



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ
ΣΠΟΡΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

ANALYSIS OF PLANT SEED PROTEINS BY ELECTROPHORESIS

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΜΙΧΑΗΛ
18684070

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΑΝΘΙΜΙΑ ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2023

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι εξεταστική επιτροπή:

Αθήνα 2024,

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Ανθμία Μπατρίνου

Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρος Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.

2. Μέλος επιτροπής

Σπυρίδων Κοντελής

Γεωπόνος, PhD, Επίκουρος Καθηγητής, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.

3. Μέλος επιτροπής

Ειρήνη Στρατή

Χημικός MSc, PhD, Επίκουρος Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος, Αλέξανδρος Μιχαήλ του Δημητρίου , με αριθμό μητρώου 18684070, φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».



Αλέξανδρος Μιχαήλ

Ο Δηλών

Πρόλογος

Στο διαρκώς αυξανόμενο πεδίο της έρευνας για την ανάπτυξη νέων βιοχημικών και φυσικοχημικών μεθόδων, οι πρωτεΐνες αποτελούν δικαίως ένα αναπόσπαστο κομμάτι, αποτελώντας τους πυλώνες των περισσότερων βιολογικών διεργασιών ή τους συνδεδετικούς κρίκους μεταξύ σύνθετων μεταβολικών συστημάτων. Σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, οι πρωτεΐνες αποτελούν τα πλέον πολυδύναμα μακρομόρια λειτουργώντας ως ένζυμα, μεταφορικά και αποθηκευτικά συστήματα, δομικές μονάδες αλλά και ελεγκτικοί μηχανισμοί της γενετικής πληροφορίας. Επομένως, η αποκρυπτογράφηση των πολύπλοκων ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών αποτελεί βασικό στόχο των βιοεπιστημών αλλά και των επιστημών τροφίμων προκειμένου να κατανοηθεί και να ελεγχθεί η αλληλεπίδρασή τους μέσα στα τρόφιμα. Ανάμεσα στην πληθώρα ανεπτυγμένων τεχνικών που μπορούν να εξυπηρετήσουν για τον συγκεκριμένο σκοπό, η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αποτελεί αξιοσημείωτη τεχνική, επιτρέποντας τον ακριβή διαχωρισμό, τον χαρακτηρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των μακρομορίων.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, γίνεται χρήση ηλεκτροφορητικών τεχνικών για την ανάλυση πρωτεϊνών από σπόρους χαρουπιού. Οι συγκεκριμένοι σπόροι έχουν πρωτίστως ζυμωθεί ή μη από συγκεκριμένες καλλιέργειες μικροοργανισμών, αφυδατωθεί, κονιοποιηθεί και κατεργαστεί με κατάλληλες τεχνικές για να αποτελέσουν κατάλληλα δείγματα για ηλεκτροφορητική ανάλυση. Επιπροσθέτως, με την χρήση διαφορετικών καλλιεργειών από μικροοργανισμούς, γίνεται ανάλυση της πρωτεολυτικής δράσης των μικροοργανισμών και της ικανότητας τους να διαχωρίσουν συγκεκριμένα πεπτίδια που έχουν αναγνωριστεί με χρήση άλλων βιοχημικών μεθόδων στους σπόρους του χαρουπιού. Τέλος, καθώς η χρήση ηλεκτροφορητικών τεχνικών για την πρωτεϊνική ανάλυση αυτών των σπόρων στην βιβλιογραφία είναι περιορισμένη, γίνεται παρουσίαση συγκεκριμένων εναλλακτικών στις πρότυπες διαδικασίες ηλεκτροφόρησης προκειμένου να βελτιωθούν τα οπτικά αποτελέσματα στα αναλυθέντα δείγματα.

Λέξεις κλειδιά: ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, χαρούπι, σπόροι, *Aspergillus oryzae*

Abstract

In the constantly expanding field of research on the development of new biochemical and physicochemical methods, proteins rightfully constitute an integral part, serving as the foundations of most biological processes or the connecting links between complex metabolic systems. In all living organisms, proteins are the most versatile macromolecules, functioning as enzymes, transport and storage systems, structural units, and regulatory mechanisms of genetic information. Therefore, deciphering the complex properties and characteristics of proteins is a fundamental goal of both life sciences and food sciences, aiming to understand and control their interactions within foods. Among the plethora of advanced techniques that can serve this purpose, protein electrophoresis stands out as a notable technique, enabling the precise separation, characterization, and quantitative determination of these macromolecules.

In this undergraduate thesis, electrophoretic techniques are employed for the analysis of proteins derived from carob seeds. These specific seeds have been primarily fermented or not by specific microorganism cultures, dehydrated, pulverized, and processed using suitable techniques to create suitable samples for electrophoretic analysis. Additionally, by utilizing different microorganism cultures, an analysis of the proteolytic activity of these microorganisms and their ability to separate specific peptides previously identified using other biochemical methods in carob seeds is conducted. Finally, as the use of electrophoretic techniques for protein analysis in these seeds is limited in academic literature, specific alternatives to standard electrophoresis procedures are presented to improve the visual results in the analyzed samples.

Key words; protein electrophoresis, carob, seeds, *Aspergillus oryzae*

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην Επίκουρο Καθηγήτρια του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και επιβλέπουσα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, κα Ανθιμία Μπατρίνου. Η τεχνογνωσία, η συνεισφορά, η υποστήριξη και η καθοδήγηση της ήταν καθοριστικά κομμάτια τόσο για την ομαλή έκβαση των πειραμάτων όσο και για την επιτυχή εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες του τμήματος, Αικατερίνη Πυροβόλου και Ναταλία Σταυροπούλου καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου μικροβιολογίας του τμήματος για την άψογη συνεργασία.

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	1
Abstract.....	4
Ευχαριστίες.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
1. Πρωτεΐνες και αμινοξέα	14
1.1. Λειτουργικότητα πρωτεϊνών	14
1.2. Αμινοξέα και πολυπεπτίδια	14
1.2.1. Αμινοξέα στην φύση και στους οργανισμούς.....	14
1.2.2. Διάκριση αμινοξέων.....	15
1.3. Δομή και διαμόρφωση πρωτεϊνών.....	15
1.4. Πρωτεΐνες στην διατροφή του ανθρώπου	19
1.4.1. Ποιότητα πρωτεϊνών στις τροφές.....	19
1.4.2. Πρωτεΐνες φυτών και σπόρων	21
1.5. Χαρούπι.....	28
1.5.1. Χαρουπιά	28
1.5.2. Σπόροι χαρουπιού	29
1.5.3. Διατροφική ανάλυση σπόρων χαρουπιού.....	30
1.5.4. Οφέλη για την υγεία.....	32
1.5.5. Εφαρμογές του χαρουπιού στην βιομηχανία τροφίμων	33
1.5.5.1. Χαρουπάλευρο	33
1.5.5.2. Σιρόπι Χαρουπιού	34
1.6. Μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών	35
1.6.1. Προσδιορισμός αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα	35
1.6.2. Τεχνικές καθαρισμού πρωτεϊνών	37
1.6.2.1. Χρωματογραφικές τεχνικές	37
1.6.2.2. Φυγοκέντρωση πρωτεϊνών	40
1.6.3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	41
1.6.3.1. Μέθοδος Kjeldahl	42
1.6.3.2. Χρωματομετρικές μέθοδοι.....	42
1.6.3.3. Φασματμετρία μάζας (MS).....	43
1.6.4. Ηλεκτροφορητικές μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών.....	46

1.6.4.1.	Μέθοδοι ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών	47
1.6.4.2.	Ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών φυτικών σπόρων.....	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....		57
2.1.	Οργανολογία- Αντιδραστήρια	58
2.1.1.	Οργανολογία.....	58
2.1.2.	Αντιδραστήρια	58
2.2.	Σκοπός του πειράματος	61
2.3.	Πειραματική πορεία.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο.....		65
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		65
3.1.	Αποτελέσματα	66
3.1.1.	Πείραμα 1 ^ο	66
3.1.2.	Πείραμα 2 ^ο	67
3.1.2.1.	Ανάλυση gel ηλεκτροφόρησης με χρήση συστήματος φωτογράφισης και ανάλυσης gel ηλεκτροφόρησης MiniBIS Pro (DNS-Bio-Imaging Systems)	68
3.1.2.2.	Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πειράματος 2	84
3.1.3.	Πείραμα 3 ^ο	85
3.2.	Αντιστοίχιση ζωνών ηλεκτροφόρησης με πρωτεΐνες	86
3.3.	Αξιολόγηση πρωτεολυτικής δράσης μικροοργανισμών ζυμώσεων	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο		89
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....		89
4.1.	Συμπεράσματα πειράματος και μελέτης	90
□	Βιβλιογραφία.....	92

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1. Πίνακας ταξινόμησης αμινοξέων	15
Εικόνα 2. Η γραμμική αλληλουχία των αμινοξέων. (National Human Genome Research Institute).....	16
Εικόνα 3. Δομή α -έλικας (Richard R. Sinden, in DNA Structure and Function, 1994)	17
Εικόνα 4. Παράλληλες και αντιπαράλληλες β -πτυχωτές επιφάνειες (Northern Kentucky University)	17
Εικόνα 5. Η δομή και η ταξινόμηση των β -στροφών. (Comprehensive Medicinal Chemistry III)	18
Εικόνα 6. Κρυσταλλική δομή της μυελοπεροξειδάσης (Zeng and Fenna) (Comprehensive Natural Products Chemistry, 1999).....	18
Εικόνα 7. Δομή της δεοξυαιμοσφαιρίνης (Principles of Organic Chemistry, 2015)	19
Εικόνα 8. Πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης που προέρχονται από διαφορετικές καλλιέργειες (Langyan S et al. Sustaining Protein Nutrition Through Plant-Based Foods).....	22
Εικόνα 9. Τριτοταγής δομή της Βισιλίνης. (Yuan Lin et al. Isolation, Purification, and Identification of Coconut Protein through SDS-PAGE, HPLC, and MALDI-TOF/TOF-MS)	22
Εικόνα 10. Σχηματισμός της δομής της γλουτένης απο την γλουτενίνη και την γλοιαδίνη μέσω ανάμιξης. (M.A. Gularte et al. Gluten formation: Its Sources, composition and health effects, 2013)	23
Εικόνα 11. Ανάλυση SDS-PAGE υπο μη μεταυσιωτικές συνθήκες σε σπόρους κινόας (Alonso Miravalles et al. Composition, Protein Profile and Rheological Properties of Pseudocereal-Based Protein- Rich Ingredients)	25

Εικόνα 12. Διάγραμμα σύγκρισης ποσότητας απαραίτητων αμινοξέων (mg/g protein) στις πρωτεΐνες φουντουκιού (μαύρες στήλες) σε σχέση με τις πρωτεΐνες αυγού (γκρί στήλες). (Brufau G. et al, Nuts: source of energy and macronutrients).....	26
Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση σπόρων κάνναβης με χρήση μετουσιωτικών παραγόντων και SDS-PAGE (Liu M. et al. Composition and functional properties of hemp seed protein isolates from various hemp cultivars)	28
Εικόνα 14. Φωτογραφίες της χαρουπιάς (εικόνες A και B) και του χαρουπιού (εικόνες C και D). (Giohari, A et al. Carob: A Sustainable Opportunity for Metabolic Health. Foods 2022).....	29
Εικόνα 15. Διαφοροποίηση χρώματος σπόρων χαρουπιού. (Zemouri Z et al. The seed diversity of Carob (Ceratonia siliqua L.) and the relationship between seeds color and coat dormancy, 2020)	30
Εικόνα 16. Χαρουπάλευρο	33
Εικόνα 17. Σιρόπι χαρουπιού (Source: greekflavours.com).....	34
Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση πρωτεϊνικής υδρόλυσης σε διαφορετικές εντάσεις ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα. (Kiewiet et al. Immunomodulatory Protein Hydrolysates and Their Application, 2018)	36
Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση μιας χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων. (Chang-Hui Shen, Chapter 8 - Quantification and Analysis of Proteins, 2019)	38
Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. (Jianmin Ma et al. Application of gel permeation chromatography technology in asphalt materials: A review, 2021)	39
Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση χρωματογραφίας συγγένειας (Source: IBA Lifesciences).....	40

Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών κλασμάτων στην διάρκεια μιας φυγοκέντρωσης (Source: University of Vermont)	41
Εικόνα 23. Αυτόματος αναλυτής Kjeldahl. (Source: Hanon Group).....	42
Εικόνα 24. LC-MS (Source: Analysis).....	43
Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων μιας διαδικασίας LC-MS για την ανάλυση πρωτεϊνικών τοξινών. (Klimentova et al, Proteomic Methods of Detection and Quantification of Protein Toxins, 2018).....	44
Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση μιας MALDI-TOF MS διαδικασίας. (Dandan Li et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research, 2022)	45
Εικόνα 27. Ο νομπελίστας Arne Tiselius επιδεικνύει την πρώτη συσκευή ηλεκτροφόρησης. (Source: nobelprize.org).....	46
Εικόνα 28. Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης gel πολυακρυλαμιδίου PAGE. (Source: microbenotes).....	48
Εικόνα 29. Σύγκριση αποτελεσμάτων απο ηλεκτροφόρηση Native-PAGE σε <i>Dicentrarchus labrax</i> και ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε <i>Chionodraco hamatus</i> 26S. (Gogliettino et al. Unusual Antioxidant Properties of 26S Proteasome Isolated from Cold-Adapted Organisms, 2017).....	50
Εικόνα 30. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης BN-PAGE σε διαλυτοποιημένα μιτοχονδριακά σύμπλοκα. (Witting et al. Blue native PAGE, 2006)	51
Εικόνα 31. Ανάλυση zymogram σε gel SDS-PAGE απο ηλεκτροφόρηση ενζύμων. (Atanes et al. Lipases and Esterases from Extremophiles: Overview and Case Example of the Production and Purification of an Esterase from <i>Thermus thermophilus</i> HB27, 2012)	52
Εικόνα 32. Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης ισοηλεκτρικής εστίασης IEF. (Source: University of Vermont)	53

Εικόνα 33. Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης 2-D. (Source: ScienceDirect)	54
Εικόνα 34. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE πρωτεϊνών μπιζελιού χωρίς επεξεργασία (εικόνα a) και μπιζελιού που υπέστη in vitro χώνευση. (Moraru et al. Comparative effects of high pressure processing and heat treatment on in vitro digestibility of pea protein and starch) .	54
Εικόνα 35. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε μετουσιωτικές συνθήκες για πρωτεΐνες των σπόρων <i>Vicia faba</i> L. (Ptaszek P. et al, Functional and Rheological Properties of <i>Vicia faba</i> L. Protein Isolates, 2021).....	55
Εικόνα 36. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Στήλη PP πρωτεΐνη μπιζελιού, CP πρωτεΐνη ρεβυθιού, LP πρωτεΐνη φακής. (Ettoimi et al, Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties, 2015)	55
Εικόνα 37. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE πρωτεϊνών φασολιών σόγιας. (Gillman J. et al, Identification of a plant introduction soybean line with genetic lesions affecting two distinct glycinin subunits and evaluation of impacts on protein content and composition, 2013)	56
Εικόνα 38. Δοχείο ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN Tetra cell με τις πλάκες Precast ήδη εμβολιασμένες με τα δείγματα πρωτεϊνών	60
Εικόνα 39. Gel ηλεκτροφόρησης πειράματος 1.....	66
Εικόνα 40. Gel ηλεκτροφόρησης πειράματος 2.....	67
Εικόνα 41. Ανάλυση gel ηλεκτροφόρησης με χρήση συστήματος φωτογράφισης και ανάλυσης gel ηλεκτροφόρησης MiniBIS Pro (DNS-Bio-Imaging Systems).....	68
Εικόνα 42. Gel ηλεκτροφόρησης πειράματος 3.....	85
Εικόνα 43. Phaseolus Vulgaris Lectin (Source: Medicago AB)	86
Εικόνα 44. beta-Conglycinin (Source: Protein Data Bank RCSB)	86
Εικόνα 45. Vicilin (Source: Protein Data Base RCSB).....	87
Εικόνα 46. Legumin (Source: Tandang-Silvas, et al. 2010).....	87

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου απο κοινές πηγές πρωτεΐνης (Source; Fullscript, Best Protein Sources: Comparing Animal and Plant-Based Protein, Laura Dan, BSc).....	20
Διάγραμμα 2. Χημική σύσταση του χαρουπιού και διαφόρων προϊόντων με βάση το χαρούπι. (Papaefstathiou et al. Nutritional characterization of carobs and traditional carob products, 2018)	31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Πρωτεΐνες και αμινοξέα

1.1. Λειτουργικότητα πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή συστήματα με εξαιρετικά περίπλοκη δομή και διάταξη και η συνεισφορά τους σε αρκετά λειτουργικά επίπεδα όλων των βιολογικών συστημάτων και εν συνέχεια και τροφίμων είναι αξιοσημείωτη. Ως μόρια, κατέχουν μια διακριτή θέση σε όλους τους οργανισμούς δρώντας ως ένζυμα (βιοκαταλύτες), δομικά συστατικά κυττάρων και οργάνων (π.χ. κολλαγόνο), δομές μηχανικής στήριξης κυττάρων και οργανισμών, συσταλτές πρωτεΐνες (π.χ. ακτίνη, μυοσίνη), μεταφορικές πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνη ορού, τρανσφερίνη, αιμοσφαιρίνη) που είναι υπεύθυνες για την μεταφορά άλλων μορίων όπως το οξυγόνο. Επιπλέον, λειτουργούν στους οργανισμούς ως αντισώματα (π.χ. ανοσοσφαιρίνες), αλλά και αποθηκευτικές πρωτεΐνες (π.χ. πρωτεΐνες σπόρων, μικέλλες καζεΐνης, αλβουμίνες αυγού). (Skipper 2005) (Srinivasan and Paraf 2017)

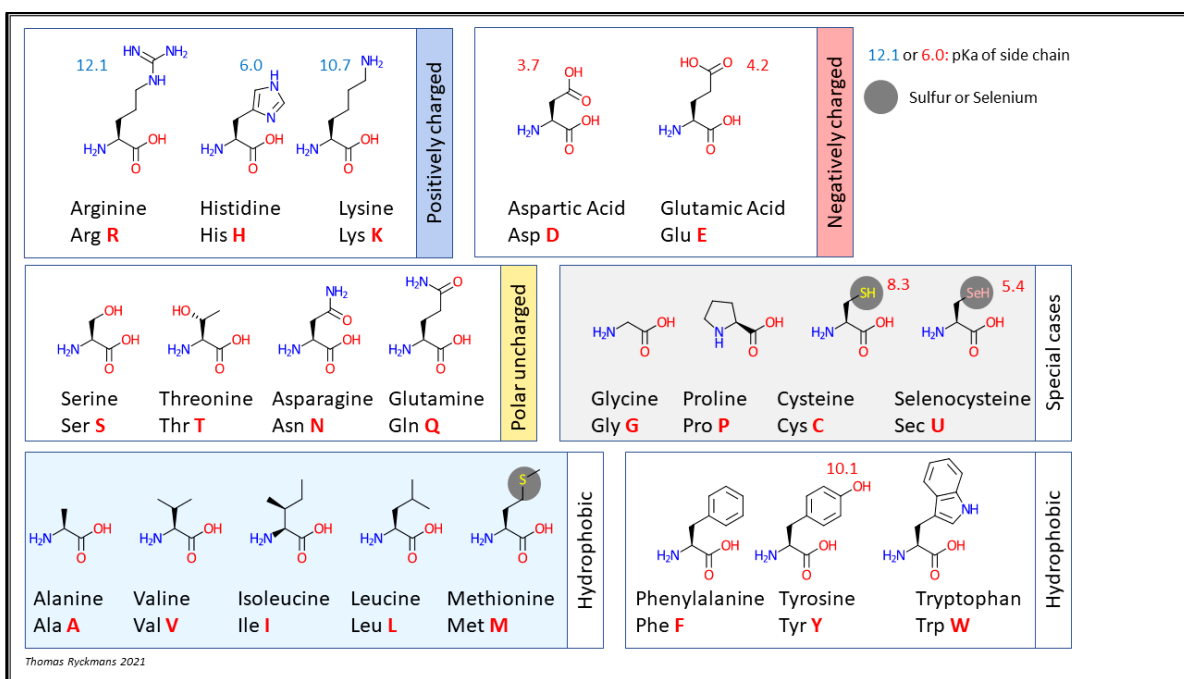
1.2. Αμινοξέα και πολυπεπτίδια

1.2.1. Αμινοξέα στην φύση και στους οργανισμούς

Τα αμινοξέα είναι τάξη σημαντικών οργανικών ενώσεων, αποτελούμενα από ένα αμινικό και ένα καρβοξυλικό άκρο. Αποτελούν τους δομικούς λίθους όλων των πρωτεϊνών, καθορίζοντας τις κύριες λειτουργίες τους αλλά και τον σκοπό ύπαρξης τους στον οργανισμό. Στην φύση έχουν εντοπιστεί περισσότερα από 700 διαφορετικά αμινοξέα εκ των οποίων τα περισσότερα είναι α-αμινοξέα, λόγω της προσάρτησης της αμινομάδας και καρβοξυλομάδας στον α-άνθρακα. Από αυτά, μόλις 20 αμινοξέα που αποτελούνται από 19 α-αμινοξέα και ένα α-ιμινικό οξύ, την προλίνη, συντίθενται και χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα των οργανισμών για την πραγματοποίηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης που ελέγχεται από τα εξειδικευμένα γονίδια. (Maloy 2013) Επιπλέον, στην φύση έχουν εντοπιστεί και άλλα είδη αμινοξέων όπως τα β-αμινοξέα, όπου η καρβοξυλομάδα και η αμινομάδα είναι προσαρτημένες σε άλλο άνθρακα της ανθρακικής αλυσίδας. Τα α-αμινοξέα που χρησιμοποιούνται από τους οργανισμούς διαφέρουν μόνο στην χημική φύση της ομάδας που συνδέεται ως πλευρική αλυσίδα στο α-άτομο άνθρακα της ανθρακικής αλυσίδας. Αυτή η ομάδα καθορίζει τα διάφορα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του αμινοξέος, όπως το φορτίο, η χημική συγγένεια με άλλες ενώσεις, η διαλυτότητα κ.α. (Barrett 1998) (Godbey 2022)

1.2.2. Διάκριση αμινοξέων

Τα αμινοξέα που έχουν αλειφατικές πλευρικές ομάδες (Αλανίνη, Ισολευκίνη, Λευκίνη, Μεθειονίνη, Προλίνη και Βαλίνη) ή αρωματικές πλευρικές αλυσίδες (Φαινυλαλανίνη, Τρυπτοφάνη και Τυροσίνη) είναι μη πολικά και εμφανίζουν περιορισμένη υδατοδιαλυτότητα. Αντιθέτως, τα αμινοξέα που φέρουν πλευρικές ομάδες με φορτίο (Αργινίνη, Λυσίνη, Ιστιδίνη, Γλουταμινικό οξύ και Ασπαρτικό οξύ) ή χωρίς φορτίο (Σερίνη, Θρεονίνη, Ασπαραγίνη, Γλουταμίνη και Κυστεΐνη) εμφανίζουν σημαντική διαλυτότητα στο νερό. (Srinivasan and Paraf 2017)

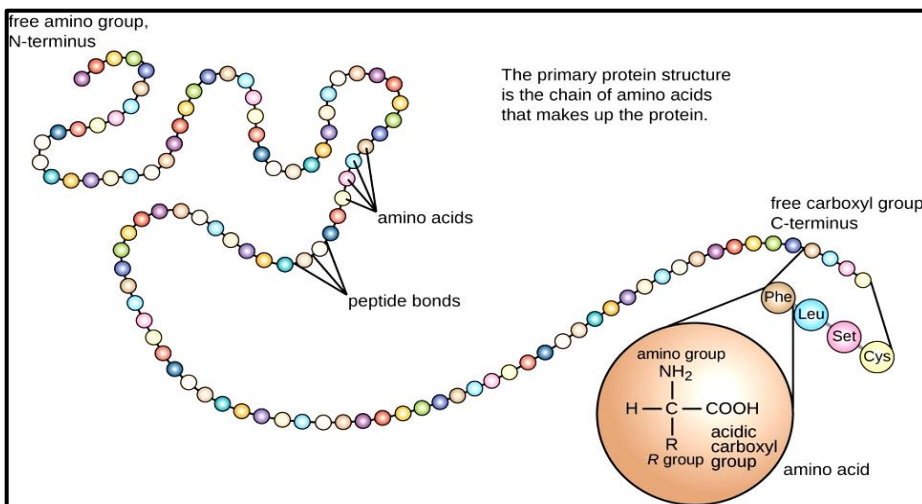


Εικόνα 1. Πίνακας ταξινόμησης αμινοξέων

1.3. Δομή και διαμόρφωση πρωτεϊνών

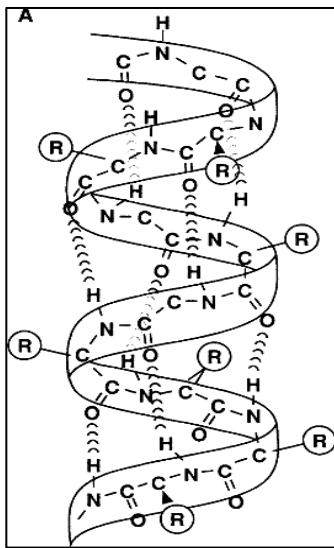
Η δομή των πρωτεϊνών που συντίθενται από τα κύτταρα των οργανισμών μέσω πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων, συνίσταται από τέσσερα διακριτά επίπεδα διαμόρφωσης: την πρωτοταγή, την δευτεροταγή, την τριτοταγή και την τεταρτοταγή δομή. Το κάθε επίπεδο διαμόρφωσης έχει υψηλή εξειδίκευση και εξυπηρετεί τις φυσικοχημικές ιδιότητες της πολυπεπτιδικής αλυσίδας όσο και την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. (Orengo, Todd and Thornton 1999) (Pelley 2007)

1ο ταγής δομή: εκφράζει την συγκεκριμένη ακολουθία των αμινοξέων που συνθέτουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα και αποτελεί την απλούστερη από όλα τα επίπεδα διαμόρφωσης μιας πρωτεΐνης. Η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών προκύπτει από την σύνδεση των αμινοξέων μέσω της αφυδάτωσης σύνθεσης που συνδυάζει την καρβοξυλομάδα του πρώτου αμινοξέος με την αμινική λειτουργική ομάδα του δεύτερου αμινοξέος, σχηματίζοντας έτσι μια αμινική ένωση, γνωστή ως πεπτιδικός δεσμός, με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου νερού. Για την διάσπαση αυτού του πεπτιδικού δεσμού μέσω της αντίδρασης της υδρόλυσης απαιτείται ένα μόριο νερού και το αποτέλεσμα είναι τα δύο αρχικά αμινοξέα με την καθορισμένη μορφή τους (αμινικό και καρβοξυλικό άκρο). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο της διαδικασίας σχηματισμού των πεπτιδικών δεσμών ονομάζεται ριβόσωμα και αποτελείται από ριβοσωμικό RNA και ριβοσωμικές πρωτεΐνες, γνωστές ως ριβονουκλεοπρωτεΐνες. Αντιθέτως, για την πρωτεϊνική υδρόλυση και διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού είναι υπεύθυνη μια τάξη ενζύμων που ονομάζονται πρωτεάσες που εμφανίζουν σημαντικό ενδιαφέρον στην παραγωγή γαλακτοκομικών (πήξη γάλακτος), ζύθου (αποδόμηση πρωτεϊνών κριθαριού) και άρτου (ενζυμική υδρόλυση ζύμης). Η πρωτοταγής δομή κάθε πρωτεΐνης συνθέτει ένα μοναδικό μοτίβο αναδίπλωσης, χαρακτηριστικό για κάθε πρωτεΐνη. Τέλος, η σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας γίνεται πάντα με συγκεκριμένη κατεύθυνση, όπου τα καινούρια αμινοξέα προστίθενται μόνο στο καρβοξυλικό άκρο, με αποτέλεσμα όλες οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες να ξεκινούν με μια αμινική ομάδα και να τελειώνουν με μια ομάδα καρβοξυλικού οξέος, που ανήκει στο τελευταίο αμινοξύ. (Orengo, Todd and Thornton 1999) (Sneha and Priya Doss 2016)



Εικόνα 2. Η γραμμική αλληλουχία των αμινοξέων. (National Human Genome Research Institute)

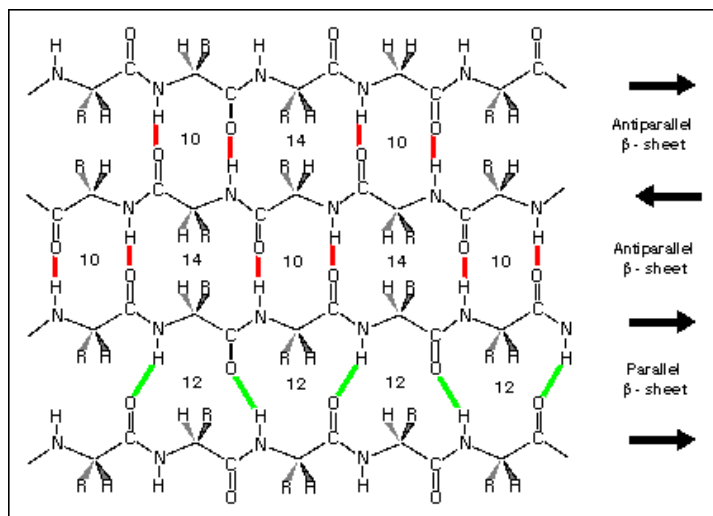
2ο ταγής δομή: Αποτελεί την τοπική στερεοδιαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, χωρίς να συμπεριλαμβάνει τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων. Έτσι οι νεοσύστατες πολυπεπτιδικές αλυσίδες αναδιπλώνονται και σχηματίζουν δομές α-έλικας, β-πτυχωτής επιφάνειας, β-στροφής και Ω-θηλιάς. Η ολοκληρωμένη δευτεροταγής δομή ενός πολυπεπτιδίου συχνά παρουσιάζεται σε δύο χωρικές διαστάσεις μέσω τοπολογικού διαγράμματος που συσχετίζει την συνδεσιμότητα και τον σχετικό προσανατολισμό των γειτονικών δευτεροταγών δομών. (Lupas and Russell 2011) (Sinden 1994)



Εικόνα 3. Δομή α-έλικας (Richard R. Sinden, in DNA Structure and Function, 1994)

Η δομή της α-έλικας προκύπτει όταν η ραχοκοκαλιά της πρωτεΐνης (πολυπεπτιδική αλυσίδα χωρίς πλευρικές αλυσίδες) διαμορφώνει μια δεξιόστροφη ελικοειδή διάταξη με 3.6 κατάλοιπα (αμινοξέα συνδεόμενα με πεπτιδικούς δεσμούς) ανά στροφή. Η σταθεροποίηση της α-έλικας γίνεται μέσω δεσμών υδρογόνου ΔH λόγω της χωρικής εγγύτητας που παρατηρείται σε συχνότητα 3-4 αμινοξέων και σχηματίζονται μεταξύ της κύριας καρβοξυλομάδας του *i* αμινοξέος και της κύριας αμινικής αλυσίδας του (*i*+4) αμινοξέος. (Sun, Foster and Boyington 2004)

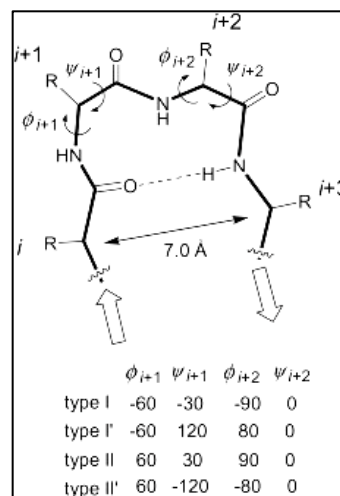
Η δομή της β-πτυχωτής επιφάνειας προκύπτει όταν τουλάχιστον δύο ή περισσότερες β-πτυχώσεις (αλυσίδες) προσεγγίζουν η μια την άλλη και σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ γειτονικών αμινοξέων. Μια παράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια σχηματίζεται όταν όλες οι β-πτυχώσεις είναι παράλληλες και έχουν την ίδια κατεύθυνση



Εικόνα 4. Παράλληλες και αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες (Northern Kentucky University)

αμινικών και καρβοξυλικών άκρων. Μια αντιπαράλληλη β-πτυχώση σχηματίζεται όταν οι β-πτυχώσεις είναι παράλληλες μεταξύ τους αλλά έχουν αντίθετη κατεύθυνση. Μια β-πτυχωτή επιφάνεια που προκύπτει από τον συνδυασμό παράλληλων και αντιπαράλληλων β-πτυχώσεων αναφέρεται ως μια μεικτή β-πτυχωτή επιφάνεια. (Sun, Foster and Boyington 2004)

Η δομή της **β-στροφής** προκύπτει στο τέλος μιας πτύχωσης όπου πραγματοποιείται μια στροφή 180° ώστε να συνεχίσει η αλυσίδα αντιπαράλληλα προς την πρώτη και σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ της καρβοξυλομάδας του i αμινοξέος και της ομάδας NH του $i+3$ αμινοξέος. Γενικά οι στροφές και οι θηλιές συνδέουν έλικες και β-πτυχωτές επιφάνειες σε πρωτεϊνικές δομές. Η δομή της **Ω-θηλιάς** δίνει πάλι μια στροφή στην πολυπεπτιδική αλυσίδα αν και το μοτίβο συνδέσεων με δεσμούς υδρογόνου είναι πιο ασθενές από τις άλλες δευτεροταγείς δομές που αναφέρθηκαν προηγουμένως. (Ahn, et al. 2017)



Εικόνα 5. Η δομή και η ταξινόμηση των β-στροφών. (Comprehensive Medicinal Chemistry III)



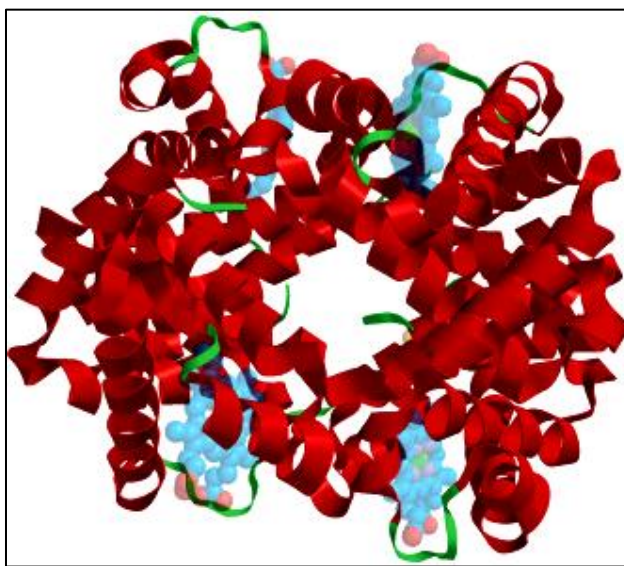
Εικόνα 6. Κρυσταλλική δομή της μυελοπεροξειδάσης (Zeng and Fenna) (Comprehensive Natural Products Chemistry, 1999)

3^ο ταγής δομή : Η τριτοταγής δομή μιας πρωτεΐνης αναφέρεται στη συνολική τρισδιάστατη διάταξη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της στο χώρο. Η ωθούσα δύναμη για την διαμόρφωση αυτού του επιπέδου διάταξης σε υδατοδιαλυτές σφαιρικές πρωτεΐνες είναι η υδροφοβικότητα συγκεκριμένων αμινοξέων που ωθεί τα υδρόφοβα-μη πολικά αμινοξέα στο κέντρο της πρωτεΐνης σχηματίζοντας έναν συμπαγή, μη πολικό πυρήνα. Έτσι, τα μη πολικά κατάλοιπα αμινοξέων (Val, Leu, Ile, Met και Phe) τείνουν να προσανατολίζονται στο εσωτερικό της πρωτεΐνης ως αποτέλεσμα της αδυναμίας διάσπασης των μορίων του νερού από τις υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες. Τα φορτισμένα πολικά κατάλοιπα αμινοξέων (Arg, His, Lys, Asp και Glu)

εντοπίζονται κυρίως στην επιφάνεια ενώ τα μη

φορτισμένα πολικά κατάλοιπα (Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr και Trp) βρίσκονται τόσο στο εσωτερικό όσο και στην επιφάνεια και είναι οι δότες δεσμών υδρογόνου που συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της τριτοταγούς δομής. Επιπλέον, οι ιοντικές δυνάμεις συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της δομής στο φυσιολογικές τιμές pH. (Skipper 2005) (Yung and Farber 2013)

4^ο ταγής δομή: Η τεταρτοταγής δομή εμφανίζεται μόνο σε πρωτεΐνες που απαρτίζονται από δύο ή περισσότερες ίδιες ή διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες (υπομονάδες) που ονομάζονται ολιγομερή. Η τεταρτοταγής δομή περιγράφει τη διάταξη των υπομονάδων εντός της μητρικής πρωτεΐνης και τις διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Οι υπομονάδες συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω μη ομοιοπολικών δυνάμεων, έτσι



Εικόνα 7. Δομή της δεοξυαιμοσφαιρίνης (Principles of Organic Chemistry, 2015)

οι ολιγομερείς πρωτεΐνες μπορούν να υποστούν γρήγορες αλλαγές διαμόρφωσης που επηρεάζουν τη βιολογική δραστηριότητα. Η κατηγορία των ολιγομερών πρωτεϊνών περιλαμβάνει την αιμοσφαιρίνη, τα αλλοστερικά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση του μεταβολισμού των οργανισμών, τις συσταλτικές πρωτεΐνες όπως η ακτίνη και η τουμπουλίνη και τις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης. (Ha and Bhagavan 2023) (Skipper 2005) (Yung and Farber 2013)

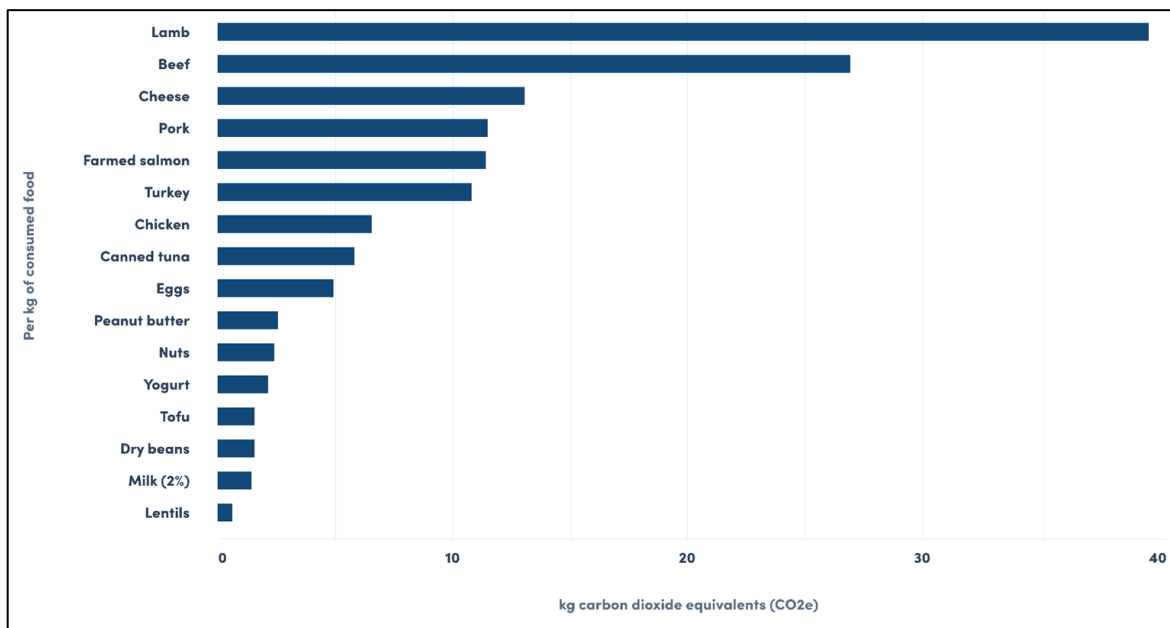
1.4. Πρωτεΐνες στην διατροφή του ανθρώπου

1.4.1. Ποιότητα πρωτεϊνών στις τροφές

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.2.1. τα αμινοξέα που χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό για την πρωτεϊνική σύνθεση είναι είκοσι σε αριθμό, εκ των οποίων συγκεκριμένα θεωρούνται απαραίτητα, καθώς δεν μπορούν να παραχθούν από τον οργανισμό. Αυτή η κατηγορία αμινοξέων περιλαμβάνει τα: βαλίνη (Val), ισολευκίνη (Ile), λευκίνη (Leu), μεθειονίνη (Met), λυσίνη (Lys), φαινυλαλανίνη (Phe), θρεονίνη (Thr),

τρουτοφάνη (Trp) και ιστιδίνη (His). Έτσι, η διατροφική ποιότητα των πρωτεϊνών των τροφίμων εξαρτάται από την ποσότητα και αναλογία απαραίτητων αμινοξέων που περιέχουν στην ή στις πολυπεπτιδικές τους αλυσίδες, καθώς και την πεπτικότητα και βιοδιαθεσιμότητα τους. (Sá, Moreno and Carciofi 2020)

Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη πρωτεϊνών από την διατροφή ενός μέσου ενήλικα κυμαίνεται στα 0,75-1 γραμμάρια πρωτεΐνης ανά κιλό σωματικού βάρους, που ισοδυναμεί με περίπου δύο μερίδες κρέατος, ψαριού, ξηρών καρπών ή τόφου την ημέρα. (British heart foundation). Επιπλέον, για τους ενήλικες έχει καθοριστεί και ελάχιστο όριο ημερήσιας πρόσληψης στην τιμή των 0.66 γραμμαρίων πρωτεΐνης ανά κιλό σωματικού βάρους, ενώ για τις εγκυμονούσες γυναίκες είναι 1.1, για τις θηλάζουσες γυναίκες είναι 1.3 και για τα μωρά κυμαίνεται στα 1.2 με 1.52 γραμμάρια. Αυτή η αυξημένη σύσταση προτείνεται καθώς αυτές οι κατηγορίες ανθρώπων απαιτούν υψηλότερες ποσότητες πρωτεϊνών στην διατροφή για να διατηρήσουν την λειτουργία του οργανισμού τους σε φυσιολογικά επίπεδα. Γενικά οι προαναφερθείσες ελάχιστες τιμές πρόσληψης αναφέρονται στις απαραίτητες ποσότητες πρωτεϊνών ώστε να αναπληρώνονται πλήρως οι απώλειες αζώτου, για να διατηρείται σταθερή η πρωτεϊνική μάζα ώστε να εξασφαλίζεται η σωστή λειτουργία, συντήρηση και ανάπτυξη του οργανισμού. (Sá, Moreno and Carciofi 2020)



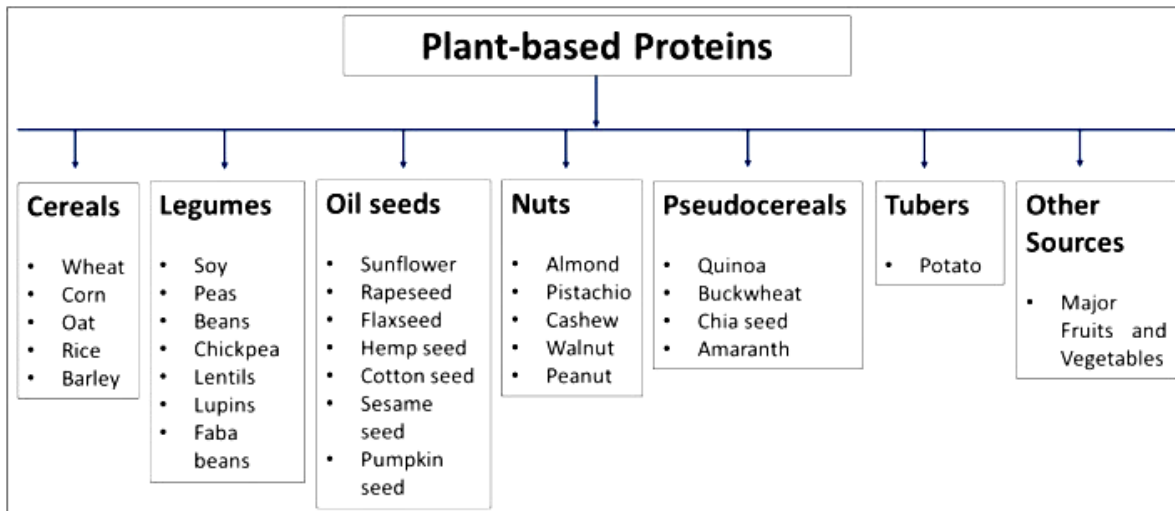
Διάγραμμα 1. Εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου από κοινές πηγές πρωτεΐνης (Source; Fullscript, Best Protein Sources: Comparing Animal and Plant-Based Protein, Laura Dan, BSc)

1.4.2. Πρωτεΐνες φυτών και σπόρων

Οι φυτικές πρωτεΐνες τα τελευταία χρόνια κατακτούν όλο και μεγαλύτερο μέρος στην καθημερινή διατροφή των ανθρώπων, κυρίως ως βασική εναλλακτική της πρόσληψης πρωτεΐνης από ζωικές πηγές.

Η ανάγκη αυτή εμφανίστηκε λόγω της πληθώρας ερευνών που αποδεικνύουν τις συνέπειες της συστηματικής και σημαντικής κατανάλωσης κρέατος και ζωικών προϊόντων στον ανθρώπινο οργανισμό, το περιβάλλον αλλά και στα ίδια τα ζώα. Έτσι, η έρευνα της επιστημονικής κοινότητας για την ανάλυση των πρωτεϊνών σε διάφορες νέες πηγές φυτικών πρωτεϊνών έχει αυξηθεί, καθώς και η μελέτη για ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους. Τέλος, μια μέθοδος που φαίνεται να έχει σημαντικά οφέλη για αυτό τον σκοπό είναι η ηλεκτροφόρηση. Οι φυτικές πρωτεΐνες συνεισφέρουν περίπου στο 57% της κατά κεφαλήν προσφοράς πρωτεΐνης σε παγκόσμια βάση, με το υπόλοιπο 43% να αποτελείται από γαλακτοκομικά προϊόντα (10%), οστρακοειδή και ψάρια (6%), κρέας (18%) και άλλα προϊόντα από ζώα (9%) (Langyan, et al. 2021).

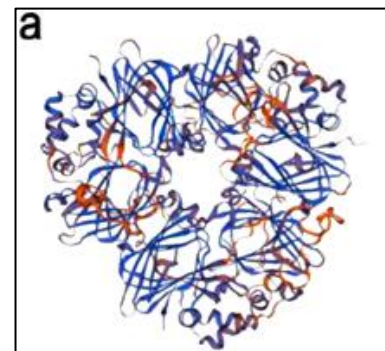
Υπάρχουν αρκετές γνωστές πηγές φυτικών πρωτεϊνών που μπορούν να παρέχουν στους ανθρώπους την απαραίτητη ποσότητα πρωτεΐνης στην διατροφή τους, αν και συγκεκριμένες από αυτές τις πηγές εμφανίζουν το μειονέκτημα της απουσίας συγκεκριμένων απαραίτητων αμινοξέων (κεφάλαιο 1.4.1.). Όμως, ενώ τα κοινά δημητριακά συνήθως έχουν χαμηλά επίπεδα λυσίνης (Lys) και τα όσπρια εμφανίζουν ανεπάρκεια σε μεθειονίνη και κυστεΐνη, τα ψευδοδημητριακά (σπόροι chia, κινόα, αμάρανθος κ.α.) αποτελούν σημαντικές πηγές λυσίνης. Φυτικά προϊόντα τα οποία εμφανίζουν σημαντικό ενδιαφέρον ως προς την περιεκτικότητά τους σε αμινοξέα και συγκεκριμένα σε απαραίτητα αμινοξέα, την βιοδιαθεσιμότητα των πρωτεϊνών τους, την πεπτικότητα τους αλλά και τα συνολικά οφέλη τους στον οργανισμό είναι τα δημητριακά, τα όσπρια, τα φύλλα φυτών, παραπροϊόντα άλλων διεργασιών επεξεργασίας φυτικών προϊόντων, οι καρποί (κυρίως ξηροί καρποί) αλλά και οι σπόροι. Στους σπόρους εντάσσεται και το αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής, που είναι οι σπόροι του χαρουπιού, για το οποίο θα γίνει εκτενής αναφορά στο επόμενο κεφάλαιο. (Sá, Moreno and Carciofi 2020) (Srinivasan and Paraf 2017)



Εικόνα 8. Πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης που προέρχονται από διαφορετικές καλλιέργειες (Langyan S et al. Sustaining Protein Nutrition Through Plant-Based Foods)

Όσπρια: αποτελούν πιθανόν την καλύτερη επιλογή για πρόσληψη φυτικών πρωτεϊνών καθώς είναι πλούσια σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, ενέργεια, βιταμίνες, μέταλλα και φυτικές ίνες. Οι πιο γνωστές καλλιέργειες οσπρίων που καταναλώνονται για την υψηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη είναι η σόγια, τα φασόλια, τα μπιζέλια και τα ρεβίθια. Συγκεκριμένα τα ρεβίθια και τα μπιζέλια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατο κοινού αλεύρου για την παρασκευή ζυμαρικών και άλλων αρτοσκευασμάτων, αυξάνοντας το πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο. Επιπλέον, στις αναπτυσσόμενες χώρες, το κοινό φασόλι αποτελεί την κύρια πηγή πρόσληψης φυτικής πρωτεΐνης, ενώ, η ποικιλία μπιζελιών *Cajanus cajan* είναι πιθανή πηγή των θειούχων αμινοξέων, μεθειονίνη και κυστεΐνη που συνήθως εκλείπουν από τα φυτικά προϊόντα. (Langyan, et al. 2021) (Σά, Moreno and Carciofi 2020)

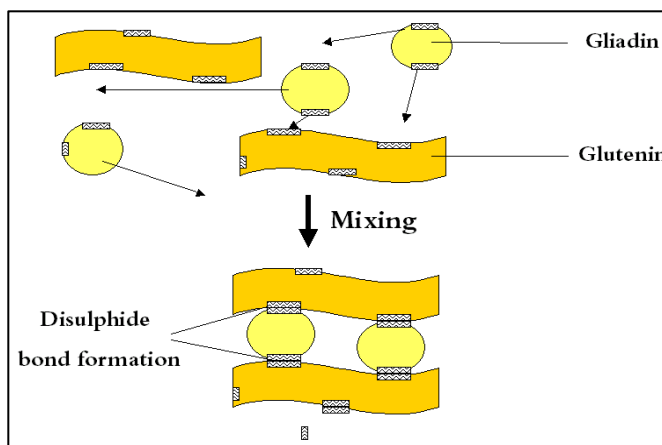
Επιπροσθέτως, στα όσπρια, οι πρωτεΐνες αποτελούν το 20% του ξηρού βάρους στα μπιζέλια ενώ το 38-40% στην σόγια με κύρια είδη πρωτεϊνών τις σφαιρίνες (globulins) 7S (ολιγομερές και συνήθως τριμερές) και 11S (ολιγομερές και συνήθως εξαμερές) αν και έχουν παρατηρηθεί και πρωτεΐνες 15-18S στα φασόλια της σόγιας που προσομοιάζουν τις κοινές πρωτεΐνες των οσπρίων. Αυτές οι ολιγομερείς πρωτεΐνες, όταν προσδιορίζονται σε μπιζέλια ονομάζονται βισιλίνη και λεγουμίνη. Τέλος, στο κομμάτι των αμινοξέων, όλες οι αποθηκευτικές πρωτεΐνες των



Εικόνα 9. Τριτοταγής δομή της Βισιλίνης. (Yuan Lin et al. Isolation, Purification, and Identification of Coconut Protein through SDS-PAGE, HPLC, and MALDI-TOF/TOF-MS)

οσπρίων είναι φτωχές στα θειούχα αμινοξέα, μεθειονίνη και κυστεΐνη, ενώ η λυσίνη που είναι επίσης απαραίτητο αμινοξύ, βρίσκεται σε μεγαλύτερα ποσοστά από ότι στα δημητριακά. Έτσι, όσον αφορά την λυσίνη και τα θειούχα αμινοξέα, τα όσπρια και τα δημητριακά καλύπτουν η μια κατηγορία τις ελλείψεις της άλλης. (Duranti 2006)

Δημητριακά: ονομάζεται κάθε είδος χόρτου της οικογένειας Poaceae που κατά την ανάπτυξη του δίνει αμυλούχους σπόρους που είναι κατάλληλοι για τροφή. Περιέχουν θρεπτικά συστατικά όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, μέταλλα, λίπη και ορισμένα δημητριακά περιέχουν ικανοποιητικά ποσά από φυτικές ίνες. Επιπλέον, συγκεκριμένα δημητριακά όπως το έγχρωμο ρύζι, έγχρωμο σιτάρι, έγχρωμο καλαμπόκι και κάποια είδη από κεχρί περιέχουν



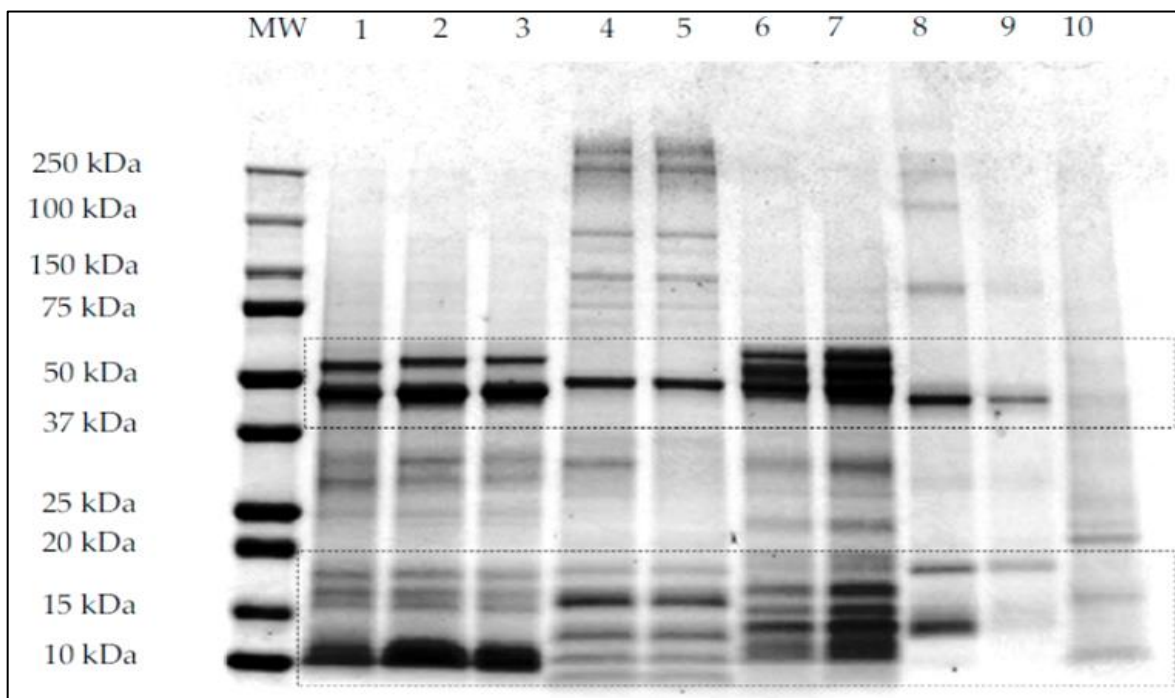
Εικόνα 10. Σχηματισμός της δομής της γλουτένης από την γλουτεΐνη και την γλοιαδίνη μέσω ανάμιξης. (M.A. Gualarte et al. *Gluten formation: Its Sources, composition and health effects*, 2013)

λειτουργικά βιοενεργά συστατικά όπως οι πολυφαινόλες, τοκοφερόλη, ορζυζενόλη, που δρουν ως αντιοξειδωτικά αλλά και βιταμίνες. Οι πρωτεΐνες των δημητριακών βρίσκονται κυρίως στο ενδοσπέρμιο των σπόρων και χρησιμοποιούνται από τα αρχαία χρόνια σε πλήθος εφαρμογών στην βιομηχανία τροφίμων (π.χ. αρτοποιία). Η βασική και κυριαρχούσα πρωτεΐνη που περιέχεται στα δημητριακά είναι η γλουτένη, η οποία ως σύμπλεγμα γλουτεΐνης και γλοιαδίνης, καθορίζει τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των δημητριακών αλλά και την τελική ποιότητα των προϊόντων. (Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. "cereal." *Encyclopedia Britannica*, August 31, 2023). Εκτός της γλουτένης, η ταξινόμηση του Osborne κατηγοριοποιεί τις πρωτεΐνες των δημητριακών σε αλβουμίνες, που είναι διαλυτές στο νερό, σφαιρίνες (globulins), που είναι διαλυτές σε αραιά διαλύματα αλάτων, προλαμίνες, που είναι διαλυτές σε υδατικά διαλύματα αλκοόλης και γλουτελίνες που είναι διαλυτές σε αραιά διαλύματα οξέων. Οι προλαμίνες και οι γλουτελίνες των δημητριακών και πιο συγκεκριμένα του σιταριού είναι οι αντίστοιχες γλοιαδίνες και γλουτεΐνες, οι οποίες μαζί συνθέτουν το σύμπλεγμα πρωτεϊνών που είναι η γλουτένη. Η ποσότητα της γλουτένης, καθώς και η αναλογία γλουτεΐνης και γλοιαδίνης, είναι υπεύθυνες για ορισμένα

χαρακτηριστικά των ζυμαριών και έτσι ενισχύουν την δύναμη, την ελαστικότητα, την ικανότητα συγκράτησης αερίων, αυξάνουν το ιξώδες αλλά και τον αναμενόμενο χρόνο ζωής του ζυμαριού. Επιπλέον καθορίζουν την ικανότητα ανάμιξης των ζυμαριών αλλά και την τελική ποιότητα των προϊόντων αρτοποιίας. Τέλος, οι πρωτεΐνες των δημητριακών είναι γενικά φτωχές σε απαραίτητα αμινοξέα, αν και οι ποσότητες διαφόρων αμινοξέων μπορούν να διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών ειδών. Έτσι, οι ποσότητες λυσίνης και τρυπτοφάνης είναι περιορισμένες στις πρωτεΐνες των δημητριακών, αλλά στην βρώμη, το ρύζι και το κεχρί η ποσότητα λυσίνης βρίσκεται κοντά στο κατώτατο όριο ενώ η απουσία της στον αραβόσιτο είναι ακόμα πιο έντονη. (Welch 2005) (Baumgartner, Krska and Welzig 2007) (Sudheesh, et al. 2022) (Baniwal, et al. 2021)

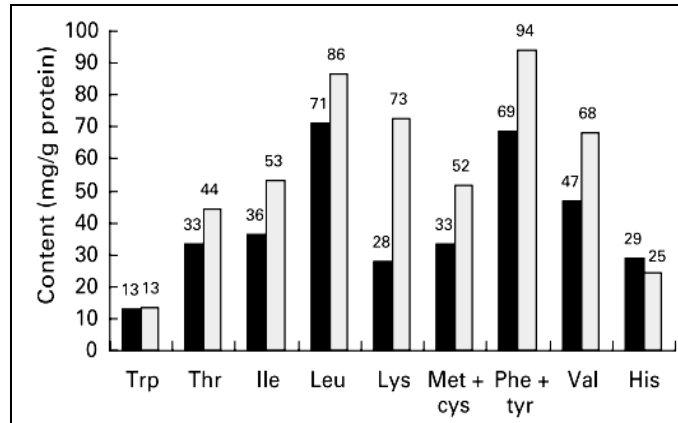
Ψευδοδημητριακά: Πρόκειται για ομάδα φυτών που κατά την ανάπτυξη τους σχηματίζουν αμυλούχους σπόρους αλλά ανήκουν στην οικογένεια των δικοτυλήδων και όχι των δημητριακών. Στις εφαρμογές της τεχνολογίας τροφίμων, χρησιμοποιούνται και επεξεργάζονται ακριβώς όπως τα δημητριακά. Τα ψευδοδημητριακά και τα προϊόντα που παράγονται με βάση αυτά, αποτελούν πολύ καλές πηγές φυτικών ινών, πρωτεϊνών, αμύλου, βιταμινών αλλά διαφόρων φυτοχημικών όπως οι σαπωνίνες, τα φυτοστεροειδή και οι φυτοστερόλες, οι πολυφαινόλες και οι βεταλαΐνες, που έχουν πιθανώς ευεργετική δράση στην υγεία του οργανισμού. Τα πιο κοινά ψευδοδημητριακά που χρησιμοποιούνται είναι η κινόα (*Chenopodium quinoa*), το φαγόπυρο (*Fagopyrum esculentum*), οι σπόροι chia (*Salvia columbariae*) και ο αμάρανθος (*Amarantus spp.*). Η ποσότητα και ποιότητα των πρωτεϊνών που περιέχονται στα ψευδοδημητριακά είναι αρκετά ικανοποιητική, καθώς, πέρα από το υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών, που κυμαίνεται στις τιμές 10-20%, περιέχουν και αρκετά από τα απαραίτητα αμινοξέα σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα δημητριακά. Πιο συγκεκριμένα, τα ψευδοδημητριακά αποτελούν καλές πηγές πρόσληψης λυσίνης, αργινίνης, τρυπτοφάνης αλλά καιθειούχων αμινοξέων (κυστεΐνη, μεθειονίνη). Από την συγκεκριμένη κατηγορία φυτών, το υψηλότερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο το περιέχει ο αμάρανθος, όπου το σύνολο των απαραίτητων αμινοξέων έχει προσδιοριστεί στην τιμή των 47.65 g/100 g πρωτεΐνης. Σε σύγκριση με την σόγια, ο αμάρανθος έχει σημαντικά υψηλότερα ποσά γλουταμίνης, γλυκίνης και μεθειονίνης, αλλά τα επίπεδα τυροσίνης και κυστεΐνης ήταν χαμηλότερα από αυτά της σόγιας. Όμως, τόσο ο αμάρανθος όσο και η σόγια έχουν ίσες ή ακόμη και μεγαλύτερες ποσότητες αμινοξέων από τις πρωτεΐνες του

αυγού, με αποτέλεσμα να αποτελούν καλές εναλλακτικές για λήψη φυτικής προέλευσης πρωτεΐνη στην ανθρώπινη διατροφή. Κατά την ανάλυση του προφίλ των πρωτεϊνών των ψευδοδημητριακών με ηλεκτροφορητικές μεθόδους SDS-PAGE (μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα πτυχιακή εργασία για τους σπόρους του χαρουπιού και θα αναλυθεί εκτενώς σε επόμενο κεφάλαιο), τα αποτελέσματα από όλα τα δείγματα έδειξαν κοινές ζώνες στα ~50 kDa και ζώνες χαμηλού μοριακού βάρους που αντιστοιχούν στο κλάσμα σφαιρίνης (~50 kDa) και στο κλάσμα λευκωματίνης (~10 kDa) (Alonso, et al. 1990) (Malik and Singh 2022) Επιπλέον, καθώς η βιοδιαθεσιμότητα και πεπτικότητα των πρωτεϊνών είναι εξίσου σημαντική και την ποσότητα και την αναλογία τους σε συγκεκριμένα αμινοξέα, η *in vitro* πεπτικότητα πρωτεΐνης (IVPD) των ψευδοδημητριακών φαίνεται να βρίσκεται σε αρκετά υψηλά επίπεδα της τάξης του 70% με εξαίρεση τους σπόρους chia που έχουν χαμηλότερες τιμές που κυμαίνονται στο 50%. Τέλος, τα ψευδοδημητριακά δεν περιέχουν το βασικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα των δημητριακών, την γλουτένη, γεγονός που επιτρέπει την ενσωμάτωσή τους σε δίαιτες για άτομα που πάσχουν από κοιλιοκάκη (δυσανεξία στην γλουτένη). (Martínez-Villaluenga, Peñas and Hernández-Ledesma 2020) (Schoenlechner, Jurackova and Berghofer 2005) (Alonso-Miravalles and O'Mahony 2018)



Εικόνα 11. Ανάλυση SDS-PAGE υπο μη μεταυσιωτικές συνθήκες σε σπόρους κινόας (Alonso Miravalles et al. Composition, Protein Profile and Rheological Properties of Pseudocereal-Based Protein- Rich Ingredients)

Ξηροί καρποί: πρόκειται για φρούτα (καρποί δέντρων ή φυτών) που περιβάλλονται από ένα εξωτερικό, μη βρώσιμο και σκληρό κέλυφος που καλύπτει τον βρώσιμο εσωτερικό πυρήνα (σπόρο). Αποτελούν ένα σημαντικό στοιχείο μιας υγιεινής και ισορροπημένης διατροφής λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε υψηλής ποιότητας λιπίδια και λιπαρά οξέα αλλά και πληθώρα άλλων



Εικόνα 12. Διάγραμμα σύγκρισης ποσότητας απαραίτητων αμινοξέων (mg/g protein) στις πρωτεΐνες φουντουκιού (μαύρες στήλες) σε σχέση με τις πρωτεΐνες αυγού (γκρί στήλες). (Brufau G. et al, Nuts: source of energy and macronutrients)

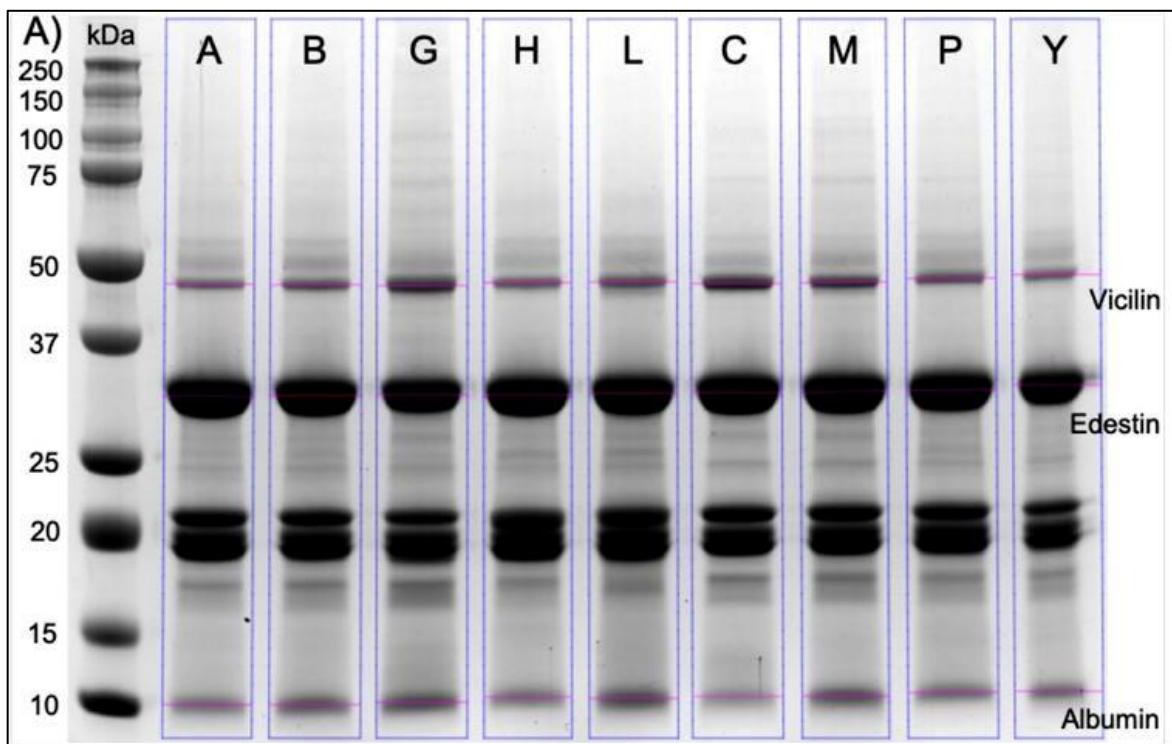
βιοδραστικών ενώσεων (φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή, τανίνες κ.α.) απαραίτητα για την σωστή λειτουργία των κυττάρων και συνολικά του οργανισμού. Το ολικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο συγκεκριμένων ξηρών καρπών είναι σχετικά υψηλό, με αποτέλεσμα να αποτελούν καλή πηγή πρωτεΐνης. Το υψηλότερο ποσοστό πρωτεϊνών κατέχεται από τα καρύδια, τα φιστίκια, τα αμύγδαλα, τα φιστίκια τύπου Αιγίνης και τα κάσιους ακολουθούμενα από τα καρύδια τύπου Βραζιλίας, τα φουντούκια και το κοκουνάρι. Το χαμηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης από τους ξηρούς καρπούς εντοπίζεται στα πεκάν και τα μακαντάμια. (Bhattacharya 2023) Όμως, στους ξηρούς καρπούς, υπάρχει η συνήθης έλλειψη των φυτικών προϊόντων σε απαραίτητα αμινοξέα όπως η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη (στα μακαντάμια), η ισολευκίνη (περισσότερο εμφανής η έλλειψη στα αμύγδαλα), τα θειούχα αμινοξέα μεθειονίνη και κυστεΐνη αλλά και η λυσίνη. Αντιθέτως, συγκεκριμένα απαραίτητα αμινοξέα, βρίσκονται σε παραπλήσια ή και ίδια επίπεδα όσο και στις πρωτεΐνες των αυγών, όπως η τρυπτοφάνη (στους ξηρούς καρπούς εκτός μακαντάμια) και η λευκίνη αλλά εξαίρεση αποτελούν και τα καρύδια τύπου Βραζιλίας που παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά των θειούχων αμινοξέων σε σχέση με τις πρωτεΐνες του αυγού. Τέλος, το πρωτεϊνικό και αμινικό περιεχόμενο των ξηρών καρπών επηρεάζεται και μεταβάλλεται ανάλογα με την ποικιλία και τις συνθήκες παραγωγής/επεξεργασίας καθώς το κλάσμα της πρωτεΐνης μειώνεται στους καβουρδισμένους ξηρούς καρπούς λόγω της αύξησης της περιεκτικότητας σε λιπαρά. (Brufau, Boatella and Rafecas 2006) (Wien 2017)

Σπόροι: πρακτικά στην κατηγορία σπόροι ανήκουν όλες οι υπόλοιπες κατηγορίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, αλλά εδώ θα αναφερθούμε στους βρώσιμους σπόρους που δεν εμπίπτουν στις προηγούμενες κατηγορίες πλήρως και προέρχονται από λαχανικά (όπως οι κολοκύθες), άνθη (όπως οι ηλίανθοι) ή άλλες καλλιέργειες και φυτά που καλλιεργούνται για ποικίλες χρήσεις εκτός της τροφής(όπως το λινάρι ή η κάνναβη). (J. Derek Bewley 2006)

Οι κολοκυθόσποροι αποτελούν καλή πηγή αρκετών θρεπτικών και βιοδραστικών ουσιών όπως αμινοξέα, φυτοστερόλες, ακόρεστα λιπαρά οξέα, φαινολικές ουσίες, τοκοφερόλες και μέταλλα. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι βιοδραστικές ουσίες που εμπεριέχονται σε αυτούς τους σπόρους έχουν ποικίλες ευεργετικές δράσεις για τον οργανισμό όπως αντιμικροβιακή, αντικαταθλιπτική, αντιδιαβητική, αντικαρκινική και αντιοξειδωτική. Εκτός από τις προαναφερθείσες ουσίες, οι σπόροι κολοκύθας περιέχουν υψηλά ποσοστά πρωτεϊνών, περίπου 35% και μελέτες έχουν αποδείξει ότι αυτές οι πρωτεΐνες προσομοιάζουν αρκετά τις πρωτεΐνες της σόγιας ως προς την βιοδιαθεσιμότητα των αμινοξέων, και πιο συγκεκριμένα η δομή της σφαιρίνης των σπόρων κολοκύθας είναι ανάλογη με αυτή των οσπρίων. (Dotto and Chacha 2020)

Οι σπόροι της κάνναβης χρησιμοποιούνται τόσο στην ιατρική, στα τρόφιμα αλλά στις Ασιατικές χώρες και σε ποικίλες άλλες χρήσεις, όπως η παραγωγή υφασμάτων, χαρτιού, ενδυμάτων και ειδών οικιακής χρήσης. Η χρήση των σπόρων της κάνναβης (*Cannabis sativa ssp. sativa*) μέχρι πριν λίγα χρόνια ήταν αρκετά περιορισμένη στις χώρες του δυτικού κόσμου λόγω της απόρριψης από τον Οργανισμό Ηνωμένων Εθνών το 1961, εξ αιτίας της υψηλής περιεκτικότητας της σε τετραϋδροκανναβινόλη (THC), η οποία έχει έντονα ψυχοδραστικά αποτελέσματα στον οργανισμό. Όμως, μετά την ανάπτυξη ποικιλιών που περιέχουν ελάχιστες ποσότητες THC (πρώτη φορά αναπτύχθηκαν στην Ουκρανία), η χρήση του στα τρόφιμα, όπως και οι έρευνες για την ανάδειξη των ευεργετικών δράσεων του, έχουν αυξηθεί σημαντικά. Οι σπόροι της κάνναβης περιέχουν περίπου 18–23% πρωτεΐνη, 25–30% λάδι, 30–40% φυτικές ίνες και 6–7% υγρασία. Συγκεκριμένα για τις πρωτεΐνες, έχουν εντοπιστεί περίπου 181 είδη πρωτεϊνών στους σπόρους της κάνναβης με πιο σημαντικές την εδεστίνη και σφαιρίνη σε ποσοστά 67-75% και λευκωματίνη σε ποσοστό 25-37% επί του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου. Η εδεστίνη περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε θειούχα αμινοξέα, όπως η κυστίνη και η μεθειονίνη. Τέλος, η

απομονωμένη πρωτεΐνη κάνναβης (HPI) αποτελεί καλή πηγή και των εννέα απαραίτητων αμινοξέων (κυρίως αργινίνη και γλουταμινικό οξύ). (Chen, et al. 2023) (El-Sohaimy, et al. 2022)



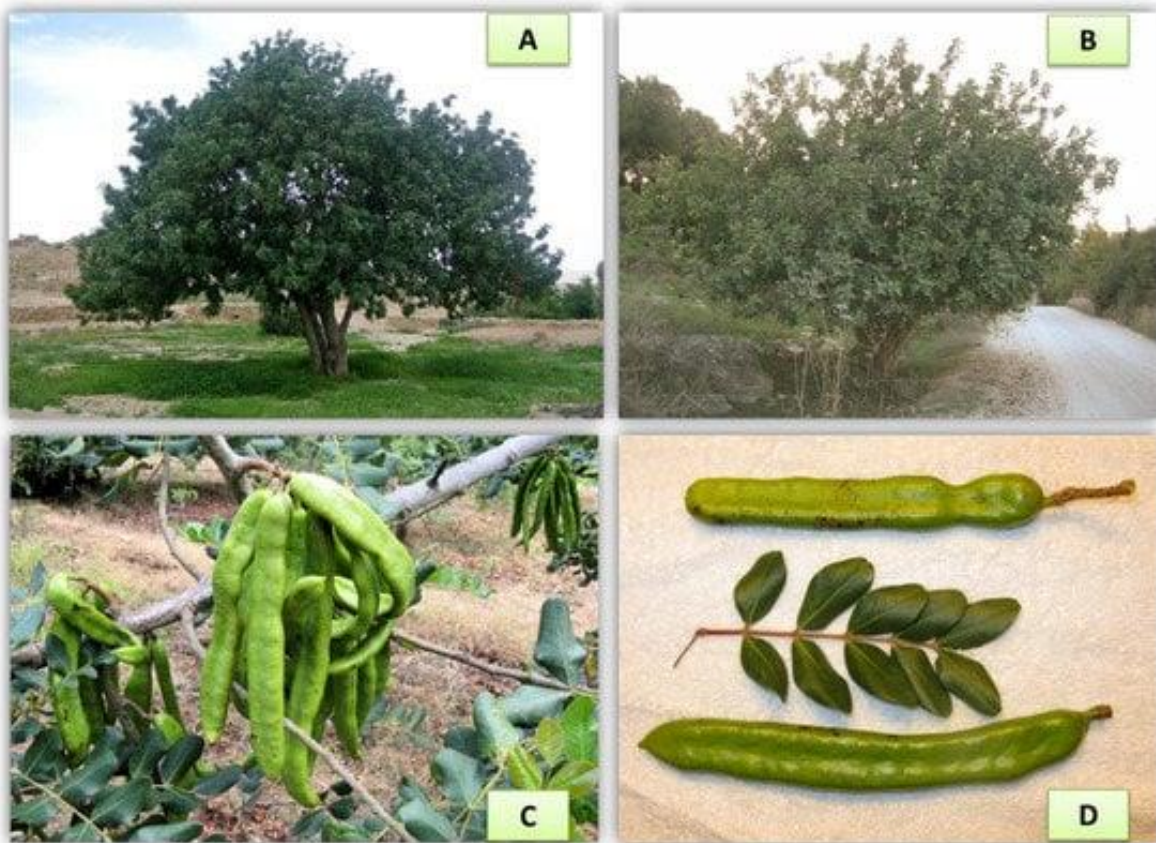
Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση σπόρων κάνναβης με χρήση μετουσιωτικών παραγόντων και SDS-PAGE (Liu M. et al. Composition and functional properties of hemp seed protein isolates from various hemp cultivars)

1.5. Χαρούπι

1.5.1. Χαρουπιά

Η χαρουπιά ή με την επιστημονική της ονομασία *Ceratonia siliqua L.* είναι ένας αειθαλής θάμνος με χοντρό κορμό και δυνατά κλαδιά που ανήκει στην οικογένεια Leguminosae ή Fabaceae που αποτελεί υποοικογένεια της Caesalpinioideae και είναι εγγενή στις χώρες της Μεσογείου. Το είδος αυτό είναι αρκετά ανθεκτικό στην ξηρασία (ξηρόφυτο ή xerophytic) και κατάλληλα προσαρμοσμένο για το άνυδρο και ημίξηρο κλιματικό μοτίβο της περιοχής της Μεσογείου, με συστήματα ριζών που φτάνουν μεγάλο βάθος στο έδαφος αλλά δυσανεκτικά στην υπερχειλίση. Η εισαγωγή του στην Ελλάδα και την Ιταλία έγινε πρώτα από τους αρχαίους Έλληνες, ενώ οι Άραβες, μέσω του εμπορίου το διέδωσαν στην Πορτογαλία, την Ισπανία και τις βόρειες ακτές της Αφρικής, περιοχές που ακόμα και σήμερα υπάρχει σημαντική παραγωγή του συγκεκριμένου φυτού. Έρευνες έχουν δείξει ότι το συγκεκριμένο είδος για να αναπτυχθεί απαιτεί θερμοκρασίες που να κυμαίνονται από

τους 16 °C έως τους 36 °C για περισσότερο από το 50% των συνολικών ωρών του έτους. Τα φύλλα του συγκεκριμένου φυτού είναι σκληρόφυλλα που επικαλύπτονται από μια εξαιρετικά παχιά επιδερμίδα και είναι πλούσια σε διάφορες φαινολικές ενώσεις. Οι τέσσερις βασικές γενετικές ομάδες του είδους *Ceratonia siliqua* είναι η SM από το νότιο Μαρόκο (South Morocco), CM από την κεντρική Μεσόγειο (Central Mediterranean) που περιλαμβάνει τους γονότυπους από την Γαλλία, Σαρδηνία, Αλγερία, Πορτογαλία, Σικελία και τις Βαλεαρίδες, και η EM από την ανατολική Μεσόγειο (Eastern Mediterranean) που περιλαμβάνει τους γονότυπους της Κύπρου, της Ελλάδας και του Λίβανου. (Giohari, et al. 2022)



Εικόνα 14. Φωτογραφίες της χαρουπιάς (εικόνες A και B) και του χαρουπιού (εικόνες C και D). (Giohari, A et al. Carob: A Sustainable Opportunity for Metabolic Health. Foods 2022)

1.5.2. Σπόροι χαρουπιού

Οι βρώσιμοι καρποί ή λοβοί της χαρουπιάς είναι σε μορφή φασολιών, κοινώς γνωστό ως χαρουπί, το οποίο αποτελείται από την σάρκα σε ποσοστό 90% και τους σπόρους σε ποσοστό 10%. Ο καρπός φέρει πράσινη απόχρωση (όντας άγουρος) και επίμηκες και

συνάμα συμπιεσμένο σχήμα με μεγάλη διαφοροποίηση στις διαστάσεις και ζαρωμένη επιφάνεια, ενώ, αποκτά καφέ απόχρωση όταν ωριμάσει. Το βασικό σώμα του καρπού αποτελείται από ένα τραχύ περίβλημα εξωτερικά που ονομάζεται περικάρπιο, που περικλείει το μαλακό εσωτερικό του που ονομάζεται ενδοκάρπιο. Οι σπόροι που βρίσκονται στο εσωτερικό του χαρουπιού χωρίζονται μεταξύ τους από το μεσοκάρπιο, έχουν



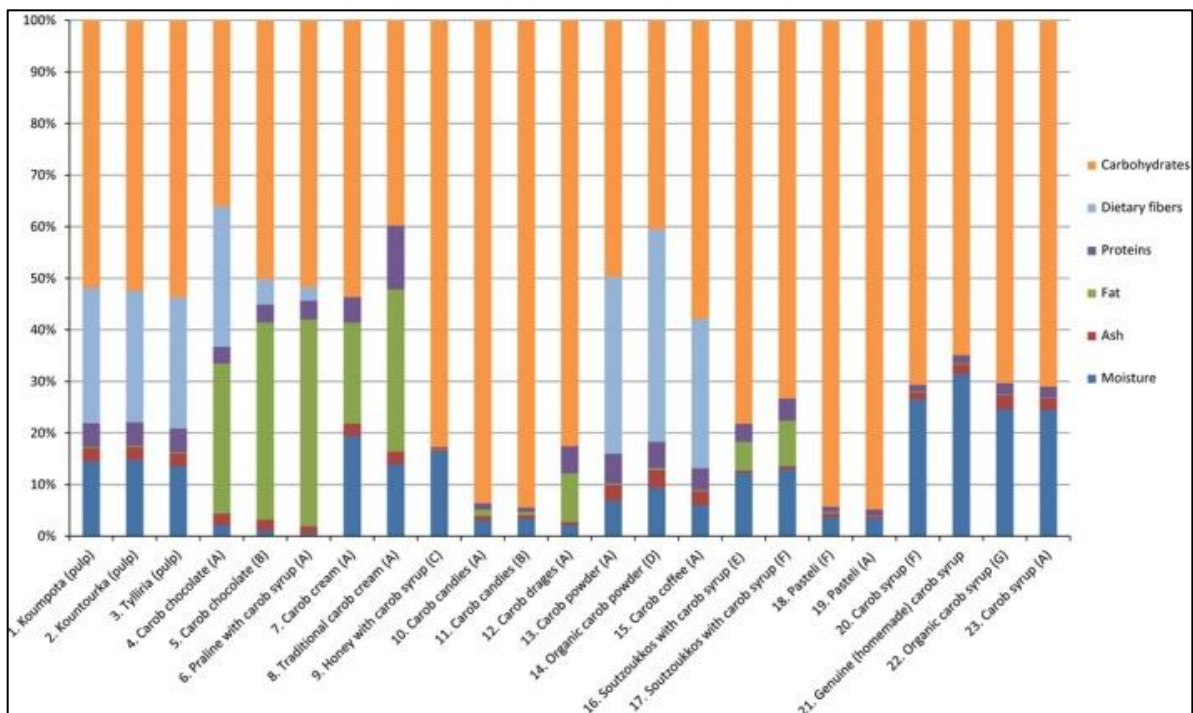
Εικόνα 15. Διαφοροποίηση χρώματος σπόρων χαρουπιού. (Zemouri Z et al. The seed diversity of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) and the relationship between seeds color and coat dormancy, 2020)

σκούρα καφέ απόχρωση και ωοειδές σχήμα, με μήκος περίπου 10 χιλιοστών (mm) και βάρος 0.2 γραμμάρια κατά προσέγγιση σε κάθε σπόρο. Επιπλέον, κάθε σπόρος αποτελείται από το τρίχωμα σε ποσοστό 30-35%, το λευκό και συνήθως ημιδιαφανές ενδοσπέρμιο σε ποσοστό περίπου 40-50% και τέλος το φυτόρο ή έμβρυο σε ποσοστό περίπου 20-25%. Οι συγκεκριμένοι σπόροι χρησιμοποιήθηκαν από τους Άραβες στην αρχαιότητα ως μονάδα βάρους κυρίως για τον χρυσό και για πολύτιμα μέταλλα υπό την ονομασία qirat ή karat, το οποίο αποτελεί μέχρι και σήμερα την μονάδα μέτρησης του βάρους του χρυσού, αλλά με την ονομασία καράτι. (Brassesco, et al. 2021) (Zemouri, et al. 2020)

1.5.3. Διατροφική ανάλυση σπόρων χαρουπιού

Ο καρπός του χαρουπιού είναι πλούσιος σε σάκχαρα σε ποσοστό 48-56%, με κυριότερες την σουκρόζη σε ποσοστό που φτάνει το 95%, την γλυκόζη σε ποσοστό 2-4% ,την φρουκτόζη σε ποσοστό 6-7% και τις ινोσιτόλες σε σχετικά υψηλά ποσοστά. Επιπλέον, σε μικρές ποσότητες έχει εντοπιστεί και πλήθος άλλων υδατανθράκων όπως η μαλτόζη, η ραφινόζη, η σταχυόζη και η ξυλόζη. Έρευνες από το Πανεπιστήμιο της Κύπρου έδειξαν ότι συγκεκριμένα τα κυπριακά χαρούπια εμφανίζουν από τις υψηλότερες περιεκτικότητες στα σάκχαρα σουκρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη σε ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ των τιμών 53,6% και 54,8% σε σχέση με άλλα είδη ή γενετικές ομάδες. Οι φυτικές ίνες του χαρουπιού βρίσκονται σε εξαιρετικά υψηλό ποσοστό ίσο με 40% w/w του χαρουπιού, κάνοντας αυτόν τον καρπό εξαιρετική πηγή φυτικών ινών, που είναι απαραίτητοι για την φυσιολογική λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου, αλλά και των

ζώων (καθώς το χαρούπι χρησιμοποιείται και σε αρκετές ζωοτροφές). Επίσης, ο καρπός της χαρουπιάς περιέχει υγρασία σε ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ του 13.6% και του 14.8% αλλά περιέχει και φαινολικές ενώσεις σε υψηλά ποσοστά με κυριότερες τα φαινολικά οξέα, τις γαλλοτανίνες και τα φλαβονοειδή. Επιπλέον, το λιπιδικό περιεχόμενο των σπόρων προσδιορίστηκε ως αρκετά χαμηλό, σε ποσοστό που κυμαίνεται στο 0.21-0.23%, αν και το ποσοστό αυτό αυξάνεται σε προϊόντα που παράγονται με βάση το χαρούπι (π.χ. πραλίνα χαρουπιού) λόγω της προσθήκης και άλλων συστατικών, με αποτέλεσμα να φτάνει ποσοστό έως και το 40.13%. Στο κομμάτι των πρωτεϊνών, οι σπόροι έχουν αρκετά ικανοποιητικά ποσοστά πρωτεϊνών, της τάξης του 4.54-4.6% στους σπόρους αλλά και ποσοστό που κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.43% και 5.12% στα προϊόντα με βάση το χαρούπι, ενώ παράλληλα δεν περιέχουν το κύριο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα των δημητριακών, την γλουτένη. Το άλευρο που παράγεται από σπόρους χαρουπιού, συγκριτικά με το πρωτεϊνικό περιεχόμενο άλλων αλεύρων φασολιών όπως τα φασόλια φάβας (*Vicia faba* L), τα μπιζέλια και η σόγια, βρέθηκε να έχει σημαντικά μεγαλύτερο πρωτεϊνικό περιεχόμενο σε ποσοστό ίσο με 48.4%, σε σχέση με 18.8% στα μπιζέλια και 34.4% στην σόγια. (Bengoechea, et al. 2008) (Papaefstathiou, et al. 2018)



Διάγραμμα 2. Χημική σύσταση του χαρουπιού και διαφόρων προϊόντων με βάση το χαρούπι. (Papaefstathiou et al. Nutritional characterization of carobs and traditional carob products, 2018)

1.5.4. Οφέλη για την υγεία

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η κατανάλωση προϊόντων με βάση το χαρούπι μπορεί να έχει ευεργετικά οφέλη στην σωστή λειτουργία και υγεία του οργανισμού λόγω της υψηλής περιεκτικότητας των καρπών σε βιοδραστικές ουσίες. Η αντιοξειδωτική δράση οφείλεται κυρίως στην παρουσία ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C) και φαινολικών ενώσεων, όπως η γαλική επιγαλλοκατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, η κατεχίνη, το γαλλικό οξύ, το κινεμικό οξύ κ.α., που εντοπίζονται στην σάρκα του καρπού, αλλά και οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή, οι συμπυκνωμένες τανίνες, και το ταννικό οξύ που εντοπίζονται στην φλούδα των σπόρων του χαρουπιού. Όλες αυτές οι ενώσεις δρουν πρωτίστως ως αντιοξειδωτικά εντοπίζουν και δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και τα ιόντα, εμποδίζοντας και προλαμβάνοντας τις βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στα κύτταρα ενώ παράλληλα έχουν και δευτερεύουσες δράσεις όπως η αγχολυτική και αντικαταθλιπτική δράση, ο έλεγχος της κοιλιακής παχυσαρκίας, η αντιβακτηριδιακή/αντιμυκητιακή δράση αλλά και η προστασία του ήπατος. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η αντιοξειδωτική δράση του χαρουπιού επηρεάζεται από τον βαθμό ωριμότητας του καρπού, όπου οι υψηλότερες ποσότητες ολικών φαινολικών ενώσεων, ολικών φλαβονοειδών αλλά και ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C), είναι διαθέσιμες όταν ο καρπός είναι άγουρος. Επιπλέον, έρευνες έχουν αποδείξει ότι η κατανάλωση προϊόντων με βάση το χαρούπι μπορεί να βοηθήσει άτομα που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2, καθώς συγκεκριμένες φαινολικές ενώσεις (γαλλικό οξύ, κατεχίνη, χλωρογενικό οξύ, μυρικετίνη και ρουτίνη) μπορούν και επιβραδύνουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης στο αίμα, δρώντας ως αναστολείς ή επηρεάζοντας την αναστολή των δύο βασικών ενζύμων α-αμυλάση και α-γλυκοσιδάση. Τέλος, πιο πρόσφατες έρευνες έχουν αναδείξει τα γαστρεντερικά οφέλη της κατανάλωσης προϊόντων χαρουπιού, κυρίως σε άτομα που πάσχουν από συγκεκριμένες πολύ κοινές γαστρεντερικές διαταραχές (π.χ. γαστρίτιδα, πεπτικά έλκη, καρκίνος, λοίμωξη από *Helicobacter pylori*). Συγκεκριμένα, σε άτομα που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα, το υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενο των καρπών της χαρουπιάς μπορεί να εμποδίσει την βράχυνση του παχέος εντέρου και να μειώσει τις βλάβες και τις βιοχημικές αλλοιώσεις του. (Papaefstathiou, et al. 2018) (Brassesco, et al. 2021)

1.5.5. Εφαρμογές του χαρουπιού στην βιομηχανία τροφίμων

Τα τελευταία χρόνια, το χαρούπι ως καρπός αλλά και οι σπόροι του, έχουν αποκτήσει σημαντικό ενδιαφέρον από την βιομηχανία τροφίμων και έχουν ενταχθεί σε πληθώρα καθημερινών αλλά και πιο εξειδικευμένων προϊόντων. Οι κυριότερες εφαρμογές του περιλαμβάνουν την χρήση αλεύρου από χαρούπι, πάστας χαρουπιού αλλά και σιροπιού από τους καρπούς.

1.5.5.1. Χαρουπάλευρο

Το άλευρο χαρουπιού όχι μόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί όπως ακριβώς το άλευρο σίτου και καλαμποκιού αλλά μπορεί να επιφέρει και πολλαπλά οφέλη τόσο στην διατροφή (κεφάλαιο 1.5.4) αλλά και στα ίδια τα προϊόντα. Για να ληφθεί το άλευρο χαρουπιού, οι λοβοί αρχικά πλένονται με καυτό τρεχούμενο νερό και τοποθετούνται σε φούρνο στους 45°C για 72 ώρες για να απαλλαγούν από την υγρασία και τυχόν ρύπους και να διευκολυνθεί η



Εικόνα 16. Χαρουπάλευρο

διαδικασία λείανσης. Η διαδικασία άλεσης γίνεται με χρήση μύλων με μαχαίρια και σφυρόμυλου με σταδιακή μείωση των διαμέτρων των οπών των κόσκινων και τέλος με χρήση υπερφυγόκεντρου μύλου με κόσκινο ώστε να ληφθεί ένα εξαιρετικά λεπτόκοκκο άλευρο χαρουπιού. Το συγκεκριμένο άλευρο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα εφαρμογών αρτοποιίας, όπως η παρασκευή ψωμιού, κέικ ή γλυκών αρτοσκευασμάτων, σνακ και ζυμαρικών, σε συνδυασμό με το άλευρο σίτου. Έρευνες έχουν δείξει ότι με την χρήση αλεύρου από χαρούπι σε ποσοστό μόλις 50% στην παρασκευή κέικ αυξάνεται σημαντικά η περιεκτικότητα του τελικού προϊόντος σε φυτικές ίνες, πρωτεΐνη και υδατάνθρακες, αυξάνεται η απορρόφηση νερού από την ζύμη, ενώ μειώνεται το λίπος. Παράλληλα, τα κέικ παρουσίασαν καλύτερα οργανοληπτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά, έχοντας βελτιωμένη κυψέλωση και ομοιομορφία ψίχας, γλυκύτητα χωρίς την απαίτηση υψηλής ποσότητας επιπρόσθετης ζάχαρης και τρυφερότητα προϊόντος. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα χαρουπάλευρα που παράγονται μαζί με τους σπόρους του χαρουπιού

έδωσαν μεγαλύτερη συνεκτικότητα και αντοχή στο τελικό προϊόν, σε σχέση με άλευρα που χρησιμοποιήθηκε μόνο η σάρκα του χαρουπιού. Τέλος, το χαρουπάλευρο, λόγω της απουσίας της γλουτένης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο του αλεύρου για την παραγωγή ειδών αρτοποιίας, σνακ και ζυμαρικών χωρίς γλουτένη, κατάλληλα για άτομα που πάσχουν από κοιλιοκάκη (δυσανεξία στην γλουτένη). (Yousif and Alghzawi 2000)

1.5.5.2. Σιρόπι Χαρουπιού

Το σιρόπι χαρουπιού αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό προϊόν που παράγεται από το χαρούπι και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα προϊόντων (π.χ. μέλι με χαρούπι, παστέλι με χαρούπι, πραλίνα χαρουπιού, γιαούρτι, ροφήματα κ.α.) ως πρόσθετο λόγω του χρώματος του, της διατροφικής σημασίας του, της γλυκύτητας του κ.α. Το σιρόπι είναι χαμηλό σε λίπη, πλούσιο σε σάκχαρα, με κυριότερα την σακχαρόζη (65-75% όλων των σακχάρων), την φρουκτόζη και την γλυκόζη (15-25% όλων των σακχάρων), αλλά και σε μέταλλα όπως ασβέστιο, φώσφορο και κάλιο. Για να παραχθεί το σιρόπι χαρουπιού, η σάρκα του καρπού διαχωρίζεται από τους σπόρους και ξηραίνεται στους 40°C για μια ημέρα. (Petit and Pinilla 1995) Έπειτα



Εικόνα 17. Σιρόπι χαρουπιού (Source: greekflavours.com)

ακολουθεί η διαδικασία εκχύλισης, όπου ο πολτός που περιέχει σωματίδια με μέσο μέγεθος 0.5-1cm διαλύεται σε νερό σε αναλογία πολτού/νερού ίση με 1:2 και αναδεύεται στους 43°C για 160 λεπτά. Έπειτα το σακχαρούχο εκχύλισμα και η στερεά φάση διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση και ο χυμός που λαμβάνεται συμπυκνώνεται με περιστροφικό εξατμιστή μέχρι να επιτευχθεί συγκέντρωση ίση με 66.5 Brix. Η συγκέντρωση των σακχάρων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ του 65% και 67%, φτάνοντας αλλά όχι υπερβαίνοντας το σημείο υπερ-κορεσμού. Αυτό απαιτείται καθώς χαμηλότερες συγκεντρώσεις σακχάρων θα προκαλούσαν προβλήματα ανάπτυξης διαφόρων μικροοργανισμών (όπως ζύμες) ενώ ένα κορεσμένο σιρόπι θα προκαλούσε προβλήματα κρυστάλλωσης της ζάχαρης σε πιθανές μεταβολές της θερμοκρασίας. Το τελικό προϊόν πρέπει να είναι ιξώδες σιρόπι με χρυσομαύρο χρώμα χωρίς στερεά υπολείμματα. (El Batal, et al. 2016)

1.6. Μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών

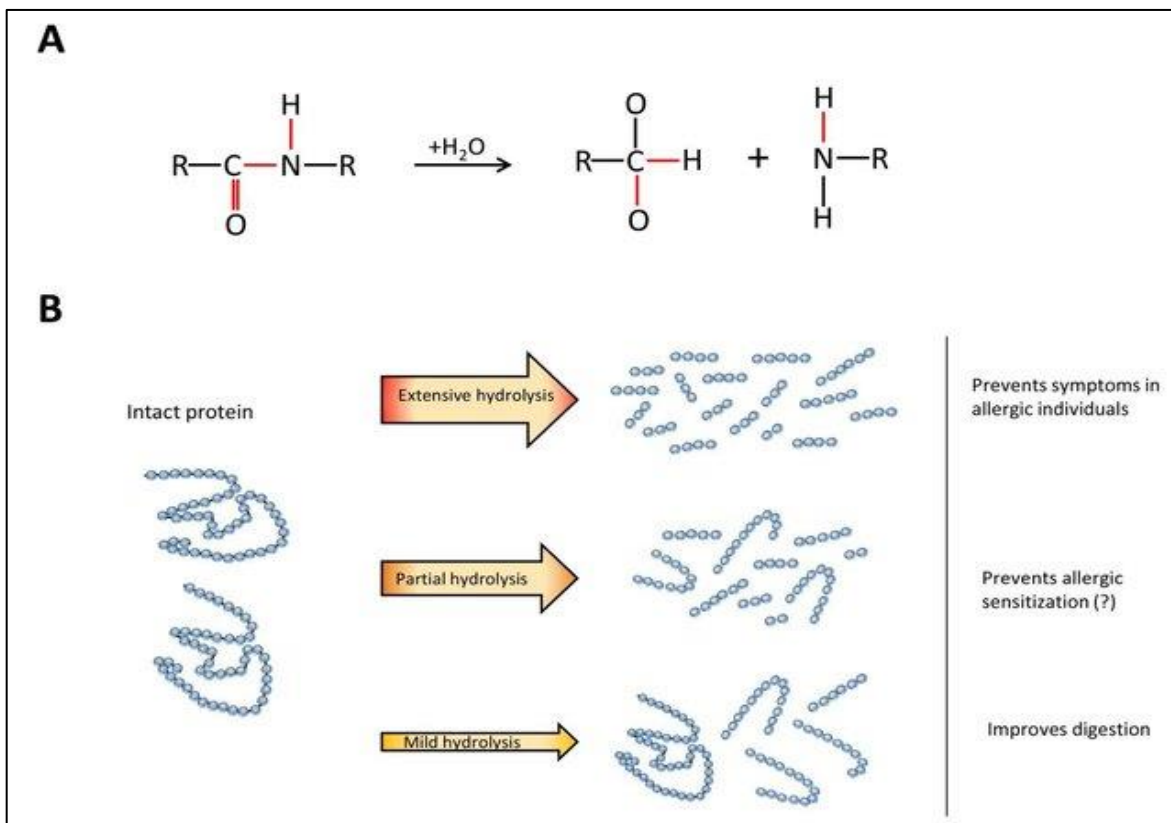
Όπως αναφέρθηκε στα κεφάλαια 1.1 και 1.4, οι πρωτεΐνες αποτελούν σημαντική κατηγορία μακρομορίων, καθορίζοντας τις διάφορες λειτουργίες, αντιδράσεις και χαρακτηριστικά όλων των οργανισμών και ως αποτέλεσμα και των τροφίμων. Επομένως, η αποκρυπτογράφηση της δομής τους, της σύνθεσης τους και των λειτουργιών τους είναι απαραίτητη προκειμένου να κατανοήσουμε τα συστατικά των τροφίμων σε βάθος αλλά και το πώς αλληλεπιδρούν με τον οργανισμό και τα κύτταρα του. (Büyükköroğlu, et al. 2018)

1.6.1. Προσδιορισμός αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων στην πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελεί το πρώτο κομμάτι της ανάλυσης μιας πρωτεΐνης, καθώς τα αμινοξέα αποτελούν την δομή της πρωτεΐνης, και η σειρά τους στην αλυσίδα είναι χαρακτηριστική και αποτελεί μια μορφή μοναδικού κώδικα για την κάθε πρωτεΐνη. Η διαδικασία για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων είναι εξαιρετικά περίπλοκη και αποτελείται από δυο βασικά κομμάτια, την ολοκληρωτική υδρόλυση του υποστρώματος για την λήψη των αμινοξέων, και την χρωματογραφική ανάλυση και ποσοτικοποίηση των απελευθερωμένων αμινοξέων.

Η υδρόλυση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας περιλαμβάνει την διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού που ενώνει τα αμινοξέα μεταξύ τους στην πολυπεπτιδική αλυσίδα και μπορεί να επιτευχθεί με χημικά μέσα, σε όξινες ή βασικές συνθήκες, ή με ενζυματικά μέσα. Η χρήση υδροχλωρικού οξέος ως μέσο υδρόλυσης αποτελεί την πιο κοινά χρησιμοποιούμενη μέθοδο καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί όντας σε υγρή ή αέρια κατάσταση και να ανακτηθεί μετά την υδρόλυση με εξάτμιση. Οι πιο κοινές συνθήκες υδρόλυσης κάτω από όξινες συνθήκες περιλαμβάνει την επίδραση HCl συγκέντρωσης 6M, για 20-24 ώρες, θερμοκρασία 110°C και συνθήκες κενού αέρος. Η χρήση του HCl μειονεκτεί λόγω του περιορισμού ως προς την χρήση του μόνο σε μικρές ποσότητες υποστρώματος, δυσκολεύοντας την ανάλυση σε περιπτώσεις όπου οι ποσότητες πρωτεϊνών είναι περιορισμένες. Επιπλέον, η υδρόλυση σε όξινες συνθήκες έχει πάντα ως αποτέλεσμα την μερική ή πλήρη αποδιάταξη και καταστροφή ορισμένων αμινοξέων. Έτσι, η τρυπτοφάνη καταστρέφεται πλήρως και η κυστεΐνη δεν μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα σε δείγματα που υπέστησαν όξινη υδρόλυση, εκτός και εάν μετατραπεί στο πιο ισχυρό παράγωγό της, το κυστεϊκό οξύ. Η ασπαραγίνη και γλουταμίνη υδρολύονται πλήρως σε ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ, ενώ η τυροσίνη

καταστρέφεται μερικώς και η σερίνη και θρεονίνη υδρολύονται μερικώς. Συγκεκριμένα για την σερίνη και θρεονίνη, επειδή περιέχουν ομάδα $-OH$ στην δομή τους, υδρολύονται σε αρκετά αργό ρυθμό και με καταγραφή της πορείας της αντίδρασης υδρόλυσης της σε ημιλογαριθμικό χαρτί, όπου με κατάλληλους συντελεστές μπορούμε να φτάσουμε στην αρχική κατάσταση των δύο προαναφερθέντων αμινοξέων. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συγκεκριμένοι προστατευτικοί παράγοντες (φαινόλη, μερκαπτοαιθανόλη, ινδόλη κ.α.) για την ελάττωση των απωλειών αμινοξέων κατά την υδρόλυση. Εναλλακτικές υδρόλυσης είναι η χρήση σουλφονικών οξέων (π.χ. μεθανοσουλφονικό οξύ), χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων, χρήση αλκαλικών διαλυμάτων (π.χ. υδροξείδιο του καλίου KOH) και διαφόρων ενζύμων (π.χ. συστήματα ακινητοποιημένων πρωτεασών). Μετά την επίτευξη της υδρόλυσης, η αλληλουχία των αμινοξέων προσδιορίζεται είτε με αυτοματοποιημένη χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής (ion-exchange) είτε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). (Fountoulakis and Lahm 1998) (Bianchi-Bosisio 2005)



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση πρωτεϊνικής υδρόλυσης σε διαφορετικές εντάσεις ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα. (Kiewiet et al. Immunomodulatory Protein Hydrolysates and Their Application, 2018)

1.6.2. Τεχνικές καθαρισμού πρωτεϊνών

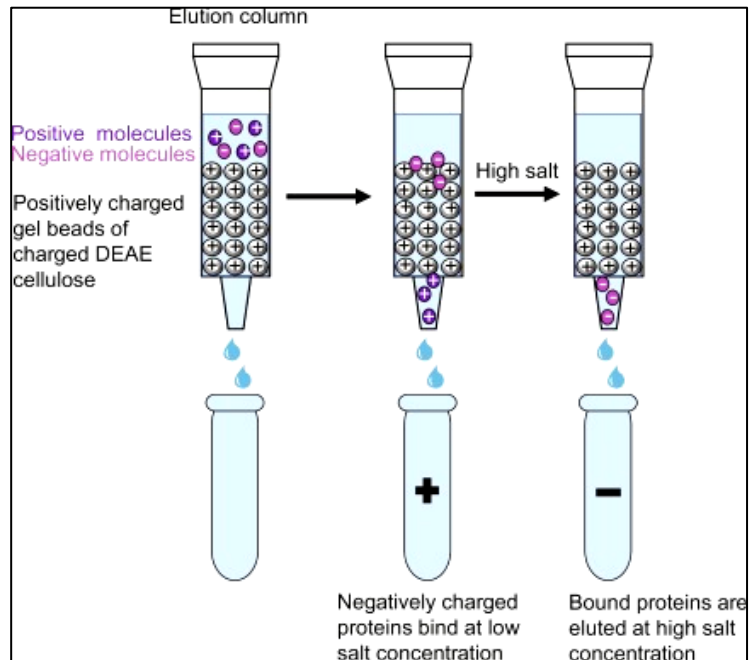
Ο καθαρισμός και η απομόνωση των πρωτεϊνών μέσα από ένα βιολογικό δείγμα αποτελεί αναπόσπαστο και εξαιρετικά σημαντικό στάδιο στην ανάλυση των πρωτεϊνών καθώς τα δείγματα που λαμβάνονται από τα τρόφιμα συνήθως αποτελούν μείγματα εκατομμυρίων ενώσεων και μορίων, όπου οι πρωτεΐνες μπορεί να αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος αυτών. Επιπλέον, η παρουσία και άλλων ενώσεων και μορίων κατά την ποιοτική ή ποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε ασαφή αποτελέσματα, σπατάλη πόρων και ανάγκη επανάληψης των αναλύσεων. Επομένως, ανάλογα με την αναμενόμενη χρήση του δείγματος απαιτείται και το ανάλογο επίπεδο καθαρότητας ως προς τις πρωτεΐνες, το οποίο λαμβάνεται με ποικίλες μεθόδους, οι σημαντικότερες των οποίων θα αναλυθούν συνοπτικά στις ακόλουθες παραγράφους. (Shen 2019)

1.6.2.1. Χρωματογραφικές τεχνικές

Ως μέθοδος, η χρωματογραφία είναι τεχνική φυσικού διαχωρισμού που επιτρέπει τον διαχωρισμό ενώσεων, την ταυτοποίηση τους αλλά και τον καθαρισμό/απομόνωση συγκεκριμένων συστατικών ή ουσιών μέσα από ένα πολύπλοκο μείγμα, επιτρέποντας την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του. Η διεργασία βασίζεται στον διαχωρισμό μορίων που βρίσκονται σε μείγμα που είτε είναι εφαρμοσμένο στην επιφάνεια μιας στερεάς στατικής φάσης ή βρίσκονται αναμεμειγμένα στην μάζα ρευστής στατικής φάσης, με την βοήθεια μιας κινητικής φάσης που προκαλεί την κίνηση των συγκεκριμένων μορίων. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με χρωματογραφικές μεθόδους με βάση συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τους όπως το μέγεθος και σχήμα, το συνολικό φορτίο, η παρουσία υδρόφοβων ομάδων αλλά και η ικανότητα σύνδεσης τους (συγγένεια) με την στατική φάση. Η στατική φάση μπορεί να είναι σε στερεά ή υγρή κατάσταση, με την υγρή να πρέπει να είναι επικαλυμμένη στην επιφάνεια μιας άλλης στερεής φάσης. Η κινητική φάση είναι αυτή που ρέει πάνω στην επιφάνεια της στατικής φάσης, προκαλώντας την κίνηση και τον διαχωρισμό των μορίων και μπορεί να είναι υγρή (εάν υγρή χρωματογραφία LC) ή αέρια (εάν αέρια χρωματογραφία GC). Οι κυριότερες μέθοδοι χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό πρωτεϊνών είναι η χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή ή μοριακού αποκλεισμού, η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) και η χρωματογραφία συγγένειας. (Coskun 2016)

Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων: Βασίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων πρωτεϊνών και της στερεάς στατικής φάσης της στήλης. Ανάλογα

με το υλικό πλήρωσης της στατικής φάσης η χρωματογραφία διακρίνεται σε Κατιοντονταλλαγή, όταν αποτελείται από καρβοξυλομεθυλομάδα με κυτταρίνη, και σε Αντιιοντοανταλλαγή, όταν αποτελείται από διαιθυλο-αμινοαιθυλο-ομάδα με κυτταρίνη. Η στατική φάση έχει πάντα φορτίο ιόντων αντίθετο από το φορτίο της πρωτεΐνης ή ομάδας πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν και η

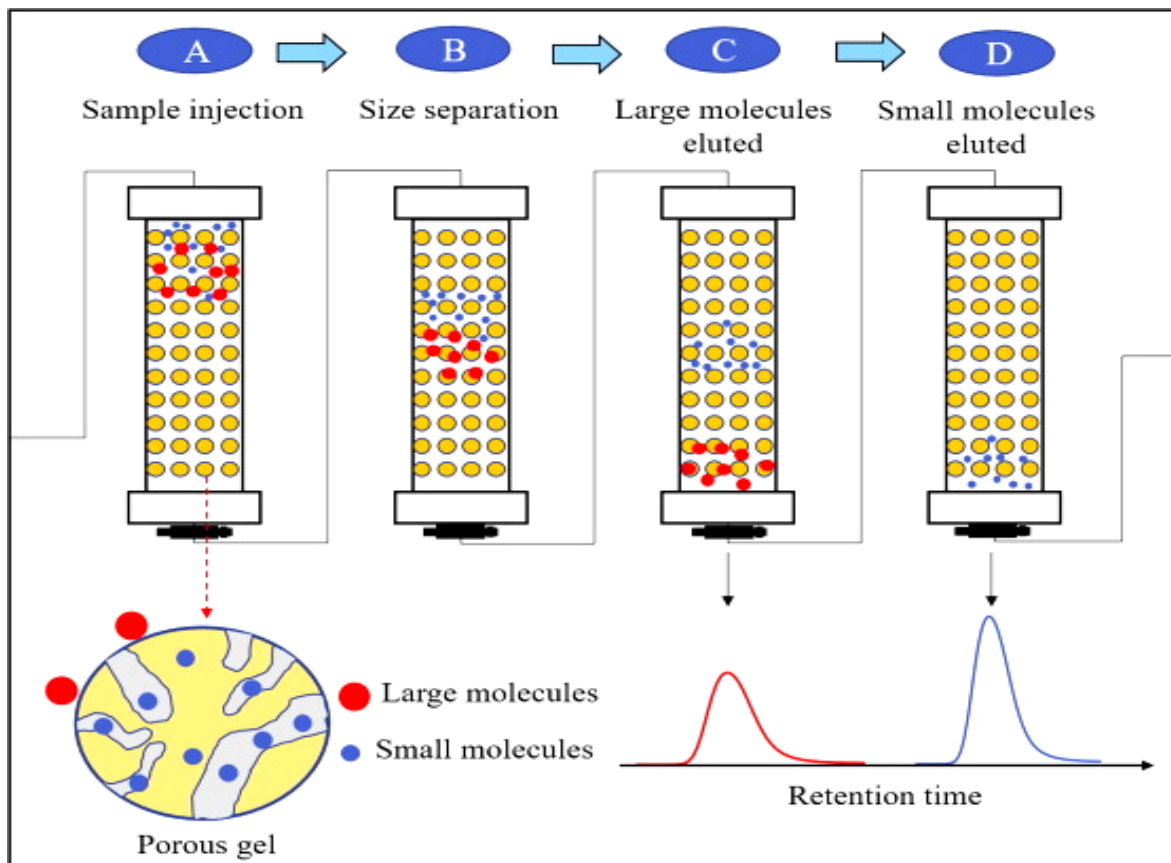


Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση μιας χρωματογραφίας ανταλλαγής ιόντων. (Chang-Hui Shen, Chapter 8 - Quantification and Analysis of Proteins, 2019)

σύνδεση των πρωτεϊνών με την στήλη επιτυγχάνεται με δεσμούς ιοντικής φύσης. Έπειτα, οι πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν από την στήλη διαχωρίζονται σε κλάσματα, ανάλογα με το πλήθος των αντίθετων προς την στήλη φορτίων που περιέχουν, μέσω έκλουσης με κατάλληλα διαλύματα που προκαλούν αλλαγή στο pH, στην συγκέντρωση των ιόντων αλάτων ή στην ιοντική ισχύ της στήλης. (Coskun 2016)

Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή ή μοριακού αποκλεισμού: Βασίζεται στην χρήση στήλης πληρωμένης με πορώδεις κόκκους υδατανθρακικού πολυμερούς (από δεξτράνη, αραρόζη ή πολυακρυλαμίδιο) για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ως προς το μοριακό τους βάρος σε κλάσματα. Όταν οι συγκεκριμένες στήλες διατρέχονται από μείγματα πρωτεϊνών διαφορετικών μεγεθών, οι πρωτεΐνες που είναι μεγαλύτερες από το μέγεθος των πόρων του πληρωτικού υλικού, αδυνατούν να εισέλθουν στο εσωτερικό των κόκκων, με αποτέλεσμα να κινούνται γρήγορα στο εσωτερικό της στήλης και να εξέρχονται πρώτες. Αντιθέτως, πρωτεϊνικά μόρια που το μέγεθος τους είναι μικρότερο από τους πόρους, διαχέονται στο εσωτερικό των κόκκων και ανάλογα με το μέγεθος τους εξέρχονται σε διαδοχικά

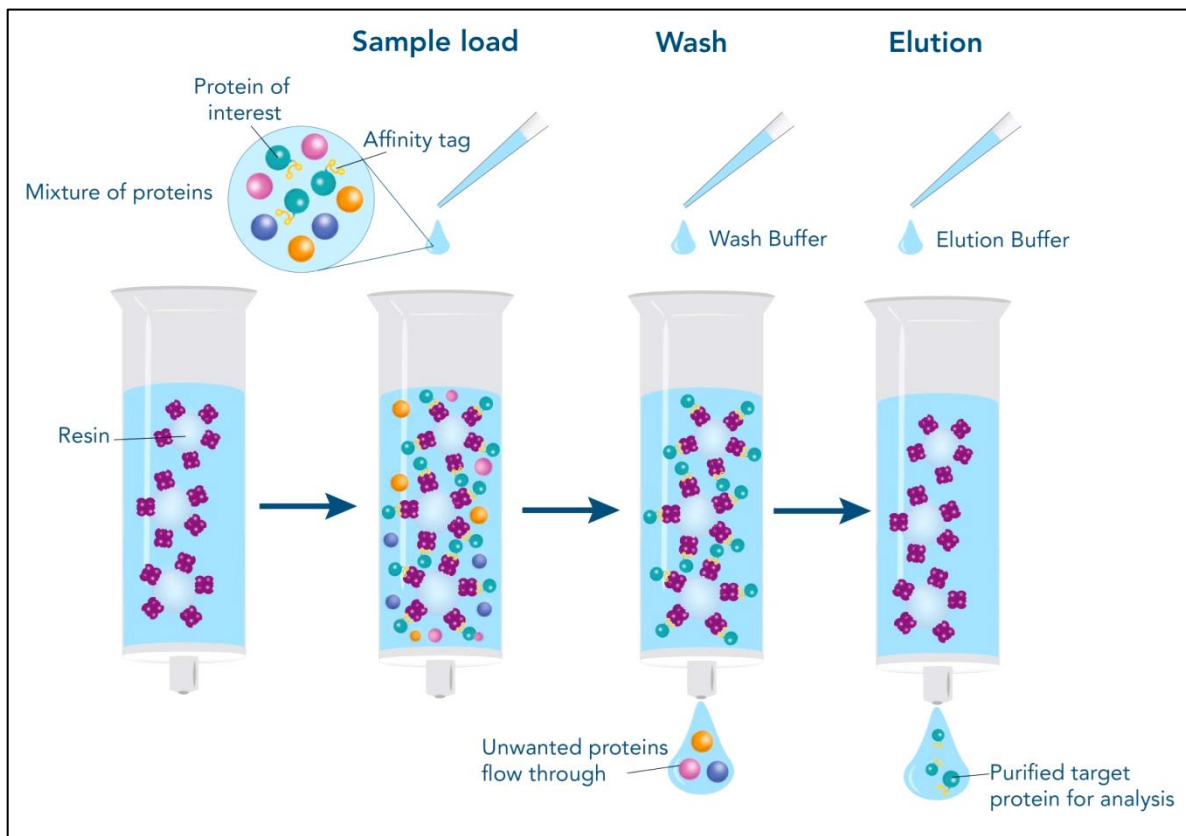
πρωτεϊνικά κλάσματα. Επισημαίνεται ότι η ροή του πρωτεϊνικού μείγματος πρέπει να είναι συνεχής και να έχει σταθερή ροή. (Coskun 2016)



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. (Jianmin Ma et al. Application of gel permeation chromatography technology in asphalt materials: A review, 2021)

Χρωματογραφία συγγένειας: Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται κυρίως για τον καθαρισμό ενζύμων, ορμονών, αντισωμάτων, νουκλεϊκών οξέων και ειδικών κατηγοριών πρωτεϊνών. Βασίζεται στην ικανότητα των πρωτεϊνικών μορίων να συνδέονται εκλεκτικά με συγκεκριμένα μόρια (π.χ. δεξτράνη, πολυακρυλαμίδιο, γλυκόζη). Τα μόρια αυτά χρησιμοποιούνται για την συγκράτηση και τον διαχωρισμό της πρωτεΐνης από το μείγμα και είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα με την επιφάνεια των κόκκων, του πληρωτικού υλικού της στήλης. Έτσι, κατά την κίνηση του πρωτεϊνικού μείγματος εντός της στήλης, οι πρωτεΐνες που εμφανίζουν συγγένεια με την στήλη, συγκρατούνται από αυτή, ενώ οι πρωτεΐνες που δεν εμφανίζουν συγγένεια εκλούνται με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και εξέρχονται της στήλης. Τέλος, για την λήψη των πρωτεϊνών που συνδέθηκαν με την στήλη, γίνεται έκλουση με κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα που αλλάζουν τις συνθήκες

(συνήθως pH) προκειμένου να μειωθεί η συγγένεια πρόσδεσης της πρωτεΐνης και να εξέλθει της στήλης. (Coskun 2016) (Yamamoto and Miyagawa 2000)

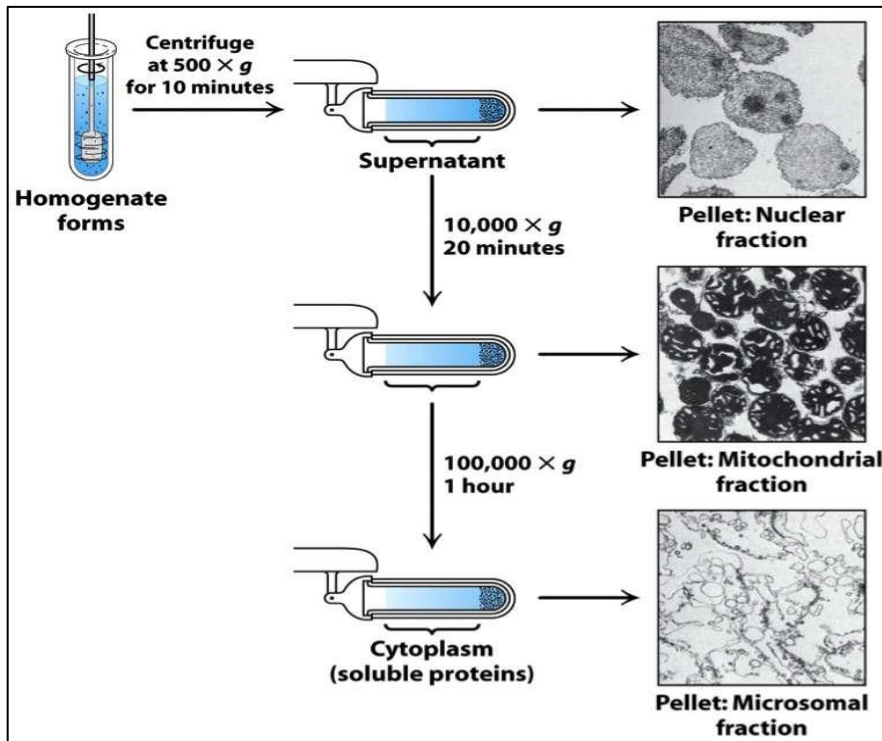


Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση χρωματογραφίας συγγένειας (Source: IBA Lifesciences)

1.6.2.2. Φυγοκέντρηση πρωτεϊνών

Πρόκειται για μια από τις πιο συχνές διαδικασίες καθαρισμού των πρωτεϊνών, όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα συστατικά ενός βιολογικού δείγματος βάσει της διαφοράς πυκνότητας, με την εφαρμογή φυγόκεντρου δύναμης. Έτσι, τα πιο πυκνά συστατικά του μείγματος μετακινούνται μακριά από τον άξονα της φυγοκέντρου, ενώ τα λιγότερο πυκνά συστατικά μεταναστεύουν πλησίον του άξονα. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας φυγοκέντρησης πρωτεϊνικών μειγμάτων είναι η ομογενοποίηση του μείγματος σε ομογενοποιητή (μίξερ) προκειμένου να καταστραφούν οι κυτταρικές μεμβράνες που θα εμπόδιζαν τον σωστό διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Έπειτα, το μείγμα τοποθετείται σε κατάλληλο φιαλίδιο, όπου με συνεχώς αυξανόμενη επιτάχυνση και διάρκεια γίνεται κλασματικός διαχωρισμός των μερών του μείγματος. Στην αρχή, το ίζημα αποτελείται από

το πυρηνικό κλάσμα , έπειτα μιτοχονδριακό κλάσμα και τέλος μικροσωματικό κλάσμα. Πριν την κάθε αύξηση της επιτάχυνσης απαιτείται απόρριψη του υπερκείμενου υγρού. Στο τελικό στάδιο το υπερκείμενο υγρό είναι καθαρό/διαυγές και περιέχει όλα τα συστατικά του κυτταροπλάσματος. (Stephenson 2016)



Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών κλασμάτων στην διάρκεια μιας φυγοκέντρησης (Source: University of Vermont)

1.6.3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών αποτελεί τον προσδιορισμό του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου και είναι μια εξαιρετικά σημαντική διαδικασία κατά την παραγωγή και τον έλεγχο της ποιότητας των τροφίμων. Η γνώση της ποσότητας των πρωτεϊνών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό του νομοθετικά απαραίτητου διατροφικού πίνακα, που πρέπει να φέρει κάθε τρόφιμο στην συσκευασία του, αλλά και επιτρέπει στον έλεγχο πιθανής νοθείας (π.χ. σε σκόνη γάλακτος). (Shen 2019)

1.6.3.1. Μέθοδος Kjeldahl

Η μέθοδος Kjeldahl αναπτύχθηκε πρωτίστως από τον Johan Kjeldahl το 1883, αλλά η μέθοδος που χρησιμοποιείται έως και σήμερα βασίζεται στις έρευνες του Barbano και Clark το 1990. Η μέθοδος αποτελείται από τρία διακριτά στάδια, την υγρή χώνευση (καύση) του οργανικού δείγματος, την απόσταξη της αμμωνίας και την εξουδετέρωση και προσδιορισμό της ποσότητας της αμμωνίας. Η υγρή χώνευση της οργανικής ύλης πραγματοποιείται με χρήση πυκνού θεικού οξέος (H_2SO_4), θερμότητας ($350^{\circ}C$), K_2SO_4 για ανύψωση του σημείου ζέσεως και ενός καταλύτη



Εικόνα 23. Αυτόματος αναλυτής Kjeldahl. (Source: Hanon Group)

(συνήθως σελήνιο ή χαλκός). Το οργανικώς δεσμευμένο άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία που δεσμεύεται από την περίσσεια του οξέος (H_2SO_4), σχηματίζοντας θειούχο αμμώνιο, το οποίο έπειτα εξουδετερώνεται με προσθήκη καυστικού νατρίου, σχηματίζοντας αμμωνία. Η αμμωνία έπειτα αποστάζεται με υδρατμούς και συλλέγεται σε φιάλη με γνωστή ποσότητα περίσσειας βορικού οξέος, σχηματίζοντας βορικό αμμώνιο. Το βορικό οξύ που παραμένει χωρίς να αντιδράσει, ογκομετρείται αλκαλιμετρικώς και μέσω των αντιδράσεων υπολογίζεται η συνολική ποσότητα αζώτου στο αρχικό δείγμα. Τέλος, με χρήση κατάλληλων παραγόντων μετατροπής, η συνολική ποσότητα αζώτου μετατρέπεται σε συνολική ποσότητα πρωτεΐνης στο δείγμα. (Shen 2019) (Goulding 2020) (Bianchi-Bosisio 2005)

1.6.3.2. Χρωματομετρικές μέθοδοι

Μέθοδος Biuret: αποτελεί μια χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στον σχηματισμό έγχρωμων συμπλόκων από ενώσεις που περιέχουν δύο ή περισσότερους πεπτιδικούς δεσμούς με τα άλατα του χαλκού, όταν βρεθούν σε αλκαλικό περιβάλλον. Το σύμπλοκο αυτό έχει ιώδες-μωβ χρώμα και η ένταση του στα 540nm είναι ανάλογη με την περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνες και πεπτίδια. Πρόκειται για μέθοδο με απλή εφαρμογή, γρήγορη εκτέλεση και μικρή επιρροή από μη πρωτεϊνικές ουσίες. (Bianchi-Bosisio 2005)

Μέθοδος Lowry: πρόκειται για μια επίσης χρωματομετρική μέθοδο που βασίζεται στα στάδια της προαναφερθείσας μεθόδου Biuret, αλλά με προσθήκη συγκεκριμένων σταδίων για αύξηση της ευαισθησίας της ανίχνευσης. Στο δείγμα τροφίμου, μετά από κατάλληλη προετοιμασία, προστίθεται φωσφομολυβδικό/φωσφοβολφραμικό οξύ επίσης γνωστό στην τεχνολογία τροφίμων ως αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Αυτό το αντιδραστήριο αλληλεπιδρά με τα ιόντα χαλκού και τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων τυροσίνη, κυστεΐνη και τρυπτοφάνη για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο με κυανό-πράσινο χρώμα που μπορεί να ανιχνευθεί μεταξύ 650 nm και 750 nm. (Bianchi-Bosisio 2005)

1.6.3.3.Φασματμετρία μάζας (MS)

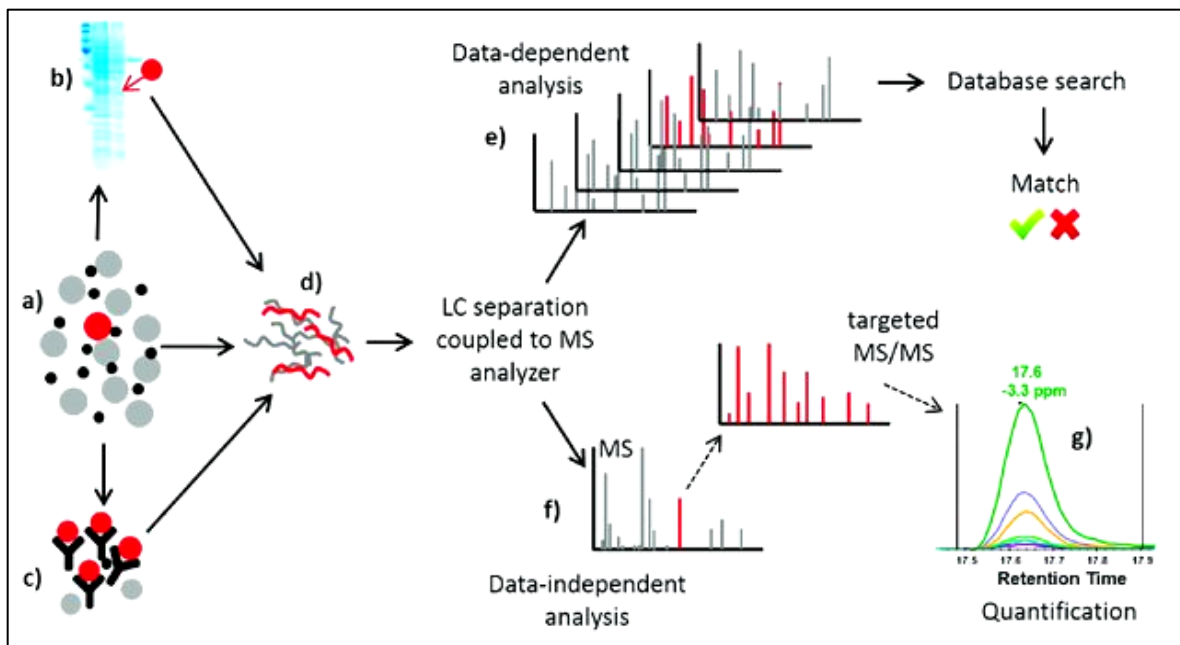
Η μέθοδος της φασματομετρίας μάζας για την ανάλυση πρωτεϊνών έχει αποκτήσει σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να προσδιορίσει το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης ή ενός πεπτιδίου με εξαιρετική ακρίβεια, επιτρέποντας την ταυτοποίηση, τον χαρακτηρισμό αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των μορίων. Γενικά, η τεχνική βασίζεται στην ανάλυση κατάλληλα επεξεργασμένων θραυσμάτων πρωτεϊνών σε ένα φασματόμετρο μάζας και στην ταυτοποίηση των κορυφών του φασματογράμματος μέσω μιας βάσης δεδομένων ώστε να γίνει η αναγνώριση της αναλυθείσας πρωτεΐνης. Για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, οι δυο πιο κοινά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι η υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας (LC-MS) και η MALDI-TOF. (Klein and A. Knepper 2018)

Στην διαδικασία LC-MS, οι πρωτεΐνες μέσα σε ένα βιολογικό δείγμα υπόκεινται σε πρωτεόλυση και χώνευση μέσω συγκεκριμένων πρωτεασών (κυρίως τρυψίνη). Αυτή η δράση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε διάλυμα ή τα δείγματα μπορούν να έχουν πρωτίστως εφαρμοστεί σε gel πολυακρυλαμιδίου-SDS. Έπειτα,



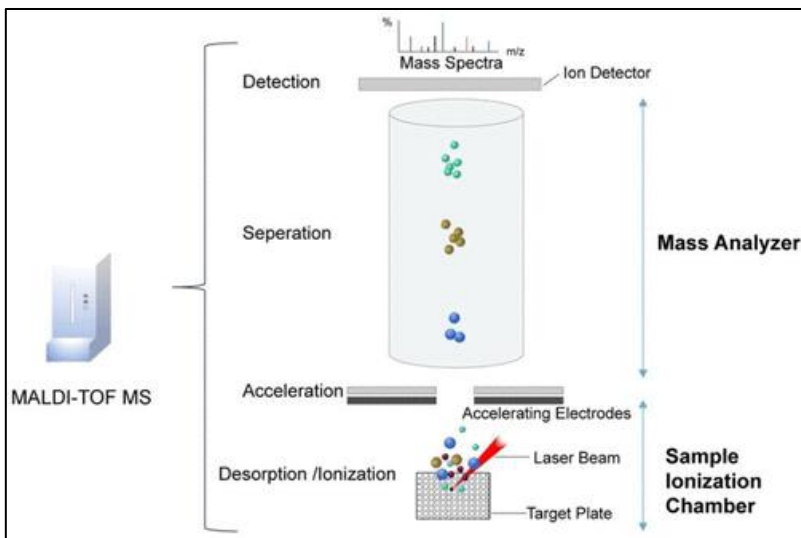
Εικόνα 24. LC-MS (Source: Analysis)

τα παραγόμενα πεπτίδια οξινίζονται και εμβολιάζονται σε μια στήλη υγρής χρωματογραφίας- υψηλής πίεσης (HPLC) η οποία, μετά από μια χρονοβόρα διαδικασία διαχωρισμού και καθαρισμού των πρωτεϊνών, απολήγει σε ένα φασματομέτρο μάζας. Το αρχικό αποτέλεσμα είναι ένα φασματογράφημα MS1 που περιλαμβάνει μια συγκεκριμένη σειρά από κορυφές, που κάθε μια έχει μια μοναδική αναλογία μάζας προς φορτίο (mass/charge ratio). Από το πρώτο φασματογράφημα λαμβάνουμε αρκετές πληροφορίες ώστε να αναγνωρίσουμε τα αρχικά πεπτίδια που απαρτίζουν την αναλυθείσα πρωτεΐνη στο δείγμα. Εάν επιθυμείται πιο εκτενής ανάλυση της πρωτεΐνης σε επίπεδο αμινοξέων, τα πεπτίδια από την πρώτη ανάλυση υπόκεινται σε θραύση με χρήση αδρανών αερίων και κατάλληλης ποσότητας κινητικής ενέργειας ώστε να γίνει διάσπαση ενός μόνο πεπτιδικού δεσμού και να παραχθούν δύο διαδοχικά πεπτίδια. Τα νέα πεπτίδια αναλύονται πάλι με φασματομέτρο μάζας, και το αποτέλεσμα είναι ένα δεύτερο και πιο εκτενές φασματογράφημα MS2, από το οποίο μέσω των αναλογιών μάζας/φορτίου κάθε κορυφής, αλλά και μέσω της σύγκρισης των κορυφών με τις γειτονικές τους, είναι δυνατή η αναγνώριση ολόκληρης της αμινοξικής ακολουθίας στα πεπτίδια. (Klein and A. Knepper 2018) (Trauger, Webb and Siuzdak 2002)



Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων μιας διαδικασίας LC-MS για την ανάλυση πρωτεϊνικών τοξινών. (Klimentova et al, Proteomic Methods of Detection and Quantification of Protein Toxins, 2018)

Η διαδικασία MALDI-TOF MS είναι η πιο κοινά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανάλυση πρωτεϊνών και εμφανίζει κάποια κοινά βασικά στοιχεία με την προαναφερθείσα LC-MS. Τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν, που συνήθως έχουν υποστεί πρωτίστως κάποιο είδους πρωτεόλυση ή θρυμματισμό, τοποθετούνται σε αγωγίμη πλάκα μαζί με μία στερεά μήτρα, αποτελούμενη από κάποιο οργανικό μόριο, ικανό να απορροφά την ενέργεια του laser και να την διασπείρει ομοιόμορφα στα μόρια του δείγματος (π.χ. 2,5-διυδροξυβενζοϊκό οξύ DHB, σιναπινικό οξύ SA, κ.α.). Έτσι, η μήτρα



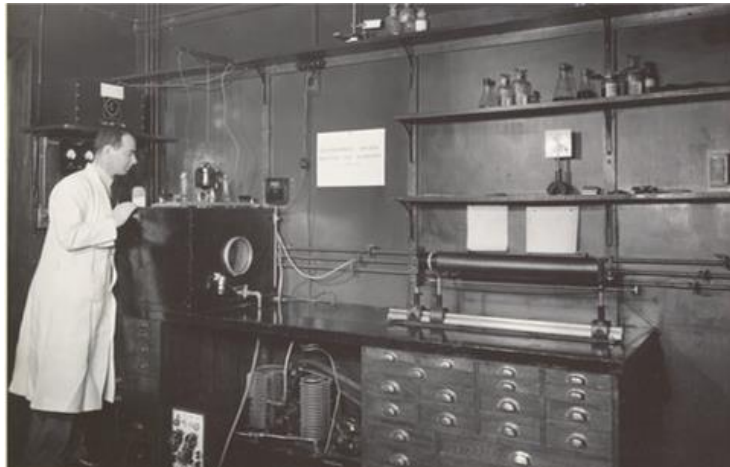
Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση μιας MALDI-TOF MS διαδικασίας. (Dandan Li et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research, 2022)

μαζί με το δείγμα υπόκεινται σε ακτινοβολία laser από παλμικό laser, με αποτέλεσμα το στερεό μείγμα, αποτελούμενο από τα οργανικά μόρια της μήτρας και τις προς ανάλυση πρωτεΐνες, να μετατρέπεται στιγμιαία σε αέρια κατάσταση, με τις πρωτεΐνες να υπόκεινται σε περεταίρω θρυμματισμό. Μετά την εκρόφηση του δείγματος, λαμβάνει χώρα μεταφορά φορτίου, προκαλώντας ιονισμό των θραυσμάτων της πρωτεΐνης, μέσω συγκρούσεων μεταξύ των μη φορτισμένων ουδέτερων μορίων, των ιόντων μήτρας, των πρωτονίων, των ηλεκτρονίων και των μεταλλικών κατιόντων. Κατόπιν, τα ιόντα που παράγονται επιταχύνονται από ένα ηλεκτρικό πεδίο στον αναλυτή μάζας για ανάλυση του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z). Συνήθως, ο αναλύτης μάζας που χρησιμοποιείται συνδυαστικά με την προαναφερθείσα μέθοδο ιονισμού είναι ο TOF (Time-of-flight), ο οποίος καταγράφει τον απαιτούμενο χρόνο πτήσης των παραγόμενων ιόντων, από την στιγμή του ιονισμού μέχρι να φτάσουν τον αναλυτή μάζας. Από τον χρόνο πτήσης μπορεί να υπολογιστεί με μεγάλη ακρίβεια ο λόγος μάζας/φορτίου του κάθε θραύσματος, ο οποίος αναπαριστάται στο τελικό φασματογράφημα μάζας σε μορφή κορυφών. Μέσω των κορυφών και μιας βάσης δεδομένων είναι δυνατή η ταυτοποίηση και αναγνώριση των πεπτιδίων και πρωτεϊνών του δείγματος. (Li, et al. 2022) (Revelou, et al. 2022)

1.6.4. Ηλεκτροφορητικές μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών

Ο όρος ηλεκτροφόρηση αναφέρεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων ως αποτέλεσμα της επίδρασης ηλεκτρικού πεδίου οδηγώντας στον διαχωρισμό τους. Σε ένα ηλεκτρικό πεδίο οι πρωτεΐνες τείνουν να μεταναστεύσουν προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο από αυτό που φέρουν. Ο ρυθμός μετανάστευσης τους (Migration rate σε cm^2/Vsec) καθορίζεται από μια σύνθετη σχέση μεταξύ των φυσικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών και του συστήματος ηλεκτροφόρησης. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, την θερμοκρασία του συστήματος, το pH, τον τύπο των ιόντων, την συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) αλλά και το μέγεθος, σχήμα και φόρτιση των αναλυθέντων πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες έχουν ποικίλα μεγέθη και σχήματα και φέρουν φορτία που τους μεταδίδονται από τις σταθερές διάστασης των αμινοξέων τους. Ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστικούς ρυθμούς μετανάστευσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν προς όφελος του διαχωρισμού τους. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών μπορεί να εφαρμοστεί είτε με υγρό μέσο είτε με μέσο σε μορφή γέλης (gel) αλλά και να εφαρμοστεί στην μεταφορά των πρωτεϊνών από ένα μέσο σε ένα άλλο (π.χ. σε εφαρμογές κηλίδωσης). (Kurien and Scofield 2012)

Τα τελευταία 50 χρόνια, οι τεχνικές ηλεκτροφόρησης έχουν εξελιχθεί καθώς έχουν γίνει βελτιώσεις στα ρυθμιστικά διαλύματα, στην επιλογή εξοπλισμού και στις τεχνικές απεικόνισης που χρησιμοποιούνται. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πληθώρα εφαρμογών όπως η



Εικόνα 27. Ο νομπελίστας Arne Tiselius επιδεικνύει την πρώτη συσκευή ηλεκτροφόρησης. (Source: nobelprize.org)

εξευγένιση πρωτεϊνών, ο καθορισμός της καθαρότητας των πρωτεϊνών (π.χ. σε διάφορα στάδια χρωματογραφικών διαχωρισμών), η συλλογή δεδομένων στον έλεγχο της έκφρασης

των πρωτεϊνών αλλά και η εξακρίβωση του μεγέθους τους, του ισοηλεκτρικού σημείου και της ενζυμικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών. Πέρα από τον σημαντικό αριθμό εφαρμογών της ηλεκτροφόρησης υπάρχουν και αρκετές τεχνικές, όπως η ηλεκτροφόρηση γέλης, η ισοηλεκτρική εστίαση (IEF), η ηλεκτροφορητική μεταφορά (blotting) και η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2D) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών. (Kurien and Scofield 2012) (Cancalon 2000)

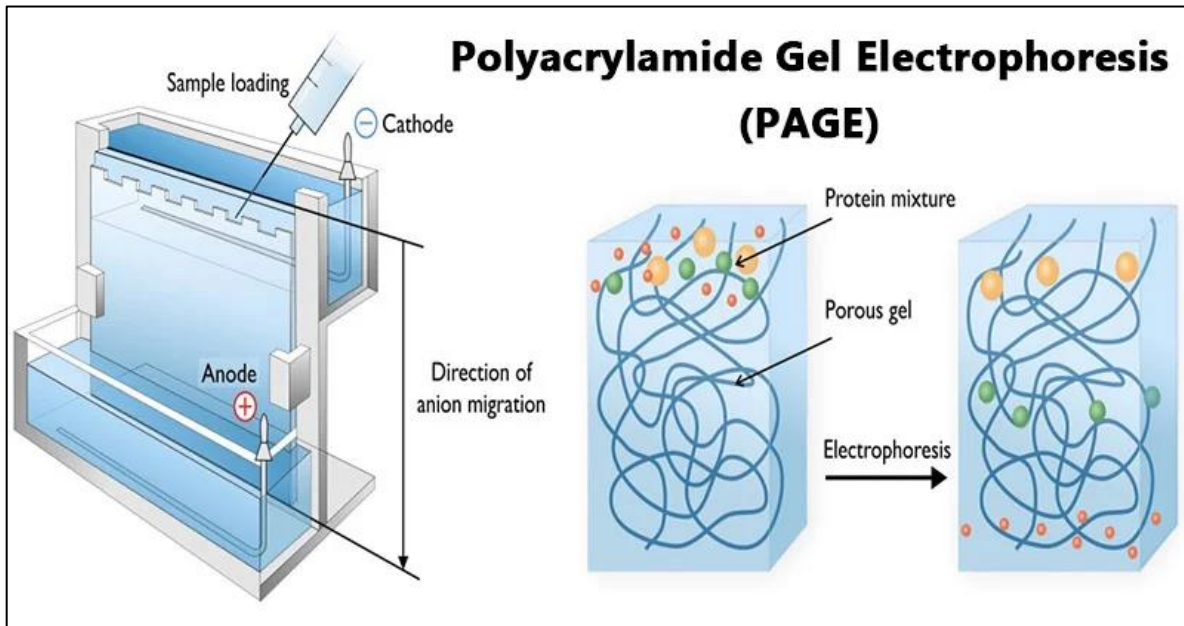
1.6.4.1. Μέθοδοι ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

Επιλέγοντας κατάλληλες μήτρες διαχωρισμού και ρυθμιστικά συστήματα, μπορούν να επιτευχθεί μεγάλο εύρος πειραματικών σκοπών χρησιμοποιώντας την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.

Ηλεκτροφόρηση γέλης (gel) πολυακρυλαμιδίου (PAGE)

Όταν η ηλεκτροφόρηση εκτελείται σε gel πολυακρυλαμιδίου ή αγαρόζης, το gel λειτουργεί εκλεκτικά ως προς το μέγεθος κατά τον διαχωρισμό. Έτσι, καθώς οι πρωτεΐνες μεταναστεύουν εντός του gel υπό τη εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, η πορώδης διαστρωμάτωση του gel επιτρέπει τις πρωτεΐνες μικρότερου μεγέθους να κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα σε σχέση με αυτές μεγαλύτερου μεγέθους. Στην περίπτωση του διαχωρισμού πρωτεϊνών, πρακτικά όλες οι μέθοδοι χρησιμοποιούν πολυακρυλαμίδιο ως αντιαγωγικό παράγοντα καλύπτοντας πρωτεΐνες σε εύρος μεγεθών από 5 έως 250 kD. Μερικές εφαρμογές με λιγότερη απήχηση όπως η ανοσοηλεκτροφόρηση και ο διαχωρισμός μεγάλων πρωτεϊνών και συμπλόκων πρωτεϊνών μεγαλύτερων από 300 kD βασίζονται στους μεγαλύτερους πόρους που παρέχει το gel αγαρόζης. (Magdeldin 2012)

Στις περισσότερες εφαρμογές της ηλεκτροφόρησης με gel πολυακρυλαμιδίου (PAGE), το gel είναι πλαισιωμένο ανάμεσα σε δύο ρυθμιστικούς θαλάμους και η μόνη διαθέσιμη διόδος μεταξύ των δύο θαλάμων είναι δια μέσω της γέλης. Συνήθως, το gel έχει κάθετο προσανατολισμό και τα πηγάδια (ειδικές εσοχές για τα δείγματα) προκύπτουν με την εφαρμογή μιας ειδικής χτένας. Εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος των ρυθμιστικών θαλάμων, εκβιάζεται η μετανάστευση των πρωτεϊνών δια μέσω της γέλης.



Εικόνα 28. Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης gel πολυακρυλαμιδίου PAGE. (Source: microbenotes)

Υπάρχουν δύο τύποι ρυθμιστικών συστημάτων: Α) Τα συνεχή ρυθμιστικά συστήματα που χρησιμοποιούν το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (σε σταθερό pH) στο gel, στο δείγμα και στην δεξαμενή ηλεκτροδίων. Όμως, αυτός ο τύπος δεν χρησιμοποιείται τόσο συχνά για διαχωρισμό πρωτεϊνών αλλά κυρίως για ανάλυση νουκλεϊκών οξέων. Β) Τα ασυνεχή ρυθμιστικά συστήματα χρησιμοποιούν ένα gel που αποτελείται από δύο τμήματα (μια γέλη με μεγάλους πόρους σε στοιβάδες πάνω από μια γέλη διαχωρισμού με μικρούς πόρους) και γίνεται χρήση διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων στο gel αλλά και στα διαλύματα ηλεκτροδίων. (Magdeldin 2012) (Cancalon 2000)

Στην ηλεκτροφόρηση σε gel, οι πρωτεΐνες δεν εισέρχονται όλες στην μήτρα την ίδια χρονική στιγμή, αλλά τα δείγματα εισάγονται στα πηγαδάκια και οι πρωτεΐνες που είναι πλησιές στο gel εισέρχονται στην γέλη πρώτες. Στα συνεχή συστήματα, οι ομοιογενείς μήτρες διαχωρισμού δημιουργούν ζώνες πρωτεϊνών που είναι διάχυτες και ελάχιστα διαχωρισμένες. Στα ασυνεχή συστήματα, οι πρωτεΐνες πρωτίστως μεταναστεύουν γρήγορα δια μέσω του τμήματος μεγάλων πόρων και έπειτα επιβραδύνονται καθώς εισέρχονται στο τμήμα μικρών πόρων. Έτσι, καθώς επιβραδύνονται, συνενώνονται δημιουργώντας μια έντονη ζώνη που βελτιώνει την ανάλυση διαχωρισμού. Επιπλέον, στα ασυνεχή συστήματα, χρησιμοποιούνται ιόντα στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης που συνενώνουν τις πρωτεΐνες καθώς μεταναστεύουν μέσα στο gel, ενισχύοντας περαιτέρω τις ζώνες.

Επομένως, τα ασυνεχή συστήματα παρέχουν καλύτερη ανάλυση διαχωρισμού από τα συνεχή αλλά και η ποικιλία ρυθμιστικών συστημάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο δείγμα, στο gel και στους θαλάμους ηλεκτροδίων δημιουργεί μια ποικιλία ασυνεχών ρυθμιστικών συστημάτων που μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες εφαρμογές. (Magdeldin 2012) (Cancalon 2000)

Ασυνεχής - native PAGE

Το αρχικό σύστημα ασυνεχούς gel δημιουργήθηκε από τον Ornstein και Davis το 1964 για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών ορού, διατηρώντας την έμφυτη (αρχική) πρωτεϊνική διαμόρφωση, τις αλληλεπιδράσεις των υποομάδων και την βιολογική δραστηριότητα. Σε τέτοια συστήματα, οι πρωτεΐνες προετοιμάζονται σε μη αναγωγικά και μη μετουσιωτικά ρυθμιστικά διαλύματα και η ηλεκτροφόρηση εκτελείται χωρίς αναγωγικούς ή μετουσιωτικούς παράγοντες. Όμως, τα δεδομένα από τις native PAGE ηλεκτροφορήσεις είναι δύσκολο να ερμηνευτούν. Εφόσον η αρχική αναλογία φορτίου/ μάζας των πρωτεϊνών διατηρείται, η κινητικότητα των πρωτεϊνών καθορίζεται από έναν σύνθετο συνδυασμό παραγόντων. Δεδομένου ότι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών διατηρούνται κατά τον διαχωρισμό, μερικές πρωτεΐνες μπορεί να διαχωριστούν σε σύμπλοκα πόλυ-υπομονάδων με αποτέλεσμα να κινούνται με απρόβλεπτους τρόπους. Επειδή όμως το αρχικό φορτίο διατηρείται, οι πρωτεΐνες μπορούν να μεταναστεύσουν προς το εκάστοτε ηλεκτρόδιο, ανάλογα με το φορτίο τους. Το αποτέλεσμα είναι ότι η χρήση native PAGE συστημάτων μπορεί να οδηγήσει σε απρόβλεπτα μοντέλα διαχωρισμού που δεν ταιριάζουν με τον καθορισμό του μοριακού βάρους. Ωστόσο, οι native PAGE εφαρμογές επιτρέπουν τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών στην ενεργό μορφή τους και μπορούν επίσης να διαχωρίσουν πρωτεΐνες ίδιου μοριακού βάρους. (Arndt, et al. 2012)

SDS- PAGE

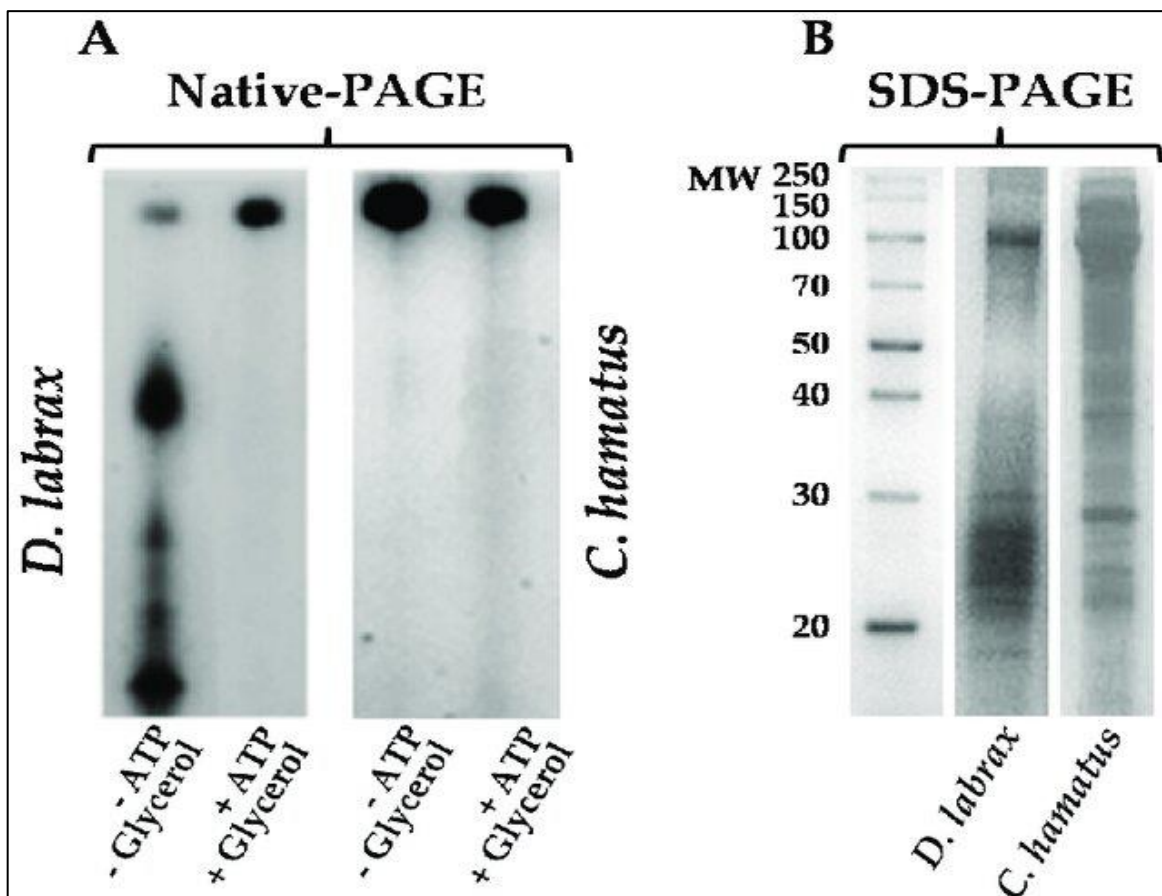
Αποτελεί υποκατηγορία των συστημάτων PAGE ηλεκτροφόρησης που δημιουργήθηκε από τον Laemmli για να υπερνικηθούν οι περιορισμοί των native PAGE συστημάτων, ο οποίος ενσωμάτωσε το απορρυπαντικό δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) σε ένα ασυνεχές μετουσιωτικό ρυθμιστικό σύστημα. Όταν οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται υπό την παρουσία SDS και παραγόντων μετουσίωσης, μετουσιώνονται και διαχωρίζονται πλήρως. Επιπλέον το SDS συνδέεται μη-ομοιοπολικά με τις πρωτεΐνες προσδίδοντας:

-Ένα συνολικό αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες, καθώς το αρνητικό φορτίο του SDS καλύπτει οποιοδήποτε υπάρχον φορτίο της εκάστοτε πρωτεΐνης.

-Μια όμοια αναλογία φορτίου/ μάζας για όλες τις πρωτεΐνες σε ένα μείγμα καθώς το SDS προσδένεται με σταθερό ρυθμό 1.4g SDS/ 1 g πρωτεΐνης (στοιχειομετρία ενός μορίου SDS για κάθε δύο αμινοξέα).

-Μια μακριά, ραβδοειδή μορφή στις πρωτεΐνες αντί της περίπλοκης τεταρτοταγούς διαμόρφωσης τους.

Ως αποτέλεσμα, ο ρυθμός μετανάστευσης σε μια πρωτεΐνη που έχει προσδεθεί το SDS μέσα σε μια γέλη καθορίζεται πρωτίστως από το μέγεθος της, επιτρέποντας την εκτίμηση του μοριακού βάρους.



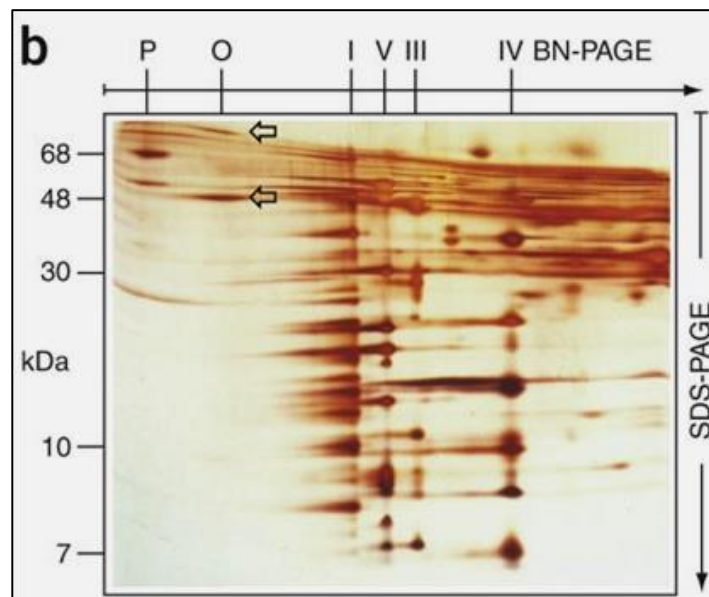
Εικόνα 29. Σύγκριση αποτελεσμάτων από ηλεκτροφόρηση Native-PAGE σε *Dicentrarchus labrax* και ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE σε *Chionodraco hamatus* 26S. (Gogliettino et al. Unusual Antioxidant Properties of 26S Proteasome Isolated from Cold-Adapted Organisms, 2017)

Το αρχικό σύστημα του Laemmli ενσωμάτωνε το SDS στο gel αλλά και στο ρυθμιστικό διάλυμα, αν και η παρουσία του στο gel δεν είναι απαραίτητη καθώς η παρουσία του στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος επαρκεί για να κορέσει τις πρωτεΐνες αλλά και η παρουσία του SDS στην ρυθμιστική κάθοδο διατηρεί τον κορεσμό του SDS κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης. (Arndt, et al. 2012) (Cancalon 2000) (Kurien and Scofield 2012)

Άλλοι τύποι ηλεκτροφόρησης με gel πολυακρυλαμιδίου (PAGE)

Blue Native Page (BN-PAGE)

Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και τον χαρακτηρισμό μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων στην έμφυτη/αρχική και βιολογικά ενεργή μορφή τους. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην διαλυτοποίηση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων με ήπια και ουδέτερα απορρυπαντικά αλλά και στην σύζευξη με ουδέτερα φορτισμένα σωματίδια Coomassie (Brilliant) Blue G-250 Stain στην



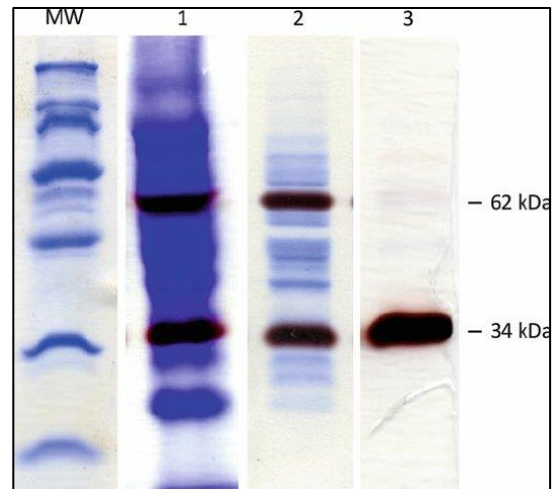
Εικόνα 30. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης BN-PAGE σε διαλυτοποιημένα μιτοχονδριακά σύμπλοκα. (Witting et al. Blue native PAGE, 2006)

επιφάνεια τους. Αυτός ο συνδυασμός προκαλεί μεγάλες αναλογίες φορτίου/μάζας που επιτρέπει στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα να μεταναστεύσουν προς την άνοδο όπως και στην SDS-PAGE. Η χρωστική Coomassie Blue όμως δεν προκαλεί μετουσίωση ή διαχωρισμό των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων όπως το SDS. Έτσι, για να επιτευχθεί υψηλής ανάλυσης ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός απαιτείται gel ακρυλαμιδίου με σταδιακή μείωση του μεγέθους των πόρων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα να εντοπίζονται στην περιοχή της γέλης με το αντίστοιχο όριο μεγέθους πόρων. (Nijtmans 2002) (Reisinger and Eichacker 2008)

Zymogram PAGE

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για να εντοπίσει και να χαρακτηρίσει κολλαγενάσες και άλλες πρωτεάσες μέσα στο gel. Το gel έχει προηγουμένως συζευχθεί με ζελατίνη ή καζεΐνη, οι οποίες δρουν ως υποστρώματα για τα ένζυμα που διαχωρίζονται στην γέλη κάτω από μη μετουσιωτικές συνθήκες. Επιπλέον, στις πρωτεΐνες χρησιμοποιείται μετουσιωτικός παράγοντας SDS μόνο για να διαχωριστούν βάσει μοριακού βάρους. Μετά την μετουσίωση των ενζύμων και αφού αποικοδομήσουν το υπόστρωμα, τα gel zymogram χρωματίζονται με την χρωστική Coomassie (Brilliant) Blue R-

250 Stain, η οποία χρίζει το υπόστρωμα αλλά αφήνει καθαρές περιοχές γύρω από τις ενεργές πρωτεάσες. (Wilkesman and Kurz 2017)



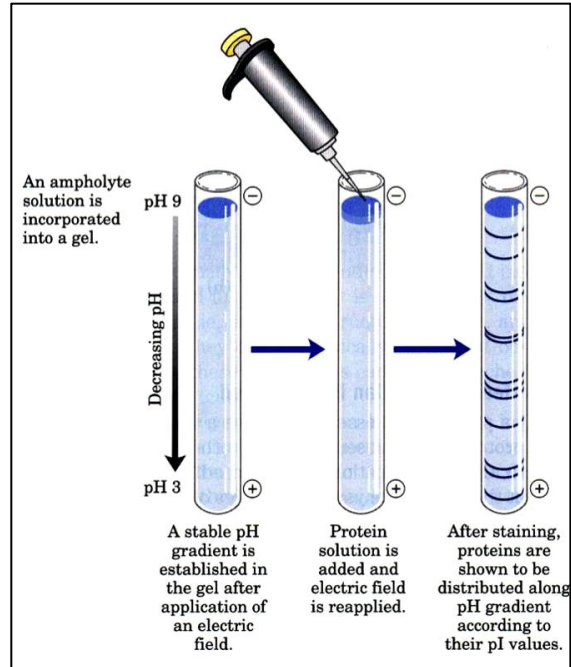
Εικόνα 31. Ανάλυση zymogram σε gel SDS-PAGE από ηλεκτροφόρηση ενζύμων. (Atanes et al. *Lipases and Esterases from Extremophiles: Overview and Case Example of the Production and Purification of an Esterase from Thermus thermophilus HB27*, 2012)

Ισοηλεκτρική εστίαση- Isoelectric Focusing (IEF)

Αυτή η μέθοδος ηλεκτροφόρησης, συνδυάζει την χρήση ηλεκτρικού πεδίου με διαβάθμιση pH για να διαχωρίσει τις πρωτεΐνες με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Προσφέρει την μεγαλύτερη ανάλυση διαχωρισμού από όλες τις ηλεκτροφορητικές τεχνικές. Όταν μια πρωτεΐνη κινηθεί δια μέσω gel με διαβαθμισμένο pH, το καθαρό της φορτίο αλλάζει ανάλογα με το εκάστοτε pH. Επιπλέον, υπό την επίδραση και ηλεκτρικού πεδίου, η πρωτεΐνη που κινείται σε διαβαθμισμένο pH, μεταναστεύει σε περιοχή pH όπου το καθαρό της φορτίο είναι μηδενικό (στο ισοηλεκτρικό σημείο IΣ της πρωτεΐνης). Εάν η πρωτεΐνη εξέλθει από αυτή την θέση ουδετερότητας, αποκτά φορτίο και επανέρχεται ξανά στην θέση μηδενικού φορτίου. Αυτή η εστίαση είναι υπεύθυνη για την υψηλή ανάλυση διαχωρισμού της IEF. Τέλος, τα IΣ των πρωτεϊνών συνήθως κυμαίνονται στο εύρος pH 3-11.

Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται για να παράξουν μια συνεχή και σταθερή διακύμανση pH μεταξύ ανόδου και καθόδου:

-Μεταφορικοί αμφολύτες: πρόκειται για ετερογενή μείγματα μικρών (300-1000Da) αγώγιμων πολυάμινων-πολυκαρβοξυλικών ενώσεων που φέρουν ποικίλα φορτία με παραπλήσια ισοηλεκτρικά σημεία. Όταν εφαρμόζεται τάση κατά μήκος ενός διαλύματος ή gel που περιέχει αμφολύτες, οι αμφολύτες προσανατολίζονται ανάλογα με τα ισοηλεκτρικά τους σημεία και ρυθμίζουν το pH στην εγγύς περιοχή, καθορίζοντας μια διαβάθμιση pH στο διάλυμα ή το gel. Οι αμφολύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε



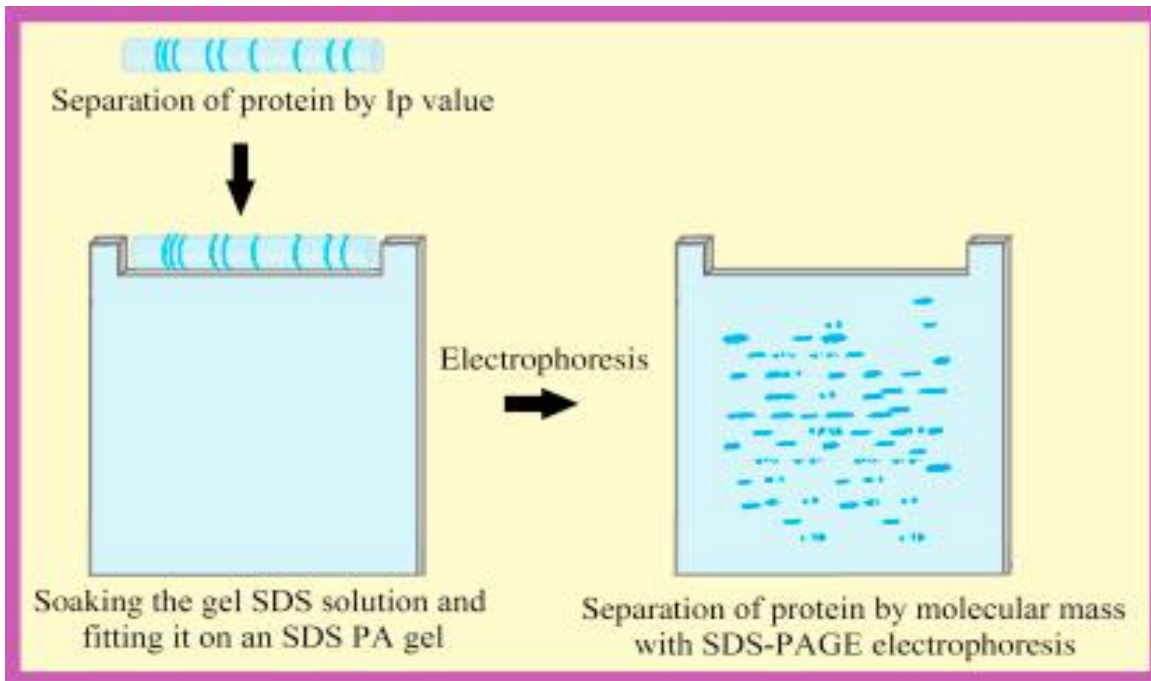
gel (π.χ. σωληνοειδή ή κάθετα gel) ή σε διαλύματα (π.χ. υγρής φάσης IEF)

Εικόνα 32. Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης ισοηλεκτρικής εστίασης IEF. (Source: University of Vermont)

-Ακίνητοποιημένες λωρίδες διαβάθμισης pH: προκύπτουν από ομοιοπολικό εμβολιασμό ρυθμιστικών συστημάτων σε μια στήλη γέλης πολυαμιδίου. Η διαβάθμιση που προκύπτει από τα διαφορετικά ρυθμιστικά συστήματα είναι σταθερή και μπορεί να προσαρμοστεί για ποικίλα εύρη pH και διαβαθμίσεις. (Alonso, et al. 1990)

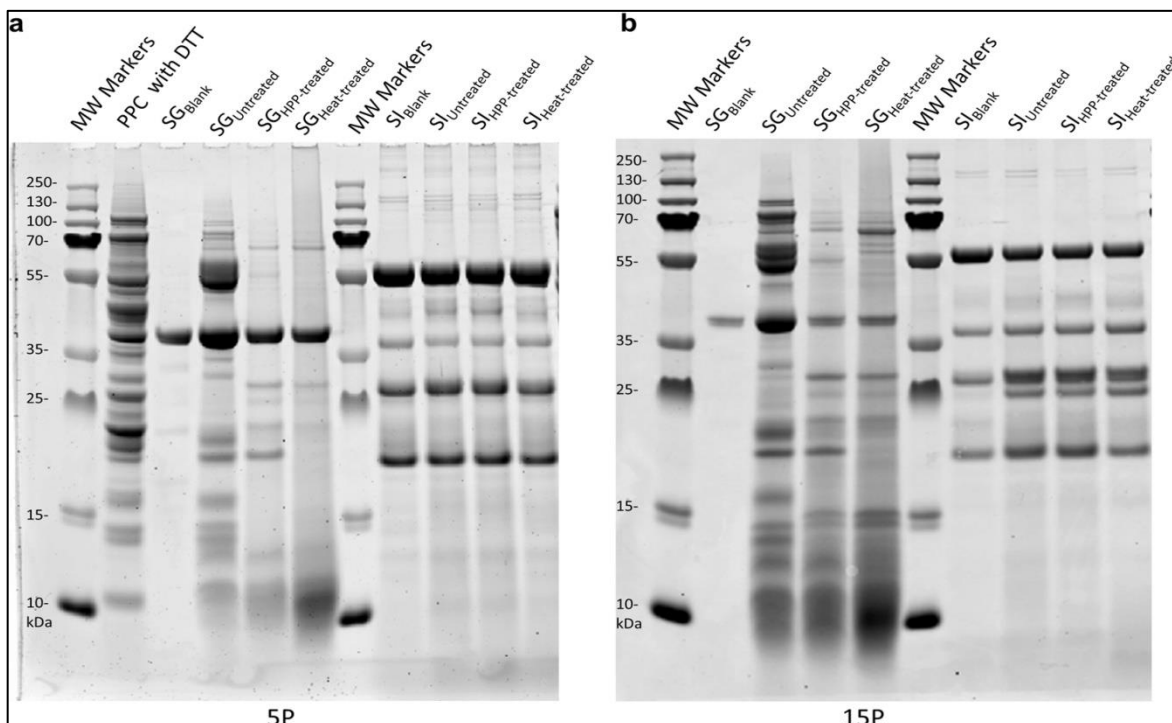
Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-D)

Η διαδοχική εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών ηλεκτροφόρησης παρέχει έναν πολυδιάστατο διαχωρισμό. Η πιο κοινή δυσδιάστατη τεχνική υποβάλει τα πρωτεϊνικά δείγματα αρχικά σε μετουσιωτική IEF σε στήλη με gel ή IPG λωρίδες από gel (για διαχωρισμό με βάση το Ι.Σ.) και έπειτα σε SDS-PAGE διαχωρισμό για περαιτέρω διαχωρισμό κατά το μοριακό τους βάρος. Επιπλέον, οι δυσδιάστατες τεχνικές υψηλής ανάλυσης επιτρέπουν τον διαχωρισμό χιλιάδων πολυπεπτιδίων σε μια μόνο πλάκα gel. Τέλος, τα αποτελέσματα μπορούν να απεικονιστούν με χρώση ή μπορούν να μεταφερθούν σε μεμβράνη για πλήρη πρωτεϊνική χρώση ή να αναλυθούν με ειδική αντιγονική ανίχνευση. (Friedman, Hoving and Westermeier 2009) (Righetti, Sebastiano and Citterio 2013) (O'Farrell 1975) (Rabilloud, et al. 1997)

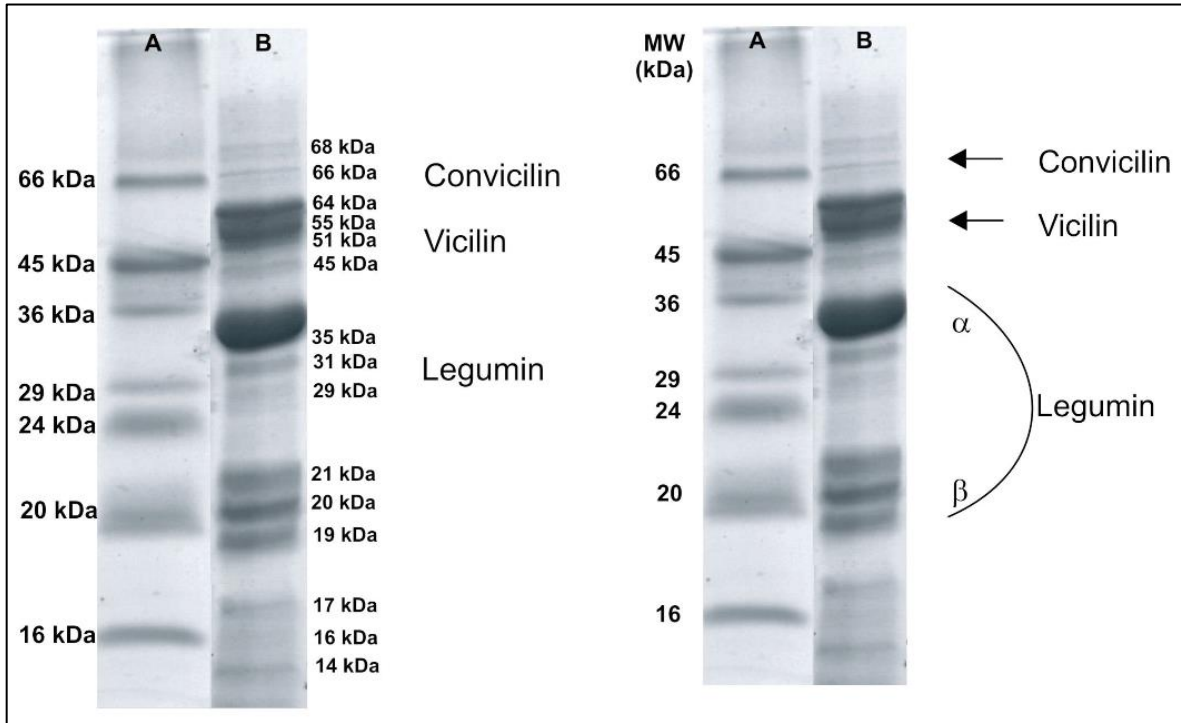


Εικόνα 33. Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης 2-D. (Source: ScienceDirect)

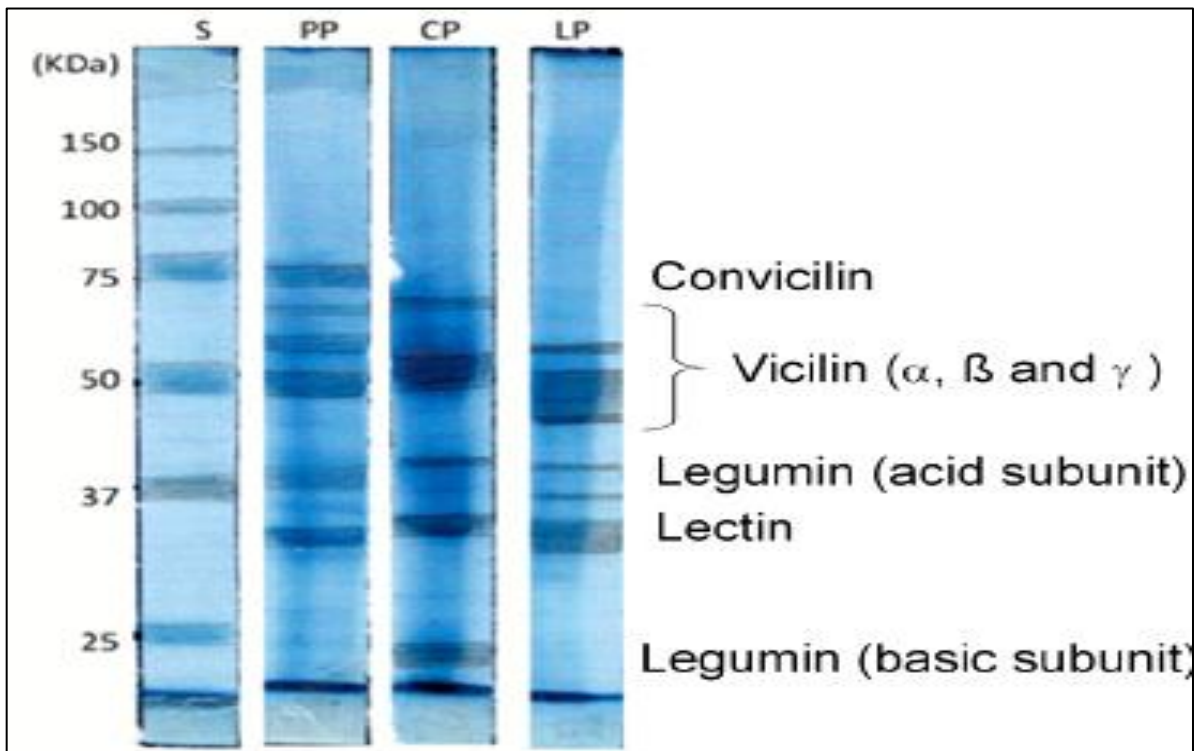
1.6.4.2. Ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών φυτικών σπόρων



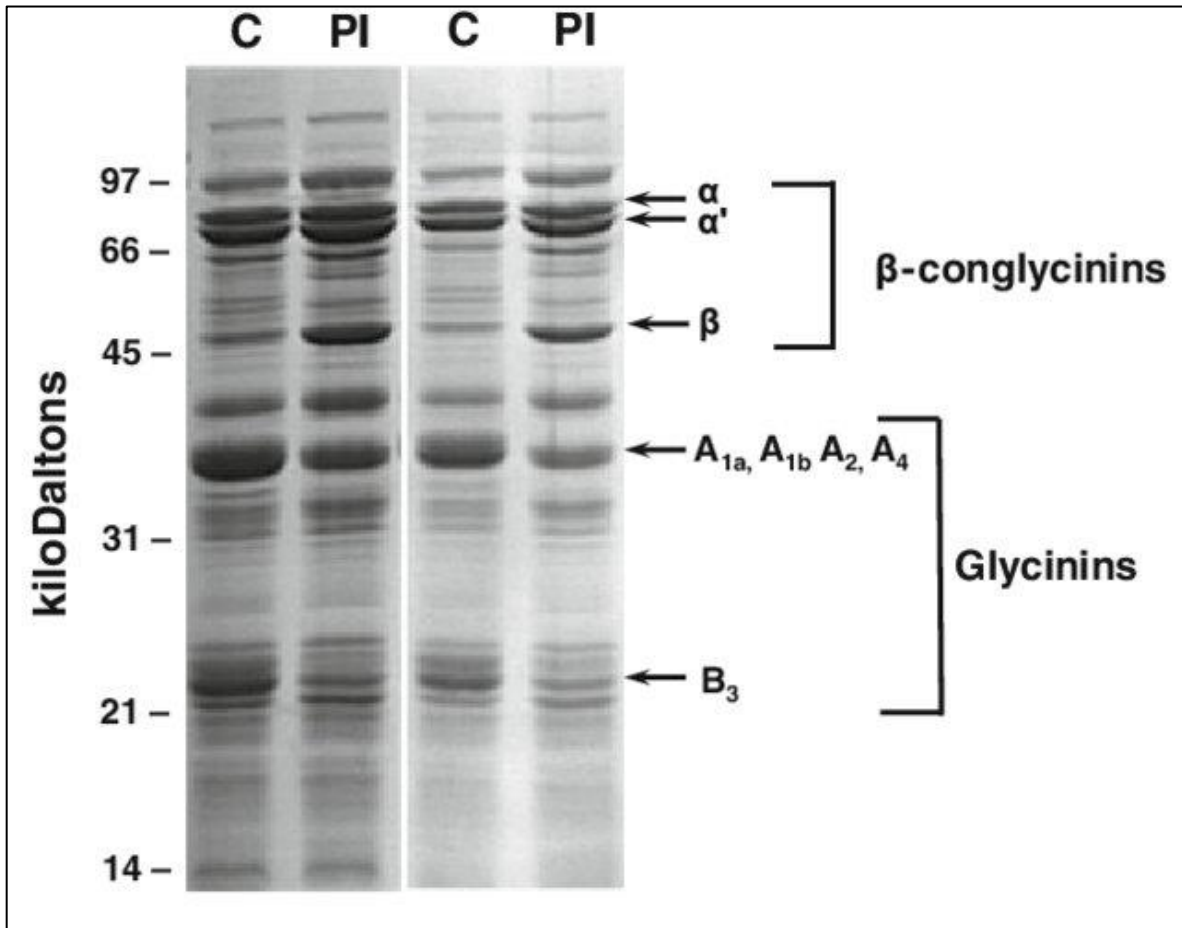
Εικόνα 34. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE πρωτεϊνών μιζελιού χωρίς επεξεργασία (εικόνα a) και μιζελιού που υπέστη *in vitro* χώνευση. (Moraru et al. Comparative effects of high pressure processing and heat treatment on *in vitro* digestibility of pea protein and starch)



Εικόνα 35. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε μετασυνθωτικές συνθήκες για πρωτεΐνες των σπόρων *Vicia faba L.* (Ptaszek P. et al, Functional and Rheological Properties of *Vicia faba L.* Protein Isolates, 2021)



Εικόνα 36. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Στήλη PP πρωτεΐνη μιτζελιού, CP πρωτεΐνη ρεβυθιού, LP πρωτεΐνη φακής. (Ettoimi et al, Pea, Chickpea and Lentil Protein Isolates: Physicochemical Characterization and Emulsifying Properties, 2015)



Εικόνα 37. Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE πρωτεϊνών φασολιών σόγιας. (Gillman J. et al, Identification of a plant introduction soybean line with genetic lesions affecting two distinct glycinin subunits and evaluation of impacts on protein content and composition, 2013)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Οργανολογία- Αντιδραστήρια

2.1.1. Οργανολογία

- Αναλυτικός ζυγός
- Φιαλίδια Eppendorf microcentrifuge 1.5 ml
- Αναδευτήρας Vortex
- Θερμαντική πλάκα με ειδικές εσοχές για τοποθέτηση φιαλιδίων
- Φυγόκεντρος
- Ογκομετρικές φιάλες 100mL, 500mL
- Πλάκες ηλεκτροφόρησης με gel- Mini-PROTEAN TGX Precast Gels
- Δοχείο ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN TGX Tetra-cell
- Συσκευή ανακίνησης δειγμάτων Mini-Rocker MR-1
- Σύστημα φωτογράφισης gel ηλεκτροφόρησης MiniBIS Pro (DNS-Bio-Imaging Systems)

2.1.2. Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος Laemmli 4X (277,8 mM Tris-HCl, pH 6,8 44,4% (v/v) γλυκερόλη, 4.4% SDS και 0,02% μπλε βρωμοφαινόλης)
- Ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος Laemmli 2X (65,8 mM Tris-HCl, ρύθμιση pH στο 6.8, 26,3% (w/v) γλυκερίνη, 2.1% SDS, 0,01% μπλε βρωμοφαινόλης)
- β-Μερκαπτοαιθανόλη
- Δείκτης κυανό της βρωμοθυμόλης
- Γλυκερόλη 100%
- Διάλυμα 20% SDS-10mM EDTA
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης - Running buffer solution Bio-Rad (0.025 M Tris-HCl, 0.1% SDS, 5% β-mercaptoethanol)
- Διάλυμα χρώσης Coomassie Brilliant Blue R-250

Laemmli Sample Buffer

Πρόκειται για το ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος που χρησιμοποιείται σε μια SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών για την προετοιμασία των δειγμάτων. Η χρήση του συγκεκριμένου ρυθμιστικού συστήματος εξασφαλίζει ιδανική ανάλυση στην απεικόνιση των τελικών ζωνών, όταν οι πρωτεΐνες προετοιμάζονται για διαδικασία SDS-PAGE με ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει Tris (τρισάμινομεθάνιο), γλυκίνη και SDS (Δωδεκυλοθειικό νάτριο). (LAEMMLI 1970)

Ρόλος των αντιδραστηρίων στο Laemmli buffer

Tris ως ρυθμιστική ουσία: Το ρυθμιστικό σύστημα Tris (τρισάμινομεθάνιο) και το pH παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη διατήρηση των πεπτιδικών δεσμών από τη διάσπαση. Το σχεδόν ουδέτερο pH χρησιμοποιείται επειδή το χαμηλό pH προκαλεί την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών και από την άλλη πλευρά, το υψηλό pH διαταράσσει τη δραστηριότητα των θειολών.

SDS: Οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε διαφορετικά μεγέθη και φορτία. Το SDS βοηθά στη ευθυγράμμιση(μετουσίωσης) των πρωτεϊνών και φέρνει ένα καθαρό αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες ανεξάρτητα από το αρχικό φορτίο. Αυτό ελαχιστοποιεί τις διακυμάνσεις κινήσεων των πρωτεϊνών στην γέλη που διαφορετικά παραμορφώνονται από τη διαφορά στο φορτίο και το σχήμα.

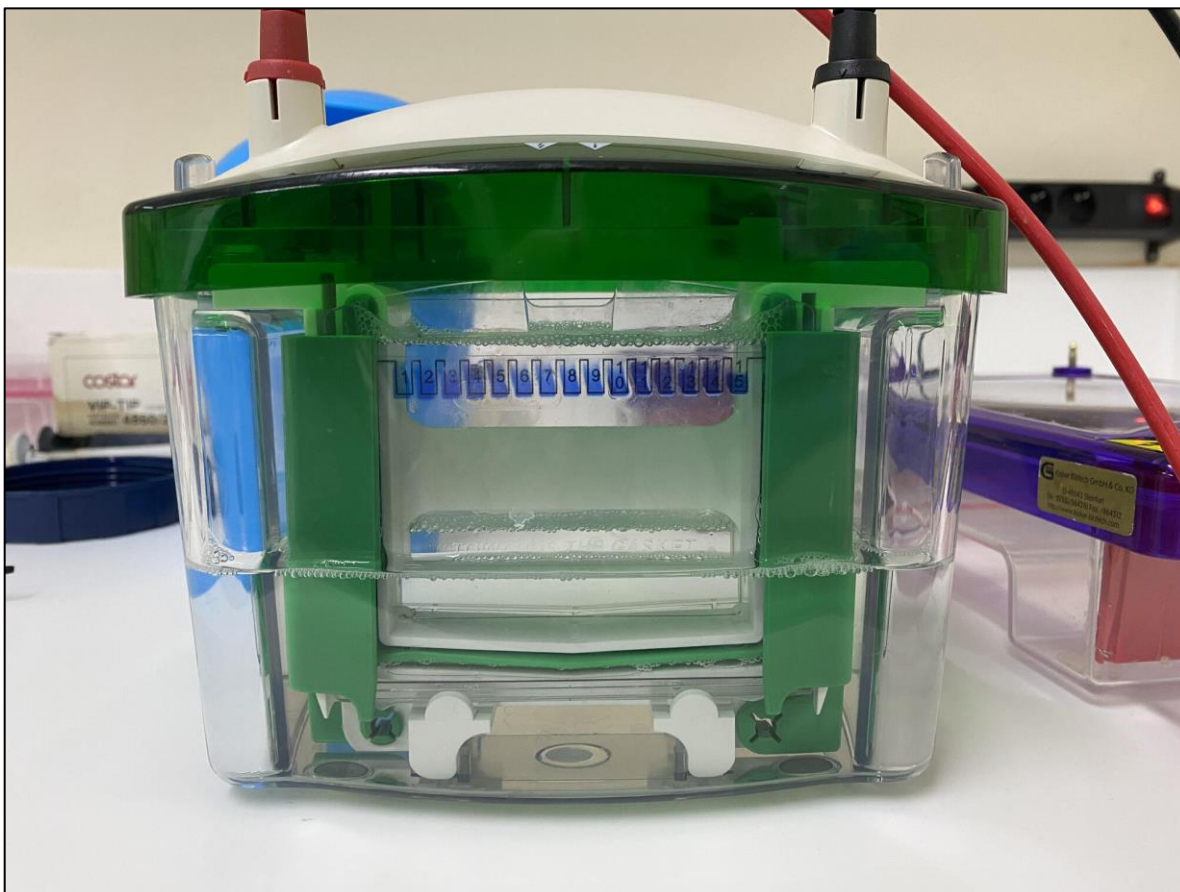
Γλυκερόλη: Η υψηλή πυκνότητα (συμπύκνωση του διαλύματος) της γλυκερίνης διασφαλίζει ότι το δείγμα κινείται προς τα κάτω μέσα στο πηγαδάκι της γέλης.

B-μερκαπτοαιθανόλη: χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών. Η B-μερκαπτοαιθανόλη, μαζί με το SDS, διασφαλίζουν ότι οι ζώνες οφείλονται σε μεμονωμένα πολυπεπίδια αντί για μοριακά σύμπλοκα.

Μπλε βρωμοθυμόλης: υποδεικνύει οπτικά τη θέση του δείγματος στο πήκτωμα.

Αν και τα αντιδραστήρια που αναφέρονται παραπάνω χρησιμοποιούνται σε τυπικό ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli, οι παραλλαγές του ρυθμιστικού διαλύματος έχουν άλλα υποκατάστατα. (LAEMMLI 1970)

Δοχείο ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN TGX Tetra-cell



Εικόνα 38. Δοχείο ηλεκτροφόρησης Mini-PROTEAN Tetra cell με τις πλάκες Precast ήδη εμβολιασμένες με τα δείγματα πρωτεϊνών

2.2. Σκοπός του πειράματος

Σκοπός του παρόντος εργαστηριακού πειράματος είναι η ανάλυση των πρωτεϊνών από σπόρους χαρουπιού που έχουν υποστεί διαφορετικές κατεργασίες και ζυμώσεις με διάφορους μικροοργανισμούς. Στόχος είναι η πιθανή αναγνώριση των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού βάρους των ζωνών των ηλεκτροφορήσεων για κάθε δείγμα και η αξιολόγηση της πρωτεολυτικής ικανότητας των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στις ζυμώσεις

2.3. Πειραματική πορεία

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για πρωτεϊνική ανάλυση στην παρούσα πτυχιακή εργασία προέρχονται από σπόρους χαρουπιού που έχουν προηγουμένως αλεσθεί, κονιοποιηθεί και ξηρανθεί. Κάθε ένα από τα δείγματα έχει υποστεί μια ειδική επεξεργασία, διαφορετική από τα υπόλοιπα. Έτσι τα δείγματα CB1 και CB5 προέρχονται από σπόρους χαρουπιού που έχουν υποστεί μόνο άλεση και κονιοποίηση. Τα δείγματα CB2, CB6, CB2X και CBA έχουν υποστεί άλεση, κονιοποίηση αλλά και ζύμωση, μετά από επιφανειακό ψεκασμό νερού, στις ίδιες συνθήκες ζύμωσης που χρησιμοποιήθηκαν για τα επόμενα δείγματα αλλά χωρίς την προσθήκη μικροοργανισμών. Τα δείγματα CB3, CB7 και CBB έχουν υποστεί άλεση, κονιοποίηση αλλά και ζύμωση, μετά από εμβολιασμό με καλλιέργεια οξυγαλακτικών βακτηρίων LAB (*Lactobacillus plantarum* - προϊόν WildBrew Sour Pitch™). Τα δείγματα CB4, CB8 και CBC έχουν υποστεί άλεση, κονιοποίηση αλλά και ζύμωση, μετά από εμβολιασμό με καλλιέργεια ζυμομυκήτων (*Saccharomyces cerevisiae* - προϊόν Turbo Yeast – Classic 8 της Still Spirits™). Τέλος, το δείγμα CBD έχει υποστεί άλεση, κονιοποίηση αλλά και ζύμωση, μετά από εμβολιασμό με καλλιέργεια *Aspergillus oryzae* (απομόνωση από ρύζι koji).

Πείραμα 1ο

Για τα δείγματα **CB1, CB2, CB3, CB4, CB2X**

- Ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό 3 mg από κάθε δείγμα σε φιαλίδιο eppendorf
- Προσθήκη ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος 0.9 mL Laemmli 4X και 0.1 mL β-mercaptoethanol στα δείγματα CB1, CB2, CB3, CB4 ενώ για το δείγμα CB2X χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος Laemmli 2X στην ίδια ποσότητα
- Θέρμανση σε θερμομαντική πλάκα κατάλληλη για φιαλίδια στους 90 °C για 10 λεπτά
- Ανάδευση με χρήση vortex
- Φυγοκέντριση στα 13.000 g για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προετοιμασία 800 mL του buffer της ηλεκτροφόρησης αναμειγνύοντας 720 mL dH₂O με 80 mL running buffer solution Bio-Rad (0.025 M Tris-HCl, 0.1% SDS, 5% β-mercaptoethanol)
- Προσθήκη ποσότητας running buffer στο εσωτερικό δοχείο που δημιουργείται μετά την τοποθέτηση των πλακών Precast Gels έως ότου καλυφθούν τα πηγαδάκια του gel πλήρως. Προσθήκη και στον εξωτερικό χώρο του δοχείου μέχρι την ένδειξη 2 gels.
- Ηλεκτροφόρηση στα 150 V για 40 λεπτά. Έπειτα αφαίρεση του gel ηλεκτροφόρησης μέσα σε δοχείο με απεσταγμένο νερό και καλή έκπλυση 3 φορές με απεσταγμένο νερό. Απομάκρυνση όλου του νερού και προσθήκη περίπου 50 mL χρωστικής Coomassie (πρακτικά βάζουμε έως ότου καλυφθεί το τζελ πλήρως εάν το δοχείο μας είναι μεγαλύτερο). Ανάδευση με την χρωστική για 2 ώρες και έπειτα διατήρηση του gel σε δοχείο με απεσταγμένο νερό overnight.

Πείραμα 2ο

Για τα δείγματα **CB5, CB6, CB7, CB8**

- Ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό 3 mg από κάθε δείγμα σε φιαλίδιο Eppendorf
- Προσθήκη ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος 0.9 mL Laemmli 4X και 0.1 mL β-mercaptoethanol

- Ανάδευση με χρήση vortex
- Θέρμανση σε θερμομαντική πλάκα κατάλληλη για φιαλίδια στους 90 °C για 10 λεπτά
- Ανάδευση με χρήση vortex
- Φυγοκέντριση στα 10.000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προετοιμασία 800 mL του buffer της ηλεκτροφόρησης αναμειγνύοντας 720 mL dH₂O με 80 mL running buffer solution Bio-Rad (0.025 M Tris-HCl, 0.1% SDS, 5% β-mercaptoethanol)
- Προσθήκη ποσότητας running buffer στο εσωτερικό δοχείο που δημιουργείται μετά την τοποθέτηση των πλακών έως ότου καλυφθούν τα πηγαδάκια του gel πλήρως. Προσθήκη και στον εξωτερικό χώρο του δοχείου μέχρι την ένδειξη 2 gels.
- Ηλεκτροφόρηση στα 100V για 50 λεπτά και ακόμα 10 λεπτά στα 130V. Έπειτα αφαίρεση του gel ηλεκτροφόρησης μέσα σε δοχείο με απεσταγμένο νερό και καλή έκπλυση 3 φορές με απεσταγμένο νερό. Απομάκρυνση όλου του νερού και προσθήκη περίπου 50 mL χρωστικής Coomassie (πρακτικά βάζουμε έως ότου καλυφθεί το τζελ πλήρως εάν το δοχείο μας είναι μεγαλύτερο). Ανάδευση με την χρωστική για 2 ώρες και έπειτα διατήρηση του gel σε δοχείο με απεσταγμένο νερό overnight.

Πείραμα 3^ο

Για τα δείγματα **CB5, CBA, CBB, CBC, CBD**

(Το δείγμα CB5 χρησιμοποιήθηκε ήδη έτοιμο από το 2ο πείραμα)

- Ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό 3 mg από κάθε δείγμα σε φιαλίδιο Eppendorf
- Προετοιμασία διαλύματος Laemmli με την εξής συνταγή: 10V διαλύματος 20% SDS- 10mM EDTA, 10V διαλύματος γλυκερόλης 100%, 5V β-μερκαπτοαιθανόλης, 1V κυανό της βρομοφαινόλης. Προετοιμασία συνολικά 5.2 mL διαλύματος Laemmli με την παραπάνω αναλογία (2 mL SDS-EDTA, 2mL glycerol, 1mL B-mercaptoethanol, 0,2 mL bromophenol blue). Προσθήκη 1mL σε κάθε φιαλίδιο Eppendorf κάθε δείγματος.
- Θέρμανση σε θερμομαντική πλάκα κατάλληλη για φιαλίδια στους 90 °C για 10 λεπτά

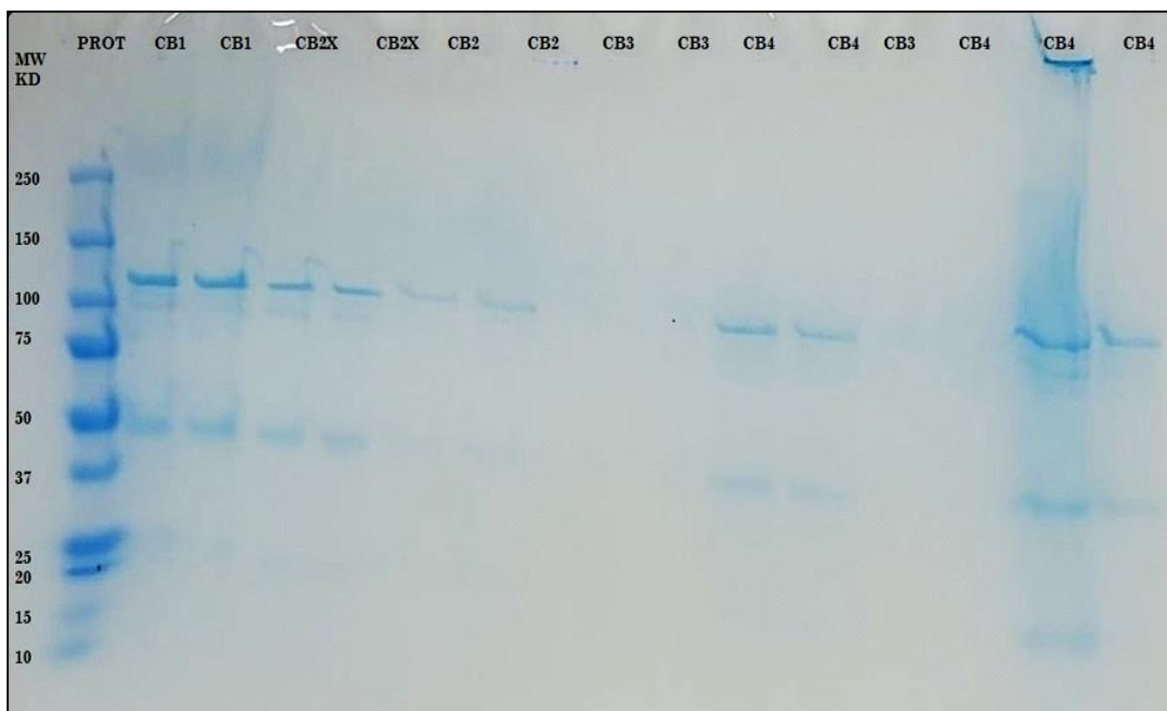
- Ανάδευση με χρήση vortex
- Φυγοκέντριση στα 10.000 g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προετοιμασία 800 mL του buffer της ηλεκτροφόρησης αναμειγνύοντας 720 mL dH₂O με 80 mL running buffer solution Bio-Rad (0.025 M Tris-HCl, 0.1% SDS, 5% β-mercaptoethanol)
- Προσθήκη ποσότητας running buffer στο εσωτερικό δοχείο που δημιουργείται μετά την τοποθέτηση των πλακών έως ότου καλυφθούν τα πηγαδάκια του gel πλήρως. Προσθήκη και στον εξωτερικό χώρο του δοχείου μέχρι την ένδειξη 2 gels.
- Ηλεκτροφόρηση στα 100V για 50 λεπτά και ακόμα 10 λεπτά στα 130V. Έπειτα αφαίρεση του gel ηλεκτροφόρησης μέσα σε δοχείο με απεσταγμένο νερό και καλή έκπλυση 3 φορές με απεσταγμένο νερό. Απομάκρυνση όλου του νερού και προσθήκη περίπου 50 mL χρωστικής Coomassie (πρακτικά βάζουμε έως ότου καλυφθεί το τζελ πλήρως εάν το δοχείο μας είναι μεγαλύτερο). Ανάδευση με την χρωστική για 2 ώρες και έπειτα διατήρηση του gel σε δοχείο με απεσταγμένο νερό overnight. Λόγω μη εμφάνισης ζωνών πρωτεϊνών έγινε προσπάθεια εμφάνισης τους με διατήρηση σε δοχείο με περίπου 50 mL χρωστικής Coomassie για 48 ώρες αλλά χωρίς επιτυχία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα

3.1.1. Πείραμα 1°



Εικόνα 39. Gel ηλεκτροφόρησης πειράματος 1

CB1 : μόνο άλεση

CB2: ζύμωση μόνο με νερό

CB3: ζύμωση με LAB

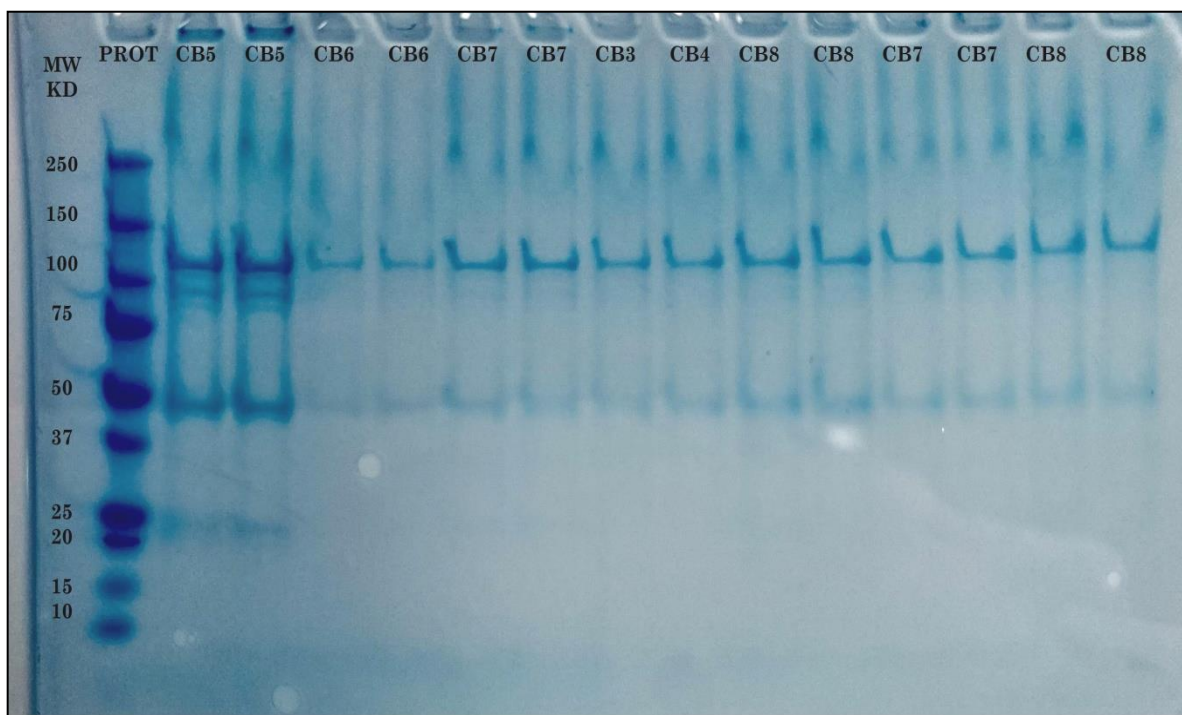
CB4: ζύμωση με ζύμη

CB2X: ζύμωση μόνο με νερό και χρήση Laemmli 2X

Στα CB1, CB2, CB3, CB4 χρησιμοποιήθηκε το Laemmli 4x

Ανάλυση: Στην παρούσα ηλεκτροφόρηση εμφανίζονται παρόμοιες ζώνες στα δείγματα CB1, CB2X, CB2 και CB4, οι οποίες εντοπίζονται στις περιοχές των 120 kDa , 100 kDa ,50 kDa και 25 kDa αντίστοιχα. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων CB3 ήταν ανεπιτυχής, καθώς δεν επιτεύχθηκε διαχωρισμός των πρωτεϊνών και ευδιάκριτος σχηματισμός ζωνών στο gel της ηλεκτροφόρησης. Αυτή η αστοχία μπορεί να οφείλεται σε σφάλματα κατά την προετοιμασία του δείγματος (π.χ. ανομοιογενής κονιοποίηση, διασταυρούμενη επιμόλυνση) ή κατά τον εμβολιασμό του Gel ηλεκτροφόρησης. Οι ζώνες των 100 kDa και 25 kDa δεν εμφανίζονται στο δείγμα CB2, το οποίο μπορεί να οφείλεται στην ανεπαρκή ποσότητα δείγματος κατά την προετοιμασία του CB2 ή στην ανεπαρκή διάσπαση των πρωτεϊνών.

3.1.2. Πείραμα 2°



Εικόνα 40. Gel ηλεκτροφόρησης πειράματος 2

CB5 : μόνο άλεση

CB6: ζύμωση μόνο με νερό

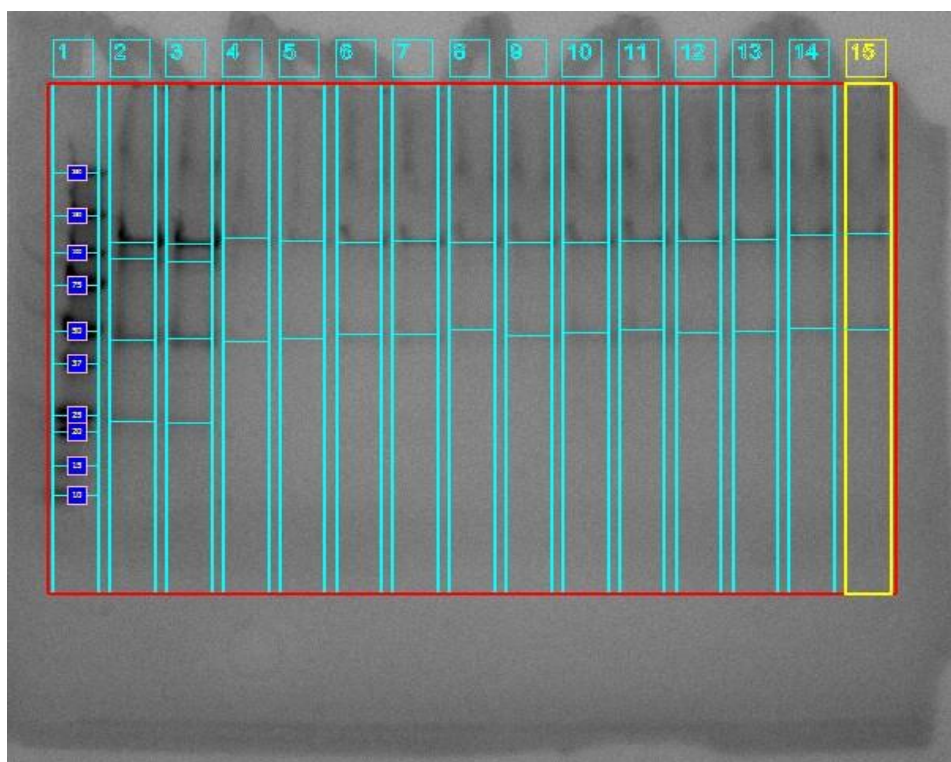
CB7: ζύμωση με LAB

CB8: ζύμωση με ζύμη

CB3: ζύμωση με LAB (δείγμα πειράματος 1)

Ανάλυση: Στο συγκεκριμένο πείραμα ηλεκτροφόρησης, όλα τα δείγματα έχουν αναπτύξει επιτυχώς ζώνες πρωτεϊνικών κλασμάτων, οι οποίες εντοπίζονται στις ίδιες περιοχές μοριακών βαρών, σχεδόν για όλα τα δείγματα. Έτσι, ζώνες εντοπίζονται στις περιοχές των 120-110 kDa, 100 kDa, 45 kDa και 25 kDa αντίστοιχα. Οι ζώνες των 100 kDa και των 25 kDa εντοπίζονται μόνο στις στήλες του δείγματος CB5, το οποίο υπέστη μόνο άλεση. Αυτό το γεγονός μπορεί να υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτή την περιοχή εμφανίζουν έντονη ευαισθησία στην θερμότητα και μετουσιώνονται κατά την επώαση των υπολοίπων δειγμάτων.

3.1.2.1. Ανάλυση gel ηλεκτροφόρησης με χρήση συστήματος φωτογράφισης και ανάλυσης gel ηλεκτροφόρησης MiniBIS Pro (DNS-Bio-Imaging Systems)



Εικόνα 41. Ανάλυση gel ηλεκτροφόρησης με χρήση συστήματος φωτογράφισης και ανάλυσης gel ηλεκτροφόρησης MiniBIS Pro (DNS-Bio-Imaging Systems)

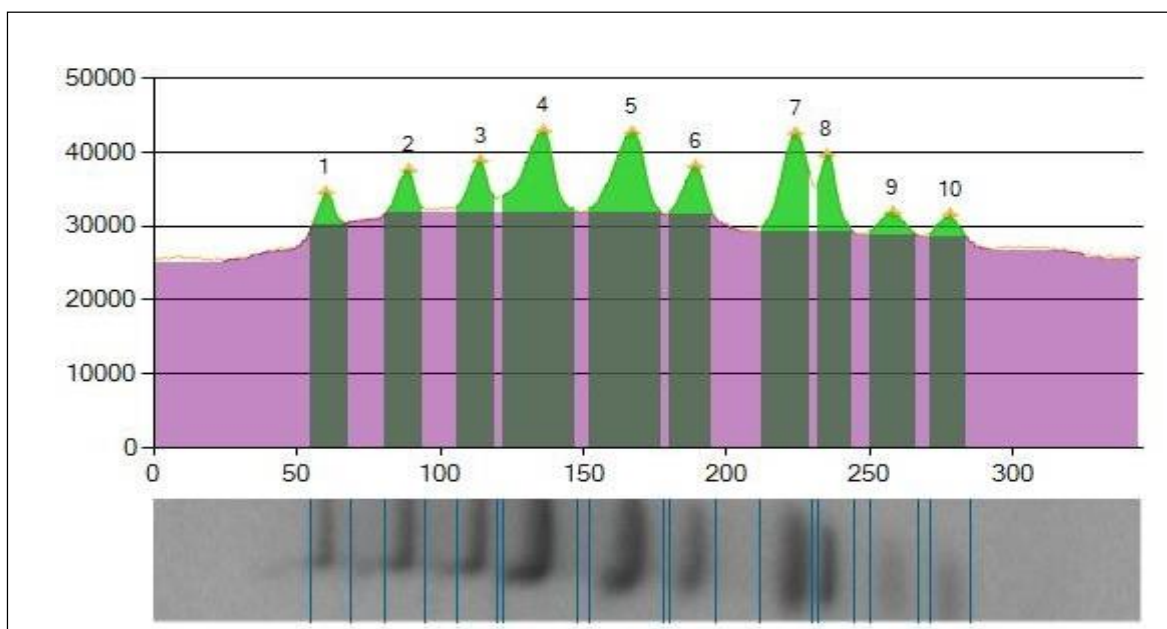
Παράμετροι εικόνας

Λογισμικό	GelCapture MiniBIS 1.0.0.1
Ημερομηνία λήψης	06/04/2023 12:56:25
Χρόνος έκθεσης	0.01 sec

Παράμετροι ανάλυσης ζωνών

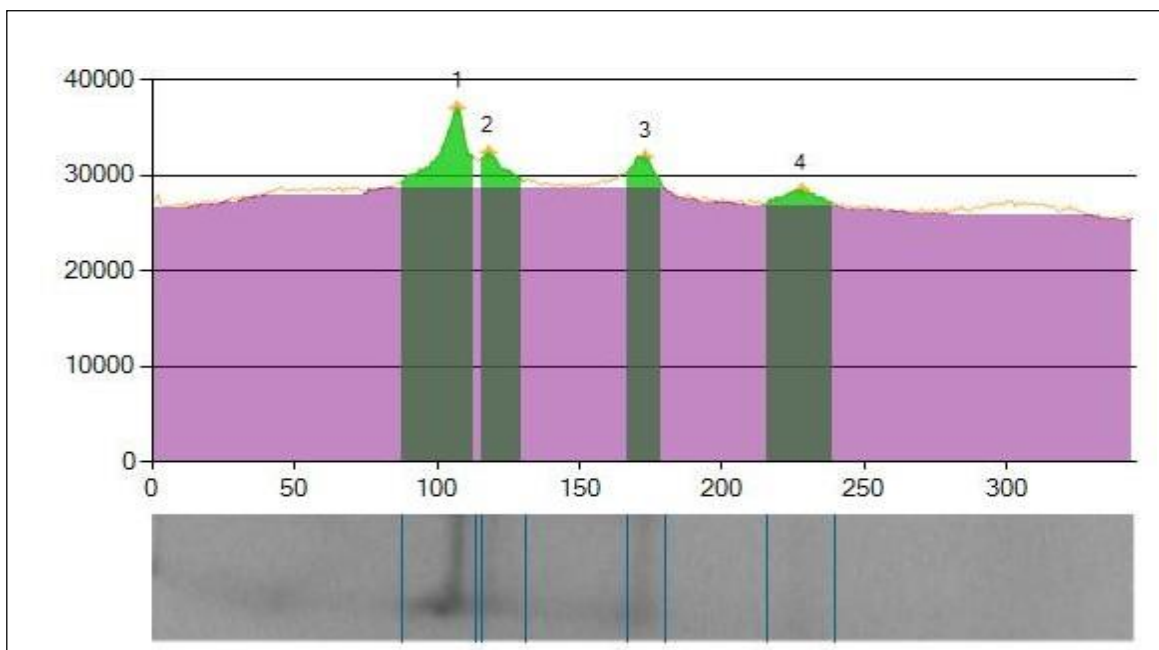
Μέθοδος αφαίρεσης φόντου	Μέγεθος δίσκου κυλιόμενης μπάλας :70
Ευαισθησία ανίχνευσης ζώνης	100
Τυπική ονομασία μοριακού βάρους	Νέο τυπικό όνομα
Τύπος παλινδρόμησης μοριακού βάρους	CubicSpline
Τύπος παλινδρόμησης μάζας	Γραμμικός
Εξίσωση παλινδρόμησης μάζας	N/A
Παλινδρόμηση μάζας R τετράγωνο	N/A

Ανάλυση 1^{ης} στήλης - Στήλη δεικτών πρωτεϊνών PROTEAN



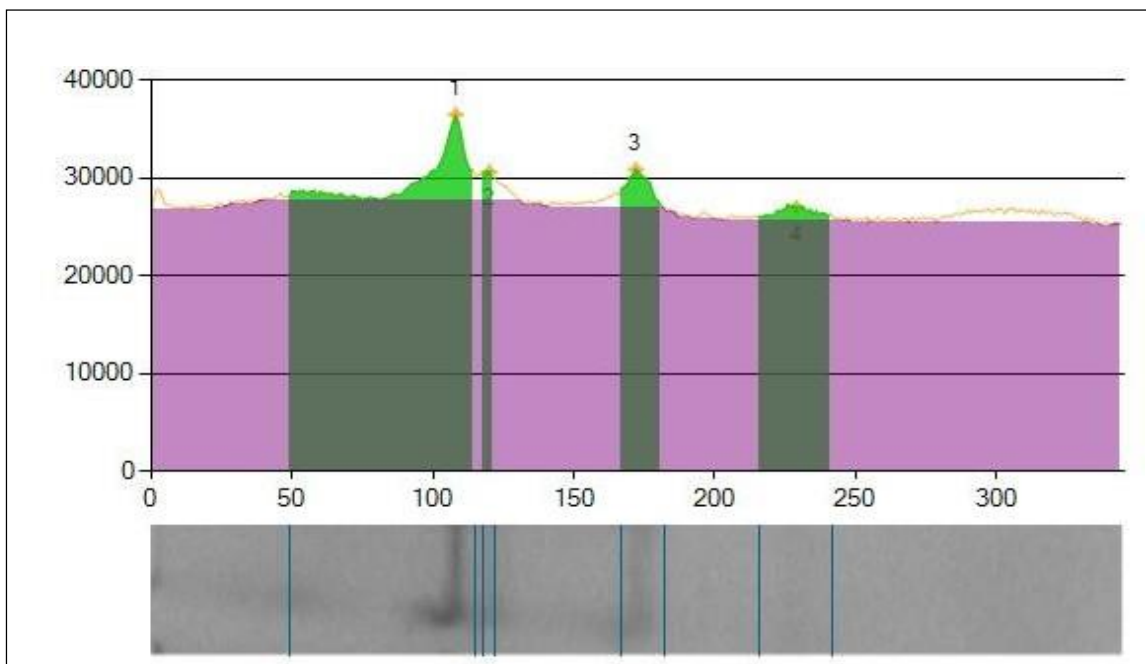
Στήλη 1 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	250,00	0,17	13867657	683914
2	150,00	0,26	14987633	1143420
3	100,00	0,33	15487711	1642320
4	75,00	0,39	28883312	3961608
5	50,00	0,48	28853370	3937334
6	37,00	0,55	17104423	1521886
7	25,00	0,65	20247036	4087137
8	20,00	0,68	13893214	1995573
9	15,00	0,75	15872872	748851
10	10,00	0,81	13042269	592477

Ανάλυση 2^{ης} στήλης – Δείγμα μόνο άλεσης



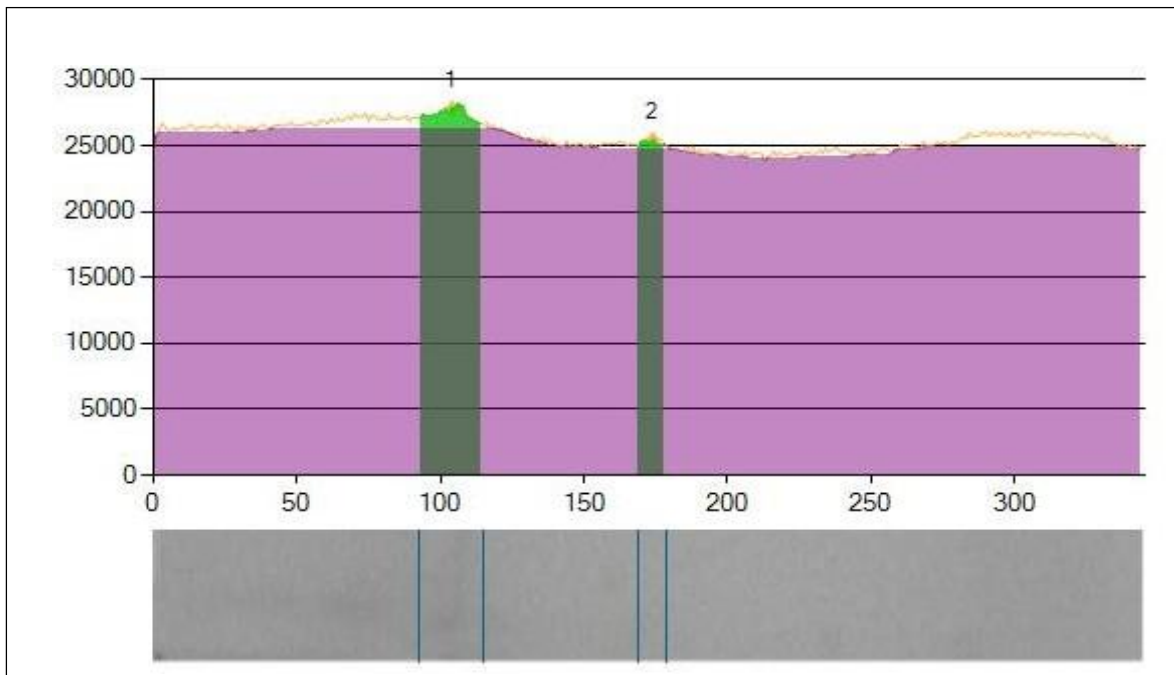
Στήλη 2 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	110,84	0,31	25301759	2766986
2	94,58	0,34	14323473	969533
3	45,95	0,50	12481129	799303
4	24,09	0,66	20155281	645056

Ανάλυση 3^{ης} στήλης – Δείγμα μόνο άλεσης



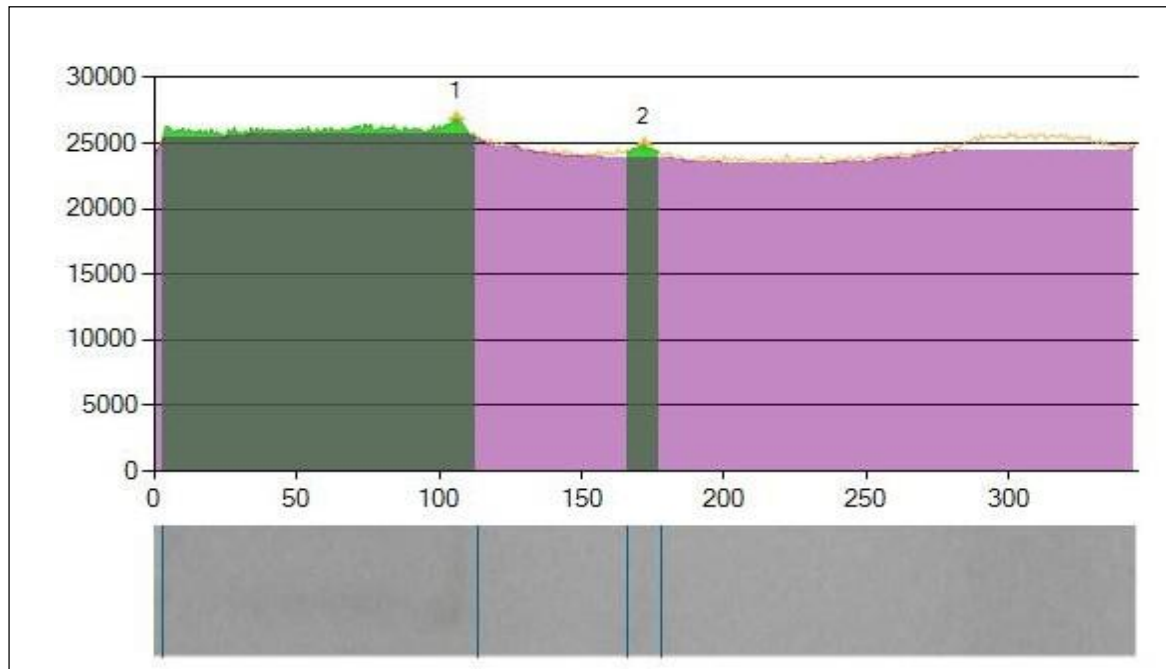
Στήλη 3 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	109,17	0,31	57425164	3565273
2	92,05	0,35	4430587	411192
3	46,60	0,50	13569402	1000028
4	23,14	0,66	20817901	688105

Ανάλυση 4^{ης} στήλης – Δείγμα ζύμωσης μόνο με νερό



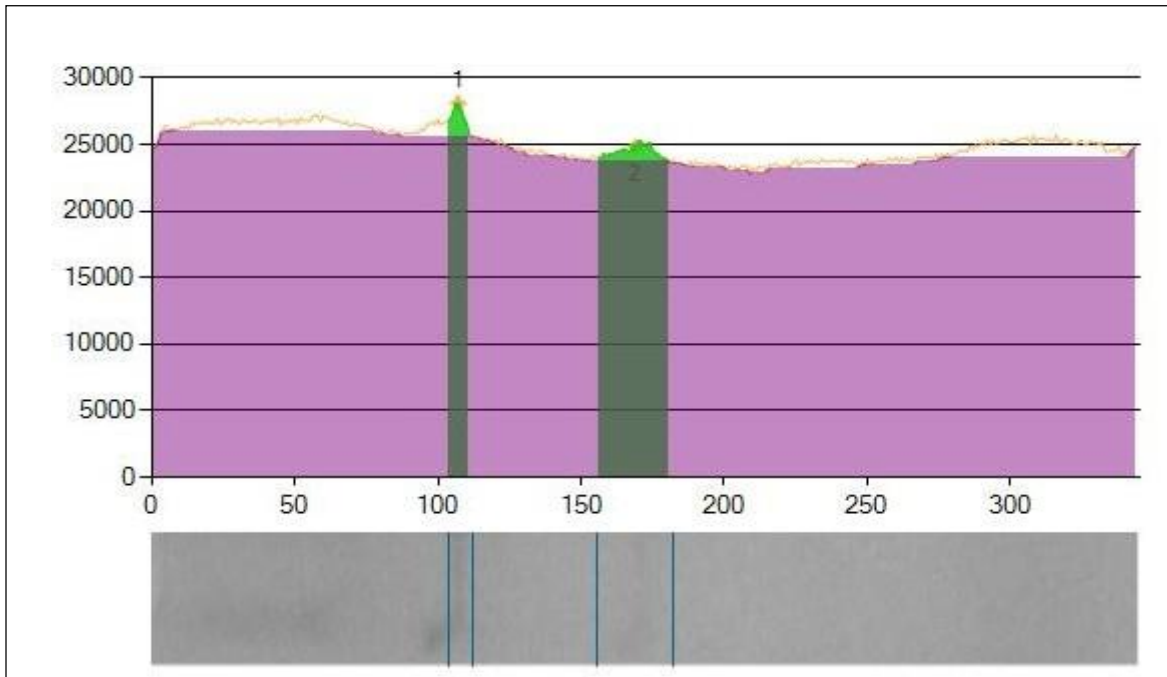
Στήλη 4 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	94,58	0,34	18263088	663300
2	45,30	0,50	8035792	115429

Ανάλυση 5^{ης} στήλης – Δείγμα ζύμωσης μόνο με νερό



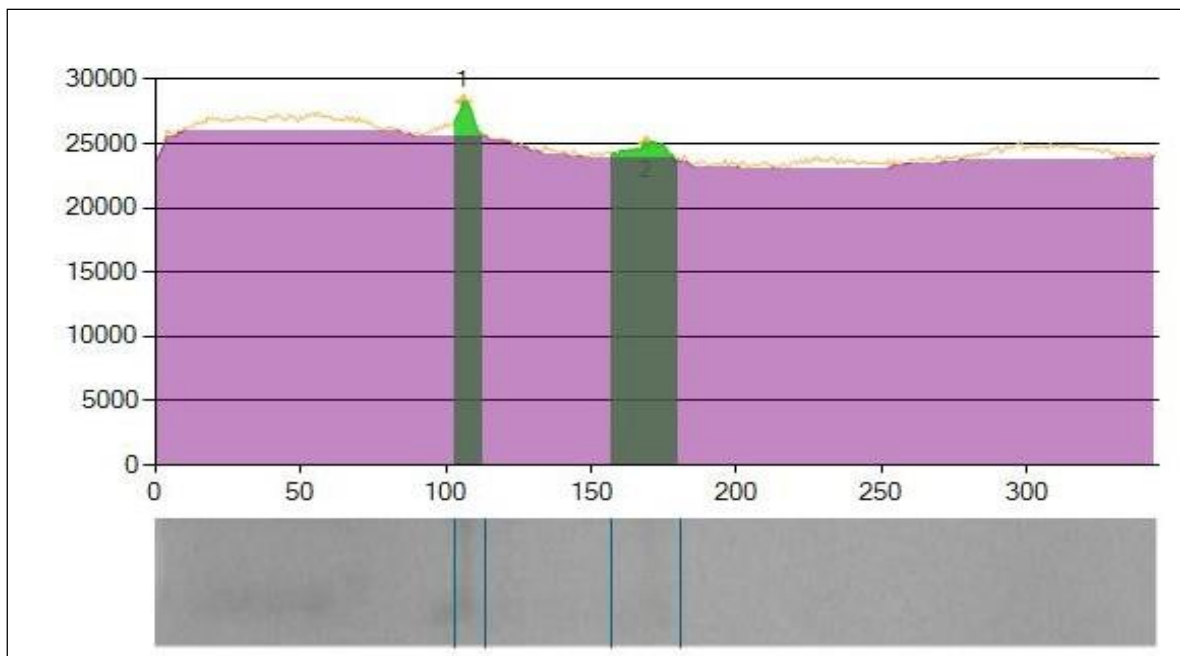
Στήλη 5 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	112,55	0,31	84493647	1231033
2	47,27	0,50	9249072	233637

Ανάλυση 6^{ης} στήλης - Δείγμα ζύμωσης με LAB (*Lactobacillus plantarum*)



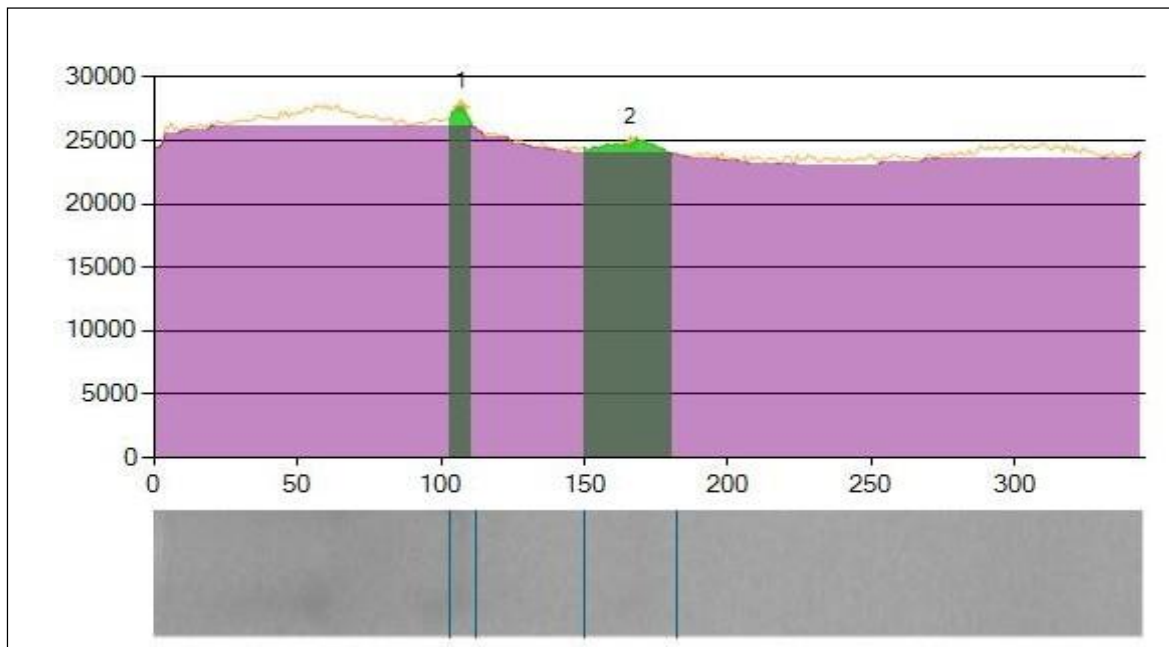
Στήλη 6 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	110,84	0,31	7050287	361334
2	43,42	0,51	19148105	532176

Ανάλυση 7^{ης} στήλης – Δείγμα ζύμωσης με LAB (*Lactobacillus plantarum*)



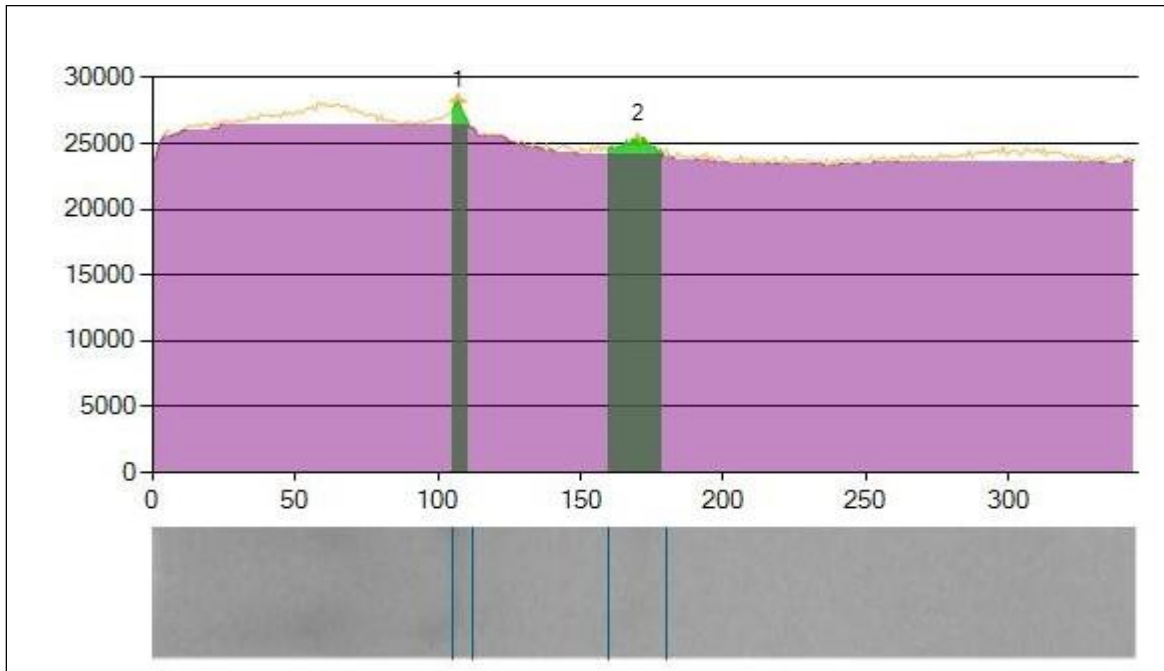
Στήλη 7 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	112,55	0,31	9373983	464979
2	44,66	0,51	17770441	399999

Ανάλυση 8^{ης} στήλης - Δείγμα ζύμωσης με LAB (*Lactobacillus plantarum*) πειράματος 1



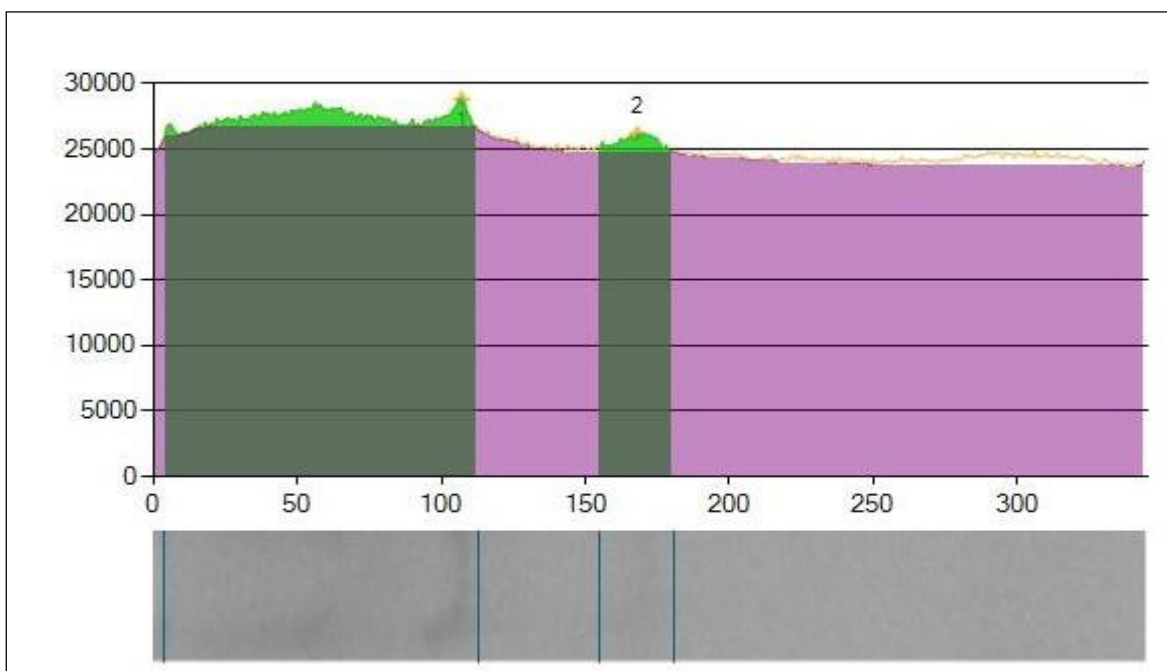
Στήλη 8 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	110,84	0,31	7828196	246849
2	46,60	0,50	23509309	506988

Ανάλυση 9^{ης} στήλης – Δείγμα ζύμωσης με ζυμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*) πειράματος 1



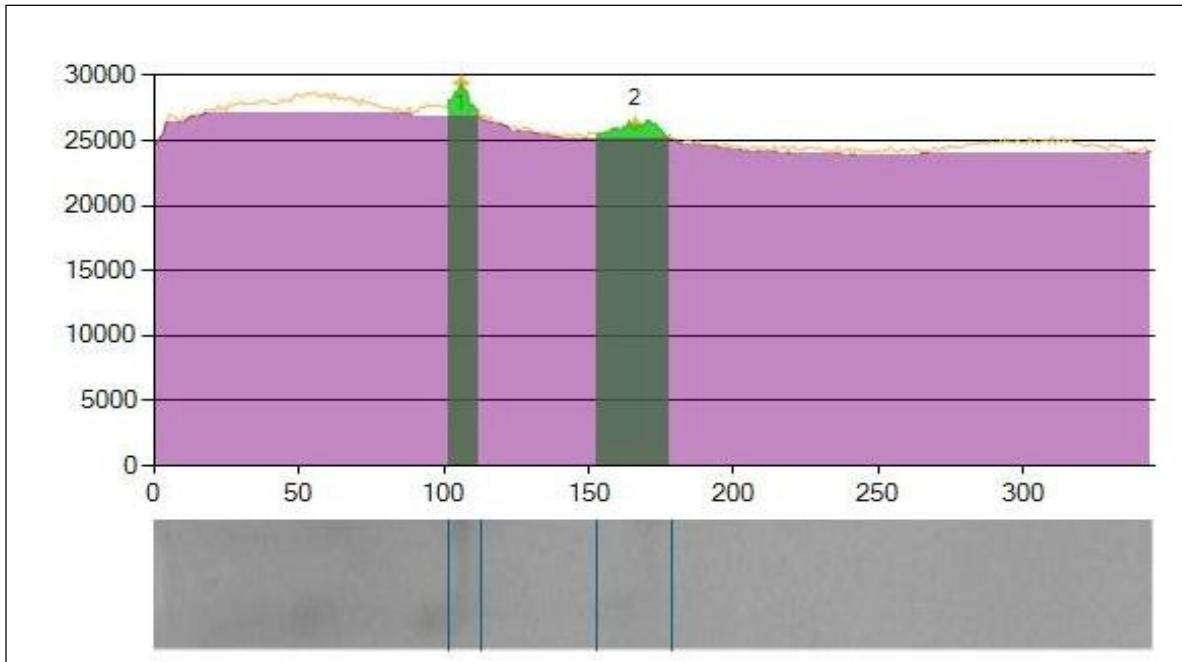
Στήλη 9η^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	110,84	0,31	6326542	209963
2	45,30	0,50	15129580	412643

Ανάλυση 10^{ns} στήλης - Δείγμα ζύμωσης με ζύμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*)



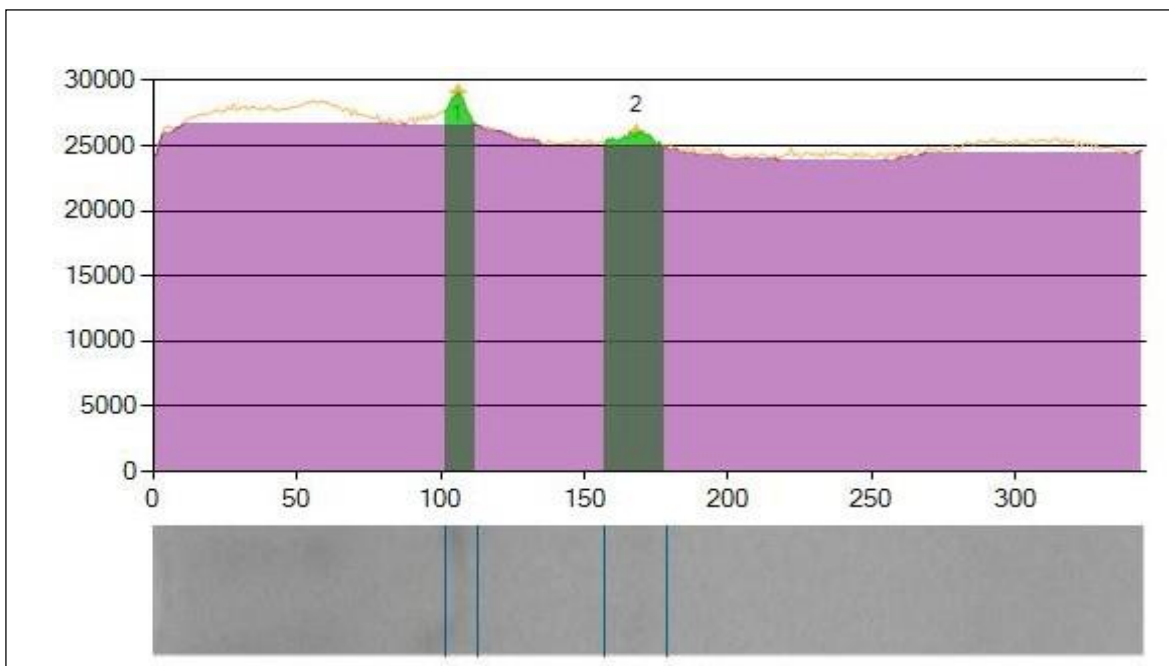
Στήλη 10η ⁿ				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	110,84	0,31	87363404	2269046
2	45,30	0,50	20020777	572410

Ανάλυση 11^{ης} στήλης - Δείγμα ζύμωσης με ζύμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*)



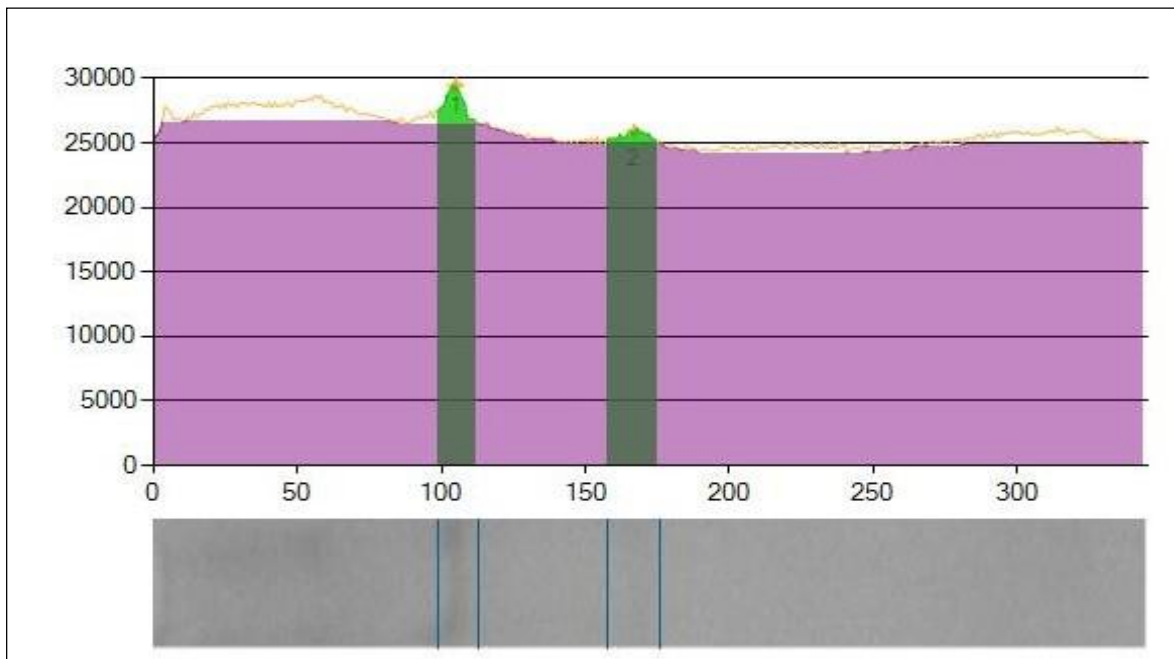
Στήλη 11 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	112,55	0,31	9801312	433848
2	44,66	0,51	20289225	596740

Ανάλυση 12^{ης} στήλης - Δείγμα ζύμωσης με LAB (*Lactobacillus plantarum*)



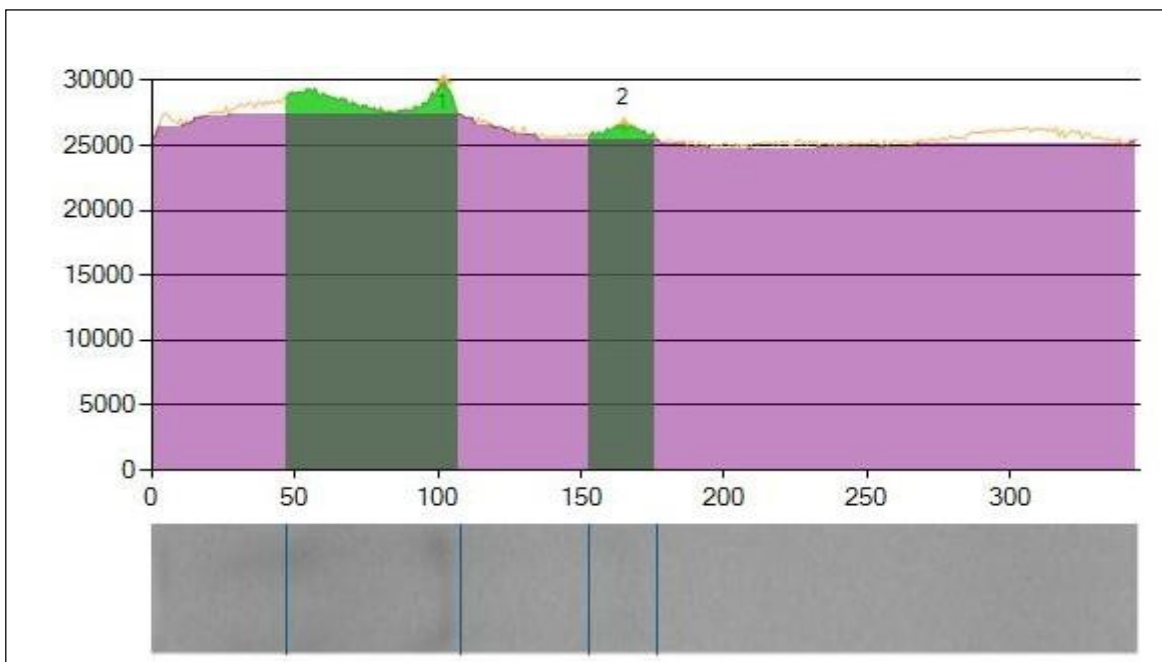
Στήλη 12 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	112,55	0,31	9714755	443636
2	45,30	0,50	17032167	334769

Ανάλυση 13^{ης} στήλης – Δείγμα ζύμωσης με LAB (*Lactobacillus plantarum*)



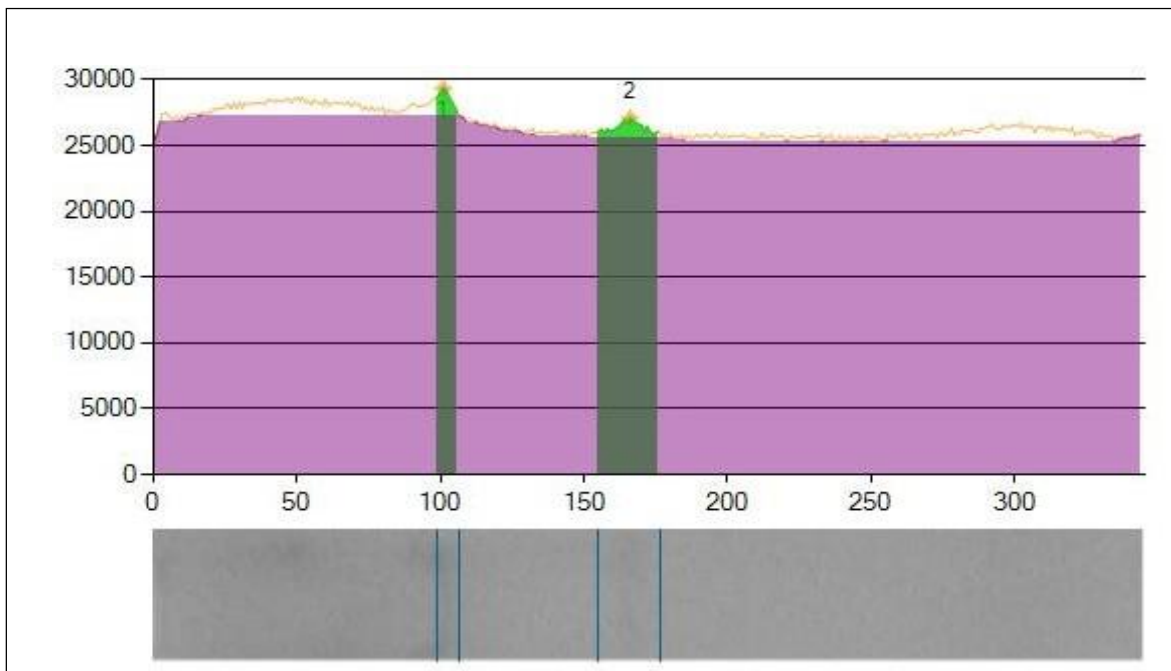
Στήλη 13 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	114,31	0,30	12165565	633111
2	47,94	0,49	14076494	317188

Ανάλυση 14^{ης} στήλης - Δείγμα ζύμωσης με ζύμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*)



Στήλη 14 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	119,88	0,30	51112362	1875331
2	47,27	0,50	18932955	472440

Ανάλυση 15^{ης} στήλης - Δείγμα ζύμωσης με ζύμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*)



Στήλη 15 ^η				
Αριθμός ζώνης	Μοριακό βάρος (kD)	RF	Volume plus Background	Net Volume
1	121,84	0,29	7425771	286753
2	49,31	0,49	17582370	447899

3.1.2.2. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πειράματος 2

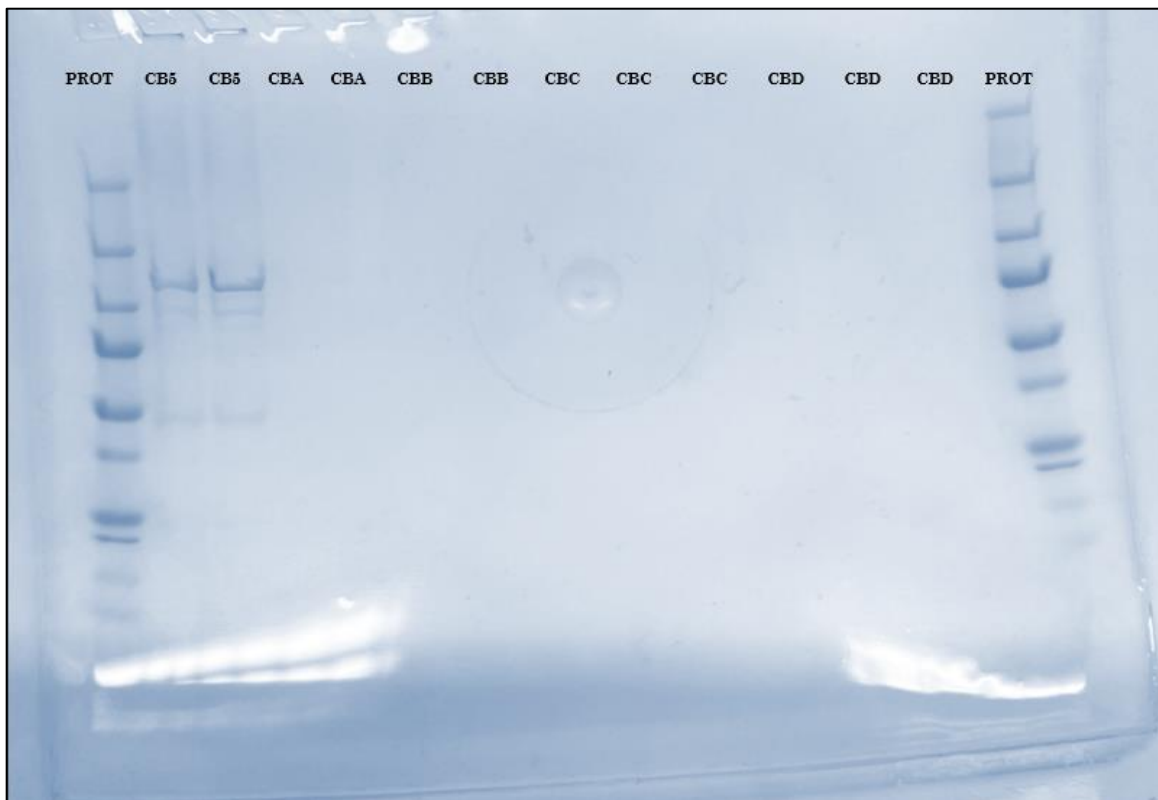
Στήλες ηλεκτροφόρησης							
Ζώνες	2η	3η	4η	5η	6η	7η	8η
	CB5	CB5	CB6	CB6	CB7	CB7	CB3
	Μόνο άλεση	Μόνο άλεση	Ζύμωση με νερό	Ζύμωση με νερό	Ζύμωση με LAB	Ζύμωση με LAB	Ζύμωση με LAB (πείραμα 1)
Μοριακό Βάρος ζωνών Kda							
1	110,84	109,17	94,58	112,55	110,84	112,55	110,84
2	94,58	92,05	45,3	47,27	43,42	44,66	46,6
3	45,95	46,6					
4	24,09	23,14					

Στήλες ηλεκτροφόρησης							
Ζώνες	9η	10η	11η	12η	13η	14η	15η
	CB4	CB8	CB8	CB7	CB7	CB8	CB8
	Ζύμωση με ζυμομύκητα (πείραμα 1)	Ζύμωση με ζυμομύκητα	Ζύμωση με ζυμομύκητα	Ζύμωση με LAB	Ζύμωση με LAB	Ζύμωση με ζυμομύκητα	Ζύμωση με ζυμομύκητα
Μοριακό Βάρος ζωνών Kda							
1	110,84	110,84	112,55	112,55	114,31	119,88	121,84
2	45,3	45,3	44,66	45,3	47,94	47,27	49,31
3							
4							

LAB: *Lactobacillus plantarum* - προϊόν WildBrew Sour Pitch™.

Ζυμομύκητας : *Saccharomyces cerevisiae* - προϊόν Turbo Yeast – Classic 8 της Still Spirits™.

3.1.3. Πείραμα 3°



Εικόνα 42. Gel ηλεκτροφόρησης πειράματος 3

CB5: μόνο άλεση

CBA: ζύμωση μόνο με νερό

CBB: ζύμωση με LAB

CBC: ζύμωση με ζύμη

CBD: ζύμωση με *Aspergillus oryzae*

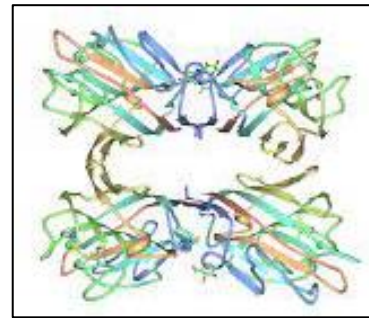
Ανάλυση: Στο συγκεκριμένο πείραμα, οι ζώνες CBA, CBB, CBC, CBD των αντίστοιχων δειγμάτων στα οποία χρησιμοποιήθηκε νέο σύστημα διαλυτών Laemmli buffer, δεν εμφάνισαν ζώνες. Αυτό το γεγονός οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα κατά την διάρκεια παρασκευής του Laemmli buffer με αποτέλεσμα να μην μπορέσει να γίνει σωστά η ανάπτυξη των πρωτεϊνών στο gel της ηλεκτροφόρησης. Αντιθέτως, οι στήλες των δειγμάτων CB5 που ανήκουν στο 2° πείραμα και έχουν προετοιμαστεί με άλλο διάλυμα Laemmli buffer, εμφανίζουν σχετικά ευδιάκριτες ζώνες πρωτεϊνικών κλασμάτων. Η ανάλυση των ζωνών του δείγματος CB5 περιέχεται στην ανάλυση πειράματος 2.

3.2. Αντιστοίχιση ζωνών ηλεκτροφόρησης με πρωτεΐνες

Η διαδικασία της αντιστοίχισης των ζωνών πρωτεϊνικών κλασμάτων που εμφανίστηκαν στα δύο επιτυχημένα πειράματα ηλεκτροφόρησης σε σπόρους χαρουπιού είναι προσεγγιστική και βασίζεται στην σύγκριση με μια αρκετά περιορισμένη βιβλιογραφική έρευνα επί του θέματος.

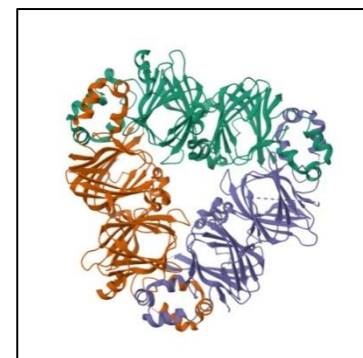
Οι πρωτεϊνικές ζώνες που εντοπίστηκαν στα πειράματα 1 και 2 αντιστοιχούν σε μοριακά βάρη ίσα με 120-110 kDa, 100 kDa, 50-45 kDa και 25 kDa αντίστοιχα.

- 120-110 kDa : Η συγκεκριμένη ζώνη πιθανότατα να ανήκει στην πρωτεΐνη Phaseolus Vulgaris Lectin (λεκτίνη), η οποία είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος ίσο με 120 kilo Dalton (kDa). Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν υδατάνθρακες και είναι εξαιρετικά ειδικές για ομάδες σακχάρων που αποτελούν μέρος άλλων μορίων, επομένως προκαλούν συγκόλληση συγκεκριμένων κυττάρων ή καθίζηση γλυκοσυζευγμάτων και πολυσακχαριτών. Η λεκτίνη έχει εντοπιστεί σε πληθώρα φυτικών προϊόντων με βασικότερα τα κόκκινα φασόλια και ορισμένα είδη φακής (U Rutishauser 1975)



Εικόνα 43. Phaseolus Vulgaris Lectin (Source: Medicago AB)

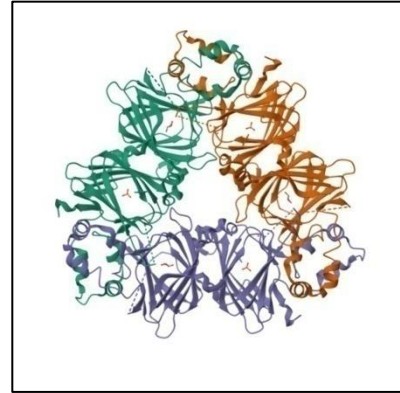
- 100 kDa : Η συγκεκριμένη ζώνη πιθανότατα ανήκει στην α-υπομονάδα ή την ά-υπομονάδα της β-κονγλυκινίνης. Πρόκειται για μια 7S-γλυκοπρωτεΐνη, σφαιρικής μορφής, που απαρτίζεται από 3 διακριτές υπομονάδες, την α, την ά και την β. Οι υπομονάδες ά και α έχουν δύο βασικές περιοχές, την περιοχή επέκτασης και την περιοχή του πυρήνα, ενώ η β-υπομονάδα αποτελείται από μια μόνο περιοχή πυρήνα. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συναντάται αρκετά συχνά



Εικόνα 44. beta-Conglycinin (Source: Protein Data Bank RCSB)

σε όσπρια και σπόρους και ιδιαίτερα στα φασόλια της σόγιας όπου καταλαμβάνει το 30-50% του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου. (Tang 2019)

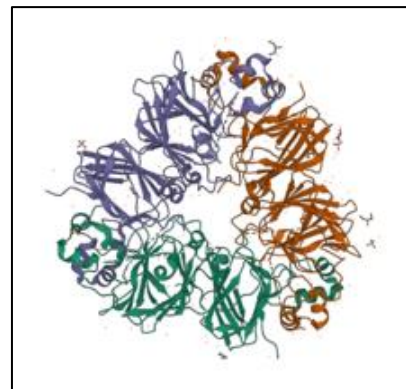
- 50-45 kDa: Η συγκεκριμένη ζώνη πιθανότατα ανήκει στην πρωτεΐνη Vicilin (βισιλίνη). Η βισιλίνη είναι μια σφαιρική 7S-πρωτεΐνη που συναντάται αρκετά συχνά στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο διαφόρων οσπρίων, όπως φαίνεται και στα αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων φυτικών σπόρων στο κεφάλαιο 1.6.4.2. . Είναι αποθηκευτική πρωτεΐνη και εμφανίζει έντονη προστατευτική δράση έναντι μυκητών και άλλων



Εικόνα 45. Vicilin (Source: Protein Data Base RCSB)

μικροοργανισμών. Η βισιλίνη αποτελείται από μια υπομονάδα α, μια μονάδα γλυκερόλης και ένα φωσφορικό ιόν. (Wong 2011). Βάσει άλλων μελετών μπορεί να θεωρηθεί ότι η ζώνη που εμφανίζεται στα 50-45kDa ανήκει σε κάποια από τις υπομονάδες μιας 11S σφαιρικής πρωτεΐνης, όπως η κονγλυκινίνη σόγιας ή η legumin μπιζελιού. Αυτές οι σφαιρικές πρωτεΐνες 11S σχηματίζονται από υπομονάδες AB που συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς. Επιπλέον, αυτές οι υπομονάδες AB αποτελούνται από όξινα πολυπεπτίδια (πολυπεπτίδιο Α) με μοριακό βάρος 30 kDa και βασικά πολυπεπτίδια (πολυπεπτίδιο Β) με μοριακό βάρος 20 kDa. (Bengoechea, et al. 2008) (C. & Bengoechea 2008)

- 25 kDa: Η συγκεκριμένη ζώνη πιθανότατα ανήκει στο βασικό πολυπεπτίδιο Β της πρωτεΐνης legumin, η οποία διασπάστηκε στα δύο επιμέρους πολυπεπτίδια της (βασικό και όξινο) λόγω της ύπαρξης μετουσιωτικού παράγοντα στα αντιδραστήρια προετοιμασίας των δειγμάτων. Η παρουσία του συγκεκριμένου πολυπεπτιδίου σε παρόμοιες περιοχές μοριακού βάρους εμφανίζεται και σε ηλεκτροφορήσεις σε πρωτεΐνες μπιζελιού και



Εικόνα 46. Legumin (Source: Tandang-Silvas, et al. 2010)

καρπών του φυτού *Vicia faba* L., των οποίων τα αποτελέσματα υπάρχουν στο κεφάλαιο 1.6.4.2. (εικόνες 35 και 36). Η πρωτεΐνη legumin είναι μια σφαιρική 11-S

πρωτεΐνη που περιέχεται σε μεγάλο ποσοστό σε όσπρια, όπως τα φασόλια, τα μπιζέλια και οι φακές αλλά και στους σπόρους της κάνναβης. Εμφανίζει αρκετές δομικές ομοιότητες με την καζεΐνη του γάλακτος των θηλαστικών και για αυτό σε ορισμένες βιβλιογραφικές αναφορές ονομάζεται και ως η καζεΐνη των λαχανικών. Τέλος, αποτελεί μια βασική αποθηκευτική πρωτεΐνη των φυτικών σπόρων και καρπών. (Tandang-Silvas, et al. 2010) (Shutov AD 1995)

3.3. Αξιολόγηση πρωτεολυτικής δράσης μικροοργανισμών ζυμώσεων

Εξετάζοντας την διαφοροποίηση που εμφανίζουν οι ζώνες ηλεκτροφορήσεων μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων, στα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί μικροοργανισμοί κατά την ζύμωση (LAB, ζυμομύκητες, *Aspergillus oryzae*) παρατηρήθηκε ότι δεν εμφανίζεται καμία ορατή διαφοροποίηση. Επιπλέον, καμία διαφοροποίηση στις ζώνες ηλεκτροφόρησης δεν εντοπίζεται και στην σύγκριση μεταξύ των ζωνών που είχαν εμβολιαστεί με μικροοργανισμούς και αυτών που δεν είχαν εμβολιαστεί με μ/ο και ζυμώθηκαν μόνο με νερό. Ως αποτέλεσμα, οι μικροοργανισμοί που προαναφέρθηκαν δεν επιτελούν κάποια σημαντική πρωτεολυτική δράση επί των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στους σπόρους του χαρουπιού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Συμπεράσματα πειράματος και μελέτης

Μέσα από την συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία έγινε μια εκτενής ανάλυση στο κομμάτι των φυτικών πρωτεϊνών και συγκεκριμένα των φυτικών σπόρων. Η ανάλυση των πρωτεϊνών σπόρων χαρουπιού αποτέλεσε μια εξαιρετικά πρωτοποριακή μελέτη, για την οποία υπάρχει αρκετό περιθώριο περαιτέρω πειραματισμών και εξερεύνησης. Οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν κατά προσέγγιση από αυτή την ανάλυση ήταν η πρωτεΐνη Phaseolus Vulgaris Lectin (λεκτίνη), η β-κονγλυκινίνη, η βισιλίνη και η πρωτεΐνη legumin. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παρά την χρήση αξιόπιστων και αναγνωρισμένων μεθόδων για την ανάλυση των πρωτεϊνών των σπόρων του χαρουπιού, απαιτούνται επακόλουθες μελέτες με χρήση διαφορετικών φυσικοχημικών μεθόδων προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα μας και να δημιουργηθεί ένα εγκεκριμένο πρωτεϊνικό προφίλ για αυτούς τους σπόρους. Στο κομμάτι της αξιολόγησης της πρωτεολυτικής δράσης των χρησιμοποιούμενων μικροοργανισμών, δεν εντοπίστηκε καμία διαφοροποίηση στις ζώνες ηλεκτροφόρησης, που να υποδηλώνει έντονη πρωτεόλυση. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων επιρεάστηκαν εκτενώς από παράγοντες όπως η σύσταση και σύνθεση διαφόρων διαλυμάτων και αντιδραστηρίων, χρόνοι παραμονής και φυγοκέντρωσης, θερμοκρασίες επώασης δειγμάτων. Επομένως, θα ήταν σημαντικό να διενεργηθούν μελέτες για την βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών προκειμένου να αυξηθεί η αξιοπιστία και η εμπιστοσύνη τόσο στην μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σπόρων πρωτεϊνών όσο και στα αποτελέσματα της.

Το αποκορύφωμα αυτής της πειραματικής πτυχιακής έρευνας αποτελεί ένα μικρό αλλά εξίσου σημαντικό κομμάτι ενός σημαντικού δυναμικού των πρωτεϊνών του χαρουπιού, με απώτερο σκοπό να βρεθούν κατάλληλες και περιβαλλοντικά βιώσιμες εναλλακτικές πηγές πρωτεϊνών προκειμένου να ενταχθούν στις καθημερινές διατροφικές επιλογές των ανθρώπων. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι το κομμάτι των πρωτεϊνών αποτελεί έναν εξαιρετικά πλούσιο και συνεχώς διευρυνόμενο επιστημονικό κλάδο, ο οποίος, μέσω μελετών όπως και η παρούσα, αρχίζει να αποκαλύπτεται προκειμένου να γίνουν γνωστές όλες οι ιδιότητες και αλληλεπιδράσεις αυτών των μακρομορίων τόσο στα τρόφιμα όσο και στον ανθρώπινο οργανισμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

❖ Βιβλιογραφία

- ❖ Ahmad Mir, Rakeeb, Sheikh Mansoor Shafi, and Sajad Majeed Zargar. "Understanding the OMICS techniques: an introduction to genomics and proteomics." 1-28. Elsevier, 2023.
- ❖ Ahn, J-M., K. Kassees, T-K. Lee, B. Manandhar, and A.M. Yousif. "Strategy and Tactics for Designing Analogs: Biochemical Characterization of the Large Molecules." 66-115. Elsevier, 2017.
- ❖ Alonso, A., G. Visedo, M. Sancho, and J. Fernández-Piqueras. "Isoelectric Focusing in Miniaturized Gels: Application to GC, PI, Tf and ORM Subtyping in Central Spain." 255-259. 1990.
- ❖ Alonso-Miravalles, Loreto, and James O'Mahony. *Composition, Protein Profile and Rheological Properties of Pseudocereal-Based Protein-Rich Ingredients*. Vol. 7, 73. 2018.
- ❖ Arndt, Claudia, Stefanie Koristka, Holger Bartsch, and Michael Bachmann. *Native Polyacrylamide Gels*. 2012.
- ❖ Baniwal, Poonam, Rahul Mehra, Nishant Kumar, Sugandha Sharma, and Shiv Kumar. *Cereals: Functional constituents and its health benefits*. Vol. 10, 343-349. 2021.
- ❖ Barrett, Graham Campbell, and Donald Trevor Elmore. *Amino acids and peptides*. Cambridge University Press, 1998.
- ❖ Baumgartner, Sabine, R. Krska, and E. Welzig. *Detecting allergens in foods*. Woodhead Publishing, 2007.
- ❖ Bengoechea, C., et al. *Composition and structure of carob (Ceratonia siliqua L.) germ proteins*. Vol. 107, 675-683. Elsevier, 2008.

- ❖ Bengoechea, Carlos & Romero, A. & Villanueva, A & Moreno, G. & Alaiz, M. & Millán, F. & Guerrero, Antonio & Puppo, Maria. "Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins." *Food Chemistry*, 2008: 675-683.
- ❖ Bhattacharya, Suvendu. *Edible nuts*. Elsevier, 2023.
- ❖ Bianchi-Bosisio, A. "PROTEINS | Physiological Samples." 357-375. Elsevier, 2005.
- ❖ Brassesco, María Emilia, Teresa R.S. Brandão, Cristina L.M. Silva, and Manuela Pintado. *Carob bean (Ceratonia siliqua L.): A new perspective for functional food*. Vol. 114, 310-322. Elsevier, 2021.
- ❖ "Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. "cereal." *Encyclopedia Britannica*, ." . <https://www.britannica.com/topic/cereal>., August 31, 2023.
- ❖ Brufau, Gemma, Josep Boatella, and Magda Rafecas. *Nuts: source of energy and macronutrients*. Vol. 96, S24-S28. 2006.
- ❖ Büyükköroğlu, Gülay, Devrim Demir Dora, Filiz Özdemir, and Candan Hizel. *Techniques for Protein Analysis*. Vol. 1, 317-351. Academic Press, 2018.
- ❖ Cancalon, Paul F. "Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Food Analysis." Wiley, 2000.
- ❖ Chen, Haihong, et al. *Emerging natural hemp seed proteins and their functions for nutraceutical applications*. Vol. 12, 929-941. Elsevier, 2023.
- ❖ Coskun, Ozlem. "Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY." 2016.
- ❖ Dotto, Joachim M., and James S. Chacha. *The potential of pumpkin seeds as a functional food ingredient: A review*. Vol. 10, e00575. Elsevier, 2020.
- ❖ Duranti, Marcello. *Grain legume proteins and nutraceutical properties*. Vol. 77, 67-82. Elsevier, 2006.
- ❖ El Batal, H., A. Hasib, A. Ouatmane, F. Dehbi, A. Jaouad, and A. Boulli. *Sugar composition and yield of syrup production from the pulp of Moroccan carob pods (Ceratonia siliqua L.)*. Vol. 9, S955-S959. Elsevier, 2016.

- ❖ El-Sohaimy, Sobhy Ahmed, Natalia Vladimirovna Androsova, Abduvali Djabarovich Toshev, and Hesham Ali El Enshasy. *Nutritional Quality, Chemical, and Functional Characteristics of Hemp (Cannabis sativa ssp. sativa) Protein Isolate*. Vol. 11, 2825. 2022.
- ❖ Fountoulakis, Michael, and Hans Werner Lahm. *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*. Vol. 826, 109-134. Elsevier, 1998.
- ❖ Friedman, David B., Sjouke Hoving, and Reiner Westermeier. *Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis*. Vol. 463, chap. 30, 515-540. Academic Press, 2009.
- ❖ Gioxari, Aristeia, et al. *Carob: A Sustainable Opportunity for Metabolic Health*. Vol. 11, 2154. 2022.
- ❖ Godbey, W T. "Proteins." 47-72. Academic Press, 2022.
- ❖ Goulding, D. A., Fox, P. F., O'Mahony, J. A. «Milk proteins: An overview.» *Milk Proteins: From Expression to Food*, 2020: 21-98.
- ❖ Ha, Chung Eun, and N.V. Bhagavan. "Three-dimensional structure of proteins and disorders of protein misfolding." 55-81. Academic Press, 2023.
- ❖ J. Derek Bewley, Michael Black, Peter Halmer. «The Encyclopedia of Seeds: Science, Technology and Uses.» 2006.
- ❖ Klein, Jon B., and Mark A. Knepper. *Protein Mass Spectrometry Made Simple*. Vol. 29, 1585-1587. 2018.
- ❖ Kurien, Biji T., and R. Hal Scofield. *Protein Electrophoresis, Methods and Protocols*. Edited by Biji T. Kurien and R. Hal Scofield. Vol. 869. Totowa, NJ: Humana Press, 2012.
- ❖ LAEMMLI, U. K. *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. Vol. 227, 680-685. 1970.

- ❖ Langyan, Sapna, Pranjali Yadava, Fatima Nazish Khan, Zahoor A Dar, Renu Singh, and Ashok Kumar. *Sustaining Protein Nutrition Through Plant-Based Foods*. Vol. 8, 772573. 2021.
- ❖ Li, Dandan, Jia Yi, Guobin Han, and Liang Qiao. *MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research*. Vol. 2, 385-404. 2022.
- ❖ Lupas, Andrei N., and Robert B. Russell. *The Structure of Proteins*. Vol. 179, 14-43. Woodhead Publishing, 2011.
- ❖ Magdeldin, Sameh. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. Edited by Sameh Magdeldin. InTech, 2012.
- ❖ Malik, Amanda Manoj, and Awanish Singh. *Pseudocereals proteins- A comprehensive review on its isolation, composition and quality evaluation techniques*. Vol. 1, 100001. Elsevier, 2022.
- ❖ Maloy, Stanley. *Amino Acids*. Academic Press, 2013.
- ❖ Martínez-Villaluenga, Cristina, Elena Peñas, and Blanca Hernández-Ledesma. *Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current applications for the development of gluten-free foods*. Vol. 137. 2020.
- ❖ Nijtmans, L. *Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes*. Vol. 26, 327-354. 2002.
- ❖ O'Farrell, P. H. *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. Vol. 250, 4007-4021. Elsevier, 1975.
- ❖ Orengo, Christine A., Annabel E. Todd, and Janet M. Thornton. *From protein structure to function*. Vol. 9. Elsevier Current Trends, 1999.
- ❖ Papaefstathiou, Eleni, Agapios Agapiou, Stelios Giannopoulos, and Rebecca Kokkinofa. *Nutritional characterization of carobs and traditional carob products*. Vol. 6, 2151-2161. 2018.
- ❖ Pelley, John W. "Protein Structure and Function." 19-28. Mosby, 2007.

- ❖ Petit, M.D., and J.M. Pinilla. *Production and purification of a sugar syrup from carob pods*. Vol. 28, 145-152. 1995.
- ❖ Rabilloud, Thierry, Céline Adessi, Anne Giraudel, and Joël Lunardi. *Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Vol. 18, 307-316. 1997.
- ❖ Reisinger, Veronika, and Lutz A. Eichacker. "Isolation of Membrane Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis." 423-431. 2008.
- ❖ Revelou, Panagiota-Kyriaki, Marinos Xagoraris, Alexandros Michail, Maroula G. Kokotou, and Violetta Constantinou-Kokotou. "Development of a UPLC-Q-ToF-MS Method for the Determination of Sulforaphane and Iberin in Cruciferous Vegetables." *IECN 2022 (MDPI)*, 3 2022: 24.
- ❖ Righetti, Pier Giorgio, Roberto Sebastiano, and Attilio Citterio. *Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis*. Vol. 13, 325-340. 2013.
- ❖ Sá, Amanda Gomes Almeida, Yara Maria Franco Moreno, and Bruno Augusto Mattar Carciofi. *Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet*. Vol. 97, 170-184. Elsevier, 2020.
- ❖ Schoenlechner, R., K. Jurackova, and E. Berghofer. "PASTA PRODUCTION FROM THE PSEUDOCEREALS AMARANTH, QUINOA AND BUCKWHEAT." 74-81. Woodhead Publishing, 2005.
- ❖ Shen, Chang-Hui. "Quantification and Analysis of Proteins." 187-214. Academic Press, 2019.
- ❖ Shutov AD, Kakhovskaya IA, Braun H, Bäumlein H, Müntz K. "Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain ancestral gene." *Journal of molecular evolution*, 1995: 1057-1069.
- ❖ Sinden, Richard R. *DNA structure and function*. Gulf Professional Publishing, 1994.
- ❖ Skipper, L. "PROTEINS | Overview." 344-352. Elsevier, 2005.

- ❖ Sneha, P., and C. G. Priya Doss. *Molecular Dynamics: New Frontier in Personalized Medicine*. Vol. 102, 181-224. Academic Press, 2016.
- ❖ Srinivasan, Damodaran, and Alain Paraf. *Food proteins and their applications*. CRC Press, 2017.
- ❖ Stephenson, Frank H. *Centrifugation*. Academic Press, 2016.
- ❖ Sudheesh, Cherakkathodi, Zahid Rafiq Bhat, Basheer Aaliya, and Kappat Valiyapeediyekkal Sunooj. *Cereal proteins*. Academic Press, 2022.
- ❖ Sun, Peter D., Christine E. Foster, and Jeffrey C. Boyington. *Overview of Protein Structural and Functional Folds*. Vol. 35. 2004.
- ❖ Tandang-Silvas, Mary Rose G., et al. "Conservation and divergence on plant seed 11S globulins based on crystal structures." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2010: 1432-1442.
- ❖ Tang, Chuanhe. "Nanostructures of soy proteins for encapsulation of food bioactive ingredients." *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*, 2019: 247-285.
- ❖ Trauger, Sunia A., William Webb, and Gary Siuzdak. *Peptide and protein analysis with mass spectrometry*. Vol. 16, 15-28. 2002.
- ❖ U Rutishauser, L Sachs. "Cell-to-cell binding induced by different lectins." *Journal of Cell Biology* , May 01, 1975: 247-257.
- ❖ Welch, R. W. *CEREAL GRAINS*. Elsevier, 2005.
- ❖ Wien, Michelle. *Nut Intake and Health*. Academic Press, 2017.
- ❖ Wilkesman, Jeff, and Liliana Kurz. "Zymography Principles." 3-10. 2017.
- ❖ Wong, J. H. ,Ng, T. B. "Plant Biochemistry: Antifungal Proteins Protecting Plants from Fungal Pathogens." *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 2011: 745-756.

- ❖ Yamamoto, Shuichi, and Eiji Miyagawa. *Dynamic binding performance of large biomolecules such as γ -globulin, viruses and virus-like particles on various chromatographic supports*. Vol. 16, 81-86. Elsevier, 2000.
- ❖ Yousif, Ali K., and H. M. Alghzawi. *Processing and characterization of carob powder*. Vol. 69, 283-287. Elsevier, 2000.
- ❖ Yung, Sunny C., and Joshua M. Farber. *Chemokines*. Academic Press, 2013.
- ❖ Zemouri, Zohra, Abderrezak Djabeur, Noureddine Frimehdi, Omar Khelil, and Meriem Kaid-Harche. *The seed diversity of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) and the relationship between seeds color and coat dormancy*. Vol. 274, 109679. Elsevier, 2020.