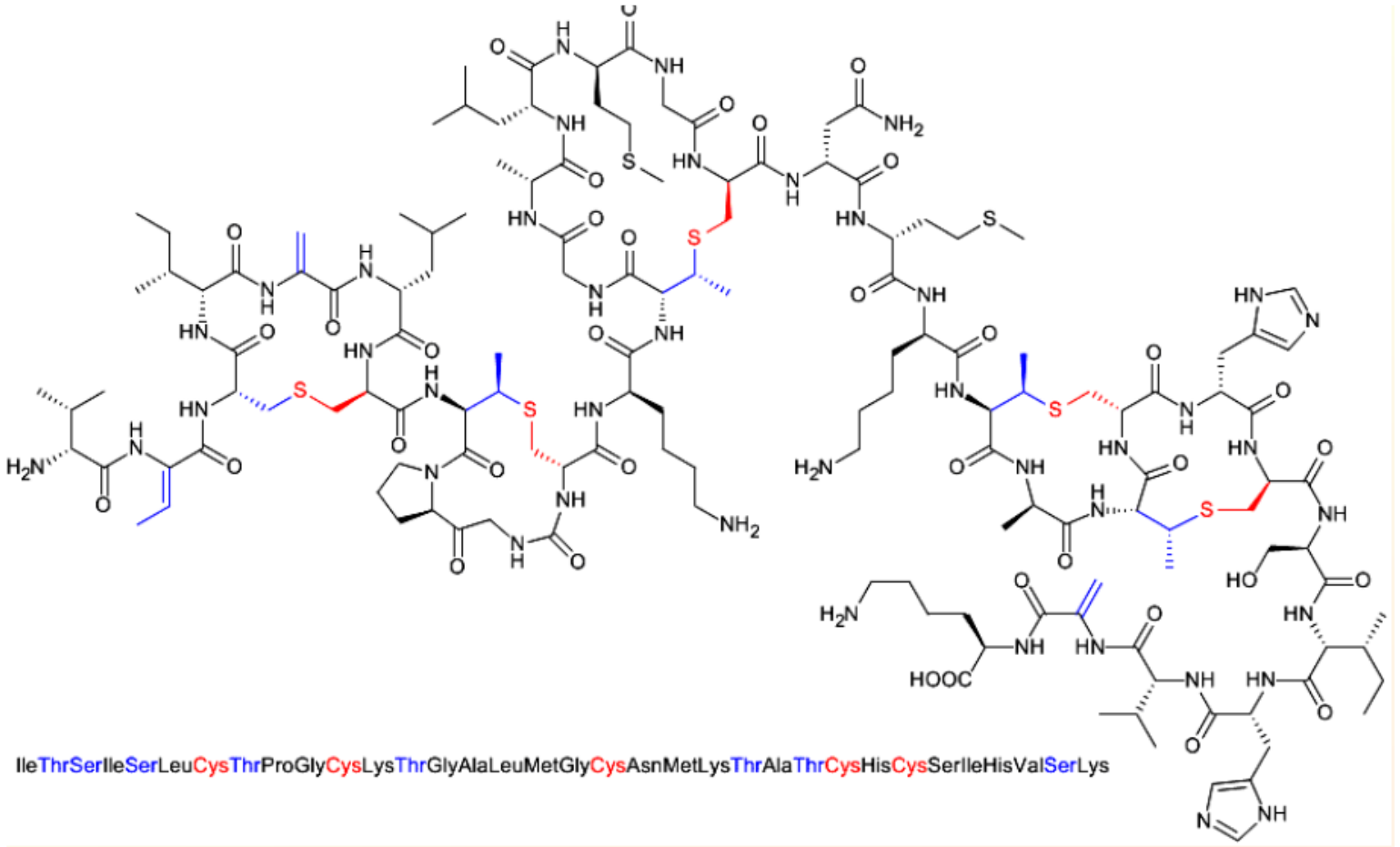
Μεθυλεστέρας του διπεπτιδίου ασπαραγινικού-φαινυλαλανίνης.

Χρησιμοποιείται ως γλυκαντικό στα τρόφιμα.






# Πεπτίδια




## Νισίνη

Πολυκυκλικό πεπτίδιο με 34 αμινοξέα, με αντιβιοτική δράση (φυσικό αντιβιοτικό). Υπάρχει στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Επιτρέπεται η χρήση του σε τρόφιμα ως συντηρητικό.

# Προσδιορισμός πρωτεΐνης σε τρόφιμα



Άμεση μέθοδος: Ανάλυση αμινοξέων

Έμμεσες μέθοδοι: Μέθοδοι Kjeldahl, Dumas, Lowry, Bradford.

Ορισμένες από τις υπάρχουσες μεθόδους απαιτούν εκχύλιση των πρωτεϊνών πριν από την ανάλυση, η αποτελεσματικότητα της οποίας ποικίλει ανάλογα με τη δομή των τροφίμων.
Επιπλέον τα αποτελέσματα προσδιορισμού της πρωτεΐνης επηρεάζονται από τις χρησιμοποιούμενες αναλυτικές μεθόδους, καθιστώντας τις άμεσες συγκρίσεις μεταξύ των μελετών δύσκολες.
Έχει βρεθεί ότι οι περισσότερες έμμεσες αναλυτικές μέθοδοι υπερεκτιμούν την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες.



# Προσδιορισμός αζώτου κατά Kjeldahl
# (έμμεσος προσδιορισμός πρωτεΐνης τροφίμου)

Στη μέθοδο Kjeldahl το αφυδατωμένο δείγμα τροφίμου υποβάλλεται σε πέψη (υγρή χώνευση, wet digestion) σε υψηλή θερμοκρασία με πυκνό θειικό οξύ παρουσία θειικού χαλκού ως καταλύτη. Προστίθεται επίσης ποσότητα θειικού καλίου για να αυξηθεί το σημείο βρασμού.

Υπό αυτές τις συνθήκες το οργανικό υλικό οξειδώνεται, και όλες οι μορφές οργανικού αζώτου μετατρέπονται σε ιόντα αμμωνίου που παραμένουν στο διάλυμα. Μετά την ολοκλήρωση της πέψης το δείγμα γίνεται αλκαλικό με πυκνό διάλυμα NaOH, οπότε τα ιόντα αμμωνίου μετατρέπονται σε αμμωνία, η οποία παραλαμβάνεται με απόσταξη με υδρατμούς και μπορεί στη συνέχεια να προσδιορισθεί με τιτλοδότηση.




Αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι η % (w/w) περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο.



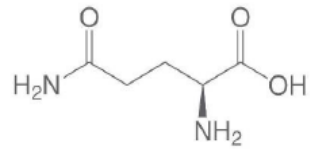
# Σύσταση πρωτεϊνών

## Μέση σύσταση πρωτεϊνών: N=16%, C=50%, H=7%, O=22%, S=0.5-3%

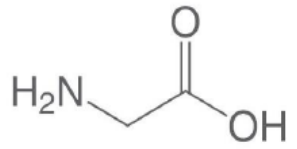
- Οι πρωτεΐνες περιέχουν περίπου 16% (w/w) άζωτο. Για τη μετατροπή της % περιεκτικότητας σε άζωτο σε % περιεκτικότητα πρωτεΐνης χρησιμοποιείται ευρέως ο συντελεστής **6.25** (από το 100/16=6.25). Οι διαφορές στο προφίλ των αμινοξέων διαφόρων κατηγοριών τροφίμων απαιτούν διαφορετικούς συντελεστές για πιο ακριβή αποτελέσματα.

**ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ:**

1. Οι πρωτεΐνες των δημητριακών έχουν υψηλή περιεκτικότητα **γλουταμίνης** (Mr=146.14, N=19.2%, με αποτέλεσμα υψηλότερη περιεκτικότητα σε άζωτο, οπότε χρησιμοποιούμε χαμηλότερο συντελεστή μετατροπής: **5.70**.
2. Περίπου το ένα τρίτο των αμινοξέων της ζελατίνης είναι γλυκίνη (Mr=75.07, N=18.6% w/w), γεγονός που αυξάνει επίσης την περιεκτικότητα σε άζωτο και απαιτείται μικρότερος συντελεστής **5.55**.
3. Για το κρέας χρησιμοποιείται ικανοποιητικά ο συντελεστής **6.25**, αλλά για το γάλα και το αυγό, αντίστοιχα απαιτούνται μεγαλύτεροι συντελεστές: **6.38** και **6.68** αντίστοιχα
4. Τα μανιτάρια περιέχουν σημαντική ποσότητα μη πρωτεϊνικού Ν υπό μορφή χιτίνης, οπότε απαιτείται μικρότερος συντελεστής: **4.76**

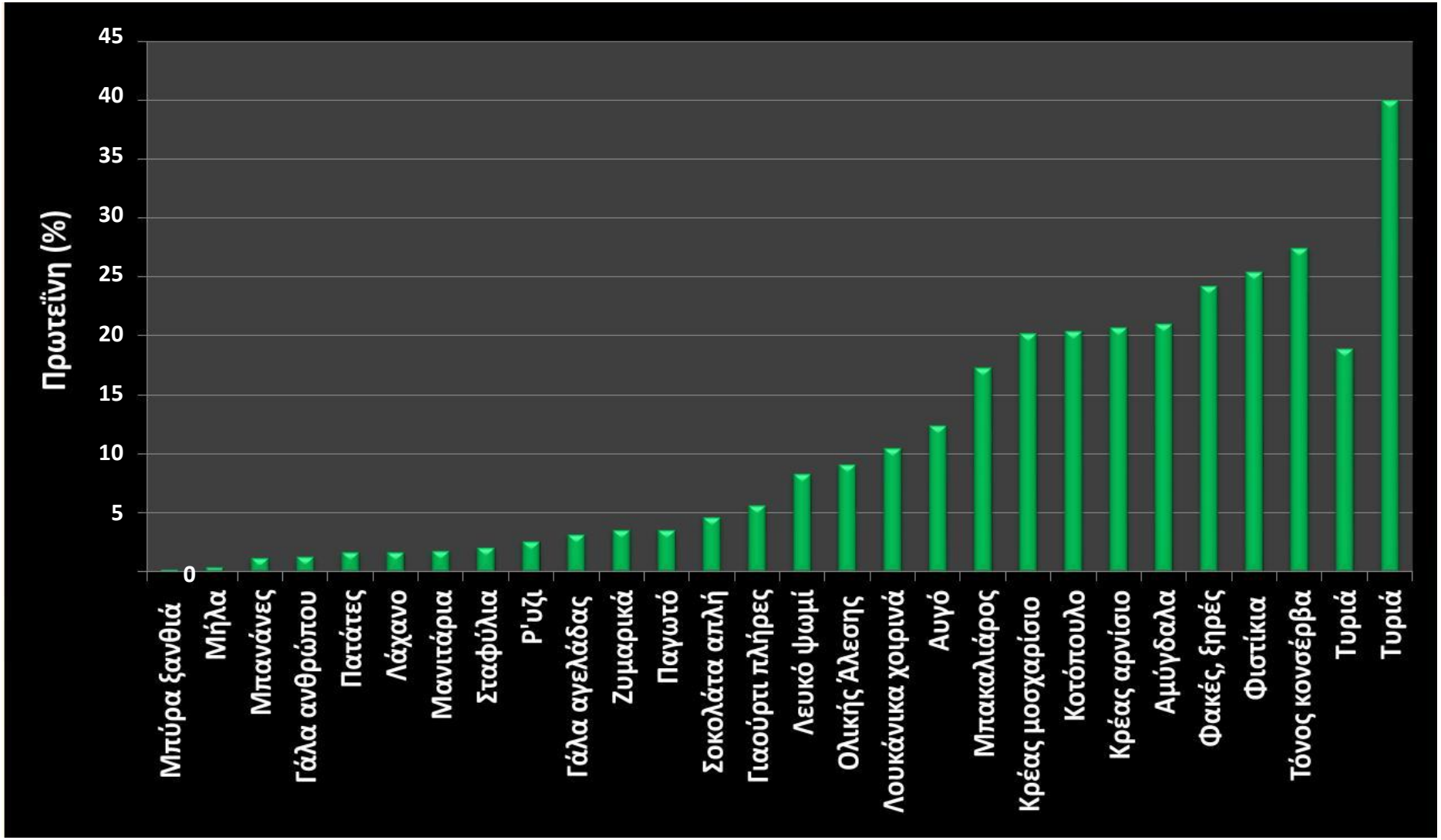


Γλουταμίνη



Γλυκίνη

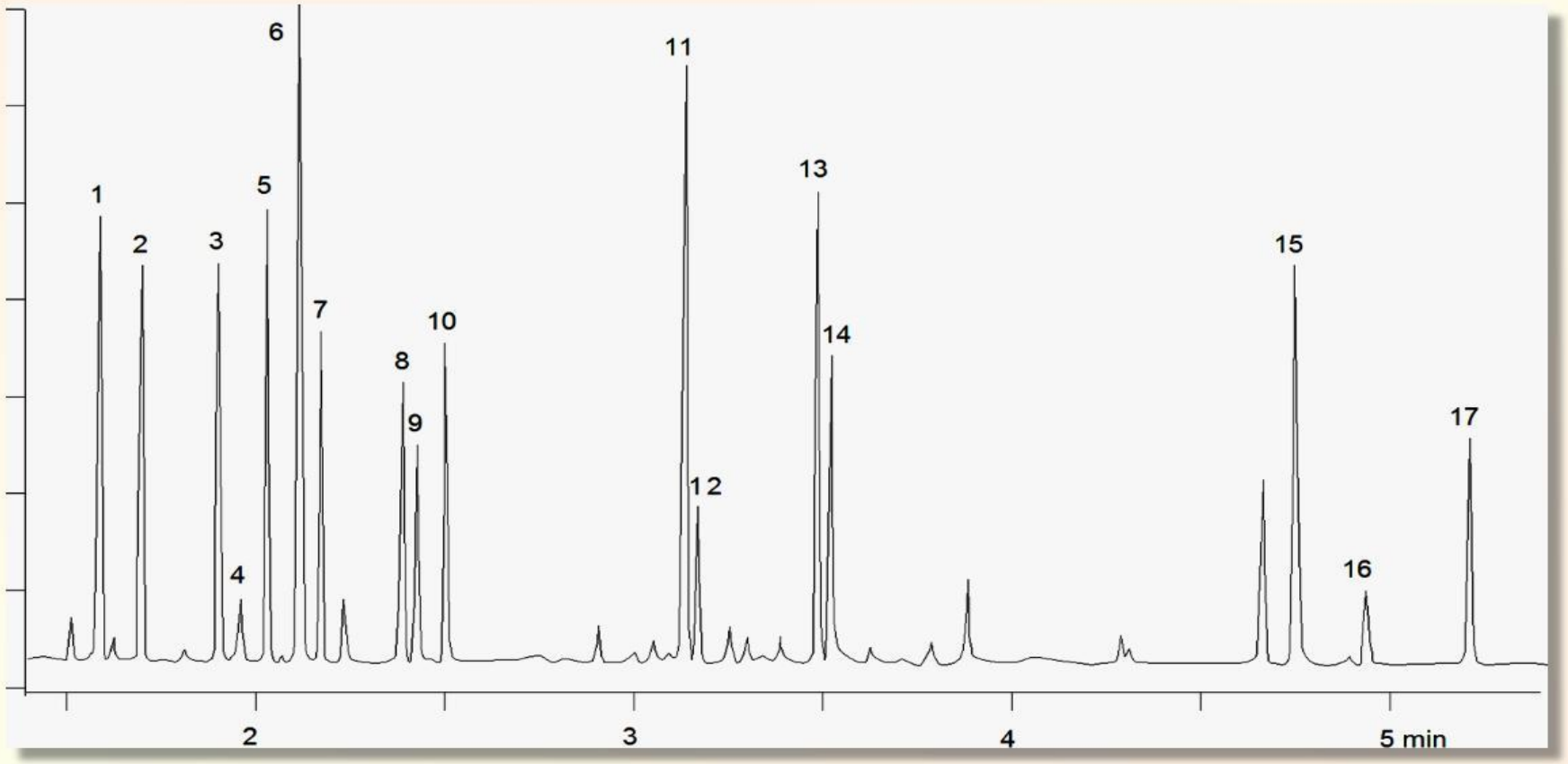
# Περιεκτικότητα διαφόρων τροφίμων σε πρωτεΐνη



# Περιεκτικότητα πρωτεΐνης διαφόρων τροφίμων σε αμινοξέα (g ανά 100g)

| Αμινοξύ | Αρακάς | Σιτάλευρο | Στήθος κοτόπουλο | Βοδινό μπριζόλα | Αυγό | Γάλα αγελάδας | Μητρικό γάλα | Μπακαλιάρος φιλέτο |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ισολευκίνη | 4.7 | 3.9 | 4.8 | 4.9 | 5.6 | 4.9 | 5.3 | 5.2 |
| Λευκίνη | 7.5 | **7.0** | 7.8 | 7.6 | **8.3** | **9.1** | **9.9** | **8.3** |
| Λυσίνη | 8.0 | 1.9 | **9.3** | **8.7** | 6.3 | 7.4 | 7.1 | **9.6** |
| Μεθειονίνη | 1.0 | 1.6 | 2.5 | 2.6 | 3.2 | 2.6 | 1.5 | 2.8 |
| Κυστεΐνη | 1.2 | 2.6 | 1.3 | 1.2 | 1.8 | 0.8 | 2.0 | 1.1 |
| Φαινυλαλανίνη | 5.0 | 4.8 | 4.7 | 4.3 | 5.1 | 4.9 | 3.8 | 4.0 |
| Τυροσίνη | 3.0 | 2.6 | 3.6 | 3.7 | 4.0 | 4.1 | 3.0 | 3.4 |
| Θρεονίνη | 4.3 | 2.7 | 4.3 | 4.5 | 5.1 | 4.4 | 4.5 | 4.7 |
| Τρυπτοφάνη | 1.0 | 1.1 | 1.1 | 1.2 | 1.8 | 1.3 | 2.3 | 1.1 |
| Βαλίνη | 5.0 | 4.4 | 5.0 | 5.1 | 7.6 | 6.6 | 6.8 | 5.6 |
| Αργινίνη | **10.0** | 3.6 | 6.5 | 6.4 | 6.1 | 3.6 | 3.8 | 6.2 |
| Ιστιδίνη | 2.4 | 2.1 | 3.1 | 3.5 | 2.4 | 2.7 | 2.5 | 2.8 |
| Αλανίνη | 4.5 | 3.1 | 6.0 | 6.1 | 5.4 | 3.6 | 4.2 | 6.7 |
| Ασπαραγινικό οξύ | **11.9** | 4.4 | **9.4** | **9.1** | **10.7** | 7.7 | 9.1 | 10.2 |
| Γλουταμινικό οξύ | **17.3** | **32.9** | **17.1** | **16.5** | **12.0** | **20.6** | **17.4** | **14.8** |
| Γλυκίνη | 4.3 | 3.2 | 5.1 | 5.6 | 3.0 | 2.0 | 2.5 | 4.6 |
| Προλίνη | 4.1 | 1.3 | 4.3 | 4.9 | 3.8 | **8.5** | **9.9** | 4.0 |
| Σερίνη | 4.7 | **5.6** | 4.1 | 4.3 | 7.9 | 5.2 | 4.3 | 4.8 |

# Αμινοξέα σε υδρόλυμα κρέατος




- 1. ALA
- 2. GLY
- 3. VAL
- 4. BAIB*
- 5. NORVALINE**
- 6. LEU
- 7. ILE
- 8. THR
- 9. SER
- 10. PRO
- 11. ASP
- 12. MET
- 13. GLU
- 14. PHE
- 15. LYS
- 16. HIS
- 17. TYR

* BAIB= β-αμινοϊσο-βουτυρικό

** NORVALINE= εσωτερικό πρότυπο

Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

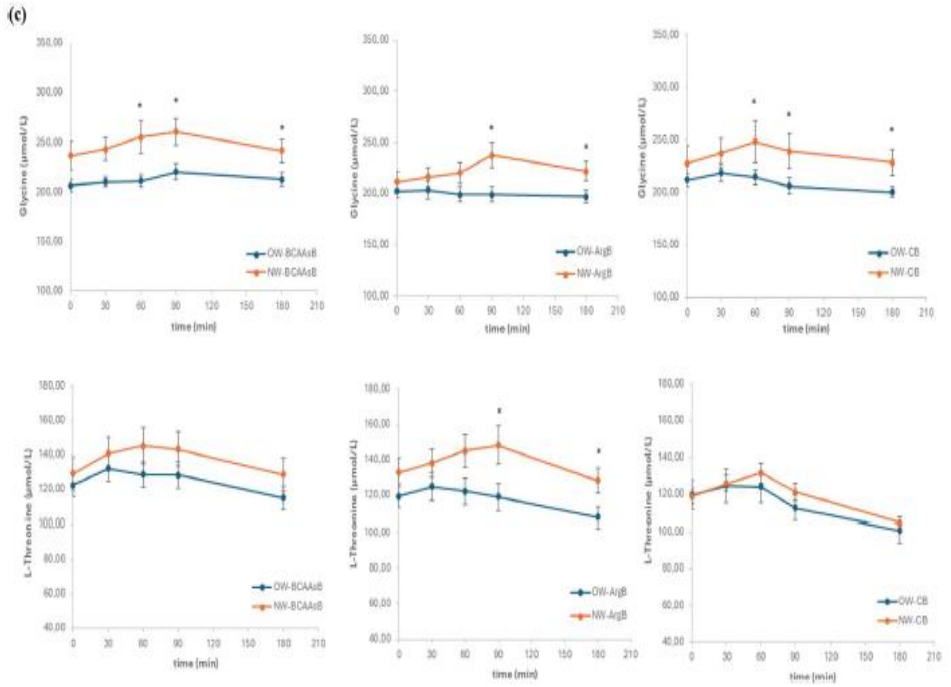
# Αμινοξέα αίματος νορμοβαρών και υπέρβαρων ατόμων

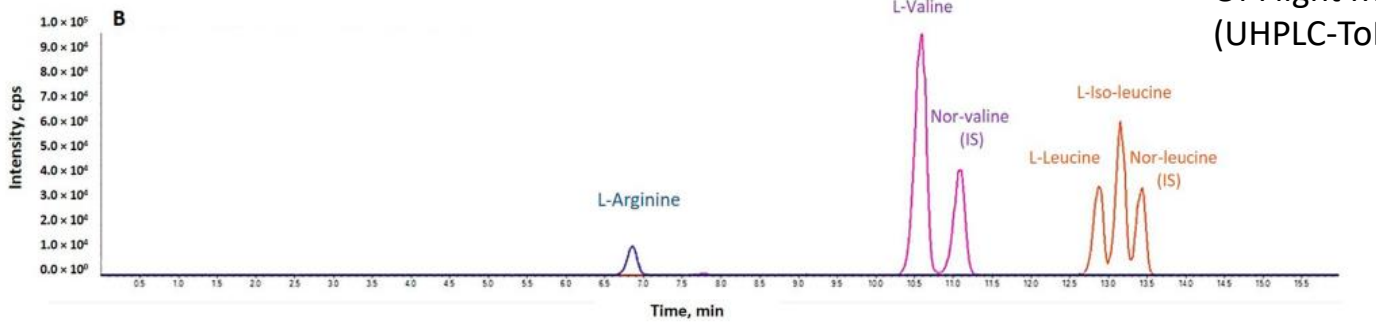
**Table 4** Fasting plasma amino acids concentrations of normalweight (n=15) and overweight/obese subjects (n=15)

| Amino acid (μmol/L) | Normalweight (n=15) | Overweight/ obese (n=15) | *p* value |
|---|---|---|---|
| L-Alanine | 268.96±9.83 | 245.40±8.47 | 0.090 |
| L-Arginine | 69.89±3.68 | 68.91±2.25 | 0.828 |
| L-Asparagine | 49.71±1.88 | 47.19±1.32 | 0.298 |
| L-Aspartic acid | 7.22±1.18 | 6.90±0.29 | 0.801 |
| L-Glutamic acid | 70.12±6.07 | 76.24±7.92 | 0.559 |
| L-Glutamine | 527.48±18.26 | 445.33±13.66 | **0.002** |
| Glycine | 224.07±8.67 | 204.40±4.22 | 0.059 |
| L-Histidine | 80.32±2.97 | 76.83±1.63 | 0.328 |
| Hydroxy-L-Proline | 11.43±0.95 | 12.62±1.15 | 0.447 |
| L-Isoleucine | 54.27±2.53 | 61.72±2.52 | 0.053 |
| L-Leucine | 115.24±4.84 | 115.67±3.80 | 0.946 |
| L-Lysine | 137.20±6.70 | 137.97±5.51 | 0.760 |
| L-Methionine | 22.12±0.93 | 27.05±0.92 | **0.001** |
| L-Phenylalanine | 50.64±1.71 | 53.50±1.12 | 0.186 |
| L-Proline | 155.22±9.58 | 165.02±11.80 | 0.538 |
| L-Serine | 110.41±6.70 | 100.21±2.59 | 0.181 |
| L-Threonine | 126.44±5.63 | 117.92±3.87 | 0.238 |
| L-Tryptophan | 54.30±1.94 | 59.24±1.18 | **0.044** |
| L-Tyrosine | 53.49±1.79 | 59.50±1.27 | **0.013** |
| L-Valine | 222.84±6.70 | 225.65±6.98 | 0.781 |
| D, L-alpha-Aminobutyric acid | 21.94±1.42 | 20.61±0.89 | 0.450 |
| L-Citrulline | 32.22±2.01 | 29.06±1.36 | 0.218 |
| L-Ornithine | 50.70±2.35 | 56.35±2.80 | 0.147 |
| Taurine | 65.02±4.11 | 71.78±4.18 | 0.275 |

Values are presented as mean±SEM. Numbers in bold indicate significant differences between the two groups of subjects at a significance level of $p<0.05$






https://doi.org/10.1007/s00394-025-03759-x

ORIGINAL CONTRIBUTION

## Amino acid composition of plant protein-enriched wheat biscuits differentially affects postprandial amino acid responses of overweight/obese compared to normalweight subjects

Amalia E. Yanni[1] · Maria-Christina Kanata[1] · Varvara Papaioannou[2] · Maria Halabalaki[2] · Vaios T. Karathanos[1]

*nutrients* MDPI

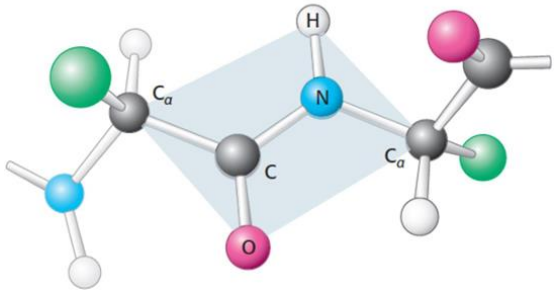
*Article*

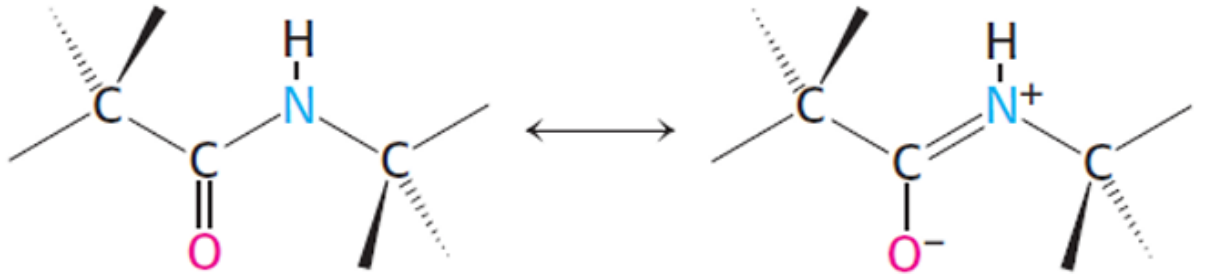
## Postprandial Glucose and Gastrointestinal Hormone Responses of Healthy Subjects to Wheat Biscuits Enriched with L-Arginine or Branched-Chain Amino Acids of Plant Origin

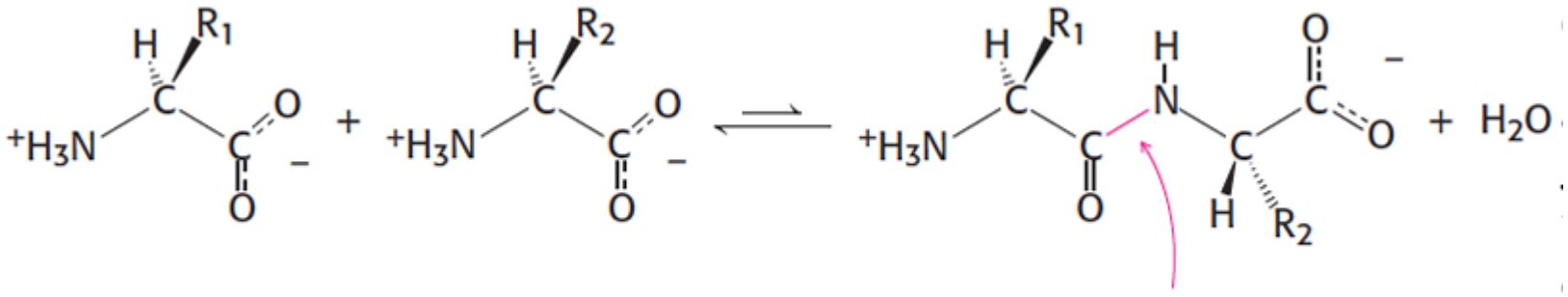
Amalia E. Yanni [1,*], Alexander Kokkinos [2], Panagiota Binou [1], Varvara Papaioannou [3], Maria Halabalaki [3], Panagiotis Konstantopoulos [4], Stamatia Simati [2] and Vaios T. Karathanos [1]

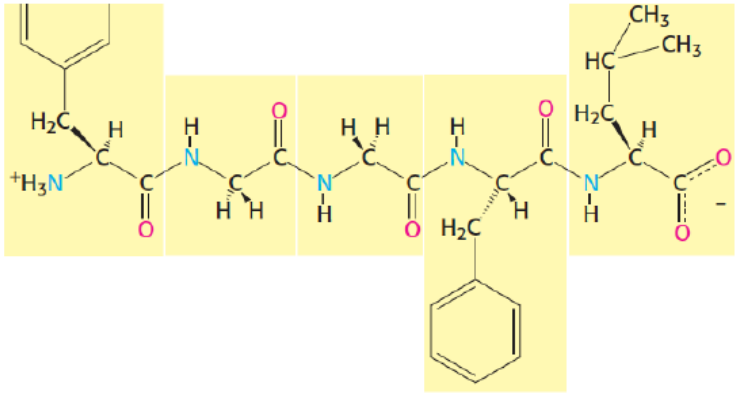
Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with Time Of Flight Mass Spectrometry (UHPLC-ToF-MS)

# Πρωτεΐνες – Πρωτοταγής δομή



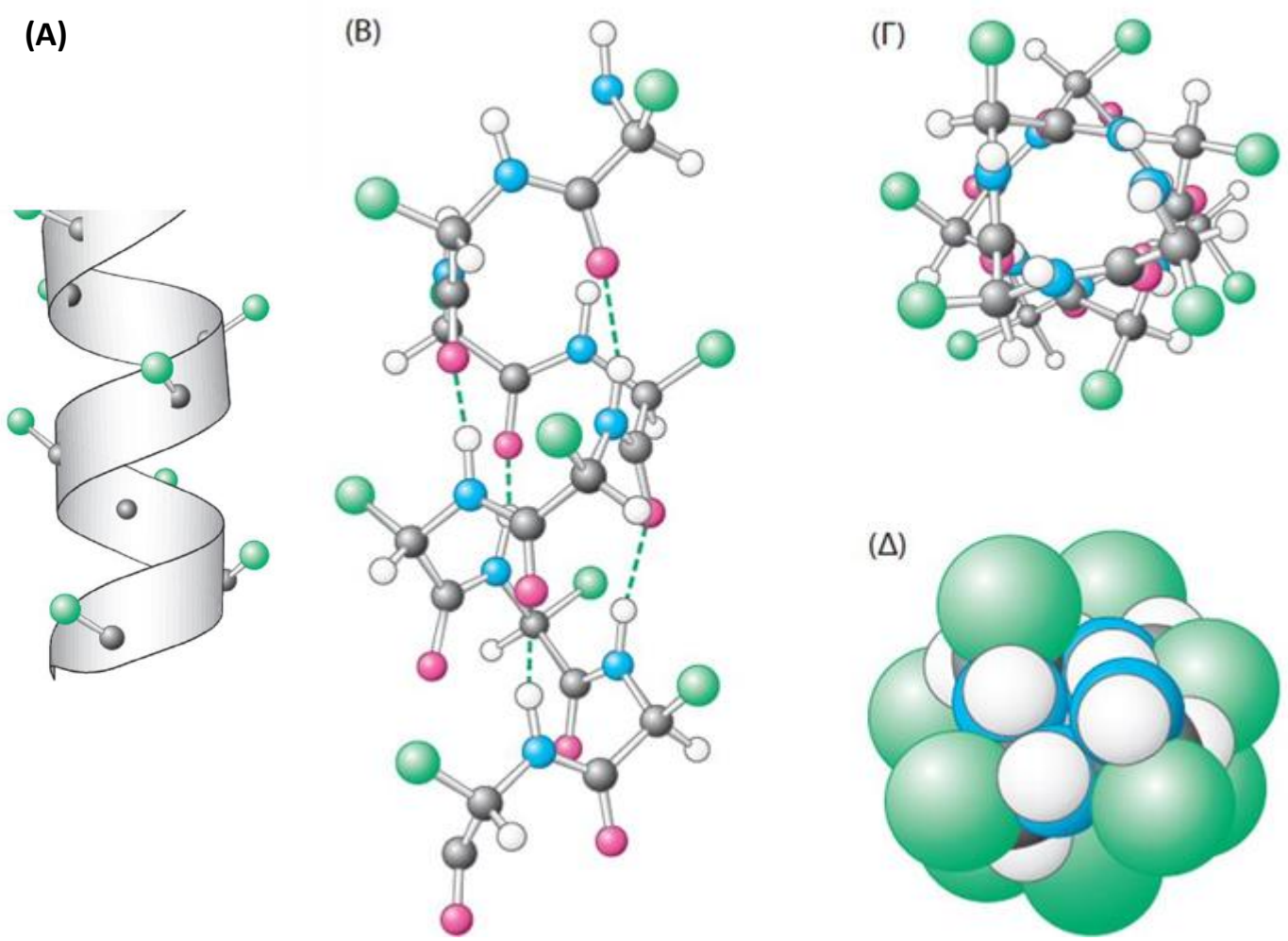




Πρωτοταγής δομή: Η γραμμική αλληλουχία και ο αριθμός των αμινοξέων που αποτελούν την πρωτεΐνη.

Κάθε πρωτεΐνη έχει μοναδική, καθορισμένη αλληλουχία αμινοξέων που καθορίζει την πρωτοταγή δομή της.

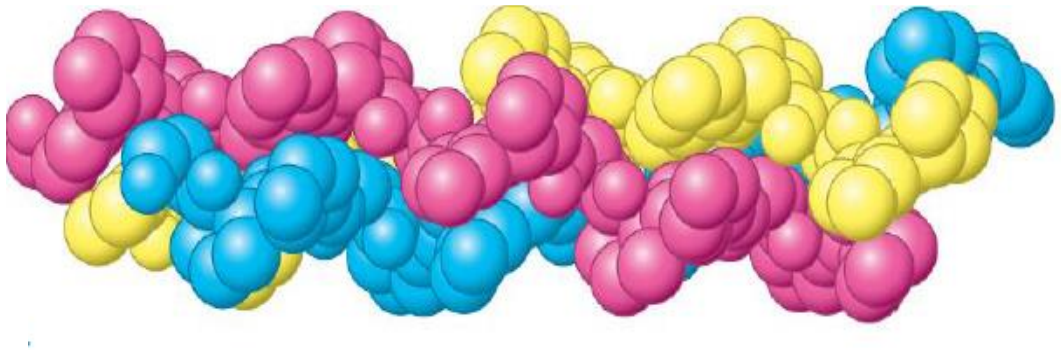
# Πρωτεΐνες – Δευτεροταγής δομή




## α-έλικα

- Δομή σπειράματος που σταθεροποιείται με ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου
- 3,6 αμινοξέα ανά στροφή
- Η δομή καθορίστηκε για πρώτη φορά από τον Linus Pauling (Nobel Χημείας 1954)
- Το 25% των πρωτεϊνών βρίσκονται σε αυτή τη μορφή

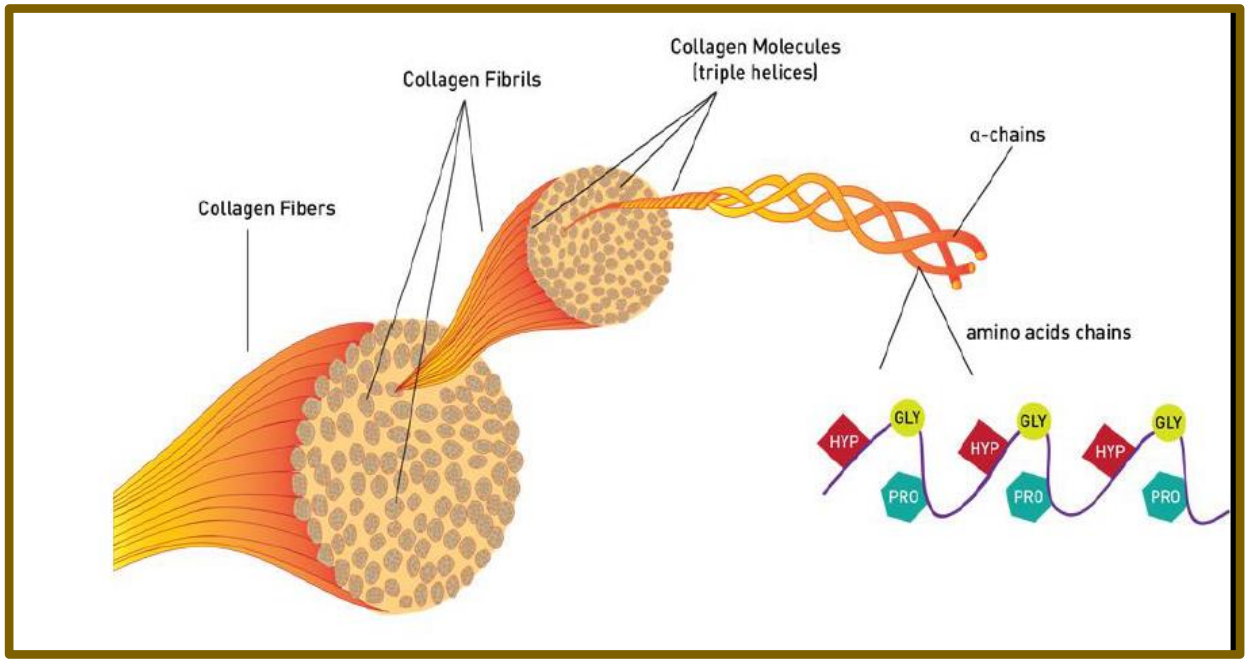
# Δομή κολλαγόνου – τριπλή έλικα



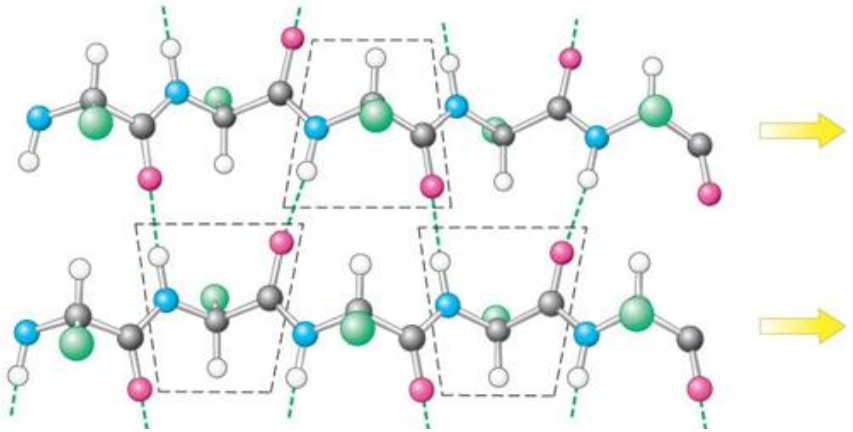
Κολλαγόνο: πρώτη σε αφθονία πρωτεΐνη των θηλαστικών. Το κολλαγόνο είναι το κύριο ινώδες συστατικό στο δέρμα, τα οστά, τους τένοντες, τους χόνδρους και τα δόντια.

Στο κολλαγόνο δεν ευνοείται η δομή α-έλικας λόγω της μεγάλης αναλογίας σε γλυκίνη και προλίνη. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζουν οι πεπτιδικοί δεσμοί της γλυκίνης δημιουργούν μια έλικα από τρεις πλεγμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

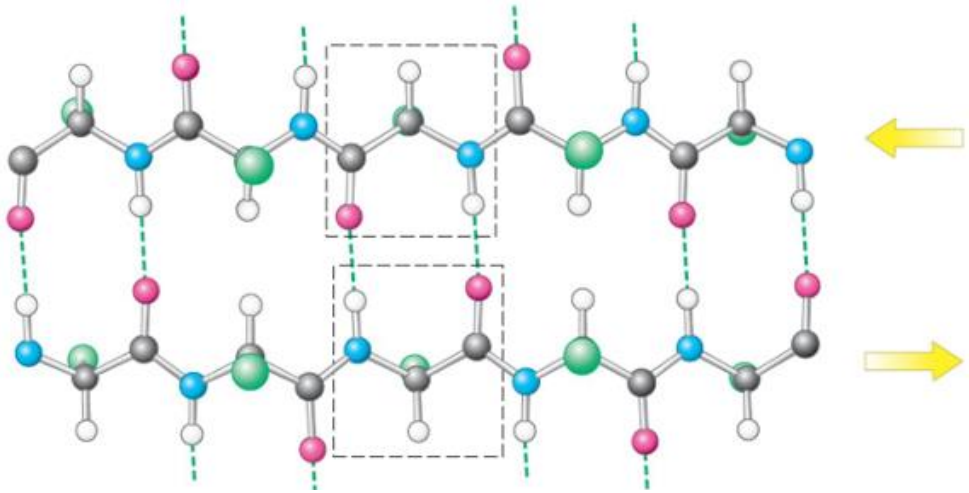
Γλυκίνη, προλίνη, ΟΗ-προλίνη, ΟΗ-λυσίνη



# Πρωτεΐνες – Δευτεροταγής δομή



Παράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια

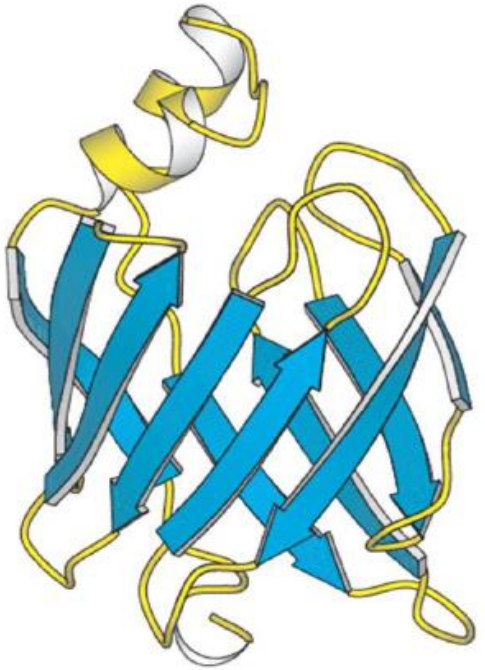


Αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια

## β-πτυχωτή επιφάνεια

β-πτυχώσεις που σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Είναι σχεδόν πλήρως εκτεταμένη δομή, αντίθετα από τη β-έλικα.

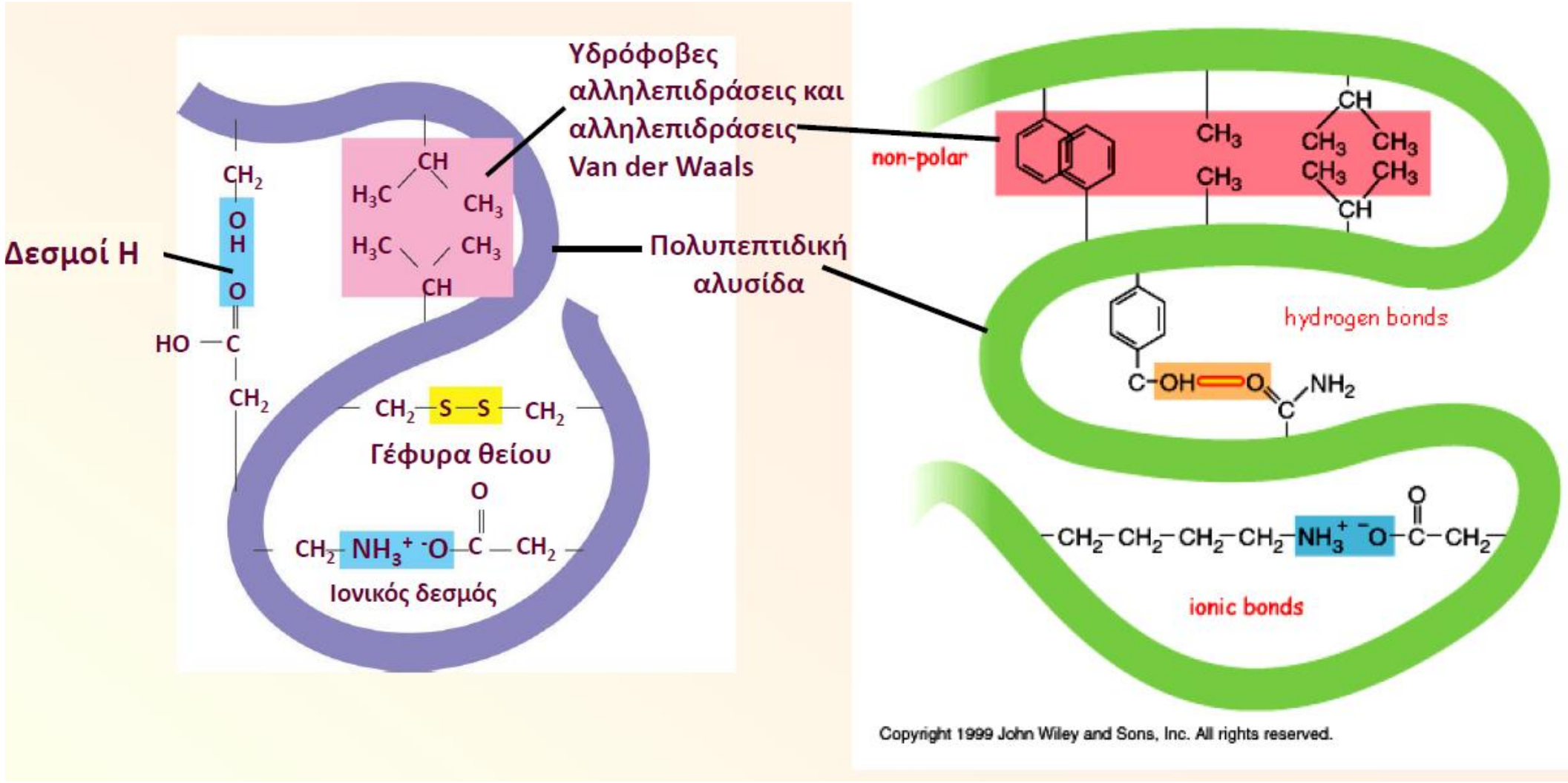
Ονομάζεται βήτα γιατί ήταν η δεύτερη δομή που προσδιορίστηκε.



ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, ΤΟΜΟΣ Ι – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ

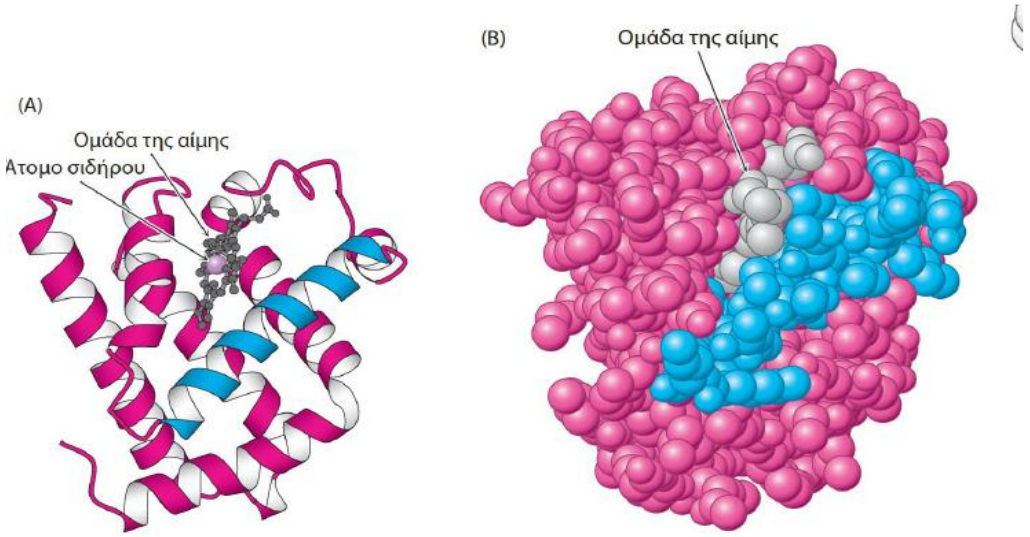
# Πρωτεΐνες – Τριτοταγής δομή

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων R- των πολυπεπτιδικών αλυσίδων



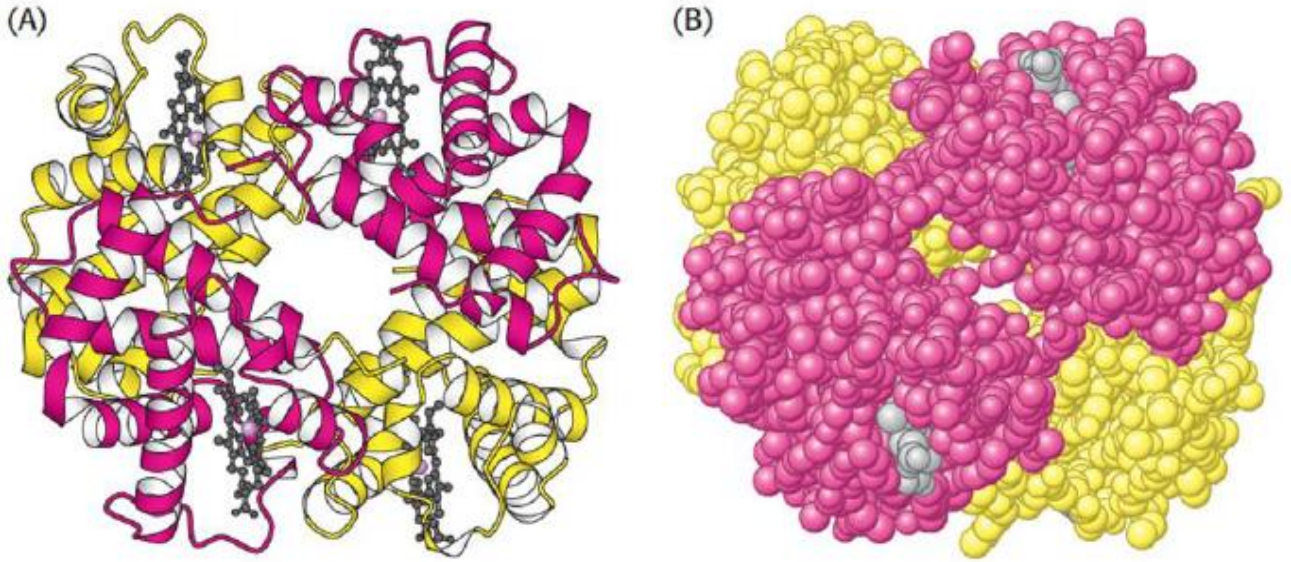
# Πρωτεΐνες – Τεταρτοταγής δομή

Οργάνωση του μακρομορίου με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων, τύπου ίδιου με αυτόν που συναντούμε στην τριτοταγή δομή.




**Δυνάμεις που επιδρούν στη σταθερότητα της πρωτεϊνικής δομής**

- Στερεοχημικές παρεμποδίσεις
- Αλληλεπιδράσεις van der Waals
- Δεσμοί υδρογόνου
- Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις
- Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις
- Δισουλφιδικοί δεσμοί



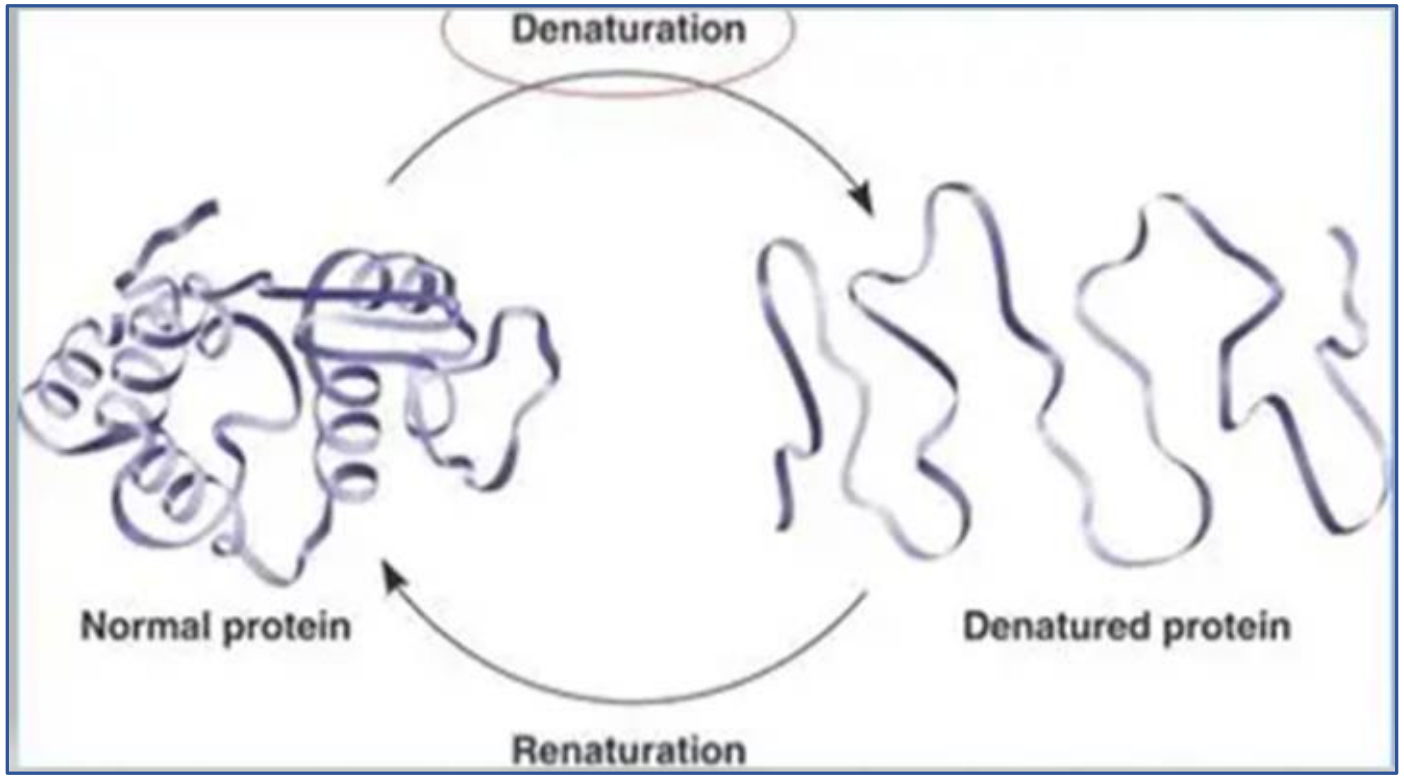

Αιμοσφαιρίνη

# Μετουσίωση πρωτεϊνών

Η φυσική δομή μιας πρωτεΐνης είναι το αποτέλεσμα ελκτικών και απωστικών αλληλεπιδράσεων που προέρχονται από ενδομοριακές δυνάμεις καθώς και αλληλεπιδράσεων με το περιβάλλον υδατικό μέσο.

Μεταβολές στο περιβάλλον όπως pH, θερμοκρασία, σύσταση διαλύτη θα επιδράσουν στις ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες δυνάμεις εντός του μορίου και το μόριο θα λάβει μια νέα δομή ισορροπίας.

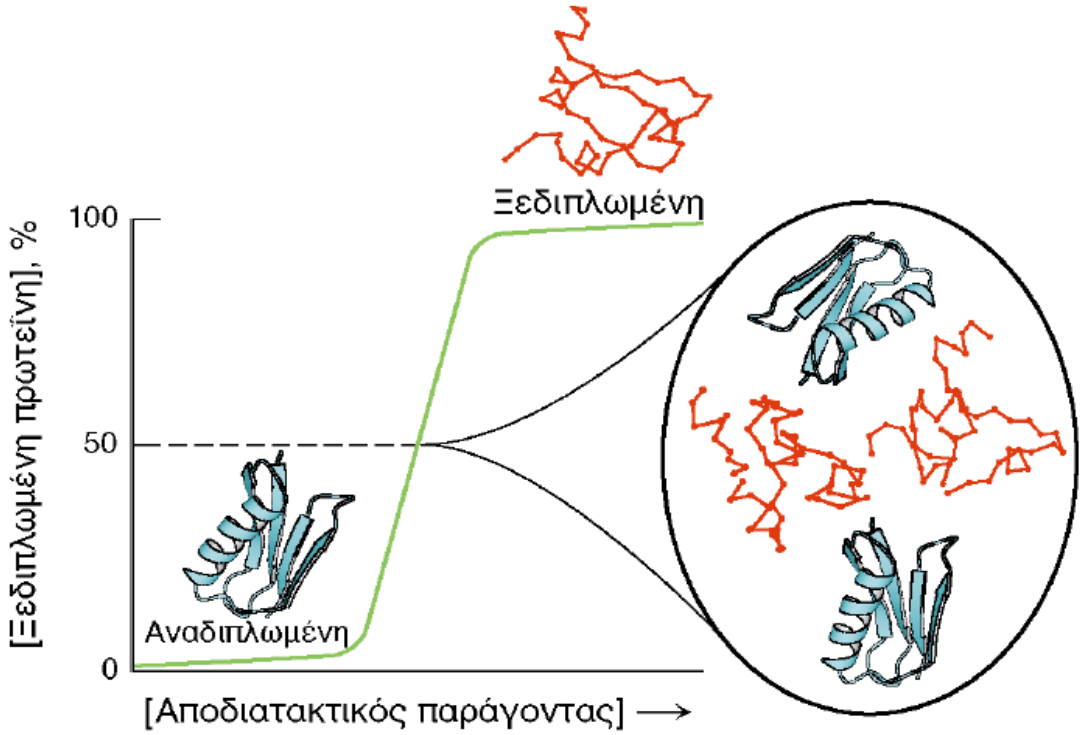
**Μετουσίωση** είναι ένα φαινόμενο όπου μια καλά ορισμένη αρχική κατάσταση μιας πρωτεΐνης που σχηματίστηκε υπό φυσιολογικές συνθήκες μετασχηματίζεται σε μια αόριστη τελική κατάσταση υπό μη φυσιολογικές συνθήκες λόγω της παρουσίας ενός παράγοντα μετουσίωσης.



# Μετουσίωση πρωτεϊνών

- Επειδή η δομή είναι μια παράμετρος που δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθεί εύκολα, η άμεση μέτρηση δεν είναι δυνατή.

- Μέτρηση φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών:
  - Απορρόφηση στο UV
  - Φθορισμός
  - Ιξώδες
  - Συντελεστής καταβύθισης
  - Οπτική περιστροφή
  - Ενζυμική δραστικότητα



# Μετουσίωση πρωτεϊνών των τροφίμων

- Προκαλεί απώλεια διαλυτότητας και ορισμένων λειτουργικών ιδιοτήτων. Μπορεί να είναι επιθυμητή ή μη επιθυμητή.
- Επιθυμητή: Αύξηση πεπτικότητας, βελτίωση αφριστικών και γαλακτοματοποιητικών ιδιοτήτων, σχηματισμός πηκτής με θέρμανση.
- Μη επιθυμητή: Στα πρωτεϊνικά ροφήματα μπορεί να προκαλέσει συσσωμάτωση και καταβύθιση κατά την αποθήκευση και να επηρεάσει δυσμενώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.



# Αποτελέσματα και Παράγοντες μετουσίωσης

*Η μετουσίωση (denaturation) μπορεί να επηρεάσει τη 2ταγή, 3ταγή, 4ταγή δομή:*

1. Αποδίπλωση (ξεδίπλωμα) πρωτεΐνης
2. Διάσπαση κάποιων δεσμών (όχι των πολύ σταθερών πεπτιδικών)
3. Έκθεση υδρόφοβων δεσμών (κανονικά στο εσωτερικό) στο διαλύτη
4. Ελάττωση διαλυτότητας
5. Αδύνατη η κρυστάλλωση
6. Αύξηση ιξώδους
7. Ευκολότερη η υδρόλυση πεπτιδικών δεσμών
8. Απώλεια βιολογικής δράσης (ενζυμικής, ανοσολογικής)

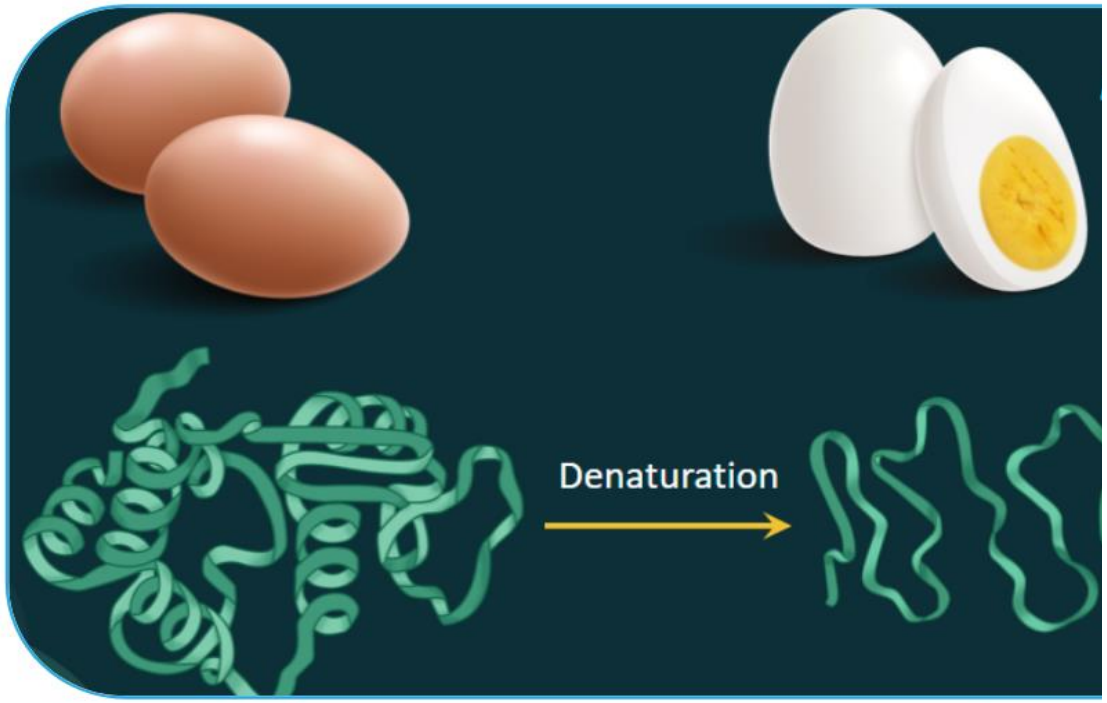
Α) Φυσικοί παράγοντες

- Θερμοκρασία
- Υδροστατική πίεση
- Διάτμηση

Β) Χημικοί παράγοντες

- pH
- Οργανικοί διαλύτες
- Απορρυπαντικά
- Οργανικές διαλυμένες ουσίες
- Χαοτροπικά άλατα

# Παράγοντες μετουσίωσης - Θερμοκρασία

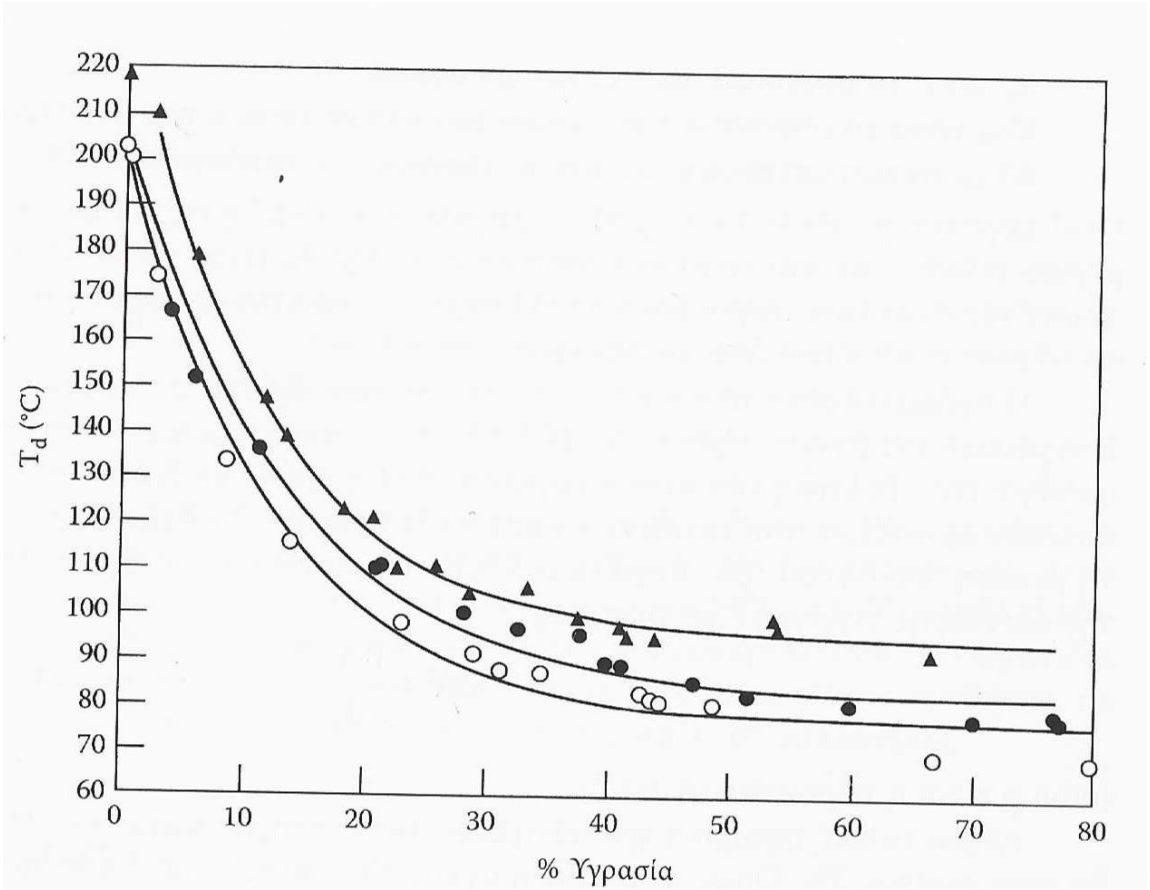



Transformation of Native Protein to Denatured protein

- Θερμοκρασία: ο πιο κοινός παράγοντας μετουσίωσης στα τρόφιμα. Συνήθως συμβαίνει σε θερμοκρασίες 40-80$^{o}$C.
- Υπάρχουν διάφοροι βαθμοί μετουσίωσης κατά την επεξεργασία ανάλογα με τον χρόνο και τη θερμοκρασία που εφαρμόζονται.
- Η προκαλούμενη από θερμοκρασία μετουσίωση των πρωτεϊνών οφείλεται στην επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων.
- Οι δεσμοί υδρογόνου και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες είναι εξώθερμες αποσταθεροποιούνται ενώ ο υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες είναι ενδόθερμες σταθεροποιούνται καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία.
- Η ισχύς των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων φτάνει έως τους 70-80$^{o}$C.
- Υπάρχουν και πρωτεΐνες που μετουσιώνονται σε ψυχρές θερμοκρασίες. Αυτό οφείλεται κυρίως στην εξασθένηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων εντός της πρωτεΐνης.

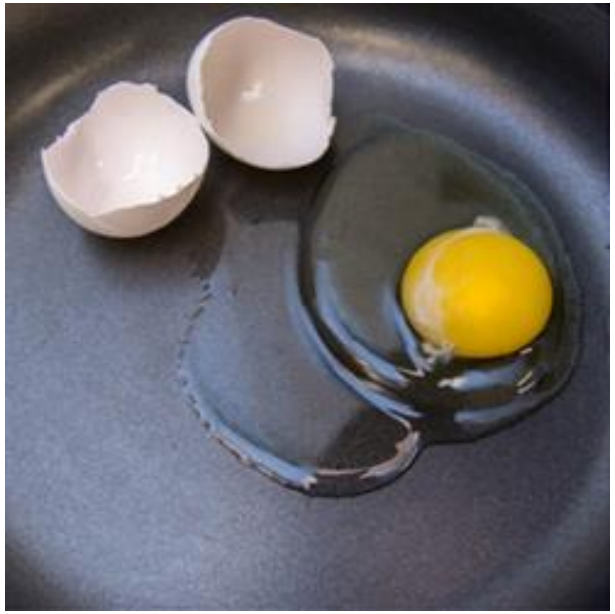
# Παράγοντες μετουσίωσης - Θερμοκρασία

- Η σύνθεση σε αμινοξέα επηρεάζει τη θερμική σταθερότητα των πρωτεϊνών. Πρωτεΐνες με μεγαλύτερη αναλογία υδρόφοβων αμινοξέων (Val, Ile, Leu, Phe) τείνουν να είναι περισσότερο σταθερές από τις πιο υδρόφιλες πρωτεΐνες.
- Ισχυρή συσχέτιση υπάρχει ανάμεσα στη θερμική σταθερότητα και στο αριθμητικό ποσοστό κάποιων αμινοξέων.
- Το νερό διευκολύνει τη θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών. Ξηρές σκόνες πρωτεϊνών είναι εξαιρετικά σταθερές στη θερμική μετουσίωση.
- Η προσθήκη αλάτων και σακχάρων επηρεάζει τη θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών σε υδατικά διαλύματα.




Επίδραση του περιεχομένου νερού στη θερμοκρασία θερμικής μετουσίωσης (Td) πρωτεΐνης σόγιας (Tsukada, H. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 70, 2096, 2006)

# Παράγοντες μετουσίωσης - Θερμοκρασία



Το διαυγές ασπράδι του ωμού αυγού περιέχει υδατοδιαλυτές, αναδιπλωμένες πρωτεΐνες



Το ασπράδι των μαγειρεμένων αυγών περιέχει αποδιπλωμένες (μετουσιωμένες), συσσωματωμένες και στερεοποιημένες πρωτεΐνες

# Γιατί το ασπράδι πήζει νωρίτερα από τον κρόκο

| | Αυγό | Ασπράδι | Κρόκος |
|---|---|---|---|
| Βάρος | 55g | 38g | 17g |
| Πρωτεΐνη | 6.6g | 3.9g | 2.7g |
| Υδατάνθρακες | 0.5g | 0.3g | 0.2g |
| Λίπος | 5.6g | 0 | 5.6g |
| Μονοακόρεστα λιπαρά | 2.5g | 0 | 2.5g |
| Πολυακόρεστα λιπαρά | 0.7g | 0 | 0.7g |
| Κορεσμένα λιπαρά | 2g | 0 | 2g |
| Χοληστερόλη | 226mg | 0 | 226mg |



«Αραίωση» της πρωτεΐνης του κρόκου από άλλα συστατικά (λιπαρά) ⇒ απαιτείται εντονότερη και μεγαλύτερης διάρκειας θέρμανση για αποτελεσματικές συγκρούσεις των μεγαλομορίων και σχηματισμό συσσωματωμάτων.

# Παράγοντες μετουσίωσης - Πίεση

- Η μετουσίωση που προκαλείται από υψηλή πίεση (1-12 kbar)μπορεί να λάβει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (πχ. 25$^{o}$C). Είναι σε μεγάλο βαθμό αντιστρέψιμη.
- **Συμβαίνει γιατί οι πρωτεΐνες είναι ευλύγιστες και συμπιεστές**. Παρά το γεγονός ότι τα αμινοξέα είναι πυκνά στοιβαγμένα στο εσωτερικό των πρωτεϊνών υπάρχουν κενοί χώροι.
- Προκαλείται μείωση του όγκου των πρωτεϊνών διότι λαμβάνουν χώρα: α) εξάλειψη των κενών χώρων λόγω της αποδίπλωσης της πρωτεΐνης και β) ενυδάτωση των μη πολικών αμινοξέων που εκτίθενται στο υδατικό διάλυμα.
- Οι ινώδεις πρωτεΐνες είναι πιο σταθερές από τις σφαιρικές.
- Εφαρμογές στα τρόφιμα:
  - αδρανοποίηση μικροβίων: η υψηλή πίεση καταστρέφει αναντιστρεπτά τις κυτταρικές μεμβράνες και οδηγεί σε διάσταση των μικροβιακών κυτταρικών οργανιδίων
  - Σχηματισμός πηκτής: λεύκωμα αυγού, διάλυμα πρωτεΐνης σόγιας (1-7 kbar, 25$^{o}$C)
  - Μέσο τρυφεροποίησης κρέατος: προκαλεί μερικό θρυμματισμό των μυικών ινιδίων

<u>Πλεονεκτήματα σε σχέση με τη θερμική επεξεργασία</u>: Δεν βλάπτει τα απαραίτητα αμινοξέα, το φυσικό χρώμα, την οσμή, τη γεύση και δεν προκαλεί ανάπτυξη τοξικών ενώσεων.

# Παράγοντες μετουσίωσης

## Διάτμηση

- Υψηλή μηχανική διάτμηση μπορεί να προκληθεί από ανάδευση, μάλαξη, χτύπημα κλπ
- Καταβύθιση πρωτεϊνών που οφείλεται σε μετουσίωση που συμβαίνει λόγω της ενσωμάτωσης φυσαλίδων αέρα και της προσρόφησης των πρωτεϊνικών μορίων στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού.



## pH

- Οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι σταθερές όταν βρίσκονται κοντά σε ουδέτερο pH.
- Όταν το pH μετατοπίζεται σε πολύ χαμηλές ή πολύ υψηλές τιμές λαμβάνει χώρα διόγκωση και αποδίπλωση του πρωτεϊνικού μορίου λόγω ισχυρών ενδομοριακών απωστικών δυνάμεων που οφείλονται σε μεταβολή του φορτίου της πρωτεΐνης.
- Η έκταση της αποδίπλωσης είναι μεγαλύτερη σε ακραίες αλκαλικές τιμές pH από ό,τι σε όξινες.
- Η μετουσίωση που προκαλείται είναι κυρίως αντιστρεπτή.

# Παράγοντες μετουσίωσης

## Οργανικοί διαλύτες

Σε υψηλές συγκεντρώσεις όλοι οι οργανικοί διαλύτες προκαλούν μετουσίωση των πρωτεϊνών εξαιτίας της επίδρασής τους στις μη πολικές πλευρικές αλυσίδες (είναι περισσότερο διαλυτές στους οργανικούς διαλύτες από ό,τι στο νερό).

## Οργανικές διαλυμένες ουσίες

Ουρία και υδροχλωρική γουανιδίνη:

- η μετουσίωση οφείλεται σε προνομιακή δέσμευση των ουσιών αυτών στη μετουσιωμένη πρωτεΐνη
- Δυνατότητα σχηματισμού ισχυρών δεσμών υδρογόνου ⟹ αποδίπλωση της πρωτεΐνης.
- Είναι αντιστρεπτή

## Απορρυπαντικά

Ισχυροί παράγοντες μετουσίωσης. Δεσμεύονται ισχυρά στις μετουσιωμένες πρωτεΐνες. Η προκαλούμενη μετουσίωση είναι αναντιστρεπτή.

## Χαοτροπικά άλατα

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα άλατα συνήθως σταθεροποιούν την πρωτεϊνική δομή. Σε υψηλές συγκεντρώσεις οι επιδράσεις εξαρτώνται κυρίως από τη φύση του ανιόντος. Ορισμένα άλατα σταθεροποιούν τη δομή (κοσμότροπα: θειικά, φωσφορικά, φθοριούχα) ενώ άλλα (βρωμιούχα, ιωδιούχα, υπερχλωρικά) την αποσταθεροποιούν (χαότροπα).