

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις θερμότερες ευχαριστίες μας στον καθηγητή του τμήματος τεχνολογίας τροφίμων Dr. Ριζούλη Χρήστο για την πολύτιμη και συνεχή βοήθεια σε κάθε βήμα της πτυχιακής εργασίας μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της εργασίας μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της μυξίνης με μια τυπική πρωτεΐνη, το καζεϊνικό νάτριο, προσομοιώνοντας της συνθήκες του πρώτου τμήματος της πεπτικής οδού, σε pH 1–3 και 7.

Παρασκευάστηκαν διαλύματα μυξίνης καζεϊνικού νατρίου ξεχωριστά και διάλυμα μυξίνης – καζεϊνικού νατρίου σε γνωστές συγκεντρώσεις. Στα διαλύματα μετρήθηκε η απορρόφηση στο ορατό και η εκπομπή φθορισμού με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας και φθορισμομετρίας αντίστοιχα, με σκοπό τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων.

Στο διάλυμα καζεϊνικού νατρίου- μυξίνης παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης της απορρόφησης στο ορατό φως σε pH 2,3-3. Κατά την μέτρηση του φθορισμού στο διάλυμα παρατηρήθηκε αύξηση του μέγιστου μήκους κύματος εκπομπής και αύξηση της έντασης εκπομπής φθορισμού. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι είναι πιθανό να υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο πρωτεϊνών στις συνθήκες αυτές.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
2. Βιβλιογραφική αναφορά.....	5
2.1 Καζεΐνη.....	5
2.1.1. Δομή καζεϊνικού νατρίου.....	5
2.1.2. Καζεϊνικό νάτριο	6
2.1.3. Διαλυτότητα Καζεϊνικού νατρίου	7
2.1.4. Ιξωδες διαλυματων καζεϊνικου νατριου.....	8
2.1.5. Σταθερότητα κατά την θέρμανση	8
2.2 Μυξίνη.....	9
2.2.1 Φυσικές ιδιοτητες της μυξινης σε αραια διαλυματα	11
2.2.2. Κolloειδεις ιδιοτητες της μυξινης	12
2.3 Φασματοφωτομετρία	14
2.4 Φθορισμομετρία	16
3. Πειραματικό Μέρος.....	18
3.1 Σκοπός εργασίας.....	18
3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	19
3.2.1. αντιδραστήρια.....	19
3.2.2. οργανα.....	19
3.2.3. παρασκευή διαλυματων.....	19
3.2.4. μεθοδοι.....	20
4. αποτελεσματα-διαγραμματα-πινακες.....	21
5. συμπερασματα- συζητηση	30
BIBLIOΓΡΑΦΙΑ	31

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρωτεΐνες είναι μακρομοριακές ενώσεις αμινοξέων, ενωμένων μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς. Σε βιολογικά συστήματα, οι πρωτεΐνες εκτελούν ποικίλες λειτουργίες όπως είναι η βιοκατάλυση, χρησιμεύουν ως δομικά στοιχεία των κυττάρων, ως διαβιβαστές πληροφοριών, ως αντισώματα και ως συστατικά του προστατευτικού κυτταρικού τοιχώματος. Αυτή η λειτουργική ποικιλομορφία, η οποία απαιτεί την ικανότητα να παίρνει πολλές μορφές στο χώρο, αποδίδεται κυρίως στη περίπλοκη χημική τους μορφή.

Οι πρωτεΐνες είναι ένα από τα κύρια συστατικά των τροφίμων. Εκτελούν αρκετές κρίσιμες λειτουργίες σε συστήματα τροφίμων που συμβάλουν στις οργανοληπτικές ιδιότητες αυτών. Οι τυπικές λειτουργίες των πρωτεϊνών στα συστήματα τροφίμων περιλαμβάνουν την διόγκωση, την ζελοποίηση, την γαλακτωματοποίηση, την αφριστική ικανότητα, την προσκόλληση, την συνοχή και την συγκράτηση των λιπιδίων και της γεύσης (Srinivasan, 1997).

Αυτές οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών στα τρόφιμα επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς, η ακτινοβολία, το pH, η ενυδάτωση, η διαλυτότητα, οι οργανικοί διαλύτες όπως επίσης από την δομική τους κατάσταση. Ένας από τους στόχους των επιστημόνων που μελετάνε τις πρωτεΐνες των τροφίμων είναι να αναπτύξουν μια θεμελιώδη θεωρία για την κατανόηση της σχέσης δομής – λειτουργίας τους, έτσι ώστε η λειτουργικότητα και οι χρήσεις των πρωτεϊνών να μπορούν να τροποποιηθούν μέσα από φυσικές, χημικές, ενζυμικές και γενετικές τροποποιήσεις.

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΦΟΡΑ

2.1 ΚΑΖΕΪΝΗ

Το γάλα περιέχει 30-36g/L ολικές πρωτεΐνες και είναι πολύ μεγάλης βιολογικής αξίας. Οι πρωτεΐνες γάλακτος ταξινομούνται σε καζεΐνες και σε πρωτεΐνες ορού. Υπάρχουν έξι κύριοι τύποι : α s1-καζεΐνη, α s2-καζεΐνη, β -καζεΐνη, κ -καζεΐνη, β -λακτογλοβουλίνη, α -λακταλβουμίνη. Η κάθε μια από αυτές εμφανίζει γενετικό πολυμορφισμό διότι προέρχεται από συγκυρίαρχα, αλληλόμορφα και αυτοχρωμοσωματικά γονίδια. Όλες οι καζεΐνες είναι συνδεδεμένες με άλατα ασβεστίου με ένα μοναδικό, υψηλά ενυδατωμένο σφαιρικό σύμπλεγμα γνωστό ως μικκύλιο της καζεΐνης. Αυτά τα συμπλέγματα ποικίλουν σε διάμετρο από 30-300nm, και ένα μικρό ποσοστό πλησιάζει τα 600nm (Srinivasan et al, 1996).

2.1.1. ΔΟΜΗ ΚΑΖΕΪΝΙΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

Η καζεΐνη αποτελείται από έναν αρκετά μεγάλο αριθμό αμινοξέων προλίνης, τα οποία είναι μη πολικά. Δεν υπάρχει επίσης καμία γέφυρα δισουλφιδίου. Κατά συνέπεια, έχει σχετικά μικρή αναδίπλωση στο χώρο, δηλαδή ελάχιστη τριτοταγή δομή. Λόγω αυτού, δεν μπορεί να μετουσιωθεί. Είναι σχετικά υδρόφοβο, καθιστώντας το αδιάλυτο στο νερό. Βρίσκεται στο γάλα με μορφή μικκυλίων καζεΐνης. Τα καζεϊνικά μικκύλια διατηρούν την συνοχή τους με τα ιόντα ασβεστίου και τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις. (Dalglish, 1998). Τα μικκύλια ως κolloειδή μόρια, διαμορφώνονται από τα συσσωματώματα καζεΐνης που τυλίγονται επάνω στα διαλυτά μόρια της κ -καζεΐνης.

Το ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης είναι 4,6. Δεδομένου ότι το pH του γάλακτος είναι 6,6, η καζεΐνη έχει αρνητικό φορτίο στο γάλα. Η καθαρή πρωτεΐνη είναι αδιάλυτη στο νερό. Ενώ είναι επίσης αδιάλυτη στα ουδέτερα διαλύματα αλάτων, είναι εύκολα διαλυτοποιήσιμη σε αραιά αλκάλια και στα διαλύματα αλάτων όπως το υδροξείδιο του νατρίου και το οξικό νάτριο.

Το μόριο του καζεϊνικού νατρίου αποτελείται από μη πολικά αμινοξέα όπως είναι η προλίνη, η λευκίνη, η τρυπτοφάνη, από πολικά αμινοξέα όπως η γλυκίνη και η τυροσίνη, όξινα αμινοξέα (ασπαραγινικό οξύ) και βασικά αμινοξέα (λυσίνη, αργινίνη). (Swaisgood, 1996).

2.1.2. ΚΑΖΕΪΝΙΚΟ ΝΑΤΡΙΟ

Τα καζεϊνικά άλατα παράγονται με διάλυση άνυδρης όξινης καζεΐνης τυροπήγματος ή ξηρής σκόνης όξινης καζεΐνης με αλκάλια. Το τελικό pH του προϊόντος είναι συνήθως 6,7 . Το πιο κοινό προϊόν είναι το καζεϊνικό νάτριο, στο οποίο το υδροξείδιο του νατρίου χρησιμοποιείται για την διάλυση. Μετά την διάλυση του, το καζεϊνικό νάτριο ξηραίνεται σε ξηραντήρα εκνέφωσης (spray-drier). Το προκύπτον προϊόν είναι τυπικά μια λευκή σκόνη, η οποία είναι ευδιάλυτη στο νερό (Munro, 2004).

Οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες, υδροδυναμικές οι οποίες περιλαμβάνουν την απορρόφηση του νερού, διαλυτοποίηση, ιξώδες και ζελοποιητική ικανότητα, και επιφανειοδραστικές ιδιότητες όπως είναι η γαλακτωματοποίηση, αφριστική ικανότητα και σχηματισμός υμενίου. Οι λειτουργικές ιδιότητες των καζεϊνών ποικίλουν ανάλογα με το pH, την θερμοκρασία, την ιοντική ισχύ και την συγκέντρωση του ασβεστίου και άλλων πολυσθενών ιόντων, ζαχάρων και υδροκολλοειδή. (Singh, 2002).

2.1.3. ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΚΑΖΕΪΝΙΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών γάλακτος εξαρτάται από την χημική φύση των πρωτεϊνών, στην επεξεργασία που υπόκεινται, pH, θερμοκρασία και την συγκέντρωση των ιόντων στο διάλυμα. Γενικά, υψηλή θερμοκρασία κατά την διαδικασία παραγωγής έχει σαν αποτέλεσμα χαμηλή διαλυτότητα της πρωτεΐνης στο τελικό προϊόν. Τα άλατα ενισχύουν την διαλυτότητα μέχρι ένα σημείο και μετά την μειώνουν. Το pH επηρεάζει το φορτίο και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων των πρωτεϊνών. Πάνω και κάτω του ισοηλεκτρικού σημείου οι πρωτεΐνες έχουν είτε αρνητικό είτε θετικό φορτίο και ενισχύουν την διαλυτότητα. Στο ισοηλεκτρικό σημείο ελκτικές δυνάμεις υπερισχύουν προκαλώντας τα μόρια της πρωτεΐνης να κροκιδωθούν, με αποτέλεσμα την απώλεια της διαλυτότητας. Τα καζεϊνικά άλατα έχουν εξαιρετική διαλυτότητα σε pH πάνω από 5,5. 10-15% διάλυμα καζεϊνικού νατρίου μπορεί εύκολα να διαλυθεί σε pH 6,0-7,0. (Singh, 2002)

2.1.4. ΙΞΩΔΕΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΚΑΖΕΪΝΙΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

Το ιξώδες των διαλυμάτων του καζεϊνικού νατρίου αυξάνουν εκθετικά με την συγκέντρωση της καζεΐνης, σε συγκεντρώσεις πάνω από 15%, τα καζεϊνικά διαλύματα παρουσιάζουν ψευδοπλαστικότητα, η οποία δυσκολεύει την επεξεργασία του. Σε τιμές θερμοκρασιών 25-60°C, το ιξώδες ενός καζεϊνικού διαλύματος σχετίζεται λογαριθμικά με την αντίστοιχη απόλυτη θερμοκρασία. (Munro, 2002).

Το φαινομενικό ιξώδες του διαλύματος καζεϊνικού νατρίου εξαρτάται από pH, με ένα ελάχιστο σε pH 7. Η προσθήκη ασβεστίου προκαλεί σημαντικές αλλαγές στα διαλύματα καζεϊνικού νατρίου αλλά το αποτέλεσμα εξαρτάται από το pH, την θερμοκρασία και την συγκέντρωση της πρωτεΐνης. (Singh, 2002)

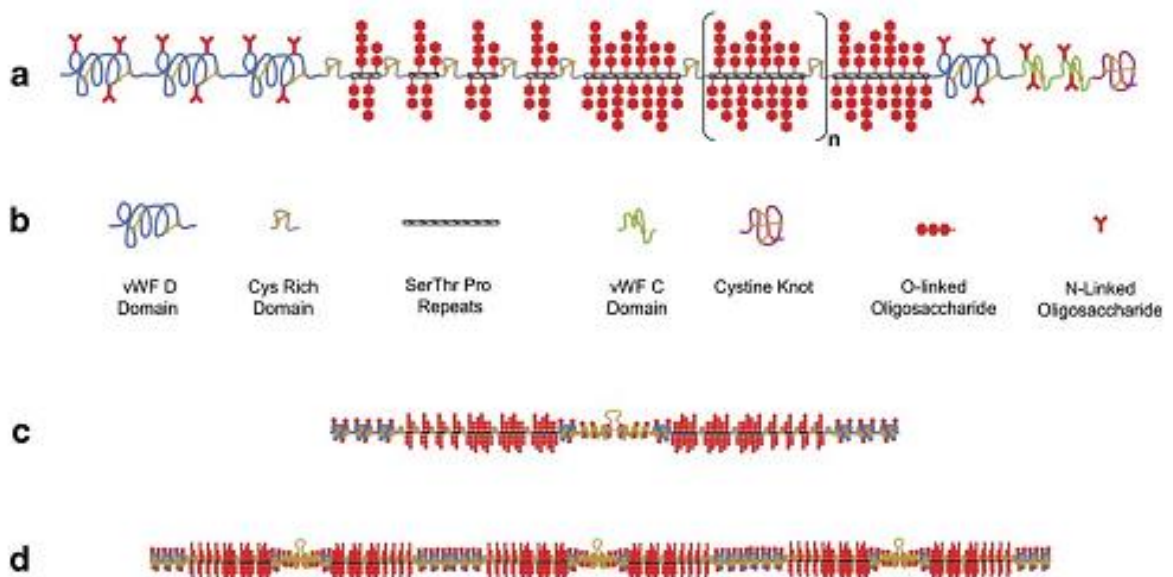
Το καζεϊνικό ασβέστιο έχει ένα σχετικά χαμηλό ιξώδες το οποίο μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και αυξάνεται πάνω από το pH 7. Διαλυτοποιημένα ιζήματα τείνουν να είναι πιο ιξώδη από ότι το καζεϊνικό νάτριο. (Singh, 2002)

2.1.5. ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΘΕΡΜΑΝΣΗ

Τα μικκύλια της καζεΐνης στο γάλα και τα υδατικά διαλύματα καζεϊνικού νατρίου είναι σταθερά στη επίδραση της θερμοκρασίας, 3% διαλύματος καζεϊνικού νατρίου σε pH 7 μπορούν να θερμανθούν στους 140°C για 60 λεπτά, ενώ το αποβουτυρωμένο γάλα είναι συνήθως σταθερό στους 140°C για 20 λεπτά σε pH 6,7. Το καζεϊνικό ασβέστιο που περιέχει 1,5 % ασβέστιο δεν είναι σταθερό στην επίδραση της θερμότητας, με την συσσωμάτωση και την κροκίδωση να εμφανίζονται σε θερμοκρασίες πάνω από τους 45°C. Προφανώς, το καζεϊνικό νάτριο ή το αποβουτυρωμένο γάλα είναι κατάλληλο για χρήση σε προϊόντα όπου η θερμική χρήση είναι υποχρεωτική (Singh, 2004).

2.2 ΜΥΞΙΝΗ

Η βλέννα αποτελείται κυρίως από νερό (95%) αλλά επίσης περιέχει άλατα, λιπίδια όπως είναι τα λιπαρά οξέα, τα φωσφολιπίδια και χοληστερόλη, πρωτεΐνες οι οποίες εξυπηρετούν αμυντικούς σκοπούς όπως είναι οι λυσοζύμες, ανοσοσφαιρίνες και παράγοντες ανάπτυξης. Ωστόσο το κύριο συστατικό που είναι υπεύθυνο για τις ιξώδης και ελαστικές ιδιότητες που ομοιάζουν με πηκτή είναι η γλυκοπρωτεΐνη μυξίνη.



Σχ. 1 (a) Σχηματική απεικόνιση της γαστρικής μυξίνης χοίρου (PGM), (b) απεικόνιση των συμβόλων που αναπαριστούν τις διαφορετικές περιοχές στο σχήμα (a), (c), (d) απεικόνιση μονομερών μορίων μυξίνης που συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. (www.sciencedirect.com, Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. Bansil et al. 2006)

Οι μυξίνες είναι πολυμερείς γλυκοπρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους ($>10^6$ Da) με μεγάλο εύρος τιμών, είναι συστατικό της βλέννας και καλύπτει τις επιφάνειες των επιθηλιακών κυττάρων. Οι μυξίνες είναι υπεύθυνες για την προστασία των κυττάρων, λόγω του ιξωδοελαστικού βλεννώδους ιστού. Η προστατευτική λειτουργία του βλεννώδους στρώματος είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για το στομάχι κατά την διάρκεια της πέψης, όπου το pH του στομάχου είναι 1-2 ενώ το pH του οισοφάγου είναι περίπου 7 (Maleki et al, 2007).

Τα μόρια της μυξίνης αποτελούνται από μια κύρια πολυπεπτιδική αλυσίδα στην οποία συνδέονται ακτινικά οι αλυσίδες των ολιγοσακχαριτών και οι περιοχές που έχουν υποστεί γλυκόλυση είναι πλούσιες σε σερίνη ή θρεονίνη, οι οποίες συνδέονται με τους ολιγοσακχαρίτες μέσω των N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη και N-ακέτυλο-γαλακτοζαμίνη. Οι περιοχές που δεν έχουν υποστεί γλυκόλυση, οποίες κανονικά περιέχουν και τα δύο άκρα αμινο-τελικό και καρβονυλο-τελικό, περιέχουν μεγάλο αριθμό κυστεΐνης και φορτισμένα αμινοξέα. Το ηλεκτρικό φορτίο της μυξίνης σχετίζεται με τα φορτία μέσα στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, για παράδειγμα, υπολείμματα γλουταμινικού και ασπαρτικού οξέος ($pK_{a\approx 4}$) καθώς επίσης στις πλευρικές αλυσίδες των ολιγοσακχαριτών, για παράδειγμα υπολείμματα σιαλικού οξέος ($pK_{a\approx 2,6}$) και σουλφιδικές ομάδες ($pK_{a\approx 1}$). Οι ιδιότητες της μυξίνης σε υδατικά διαλύματα εξαρτώνται από την αλληλεπίδραση κυρίως των ηλεκτροστατικών απωστικών και υδροφοβικών δυνάμεων.

Αποδεικνύεται ότι οι αλλαγές στο pH επηρεάζουν τον ιονισμό του σιαλικού οξέος και των αμινοξέων στη πεπτιδική αλυσίδα της μυξίνης, φορτίζοντας τα μόρια της μυξίνης αρνητικά πάνω από αυτό το pH και η πυκνότητα του φορτίου της μυξίνης αυξάνεται όσο αυξάνεται το pH. Το pH παίζει σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μυξίνης – μυξίνης οι οποίες οδηγούν στην ένωση τους και στο σχηματισμό πηκτής. Ωστόσο υπάρχει έλλειψη μελετών που ασχολούνται συστηματικά με την δομή, την δυναμική και ρεολογική συμπεριφορά της μυξίνης πάνω σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH. (Maleki, 2007)

2.2.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΜΥΞΙΝΗΣ ΣΕ ΑΡΑΙΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

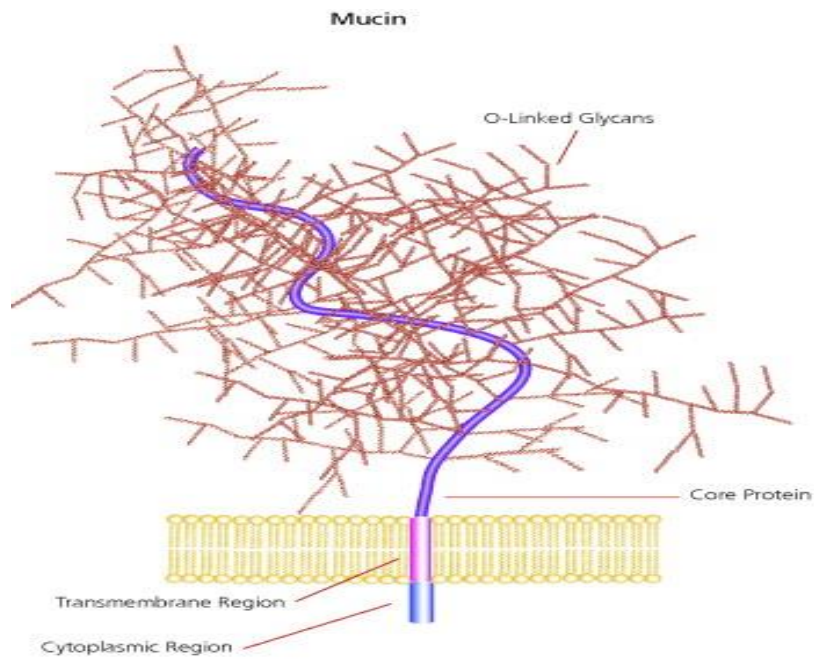
Η μυξίνη είναι δύσκολο να χαρακτηριστεί λόγω του υψηλού μοριακού της βάρους, της πολυδιασποράς της και του μεταβλητού βαθμού γλυκόλυσης. Οι Bansil et al, (1995) και Harding (1989) σε πρόσφατες μελέτες έδειξαν, με την μέθοδο της σκέδασης φωτός, ότι η μυξίνη είναι μια τυχαία σπείρα με ακτίνα περιστροφής 100nm και οι Fiabrig et al, (1995) σε έρευνές του ανέφερε ότι η γαστρική μυξίνη από χοίρους (PGM) έχει μήκος 400nm. Σε πιο πρόσφατες μελέτες δυναμικής ατομικής μικροσκοπίας (AFM) σε μυξίνες που προέρχονται από οφθαλμούς βρέθηκαν ξεχωριστές ίνες με μεγάλη κατανομή μήκους. Ενώ το μήκος των περισσότερων ήταν 200-600nm η κατανομή εκτείνονταν έως και 1500nm. Ο Deacon et. al. (2000) παρατήρησαν μεγαλύτερες ίνες μέχρι και 2μm σε PGM.

Η διαμόρφωση στο χώρο της μυξίνης εξαρτάται από παράγοντες όπως το pH και η ιοντική ισχύς. Για παράδειγμα μελέτες δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) σε αραιά διαλύματα (<5 gr/ml) PGM έδειξαν ότι καθώς το pH ελαττώνεται αυτή υφίσταται αλλαγές στη διαμόρφωση της. Συγκεκριμένα από μια ισοτροπική τυχαία έλικα (με μήκος 390nm) σε pH 7 παρατηρείται μια νέα μη ισοτροπική εκτεταμένη τυχαία έλικα (με μήκος 490nm) σε pH 2. Μετρήσεις στο ζήτη δυναμικό της μυξίνης και απέδειξαν ότι το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι μεταξύ 2 και 3, (R.Bansil, B.S. Turner, 2006)

2.2.2. ΚΟΛΛΟΕΙΔΕΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΜΥΞΙΝΗΣ

Οι μυξίνες έχουν την τάση για συσσωμάτωση και τον σχηματισμό πηκτής. Οι Taylor et. al. (2003) χρησιμοποίησαν ρεολογικές τεχνικές για να μελετήσει την δομή και τον σχηματισμό της πηκτής PGM και έδειξαν ότι συνδιασμός μόνιμων και παροδικών αλληλεπιδράσεων ευθύνονται για την διατήρηση του πλέγματος πηκτής (matrix). Σχηματισμός πηκτής επίσης παρατηρήθηκε σε μυξίνη προερχόμενη από το υπογνάθιο κύνου σε διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης (McCullagh, 1996). Εφόσον οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις αποσταθεροποιούνται από την υδροχλωρική γουανιδίνη ο σχηματισμός πηκτής σε υψηλού μοριακού βάρους κλάσματα εμπεριέχουν την αλληλοδιείσδυση των υδατανθρακικών πλευρικών αλυσίδων.

Ο Bhaskar et. al. απέδειξε μια αντιστρεπτή αύξηση στο ιξώδες σε υδατικά διαλύματα PGM σε pH 2. Μελέτες με DLS έδειξαν ότι σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10 mg/ml σχηματίζεται πηκτή σε pH κάτω από 4. Επίσης σε χαμηλά pH παρατηρήθηκε αύξηση στην υδροφοβικότητα του πρωτεϊνικού πυρήνα της PGM όπως αποδείχτηκε με την αύξηση της δέσμευσης της φθορίζουσας υδροφοβικής χρωστικής 1-ανιλινοναφθυλ-8- σουλφονικό οξύ (ANS). Εικόνες (AFM) επιβεβαιώνουν ότι ενώ η PGM υπάρχει σαν ξεχωριστό μόριο σε pH 6 (μήκους περίπου 400nm), σχηματίζει συσσωματώματα σε pH χαμηλότερα από 4. Το ιξώδες αυξάνεται και ο σχηματισμός πηκτής δεν παρατηρείται εάν το μόριο της PGM έχει διασπαστεί ενζυμικά ή αν έχει αυξηθεί η συγκέντρωση των αλάτων. (Bansil, et al, 2006)



Σχ. 2. Απεικόνιση της δομής του μορίου της Μυξίνης. (<http://www.sigmaaldrich.com>)

2.3 ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

Αρχή λειτουργίας

Η φασματοφωτομετρία απορρόφησης είναι μία αναλυτική τεχνική πολύ χρήσιμη, όχι μόνο για ποσοτική ανάλυση αλλά και για την λήψη βασικών πληροφοριών που αφορούν στη δομή των μορίων.

Κάποια μόρια όταν ακτινοβοληθούν, απορροφούν μέρος της ακτινοβολίας σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Όσο περισσότερα μόρια υπάρχουν στην δέσμη του φωτός, τόσο περισσότερο φως απορροφάται. Άρα μετρώντας την διαφορά της ποσότητας του φωτός, με και χωρίς τα προς μέτρηση μόρια μπορεί να εκτιμηθεί η ποσότητά τους.

Η φασματοφωτομετρία στηρίζεται στο νόμο των Lambert-Beer, ο οποίος ορίζει ότι η σχέση μεταξύ των εντάσεων της ακτινοβολίας που προσπίπτει σε διάλυμα μιας ουσίας (I_0) και εκείνης που το διαπερνά χωρίς να απορροφηθεί (I) είναι ανεξάρτητη από την απόλυτη τιμή της έντασης της ακτινοβολίας και εξαρτάται από το πάχος της στιβάδας του διαλύματος (d) και τη συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα (C).

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon C d} \quad \text{ή} \quad \log I / I_0 = -\epsilon C d$$

Η σταθερά ϵ ονομάζεται μοριακός συντελεστής απορρόφησης της ουσίας για ορισμένο μήκος κύματος και εκφράζει την απορροφητικότητα διαλύματος 1M της ουσίας που έχει πάχος στοιβάδας 1cm.

Από το νόμο των Lambert-Beer προκύπτει ότι για ορισμένο μήκος κύματος και για σταθερό πάχος στοιβάδας η απορροφητικότητα είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος (Πολυχρονιάδου, 1996).

Η πιο απλή μορφή φασματοφωτόμετρου είναι το φασματοφωτόμετρο ορατού φάσματος (Vis από το Visible). Σε αυτό η πηγή είναι μια κοινή λάμπα πυρακτώσεως. Το σύστημα διαχωρισμού είναι ένα κοινό πρίσμα ή συνηθέστερα ένα περιθλαστικό φράγμα το οποίο απομονώνει την επιθυμητή μονοχρωματική ακτινοβολία (μια συχνότητα ορατή σαν κόκκινο, πράσινο, κίτρινο κλπ φως). Η ακτινοβολία αυτή περνάει μέσα από μια κυψελίδα που περιέχει το προς εξέταση δείγμα και όσο φως δεν απορροφά το διάλυμα μετρείται από ένα κοινό φωτόμετρο που βρίσκεται από την απέναντι πλευρά της κυψελίδας.

Τα βασικά μέρη ενός φασματοφωτόμετρου:

1. Η λυχνία παραγωγής φωτός (εκπομπέας φωτός). Χρησιμοποιούνται διάφορες λυχνίες ανάλογα με το φάσμα του φωτός (UV, Vis, IR) που θέλουμε να παράγουμε (προσπίπτουσα ακτινοβολία P_0).
2. Το όργανο απομόνωσης μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που θα διέλθει από το διάλυμα πρέπει να έχει συγκεκριμένο μήκος κύματος τέτοιο ώστε να απορροφάται από την ουσία που μελετάται. Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση ειδικών οργάνων όπως είναι οι α) μονοχρωμάτορες, β) φίλτρα γ) πρίσματα και δ) φράγματα περιθλάσεως.
3. Κυψελίδες. Οι κυψελίδες είναι μικρά γυάλινα κυλινδρικά ή ορθογώνια σωληνάρια μέσα στα οποία τοποθετείται το υπό μελέτη διάλυμα. Είναι συγκεκριμένου πάχους και διαμέτρου και κατασκευάζονται από διάφορα υλικά (όχι μόνο γυαλί) ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μήκος κύματος. Οι κυψελίδες πρέπει να διατηρούνται σχολαστικά καθαρές αφού η παραμικρή ακαθαρσία θα επηρεάσει σημαντικά τη μέτρηση.
4. Φωτοκύτταρο (ανιχνευτής φωτός). Είναι το όργανο που μετράει την ένταση της ακτινοβολίας που διέρχεται μέσα από το διάλυμα.



Σχ.3.Φασματοφωτόμετρο UV-Vis , Helios Alpha
(www.thomasci.com)

2.4 ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

Αρχή λειτουργίας

Σύμφωνα με τον νόμο του Stokes οι μεταπτώσεις ηλεκτρονίων απαιτούν για την διέγερσή τους περισσότερη ενέργεια από όση ελευθερώνεται πάλι υπό μορφή ακτινοβολίας : εξαιτίας αυτού το φάσμα φθορισμού είναι μετατοπισμένο προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης. Αν τα ηλεκτρόνια από την S_1 και το επίπεδο ταλάντωσης μηδέν επιστρέψουν στην S_0 τότε το επίπεδο συμμετρίας βρίσκεται μεταξύ του φάσματος διέγερσης και φθορισμού (μετάβαση 0-0). Η απορρόφηση υπακούει στον νόμο των Lambert και Beer. Για την ένταση του φθορισμού ισχύει: $I = \epsilon \cdot I_0 \cdot Q \cdot K$. Η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη προς την ένταση του απορριφθέντος φωτός (όπου Q: κβαντική απόδοση, ϵ : συντελεστής απορρόφησης και K: σταθερά του οργάνου). (G.Schwedt, 1996)

Διάταξη φθορισμόμετρου

Σε αντιδιαστολή με την φωτομετρία, στο φθορισμόμετρο μετράται η ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού (εκπομπής) κάθετα προς την διεύθυνση της ακτινοβολίας διέγερσης. Προκειμένου να απομακρυνθούν κατάλοιπα του φωτός διέγερσης (διάχυτο φως), πριν από την μέτρηση του φθορισμού, τοποθετείται μονοχρωμάτορας εκπομπής. Ως πηγές φωτός χρησιμοποιούνται κατά το πλείστον λυχνίες εκκένωσης αερίων υπό υψηλή πίεση με όσο το δυνατό σταθερή ένταση ακτινοβολίας ενώ ως δείκτης χρησιμοποιείται φωτοπολλαπλασιαστής.

Η ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή φωτός διέρχεται από ένα πρωτογενές φίλτρο (φίλτρο διεγέρσεως), το οποίο επιτρέπει την διόδο μόνο εκείνου του τμήματος της δέσμης φωτός, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την διέγερση των μορίων. Η ακτινοβολία φθορισμού εκπέμπεται από το δείγμα προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ακτινοβολία φθορισμού εκπέμπεται από ένα δευτερογενές φίλτρο (φίλτρο φθορισμού), το οποίο επιτρέπει την διόδο μικρού τμήματός της (από την μία και από την άλλη μεριά της κορυφής της ταινίας φθορισμού) και προσπίπτει στον ανιχνευτή (φωτοπολλαπλασιαστή). Το σήμα εξόδου το ενισχύεται και παρουσιάζεται σε ένα όργανο μετρήσεως (αναλογικό ή ψηφιακό μετρητή, καταγραφέα ή παλμογράφο).

Τα μήκη κύματος της διέγερσης και του φθορισμού καθώς και η ένταση του φθορισμού συσχετίζονται σε τρισδιάστατο φάσμα φθορισμού. Στην πράξη το μήκος κύματος της διέγερσης διατηρείται σταθερό και απεικονίζεται το φάσμα φθορισμού (εκπομπής). (G.Schwedt, 1996)

Η φθορισμομετρία χρησιμοποιείται για την μελέτη της αλλαγής στη διαμόρφωση της δομής των πρωτεϊνών που περιέχουν στο μόριο τους τα αμινοξέα Τρυπτοφάνη και Τυροσίνη, τα οποία έχουν την τάση να φθορίζουν όταν ακτινοβοληθούν με μονοχρωματική ακτίνα συγκεκριμένου μήκους κύματος. Η αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης γίνεται αντιληπτή με την μεταβολή της έντασης της εκπομπής φθορισμού και του μέγιστου μήκους κύματος εκπομπής.



Σχ. 4. Φθορισμόμετρο RF-1501 Shimadzu (www.shimadzu.eu)

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις μιας γλυκοπρωτεΐνης (μυξίνη) και μιας τυπικής πρωτεΐνης που συναντάται στα τρόφιμα (καζεϊνικό νάτριο) προσομοιώνοντας τις συνθήκες του πεπτικού συστήματος. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης έγινε με φασματοφωτομετρία ορατού και φθορισμοφωσφορομετρία.

Στόχος της μελέτης είναι ο προσδιορισμός της συμπεριφοράς της μυξίνης (ως τυπικής γλυκοπρωτεΐνης της πεπτικής οδού) με τις πρωτεΐνες των τροφίμων και η διεξαγωγή συμπερασμάτων ώστε να βελτιωθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων, καθώς επίσης και η αλλαγή στη δομή των πρωτεϊνών ανάλογα με τις αλλαγές του pH.

3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Χρησιμοποιήθηκε καζεϊνικό νάτριο της γαλακτοβιομηχανίας Μεβγαλ και μυξίνη από στομάχι χοίρου (Pig Gastric Mucin) της εταιρίας Sigma Type III, bound sialic acid 0.5-1.5 %.

3.2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Κιτρικό οξύ ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) , 99,5-100,5 % Merck
- Ρυθμιστικό Tris Buffer
- Νατραζίδιο 99% , Riedel-deHaën
- NaOH >97%, Carlo Erba reagent
- HCl 37% v/v , Carlo Erba reagent.

3.2.2. ΟΡΓΑΝΑ

- Φασματοφωτόμετρο, Helios Alpha Spectrophotometer, Thermo Electron Corporation
- Φθορισμόμετρο, RF-1501 Shimadzu Spectrofluorophotometer
- Πεχάμετρο , Thermo Electron Corporation
- Μαγνητικό αναδευτήρα

3.2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέως (Buffer) ζυγίστηκαν 2,1gr κιτρικού οξέως, διαλύθηκαν σε φιάλη ενός λίτρου και έγινε η ρύθμιση του pH στο 3 και 1 με την χρήση των αντιδραστηρίων υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) και υδροχλωρικού οξέως (HCl).

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος Tris ζυγίστηκαν 1,25 gr Tris, διαλύθηκαν σε φιάλη ενός λίτρου και ρυθμίστηκε το pH στο 7 με την χρήση των NaOH και HCl. Και στα δύο ρυθμιστικά διαλύματα προστέθηκε μικρή ποσότητα τριζιδίου.

Για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος καζεΐνης ζυγίστηκαν 0,4 gr καζεϊνικού νατρίου και διαλύθηκαν σε 100ml Buffer με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, κατόπιν έγιναν επιθυμητές αραιώσεις.

Για την παρασκευή του αρχικού διαλύματος μυξίνης ζυγίστηκαν 0,1 gr PGM και διαλύθηκαν σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος με την βοήθεια του μαγνητικού αναδευτήρα.

Οι τελικές συγκεντρώσεις που προέκυψαν για το διάλυμα καζεϊνικού νατρίου – PGM ήταν 0,035% και 0,05% αντίστοιχα για την μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο και 0,000625% και 0,0025% αντίστοιχα για την μέτρηση της εκπομπής στο φθορισμόμετρο.

3.2.4. ΜΕΘΟΔΟΙ

Μετρήθηκε η απορρόφηση με την χρήση του φασματοφωτόμετρου, του διαλύματος καζεϊνικού νατρίου-μυξίνης σε εύρος τιμών pH 1-7. Η μέτρηση έγινε στα 500nm, διότι σε αυτό το μήκος κύματος το καζεϊνικό και η μύξινη παρουσιάζουν το μέγιστο της απορρόφησης.

Μετρήθηκε η εκπομπή με την χρήση του φθορισμόμετρου σε εύρος τιμών μήκους κύματος από 280nm μέχρι τα 450nm, του διαλύματος καζεϊνικού νατρίου – μυξίνης σε εύρος τιμών pH 1-3 και 7. Η Τυροσίνη και η τρυπτοφάνη απορροφούν στα 290 nm και επειδή το φάσμα φθορισμού μετατοπίζεται προς λίγο μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης, επιλέχθηκαν αυτές οι τιμές.

Η φασματοφωτομετρία είναι μια απλή και γρήγορη μέθοδος για την ποιοτική ανάλυση διαλυμάτων και μπορούν να ληφθούν χρήσιμες πληροφορίες για την δομή των προς ανάλυση διαλυμάτων. Η φθορισμομετρία χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική μέθοδος και αποσκοπεί, όπως και η φασματοφωτομετρία, στη συλλογή πληροφοριών για την δομή των πρωτεϊνών.

Το κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις φορές σε κάθε τιμή pH και στις δύο μεθόδους. Η αλλαγές του pH των διαλυμάτων για τις μετρήσεις έγιναν με την χρήση NaOH και HCl.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ-ΠΙΝΑΚΕΣ

Καθορισμός της συγκέντρωσης καζεϊνικού νατρίου και μυξίνης

Στο σχήμα 5 παριστάνονται γραφικά οι τιμές των απορροφήσεων του διαλύματος καζεΐνης – PGM, σε pH 1,3 και 7. Στα διαλύματα η συγκέντρωση του PGM παραμένει σταθερή στο 0,05% ενώ η συγκέντρωση της καζεΐνης μεταβάλλεται.

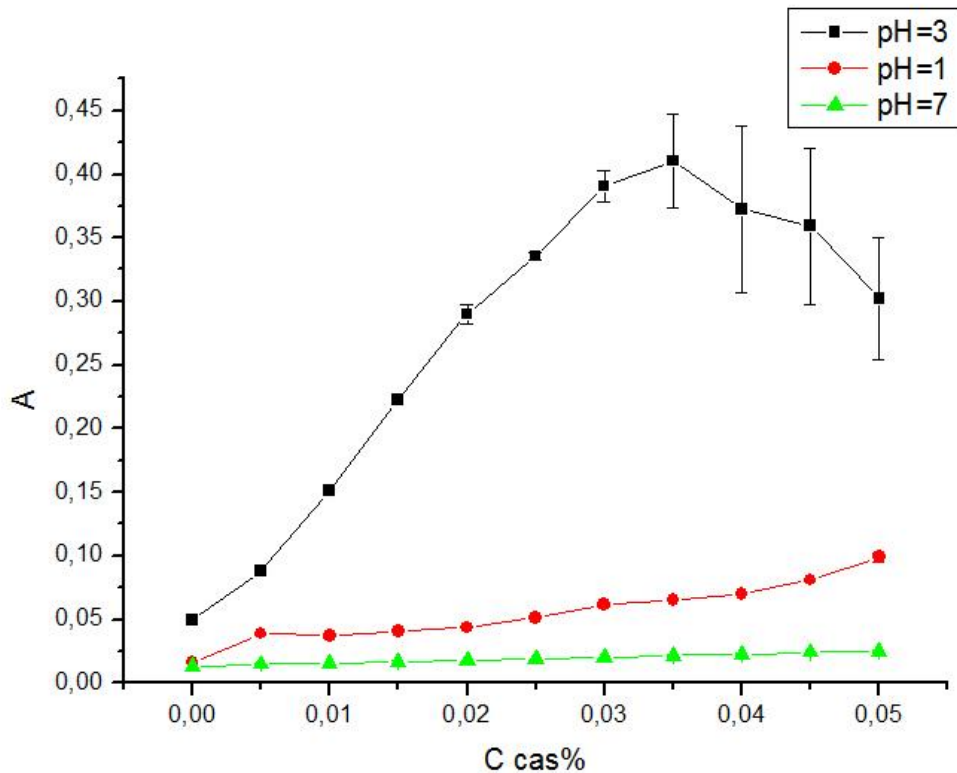
Έγιναν μετρήσεις καθαρής μυξίνης συγκέντρωσης 0,05% και οι τιμές απορρόφησης που μετρήθηκαν σε pH 1, 3 και 7 είναι: 0,016, 0,049 και 0,013 αντίστοιχα. Το παραπάνω δείχνει ότι η καθαρή μυξίνη σε αυτή τη συγκέντρωση δεν κροκιδώνεται. Έγιναν επίσης μετρήσεις καθαρού καζεϊνικού νατρίου συγκέντρωσης από 0,1 μέχρι 0,01% σε pH 1, 3 και 7 παίρνοντας σχεδόν μηδενικές τιμές απορρόφησης σε pH 3 και 7 και παρουσιάζοντας ένα μέγιστο στην απορρόφηση 0,180 σε συγκέντρωση 0,1% και pH 1, κάτι το οποίο θα πρέπει να μελετηθεί ξεχωριστά.

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι το διάλυμα με συγκέντρωση καζεΐνης 0,035% παρουσιάζει μέγιστο στα 500nm, οπότε στα περαιτέρω πειράματα χρησιμοποιείται η συγκεκριμένη συγκέντρωση καζεΐνης, διότι σε αυτές τις συγκεντρώσεις τα καζεϊνικά άλατα με τα μόρια του PGM παρουσιάζουν τις ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους.

Στο διάγραμμα παρατηρείται ότι η απορροφήσεις σε pH 1 και 7 των διαλυμάτων καζεΐνης-PGM είναι ελάχιστες σε αντίθεση με την απορρόφηση σε pH 3.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών εξαρτώνται κυρίως από την συγκέντρωσή τους, το pH και την ιοντική ισχύ. Παρατηρήθηκε ότι στο pH 3 αυξάνεται γραμμικά η απορρόφηση του διαλύματος μέχρι την συγκέντρωση 0,035% σε καζεϊνικό νάτριο σε pH 1 και 7 η απορρόφηση είναι πολύ μικρότερη. Αυτό συμβαίνει διότι σε τιμές pH 1 και 7 οι πρωτεΐνες δεν κροκιδώνονται. Γνωρίζοντας ότι τα ισοηλεκτρικά σημεία της καζεΐνης είναι 4,6 και της μυξίνης μεταξύ 2 και 3, σε υδατικό διάλυμα με pH 3 τα μόρια των πρωτεϊνών είναι αντίθετα φορτισμένα με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους δημιουργώντας συσσωματώματα παρουσιάζοντας έτσι μια αύξηση στην απορρόφηση του διαλύματος καζεΐνης – μυξίνης. Η μείωση που παρουσιάζεται στην απορρόφηση σε pH 3 κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του καζεϊνικού νατρίου πάνω από την συγκέντρωση 0,035% είναι πιθανόν να οφείλεται στη καθίζηση των συσσωματωμάτων, λόγω

αύξησης του μεγέθους τους. Για περισσότερες πληροφορίες πρέπει να γίνουν μετρήσεις του μεγέθους των σωματιδίων.



Σχ.5. Απορρόφηση του διαλύματος καζεΐνης – PGM. Με σταθερή συγκέντρωση PGM 0,05%, σε pH 1, 3 και 7

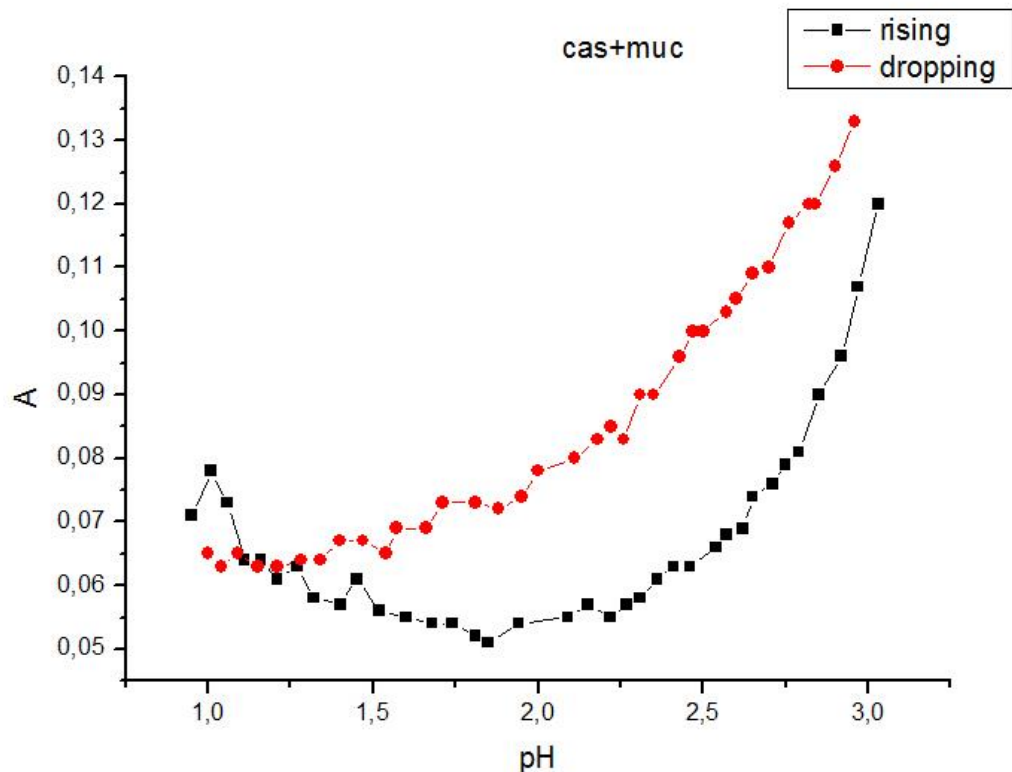
Στο σχήμα 6 παριστάνεται η απορρόφηση σε ένα εύρος τιμών pH από 1 έως 3 στο διάλυμα καζεΐνης-PGM με συγκεντρώσεις 0,035% και 0,05% αντίστοιχα.

Σε τιμές pH από 1 μέχρι 2,3 η απορρόφηση του δείγματος καζεΐνης - PGM δεν παρουσιάζει μεγάλη αλλαγή και το διάλυμα είναι σχεδόν διαυγές, αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η δύο πρωτεΐνες βρίσκονται σε διάσταση διότι έχουν το ίδιο (θετικό) φορτίο.

Από το pH 2,3 μέχρι 3 παρατηρείται σταδιακά αύξηση της απορρόφησης η οποία πιθανό να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των PGM και καζεΐνης. Σε τιμές pH από 2,3 έως 4,6 το καζεϊνικό νάτριο

και η μυζίνη είναι φορτισμένες θετικά και αρνητικά αντίστοιχα, με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Το συμπέρασμα αυτό διεξάγεται από τις τιμές της απορρόφησης οι οποίες αυξάνονται με την αύξηση του pH.

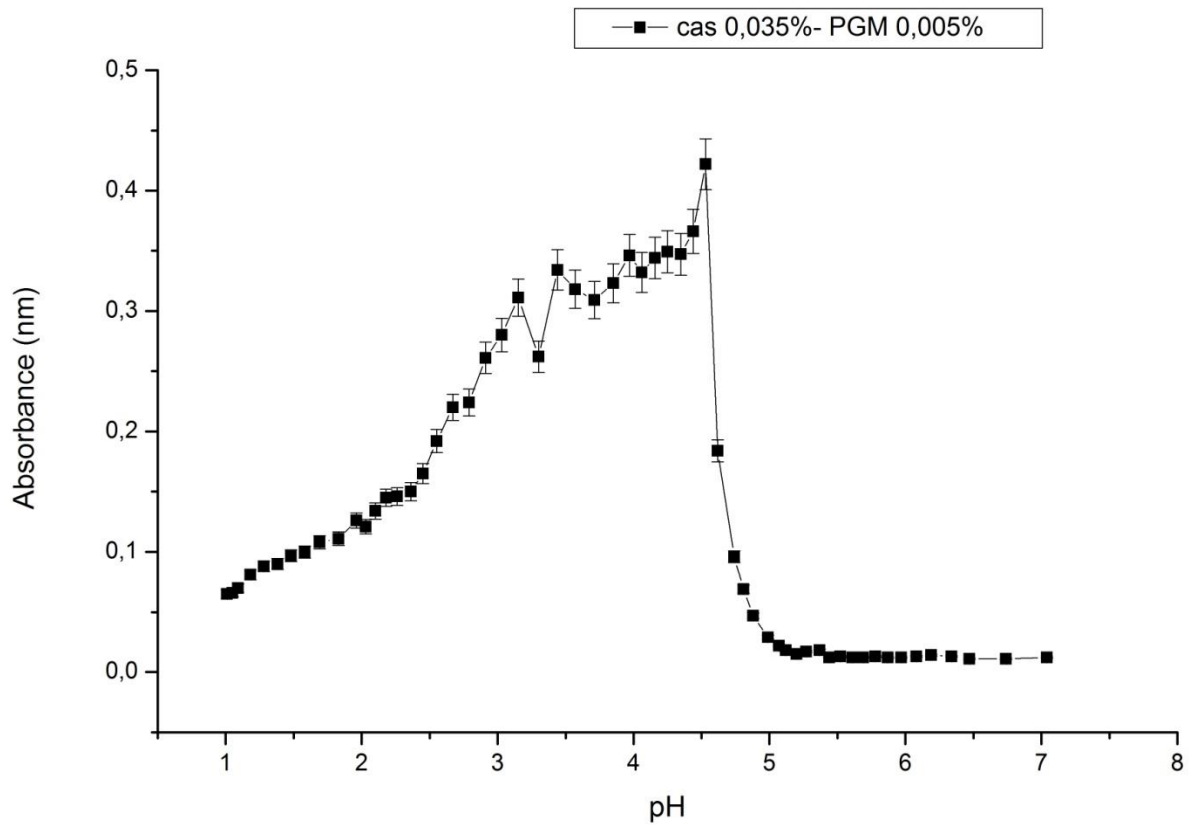
Η διαφορά στις καμπύλες απορρόφησης κατά την μεταβολή του pH είναι πιθανό να οφείλεται στην αλλαγή της αρχικής συγκέντρωσης του διαλύματος λόγω προσθήκης διαλυμάτων οξέων και βάσεων για την συνεχή τιτλοδότηση του δείγματος.



Σχ.6. Απορρόφηση του διαλύματος καζεΐνης – PGM με αυξομείωση του pH από 1-3.

Επίσης έγιναν μετρήσεις σε τιμές pH από 1 έως 7 (σχήμα 7) και παρατηρήθηκε μέγιστο στην απορρόφηση σε pH περίπου 4,5 και σταδιακή ελάττωση της απορρόφησης έως το pH 7. Στο μέγιστο της απορρόφησης (pH ~4,5) παρατηρήθηκαν μεγάλα συσσωματώματα στο διάλυμα, τα οποία με την πάροδο του χρόνου καθίζαναν. Αυτό πιθανό να οφείλεται στη συσσωμάτωση του καζεϊνικού νατρίου στο ισοηλεκτρικό του σημείο. Η χαμηλή απορρόφηση που βρέθηκε σε pH>4,5, πιθανώς να

οφείλεται στο ότι οι δύο πρωτεΐνες (καζεΐνη – PGM) ήταν ομώνυμα φορτισμένες (αρνητικά) οπότε δεν υπήρχαν ελκτικές αλληλεπιδράσεις.



Σχ.7. Απορρόφηση του διαλύματος καζεΐνης – PGM με μεταβολή του pH από 1-7.

Στο διάγραμμα 8 απεικονίζονται οι τιμές του μέγιστου μήκους κύματος της εκπομπής των διαλυμάτων καζεΐνης, μυξίνης και του διαλύματος και των δύο σε τιμές pH από 1 έως 3.

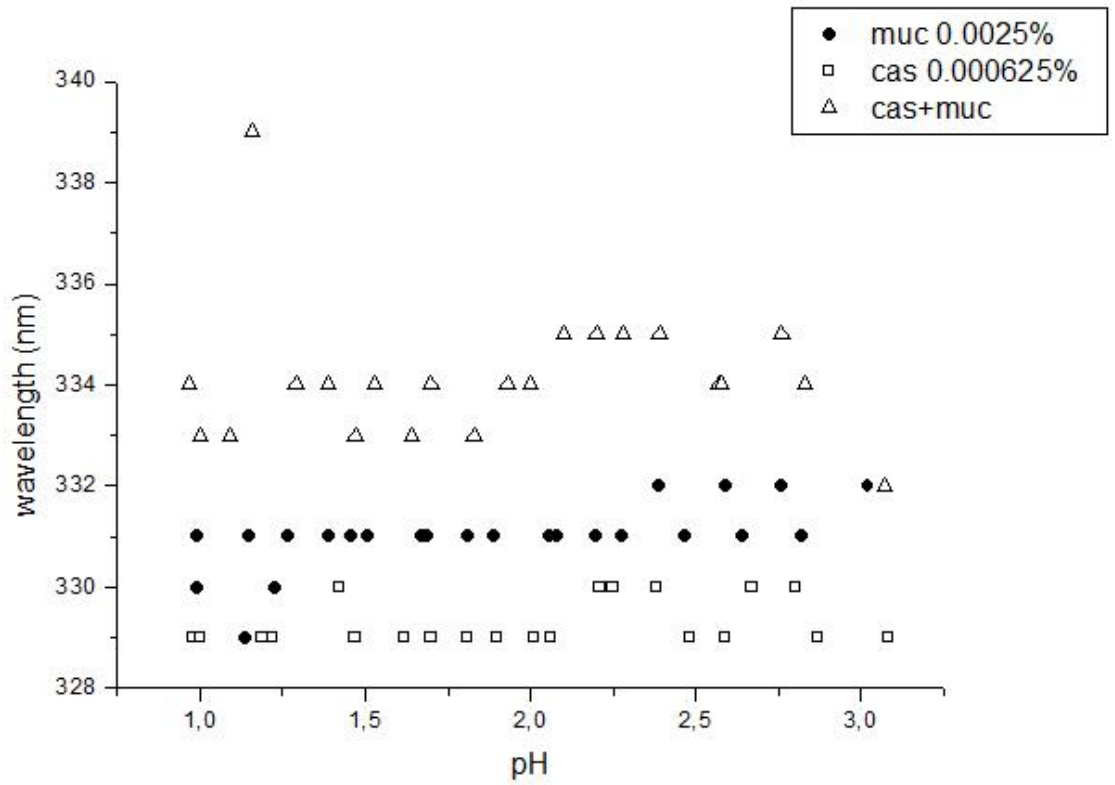
Παρατηρείται στο σχήμα 8 ότι τα μέγιστα μήκη κύματος των εκπομπών των κάθε δειγμάτων ξεχωριστά παρουσιάζουν σχεδόν μηδενική μεταβολή στις διάφορες τιμές pH, το καθένα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Από το διάγραμμα 8 φαίνεται, ότι τα μέγιστα μήκη κύματος της εκπομπής, κατά την μεταβολή του pH, παραμένουν σταθερά. Επίσης το διάλυμα καθαρής μυξίνης έχει μέγιστο εκπομπής στα 331nm, το διάλυμα του καθαρού καζεϊνικού νατρίου έχει μέγιστο στα 329 nm και το διάλυμα καζεϊνικού- PGM παρουσιάζει μέγιστο στα 334 nm. Υποδηλώνοντας ότι κάποια πιθανή αλληλεπίδραση μπορεί να έχει συμβεί.

Η προσπίπτουσα ακτινοβολία στις παραπάνω μετρήσεις είχε μήκος κύματος 295 nm, όπου εκπέμπει μόνο η Τρυπτοφάνη ενώ μετρήσεις έγιναν επίσης με προσπίπτουσα ακτινοβολία στα 280 nm (σχήμα 10) όπου εκπέμπει η Τυροσίνη και η Τρυπτοφάνη.

Το φάσμα φθορισμού καθορίζεται κυρίως από την πολικότητα του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται η Τυροσίνη και η Τρυπτοφάνη και από τις αλληλεπιδράσεις τους στο μόριο της πρωτεΐνης. Σε όλες τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν υπήρχαν πολύ μικρές αλλαγές στο μέγιστο μήκος κύματος της εκπομπής φθορισμού, το οποίο κυμαινόταν περίπου στη τιμή 330nm. Η τιμή αυτή του μέγιστου τις εκπομπής είναι χαρακτηριστικό για το μόριο της Τρυπτοφάνης σε υδρόφοβο περιβάλλον.

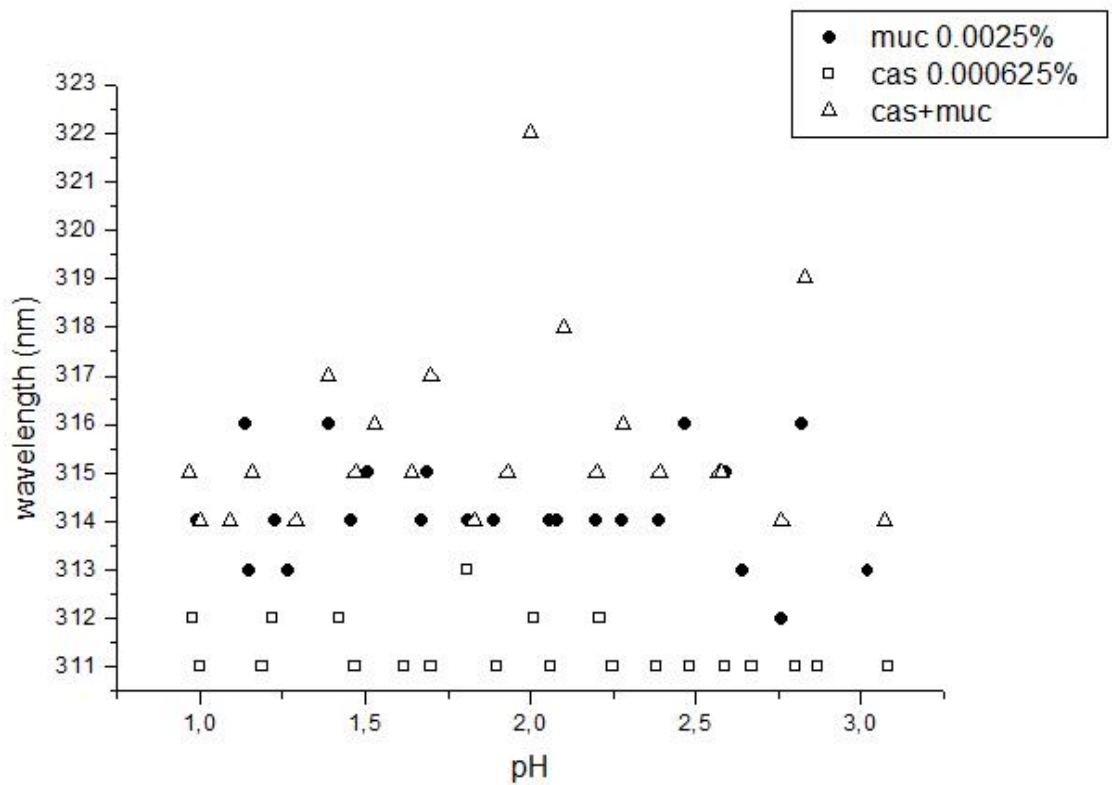
Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις ήταν πολύ μικρές και δεν παρατηρήθηκε στο διάλυμα καμία θολερότητα.



Σχ. 8. Τιμές εκπομπής των διαλυμάτων καθαρής καζεΐνης, μυξίνης και του μείγματος αυτών στα 295 nm.

Στο σχήμα 9 φαίνονται τα μέγιστα μήκη κύματος των εκπομπών των διαλυμάτων καζεΐνης, μυξίνης και καζεΐνης – μυξίνης σε pH 1-3 στα 280 nm.

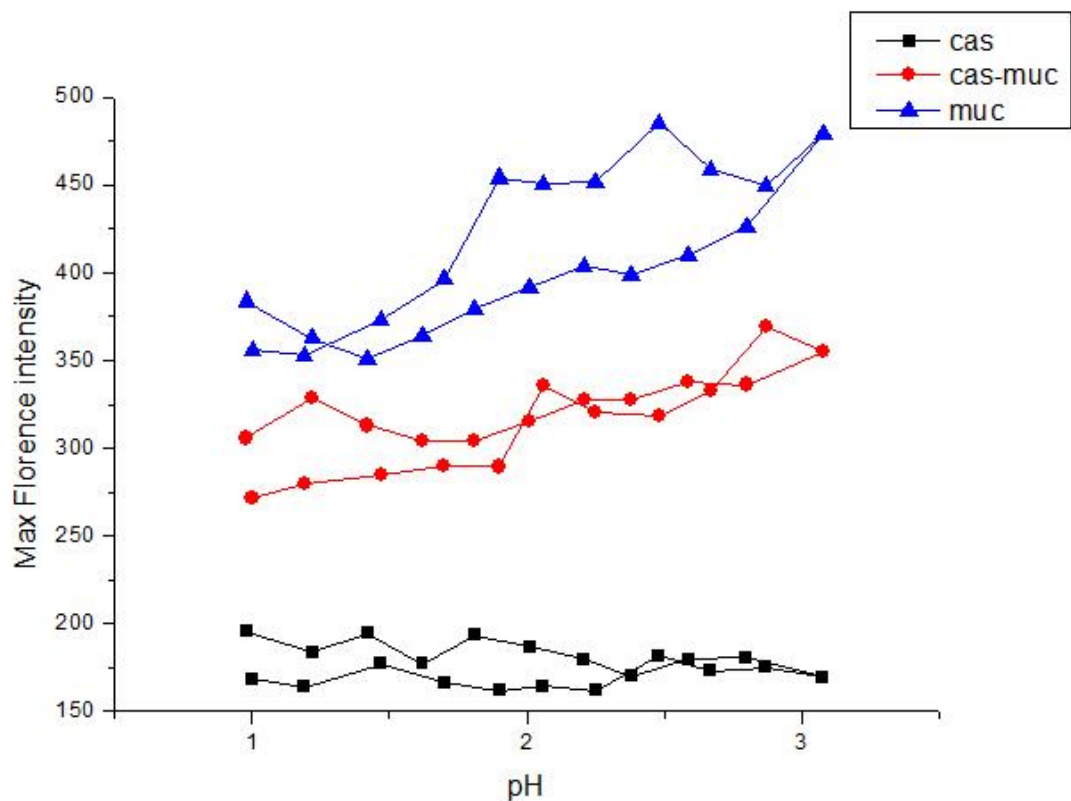
Παρατηρείται από το σχήμα 9 ότι στα 280 nm, οι εκπομπές των διαλυμάτων μυξίνης και καζεΐνης – μυξίνης έχουν περίπου το ίδιο μέγιστο στα 314-315nm. Το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής της καθαρής καζεΐνης βρίσκεται στα 311nm.



Σχ.9 . Τιμές εκπομπής των διαλυμάτων καθαρής καζεΐνης, μυξίνης και του μείγματος αυτών στα 280 nm.

Στο σχήμα 10 παρουσιάζονται οι μεταβολές της έντασης εκπομπής στα διαλύματα καζεΐνης, μυξίνης και καζεΐνης–μυξίνης με την μεταβολή του pH από 1 έως 3, με μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στα 280nm.

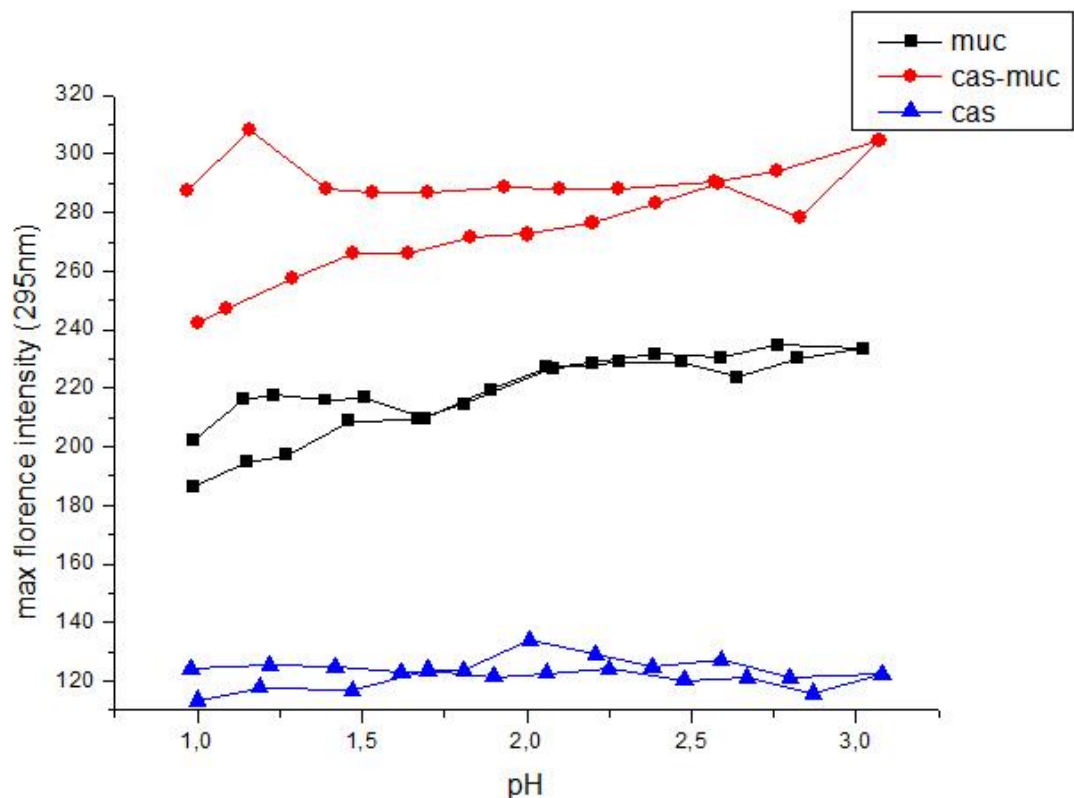
Παρατηρείται ότι το διάλυμα καζεϊνικού νατρίου έχει το μικρότερο f_{max} , το οποίο δεν μεταβάλλεται με την αλλαγή του pH. Το μεγαλύτερο f_{max} το έχει το διάλυμα της μυξίνης, το οποίο παρουσιάζει μια σταδιακή αύξηση στην ένταση της εκπομπής. Αυτό οφείλεται στην αλλαγή της δομής του μορίου της μυξίνης με την μεταβολή του pH και τη μεταφορά της Τυροσίνης και Τρυπτοφάνης σε πιο υδρόφιλο περιβάλλον.



Σχ. 10 Μεταβολή της έντασης της ακτινοβολίας εκπομπής διαλυμάτων καζεΐνης, μυξίνης και καζεΐνης –μυξίνης σε pH 1-3, με προσπίπτουσα ακτινοβολία στα 280 nm.

Στο σχήμα 11 παριστάνονται οι εντάσεις των διαλυμάτων καζεΐνης, μυξίνης και διαλύματος καζεΐνης –μυξίνης, με την μεταβολή του pH από 1 έως 3 και με προσπίπτουσα ακτινοβολία στα 295nm.

Παρατηρείται ότι το διάλυμα καζεΐνης-μυξίνης παρουσιάζει την μεγαλύτερη ένταση εκπομπής η οποία οφείλεται αποκλειστικά στη Τρυπτοφάνη. Στο σχήμα 10 παρατηρείται ότι το διάλυμα της καθαρής μυξίνης έχει μεγαλύτερο f_{max} στα 280nm από το διάλυμα καζεΐνης-μυξίνης ενώ στο σχήμα 11 το διάλυμα καζεΐνης -μυξίνης παρουσιάζει μεγαλύτερο f_{max} στα 295 nm. Συμπεραίνεται ότι το σύμπλεγμα που δημιουργείται μεταξύ της καζεΐνης και της μυξίνης οφείλεται στο αμινοξύ Τρυπτοφάνη.



Σχ. 11 Μεταβολή της έντασης της ακτινοβολίας εκπομπής διαλυμάτων καζεΐνης, μυξίνης και καζεΐνης –μυξίνης σε pH 1-3, με προσπίπτουσα ακτινοβολία στα 295 nm.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι σε συνθήκες προσομοίωσης της γαστρικής οδού, μπορούν να υπάρχουν πιθανές αλληλεπιδράσεις σε διαλύματα καζεϊνικού νατρίου-μυξίνης, οι οποίες εξαρτώνται από το pH. Οι αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται από τον τύπο της πρωτεΐνης, από την συγκέντρωσή της και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Προφανώς τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις έχουν σημασία στη διεργασία της πέψης.

Από την μελέτη που έγινε στο φασματοφωτόμετρο συμπεραίνεται ότι σε τιμές pH από 2,3 έως 3 , οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Αυτή η αλληλεπίδραση που συμβαίνει μεταξύ τους οφείλεται στο διαφορετικό φορτίο της κάθε πρωτεΐνης.

Από τα αποτελέσματα της φθορισμομετρίας βρέθηκε ότι το μήκος κύματος των διαλυμάτων καζεΐνης –μυξίνης αυξήθηκε σε σχέση με τα καθαρά διαλύματα τους. Αυτό δηλώνει ότι υπάρχει κάποια σύμπλεξη μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Αυτό επίσης φαίνεται και από την ένταση του φθορισμού της Τρυπτοφάνης στα 295nm.

Τα παραπάνω μπορούν να αποτελέσουν βάση για περαιτέρω διερεύνηση και δυνητικά την κατανόηση σταδίων της τύχης των πρωτεϊνών στη στοματική–γαστρική οδό.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Από περιοδικά:

- D. Guzey, D.J. McClements, (2005). Characterization of β -lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids* , 20, 124-131.
- A. Lindahl, A.L. Ungell, L. Knutson, H. Lennernäs (1997). Characterization of fluids from the stomach and proximal jejunum in Men and Women. *Pharmaceutical Research* Vol 14, No4.
- A.T.Kafrani, E.A. Mobarakeh, A.K. Borbdar, T. Haertlé (2010). Structure-function relationship of β -lactoglobulin in the presence of dodecyltrimethyl ammonium bromide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* , 75, 268-274.
- A.K. Anal, A. Tobiassen, J. Flanagan, H. Singh (2008). Preparation and characterization of nanoparticles formed by chitosan-caseinate interactions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 64, 104-110
- E. Gelhaye, N. Navrot, I.K.McDonald, N. Rouhier, E.L. Raven, J.P. Jacquot (2006). Ascorbate peroxidase-thioredoxin interaction. *Photosynth Res*, 89, 193-200.
- S.O. Agboola, R.E. Aluko, (2009) Isolation and structural properties of the major protein fraction in Australian wattle seed (*Acacia victoriae Benth*). *Food Chemistry*, 115, 1187-1193.
- A. Maleki, G.Lafitte, A.L. Kjøniksen, K. Thuresson, B.Nyström (2008). Effect of pH on the association behavior in aqueous solutions of pig gastric mucin. *Carbohydrate research*, 343, 328-340.

- R. Bansil, B. S. Turner, (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid and interface science*, 11, 164-170.
- I. Fiebriga, S.E. Hardingb, A. J. Roweed, S. C. Hymand & S.S. Davisa (1995). Transmission electron microscopy studies on pig gastric mucin and its interactions with chitosan. *Carbohydrate Polymers* 28, 239-244.
- X. Cao, R. Bansil, K. R. Bhaskar, B. S. Turner, J. T. LaMont, Niu Niu, N. H. Afdhal (1999). pH- Dependent Conformational Change of Gastric Mucin Leads to Sol-Gel Transition. *Biophysical Journal* Vol. 76, 1250–1258.

Από βιβλία:

- C.R. Southward, (2002). *Encyclopedia of Dairy Sciences: Protein Coprecipitates*, pp 1982-1990, 1915-1924. H. Singh, *Functional Properties* pp 1976- 1982. P.A. Munro, *Caseins, Functional Properties and Food Uses*, pp 1909-1915. Elsevier Science Ltd.
- H.D. Belitz, (2006). *Χημεία τροφίμων*, pp 109-152, κεφ. 10, εκδόσεις Τζιόλα
- Srinivasan D. , A. Paraf (1997). *Food proteins and their applications*. In: *Physicochemical bases of protein functionality and Structure function relationships of food proteins*, Marcel Dekker nc.
- Georg Schwedt (1996). *Εγχειρίδιο των φυσικών και χημικών μεθόδων ανάλυσης* , pp 82 -133 Μαρία Γρ. Παρισιάνου.
- J.R.J.Pare , J.M.R. Belanger (1997). *Instrumental methods in food analysis* , pp 93 -177 Elsevier Science Ltd.

- Srinivasan D. (2007). Food chemistry, pp 849-974 , CRC Press Taylor & Francis group
- Α.Α.Πολυχρονιάδου (1996). Ανάλυση τροφίμων, pp 64-66, Εκδόσεις Γαρταγάνη