

Πείραμα 5^ο

Προσδιορισμός Πρωτεϊνών

Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες των τροφίμων χρησιμοποιούνται για:

- τη διατήρηση και αναπλήρωση των πρωτεϊνών του οργανισμού.
- τη σύνθεση διαφόρων απαραίτητων ενώσεων όπως ένζυμα, ορμόνες, νουκλεϊνικά οξέα, κλπ.
- την παροχή ενέργειας.
- περιέχουν απαραίτητα αμινοξέα, όπως λυσίνη, θρυπτοφάνη, μεθειονίνη, λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη, τα οποία το σώμα δεν μπορεί να συνθέσει.
- Οι πρωτεΐνες είναι τα κύρια δομικά συστατικά πολλών τροφών και καθορίζουν την επιθυμητή εμφάνιση, την υφή ή τη σταθερότητα αυτών (την τρυφερότητα του κρέατος ή των προϊόντων ψαριών).
- Οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ως πηκτικές ουσίες, ως γαλακτωματοποιητές, ως μέσα αφρισμού κλπ.
- Πολλές πρωτεΐνες τροφίμων έχουν ενζυμική δράση ενισχύοντας το ρυθμό εξέλιξης βιοχημικών αντιδράσεων.

Συνιστώμενη Διαιτητική Πρόσληψη Πρωτεΐνης (Recommended Dietary Allowance)

Το ελάχιστο ποσό της ημερήσιας απαραίτητης ποσότητας πρωτεΐνης που πρέπει να λαμβάνεται από την τροφή είναι περίπου **1 g/Kg** βάρους του σώματος.

Τρόφιμα πλούσια σε πρωτεΐνες

Κρέας και κρεατοσκευάσματα (χοιρινό φιλέτο, βοδινό κρέας, κουνέλι, μοσχάρι, ζαμπόν)

Ψάρια και θαλασσινά (χαβιάρι, σολομός, τσιπούρα, ξιφίας, χταπόδι)

Πουλερικά και αυγά (κοτόπουλο, αυγά)

Γαλακτοκομικά (γιαούρτι, γάλα, φέτα, μυζήθρα)

Όσπρια (φασόλια, φακές, φάβα)

Ξηροί καρποί (αμύγδαλα, καρύδια)

Δημητριακά

1^η Μέθοδος

Μέθοδος KJELDAHL

Αρχή μεθόδου:

Ποσότητα δείγματος υποβάλλεται σε υγρή χώνευση με πυκνό θειικό οξύ παρουσία καταλυτών θειικού καλίου και θειικού χαλκού. Το οργανικώς δεσμευμένο άζωτο μετατρέπεται σε αμμωνία που δεσμεύεται από την περίσσεια του οξέος. Το μίγμα ψύχεται και ακολούθως προστίθεται περίσσεια πυκνού διαλύματος καυστικού νατρίου. Ελευθερώνεται αμμωνία, που απομακρύνεται με απόσταξη με υδρατμούς και δεσμεύεται από γνωστή περίσσεια προτύπου διαλύματος οξέος. Η περίσσεια του

οξέος προσδιορίζεται αλκαλιμετρικώς. Από την ποσότητα της αμμωνίας υπολογίζεται η εκατοστιαία περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο η οποία ανάγεται σε εκατοστιαία περιεκτικότητα πρωτεϊνών.

Συσκευές –Σκεύη-Αντιδραστήρια

Συσκευή καύσης Kjeldahl

Συσκευή απόσταξης Kjeldahl

Απιοειδής φιάλη Kjeldahl για την υγρή χώνευση των 500 mL

Ογκομετρικοί κύλινδροι

Κωνικές φιάλες των 250 mL

Σιφόνια

Προχοΐδα των 50,0 mL

Πυκνό θειικό οξύ (H_2SO_4) 98% w/w (ελεύθερο αζώτου)

Ένυδρος θειικός χαλκός ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

Θειικό κάλιο (K_2SO_4)

Διάλυμα καυστικού νατρίου 40% και 20% w/w

Πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου 0.50 M

Πρότυπο διάλυμα HCl 0.50 M

Δείκτης αιθανολικό διάλυμα ερυθρού του μεθυλίου 0.3% w/v

Συσκευή KJELDAHL



Συσκευή πέψης αζώτου



Αποστακτική μονάδα

Πειραματική πορεία

1^ο Στάδιο: Υγρή πέψη ή χώνευση

Σε καθαρή και στεγνή απιοειδή φιάλη Kjeldahl τίθεται κατάλληλη ποσότητα δείγματος τροφίμου (1-2 g αναλόγως με το είδος του τροφίμου) και προστίθενται 1 g ένυδρου $CuSO_4$, 15 g K_2SO_4 και 25 mL π. H_2SO_4 . Η φιάλη τοποθετείται στη συνέχεια στη συσκευή καύσης Kjeldahl. Ρυθμίζεται η θερμοκρασία σταδιακά έως τους 350 °C και η φιάλη παραμένει για αποτέφρωση του τροφίμου για 30 τουλάχιστον min. Η θέρμανση είναι αρχικώς ήπια ώστε να αποφευχθεί ο έντονος αφρισμός. Όταν ο

αφρισμός σταματήσει η θέρμανση καθίσταται εντονότερη μέχρι την εξαφάνιση απανθρακωμένων υπολειμμάτων, την πλήρη διαύγαση του περιεχομένου της φιάλης και την απόκτηση κυανοπράσινου χρώματος. Ακολούθως η φιάλη με το περιεχόμενό της αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

2^ο Στάδιο: Απόσταξη αμμωνίας

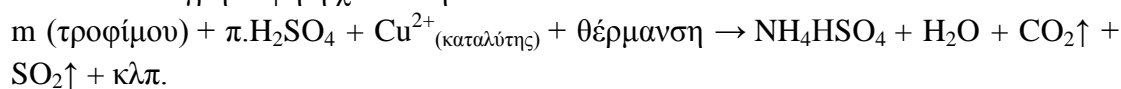
Η αποστακτική συσκευή συνδέεται με ειδικές δεξαμενές για απιονισμένο νερό και NaOH. Η φιάλη Kjeldahl προσαρμόζεται στη συσκευή απόσταξης Kjeldahl. Παράλληλα στην απόληξη του ψυκτήρα της συσκευής Kjeldahl τοποθετείται κωνική φιάλη, η οποία περιέχει 25 mL προτύπου διαλύματος HCl 0.50 M, και 2-3 σταγόνες δείκτη. Στη συνέχεια τίθεται η συσκευή της απόσταξης σε λειτουργία. Γίνεται αυτόματη προσθήκη αποσταγμένου νερού και διαλύματος καυστικού νατρίου 40% w/w και το περιεχόμενό της φιάλης, υπό συνεχή ανάδευση, θερμαίνεται προκειμένου να αποστάξει πλήρως η αμμωνία. Η παραγόμενη αμμωνία αναμιγνύεται με τους υπερκείμενους υδρατμούς και διοχετεύεται στον ψυκτήρα. Εκεί υγροποιείται και το απόσταγμα συλλέγεται στην κωνική φιάλη, όπου εξουδετερώνεται από το πρότυπο διάλυμα HCl. Μετά από τη συλλογή 150 περίπου mL αποστάγματος διακόπτεται η θέρμανση και ολοκληρώνεται η απόσταξη.

3^ο Στάδιο: Προσδιορισμός αμμωνίας.

Ακολουθεί ογκομέτρηση της περιόσεως του υδροχλωρίου με πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου 0.50 M. Από την κατανάλωση υπολογίζεται η αμμωνία και το άζωτο.

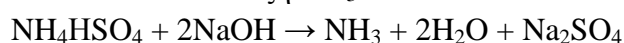
Αντιδράσεις

1^ο Στάδιο: Υγρή πέψη ή χώνευση

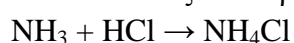


Το εκλυόμενο SO₂ δεσμεύεται σε παγίδα NaOH 40% w/w και εξουδετερώνεται

2^ο Στάδιο: Απόσταξη NH₃



3^ο Στάδιο: Εξουδετέρωση και προσδιορισμός NH₃



Υπολογισμοί

$$n(\text{HCl}) = n(\text{NH}_3) + n(\text{NaOH}) \text{ οπότε}$$

$$n(\text{NH}_3) = n(\text{HCl}) - n(\text{NaOH})$$

$$n(\text{NH}_3) = n(\text{N}) \text{ άρα } m(\text{N}) = n(\text{N}) \times 14$$

$$\% \text{ N (τροφίμου)} = [m(\text{N}) / m(\text{τροφίμου})] \times 100$$

$$\% \text{ πρωτεΐνη} = \% \text{ N} \times 6.25$$

όπου: 6.25 ο γενικός συντελεστής μετατροπής του οργανικού αζώτου σε πρωτεΐνες.

Συντελεστής μετατροπής του οργανικού αζώτου σε πρωτεΐνες

Για τον υπολογισμό του συντελεστή μετατροπής του οργανικού αζώτου σε πρωτεΐνη, προκύπτει από το είδος των πρωτεϊνών του εκάστοτε τροφίμου. Από το είδος των

πρωτεϊνών και των περιεχόμενων αμινοξέων τους προκύπτει η εκατοστιαία περιεκτικότητα της πρωτεΐνης κάθε τροφίμου σε άζωτο ως εξής:

$$\% \text{ w/w N στην πρωτεΐνη} = [\text{Ar(N)χατομικότητα}]/\text{Mr(πρωτεΐνης)}$$

Στη συνέχεια για να διαπιστωθεί πόσες φορές πρέπει να πολλαπλασιαστεί η εκατοστιαία περιεκτικότητα του δείγματος σε άζωτο ώστε να αναχθεί σε εκατοστιαία περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη, προσδιορίζεται ο συντελεστής μετατροπής (ΣΜ) του οργανικού αζώτου σε πρωτεΐνη ως εξής:

$$\text{ΣΜ} = 100/(\% \text{ w/w N στην πρωτεΐνη})$$

Στον Πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι συντελεστές μετατροπής του αζώτου σε πρωτεΐνη για διάφορα είδη τροφίμων. Αν για κάποιο τρόφιμο δεν δίνεται ο ΣΜ από τη βιβλιογραφία χρησιμοποιείται ως γενικός ΣΜ η τιμή 6,25.

Συντελεστές για τη μετατροπή του αζώτου σε πρωτεΐνη

Τρόφιμο	Συντελεστής	Τρόφιμο	Συντελεστής
Κρέας και ψάρι	6,25	Σιτάρι, κριθάρι, βρώμη, σίκαλη και το αλεύρι αυτών	5,83
Γάλα και γαλακτοκομικά	6,38	Σόγια	5,71
Καζεΐνη	6,40	Ρύζι και ρυζάλευρο	5,95
Ανθρώπινο γάλα	6,37	Φασόλια	5,30
Καρύδα, κάσιους και άλλοι ξηροί καρποί	5,30	Κεχρί	6,31
Σησάμι, ηλιόσποροι	5,30	Αυγά ολόκληρα	6,25
Φιστίκια, καρύδια Βραζιλίας, αράπικα φιστίκια	5,46	Ζελατίνη	5,55

2^η Μέθοδος

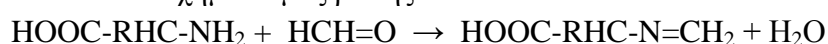
Προσδιορισμός αριθμού φορμόλης

Αρχή μεθόδου:

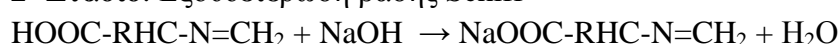
Σε ποσότητα δείγματος τροφίμου, το οποίο έχει εξουδετερωθεί ως προς την οξύτητά του με πρότυπο διάλυμα αλκάλειας παρουσία φαινολοφθαλείνης, προστίθεται περίσσεια προεξουδετερωμένου διαλύματος φορμαλδεΐδης. Η φορμαλδεΐδη (HCH=O) αντιδρά με την ελεύθερη αμινομάδα των αμινοξέων, προστατεύοντάς την και σχηματίζοντας βάση Schiff, απελευθερώνοντας ταυτόχρονα υδρογονοκατιόντα (H⁺). Τα υδρογονοκατιόντα αυτά προσδιορίζονται αλκαλιμετρικώς.

Αντιδράσεις

1^ο Στάδιο: Σχηματισμός βάσης Schiff



2^ο Στάδιο: Εξουδετέρωση βάσης Schiff



Παρατηρήσεις

- Ο αριθμός φορμόλης αποτελεί μέτρο της περιεκτικότητας σε συστατικά με ελεύθερες αμινομάδες (π.χ. πρωτεΐνες & ελεύθερα αμινοξέα).
- Από ένα μόριο των α-αμινοξέων ελευθερώνεται ένα υδρογονοκατιόν, ενώ από τέσσερα μόρια προλίνης ή υδροξυπρολίνης (περιέχουν ιμινομάδα) ελευθερώνονται μόνο τρία υδρογονοκατιόντα. Το μόνο αμινοξύ από το οποίο δεν ελευθερώνονται υδρογονοκατιόντα είναι η ιστιδίνη.
- Αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα κριτήρια γνησιότητας των φρουτοχυμών (50% των διαλυτών αζωτούχων συστατικών τους είναι ελεύθερα αμινοξέα).
- Επιτρέπει τη διάκριση του φυσικού από το τεχνητό ξύδι.

Συσκευές –Σκεύη-Αντιδραστήρια

Κωνικές φιάλες των 250 mL

Σιφόνια

Προχοΐδα των 50,0 mL

Προεξουδετερωμένο διάλυμα φορμαλδεΰδης 40%

Πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου 0.10 M

Δείκτης φαινολοφθαλείνη

Πειραματική πορεία

Σε κωνική φιάλη των 250 mL μεταφέρονται 10,00 mL δείγματος χυμού και προστίθενται 50 περίπου mL αποσταγμένου νερού και 2-3 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλείνης. Το διάλυμα ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου 0.10 M για την εξουδετέρωση της ελεύθερης οξύτητας. Στη συνέχεια στο εξουδετερωμένο διάλυμα του χυμού προστίθενται 10 mL προεξουδετερωμένου διαλύματος φορμαλδεΰδης, το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται ισχυρά και ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου 0.10 M. Από την δεύτερη κατανάλωση του προτύπου διαλύματος υπολογίζεται ο αριθμός φορμόλης.

Υπολογισμοί

Ως αριθμός φορμόλης ορίζεται ο όγκος σε mL διαλύματος NaOH 0.10 M που απαιτείται για την εξουδετέρωση των υδρογονοκατιόντων που ελευθερώνονται μετά από την προσθήκη της φορμαλδεΰδης από 10 mL χυμού.

Ο αριθμός φορμόλης για τους χυμούς πρέπει να κυμαίνεται από 1 έως 1,8.

Ερωτήσεις

- 1) Υπολογίστε το % w/w περιεχόμενο άζωτο και την % w/w πρωτεΐνη του τροφίμου που μελετήσατε.
- 2) Αν για ένα τρόφιμο δίνεται ότι η % w/w περιεκτικότητα του N στην πρωτεΐνη του ισούται με 18,5 ποιος ο ΣΜ;
- 3) Υπολογίστε τον αριθμός φορμόλης για τους χυμούς που μελετήθηκαν.