



Πανεπιστήμιο Κύπρου
Τμήμα Χημείας

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΑΣΤΕΡ

**ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΝΘΟΚΥΑΝΙΝΩΝ ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ
ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

ΒΙΟΛΑΡΗ ΜΑΡΙΝΑ

Ερευνητικός Σύμβουλος: Δρ. Επαμεινώνδας Λεοντίδης

ΜΑΪΟΣ 2021



Πανεπιστήμιο Κύπρου
Τμήμα Χημείας

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΑΣΤΕΡ

ΒΙΟΛΑΡΗ ΜΑΡΙΝΑ

Εξεταστική Επιτροπή:

- (1) Δρ. Ιωάννης Πασχαλίδης**, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου.
- (2) Δρ. Σοφία Χαραλάμπους – Hayes**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου.
- (3) Δρ. Επαμεινώνδας Λεοντίδης**, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κύπρου (Ερευνητικός Σύμβουλος)

ΜΑΪΟΣ 2021

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ως την ελάχιστη δυνατή μνεία, οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον ερευνητικό μου σύμβουλο Δρ. Επαμεινώνδα Λεοντίδη, για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή του, την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου πρόσφερε καθώς και το πολύ καλό κλίμα συνεργασίας που διαμόρφωσε συμβάλλοντας τα μέγιστα καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Τον ευχαριστώ για τον χρόνο που μου αφιέρωσε, για την βοήθεια και την προθυμία του να λύσει κάθε πρόβλημα και δυσκολία που αντιμετώπισα, έτσι ώστε η διατριβή αυτή να αποκτήσει την παρούσα μορφή.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους Καθηγητές του Τμήματος Χημείας Δρ. Ιωάννη Πασχαλίδη και Δρ. Σοφία Χαραλάμπους – Hayes για την αποδοχή της συμμετοχής τους ως αξιολογητές της μελέτης αυτής.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Διδακτορικό φοιτητή Γιώργο Λευκαρίτη για τη διάθεση του περιστροφικού εξατμιστήρα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Καθηγητή Ν. Χρονάκη, την Μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γεωργία Ιωάννου για την εκτέλεση των πειραμάτων HPLC στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας της Καθηγήτριας Κ. Καπνίση και τον Δρ. Πάρη Παπαγιώργη για την προμήθεια των βατόμουρων.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους τεχνικούς κ. Σάββα Σάββα και κ. Παναγιώτη Ανδρέου των οποίων η βοήθεια ήταν καταλυτική έτσι ώστε να λυθούν και να ξεπεραστούν τεχνικά προβλήματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Διδακτορική φοιτήτρια Σαββούλα Αλεξανδράκη, μέλος της Ομάδας Φυσικοχημείας Κolloειδών και επιφανειών, για την άριστη συνεργασία, τις συμβουλές και το κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω σε ολόκληρη την οικογένειά μου για την υπομονή τους, την πολύτιμη στήριξή τους και την πίστη τους σε μένα σε αυτή την τόσο σημαντική περίοδο της ζωής μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ανθοκυανίνες είναι μια από τις μεγαλύτερες και πιο σημαντικές ομάδες υδατοδιαλυτών χρωστικών. Απομονώνονται από φυσικές πηγές ως ακατέργαστο μίγμα και ο διαχωρισμός και η ταυτοποίησή τους μπορεί να γίνει με διάφορες αναλυτικές και χρωματογραφικές μεθόδους, όπως το HPLC. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι οι ανθοκυανίνες εμφανίζουν αγγειοπροστατευτικά, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινικά, και αντιδιαβητικά αποτελέσματα, τα οποία πιθανώς είναι συνδεδεμένα με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους. Με βάση αυτά τα πλεονεκτήματα των ανθοκυανινών είναι σημαντικό για τη βιομηχανία τροφίμων να προσθέσει ανθοκυανίνες σε τρόφιμα, προκειμένου να αξιοποιήσει την αντιοξειδωτική τους δράση. Ωστόσο, η χημική και δομική σταθερότητα των ανθοκυανινών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως το pH, η αύξηση της θερμοκρασίας, η υπεριώδης ακτινοβολία και η έκθεση σε οξυγόνο. Ο σχηματισμός συμπλεγμάτων ανθοκυανίνης με διάφορα βιομόρια που αποτελούν συστατικά των τροφίμων έχει προταθεί ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη χημική σταθεροποίηση των ανθοκυανινών και τη σταθερότητα του χρώματός τους. Οι μελέτες τέτοιων συμπλεγμάτων στη βιβλιογραφία είναι ελάχιστες και παρεμποδίζονται από το γεγονός ότι οι ανθοκυανίνες δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες ως καθαρά μόρια.

Στην παρούσα διατριβή μάστερ πραγματοποιήθηκαν πειράματα για απομόνωση ανθοκυανινών από φυτικές πρώτες ύλες (κόκκινο λάχανο και βατόμουρα). Τα φασματικά χαρακτηριστικά των εκχυλισμάτων των ανθοκυανινών μελετήθηκαν μέσω της λήψης φασμάτων UV-vis, της μελέτης αλλαγής του χρώματος των εκχυλισμάτων ανάλογα με το pH και της λήψης φασμάτων φθορισμού. Ο κύριος στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των ανθοκυανινών σε υδατικά διαλύματα με διάφορα μακρομοριακά συστατικά των τροφίμων, όπως είναι οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκαν διάφορες μέθοδοι, όπως οι μετρήσεις θολερότητας, η φασματοσκοπία UV-vis, η φασματοσκοπία φθορισμού, ο κυκλικός διχρωσμός (CD), η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) και η διαπίδυση σε συνδυασμό με θεωρητικά μοντέλα. Συγκεκριμένα μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού μελετήθηκαν οι τοπικές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των ανθοκυανινών με τις πρωτεΐνες: αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), πρωτεΐνη ορού του γάλακτος (WPI) και καζεϊνικό

νάτριο και τους πολυσακχαρίτες: χιτοζάνη, πηκτίνη, θειική χονδροϊτίνη και αλγινικό νάτριο σε υδατικά διαλύματα. Οι μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού πραγματοποιήθηκαν για να εξετασθούν οι μεταβολές στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών BSA και WPI στην παρουσία ανθοκυανινών. Οι μετρήσεις θολερότητας και η θερμιδομετρία ITC χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η συμπεριφορά συσσωμάτωσης μεγαλύτερης κλίμακας και τέλος η διαπίδυση χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω μελέτη των αλληλεπιδράσεων των ανθοκυανινών με την BSA, την WPI και την χιτοζάνη.

Από τα αποτελέσματα δημιουργείται για πρώτη φορά μια πληρέστερη εικόνα των αλληλεπιδράσεων μιγμάτων ανθοκυανινών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, που είναι συστατικά των τροφίμων. Οι αλληλεπιδράσεις φαίνεται να είναι σε κάποια συστήματα αρκετά ισχυρές και να επηρεάζουν τη δομή των πρωτεϊνών και τη σταθερότητα των ανθοκυανινών στο διάλυμα. Από τη μέθοδο της διαπίδυσης προκύπτει εικόνα ταυτόχρονης αλληλεπίδρασης πολλών μορίων ανθοκυανίνης ανά μόριο πρωτεΐνης ή πολυσακχαρίτη, κάτι που αξίζει να διερευνηθεί περισσότερο.

ABSTRACT

Anthocyanins are one of the largest and most important groups of water-soluble pigments. They are isolated from natural sources as a crude mixture and can be separated and identified by various analytical and chromatographic methods, such as HPLC. Several studies have shown that anthocyanins exhibit vasoprotective, anti-inflammatory, anticancer, and antidiabetic effects, which are probably linked to their antioxidant properties. Based on these advantages of anthocyanins, it is important for the food industry to add anthocyanins to foods in order to harness their antioxidant activity. However, the chemical and structural stability of anthocyanins is affected by various factors such as pH, increase of temperature, ultraviolet radiation and oxygen exposure. The formation of anthocyanin complexes with various biomolecules that are food ingredients has been proposed as a promising approach to the chemical stabilization of anthocyanins and the stability of their color. Studies of such complexes in the literature are minimal and are hampered by the fact that anthocyanins are not commercially available as pure molecules.

In the present thesis were carried out experiments on the extraction of anthocyanins from plant sources (red cabbage and blackberries). The spectral characteristics of anthocyanin extracts were studied by obtaining UV-vis spectra, studying the color change of the extracts depending on the pH, and obtaining fluorescence spectra. The main goal of the present thesis is to study the interactions of anthocyanins in aqueous solutions with various macromolecular components of food, such as proteins and polysaccharides. For this purpose, various methods were applied, such as turbidity measurements, UV-vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, circular dichroism (CD), isothermal titration calorimetry (ITC) and dialysis in combination with theoretical models. In particular, fluorescence spectroscopy studied the local intermolecular interactions of anthocyanins with proteins: bovine serum albumin (BSA), whey protein isolate (WPI) and sodium caseinate and polysaccharides: chitosan, pectin, chondroitin sulphate and sodium alginate in aqueous solutions. Circular dichroism measurements were performed to examine changes in the secondary structure of BSA and WPI proteins in the presence of anthocyanins. Turbidity measurements and ITC calorimetry were used to investigate larger-scale aggregation behavior

and finally dialysis was used for further study of anthocyanins interactions with BSA, WPI and chitosan.

The results provide for the first time, a more complete picture of the interactions of anthocyanins mixtures with proteins and polysaccharides, which are food ingredients. The interactions appear to be in some systems quite strong and affect the protein structure and stability of anthocyanins in the solution. The method of dialysis shows an image of simultaneous interaction of several molecules of anthocyanin per molecule of protein or polysaccharide, which deserves further investigation.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	i
Περιεχόμενα Σχημάτων	xi
Περιεχόμενα Πινάκων	xix
Κατάλογος Συνοτομογραφιών	xxii
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 2: Ανθοκυανίνες	5
2.1 Γενικά για τα αντιοξειδωτικά	5
2.1.1 Φυσικά αντιοξειδωτικά	6
2.2 Ανθοκυανίνες	8
2.2.1 Γενικά για τις ανθοκυανίνες	8
2.2.2 Χημικές δομές ανθοκυανινών	9
2.2.3 Οξείδωση ανθοκυανινών	11
2.2.4 Απομόνωση ανθοκυανινών από φυτικά προϊόντα	13
2.2.5 Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των ανθοκυανινών	19
2.2.5.1 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού	19
2.2.5.1.1 Φασματικές αλλαγές των ανθοκυανινών ανάλογα με το pH	19
2.2.5.1.2 Προσδιορισμός γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης	21
2.2.5.1.3 Μέθοδος διαφορικού pH – Υπολογισμός συγκέντρωσης ανθοκυανινών	22
2.2.5.2 Φασματοσκοπία φθορισμού	23
Κεφάλαιο 3: Βιομόρια	27
3.1 Διάφορα Βιομόρια - Πρωτεΐνες και Πολυσακχαρίτες	27

3.2	Πρωτεΐνες	27
3.2.1	Αλβουμίνη βόειου ορού	27
3.2.2	Καζεϊνικό άλας νατρίου (Καζεϊνικό νάτριο)	29
3.2.2.1	Καζεΐνη	29
3.2.2.2	Καζεϊνικό νάτριο	29
3.2.3	Πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Whey protein isolate)	30
3.3	Πολυσακχαρίτες	32
3.3.1	Χιτοζάνη	32
3.3.2	Πηκτίνη	34
3.3.3	Αλγινικό νάτριο	37
3.3.4	Θεική χονδροϊτίνη	38
3.4	Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών	39
3.4.1	Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού	39
3.4.1.1	Μοριακή προέλευση της απορρόφησης των πρωτεϊνών	40
3.4.2	Φθορισμός πρωτεϊνών	42
3.4.2.1	Φασματικά χαρακτηριστικά των αρωματικών αμινοξέων	43
Κεφάλαιο 4:	Μέθοδοι Πειραμάτων	46
4.1	Χρήση φθορισμού στη μελέτη πρωτεϊνών	46
4.1.1	Γενικές αρχές της φασματοσκοπίας φθορισμού	46
4.1.2	Απόσβεση φθορισμού	48
4.1.2.1	Διορθώσεις απορρόφησης για το inner-filter effect	51

4.1.3	Σύγχρονος φθορισμός	52
4.1.4	Ενίσχυση φθορισμού	53
4.2	Κυκλικός διχρωισμός	54
4.3	Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)	57
4.3.1	Διόρθωση μη επεξεργασμένων δεδομένων ITC	60
4.3.2	Εξαγωγή θερμοδυναμικών παραμέτρων	61
4.4	Διαπίδυση	62
4.4.1	Γραφικές παραστάσεις Scatchard (Scatchard plots)	65
4.4.2	Διαγράμματα Hill	67
4.4.1.1	Αλληλεπίδραση μεγάλων υποκαταστατών με αλυσίδες επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων	68
Κεφάλαιο 5:	Πειραματικό μέρος	72
5.1	Χημικά	72
5.2	Παρασκευή διαλυμάτων	72
5.2.1	Παρασκευή μητρικού υδατικού διαλύματος οξικών (ρυθμιστικό διάλυμα) συγκέντρωσης 0.01M σε συνθήκες pH=4	72
5.2.2	Παρασκευή μητρικού υδατικού διαλύματος φωσφορικών (ρυθμιστικό διάλυμα) συγκέντρωσης 0.01M σε συνθήκες pH=6	72
5.2.3	Παρασκευή μητρικού υδατικού διαλύματος φωσφορικών (ρυθμιστικό διάλυμα) συγκέντρωσης 0.01M σε συνθήκες pH=7	73
5.2.4	Παρασκευή διαλύματος 0.2N KCl – 0.2N HCl (25:67) σε συνθήκες pH=1	73
5.2.5	Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 1N οξικού νατρίου–1N υδροχλωρικού οξέος–νερό (100:60:90) σε συνθήκες pH=4.5	73
5.2.6	Παρασκευή μητρικού διαλύματος ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 0.334mM	73

5.2.7 Παρασκευή διαλυμάτων των πρωτεϊνών (BSA, WPI και καζεϊνικό νάτριο) συγκέντρωσης 1mg/mL σε συνθήκες pH=4 και pH=6 (BSA,WPI) και pH=7 (καζεϊνικό νάτριο):	73
5.2.8 Παρασκευή διαλυμάτων των πολυσακχαριτών χιτοζάνης και πηκτίνης συγκέντρωσης 1mg/mL σε συνθήκες pH=4 και pH=3.2 αντίστοιχα	73
5.2.9 Παρασκευή διαλύματος θεικής χονδροϊτίνης συγκέντρωσης 25mg/mL σε συνθήκες pH=3.2	73
5.2.10 Παρασκευή διαλύματος αλγινικού νατρίου συγκέντρωσης 12.5 mg/mL σε συνθήκες pH=4	74
5.3 Συσκευές	74
5.4 Απομόνωση των ανθοκυανινών	74
5.4.1. Απομόνωση ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο	74
5.4.2 Απομόνωση ανθοκυανινών από βατόμουρα	75
5.5 Τίτλοδότηση ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο και βατόμουρα με υδροξείδιο του νατρίου	76
5.6 5.6 Φασματομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)	76
5.6.1 Φάσματα απορρόφησης ανθοκυανινών από βατόμουρα και κόκκινο λάχανο σε διάφορα pH	76
5.6.2 Προσδιορισμός γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης	76
5.7 Φασματοσκοπία φθορισμού	77
5.7.1 Φθορισμός ανθοκυανινών	77
5.7.1.1 Διέγερση σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος pH=3 και pH=6	77
5.7.2 Έλεγχος γραμμικότητας φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα pH=3 και pH=6	78

5.7.3 Αλληλεπίδραση ανθοκυανινών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες	78
5.7.3.1 Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)	79
5.7.3.1.1.Μελέτη γραμμικότητας φθορισμού της BSA σε pH=6	79
5.7.3.1.2 Μελέτη φθορισμού της BSA παρουσία ανθοκυανίνης pH=4 και pH=6	79
5.7.3.1.3 Σύγχρονος φθορισμός BSA pH=4	79
5.7.3.1.4 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία BSA	80
5.7.3.2 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Whey protein isolate)	80
5.7.3.2.1 Μελέτη γραμμικότητας φθορισμού της WPI σε συνθήκες pH=6	80
5.7.3.2.2 Μελέτη φθορισμού της WPI παρουσία ανθοκυανίνης pH=4 και pH=6	80
5.7.3.2.3 Σύγχρονος φθορισμός WPI pH=4	81
5.7.3.2.4 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία WPI	81
5.7.3.3 Καζεϊνικό νάτριο	82
5.7.3.3.1 Μελέτη γραμμικότητας φθορισμού του καζεϊνικού νατρίου σε συνθήκες pH=7	82
5.7.3.3.2 Μελέτη φθορισμού της WPI παρουσία ανθοκυανίνης pH=4 και pH=6	82
5.7.3.3.3 Σύγχρονος φθορισμός καζεϊνικού νατρίου pH=7	82
5.7.3.3.4 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία καζεϊνικού νατρίου pH=7	83
5.7.3.4 Χιτοζάνη	83
5.7.3.4.1 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία χιτοζάνης pH=4	83
5.7.3.5 Πηκτίνη	84

5.7.3.5.1 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία πηκτίνης pH=3.2	84
5.7.3.6 Θεϊκή χονδροϊτίνη	84
5.7.3.6.1 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία θεϊκής χονδροϊτίνης pH=3.2	84
5.7.3.7 Αλγινικό νάτριο	85
5.7.3.7.1 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία αλγινικού νατρίου pH=4	85
5.8 Κυκλικός διχρωσμός	85
5.8.1 Αλληλεπίδραση BSA-ανθοκυανίνη από βατόμουρα σε συνθήκες pH=4	85
5.8.2 Αλληλεπίδραση WPI-ανθοκυανίνη από βατόμουρα σε συνθήκες pH=4	86
5.9 Πειράματα διαπίδυσης	86
5.9.1 Μembrάνες διαπίδυσης – ανθοκυανίνη σε συνθήκες pH=4 – κατασκευή γραφήματος $[\text{Anthocyanin}]_{\text{free}}$ vs $[\text{Anthocyanin}]_{\text{total}}$	86
5.9.2 Αλληλεπίδραση BSA-ανθοκυανίνη βατόμουρα σε συνθήκες pH=4	87
5.9.2.1 Παράλληλο πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανίνη-BSA και ανθοκυανίνη με έλεγχο απορρόφησης σε διάφορους χρόνους για την κατασκευή διαγράμματος Absorbance vs time (min)	87
5.9.3 Αλληλεπίδραση WPI-ανθοκυανίνη βατόμουρα σε συνθήκες pH=4	88
5.9.4 Αλληλεπίδραση χιτοζάνης-ανθοκυανίνη βατόμουρα σε συνθήκες pH=4	88
5.10 Πειράματα θολερότητας	89
5.10.1 Μελέτη θολερότητας διαλυμάτων ανθοκυανίνης σε συνθήκες pH=4	89
5.10.2 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-BSA σε συνθήκες pH=4	89

5.10.3 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-WPI σε συνθήκες pH=4	90
5.10.4 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-καζεϊνικού νατρίου σε συνθήκες pH=7	90
5.10.5 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-χιτοζάνης σε συνθήκες pH=4	90
5.10.6 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-πηκτίνης σε συνθήκες pH=4	91
5.10.7 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-θειική χονδροϊτίνη σε συνθήκες pH=4	91
5.11 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	92
5.12 5.12 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)	92
Κεφάλαιο 6: Επεξεργασία και Συζήτηση Αποτελεσμάτων	93
6.1 Απομόνωση ανθοκυανινών από φυσικές πηγές	93
6.1.1. Απομόνωση ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο	93
6.1.2. Απομόνωση ανθοκυανινών από βατόμουρα	94
6.2 Προσδιορισμός γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης	95
6.3 Φάσματα UV ανθοκυανίνης σε διάφορα pH και μελέτη αλλαγής χρώματος ανθοκυανίνης ανάλογα με το pH	97
6.3.1 Φάσματα UV και Τιτλοδότηση ανθοκυανίνης από κόκκινο λαχάνο	98
6.3.2 Φάσματα UV και Τιτλοδότηση ανθοκυανίνης από βατόμουρα	98
6.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	101
6.5 Φασματοσκοπία φθορισμού	102
6.5.1. Φθορισμός ανθοκυανινών	102
6.5.1.1 Φθορισμός ανθοκυανινών από βατόμουρα	103
6.5.1.2 Φθορισμός ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο	107

6.5.2	Γραμμικότητα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα	110
6.5.3	Γραμμικότητα φθορισμού βιομορίων	112
6.5.4	Αλληλεπίδραση ανθοκυανινών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες	114
6.5.4.1	Μελέτη φθορισμού αλβουμίνης βόειου ορού στην παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα	114
6.5.4.1.1	Μηχανισμός απόσβεσης φθορισμού της BSA από τις ανθοκυανίνες	115
6.5.4.1.2	Σύγχρονα φάσματα φθορισμού	119
6.5.4.2	Μελέτη φθορισμού ανθοκυανίνης στην παρουσία αλβουμίνης βόειου ορού	121
6.5.4.3	Σύγκριση ανθοκυανινών από βατόμουρα με ανθοκυανίνες από κόκκινο λάχανο	123
6.5.4.3.1	Αλληλεπίδραση ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με την BSA σε pH=4	123
6.5.4.4	Μελέτη φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία χιτοζάνης	124
6.5.4.6	Σύνοψη αποτελεσμάτων των πειραμάτων φθορισμού	125
6.6	Θολερότητα	130
6.7	Κυκλικός διχρωσμός	133
6.7.1	Επίδραση του εκχυλίσματος ανθοκυανίνης στη δευτεροταγή δομή της BSA	133
6.7.2	Επίδραση του εκχυλίσματος ανθοκυανίνης στη δευτεροταγή δομή της WPI	135
6.8	Πειράματα διαπίδυσης	137
6.8.1	Υπολογισμός παραμέτρου D	139
6.8.2	Αλληλεπίδραση BSA με ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4	141
6.8.2.1	Παράλληλο πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών παρουσία και απουσία BSA με έλεγχο απορρόφησης σε διάφορους χρόνους	141

6.8.2.2	Πείραμα διαπίδυσης BSA-ανθοκυανίνες pH=4	143
6.8.2.2.1	Διαγράμματα Scatchard	143
6.8.2.2.2	Διαγράμματα Hill	156
6.8.3	Πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών στην παρουσία WPI σε pH=4	148
6.8.3.1	Διαγράμματα Scatchard	148
6.8.3.2	Διαγράμματα Hill	151
6.8.4	Πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών στην παρουσία χιτοζάνης σε pH=4	152
6.9	Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)	155
6.9.1	Μελέτη αλληλεπίδρασης ανθοκυανινών με BSA σε pH=4	155
6.9.1.1	Εξαγωγή θερμοδυναμικών παραμέτρων	158
6.9.2	Μελέτη αλληλεπίδρασης ανθοκυανινών με WPI σε pH=4	160
Κεφάλαιο 7	Ανακεφαλαίωση, Συμπεράσματα και Μελλοντική Εργασία	163
7.1	Ανακεφαλαίωση των κυριότερων αποτελεσμάτων	163
7.1.1	Ανακεφαλαίωση φασματικών χαρακτηριστικών των ανθοκυανινών	163
7.1.2	Ανακεφαλαίωση αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη φασματοσκοπία φθορισμού	164
7.1.2.1	Αλληλεπίδραση ανθοκυανινών με πρωτεΐνες	164
7.1.2.2	Αλληλεπίδραση ανθοκυανινών με πολυσακχαρίτες	166
7.1.3	Ανακεφαλαίωση αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον κυκλικό διχρωισμό	166
7.1.4	Ανακεφαλαίωση αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τα πειράματα διαπίδυσης	166
7.1.5	Ανακεφαλαίωση αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)	167

7.2	Καταληκτικά Συμπεράσματα	167
7.3	Μελλοντική Εργασία	168
	Βιβλιογραφία	169
	Παράρτημα	176

ΒΙΟΛΑΡΗ ΜΑΡΙΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Κεφάλαιο 2

Σχήμα 2.1	Ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών που απαντώνται σε φυσικές πηγές.	6
Σχήμα 2.2	Γενική μοριακή δομή ανθοκυανιδίνης.	9
Σχήμα 2.3	Χημικές δομές των κύριων ανθοκυανιδινών.	10
Σχήμα 2.4	Επίδραση των συνθηκών pH στο χρώμα των ανθοκυανινών ή των προϊόντων μετατροπής τους.	11
Σχήμα 2.5	Παρουσιάζεται η επίδραση του pH στο χρώμα των ανθοκυανινών (από τριαντάφυλλο).	11
Σχήμα 2.6	Παρουσιάζονται οι (Α) πιθανές οδοί αποικοδόμησης ανθοκυανίνης με διάσπαση δεσμών (Β) πιθανοί μηχανισμοί αποικοδόμησης ανθοκυανίνης με προσχηματισμένο υπεροξειδίο υδρογόνου.	12
Σχήμα 2.7	Παρουσιάζονται οι πιθανοί μηχανισμοί αποικοδόμησης ανθοκυανίνης χωρίς προσχηματισμένο υπεροξειδίο υδρογόνου.	13
Σχήμα 2.8	Χημικές δομές 3-Ο-γλυκοζυλιωμένων ανθοκυανινών με την προσθήκη ακετυλίου, κουμαροϋλίου και καφεοϋλίου στον γλυκοζιτικό δακτύλιο.	14
Σχήμα 2.9	Χρωματογραφήματα HPLC ανθοκυανινών και ανθοκυανιδινών που λήφθηκαν από φρούτα.	18
Σχήμα 2.10	Φάσματα απορρόφησης κόκκινου λάχανου σε διάφορα pH.	20
Σχήμα 2.11	Πρότυπα φάσματα των -3-γλυκοζυλιωμένων (μη ακυλιωμένων, διακεκομμένη γραμμή) και -3,5 γλυκοζυλιωμένων (ακυλιωμένων, συνεχόμενη γραμμή) χρωστικών.	22
Σχήμα 2.12	Φάσματα φθορισμού (δεξιά άξονας) και φάσματα διέγερσης φθορισμού (αριστερός άξονας) της Cyanidin 3-glucoside και της Cy-3,5-digluc. a) Cy 3-gluc σε διαλύτη (νερό-μεθανόλη, 1: 1, v / v, pH 5). φάσματα φθορισμού: (1) $\lambda_{exc}=220$ nm, (2) $\lambda_{exc}=230$ nm, (3) $\lambda_{exc}=290$ nm και φάσματα διέγερσης φθορισμού: (4) $\lambda_{exc}=320$ nm, (5) $\lambda_{exc}=360$ nm. (b) Cy 3-gluc σε νερό, pH 5 · φάσματα φθορισμού: (1) $\lambda_{exc}=220$ nm, (2) $\lambda_{exc}=230$ nm, (3) $\lambda_{exc}=285$ nm και φάσματα διέγερσης φθορισμού: (4) $\lambda_{exc}=300$ nm, (5) $\lambda_{exc}=360$ nm. (c) Cy	24

3,5-diglc σε διαλύτη νερό-μεθανόλη, pH 5 · φάσματα φθορισμού: (1) $\lambda_{exc}=220$ nm και φάσμα διέγερσης φθορισμού: (2) $\lambda_{exc}=300$ nm. INT: ένταση φθορισμού (a.u.).

Σχήμα 2.13 Φάσματα φθορισμού των ανθοκυανινών εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου για διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης: $\lambda_{ex,1}=300$ nm, $\lambda_{ex,2}=340$ nm, $\lambda_{ex,3} = 410$ nm. **25**

Κεφάλαιο 3

Σχήμα 3.1 Δομή αλβουμίνης βόειου ορού. **29**

Σχήμα 3.2 Τριτοταγής δομή της (a) β-λακτοσφαιρίνης και (b) α-λακτοσφαιρίνης. **32**

Σχήμα 3.3 Αριστερά, απεικονίζεται το μονομερές της χιτοζάνης και δεξιά απεικονίζονται οι συντακτικοί τύποι της χιτίνης (chitin) και της χιτοζάνης (chitosan) αντίστοιχα. **33**

Σχήμα 3.4 Πρωτονιωμένη και αποπρωτονιωμένη μορφή χιτοζάνης σε όξινο διάλυμα. **34**

Σχήμα 3.5 Απεικονίζεται η δομή της πηκτίνης. **35**

Σχήμα 3.6 Απεικονίζεται η ομογαλακτουρονάνη. **34**

Σχήμα 3.7 Αριστερά απεικονίζεται η ραμνογαλακτουρονάνη-I και δεξιά η ραμνογαλακτουρονάνη-II. **36**

Σχήμα 3.8 Δομή αλγινικού νατρίου. **38**

Σχήμα 3.9 Χημική δομή μίας μονάδας σε αλυσίδα θειικής χονδροϊτίνης. Chondroitin-4-sulfate: $R_1 = H$; $R_2 = SO_3H$; $R_3 = H$. Chondroitin-6-sulfate: $R_1 = SO_3H$; $R_2, R_3 = H$. **39**

Σχήμα 3.10 Δομές των αμινοξέων τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη. **41**

Σχήμα 3.11 Φάσματα UV της ριβονουκλεάσης T1. Το φάσμα της φυσικής (native) πρωτεΐνης παρουσιάζεται ως συνεχής γραμμή, και το φάσμα της αποδιατεταγμένης (unfolded) πρωτεΐνης ως διακεκομμένη γραμμή. Η ριβονουκλεάση T1 περιέχει εννέα κατάλοιπα Tyr, τα οποία οδηγούν στο μέγιστο στα 278 nm, το μοναδικό κατάλοιπο Trp οδηγεί στους ώμους μεταξύ 280-300 nm. Οι μικρές συνεισφορές των τεσσάρων κατάλοιπων Phe κοντά στα 260 nm είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμες. **41**

Σχήμα 3.12	Φάσματα απορρόφησης (A) και εκπομπής (E) των αρωματικών αμινοξέων σε υδατικό διάλυμα pH 7.	44
Σχήμα 3.13	Δυναμική απόσβεση κατάλοιπων τρυπτοφάνης σε πρωτεΐνες τα οποία είτε είναι στο εσωτερικό (W_1) είτε είναι επιφανειακά προσβάσιμα (W_2).	45
Κεφάλαιο 4		
Σχήμα 4.1	Μια μορφή διάγραμματος ενέργειας Jablonski.	48
Σχήμα 4.2	Σύγκριση δυναμικής και στατικής απόσβεσης.	50
Σχήμα 4.3	Παρουσιάζεται η έλλειψη, με κύριο άξονα a και δευτερεύοντα άξονα b, η οποία σχηματίζεται από την προβολή του διανύσματος του ηλεκτρικού πεδίου για ελλειπτικά πολωμένο φως και φαίνεται η οπτική γωνία περιστροφής "α" και η ελλειπτικότητα "θ".	55
Σχήμα 4.4	CD φάσματα αναφοράς για α-έλικα, β-πτυχωτή και τυχαίο σπείραμα υπολογισμένα από τα φάσματα σφαιρικών πρωτεϊνών γνωστής δομής.	57
Σχήμα 4.5	Πειραματικές καμπύλες ITC πρόσδεσης πρωτεΐνης-υποκαταστάτη: (a) Ισχύς που απαιτείται για τη διατήρηση σταθερής διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ των κυψελίδων μέτρησης και αναφοράς ως συνάρτηση του χρόνου. (b) ενθαλπία πρόσδεσης ως συνάρτηση του αριθμού των εγχύσεων.	59
Σχήμα 4.6	Γραφική παράσταση διορθωμένης συνολικής θερμότητας αλληλεπίδρασης ως προς τη μοριακή αναλογία (mol υποκαταστάτη / mol μακρομορίου).	61
Σχήμα 4.7	Σακούλι διαπίδυσης στην αρχή και στην ισορροπία.	63
Σχήμα 4.8	Γραφική παράσταση Scatchard για πανομοιότυπες, ανεξάρτητες θέσεις πρόσδεση.	65
Σχήμα 4.9	Γραφική παράσταση Scatchard για σύστημα με δύο θέσεις πρόσδεσης.	66
Σχήμα 4.10	Απεικόνιση μικροκαταστάσεων στην περίπτωση δύο υποκαταστατών που προσδένονται στο πλέγμα, με $\ell=3$ και $N=12$.	70

Σχήμα 4.11	Γράφημα Scatchard για πρόσδεση υποκαταστάτη σε μακρομόριο με διάφορες τιμές ℓ και $k=1M$.	71
Κεφάλαιο 6		
Σχήμα 6.1	Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων ανθοκυανινών σε οξιμισμένη μεθανόλη.	96
Σχήμα 6.2	Μορφές ισορροπίας των ανθοκυανινών.	97
Σχήμα 6.3	Φάσματα απορρόφησης UV-vis εκχυλισμάτων ανθοκυανίνης από κόκκινα λάχανα σε διάφορα pH.	98
Σχήμα 6.4	Φάσματα απορρόφησης UV-vis εκχυλισμάτων ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε διάφορα pH.	99
Σχήμα 6.5	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 260-280nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=1\text{mg/L}=2.23 \times 10^{-6}\text{M}$).	103
Σχήμα 6.6	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 260-290nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=1\text{mg/L}=2.23 \times 10^{-6}\text{M}$).	103
Σχήμα 6.7	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 320-350nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=3.75\text{mg/L}=8.35 \times 10^{-6}\text{M}$).	104
Σχήμα 6.8	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 320-350nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=3.75\text{mg/L}=8.35 \times 10^{-6}\text{M}$).	104
Σχήμα 6.9	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 550-570nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=3.75\text{mg/L}=8.35 \times 10^{-6}\text{M}$).	105
Σχήμα 6.10	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 550-570nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=3.75\text{mg/L}=8.35 \times 10^{-6}\text{M}$).	105
Σχήμα 6.11	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 260-290nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=1.5\text{mg/L}=3.34 \times 10^{-6}\text{M}$).	107
Σχήμα 6.12	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 260-290nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=1.5\text{mg/L}=3.34 \times 10^{-6}\text{M}$).	107
Σχήμα 6.13	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 340-360nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=1.5\text{mg/L}=3.34 \times 10^{-6}\text{M}$).	108

Σχήμα 6.14	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 330-370nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=1.5\text{mg/L}=3.34 \times 10^{-6}\text{M}$).	108
Σχήμα 6.15	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 550-560nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=3\text{mg/L}=6.68 \times 10^{-6}\text{M}$).	109
Σχήμα 6.16	Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 540-570nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=3\text{mg/L}=6.68 \times 10^{-6}\text{M}$).	109
Σχήμα 6.17	Γραφική παράσταση της μέγιστης έντασης φθορισμού έναντι της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών.	111
Σχήμα 6.18	Γραφική παράσταση της μέγιστης έντασης φθορισμού έναντι της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών Α) BSA, Β)WPI C)καζεϊνικό νάτριο.	113
Σχήμα 6.19	Φάσματα φθορισμού BSA στην παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 280nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 1nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 2.5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-8300.	115
Σχήμα 6.20	Διάγραμμα Stern-Volmer απόσβεσης της BSA από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=4.	116
Σχήμα 6.21	Διορθωμένο διάγραμμα (για την εξάλειψη του inner-filter effect) Stern-Volmer απόσβεσης της BSA από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=4.	117
Σχήμα 6.22	Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[(I_0-I)/I_0]$ έναντι της συνολικής συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε pH=4.	117
Σχήμα 6.23	Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[(I_0-I)/I_0]$ έναντι της ελεύθερης συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε pH=4.	118
Σχήμα 6.24	Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[(I_0-I)/I_0]$ έναντι της συνολικής συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε pH=4, χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση.	119
Σχήμα 6.25	Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της BSA : (Α) $\Delta\lambda=15\text{ nm}$, (Β) $\Delta\lambda = 50\text{ nm}$ σε pH=4. Σταθερή συγκέντρωση BSA= $3.76 \times 10^{-6}\text{ M}$. Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-8300.	120
Σχήμα 6.26	Διάγραμματα I/I_0 στο λ_{max} ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης για $\Delta\lambda=15$ και $\Delta\lambda=50\text{ nm}$.	121
Σχήμα 6.27	(Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 330nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm,	121

χρησιμοποίηση φίλτρου 380nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300. (B) Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4 παρουσία BSA (διέγερση: 330nm).

- Σχήμα 6.28** (A) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300. (B) Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4 παρουσία BSA (διέγερση: 560nm). **122**
- Σχήμα 6.29** (A) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία χιτοζάνης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 330nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300. (B) Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4 παρουσία χιτοζάνης (διέγερση: 330nm). **125**
- Σχήμα 6.30** Διαγράμματα απορρόφησης στα 650nm ως προς το λόγο (A) moles ανθοκυανίνης/moles BSA και (B) moles ανθοκυανίνης/moles WPI σε pH=4. **131**
- Σχήμα 6.31** Διαγράμματα απορρόφησης στα 650nm ως προς το λόγο (A) moles ανθοκυανίνης/moles χιτοζάνης, (B) moles ανθοκυανίνης/moles πηκτίνης και (C) moles ανθοκυανίνης/moles θειικής χονδροϊτίνης σε pH=4. **132**
- Σχήμα 6.32** Φάσματα κυκλικού διχρωισμού εκφρασμένα ως η μέση ελλειπτικότητα υπολείμματος (MRE) (A) BSA απουσία ανθοκυανινών σε pH=4 μM (B) BSA παρουσία και απουσία ανθοκυανινών σε pH=4. **133**
- Σχήμα 6.33** Παρουσιάζεται διάγραμμα του % ποσοστού δομής της BSA σε α-έλικα, β-στροφή και τυχαίο σπείραμα ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης. **135**
- Σχήμα 6.34** Φάσματα κυκλικού διχρωισμού εκφρασμένα ως η μέση ελλειπτικότητα υπολείμματος (MRE) (A) WPI απουσία ανθοκυανινών σε pH=4 μM (B) WPI παρουσία και απουσία ανθοκυανινών σε pH=4. **135**
- Σχήμα 6.35** Παρουσιάζεται διάγραμμα του % ποσοστού δομής της WPI σε α-έλικα, β-στροφή και τυχαίο σπείραμα ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης. **137**
- Σχήμα 6.36** Σακούλι διαπίδυσης στην αρχή του πειράματος και στην ισορροπία. **139**
- Σχήμα 6.37** Διαγράμματα απορρόφησης της «ελεύθερης» ανθοκυανίνης ως προς τη συγκέντρωση της συνολικής ανθοκυανίνης (A) στα 276 nm, (B) στα 518 nm. **140**

Σχήμα 6.38	(Α) Διάγραμμα απορρόφησης (276 nm) ως προς το χρόνο που αντιστοιχεί στην απελευθέρωση της ανθοκυανίνης μέσω μεμβράνης διαπίδυσης και (Β) διάγραμμα απορρόφησης (518.5 nm) ως προς το χρόνο απουσία (●) και παρουσία (○) BSA.	142
Σχήμα 6.39	Γραφική παράσταση Scatchard από πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών παρουσία BSA σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.	144
Σχήμα 6.40	Γραφική παράσταση Scatchard από πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών παρουσία BSA σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm.	145
Σχήμα 6.41	Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.	146
Σχήμα 6.42	Γραφική παράσταση Scatchard ανθοκυανινών – WPI σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.	149
Σχήμα 6.43	Γραφική παράσταση Scatchard συστήματος ανθοκυανινών - WPI από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm.	150
Σχήμα 6.44	Γραφική παράσταση Scatchard συστήματος χιτοζάνης-ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4.	154
Σχήμα 6.45	Θερμόγραμμα αντίδρασης 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.03mM BSA σε pH=4.	156
Σχήμα 6.46	Θερμόγραμμα αραίωσης 2.4mM ανθοκυανίνης.	156
Σχήμα 6.47	Θερμότητα ανά έγχυση όπως προκύπτει από την ολοκλήρωση των κορυφών του θερμογράμματος του Σχ. 6.45.	157
Σχήμα 6.48	Διορθωμένη θερμότητα αλληλεπίδρασης 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.03mM BSA σε pH=4.	157
Σχήμα 6.49	Σύγκριση πειραμάτων αλληλεπίδρασης 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.03mM BSA σε pH=4.	158
Σχήμα 6.50	Διάγραμμα ολοκληρωτικής θερμότητας ως προς το γραμμομοριακό λόγο ανθοκυανίνης/BSA έπειτα από προσαρμογή του μοντέλου για N ισοδύναμες θέσεις πρόσδεσης για την ανθοκυανίνη πάνω σε κάθε μόριο	159

πρωτεΐνης. Αλληλεπίδραση 2.4mM ανθοκυανίνη με 0.03mM BSA σε pH=4.

- Σχήμα 6.51** Θερμόγραμμα αντίδρασης 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.027mM WPI σε pH=4. **160**
- Σχήμα 6.52** Θερμόγραμμα αραίωσης 2.4mM ανθοκυανίνης. **161**
- Σχήμα 6.53** Θερμότητα ανά έγχυση όπως προκύπτει από την ολοκλήρωση των κορυφών του θερμογράμματος του Σχ. 6.51. **161**
- Σχήμα 6.54** Διορθωμένη θερμότητα αλληλεπίδρασης 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.027mM WPI σε pH=4. **162**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Κεφάλαιο 2

Πίνακας 2.1	Συνολική περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες και οι κύριες ανθοκυανιδίνες σε φυσικές πηγές.	15
Πίνακας 2.2	Κύριες ανθοκυανιδίνες στα φρούτα από χρωματογραφήματα HPLC.	17
Πίνακας 2.3	Τα χρώματα και τα μέγιστα απορρόφησης της χρωστικής της ανθοκυανίνης του κόκκινου λάχανου ως συνάρτηση του pH.	21

Κεφάλαιο 3

Πίνακας 3.1	Απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων.	40
--------------------	--------------------------------------	-----------

Κεφάλαιο 5

Πίνακας 5.1	Σύνοψη πειραμάτων φθορισμού για μελέτη αλληλεπίδρασης ανθοκυανινών με διάφορα βιομόρια.	78
--------------------	---	-----------

Κεφάλαιο 6

Πίνακας 6.1	Πειραματικά αποτελέσματα εκχύλισης της ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο με μέσο εκχύλισης το νερό.	93
Πίνακας 6.2	Πειραματικά αποτελέσματα εκχύλισης της ανθοκυανίνης από βατόμουρα.	94
Πίνακας 6.3	Αποτελέσματα προσδιορισμού του ποσοστού γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης στις δύο πηγές απομόνωσης.	97
Πίνακας 6.4	Δεδομένα πειραμάτων γραμμικότητας φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα pH=6.	111
Πίνακας 6.5	Δεδομένα πειραμάτων γραμμικότητας φθορισμού BSA (pH=6), WPI (pH=6) και καζεϊνικού νατρίου (pH=7).	112
Πίνακας 6.6	Τιμές K_{sv} , K_a , n του συστήματος BSA-ανθοκυανίνες pH=4.	116
Πίνακας 6.7	Τιμές K_{sv} , K , n του συστήματος BSA-ανθοκυανίνες Λ και συστήματος BSA-ανθοκυανίνες B (χωρίς διόρθωση inner-filter effect).	124

Πίνακας 6.8	Σύνοψη πειραματικών αποτελεσμάτων από διαγράμματα Stern-Volmer για αλληλεπίδραση ανθοκυανίνης από βατόμουρα με πρωτεΐνες με διέγερση σε μήκος κύματος 280 nm (διόρθωση για inner-filter effect).	126
Πίνακας 6.9	Σύνοψη πειραματικών αποτελεσμάτων από διαγράμματα Benesi-Hildebrand για αλληλεπίδραση ανθοκυανίνης από βατόμουρα με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες.	128
Πίνακας 6.10	Ανάλυση CD δευτεροταγούς δομής της ελεύθερης BSA και της πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τις ανθοκυανίνες.	133
Πίνακας 6.11	Ανάλυση CD δευτεροταγούς δομής της ελεύθερης WPI και της πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τις ανθοκυανίνες.	136
Πίνακας 6.12	Απορροφήσεις και συγκεντρώσεις «ελεύθερων» ανθοκυανινών στα 276 nm και 518.5 nm.	140
Πίνακας 6.13	Αποτελέσματα παράλληλου πειράματος διαπίδυσης ανθοκυανίνης απουσία και παρουσία BSA σε pH=4.	141
Πίνακας 6.14	Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης BSA-ανθοκυανινών σε pH=4 από το πείραμα διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.18 και υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι σταθερή και ίση με $3.76 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($n_p = C_p * V_{in} = 3.76 \times 10^{-8} \text{ M}$).	143
Πίνακας 6.15	Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης BSA-ανθοκυανινών σε pH=4 από το πείραμα διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.18 και υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι σταθερή και ίση με $3.76 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($n_p = C_p * V_{in} = 3.76 \times 10^{-8} \text{ M}$).	144
Πίνακας 6.16	Σύνοψη αποτελεσμάτων αλληλεπίδρασης BSA-ανθοκυανινών σε pH=4 από τα διαγράμματα Hill (276 nm).	147
Πίνακας 6.17	Σύνοψη αποτελεσμάτων αλληλεπίδρασης BSA-ανθοκυανινών σε pH=4 από τα διαγράμματα Hill (518.5nm).	147
Πίνακας 6.18	Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης WPI-ανθοκυανινών σε pH=4 από το πείραμα διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.18 και υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι σταθερή και ίση με $5.435 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($n_p = C_p * V_{in} = 5.435 \times 10^{-8} \text{ M}$).	149

- Πίνακας 6.19** Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης WPI-ανθοκυανινών σε pH=4 από το πείραμα διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.18 και υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι σταθερή και ίση με $5.435 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($n_p = C_p * V_{in} = 5.435^{-8} \text{ M}$). **150**
- Πίνακας 6.20** Σύνοψη αποτελεσμάτων αλληλεπίδρασης WPI-ανθοκυανινών σε pH=4 από τα διαγράμματα Hill. **152**
- Πίνακας 6.21** Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης χιτοζάνης - ανθοκυανινών σε pH=4 από το πείραμα διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.22 και υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm. Η συγκέντρωση της χιτοζάνης είναι σταθερή και ίση με $8.33 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($n_p = C_p * V_{in} = 8.33^{-8} \text{ M}$). **153**

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

β-LG	β-λακτοσφαιρίνη
B-H	Benesi-Hildebrand
BSA	Αλβουμίνη βόειου ορού
CD	Κυκλικός διχρωσμός
Cy	Κυανιδίνη
Dp	Δελφινιδίνη
ITC	Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης
Mv	Μαλβιδίνη
Pg	Πελαργονιδίνη
Pn	Πεονιδίνη
Pt	Πετουνιδίνη
S-V	Stern-Volmer
Trp	Τρυπτοφάνη
Tyr	Τυροσίνη
WPI	Πρωτεΐνη ορού γάλακτος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

Η μελέτη των φυσικών χρωστικών είναι μια εκτεταμένη και ενεργή περιοχή έρευνας λόγω του αυξανόμενου ενδιαφέροντος της αντικατάστασης των συνθετικών χρωστικών σε τρόφιμα και φαρμακευτικά σκευάσματα, επειδή έχουν τοξικές επιδράσεις στον άνθρωπο. Οι ανθοκυανίνες είναι μια ομάδα φυσικών φαινολικών ενώσεων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα ελκυστικά χρώματα πολλών φυτικών πρώτων υλών και γίνονται ολοένα σημαντικότερες ως αντιοξειδωτικά, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία.

Το κύριο ενδιαφέρον για τις ανθοκυανίνες προκύπτει από την μεγάλη τους διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα, γεγονός που τις καθιστά ενδιαφέρουσες για χρήση ως φυσικές υδατοδιαλυτές χρωστικές. Οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν μια ποικιλία χρωμάτων. Τα χρώματα των διαλυμάτων τους εξαρτώνται από το pH και καθορίζονται από τις μεταβολές στη μοριακή τους δομή. Σε διαφορετικές συνθήκες pH, οι ανθοκυανίνες βρίσκονται σε διαφορετικές μορφές (τόσο ιονισμού όσο και λόγω διάνοιξης του ενδιάμεσου δακτυλίου τους). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τον τρόπο που εντάσσονται οι ανθοκυανίνες σε ευρύτερες πολυμοριακές δομές, παρουσιάζει η μορφή του κατιόντος φλαβυλίου η οποία επικρατεί σε όξινες συνθήκες. Μια άλλη αξιοσημείωτη ιδιότητα των ανθοκυανινών είναι το ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων τους, καθώς θεωρούνται χρήσιμες για την πρόληψη διαφόρων ασθενειών όπως οι νευρολογικές και καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος και ο διαβήτης. [Chandrasekhar et al (2012), Horbowicz et al (2008)]

Παρά τις πολλές δυνατές εφαρμογές που φαίνεται να έχουν οι ανθοκυανίνες στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων, η χρήση τους είναι σχετικά περιορισμένη λόγω της χαμηλής σταθερότητάς τους σε δεδομένες περιβαλλοντικές συνθήκες, λόγω των αλληλεπιδράσεών τους με διάφορα συστατικά των τροφίμων, όπως οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες, αλλά και λόγω των χαμηλών ποσοστών εκχύλισής τους από φυτικές πηγές. Οι ανθοκυανίνες αποικοδομούνται εύκολα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης των τροφίμων, επειδή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες σε παράγοντες όπως το φως, το pH, η θερμοκρασία και η παρουσία οξυγόνου. Επίσης, καθώς οι ανθοκυανίνες

απομονώνονται από διάφορες φυτικές πηγές και τα εκχυλίσματα που προκύπτουν είναι μίγματα με πολλά συστατικά, είναι δύσκολη η ανάλυση και η προτυποποίηση των μιγμάτων τους. [Khoo et al (2017)]

Η βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας των φαινολικών αυτών ενώσεων πραγματοποιείται με την δημιουργία συμπλεγμάτων με διάφορους φορείς, κυρίως πρωτεΐνες όπως: οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος, η πρωτεΐνη βόειου ορού, το καζεϊνικό νάτριο και πολυσακχαρίτες όπως: η πηκτίνη και η χιτοζάνη. Ειδικά για χρήση των ανθοκυανινών ως αντιοξειδωτικά σε γαλακτώματα ελαίου σε νερό, που είναι πολύ συνηθισμένη φυσική μορφολογία στη χημεία τροφίμων, είναι αναγκαία η γνώση της αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών με τους γαλακτωματοποιητές και τις ουσίες που τοποθετούνται στις επιφάνειες των σταγονιδίων των γαλακτωμάτων. Ως αντιοξειδωτικά οι ανθοκυανίνες θα δρουν κυρίως από το εσωτερικό της υδατικής φάσης ενός γαλακτώματος, λόγω της μεγάλης τους διαλυτότητας στο νερό. Είναι ωστόσο σημαντικό να γνωρίζει κανείς για την αλληλεπίδραση των μορίων αυτών με τις διεπιφάνειες των γαλακτωμάτων.

Η παρούσα διατριβή μάστερ έχει ως στόχο την μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών που απομονώνονται από φυτικές πηγές (κόκκινο λάχανο και βατόμουρα) με διάφορα μακρομοριακά συστατικά των τροφίμων, όπως είναι οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες, σε υδατικά διαλύματα. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των ανθοκυανινών με τις πρωτεΐνες: αλβουμίνη του βόειου ορού (BSA), πρωτεΐνη ορού του γάλακτος (WPI), καζεϊνικό νάτριο και τους πολυσακχαρίτες: χιτοζάνη, πηκτίνη,θειική χονροϊτίνη και αλγινικό νάτριο. Οι μελέτες αυτές είναι απαραίτητες για τη σταθεροποίηση και βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας των ανθοκυανινών και για την διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων με τα συστατικά που βρίσκονται στα τοιχώματα πολλών ειδών γαλακτωμάτων. Βιβλιογραφικά, υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών με διάφορα βιομόρια, κυρίως πρωτεΐνες όπως: οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος, η πρωτεΐνη βόειου ορού, το καζεϊνικό νάτριο [Tang et al (2014), Wei et al (2018), Zuo et al (2015)]. Γενικά η μελέτη της πρόσδεσης των ανθοκυανινών σε πρωτεΐνες και άλλους γαλακτωματοποιητές (π.χ. πολυσακχαρίτες) είναι αρκετά περιορισμένη και έχει εμφανισθεί κυρίως σε πρόσφατη βιβλιογραφία, ιδιαίτερα στην περίπτωση των πολυσακχαριτών, όπου οι έρευνες μέχρι τώρα περιορίζονται στην πηκτίνη

[Fernandes et al (2014), Fernandes et al (2020)]. Βασικές μέθοδοι διερεύνησης αυτών των αλληλεπιδράσεων βιβλιογραφικά είναι οι φασματοσκοπίες φθορισμού, υπερύθρου και κυκλικού διχρωισμού, ενώ πολύ λίγη εργασία έχει γίνει με θερμοδυναμικές μεθόδους όπως η διαπίδυση και η θερμιδομετρία ITC και με βασικές χημικές μεθόδους όπως το NMR και η φασματοσκοπία μάζας.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιούνται μελέτες αλληλεπίδρασης μιγμάτων ανθοκυανινών που απομονώνονται από βατόμουρα (blackberries) με πρωτεΐνες και με τέσσερις πολυσακχαρίτες για να καλυφθεί ένα βιβλιογραφικό κενό. Αν και έγιναν λίγες μετρήσεις με ανθοκυανίνες που απομονώθηκαν από κόκκινα λάχανα, τελικά προτιμήθηκαν οι ανθοκυανίνες από blackberries, επειδή βιβλιογραφικά το μίγμα ανθοκυανινών της δεύτερης πηγής είναι πολύ απλούστερο [Drabent et al (1999), Filip et al (2012)]. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα για την μελέτη των προαναφερθεισών αλληλεπιδράσεων είναι οι μετρήσεις θολερότητας, η φασματοσκοπία UV-vis, φθορισμού και κυκλικού διχρωισμού, η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) και η διαπίδυση. Αυτές οι μέθοδοι στοχεύουν στην εξέταση των τοπικών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (φθορισμός), στη μελέτη της συμπεριφοράς συσσωμάτωσης μεγαλύτερης κλίμακας (θολερότητα, ITC), στην εξέταση μεταβολών της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών (CD) και στη διερεύνηση της συνολικής θερμοδυναμικής συμπεριφοράς «πρόσδεσης» (ITC, φθορισμός, διαπίδυση).

Το κείμενο της παρούσας διατριβής μάστερ αποτελείται από επτά κεφάλαια. Μετά την παρούσα εισαγωγή στο δεύτερο κεφάλαιο θα συζητηθούν τα αντιοξειδωτικά, οι ανθοκυανίνες, οι χημικές τους δομές, η απομόνωσή τους από φυτικά προϊόντα και τα φασματοσκοπικά τους χαρακτηριστικά. Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα διάφορα βιομόρια που χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή, οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες, και τα φασματικά τους χαρακτηριστικά. Έπειτα στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών με τα διάφορα βιομόρια. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται τα θεωρητικά υπόβαθρα των τεχνικών και τα θεωρητικά μοντέλα με τα οποία προσομοιώθηκαν τα πειραματικά δεδομένα κάθε τεχνικής. Στο πέμπτο κεφάλαιο περιγράφεται το πειραματικό μέρος της εργασίας. Στο έκτο κεφάλαιο παρατίθενται τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την αλληλεπίδραση των ανθοκυανινών με

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

τα συστατικά των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων. Η διατριβή αυτή κλείνει με το έβδομο κεφάλαιο, στο οποίο γίνεται ανακεφαλαίωση των αποτελεσμάτων και εξαγωγή των συμπερασμάτων της εργασίας, καθώς και πιθανή μελλοντική εργασία για να καλυφθούν τα κενά που παραμένουν. Στο τέλος του κειμένου της διατριβής βρίσκεται η βιβλιογραφία που χρησιμοποιήθηκε καθώς και παράρτημα με πρόσθετα αποτελέσματα.

ΒΙΟΛΑΡΗ ΜΑΡΙΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Ανθοκυανίνες

2.1.Γενικά για τα αντιοξειδωτικά

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι σήμερα ένα σημαντικό πρόβλημα για τις βιομηχανίες καλλυντικών και τροφίμων. Το πρόβλημα είναι μεγαλύτερο, όταν τα λιπιδικά υποστρώματα περιέχουν ακόρεστα ή πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που είναι πολύ ευαίσθητα στις διεργασίες οξείδωσης. Η οξείδωση των λιπιδίων μεταβάλλει τις οργανοληπτικές τους ιδιότητες, δηλαδή τη γεύση, την οσμή, το χρώμα και την υφή, και εξαντλεί τις θρεπτικές τους ιδιότητες, ενώ συγχρόνως παράγονται τοξικές ενώσεις. [Lucas et al (2010)]

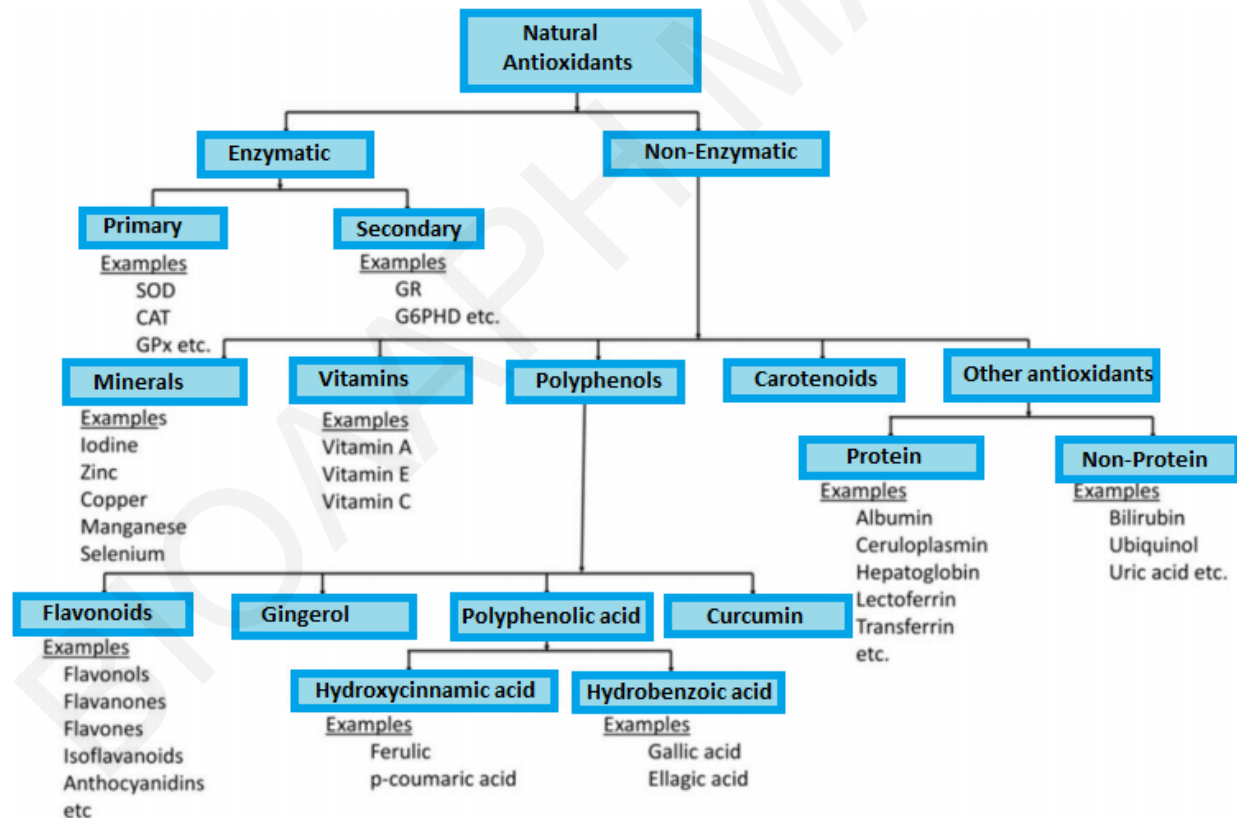
Με τον όρο αντιοξειδωτικά αναφερόμαστε στις φυσικές ουσίες που περιέχονται στα τρόφιμα, οι οποίες δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό, αλλά και στα πρόσθετα (χημικά ή φυσικά) που περιέχονται σε τρόφιμα του εμπορίου με σκοπό τη συντήρησή τους. Τα αντιοξειδωτικά συνεισφέρουν στην επιβράδυνση της πορείας της γήρανσης του οργανισμού και έχουν ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες, αφού δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά τον μεταβολισμό, και εμποδίζουν το σχηματισμό υπεροξειδίων με καρκινογόνο δράση. Μπορούν να μειώσουν σε μεγάλο βαθμό τις ανεπιθύμητες βλάβες που οφείλονται στα οξειδωτικά καταστρέφοντάς τα προτού αντιδράσουν με βιολογικούς στόχους, αποτρέποντας αλυσιδωτές αντιδράσεις ή αποτρέποντας την ενεργοποίηση οξυγόνου σε εξαιρετικά δραστικά προϊόντα (reactive products). [Bunaciu et al (2012)]

Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της οξείδωσης των τροφίμων εδώ και χρόνια. Μία από τις σημαντικότερες απαιτήσεις για ένα κατάλληλο αντιοξειδωτικό για τα έλαια και τα λίπη είναι η θερμική σταθερότητα κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας. Έχει αποδειχθεί σε διάφορα βρώσιμα έλαια ότι τα περισσότερα φυσικά πρόσθετα έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση και θερμική σταθερότητα από ό,τι τα συνθετικά αντιοξειδωτικά [Taghvaei et al (2013)]. Η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από τη χημική τους δραστηριότητα ως ριζωματίδια (radical scavengers) ή χηλικοί υποκαταστάτες μετάλλων (metal chelators), την αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά τροφίμων, τις περιβαλλοντικές

συνθήκες, όπως το pH ή τη συγκέντρωση, και την κατανομή του αντιοξειδωτικού σε διαφορετικά συστήματα τροφίμων [Lucas et al (2010)].

2.1.1 Φυσικά αντιοξειδωτικά

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά υπάρχουν σε όλα τα μέρη των φυτών, στα φρούτα, στα λαχανικά, στους σπόρους, στα φύλλα, στις ρίζες και στους φλοιούς. Αυτά τα φυσικά αντιοξειδωτικά είναι κυρίως πολυφαινόλες (φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, ανθοκυανίνες, λιγνάνες και στυλβένια), καροτενοειδή (ξανθοφύλλες και καροτίνες) και βιταμίνες (βιταμίνη E και C) [Anwar et al (2018)]. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά, με βάση τον μηχανισμό δράσης τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες ομάδες, των ενζυμικών και μη ενζυμικών [Atta et al (2017), Xu et al (2017)]. Μια λεπτομερής ταξινόμηση των φυσικών αντιοξειδωτικών παρουσιάζεται στο σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1: Ταξινόμηση των αντιοξειδωτικών που απαντώνται σε φυσικές πηγές [Anwar et al (2018)].

Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά δρουν διασπώντας και αφαιρώντας τις ελεύθερες ρίζες. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα μετατρέπουν επικίνδυνα οξειδωτικά προϊόντα σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και έπειτα σε νερό, με μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων παρουσία συμπαραγόντων, που είναι μέταλλα όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο και ο σίδηρος. Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά λειτουργούν διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Λίγα παραδείγματα των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η φυτική πολυφαινόλη, τα καροτενοειδή και η γλουταθειόνη. Οι πολυφαινόλες είναι η μεγαλύτερη κατηγορία και αποτελούνται από φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή. Οι άλλες κατηγορίες διατροφικών αντιοξειδωτικών περιλαμβάνουν βιταμίνες, καροτενοειδή, οργανοσουλφουρικές ενώσεις και μέταλλα. [Bunaciu et al (2012), Nimse et al (2015)]

Ένας άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης των αντιοξειδωτικών βασίζεται στη διαλυτότητά τους στο νερό ή στα λιπίδια. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά. Τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά (π.χ. βιταμίνη C) υπάρχουν στα κυτταρικά υγρά, όπως η κυτοσόλη (cytosol) ή η κυτοπλασμική μήτρα. Τα λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά (π.χ. βιταμίνη E, καροτενοειδή και λιποϊκό οξύ-lipoic acid) εντοπίζονται κατά κύριο λόγο σε κυτταρικές μεμβράνες. [Nimse et al (2015)]

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν επίσης να ταξινομηθούν ανάλογα με το μέγεθός τους, σε μικρομοριακά αντιοξειδωτικά και μακρομοριακά αντιοξειδωτικά. Τα μικρομοριακά αντιοξειδωτικά εξουδετερώνουν τα δραστικά είδη οξυγόνου με μια διαδικασία που ονομάζεται απομάκρυνση ριζών (radical scavenging). Τα κύρια αντιοξειδωτικά στην κατηγορία αυτή είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή και η γλουταθειόνη. Τα μακρομοριακά αντιοξειδωτικά είναι ένζυμα (π.χ. υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάση γλουταθειόνης) και πρωτεΐνες (αλβουμίνη) που απορροφούν δραστικά είδη οξυγόνου και τα εμποδίζουν να επιτεθούν σε άλλες βασικές πρωτεΐνες. [Nimse et al (2015)]

2.2 Ανθοκυανίνες

2.2.1 Γενικά για τις ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι μία από τις μεγαλύτερες και πιο σημαντικές ομάδες υδατοδιαλυτών χρωστικών στα περισσότερα είδη του φυτικού βασιλείου [Horbowicz et al (2008)]. Η λέξη «ανθοκυανίνη» προέρχεται από δύο ελληνικές λέξεις: «άνθος» που σημαίνει λουλούδι, και το «κυανός» που σημαίνει σκούρο μπλε. Το όνομά τους αποκαλύπτει το σημαντικό χαρακτηριστικό τους ως φυσικές χρωστικές.

Στη φύση οι ανθοκυανίνες εμφανίζονται ως «ανθοκυανιδίνες», που είναι γλυκοζυλιωμένα πολυϋδρόξυ και πολυμεθόξυ παράγωγα αλάτων του 2-φαινυλοβενζοπυριλίου (φλαβυλίου). Είναι διαλυτές στο νερό, γεγονός που διευκολύνει την ενσωμάτωσή τους σε υδατικά συστήματα τροφίμων. [Chandrasekhar et al (2012)]

Στις ουσίες αυτές οφείλονται τα χρώματα σε διάφορα φρούτα, λαχανικά και λουλούδια. Η παρουσία ανθοκυανινών συνδέεται γενικά με ελκυστικά πολύχρωμα φρούτα σε όλο τον κόσμο, όπως τα σταφύλια, οι φράουλες, τα βατόμουρα, τα σμέουρα, τα ρόδια, το μάνγκο, τα σύκα, και με λαχανικά όπως το κόκκινο λάχανο, η γλυκοπατάτα, η κόκκινη πατάτα, το κόκκινο κρεμμύδι, το ραπανάκι, το κόκκινο μαρούλι, η μελιτζάνα. Οι ανθοκυανίνες σε φρούτα και λαχανικά υπάρχουν σε γλυκοζυλιωμένες μορφές. Ανάμεσα σε διαφορετικά φυτά ή ακόμη και σε ποικιλίες του ίδιου φυτού, η συνολική περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες ποικίλλει σημαντικά και επηρεάζεται από γονίδια, φως, θερμοκρασία και αγρονομικούς παράγοντες. Οι ανθοκυανίνες μπορούν να βρεθούν σε όλα τα μέρη των φυτών. Αν και συσσωρεύονται κυρίως σε λουλούδια και φρούτα, υπάρχουν και στα φύλλα. [Chandrasekhar et al (2012), Horbowicz et al (2008)]

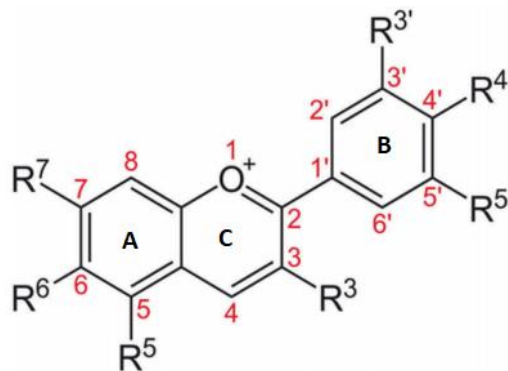
Εκτός από τα χαρακτηριστικά τους χρώματα, οι ανθοκυανίνες έχουν μια σειρά από βιολογικές ιδιότητες που αποφέρουν οφέλη για την υγεία. Τα παραδείγματα κυμαίνονται από την αναστολή της βλάβης του DNA στα καρκινικά κύτταρα in vitro, στην επαγωγή της παραγωγής ινσουλίνης σε απομονωμένα παγκρεατικά κύτταρα, στη μείωση των φλεγμονωδών αποκρίσεων, στη βελτίωση της εγκεφαλικής λειτουργίας σε μεγάλες ηλικίες και στη βελτίωση της οπτικής οξύτητας [Chandrasekhar et al (2012)]. Έχει αναφερθεί ότι οι ανθοκυανίνες είναι ωφέλιμες για την υγεία ως ισχυρά αντιοξειδωτικά. Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα εμποδίζει τα οξειδωτικά

να βλάψουν τον συνδετικό ιστό. Επιπλέον, προστατεύουν από μια ποικιλία καρδιαγγειακών παθήσεων, μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο στεφανιαίας νόσου μέσω της αναστολής της συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων, είναι δραστικές εναντίων ορισμένων ειδών καρκίνου και μπορούν να δράσουν ως αντιδιαβητικά και κατά της παχυσαρκίας. Επίσης, έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι μικροοργανισμών, ιδιαίτερα στην αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών που μεταδίδονται από τρόφιμα, ενώ εξουδετερώνουν τα ένζυμα που καταστρέφουν τον συνδετικό ιστό και επιδιορθώνουν τις κατεστραμμένες πρωτεΐνες στα τοιχώματα των αγγείων [Horbowicz et al (2008), Khoo et al (2017)].

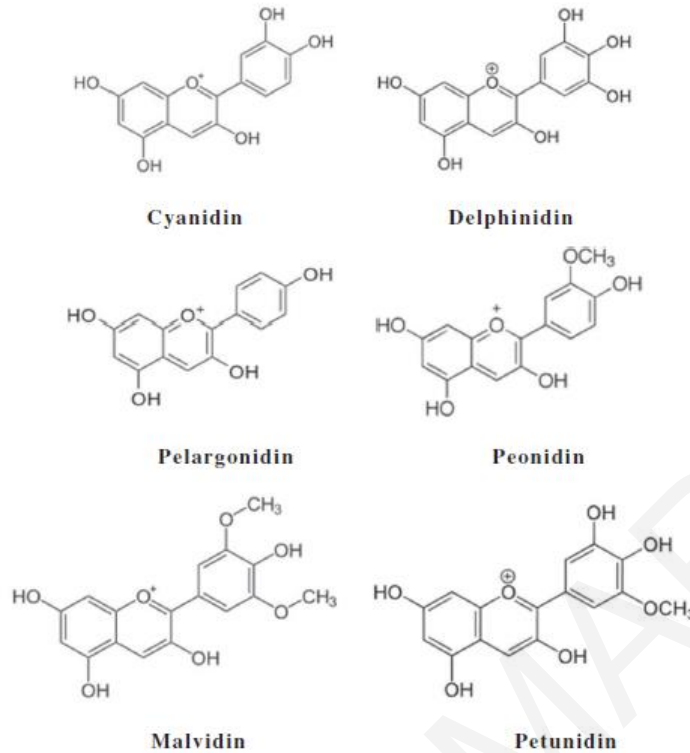
2.2.2 Χημικές δομές ανθοκυανινών

Οι ανθοκυανιδίνες είναι υδροξυλιωμένα και μεθοξυλιωμένα παράγωγα των αλάτων φαινυλ-2-βενζοπυριλίου ή φλαβυλίου, και θεωρούνται ως φλαβονοειδείς ενώσεις. Η γενική μοριακή δομή μιας ανθοκυανιδίνης φαίνεται στο Σχήμα 2.2. Η ανθοκυανιδίνη είναι γνωστή και ως αγλυκόνη. Η βασική δομή της αγλυκόνης είναι ένας σκελετός που αποτελείται από: C-6 (A-δακτύλιος) - C-3 (C-δακτύλιος) - C-6 (B-δακτύλιος) όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2.

Υπάρχουν δεκαεπτά γνωστές ανθοκυανιδίνες που απαντώνται στη φύση, αλλά μόνο έξι είναι κοινές στα ανώτερα φυτά. Αυτές είναι η κυανιδίνη (Cy), η πεονιδίνη (Pn), η πελαργονιδίνη (Pg), η μαλβιδίνη (Mv), η δελφινιδίνη (Dp) και η πετουινιδίνη (Pt). Η πιο κοινή από τις έξι είναι η κυανιδίνη. Οι δομές των κύριων ανθοκυανιδινών φαίνονται στο Σχήμα 2.3. Οι διαφορές στη χημική δομή αυτών των έξι ανθοκυανιδινών εμφανίζονται στις θέσεις 3' και 5' του δακτυλίου B.



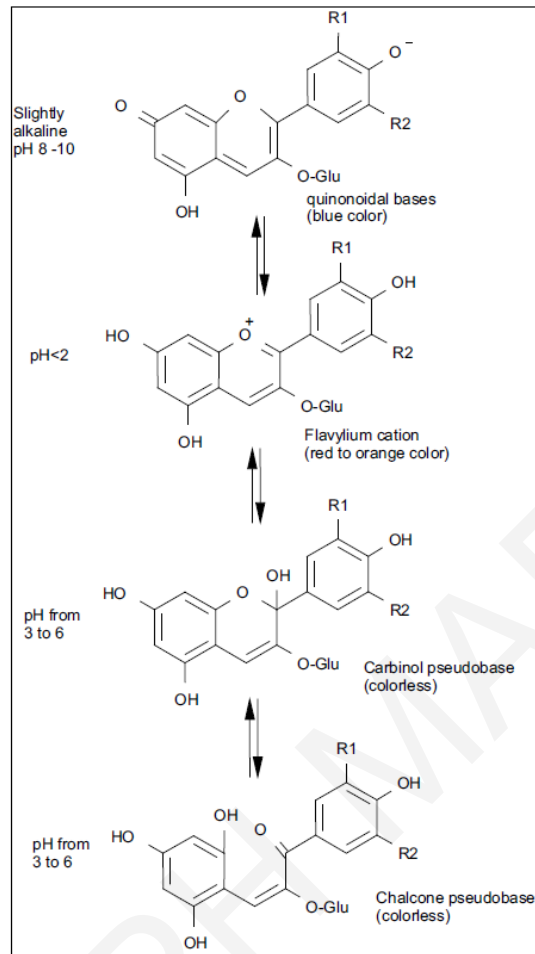
Σχήμα 2.2: Γενική μοριακή δομή ανθοκυανιδίνης [Khoo et al (2017)].



Σχήμα 2.3: Χημικές δομές των κύριων ανθοκυανιδινών [Kho et al (2017)].

Το χρώμα των ανθοκυανινών εξαρτάται από το pH του διαλύματος (Σχήμα 2.4). Αυτό συμβαίνει λόγω της μοριακής δομής των ανθοκυανινών που έχουν ιοντική φύση. Λόγω της παρουσίας οκτώ συζευγμένων διπλών δεσμών όπου κατανέμεται θετικό φορτίο, οι ανθοκυανίνες είναι έντονα κόκκινες ή πορτοκαλί κάτω από όξινες συνθήκες (για τιμές pH μικρότερες του 2), αλλά σε υψηλότερο pH είναι άχρωμες. Σε ουδέτερο pH έχουν μωβ απόχρωση και σε αλκαλικές συνθήκες το χρώμα τους μετατρέπεται σε κυανό (Σχήμα 2.5). Η ένταση και ο τύπος του χρώματος των ανθοκυανινών επηρεάζονται από τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου και μεθοξυλίου. Εάν υπάρχουν περισσότερες ομάδες υδροξυλίου, τότε το χρώμα έχει περισσότερο κυανή απόχρωση, ενώ εάν υπάρχουν περισσότερες μέθοξυ-ομάδες τότε αυξάνεται η ερυθρότητα. Σε αυξανόμενες τιμές pH σχηματίζονται η άχρωμη ψευδοβάση της καρβινόλης και οι χαλκόνες, ακολουθούμενες από το σχηματισμό ανιοντικών κινουειδών ειδών (quinoidal species) [Horbowicz et al (2008), Kho et al (2017)]. Γενικά η μεταβολή του χρώματος με το pH δεν συνδέεται μόνο με φαινόμενα πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης, αλλά και με αντιδράσεις διάνοξης ή τροποποίησης του δακτυλίου C.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2



Σχήμα 2.4: Επίδραση των συνθηκών pH στο χρώμα των ανθοκυανινών ή των προϊόντων μετατροπής τους [Horbowicz et al (2008)].

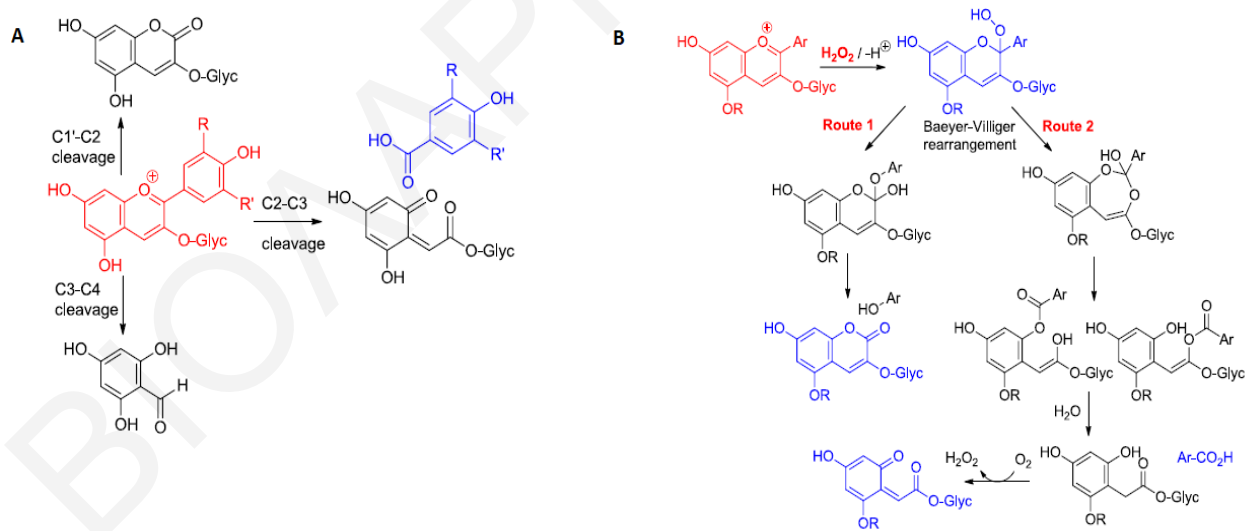


Σχήμα 2.5: Παρουσιάζεται η επίδραση του pH στο χρώμα των ανθοκυανινών (από τριαντάφυλλο) [Wahyuningsih et al (2017)].

2.2.3 Οξείδωση ανθοκυανινών

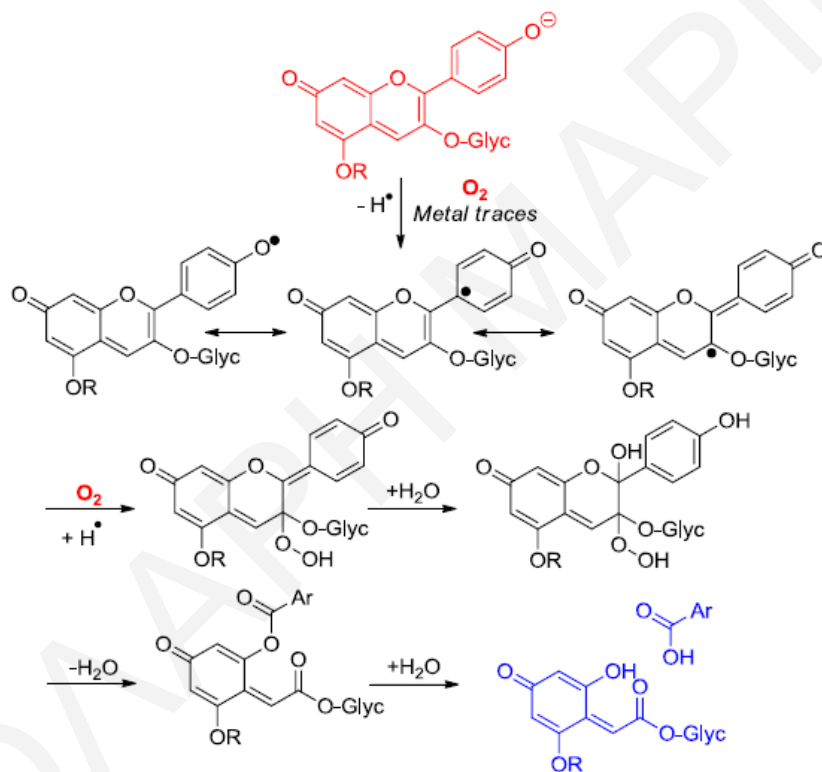
Οι ανθοκυανίνες είναι από τα λιγότερο θερμικά σταθερά φλαβονοειδή. Οι ανθοκυανιδίνες, οι αντίστοιχες αγλυκόνες, είναι στην πραγματικότητα σταθερές μόνο σε πολύ

όξινες συνθήκες και αποικοδομούνται εκτενώς σε λιγότερο από μία ώρα σε φυσιολογικές συνθήκες (pH =7.4, 37 °C). Από τη δομή των προϊόντων αποικοδόμησης, είναι σαφές ότι λειτουργεί ένας συνδυασμός υδρολυτικών και αυτοοξειδωτικών οδών, οδηγώντας σε διάσπαση των δεσμών C2 – C1', C2 – C3 και C3 – C4 (σχήμα 2.6A). Ένας μηχανισμός που περιλαμβάνει προσχηματισμένο υπεροξείδιο του υδρογόνου εξηγεί το σχηματισμό ορισμένων προϊόντων διάσπασης (Σχήμα 2.6B). Το κρίσιμο βήμα είναι η προσθήκη του H₂O₂ (ένα σκληρό πυρηνόφιλο) στο C2 του ιόντος φλαβυλίου, ακολουθούμενο από την αναδιάταξη Baeyer – Villiger, για τη διάσπαση των δεσμών C2 – C1' και C2 – C3. Ωστόσο, παραμένει ασαφές πως γίνεται ο προκαταρκτικός σχηματισμός του H₂O₂ που πρέπει να περιλαμβάνει την άμεση αυτοοξείδωση των ανθοκυανινών. Ένας εναλλακτικός μηχανισμός που αρχίζει με μεταφορά ηλεκτρονίων ή ατόμων H με την αναγνώριση ιχνών από μη αναγνωρισμένα μέταλλα μετάπτωσης από την ανιοντική ή ουδέτερη βάση στο O₂, θα έδινε μια εξαιρετικά απεντοπισμένη ρίζα, ευαίσθητη στην προσθήκη O₂ σε διαφορετικά κέντρα (Σχήμα 2.7). Η διάσπαση των ενδιάμεσων υδροϋπεροξειδίων που σχηματίζονται θα μπορούσε επίσης να ερμηνεύσει τα προϊόντα αποικοδόμησης που ανιχνεύονται. [Dangles et al (2018)]



Σχήμα 2.6: Παρουσιάζονται οι (A) πιθανές οδοί αποικοδόμησης ανθοκυανίνης με διάσπαση δεσμών (B) πιθανοί μηχανισμοί αποικοδόμησης ανθοκυανίνης με προσχηματισμένο υπεροξείδιο υδρογόνου [Dangles et al (2018)].

Παρά την πιθανή σημασία της αλληλεπίδρασης με βιοπολυμερή στη χημεία τροφίμων και στη διατροφή, η ικανότητα των ανθοκυανινών να προσδένονται σε πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες εξακολουθεί να είναι ελάχιστα τεκμηριωμένη στο μοριακό επίπεδο. Οι μελέτες πρόσδεσης επικεντρώνονται βιβλιογραφικά στις ανθοκυανίνες (γλυκοζίτες), αν και διερευνώνται συχνά οι ανθοκυανιδίνες. Πράγματι, οι αγλυκόνες είναι χημικά ασταθείς σε ελαφρώς όξινες και ουδέτερες συνθήκες και μπορεί ουσιαστικά να υποβαθμιστούν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Ωστόσο βιβλιογραφικά, δεν γίνεται έρευνα της αποικοδόμησης ή οξείδωσης της ανθοκυανίνης κατά τη διάρκεια αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια.

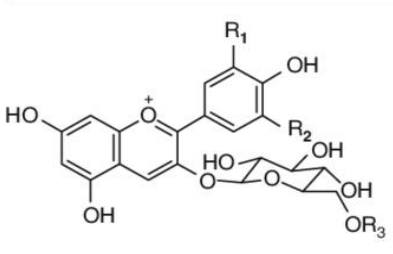


Σχήμα 2.7: Παρουσιάζονται οι πιθανοί μηχανισμοί αποικοδόμησης ανθοκυανίνης χωρίς προσχηματισμένο υπεροξειδίο υδρογόνου [Dangles et al (2018)].

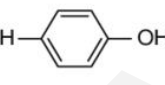
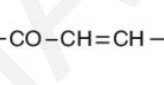
2.2.4 Απομόνωση ανθοκυανινών από φυτικά προϊόντα

Οι φυσικές πηγές των ανθοκυανινών είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, τα λουλούδια, τα φύλλα και οι ρίζες των φυτών. Οι ανθοκυανιδίνες σε φρούτα και λαχανικά υπάρχουν ως γλυκοζυλιωμένες μορφές (ανθοκυανίνες) οι οποίες είναι συνδεδεμένες με γλυκόζη, γαλακτόζη,

αραβινόζη, ρουτινόζη, σαμπουβιόζη (sambubiose), σοφορόζη (sophorose) και μερικές φορές με την προσθήκη ακετυλίου (acetyl), καφεοϋλίου (caffeoyl), διοξαλίου(dioxyalyl), μαλονυλίου (malonyl), κουμαροϋλίου (coumaroyl), όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.8. [Corona et al (2011), Ramawat et al (2013)]



Ανθοκυανίνες	R ₁	R ₂
Cyanidin-3-O-glucoside	OH	H
Delphinidin-3-O-glucoside	OH	OH
Paeonidin-3-O-glucoside	OCH ₃	H
Petunidin-3-O-glucoside	OCH ₃	OH
Malvidin-3-O-glucoside	OCH ₃	OCH ₃

R ₃ : —CO—CH ₃	—CO—CH=CH— 	—CO—CH=CH— 
(-acetyl)	(-p-coumaroyl)	(-caffeoyl)

Σχήμα 2.8: Χημικές δομές 3-O-γλυκοζυλιωμένων ανθοκυανινών με την προσθήκη ακετυλίου, κουμαροϋλίου και καφεοϋλίου στον γλυκοζιτικό δακτύλιο [Ramawat et al (2013)].

Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται η συνολική περιεκτικότητα της ανθοκυανίνης και οι κύριες ανθοκυανιδίνες σε φυσικές πηγές. Γενικά, το επίπεδο των ανθοκυανινών στα φρούτα είναι πολύ υψηλότερο από ό,τι στα λαχανικά. Μεταξύ των φρούτων που είναι πλουσιότερα σε ανθοκυανίνες είναι διάφορα μούρα και οι μαύρες σταφίδες. Υπάρχει μόνο ένα λαχανικό που περιέχει υψηλό επίπεδο ανθοκυανινών, η μελιτζάνα. Οι περισσότερες πηγές περιέχουν περιορισμένο αριθμό χρωστικών ανθοκυανίνης (όπως τα δαμάσκηνα), αλλά ορισμένες πηγές (όπως τα κόκκινα σταφύλια), μπορεί να περιέχουν ένα μίγμα με περισσότερες από 20 χρωστικές.

Στα φυτά είναι κοινές οι ακόλουθες τρεις κατηγορίες γλυκοζιτών ανθοκυανιδίνης (anthocyanidin glycosides): οι 3-μονογλυκοζίτες, οι 3-διγλυκοζίτες και οι 3,5-διγλυκοζίτες. Οι 3-γλυκοζίτες εμφανίζονται περίπου δυόμισι φορές συχνότερα από τους 3,5-διγλυκοζίτες. Η 3-cyanidin-glucoside είναι η πιο διαδεδομένη ανθοκυανίνη που προσδιορίζεται στα φρούτα και λαχανικά [Horbowicz et al (2008)]. Στα φυτά, η 3-γλυκοζυλιωμένη κυανιδίνη σχηματίζεται λόγω

του χαμηλού pH. Για αυτό και όλα τα μούρα (όξινης φύσης) περιέχουν γλυκοζίτες κυανιδίνης. Η μαλβιδίνη, η πεονιδίνη και η πετουνιδίνη βρίσκονται σε μεθυλιωμένες μορφές και συνήθως δεν απαντώνται στα κόκκινα μούρα αλλά στα φρούτα με μπλε χρώμα. Γενικά η μεθυλιωμένη ανθοκυανιδίνη παρέχει μικρότερη ερυθρωπή χρώση (reddening effect) από τη μη μεθυλιωμένη δομή. [Kho et al (2017)]

Πίνακας 2.1: Συνολική περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνες και οι κύριες ανθοκυανιδίνες σε φυσικές πηγές.

Πηγή: Φρούτο ή λαχανικό	Συνολική περιεκτικότητα σε ανθοκυανίνη (mg/kg)	Κύρια Ανθοκυανιδίνη (mg/100g)					
		Cy	Pg	Mv	Pt	Pn	Dp
Βατόμουρο (Blackberry)	820 - 1800	90.3	0.2				
Μύρτιλο (Blueberry)	825 - 5300	17.0		61.4	26.4	11.4	47.4
Elderberry	2000 - 15600	758.5	1.1				
Chokeberry	5060 - 10000	435.8	1.4				
Cranberry	460 - 2000	41.8		0.3		42.1	7.7
Bilberry	4600	112.6		54.4	51.1	51.1	161.9
Raspberry (red)	100-600	35.8	1.9	0.7			0.3
Raspberry (black)	763-4277	323.5					
Κεράσι (sweet)	3500 - 4500	75.2	0.5			4.5	
Κεράσι (sour)	3500-4500	6.6 (?)					
Φράουλα	127 - 360	2.0	31.3				0.3
Δαμάσκηνα	19-250	39.7					

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Κόκκινο σταφύλι	300-7500	1.5	1.1	34.7	2.9	2.1	3.7
Μαύρη σταφίδα	1300 - 4000	85.6	1.2		3.9	0.7	181.1
Κόκκινο κρεμμύδι	Μέχρι 250	6.2				1.2	2.3
Κόκκινο λάχανο	250	72.9					0.1
Μελιτζάνα (eggplant)	7500						13.8
Ραπανάκι	110 - 600		25.7				

Η απομόνωση των ανθοκυανινών μπορεί να πραγματοποιηθεί από πολλές φυσικές πηγές, αλλά το κύριο πρόβλημα με όλες τις ανθοκυανίνες είναι η αστάθειά τους κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση. Οι συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης ανθοκυανινών από φυτικό υλικό δεν παρουσιάζουν εκλεκτικότητα και αποδίδουν διαλύματα χρωστικής με μεγάλες ποσότητες υποπροϊόντων, όπως τα σάκχαρα, τα οργανικά οξέα και οι πρωτεΐνες. Μερικές από αυτές τις ακαθαρσίες μπορεί να επιταχύνουν την αποικοδόμηση της ανθοκυανίνης κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή να προκαλέσουν προβλήματα σε περαιτέρω στάδια επεξεργασίας, όπως η ξήρανση με ψεκασμό (spray drying) [Chandrasekhar et al (2012)].

Οι αποτελεσματικές μέθοδοι εκχύλισης θα πρέπει να μεγιστοποιούν την ανάκτηση των ανθοκυανινών με ελάχιστη ποσότητα πρόσθετων ουσιών και ελάχιστη αποικοδόμηση ή αλλοίωση της φυσικής τους κατάστασης. Αρκετές μέθοδοι που χρησιμοποιούν διαλύτες, όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη και η ακετόνη για την εκχύλιση της ανθοκυανίνης είναι αποτελεσματικές. Ωστόσο, ορισμένοι από τους χρησιμοποιούμενους διαλύτες όπως η μεθανόλη και η ακετόνη, μπορεί να είναι τοξικοί για την ανθρώπινη υγεία. Η προσρόφηση είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τον καθαρισμό των χρωστικών ανθοκυανίνης σε ένα μόνο στάδιο, επιτυγχάνοντας παράλληλα την απομάκρυνση των πολικών, μη φαινολικών προσμίξεων.

Συμπερασματικά, οι ανθοκυανίνες απομονώνονται από τις πηγές ως ακατέργαστο μίγμα. Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των ανθοκυανινών μπορεί να γίνει με διάφορες αναλυτικές, χρωματογραφικές μεθόδους. Κάποιες από αυτές είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography-TLC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (CE), η χρωματογραφία ζεύγους ιόντων αντίστροφης φάσης (reversed-phase ion-pair chromatography), η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-vis) και η αέρια χρωματογραφία. Εκτός από τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των ανθοκυανινών, η ποσοτικοποίηση αυτών των ενώσεων γίνεται συνήθως με διάφορες χρωματογραφικές μεθόδους και η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης [Khoon et al (2017)].

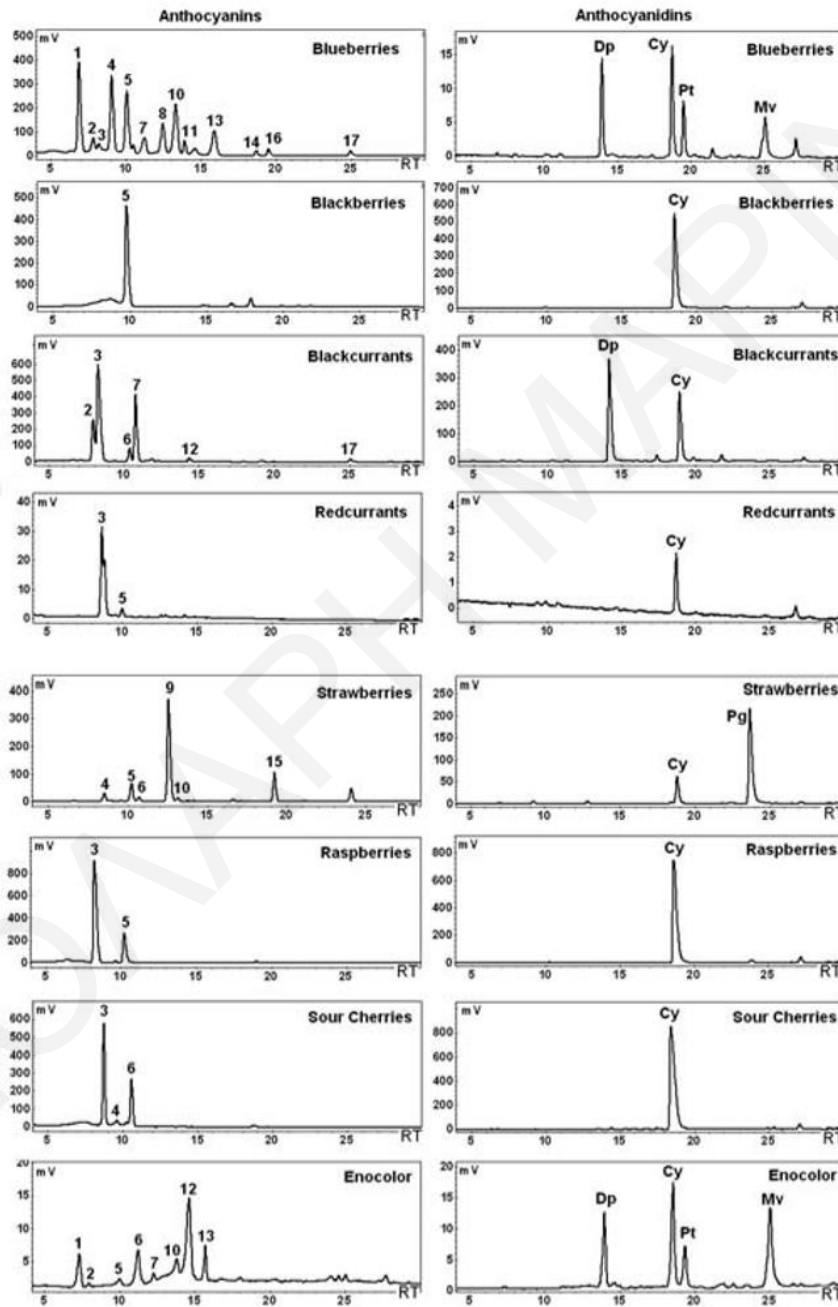
Η άμεση εκχύλιση και ανάλυση τροφίμων για την περιεκτικότητά τους σε ανθοκυανίνη συχνά αποδίδει πολύπλοκα χρωματογραφήματα με πολλές άγνωστες κορυφές, δυσκολεύοντας έτσι την ακριβή ποσοτικοποίηση. Στο Σχήμα 2.9 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα χρωματογραφήματος HPLC ανθοκυανινών και ανθοκυανιδινών που απομονώθηκαν από φρούτα. Οι κύριες ανθοκυανιδίνες που βρέθηκαν στα μελετημένα φρούτα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.9, τα blueberries περιέχουν το πιο πολύπλοκο μίγμα ανθοκυανινών, με κύριες τις Dp-3-galactozide (1), Dp-3-arabinozide (4), Cy-3-glucozide (5), Pt-3-glucozide (8), Pn-3-galactozide (10) και Mn-3-galactozide (13) και τέσσερις ταυτοποιημένες ανθοκυανιδίνες την δελφινιδίνη, την κυανιδίνη, την πετουνιδίνη και την μαλβιδίνη. Στα blackberries η κυρίαρχη ανθοκυανίνη είναι η Cy-3-glc (5) και η αντίστοιχη ανθοκυανιδίνη είναι η κυανιδίνη. [Filip et al (2012)]

Πίνακας 2.2: Κύριες ανθοκυανιδίνες στα φρούτα από χρωματογραφήματα HPLC.

Φρούτα	Κύριες Ανθοκυανιδίνες
Blueberries	Δελφινιδίνη, Κυανιδίνη, Πετουνιδίνη, Μαλβιδίνη
Blackberries	Κυανιδίνη
Blackcurrants	Δελφινιδίνη, Κυανιδίνη
Redcurrants	Κυανιδίνη
Strawberries	Κυανιδίνη, Πελαργονιδίνη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Raspberries	Κυανιδίνη
Sour cherries	Κυανιδίνη
Enocolor	Δελφινιδίνη, Κυανιδίνη, Πετουνιδίνη, Μαλβιδίνη



Σχήμα 2.9: Χρωματογραφήματα HPLC ανθοκυανινών και ανθοκυανιδινών που λήφθηκαν από φρούτα [Filip et al (2012)].

2.2.5 Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των ανθοκυανινών

2.2.5.1 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού

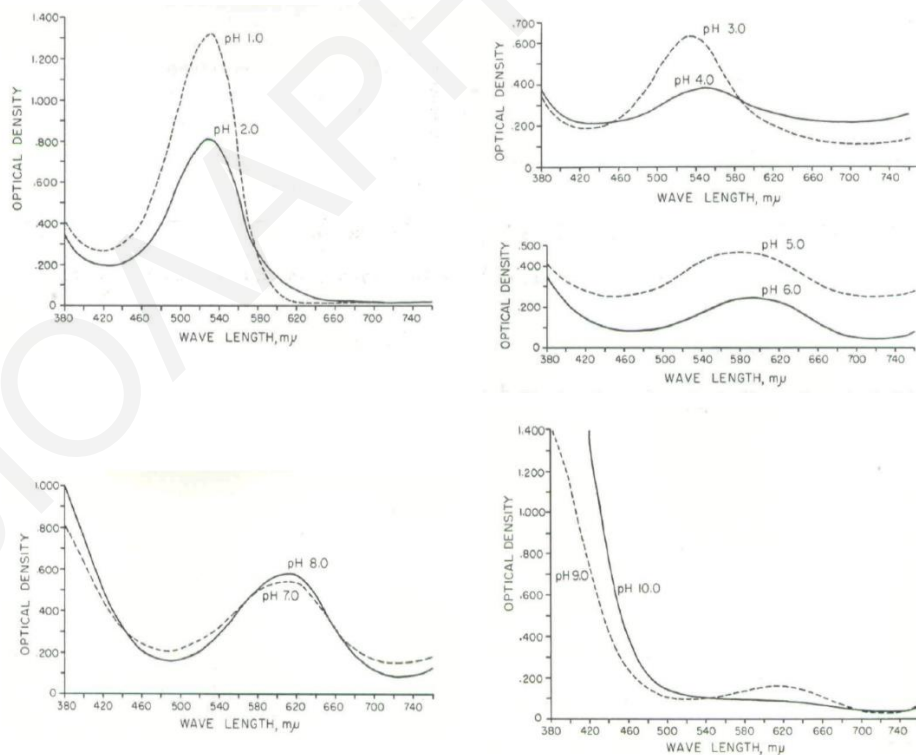
Η φασματοφωτομετρία απορρόφησης UV-Vis των ανθοκυανινών είναι μία από τις πιο διαδεδομένες φασματοσκοπικές μεθόδους για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των ανθοκυανινών, την μελέτη των δομικών αλλαγών υπό την επίδραση διαφορετικών φυσικοχημικών παραγόντων και για τον προσδιορισμό των παραμέτρων ισορροπίας μεταξύ των διαφορετικών μορφών αυτών των ενώσεων, όπως η ισορροπία οξέος-βάσης και η ισορροπία των ταυτομερών μορφών (tautomeric forms) [Drabent et al (1999), Drabent et al (2007)]. Το φάσμα απορρόφησης UV-vis μιας ανθοκυανίνης μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη φύση της ανθοκυανιδίνης, τη μορφή γλυκοζυλίωσης και την πιθανότητα ακυλίωσης. Οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος απορρόφησης στο κυανό άκρο του ορατού φάσματος, με τη μέγιστη απορρόφηση να παρατηρείται στις περιοχές 500-535 nm [Shipp et al (2010)]. Από τα φάσματα UV-vis μπορούν να ταυτοποιηθούν ορισμένες από τις ανθοκυανιδίνες. Το μέγιστο μήκος κύματος για ενώσεις με βάση την πελαργονιδίνη έχει παρατηρηθεί περίπου στα 502-506 nm, για την κυανιδίνη στα 512-520 nm, για την πεονιδίνη στα 517-520 nm, για τη δελφινιδίνη στα 525 nm, για την πετουνιδίνη στα 526-529 nm και για την μαλβινιδίνη στα 530 nm [Shipp et al (2010)]. Γενικά στα 270-300 nm απορροφά η αρωματική ομάδα, ενώ στην περιοχή των 526 nm υπάρχει απορρόφηση από συζευγμένους διπλούς δεσμούς και γι' αυτό στα 526 nm διακρίνονται οι διάφοροι τύποι των ανθοκυανιδινών. [Wahyuningsih et al (2017)]

2.2.5.1.1 Φασματικές αλλαγές των ανθοκυανινών ανάλογα με το pH

Γενικά, οι χρωστικές της ανθοκυανίνης συνήθως ποικίλλουν στο χρώμα ανάλογα με το pH και κυμαίνονται από ερυθρό σε όξινο διάλυμα, μωβ σε ουδέτερο pH έως μπλε σε αλκαλικό διάλυμα. Το κόκκινο χρώμα οφείλεται στο άλας οξονίου της χρωστικής, ενώ το μωβ και το μπλε χρώμα σχετίζονται με το σχηματισμό κινόνης στον δακτύλιο C. Η μωβ περιοχή συνήθως θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει την κινουειδής βάση και η μπλέ περιοχή το άλας της βάσης. Ο Fuld (1905) ανακάλυψε ότι η χρωστική του κόκκινου λάχανου έχει τις ιδιότητες ενός δείκτη pH. Στην ανθοκυανίνη του κόκκινου λάχανου, η σύσταση είναι πιο περίπλοκη και ασυνήθιστη από άλλα εκχυλίσματα ανθοκυανίνης, λόγω της ύπαρξης των επιπλέον περιοχών του πράσινου και

του κίτρινου χρώματος [Wolf et al (1956)]. Αυτή η μεγάλη ποικιλία χρωμάτων από τα εκχυλίσματα του κόκκινου λάχανου μπορεί να οφείλεται στο μείγμα ουσιών που συνυπάρχουν.

Στο Σχήμα 2.10 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης του κόκκινου λάχανου σε διάφορα pH και στον Πίνακα 2.3 καταγράφονται οι χρωματικές αλλαγές ανάλογα με το pH, από την μελέτη των Wolf et al (1956). Στο pH=1 υπάρχει πολύ έντονη απορρόφηση στα 530 nm. Στο pH=2 δεν υπάρχει μετατόπιση στη θέση αυτής της κορυφής, αλλά υπάρχει μείωση στο ύψος της κορυφής. Στο pH=3 το ύψος της κορυφής απορρόφησης έχει μειωθεί περαιτέρω και η θέση της μέγιστης απορρόφησης αρχίζει να μετατοπίζεται ελαφρώς προς την ερυθρή περιοχή. Σε pH=4 η μετατόπιση προς την ερυθρή περιοχή είναι πιο εμφανής και η μέγιστη απορρόφηση είναι στα 545 nm. Με περαιτέρω αύξηση του pH, η κορυφή απορρόφησης αυξάνεται περαιτέρω και μετατοπίζεται προς το ερυθρό άκρο του φάσματος, και στο pH=9 η κορυφή βρίσκεται στα 615 nm. Σε pH=10 συνοδευόμενη από την αλλαγή χρώματος της ανθοκυανίνης από πράσινο σε κίτρινο, αυτή η κορυφή απορρόφησης έχει εξαλειφθεί και η μέγιστη απορρόφηση εμφανίζεται τώρα σε πολύ μικρότερα μήκη κύματος, κάτω από 420 nm. [Wahyuningsih et al (2017), Wolf et al (1956)].



Σχήμα 2.10: Φάσματα απορρόφησης κόκκινου λάχανου σε διάφορα pH. [Wolf et al (1956)]

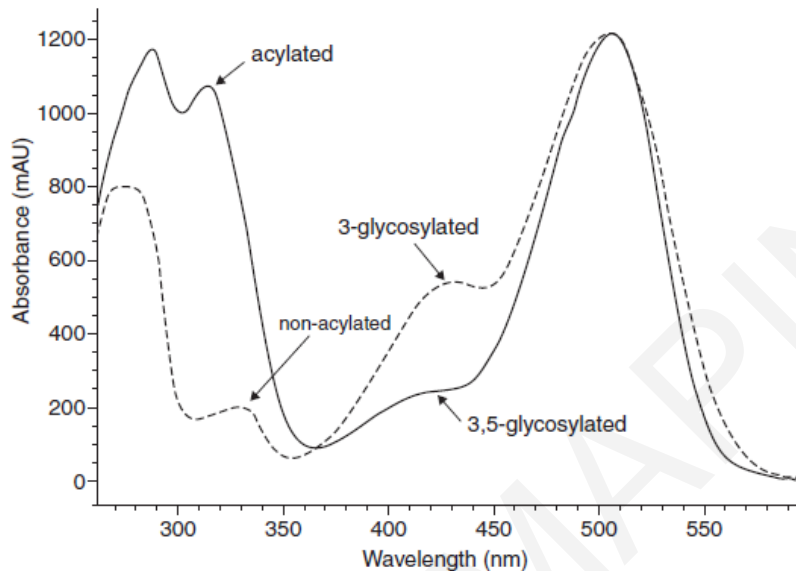
Πίνακας 2.3: Τα χρώματα και τα μέγιστα απορρόφησης της χρωστικής της ανθοκυανίνης του κόκκινου λάχανου ως συνάρτηση του pH. [Wolf et al (1956)]

pH	Χρώμα διαλύματος	Μέγιστη απορρόφηση (nm)
1	Κόκκινο	530
2	Κόκκινο	530
3	Σκούρο κόκκινο (purplish red)	535
4	Μπορντό (reddish purple)	545
5	Μωβ	580
6	Μπλέ	590
7	Μπλέ	605
8	Γαλαζοπράσινο	610
9	Πράσινο	615
10	Κίτρινο	<420

2.2.5.1.2 Προσδιορισμός γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης

Σημαντικά δομικά χαρακτηριστικά των ανθοκυανινών μπορούν να ληφθούν από φασματικά δεδομένα, συμπεριλαμβανομένων της φύσης της αγλυκόνης (ανθοκυανιδίνη), της θέσης προσκόλλησης του σακχάρου στην ανθοκυανιδίνη και πληροφορίες σχετικά με την ακυλίωση από αρωματικά οργανικά οξέα [Harborne (1958), Hong et al (1990)]. Οι πληροφορίες αυτές λαμβάνονται με τη λήψη φασμάτων των ανθοκυανινών σε οξιμισμένη μεθανόλη. Από το Σχήμα 2.11 φαίνεται ότι μπορεί να προσδιοριστεί η ακυλίωση στο C-δακτύλιο λαμβάνοντας το λόγο των απορροφήσεων $A_{acyl-max}/A_{vis-max}$ [Harborne (1958), Durst et al (2001)]. Συγκεκριμένα, το $A_{acyl-max}$ είναι η κορυφή στα 310-320 nm. Αν ο λόγος αυτών των απορροφήσεων είναι πολύ χαμηλός τότε δεν υπάρχει ακυλίωση. Αν ο λόγος είναι 0.5-0.7 (48-71%) τότε υπάρχει μια ομάδα ακυλίου (48-71%), ενώ αν ο λόγος είναι 0.8-1.1 (83-107%) τότε υπάρχουν δύο ομάδες ακυλίου. Η ακυλίωση γίνεται συνήθως με υδροξυλιωμένο αρωματικό οργανικό οξύ. Αν δεν υπάρχει κορυφή σε αυτή την περιοχή τότε δεν υπάρχει ακυλίωση (με κινναμικό οξύ). Εκτός από την ακυλίωση με κινναμικό οξύ, οι ανθοκυανίνες ακυλιώνονται και με οξικό ή μαλωνικό οξύ. Ανίχνευση τέτοιας ακυλίωσης δεν είναι δυνατή μέσω απορρόφησης στο UV, επειδή οι ομάδες αυτές δεν έχουν χαρακτηριστική απορρόφηση. Από το Σχήμα 2.11 μπορεί επίσης να προσδιοριστεί η 3-έναντι της 3,5-γλυκοζυλίωσης, συγκεκριμένα από το λόγο των απορροφήσεων $A_{440}/A_{vis-max}$. Αν ο λόγος είναι ≥ 0.3 το μόριο είναι 3-γλυκοζυλιωμένο (το

υδροξύλιο στη θέση 5 είναι ελεύθερο), ενώ εάν ο λόγος είναι <0.2 τότε το μόριο είναι 3,5-διγλυκοζυλιωμένο.



Σχήμα 2.11: Πρότυπα φάσματα των -3-γλυκοζυλιωμένων (μη ακυλιωμένων, διακεκομμένη γραμμή) και -3,5 γλυκοζυλιωμένων (ακυλιωμένων, συνεχόμενη γραμμή) χρωστικών. [Durst et al (2001)]

2.2.5.1.3 Μέθοδος διαφορικού pH – Υπολογισμός συγκέντρωσης ανθοκυανινών

Όπως προαναφέρθηκε οι ανθοκυανίνες υφίστανται αναστρέψιμους δομικούς μετασχηματισμούς με μεταβολή στο pH που εκδηλώνονται με μεταβολές στα φάσματα απορρόφησης. Η έγχρωμη μορφή οξονίου υπερισχύει σε pH 1.0 και η άχρωμη μορφή ημικετάλης (hemiketal) υπερισχύει σε pH 4.5. Το φαινόμενο αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον ακριβέστερο ποσοτικό προσδιορισμό των ανθοκυανινών. Από τη μέθοδο διαφορικού pH επιτρέπεται η σχετικά ακριβής μέτρηση των συνολικών ανθοκυανινών, ακόμη και παρουσία πολυμερισμένων και αποικοδομημένων χρωστικών και άλλων ενώσεων που μπορεί να παρεμβάλλονται φασματικά.

Ένα ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου/HCl με τιμή pH=4.5 και ένα ρυθμιστικό διάλυμα KCl/HCl με τιμή pH=1.0 χρησιμοποιούνται στη φασματοφωτομετρική ανάλυση. Η απορρόφηση που προκαλείται από τις ανθοκυανίνες στο δείγμα υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\Delta A = (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH}_{1.0}} - (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH}_{4.5}} \quad \text{(Εξίσωση 2.1)}$$

Το $A_{\lambda_{\max}}$ είναι η απορρόφηση στο μέγιστο μήκος κύματος (για παράδειγμα: 530 nm) και η τιμή A_{700} αφαιρείται για να μηδενιστεί η επίδραση της παρουσίας διαφόρων φαινολικών και άλλων ουσιών. [Fuleki et al 1968, Nicoué et al (2007)]

Η συγκέντρωση της ανθοκυανίνης στη συνέχεια εκτιμάται μέσω της εξίσωσης [Fuleki et al 1968]:

$$\text{Συγκέντρωση της χρωστικής ανθοκυανίνης (mg/L)} = \frac{\Delta A * M_w * DF * 10^3}{\epsilon * L} \quad \text{(Εξίσωση 2.2)}$$

Όπου:

M_w : Μοριακή μάζα ανθοκυανίνης (449.2 g/mol) (cyanidine 3-glucoside)

DF : Συντελεστής αραιώσης (dilution factor)

ϵ : Συντελεστής απόσβεσης για την μορφή cyanidine 3-glucoside που επικρατεί στο pH του συστήματος = 26.900 L/cm* mol

L : μήκος διαδρομής (path length) (1cm)

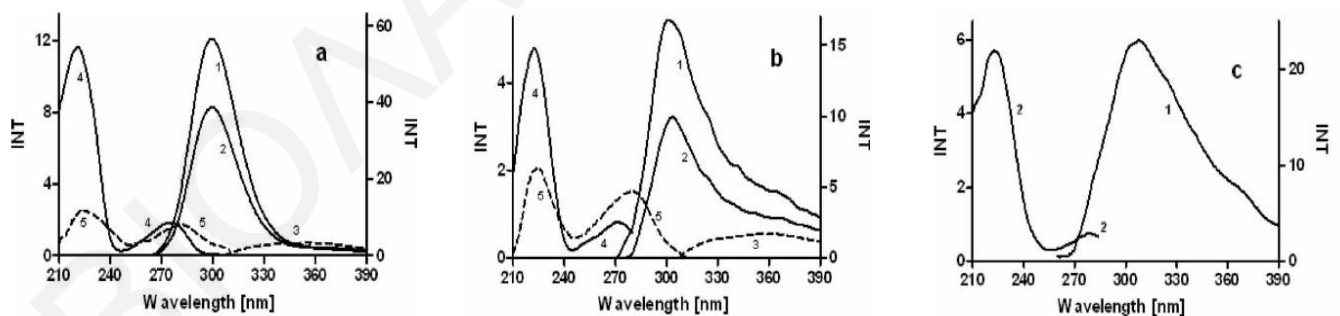
10^3 : συντελεστής για μετατροπή από g σε mg

2.2.5.2 Φασματοσκοπία φθορισμού

Ορισμένες ανθοκυανίνες παρουσιάζουν μετρήσιμο φθορισμό, αλλά οι πληροφορίες σχετικά με αυτό το θέμα στη βιβλιογραφία είναι λιγοστές. Μελέτη των *Drabent et al (1999)* για τον φθορισμό εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου, που περιέχει κυρίως παράγωγα κυανιδίνης, έδειξε ότι οι άχρωμες ενώσεις που υπάρχουν σε αυτά τα εκχυλίσματα εμφανίζουν φθορισμό και συγκεκριμένα ότι αυτή η εκπομπή (emission) εξαρτάται από το pH. Η εκπομπή φθορισμού των ανθοκυανινών έχει συνήθως διερευνηθεί χρησιμοποιώντας διέγερση στην ορατή περιοχή και κοντά στην υπεριώδη ακτινοβολία, δηλαδή στο μήκος κύματος διέγερσης, $\lambda_{\text{exc}} > 270$ nm. Η χαμηλή κβαντική απόδοση φθορισμού, ειδικά των χρωματισμένων μορφών των ανθοκυανινών, είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους εφαρμόζεται σπάνια για αναλυτικούς λόγους.

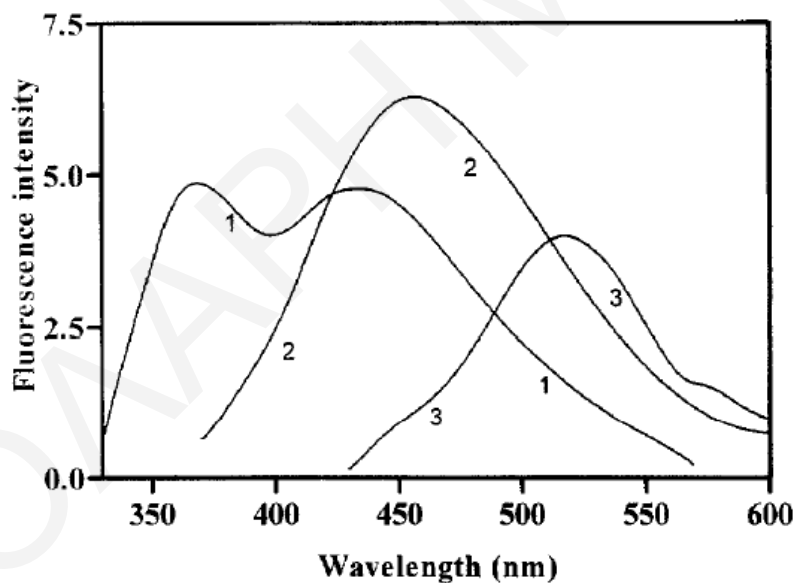
Τα άρθρα που δημοσιεύθηκαν μέχρι στιγμής περιγράφουν τον φθορισμό διαφόρων μορφών ανθοκυανινών σε υδατικό περιβάλλον σε διάφορα pH [*Drabent et al (1999)*, *Drabent et al (2007)*, *Pliszka et al (2001)*, *Rakic et al (2015)*]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι χαλκόνες έχουν εκπομπές φθορισμού στο φασματικό εύρος 420–450 nm (λ_{exc} 320–340 nm), ενώ η ημιακεταλική μορφή (B) στα 370 nm. Το κατιόν φλαβυλίου εμφανίζει ασθενή εκπομπή φθορισμού στο φασματικό εύρος 570-620 nm (λ_{exc} =520 nm) και η κινουειδής βάση ως ανιόν έχει φάσματα εκπομπής φθορισμού στην περιοχή των 600-665 nm [*Rakic et al (2015)*].

Ένα παράδειγμα μελέτης των *Drabent et al (2007)* για τον φθορισμό της γλυκοζυλιωμένης και διγλυκοζυλιωμένη κυανιδίνης σε συνθήκες pH=5, παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.12. Συγκεκριμένα οι ερευνητές πραγματοποίησαν διέγερση της Cyanidin-3-glucoside (σε διαλύτη νερό-μεθανόλη σε pH 5) στην περιοχή των 210-290 nm, με πιο αποτελεσματική την διέγερση στα $\lambda_{exc}=220-230$ nm και $\lambda_{exc}=280-290$ nm. Διαπίστωσαν ότι η Cy-3-glc εμφανίζει φθορισμό μικρού μήκους κύματος με μέγιστο σε $\lambda_{max}^{fl}=299$ nm (σχήμα 2.12(a), καμπύλες 1 και 2) και φθορισμό μεγάλου μήκους κύματος χαμηλότερης έντασης με μέγιστο περίπου στα 356 nm (σχήμα 2.12(a), καμπύλη 3). Τα φάσματα διέγερσης φθορισμού, που παρακολουθήθηκαν στα 320 nm, δείχνουν μέγιστα στα 275 nm και 220 nm (σχήμα 2.12(a), καμπύλη 4). Το μέγιστο διέγερσης του φθορισμού μεγάλου μήκους κύματος ($\lambda_{max}^{fl} = 356$ nm) παρατηρείται σε περίπου $\lambda_{exc} = 282$ nm (σχήμα 2.12(a), καμπύλη 5), αλλά η πιο επιλεκτική διέγερση αυτής της ζώνης επιτυγχάνεται σε $\lambda_{exc} = 290$ nm. Η Cy 3-glc σε νερό παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά φθορισμού με αυτά του διαλύτη νερό-μεθανόλη στο ίδιο pH (σχήμα 2.12(b)). Το Σχήμα 2.12(c) παρουσιάζεται το φάσμα φθορισμού (καμπύλη 1) και το φάσμα διέγερσης φθορισμού (καμπύλη 2) της Cy 3,5-diglucoside. Αυτή η ένωση χαρακτηρίζεται επίσης από έναν φθορισμό μικρού μήκους κύματος με κορυφή στα 308 nm (Εικ. 2.12c, καμπύλη 1). Το φάσμα διέγερσης φθορισμού εμφανίζει δύο μέγιστα, στα 220 nm και περίπου 280 nm (σχήμα 2.12(c), καμπύλη 2).



Σχήμα 2.12: Φάσματα φθορισμού (δεξιά άξονας) και φάσματα διέγερσης φθορισμού (αριστερός άξονας) της Cy 3-glc και της Cy 3,5-diglucoside. a) Cy 3-glc σε διαλύτη (νερό-μεθανόλη, 1: 1, v / v, pH 5). φάσματα φθορισμού: (1) $\lambda_{exc}=220$ nm, (2) $\lambda_{exc}=230$ nm, (3) $\lambda_{exc}=290$ nm και φάσματα διέγερσης φθορισμού: (4) $\lambda_{exc}=320$ nm, (5) $\lambda_{exc}=360$ nm. (b) Cy 3-glc σε νερό, pH 5 · φάσματα φθορισμού: (1) $\lambda_{exc}=220$ nm, (2) $\lambda_{exc}=230$ nm, (3) $\lambda_{exc}=285$ nm και φάσματα διέγερσης φθορισμού: (4) $\lambda_{exc}=300$ nm, (5) $\lambda_{exc}=360$ nm. (c) Cy 3,5-diglc σε διαλύτη νερό-μεθανόλη, pH 5 · φάσματα φθορισμού: (1) $\lambda_{exc}=220$ nm και φάσμα διέγερσης φθορισμού: (2) $\lambda_{exc}=300$ nm. INT: ένταση φθορισμού (a.u.). [Drabent et al (2007)]

Ένα δεύτερο παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των *Drabent et al (1999)*. Οι ερευνητές μελέτησαν τα φάσματα φθορισμού εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου με διέγερση στην περιοχή των $280 \text{ nm} \leq \lambda_{\text{ex}} \leq 540 \text{ nm}$. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων έδειξαν ότι με διέγερση στην περιοχή των 460-540 nm, οι ανθοκυανίνες δεν εκπέμπουν φθορισμό. Αντ' αυτού, με διέγερση στα $\lambda_{\text{ex}} \leq 460 \text{ nm}$ το εκχύλισμα εμφανίζει ξεκάθαρα φθορισμό. Τα φάσματα φθορισμού του εκχυλίσματος του κόκκινου λάχανου με διέγερση στα 300, 340 και 410 nm παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.13. Τα φάσματα διαφέρουν σημαντικά για διεγέρσεις στα 300 και 410 nm (σχήμα 2.13, καμπύλες 1 και 3). Ο χαρακτήρας αυτών των φασμάτων εκπομπής υποδεικνύει ότι μπορούν να διακριθούν τουλάχιστον τρεις ζώνες φθορισμού στο εξεταζόμενο εκχύλισμα. Από την άλλη πλευρά, η καμπύλη 2 στο σχήμα 2.13 μπορεί να θεωρηθεί ως αποτέλεσμα της επικάλυψης διαφορετικών φασμάτων φθορισμού (συμπεριλαμβανομένων των καμπυλών 1 και 3). [*Drabent et al (1999)*]



Σχήμα 2.13: Φάσματα φθορισμού των ανθοκυανινών εκχυλίσματος κόκκινου λάχανου για διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης: $\lambda_{\text{ex},1}=300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex},2}= 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex},3} = 410 \text{ nm}$. [*Drabent et al (1999)*]

Όπως είναι γνωστό, ο φθορισμός των χρωστικών σε διαλύματα λαμβάνει χώρα από τη χαμηλότερης ενέργειας διεγερμένη κατάσταση S_1 , και το φάσμα φθορισμού μετατοπίζεται προς

μεγαλύτερο μήκος κύματος σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης $S_0 \rightarrow S_1$. Σε διαλύματα που περιέχουν μία φθορίζουσα ουσία το φάσμα φθορισμού χαρακτηρίζεται από μία ζώνη (band), η θέση της οποίας σε σχέση με το μήκος κύματος δεν εξαρτάται από το μήκος κύματος διέγερσης, λ_{ex} . Ωστόσο, εάν η διέγερση του δείγματος με διαφορετικό λ_{ex} οδηγεί σε φθορισμό σε διαφορετικές φασματικές περιοχές ή το φάσμα φθορισμού περιέχει πολλές διακριτές ζώνες, αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχουν αρκετές φθορίζουσες ενώσεις στο δείγμα ή ότι γενικότερα υπάρχουν διάφορα είδη φθορισμού. Ο διαχωρισμός του φθορισμού συγκεκριμένων ειδών είναι δύσκολος για πολλούς λόγους όπως : η αλληλεπικάλυψη των φασμάτων φθορισμού, οι κοινές περιοχές διέγερσης δύο ή περισσότερων ειδών, τα φαινόμενα απορρόφησης (re-absorption) και εκπομπής (re-emission), η μεταφορά ενέργειας συντονισμού, η απόσβεση, ο διπλός (dual) φθορισμός. Στις προηγούμενες μελέτες φθορισμού των ανθοκυανινών, οι δυσκολίες που συνδέονται με τον κατάλληλο διαχωρισμό των ζωνών φθορισμού σχετίζονται με τους δύο πρώτους λόγους, επειδή τα ληφθέντα αποτελέσματα [Drabent et al (1999)] υποδεικνύουν μια σαφή αλληλεπικάλυψη των φασμάτων φθορισμού και ύπαρξη κοινών περιοχών διέγερσης διαφορετικών ειδών (σχήμα 2.13). Τα φάσματα φθορισμού των ανθοκυανινών δείχνουν ότι τα ληφθέντα εκχυλίσματα περιέχουν πολλά φθορίζοντα συστατικά, τα οποία μπορεί να είναι διαφορετικές ενώσεις ανθοκυανίνης, άλλες φθορίζουσες ενώσεις που υπάρχουν στα εκχυλίσματα, διαφορετικές ιοντικές και ταυτομερείς μορφές αυτών των ενώσεων, ή διαφορετικά κέντρα φθορισμού που δημιουργούνται από μόρια της ίδιας της ένωσης ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης με το μικροπεριβάλλον. Τα πειραματικά δεδομένα των Drabent et al (1999) υποδηλώνουν ότι υπάρχουν τουλάχιστον τρία διαφορετικά είδη φθορισμού στα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Βιομόρια

3.1 Διάφορα Βιομόρια - Πρωτεΐνες και Πολυσακχαρίτες

Οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται ευρέως ως δομικά συστατικά στα τρόφιμα λόγω των ειδικών χαρακτηριστικών τους και της υψηλής θρεπτικής τους αξίας. Τα αμινοξέα είναι τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών και ο τύπος, ο αριθμός και η ακολουθία τους καθορίζουν τα μοριακά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών, όπως το μοριακό βάρος, τη διαμόρφωση (σφαιροειδής, τυχαία σπείρα, έλικα), τις ηλεκτρικές ιδιότητες ως συνάρτηση του pH, την ευκαμψία (άκαμπτη έναντι ευλύγιστης δομής), την υδροφοβικότητα, τη θερμική σταθερότητα και τη χημική δραστικότητα. Γενικά, οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μια ποικιλία διαφορετικών ιδιοτήτων ανάλογα με τη μοριακή τους δομή, όπως γαλακτωματοποίηση, ζελατινοποίηση, αφρισμό, προσρόφηση σε διεπιφάνειες, καταλυτικές ενζυμικές αντιδράσεις [Liu et al (2017)].

Οι πολυσακχαρίτες είναι ο άλλος κύριος τύπος βιοπολυμερών που χρησιμοποιούνται ευρέως ως δομικά συστατικά στα τρόφιμα. Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερικές αλυσίδες που αποτελούνται από μονοσακχαρίτες συνδεδεμένους μεταξύ τους με γλυκοσιδικούς δεσμούς. Η σύσταση των μονομερών ενός πολυσακχαρίτη είναι τυπικά πιο ομοιόμορφη από εκείνη μιας πρωτεΐνης. Οι πολυσακχαρίτες ποικίλλουν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, τη διαμόρφωση, τη διακλάδωση, τα ηλεκτρικά χαρακτηριστικά, την ευκαμψία και την υδροφοβικότητα, αλλά και ανάλογα με τη βιολογική τους προέλευση και τις συνθήκες επεξεργασίας, με αποτέλεσμα σημαντικές διαφορές στις φυσικοχημικές και λειτουργικές τους ιδιότητες, όπως η ενυδάτωση, η ζελατινοποίηση και η επιφανειακή δραστικότητα. Οι πολυσακχαρίτες συνήθως προκύπτουν από βιοσύνθεση σε φυτά (όπως η πηκτίνη και το αλγινικό άλας), σε ζώα (χιτοζάνη) και σε μικροοργανισμούς (όπως η υαλουρονάνη, η γελλάνη ή η ξανθάνη) [Liu et al (2017)].

3.2 Πρωτεΐνες

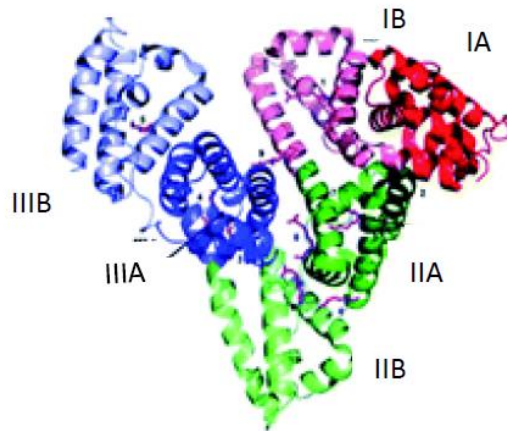
3.2.1 Αλβουμίνη βόειου ορού

Η αλβουμίνη ορού αναγνωρίστηκε ως κύριο συστατικό του αίματος ήδη από το 1839 (Ansell, 1839) [Carter et al (1994)]. Ως η πιο άφθονη πρωτεΐνη στο κυκλοφορικό σύστημα και με τυπικές συγκεντρώσεις στο αίμα 5 g / 100 ml, η αλβουμίνη συμβάλλει κατά 80% στην κολλοειδή ωσμωτική πίεση στο αίμα. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι η αλβουμίνη είναι κυρίως υπεύθυνη

για τη διατήρηση του pH του αίματος. Ίσως, η πιο σημαντική ιδιότητά της είναι η ικανότητά της να δεσμεύει αναστρέψιμα μια απίστευτη ποικιλία υποκαταστατών (ligands). Η αλβουμίνη εκτελεί επίσης πολλές άλλες λειτουργίες, όπως η απομόνωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και η απενεργοποίηση διαφόρων τοξικών λιπόφιλων μεταβολιτών, όπως η χολερυθρίνη. Αν και η αλβουμίνη έχει ευρεία συγγένεια για μικρές αρνητικά φορτισμένες αρωματικές ενώσεις, έχει επίσης υψηλή συγγένεια για τα λιπαρά οξέα, την αιματίνη και την χολερυθρίνη. Επιπλέον, συνδέεται ομοιοπολικά με την κυστεΐνη, την γλουταθειόνη και διάφορα μέταλλα, όπως ο Cu (II), το Ni (II), ο Hg (II), ο Ag(II) και ο Au(I). Η αλβουμίνη είναι η πιο πολυλειτουργική πρωτεΐνη μεταφοράς που είναι γνωστή μέχρι σήμερα. [Carter et al (1994)]

Η αλβουμίνη του βόειου ορού (BSA ή "Fraction V") είναι μια πρωτεΐνη αλβουμίνης ορού που προέρχεται από αγελάδες. Η BSA είναι μία σφαιρική πρωτεΐνη μονής αλυσίδας που υπάρχει στον ορό του γάλακτος σε συγκεντρώσεις 0,3 - 0,6 g/L. Το μοριακό βάρος της είναι περίπου 69 kDa και έχει τιμή ισοηλεκτρικού σημείου (pI) περίπου 4.7-4.9. Αποτελείται από 583 κατάλοιπα αμινοξέων, με 17 ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς και μια μόνο ελεύθερη θειόλη στο κατάλοιπο 34. Η BSA αποτελείται από τρεις γραμμικά διευθετημένους τομείς (I – III) που αποτελούνται από δύο υποτομείς (A και B) (Σχήμα 3.1) [Bolattin et al (2016)]. Υδρόφιλα και υδρόφοβα κατάλοιπα εντοπίζονται στην επιφάνεια και στο εσωτερικό του μορίου της πρωτεΐνης, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο κατάλοιπα τρυπτοφάνης (Trp134 και Trp213), εκ των οποίων το κατάλοιπο Trp134 βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου και το κατάλοιπο Trp213 βρίσκεται στον υδρόφοβο θύλακα [Bolattin et al (2016), [Fee et al (2013)]. Οι ιδιότητες της BSA εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την δευτεροταγή δομή της, που περιέχει 67% ελικοειδείς δομές (helical structures), 10% αναστροφές (turn) και 23% εκτεταμένες διαμορφώσεις αλυσίδας χωρίς κανένα β-φύλλο. Η δευτεροταγής δομή της BSA μπορεί να επηρεαστεί από μια σειρά φυσικών και χημικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, η πίεση, το pH και η παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών. [Lu et al (2015)]

Όσον αφορά τις βιολογικές λειτουργίες της BSA, αυτές περιλαμβάνουν την δέσμευση λιπαρών οξέων, μια αντιμεταλλακτική (antimutagenic) λειτουργία και την πρόληψη του καρκίνου. Επίσης έχει καλές ιδιότητες πηκτωματοποίησης και χρησιμοποιείται ευρέως σε τρόφιμα και σε θεραπευτικές εφαρμογές. [Fee et al (2013)]



Σχήμα 3.1: Δομή αλβουμίνης βόειου ορού. [Bolattin et al (2016)]

3.2.2 Καζεϊνικό άλας νατρίου (Καζεϊνικό νάτριο)

3.2.2.1 Καζεΐνη

Η καζεΐνη (σχήμα 3.2) είναι το κύριο συστατικό του γάλακτος σε ποσοστό 80% της συνολικής πρωτεΐνης, όπου υπάρχει υπό την μορφή πολυδιασκορπισμένων σφαιρικών συμπλόκων που περιέχουν πρωτεΐνες καζεΐνης και κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο. Η καζεΐνη είναι ένα μείγμα τεσσάρων διαφορετικών καζεϊνών και αποτελείται από αs1-καζεΐνη (45%), αs2-καζεΐνη (12%), β-καζεΐνη (34%) και κ-καζεΐνη (10%) [Kelly et al (2009), Modler et al (1985)]. Η καζεΐνη υπάρχει στο γάλα σε συνδυασμό με ασβέστιο, ανόργανο φωσφορικό άλας και κιτρικό άλας ως κολλοειδές εναιώρημα σύνθετων μικκυλίων και αντιπροσωπεύει το 2.6-2.9% κατά βάρος του πλήρους γάλακτος. Δεδομένου ότι το ισοηλεκτρικό σημείο της καζεΐνης είναι περίπου 4.6, η προσθήκη οξέος (γαλακτικού, υδροχλωρικού ή θεικού) στο γάλα οδηγεί σε αποσταθεροποίηση και καθίζηση των καζεϊνών, και έτσι παράγονται αρκετά προϊόντα όπως η όξινη καζεΐνη, η καζεΐνη πυτιάς ή το συν-καθίζημα. Ωστόσο, η προσθήκη αλκάλειος σε όξινη καζεΐνη αποδίδει υδατοδιαλυτό καζεϊνικό άλας [Kelly et al (2009)].

3.2.2.2 Καζεϊνικό νάτριο

Τα καζεϊνικά άλατα παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας τεχνικές καθίζησης και δεν μοιάζουν με τα μικκύλια της καζεΐνης στο γάλα, καθώς η κολλοειδής φωσφορική δομή έχει καταστραφεί [Modler et al (1985)]. Παράγονται με την εξουδετέρωση της όξινης καζεΐνης με

αλκάλια. Τα καζεϊνικά άλατα νατρίου, καλίου και αμμωνίου είναι διαλυτά σε pH μεγαλύτερο από 5.5 [Kelly et al (2009)].

Το καζεϊνικό άλας νατρίου είναι η πιο συνηθισμένη μορφή αυτής της κατηγορίας προϊόντος και παρασκευάζεται με ανάμιξη ενός διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (όξινου ανθρακικού ή ανθρακικού άλατος) με ξηρή όξινη καζεΐνη που έχει εναιωρηθεί σε νερό και στην συνέχεια με ξήρανση του διαλύματος που προκύπτει [Southward et al (2003)].

Το καζεϊνικό νάτριο είναι ένα είδος υδατοδιαλυτού γαλακτωματοποιητή. Έχει τη λειτουργία της σταθεροποίησης, της ενίσχυσης των πρωτεϊνών, της πάχυνσης (thickening) και του αφρισμού. Δεν υπάρχει συγκεκριμένη χημική δομή για το καζεϊνικό νάτριο. Στην ηλεκτροφορητική ανάλυση φαίνεται να υπάρχουν τουλάχιστον 20 διαφορετικά είδη πρωτεϊνικών συστατικών. Τα κύρια συστατικά του είναι ένα μείγμα άλφα καζεΐνης, βήτα καζεΐνης και κάπα καζεΐνης.

3.2.3 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Whey protein isolate)

Ο ορός γάλακτος (whey), ένα υποπροϊόν της παρασκευής τυριών και της καζεΐνης στη γαλακτοκομική βιομηχανία, αντιπροσωπεύει περίπου το 20% (κ.β.) της συνολικής πρωτεΐνης του γάλακτος. Η έρευνα για τη χρήση του ορού γάλακτος επικεντρώθηκε σε μεγάλο βαθμό στις πρωτεΐνες και στα πεπτιδικά συστατικά του ορού γάλακτος και στις πολυάριθμες χημικές, φυσικοχημικές και βιοδραστικές ιδιότητές τους, που βοήθησαν σε μεγάλο βαθμό να μετατραπεί ο ορός γάλακτος από ένα απόβλητο (waste material), που συχνά είναι ανεπιθύμητο, σε ένα πολύτιμο γαλακτοκομικό προϊόν που περιέχει πολλά συστατικά διαθέσιμα για εκμετάλλευση στα τρόφιμα, στη βιοτεχνολογία, στην ιατρική και στα βιοαποικοδομήσιμα υλικά. [Qi et al (2011)]

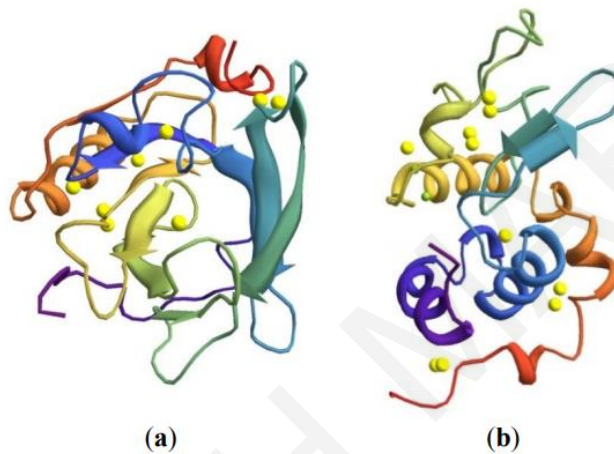
Ο ορός γάλακτος είναι ένα σύνθετο μείγμα σφαιρικών πρωτεϊνών που περιλαμβάνει β-λακτοσφαιρίνη (~50% κ.β.), α-λακτοσφαιρίνη (~20% κ.β.), ανοσοσφαιρίνες (immunoglobulin - Ig) (IgG, ~10% κ.β.), BSA (~6% κ.β.) και άλλα δευτερεύοντα πρωτεϊνικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων της λακτοφερρίνης, της λακτοϋπεροξειδάσης, της λυσοζύμης και των αυξητικών παραγόντων. [Qi et al (2011)]

Ανάλογα με την επιθυμητή χρήση και τα αποτελέσματα, ο ορός γάλακτος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φρέσκο παστεριωμένο υγρό ή υπό τη μορφή συμπυκνωμένων προϊόντων όπως: το συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey protein concentrate), το προϊόν απομόνωσης πρωτεΐνης ορού γάλακτος (whey protein isolate), ο ορός γάλακτος μειωμένης λακτόζης (reduced-lactose whey), οι υδρολυμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος και ο απαλλαγμένος από μέταλλα ορός [Pal et al (2014)]. Η πρωτεΐνη ορού γάλακτος (whey protein isolate), ένα από τα πιο σημαντικά συμπυκνωμένα προϊόντα, είναι μια εμπορική σκόνη με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (>90%) που παρασκευάζεται συνήθως με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων ή μικροδιήθηση (microfiltration), ακολουθούμενη από ξήρανση με ψεκασμό (spray drying). Το υπόλοιπο 4-6% του συστατικού είναι συνδυασμός λίπους, λακτόζης και τέφρας.

Η WPI περιέχει υψηλό ποσοστό καθαρής πρωτεΐνης και μπορεί να είναι αρκετά καθαρή ώστε να μην περιέχει λακτόζη, υδατάνθρακες, λιπαρά και χοληστερόλη.^[in.1] Η WPI αποτελείται από τέσσερα κύρια συστατικά: την β-λακτοσφαιρίνη, την α-λακτοσφαιρίνη, την αλβουμίνη ορού (serum albumin) και τις ανοσοσφαιρίνες. Η β-λακτοσφαιρίνη (σχήμα 3.2(a)) είναι το κύριο συστατικό της WPI από αγελάδες και πρόβατα (cow and sheep's WPI) και βρίσκεται στο κλάσμα ορού του γάλακτος πολλών θηλαστικών. Ωστόσο, δεν υπάρχει στο ανθρώπινο μητρικό γάλα. Η β-λακτοσφαιρίνη είναι μια σχετικά μικρή πρωτεΐνη που αποτελείται από 162 κατάλοιπα αμινοξέων, με μοριακό βάρος 18.4 kDa και σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει κυρίως ως διμερές.^[in.1] Η α-λακτοσφαιρίνη (σχήμα 3.2(b)) είναι μια πρωτεΐνη που υπάρχει στο γάλα σχεδόν όλων των θηλαστικών και εμπλέκεται στην παραγωγή λακτόζης. Το μοριακό της βάρος είναι 14.2 kDa. Η αλβουμίνη ορού (serum albumin) παράγεται από το ήπαρ, η κύρια λειτουργία της είναι ως πρωτεϊνικός μεταφορέας για στεροειδή, λιπαρά οξέα και ορμόνες του θυροειδή στο αίμα και παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του όγκου των εξωκυτταρικών υγρών συμβάλλοντας στην κολλοειδή ωσμωτική πίεση. Η αλβουμίνη ορού είναι μια σφαιρική, υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος περίπου 65 kDa. Η ανοσοσφαιρίνη (Ig), επίσης γνωστή ως αντίσωμα, χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα για την αναγνώριση και την εξουδετέρωση ξένων αντικειμένων όπως τα βακτήρια και οι ιοί. Στα πλακουντοφόρα θηλαστικά

υπάρχουν πέντε ισότυποι αντισωμάτων (antibody isotypes) γνωστοί ως IgA, IgD, IgE, IgG και IgM. Μια τυπική ανοσοσφαιρίνη έχει μοριακό βάρος 150 kDa.

Η WPI έχει υψηλή θρεπτική αξία και έχει γίνει σημαντική πηγή λειτουργικών συστατικών σε διάφορα τρόφιμα που προάγουν την υγεία. Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας της σε πρωτεΐνες, λειτουργεί ως παράγοντας δέσμησης του νερού, πηκτωματοποίησης, γαλακτωματοποίησης και αφρισμού. Έχει αναφερθεί ότι η WPI μπορεί να έχει αντιφλεγμονώδεις ή αντικαρκινικές ιδιότητες. ^[in.1]



Σχήμα 3.2: Τριτοταγής δομή της (a) β-λακτοσφαιρίνης και (b) α-λακτοσφαιρίνης. [Hammann et al (2014)]

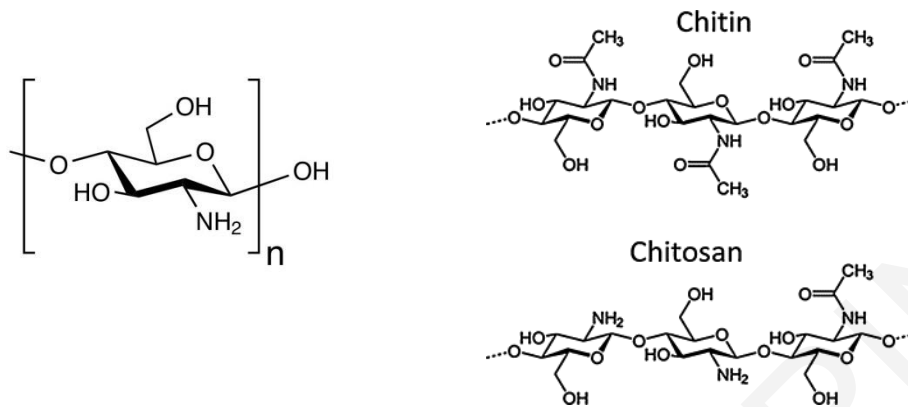
3.3 Πολυσακχαρίτες

3.3.1 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικό, μη τοξικό και βιοαποικοδομήσιμο βιοπολυμερές, που παράγεται ευρέως από κοχύλια, καβούρια και απόβλητα γαρίδας. Μεταξύ άφθονων φυσικά απαντώμενων πολυσακχαριτών, οι οποίοι είναι ουδέτεροι ή όξινοι, η χιτοζάνη διακρίνεται για την κατιοντική της φύση ($pK_a = 6.5$). Η χιτοζάνη εμφανίζει ικανότητα δέσμησης νερού, λιπαρών και χρωστικών ουσιών και έχει γαλακτωματοποιητικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες, υπολιπιδαιμική και υποχοληστερολαιμική δραστηριότητα [Speiciene et al (2007)].

Η χιτοζάνη είναι η μερικώς αποακετυλιωμένη μορφή χιτίνης (που είναι ο δεύτερος πιο άφθονος πολυσακχαρίτης στη γη μετά την κυτταρίνη) και έχει χημική δομή η οποία αποτελείται από μονομερή 2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-α-Δ-γλυκόζης (Σχήμα 3.3) [Ogawa et al (2003)]. Η χιτίνη

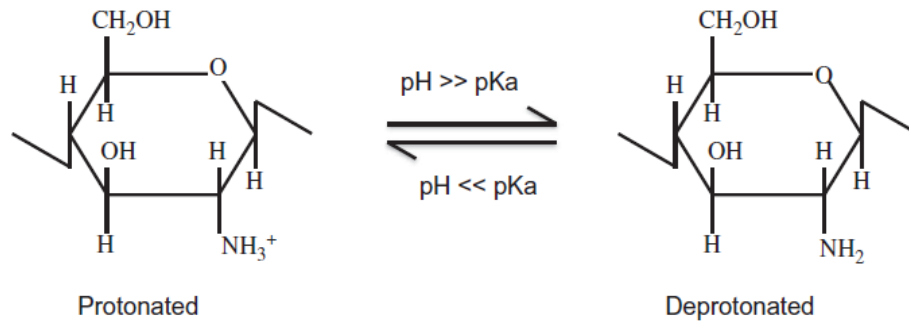
και η χιτοζάνη είναι τα κύρια δομικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων μικροοργανισμών και επιδερμίδων καρκινοειδών, εντόμων και μαλακίων. [Klinkesorn et al (2013)]



Σχήμα 3.3: Αριστερά, απεικονίζεται το μονομερές της χιτοζάνης και δεξιά απεικονίζονται οι συντακτικοί τύποι της χιτίνης (chitin) και της χιτοζάνης (chitosan) αντίστοιχα. [Ogawa et al (2003)]

Η χιτοζάνη έχει θετικό φορτίο σε όξινα διαλύματα λόγω της παρουσίας των πρωτονιωμένων αμινομάδων κατά μήκος της αλυσίδας της που έχουν τιμές pK_a μεταξύ 6.3 και 7.0. Είναι αδιάλυτη στο νερό, αλλά διαλυτή σε διαλύματα ασθενούς οργανικού οξέος. Μπορεί να πρωτονιωθεί με επιλεγμένα οξέα, εφόσον το pK_a της αμίνης της χιτοζάνης είναι περίπου 6.3 (Σχήμα 3.4). Τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της χιτοζάνης εξαρτώνται από το μοριακό της βάρος και το βαθμό αποακετυλίωσής της, που μπορούν να ελεγχθούν κατά τη διαδικασία παραγωγής. [Ogawa et al (2003)]

Η χιτοζάνη αποδείχθηκε χρήσιμη στην παρασκευή σταθερών γαλακτωμάτων χωρίς οποιοδήποτε άλλο επιφανειοδραστικό, μαζί με ανιοντικά ή μη ιοντικά επιφανειοδραστικά, σε συζεύξεις με διαφορετικές πρωτεΐνες, ή σε πολλαπλά στρώματα με ανιοντικά συστατικά. Η παρουσία χιτοζάνης στη συνεχή φάση κατά τη διάρκεια του σχηματισμού γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας όξινων ($pH=3$) γαλακτωμάτων που περιέχουν προϊόντα απομόνωσης πρωτεΐνης ορού γάλακτος [Speiciene et al (2007)]. Η χιτοζάνη έλαβε τον τίτλο ουσίας "γενικά αναγνωρισμένης ως ασφαλής" στις Ηνωμένες Πολιτείες για γενική εφαρμογή στα τρόφιμα και τα ποτά. [Ogawa et al (2003)]



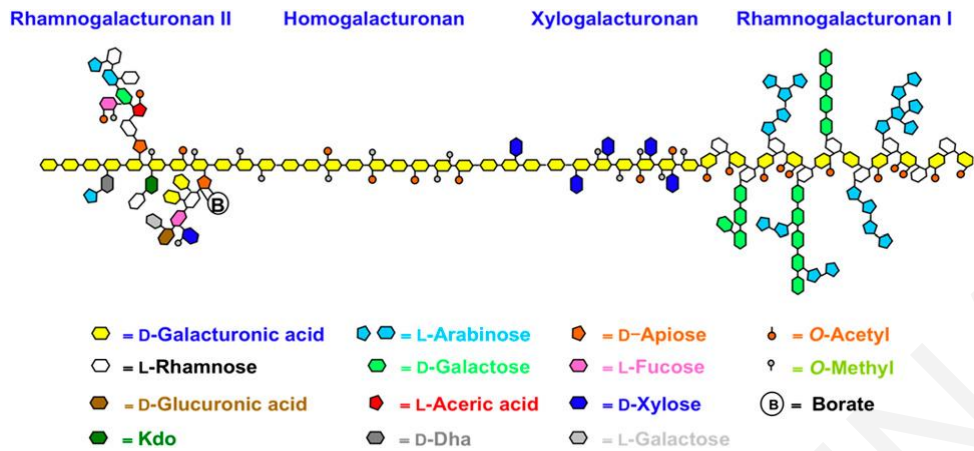
Σχήμα 3.4: Πρωτονιωμένη και αποπρωτονιωμένη μορφή χιτοζάνης σε όξινο διάλυμα. [Klinkesorn et al (2013)]

3.3.2 Πηκτίνη

Η πηκτίνη αντιπροσωπεύει μια οικογένεια ετερογενών πολυσακχαριτών που εντοπίζονται στο κυρίως στρώμα των κυτταρικών τοιχωμάτων στα ανώτερα φυτά [Ngouémazong et al (2015)]. Αρχικά απομονώθηκε και περιγράφηκε από τον Henri Braconnot το 1825. Η πηκτίνη παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία στη μοριακή της δομή και είναι ευαίσθητη σε χημικές και ενζυματικές μετατροπές. Συγκεκριμένα, η δομή της πηκτίνης περιλαμβάνει πολυάριθμες λειτουργικές ομάδες οι οποίες, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, είναι ικανές να επάγουν συγκεκριμένες λειτουργίες πολυμερούς. Συνεπώς, εκλεκτικές αλλοιώσεις της μοριακής δομής της πηκτίνης μπορεί να καταστήσουν το πολυμερές κατάλληλο για πολλές εφαρμογές. [Ngouémazong et al (2015)]

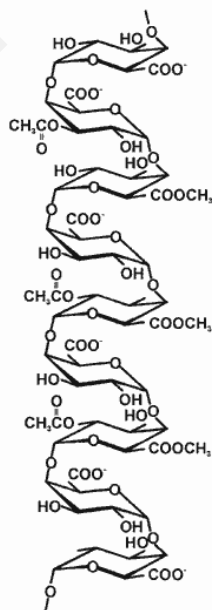
Οι πηκτικοί πολυσακχαρίτες, γενικά αναφερόμενοι ως "πηκτίνη", είναι από τα πλέον δομικά πολύπλοκα και συναρπαστικά φυτικά μακρομόρια. Η πηκτίνη είναι μια οικογένεια πολυσακχαριτών πλούσιων σε γαλακτουρονικό οξύ, συμπεριλαμβανομένων της ομογαλακτουρονάνης (HG), της ραμνογαλακτουρονάνης I (RG-I) και της υποκατεστημένης γαλακτουρονάνης και ραμνογαλακτουρονάνης II (RG-II) (Σχήμα 3.5). Η απομονωμένη πηκτίνη έχει τυπικό μοριακό βάρος 60.000-130.000 g / mol το οποίο κυμαίνεται ανάλογα με τις συνθήκες προέλευσης και εκχύλισης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3



Σχήμα 3.5: Απεικονίζεται η δομή της πηκτίνης. [Harholt et al (2010)]

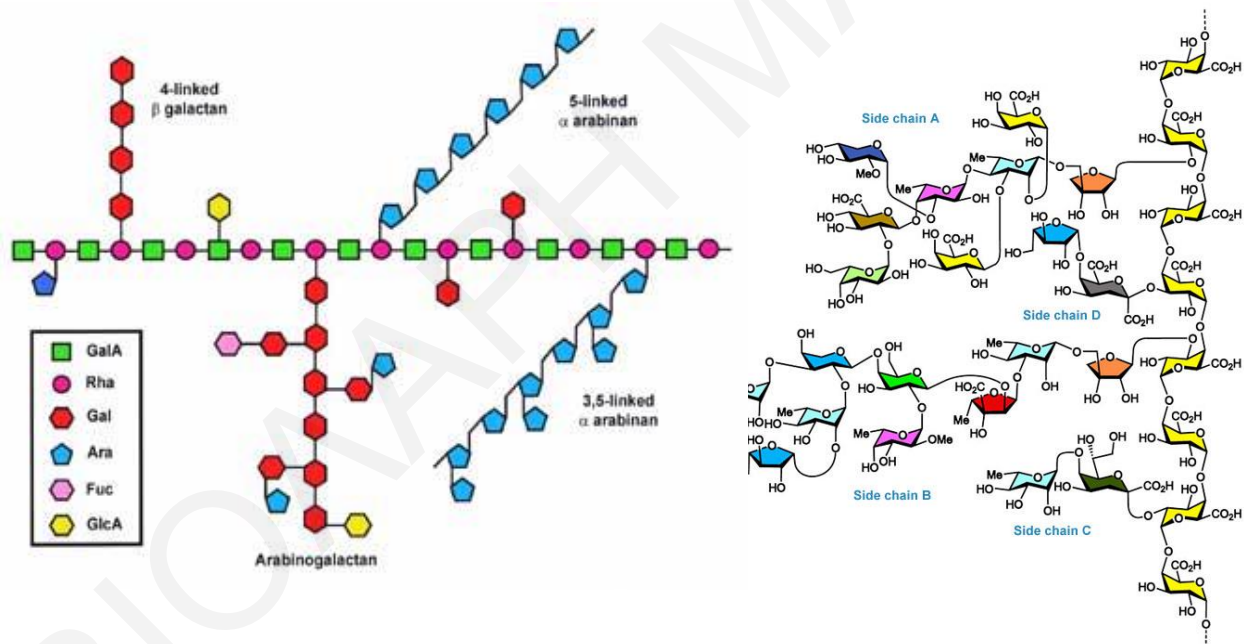
Η ομογαλακτουρονάνη (HG) είναι ο πιο άφθονος πηκτικός πολυσακχαρίτης που αντιπροσωπεύει περίπου το 65% της συνολικής περιεκτικότητας σε πηκτίνες φυτικών ιστών (Σχήμα 3.6). Αυτό το γραμμικό δομικό στοιχείο της πηκτίνης είναι ένα ομοπολυμερές το οποίο αποτελείται από μέχρι 200 μονάδες α-(1,4)-D γαλακτουρονικού οξέος (Gal A), εκ των οποίων ένας αριθμός καταλοίπων είναι εστεροποιημένος με μεθυλομάδα στη θέση C-6, παρέχοντας έτσι έναν ειδικό βαθμό εστεροποίησης του μεθυλίου στο πολυμερές. [Ngouémazong et al (2015)]



Σχήμα 3.6: Απεικονίζεται η ομογαλακτουρονάνη [Caffall et al (2009)]

Η ραμνογαλακτουρονάνη-I (RGI) (rhamnogalacturonan-I) αντιπροσωπεύει περίπου το 20% - 35% της πηκτίνης (Σχήμα 3.7). Είναι η πλέον διακλαδισμένη και δομικά ετερογενής μονάδα του πηκτινικού πολυσακχαρίτη. Ο σκελετός της χαρακτηρίζεται από μια μακριά ακολουθία καταλοίπων (2)- α -L-ραμνόζης-(1,4)- α -D-GalA-(1) που μπορεί να είναι ακετυλιωμένα στις θέσεις O-2 και / ή θέσεις O-3 του Gal A. [Ngouémazong et al (2015)]

Η ραμνογαλακτουρονάνη-II (RGIΙ) αποτελεί περίπου το 10% της πηκτίνης (Σχήμα 3.7). Είναι το συστατικό που βρίσκεται στις περισσότερες πηκτίνες και είναι ένα πολύπλοκο δομικό στοιχείο. Δομικά δεν είναι παρόμοια με την ραμνογαλακτουρονάνη I, εκτός από τις πλευρικές αλυσίδες. Ο σκελετός της αποτελείται από τουλάχιστο 8 α (1-4)-D-γαλακτουρονικά οξέα στα οποία προσαρμόζονται τέσσερις ετεροπολυμερικές πλευρικές αλυσίδες, σταθερής δομής και γνωστής σύστασης, που αποτελούνται από 12 διαφορετικούς τύπους σακχάρων με πάνω από 20 διαφορετικές συνδέσεις. [Mohnen et al (2008), Ngouémazong et al (2015)]



Σχήμα 3.7: Αριστερά απεικονίζεται η ραμνογαλακτουρονάνη-I και δεξιά η ραμνογαλακτουρονάνη-II. [Sergey et al (2011)]

Γενικά, οι χημικές αναλύσεις των εκχυλισμάτων της πηκτίνης αποκαλύπτουν την παρουσία πρωτεϊνών, οι οποίες θεωρούνται ως ρυπαντικά εγγενή μέρη του πολυμερούς.

Ανάλογα με τις συνθήκες εκχύλισης, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη της πηκτίνης συνήθως κυμαίνεται από ίχνη μέχρι 5%. [Ngouémazong et al (2015)]

Από το 1927, η πηκτίνη προτάθηκε να είναι ένας πιθανός παράγοντας γαλακτωματοποίησης για εφαρμογές τροφίμων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η πηκτίνη, όπως επίσης και ένας αριθμός άλλων πολυσακχαριτών, έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα ως παράγοντας σταθεροποίησης γαλακτωμάτων, για τον έλεγχο κυρίως της διάρκειας ζωής των γαλακτωμάτων μέσω αύξησης του ιξώδους της συνεχούς φάσης. Πρόσφατα, έχει διαπιστωθεί ότι ορισμένες πηκτίνες παρουσιάζουν κάποια επιφανειακή δραστηριότητα στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού, διευκολύνοντας έτσι το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των λεπτών σταγονιδίων ελαίου κατά τη διάρκεια και μετά τη γαλακτωματοποίηση. Γενικά, όπως και για άλλα υδροκολλοειδή, η γαλακτωματοποιητική δραστηριότητα της πηκτίνης συνδέεται με την πρωτεϊνική της χαρακτηριστική ομάδα, ενώ το δυναμικό σταθεροποίησης γαλακτώματος (δηλαδή η ικανότητα περιορισμού ή παρεμπόδισης αστάθειας γαλακτώματος) αποδίδεται κυρίως στα δομικά χαρακτηριστικά και στη διαμόρφωση του τμήματος των υδατανθράκων. [Ngouémazong et al (2015)]

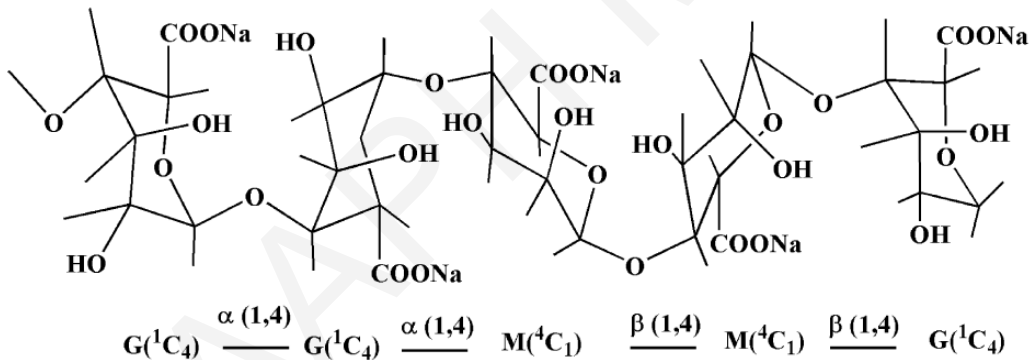
Εκτός από την πολύπλοκη μοριακή δομή του πολυανιόντος, τα εγγενή χαρακτηριστικά διαφόρων συστημάτων, όπως η συγκέντρωση του πολυμερούς, η ιοντική ισχύς και το pH, συμβάλλουν στην επιτυχία της γαλακτωματοποίησης, με χρήση πηκτίνης. Οι υδροδυναμικές ιδιότητες της πηκτίνης, όπως η διαμόρφωση, η πυκνότητα του επιφανειακού φορτίου, η μοριακή μάζα, και οι αλληλεπιδράσεις της αλύσου του πολυμερούς, έχουν επίσης υποδειχθεί ότι επηρεάζουν τις ιδιότητες γαλακτωματοποίησης και σταθεροποίησης γαλακτωμάτων. [Ngouémazong et al (2015)]

3.3.3 Αλγινικό νάτριο

Το άλας νατρίου του αλγινικού οξέος (Σχήμα 3.8) είναι ένας δυαδικός γραμμικός ετεροπολυσακχαρίτης που περιέχει 1,4-συνδεδεμένα α-L γουλουρονικό οξύ (G) και β-D-μαννουρονικό οξύ (M) [Sudha et al (2014)]. Το αλγινικό νάτριο εκχυλίζεται από καστανά φύκια από το βακτήριο *Phaeophyceae* και περιέχει 30 έως 60% αλγινικό οξύ. Η μετατροπή του

αλγινικού οξέος σε αλγινικό νάτριο αυξάνει δραστικά την διαλυτότητά του σε νερό, γεγονός που βοηθά στην εκχύλισή του [Fallourd et al (2009), [Loureiro et al (2017)].

Το αλγινικό άλας που χρησιμοποιείται πιο συχνά στα τρόφιμα είναι το αλγινικό νάτριο (E401) [Fallourd et al (2009)]. Χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων ως σταθεροποιητής ή σαν ένας παράγοντας πάχυνσης ή γαλακτωματοποίησης. Η ικανότητα του να δρα ως παχυντής στην βιομηχανία τροφίμων οφείλεται στο ότι αναμιγνύεται με ιόντα ασβεστίου (ή βαρίου) παράγοντας μια δομή πηκτώματος. Συγκεκριμένα, όταν ανταλλάσσονται μονοσθενή ιόντα (π.χ. αλγινικό νάτριο) με δισθενή ιόντα (ιδιαίτερα ασβέστιο), το διάλυμα μετατρέπεται από διασπορά χαμηλού ιξώδους σε δομή γέλης (gel structure). Λόγω αυτής της ικανότητας πηκτωματοποίησης, της ιδιότητας σταθεροποίησης και του υψηλού ιξώδους σε υδατικά διαλύματα, το αλγινικό άλας και τα παράγωγά του έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε βιοϊατρικές εφαρμογές μεταμόσχευσης κυττάρων (cell transplantation), για μεταφορά φαρμάκων (drug delivery) και ως συστατικό σε διάφορες γέλες. [Loureiro et al (2017)]

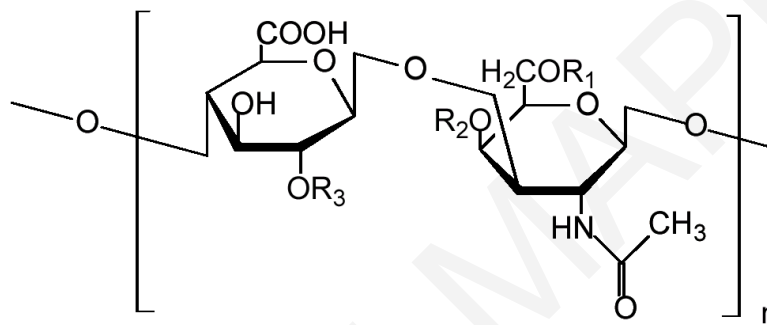


Σχήμα 3.8: Δομή αλγινικού νατρίου. [Sudha et al (2014)]

3.3.4 Θεϊκή χονδροϊτίνη

Η θεϊκή χονδροϊτίνη είναι μια θεϊκή γλυκοζαμινογλυκάνη (GAG), η οποία αποτελείται από μια αλυσίδα εναλλασσόμενων σακχάρων (N-ακετυλαγαλακτοζαμίνη και γλυκουρονικό οξύ) υποκατεστημένη με θείο στις θέσεις 4 ή 6 (Σχήμα 3.9). Οι γλυκοζαμινογλυκάνες αποτελούνται από μεγάλες αλυσίδες επαναλαμβανόμενων μονάδων δισακχαρίτη. Αυτά τα πολυμερή γενικά αποτελούνται από υψηλά υποκατεστημένες με θεϊκά είτε ως N-ακετυλογλυκοζαμίνης είτε ως N-ακετυλαγαλακτοζαμίνης, ακολουθούμενες από γλυκουρονικό οξύ ή ιδουρονικό οξύ (iduronic

acid), επαναλαμβανόμενες σε γραμμική αλυσίδα [Klecker et al (2017), McAtee et al (2014), Oprea et al (2009)]. Οι αλυσίδες της θειικής χονδροϊτίνης ταξινομούνται κατά προσέγγιση στους τύπους A, C, D, E, K και H και ονομάζονται θεικές χονδροϊτίνες A (C-4-S), C (C-6-S), D (C-2,6-S), E (C-4,6-S), K (C-3,4-S) και H (IdoAa1-3Gal-NAc(4S,6S)) αντίστοιχα, εκ των οποίων οι πιο συνηθισμένες είναι οι C-4-S και C-6-S (Σχήμα 3.9). Μια αλυσίδα χονδροϊτίνης μπορεί να έχει πάνω από 100 σάκχαρα, σε καθένα από τα οποία μπορεί να προστεθούν θειικές ομάδες σε μεταβλητές θέσεις και ποσότητες. [Klecker et al (2017), Oprea et al (2009), [Roberts et al (2016)]



Σχήμα 3.9: Χημική δομή μίας μονάδας σε αλυσίδα θειικής χονδροϊτίνης. Chondroitin-4-sulfate:

$R_1 = H$; $R_2 = SO_3H$; $R_3 = H$. Chondroitin-6-sulfate: $R_1 = SO_3H$; $R_2, R_3 = H$.

3.4 Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών

3.4.1 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού

Ένα φάσμα UV λαμβάνεται όταν η απορρόφηση του φωτός μετρείται σε συνάρτηση με τη συχνότητα ή το μήκος κύματος. Τα μόρια με ηλεκτρόνια σε αρωματικά συστήματα συχνά απορροφούν το φως στο εγγύς υπεριώδες (150-400 nm) ή στην ορατή περιοχή (400-800 nm). Οι πρωτεΐνες συνήθως εμφανίζουν μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή 275-280 nm, τα οποία προκαλούνται από την απορρόφηση των δύο αρωματικών αμινοξέων τρυπτοφάνης (Trp) και τυροσίνης (Tyr) και, σε μικρό βαθμό, από την απορρόφηση της κυστίνης (δηλαδή των δισουλφιδικών δεσμών). Οι απορροφήσεις των κατάλοιπων Trp και Tyr εξαρτώνται από το μικροπεριβάλλον των χρωμοφώρων τους και μετατοπίζονται ελαφρώς ερυθρά όταν μεταφέρονται από ένα πολικό σε μη πολικό περιβάλλον, όπως στο εσωτερικό μιας σφαιρικής πρωτεΐνης. [Schmid (2001)]

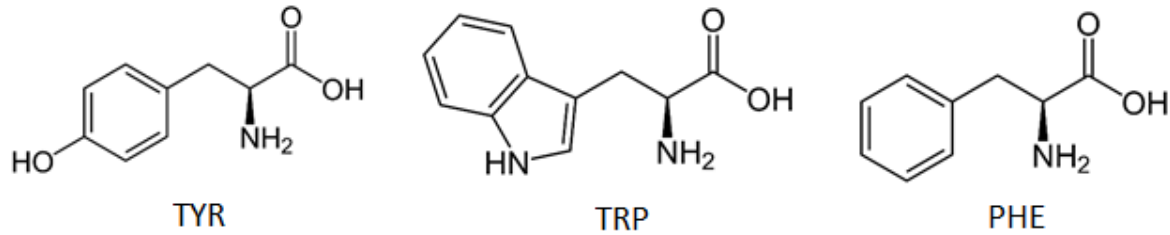
3.4.1.1 Μοριακή προέλευση της απορρόφησης των πρωτεϊνών

Οι πεπτιδικές ομάδες της κύριας αλυσίδας των πρωτεϊνών απορροφούν φως στην υπεριώδη περιοχή (180-230 nm). Οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων τυροσίνης, τρυπτοφάνης και φαινυλαλανίνης (Phe) (Σχήμα 3.10) απορροφούν επίσης φως σε αυτήν την περιοχή και, επιπλέον, απορροφούν στο εγγύς υπεριώδες ή αλλιώς στην «αρωματική» περιοχή (240-300 nm) (Πίνακας 3.1). Επίσης οι δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ δύο καταλοίπων κυστεΐνης παρουσιάζουν ζώνη απορρόφησης κοντά στα 260 nm. [Schmid (2001)]

Οι χαρακτηριστικές απορροφήσεις των αρωματικών αμινοξέων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Στο εγγύς υπεριώδες η μοριακή απορρόφηση της φαινυλαλανίνης είναι πολύ μικρότερη από εκείνη της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης και το φάσμα μιας πρωτεΐνης (παράδειγμα ριβονουκλεάση T1 στο Σχήμα 3.11) μεταξύ 240-300 nm οφείλεται κυρίως σε συνεισφορές από τις πλευρικές αλυσίδες των κατάλοιπων Tyr και Trp. Τα κατάλοιπα Phe συμβάλλουν στη λεπτή δομή (fine structure) («wiggles») στο φάσμα μεταξύ 250-260 nm. Τα αρωματικά αμινοξέα δεν απορροφούν πάνω από 310 nm, και συνεπώς η απορρόφηση μιας πρωτεΐνης πρέπει να είναι μηδέν σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 310 nm. Οι πρωτεΐνες χωρίς κατάλοιπα Trp δεν απορροφούν πάνω από 300 nm. [Schmid (2001)]

Πίνακας 3.1: Απορρόφηση των αρωματικών αμινοξέων. [Schmid (2001)]

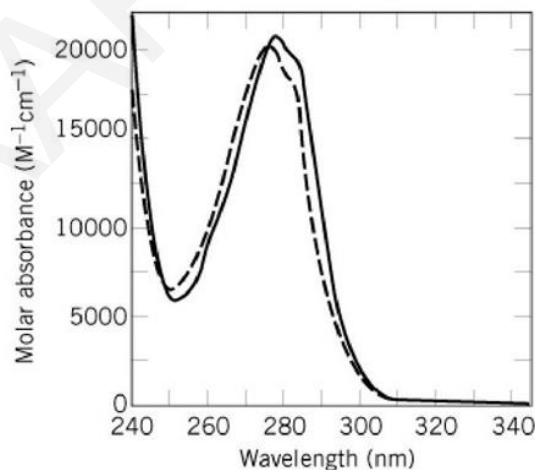
Κατάλοιπο	λ_{\max} (nm)
Τρυπτοφάνη	280
Τυροσίνη	275
Φαινυλαλανίνη	258



Σχήμα 3.10: Δομές των αμινοξέων τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη.

Τα φάσματα απορρόφησης των αρωματικών αμινοξέων είναι ευαίσθητα σε αλλαγές στο περιβάλλον τους. Γενικά, παρατηρείται κυανή μετατόπιση (blue shift) των φασμάτων όταν μειώνεται η πολικότητα του διαλύτη (hypsochromic shift) και ερυθρή μετατόπιση (red shift) στο μέγιστο μήκος κύματος (βαθοχρωμισμός) όταν μειωθεί η υδροφοβικότητα.

Στις διπλωμένες (folded) φυσικές πρωτεΐνες, τα αρωματικά κατάλοιπα που βρίσκονται στο εσωτερικό του υδρόφοβου πυρήνα του μορίου δείχνουν επίσης μια μικρή ερυθρή μετατόπιση στην απορρόφησή τους, η οποία αναστρέφεται όταν εκτίθενται στον υδατικό διαλύτη κατά την αποδιάταξη (unfolding). Το φαινόμενο εμφανίζεται στα φάσματα που λαμβάνονται για την πρωτεΐνη ριβονουκλεάση T1 (Σχήμα 3.11). Οι μέγιστες διαφορές απορρόφησης εμφανίζονται στην περιοχή των 285-295 nm. [Schmid (2001)]



Σχήμα 3.11: Φάσματα UV της ριβονουκλεάσης T1. Το φάσμα της φυσικής (native) πρωτεΐνης παρουσιάζεται ως συνεχής γραμμή, και το φάσμα της αποδιατεταγμένης (unfolded) πρωτεΐνης ως διακεκομμένη γραμμή. Η ριβονουκλεάση T1 περιέχει εννέα κατάλοιπα Tyr, τα οποία οδηγούν στο μέγιστο στα 278 nm, το μοναδικό κατάλοιπο Trp οδηγεί στους ώμους μεταξύ 280-300 nm. Οι μικρές συνεισφορές των τεσσάρων κατάλοιπων Phe κοντά στα 260 nm είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμες. [Schmid (2001)]

3.4.2 Φθορισμός πρωτεϊνών

Μεταξύ των βιοπολυμερών, οι πρωτεΐνες είναι μοναδικές στην εμφάνιση χρήσιμου ενδογενούς φθορισμού. Τα λιπίδια, οι μεμβράνες και οι πολυσακχαρίτες είναι ουσιαστικά μη φθορίζοντα βιολογικά συστατικά. Στις πρωτεΐνες, τα τρία αρωματικά αμινοξέα - φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και τρυπτοφάνη - είναι όλα φθοροφόρα (fluorescent). Αυτά τα τρία αμινοξέα είναι σχετικά σπάνια στις πρωτεΐνες. Η τρυπτοφάνη, η οποία είναι το κυρίαρχο ενδογενές φθοροφόρο, είναι γενικά παρούσα σε περίπου 1 mole% σε πρωτεΐνες. Ο μικρός αριθμός καταλοίπων τρυπτοφάνης είναι πιθανώς αποτέλεσμα της μεταβολικής δαπάνης για τη σύνθεσή τους. Μια πρωτεΐνη μπορεί να διαθέτει μόνο ένα ή μερικά κατάλοιπα τρυπτοφάνης, γεγονός που διευκολύνει την ερμηνεία των φασματικών δεδομένων. Εάν και τα είκοσι είδη αμινοξέων μιας πρωτεΐνης ήταν φθοροφόρα, τότε η εκπομπή των πρωτεϊνών θα ήταν εξαιρετικά περίπλοκη.

Ένα πολύτιμο χαρακτηριστικό του ενδογενούς φθορισμού των πρωτεϊνών είναι η υψηλή ευαισθησία της τρυπτοφάνης στο περιβάλλον της. Αλλαγές στα φάσματα εκπομπής της τρυπτοφάνης συμβαίνουν συχνά ως απόκριση σε μεταβολές της διαμόρφωσης, στην συσσωμάτωση υπομονάδων, στη πρόσδεση υποστρώματος (substrate binding) ή στη μετουσίωση. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να επηρεάσουν το περιβάλλον του δακτυλίου της ινδόλης. Η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη εμφανίζουν υψηλές ανισοτροπίες που είναι συχνά ευαίσθητες στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών και στην έκταση της κίνησης κατά τη διάρκεια της διεγερμένης κατάστασης. Επίσης, η τρυπτοφάνη φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην δυναμική απόσβεση (collisional quenching), λόγω της τάσης της διεγερμένης κατάστασης της ινδόλης να δίνει ηλεκτρόνια. Η τρυπτοφάνη μπορεί να αποσβεστεί από εξωτερικά προστιθέμενους αποσβέστες ή από γειτονικές ομάδες εντός των πρωτεϊνών.

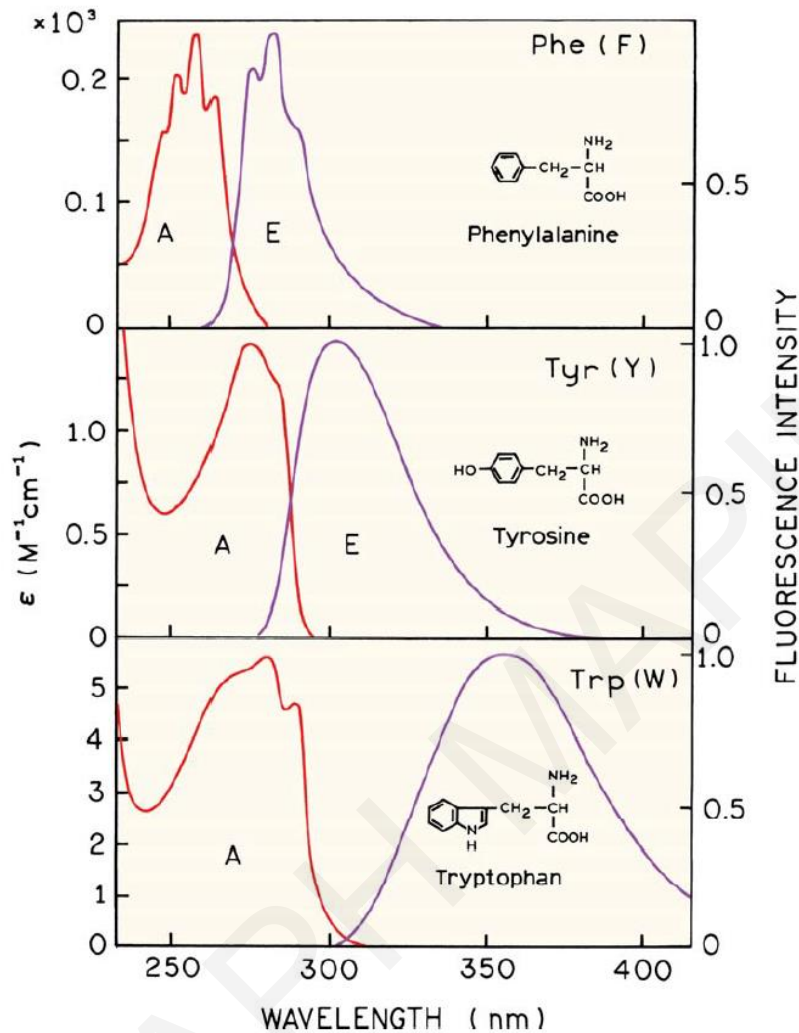
Ένας παράγοντας που δυσκολεύει την ερμηνεία του φθορισμού των πρωτεϊνών είναι η παρουσία πολλών φθοροφόρων αμινοξέων στις περισσότερες πρωτεΐνες. Το περιβάλλον κάθε κατάλοιπου είναι διαφορετικό και οι φασματικές ιδιότητές του είναι γενικά διαφορετικές. Ωστόσο, τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής των κατάλοιπων τρυπτοφάνης σε πρωτεΐνες αλληλεπικαλύπτονται στα περισσότερα μήκη κύματος και έτσι είναι δύσκολο να διαχωριστούν οι φασματικές συνεισφορές κάθε τρυπτοφάνης σε μια πρωτεΐνη. Ένας επιπλέον παράγοντας

που περιπλέκει την ερμηνεία του φθορισμού είναι το γεγονός ότι η τρυπτοφάνη εμφανίζει σύνθετες φασματικές ιδιότητες λόγω της παρουσίας δύο σχεδόν ίσης ενέργειας διεγερμένων καταστάσεων, 1L_a και 1L_b . Οι ηλεκτρονικές μεταβάσεις εμφανίζουν ξεχωριστά φάσματα απορρόφησης, εκπομπής και ανιστροπίας και εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία στην πολικότητα του διαλύτη. Η πολυπλοκότητα της ινδόλης προκάλεσε λεπτομερείς μελέτες του φθορισμού των πρωτεϊνών, αλλά επίσης παρεμπόδισε και την ερμηνεία των δεδομένων. [Lakowicz (2006), chapter 16]]

3.4.2.1 Φασματικά χαρακτηριστικά των αρωματικών αμινοξέων

Οι πρωτεΐνες περιέχουν τρία κατάλοιπα αμινοξέων που συμβάλλουν στον φθορισμό τους. Αυτά είναι η τυροσίνη, η τρυπτοφάνη και η φαινυλαλανίνη. Τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής αυτών των αμινοξέων παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.12. Η εκπομπή πρωτεϊνών κυριαρχείται από την τρυπτοφάνη, η οποία απορροφά σε μεγαλύτερα μήκη κύματος και εμφανίζει τον μεγαλύτερο συντελεστή απόσβεσης. Η ενέργεια που απορροφάται από τη φαινυλαλανίνη και τη τυροσίνη μεταφέρεται συχνά στα κατάλοιπα τρυπτοφάνης της ίδιας πρωτεΐνης.

Η φαινυλαλανίνη εμφανίζει το μικρότερο μήκος κύματος απορρόφησης και εκπομπής. Η φαινυλαλανίνη εμφανίζει μια δομημένη εκπομπή με μέγιστο σχεδόν στα 282 nm. Η εκπομπή τυροσίνης στο νερό συμβαίνει στα 303 nm και συχνά δεν είναι ευαίσθητη στην πολικότητα του διαλύτη. Η μέγιστη εκπομπή τρυπτοφάνης στο νερό εμφανίζεται κοντά στα 350 nm και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πολικότητα και / ή το περιβάλλον.

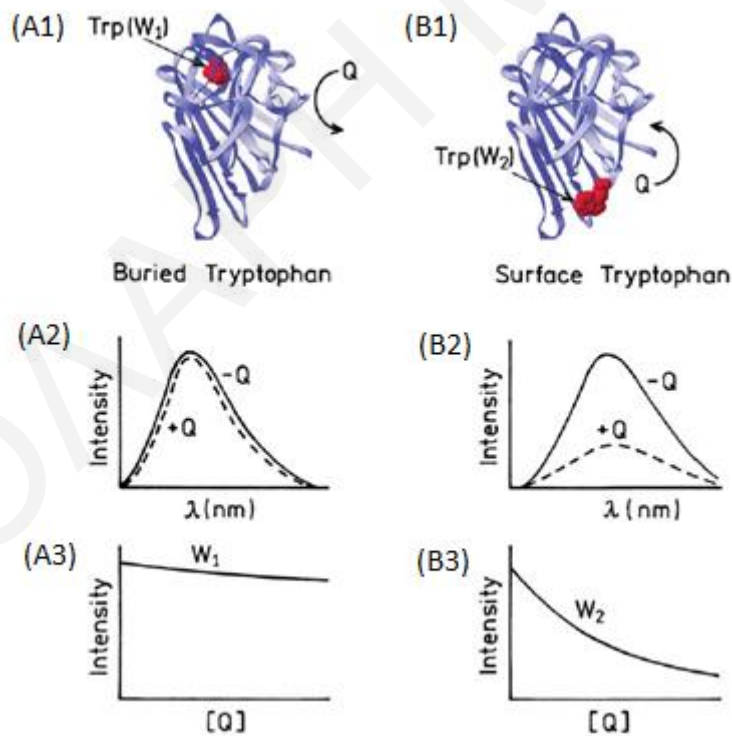


Σχήμα 3.12: Φάσματα απορρόφησης (A) και εκπομπής (E) των αρωματικών αμινοξέων σε υδατικό διάλυμα pH 7. [Lakowicz (2006), chapter 16]]

Ο φθορισμός μιας πρωτεΐνης γενικά διεγείρεται στο μέγιστο απορρόφησης κοντά στα 280 nm ή σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Κατά συνέπεια, η φαινυλαλανίνη δεν είναι διεγερμένη στα περισσότερα πειράματα. Επιπλέον, η κβαντική απόδοση της φαινυλαλανίνης στις πρωτεΐνες είναι μικρή (τυπικά περίπου 0.03), έτσι η εκπομπή από αυτό το κατάλοιπο παρατηρείται σπάνια για τις πρωτεΐνες. Η απορρόφηση των πρωτεϊνών στα 280 nm οφείλεται στα κατάλοιπα τυροσίνης και τρυπτοφάνης. Στους 23 °C σε ουδέτερο υδατικό διάλυμα, οι κβαντικές αποδόσεις της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης είναι περίπου 0.14 και 0.13, αντίστοιχα. Σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 295 nm η απορρόφηση οφείλεται κυρίως στην τρυπτοφάνη. Ο φθορισμός της

τρυπτοφάνης μπορεί να διεγερθεί επιλεκτικά στα 295-305 nm. Η τυροσίνη θεωρείται συχνά ως ένα απλό φθοροφόρο, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί επίσης να εμφανίζει πολύπλοκες φασματικές ιδιότητες, ειδικά στην ιονισμένη της μορφή που έχει ασθενή εκπομπή στα 350 nm. [Lakowicz (2006), chapter 16]]

Η δυναμική απόσβεση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της έκθεσης της τρυπτοφάνης στην υδατική φάση. Η βασική ιδέα παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.13, το οποίο απεικονίζει την απόσβεση από ένα υδατοδιαλυτό αποσβέστη (Q) που δεν διαπερνά εύκολα την πρωτεϊνική μήτρα. Η δυναμική απόσβεση είναι ουσιαστικά ένα φαινόμενο επαφής, το φθοροφόρο και ο αποσβέστης πρέπει να βρίσκονται σε μοριακή επαφή για να συμβεί η απόσβεση. Κατά συνέπεια, για το κατάλοιπο τρυπτοφάνης W_1 που βρίσκεται στο εσωτερικό της πρωτεΐνης δεν αναμένεται απόσβεση (Σχήμα 3.13 A1, A2, A3), ενώ για το κατάλοιπο τρυπτοφάνης W_2 που βρίσκεται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, αναμένεται απόσβεση (Σχήμα 3.13 B1, B2, B3).



Σχήμα 3.13: Δυναμική απόσβεση κατάλοιπων τρυπτοφάνης σε πρωτεΐνες τα οποία είτε είναι στο εσωτερικό (W_1) είτε είναι επιφανειακά προσβάσιμα (W_2). [Lakowicz (2006), chapter 16]]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Μέθοδοι πειραμάτων

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα είναι οι μετρήσεις θολερότητας, η φασματοσκοπία UV-vis, η φασματοσκοπία φθορισμού, ο κυκλικός διχρωισμός, η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) και η διαπίδυση. Αυτές οι μέθοδοι διερευνούν τις τοπικές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (φθορισμός), τη συμπεριφορά συσσωμάτωσης μεγαλύτερης κλίμακας (θολερότητα, ITC), τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών (CD) και τη συνολική θερμοδυναμική συμπεριφορά «πρόσδεσης» (ITC, φθορισμός, διαπίδυση).

4.1 Χρήση φθορισμού στη μελέτη πρωτεϊνών

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της πρόσδεσης υποκαταστατών (ligands) σε πρωτεΐνες μπορεί να πραγματοποιηθεί εξετάζοντας τα φάσματα φθορισμού. Γενικά, ο φθορισμός μιας πρωτεΐνης προκαλείται από τρεις φθορίζουσες ενώσεις που υπάρχουν σε αυτή, συγκεκριμένα τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης, τυροσίνης και φαινυλαλανίνης. Ο φθορισμός της τρυπτοφάνης συνήθως μελετάται για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τις μικροπεριβαλλοντικές μεταβολές της πρωτεΐνης οι οποίες μπορούν να αντανακλούν σε κάποιο βαθμό τις διαμορφωτικές (conformational) αλλαγές κοντά στις χρωμοφόρες ομάδες. [Wei et al. (2018)]

Οι τεχνικές φθορισμού που χρησιμοποιούνται βιβλιογραφικά στη μελέτη αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών με γαλακτωματοποιητές είναι η απόσβεση φθορισμού, ο σύγχρονος φθορισμός, ο τρισδιάστατος φθορισμός και η μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού. Υπάρχουν ακόμα τρεις τεχνικές φθορισμού οι οποίες είναι σημαντικές, αλλά βιβλιογραφικά δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στη μελέτη αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών με διάφορα μόρια. Αυτές είναι η φασματοσκοπία συσχέτισης φθορισμού (fluorescence correlation spectroscopy), η χρήση πόλωσης φθορισμού και ο χρονοεξαρτημένος φθορισμός. Στην παρούσα διατριβή, οι τεχνικές φθορισμού που χρησιμοποιήθηκαν είναι η απόσβεση φθορισμού, η ενίσχυση φθορισμού και ο σύγχρονος φθορισμός.

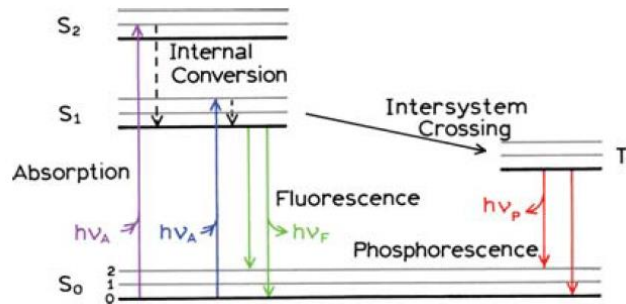
4.1.1 Γενικές αρχές της φασματοσκοπίας φθορισμού

Ο φθορισμός είναι ένα φυσικό φαινόμενο στο οποίο μια συγκεκριμένη χημική ουσία (φθορίζουσα ουσία - φθοροφόρο) εκπέμπει φώς συγκεκριμένου χρώματος αμέσως μόλις απορροφήσει φώς ενός άλλου χρώματος. Ο φθορισμός ανήκει στην κατηγορία των φυσικών

γεγονότων που συνιστούν τη φωταύγεια. Η φωταύγεια είναι ένας γενικός όρος για την εκπομπή ακτινοβολίας, η οποία χωρίζεται στον φθορισμό και στον φωσφορισμό ανάλογα με τη φύση της διεγερμένης κατάστασης. Στις διεγερμένες απλές καταστάσεις, το ηλεκτρόνιο στο διεγερμένο τροχιακό είναι συζευγμένο (αντιπαράλληλο spin) με δεύτερο ηλεκτρόνιο στο τροχιακό της θεμελιώδους κατάστασης. Συνεπώς, η επιστροφή στη θεμελιώδη κατάσταση είναι spin-επιτρεπτή και συμβαίνει γρήγορα με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων. Οι ρυθμοί εκπομπής του φθορισμού είναι περίπου 10^8 s^{-1} , έτσι ώστε ένας τυπικός χρόνος ημιζωής φθορισμού είναι κοντά στα 10ns. Ο χρόνος ημιζωής (τ) ενός φθοροφόρου είναι ο μέσος χρόνος μεταξύ της διέγερσης και της επιστροφής στη θεμελιώδη κατάσταση. Ο φωσφορισμός είναι η εκπομπή φωτός από τριπλές διεγερμένες καταστάσεις, στις οποίες το ηλεκτρόνιο στο διεγερμένο τροχιακό έχει το ίδιο spin με το ηλεκτρόνιο της θεμελιώδους κατάστασης. Οι μεταβάσεις στη θεμελιώδη κατάσταση απαγορεύονται και έτσι οι ρυθμοί εκπομπής είναι πιο αργοί, περίπου $10^3\text{-}10^0 \text{ s}^{-1}$, με αποτέλεσμα οι χρόνοι ημιζωής του φωσφορισμού να είναι από μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου έως κάποια δευτερόλεπτα.

Ο φθορισμός τυπικά εμφανίζεται σε αρωματικά μόρια, γνωστά ως φθορίζουσες ουσίες. Τα φασματικά δεδομένα φθορισμού γενικά παρουσιάζονται ως φάσματα εκπομπής. Ένα φάσμα εκπομπής φθορισμού είναι μια γραφική παράσταση της έντασης φθορισμού σε σχέση με το μήκος κύματος (nm) ή τον κυματαριθμό (cm^{-1}). Τα φάσματα ποικίλουν ευρέως και εξαρτώνται από τη χημική δομή της φθορίζουσας ουσίας και του διαλύτη στον οποίο βρίσκεται. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του φθορισμού είναι η υψηλής ευαισθησίας ανίχνευση.

Στον φθορισμό, η απορρόφηση φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός μεγαλύτερου μήκους κύματος. Αυτή η εκπομπή φωτός συμβαίνει καθώς οι φθορίζουσες ουσίες αποδιεγείρονται από υψηλότερη ενεργειακή στάθμη σε χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη. Τα φαινόμενα φθορισμού αποτυπώνονται στο διάγραμμα ενέργειας Jablonski που φαίνεται στο Σχήμα 4.1. Τα διαγράμματα Jablonski χρησιμοποιούνται σε διάφορες μορφές, για να απεικονίσουν διάφορες μοριακές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν οι διεγερμένες μοριακές καταστάσεις.



Σχήμα 4.1: Μια μορφή διάγραμματος ενέργειας Jablonski. [Lakowicz (2006)]

Καθώς το μόριο απορροφά ενέργεια, μεταβαίνει από την θεμελιώδη κατάσταση S_0 σε ένα δονητικό επίπεδο μίας απλής διεγερμένης κατάστασης S_n ($n=1,2,\dots$). Το διεγερμένο μόριο εν μέρει χάνει ενέργεια μέσω της εσωτερικής μετατροπής χωρίς εκπομπή φωτονίων και στην συνέχεια απελευθερώνει αυθόρμητα ένα φωτόνιο χαμηλής ενέργειας καθώς επιστρέφει στην απλή θεμελιώδη κατάσταση (singlet ground state). Μελέτη του διαγράμματος Jablonski αποκαλύπτει γιατί η ενέργεια της εκπομπής είναι συνήθως μικρότερη από αυτήν της απορρόφησης. Ο φθορισμός εμφανίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, φαινόμενο που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Sir. G. G. Stokes το 1852 στο Πανεπιστήμιο του Cambridge και έτσι είναι γνωστό ως νόμος Stokes. Για παράδειγμα, όταν ένα μόριο απορροφά υπεριώδες φως στην περιοχή των 315-400 nm, οι εκπομπές μπορεί να βρίσκονται στο ορατό μέρος του φάσματος. [Lakowicz (2006)]

4.1.2 Απόσβεση φθορισμού

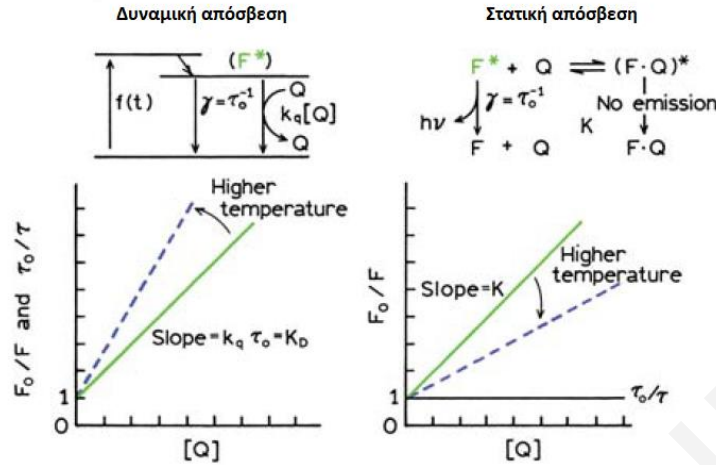
Η απόσβεση φθορισμού αναφέρεται σε οποιαδήποτε διαδικασία που μειώνει την ένταση φθορισμού ενός δείγματος. Μια ποικιλία μοριακών αλληλεπιδράσεων μπορεί να οδηγήσει σε απόσβεση. Αυτές περιλαμβάνουν αντιδράσεις της διεγερμένης κατάστασης, μοριακές αναδιατάξεις, μεταφορά ενέργειας, σχηματισμό συμπλέγματος στη θεμελιώδη κατάσταση και στατική και δυναμική (collisional) απόσβεση. Η απόσβεση φθορισμού έχει μελετηθεί ευρέως τόσο ως θεμελιώδες φαινόμενο, όσο και ως πηγή πληροφοριών σχετικά με τα χημικά συστήματα [Lakowicz (2006)].

Η απόσβεση φθορισμού περιγράφεται στο απλούστερο επίπεδο από την εξίσωση Stern-Volmer (εξ.4.1). Σε αυτή την εξίσωση F_0 και F είναι οι εντάσεις φθορισμού απουσία και παρουσία αποσβέστη αντίστοιχα, K_q είναι η διμοριακή σταθερά απόσβεσης, τ_0 είναι ο χρόνος ημιζωής της διεγερμένης κατάστασης του φθοροφόρου απουσία αποσβέστη, και $[Q]$ είναι η συγκέντρωση του αποσβέστη. Η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer δίνεται από $K_{sv} = K_q\tau_0$. Εάν η απόσβεση είναι δυναμική, η σταθερά Stern-Volmer θα αντιπροσωπεύεται από την K_D , διαφορετικά, αυτή η σταθερά θα περιγραφεται ως K_{sv} .

$$F_0/F = 1 + K_{sv}\cdot[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad \text{(Εξίσωση 4.1)}$$

Τα δεδομένα απόσβεσης παρουσιάζονται συνήθως ως γραφήματα F_0/F ως προς $[Q]$, καθώς ο λόγος F_0/F αναμένεται να εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση του αποσβέστη. Ένα τέτοιο διάγραμμα έχει αποτέμνουσα ίση με 1 και κλίση ίση με K_{sv} (Σχήμα 4.2). Είναι χρήσιμο να αναφερθεί ότι το K_{sv}^{-1} είναι η συγκέντρωση αποσβέστη στην οποία $F_0/F = 2$ ή όπου το 50% της έντασης έχει αποσβεστεί. Η γραμμικότητα στη γραφική παράσταση Stern-Volmer αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης μιας κατηγορίας (single class) φθοροφόρων, όλα εξίσου προσιτά στην απόσβεση. Εάν υπάρχουν δύο πληθυσμοί φθοροφόρων και ο φθορισμός του ενός δεν αποσβένεται, τότε οι γραφικές παραστάσεις S-V αποκλίνουν από τη γραμμικότητα προς τον άξονα X. Αυτό το αποτέλεσμα παρατηρείται συχνά στην απόσβεση φθορισμού της τρυπτοφάνης σε πρωτεΐνες από πολικούς ή φορτισμένους αποσβέστες, οι οποίοι δεν διεισδύουν εύκολα στο υδρόφοβο εσωτερικό των πρωτεϊνών, και μόνο τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης στην επιφάνεια της πρωτεΐνης αποσβένονται.

Η απόσβεση φθορισμού διακρίνεται σε δυναμική και στατική απόσβεση. Η στατική και δυναμική απόσβεση μπορούν να διακριθούν από τη διαφορετική εξάρτησή τους από τη θερμοκρασία και το ιώδες, ή κατά προτίμηση από τις μετρήσεις χρόνου ημιζωής. Γενικά, η δυναμική απόσβεση ελέγχεται από το φαινόμενο διάχυσης και επειδή η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αυξημένη διάχυση, κατά συνέπεια μεγαλώνει η σταθερά δυναμικής απόσβεσης. Η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει ωστόσο τη σταθερότητα του συμπλέγματος φθοροφόρου-αποσβέστη με αποτέλεσμα τη μείωση της σταθεράς στατικής απόσβεσης (Σχήμα 4.2). [Lakowicz (2006), Tang et al (2014)]



Σχήμα 4.2: Σύγκριση δυναμικής και στατικής απόσβεσης [Lakowicz (2006)].

Για τη στατική απόσβεση η σταθερά πρόσδεσης K και ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης προσδιορίζονται από την τροποποιημένη εξίσωση Stern-Volmer (εξ. 4.2), μέσω κατασκευής λογαριθμικού διαγράμματος $[(F_0 - F)/F]$ ως προς $[Q]$. Η κλίση του διαγράμματος ισούται με τον αριθμό θέσεων πρόσδεσης (n) και η αποτέμνουσα ισούται με τον λογάριθμο της σταθεράς πρόσδεσης ($\log K_s$).

$$\text{Log}[(F_0 - F)/F] = \log K_s + n \log [Q] \quad \text{(Εξίσωση 4.2)}$$

Το $[Q]$ είναι η συγκέντρωση του ελεύθερου αποσβέστη, για την οποία μπορούμε να γράψουμε την ακόλουθη εξίσωση 4.3:

$$[Q] = [Q]_{tot} - n[PQ_n] = [Q]_{tot} - n([P]_0 - [P]) = [Q]_{tot} - n[P]_{tot} \frac{([P]_{tot} - [P])}{[P]_{tot}} = [Q]_{tot} - n[P]_{tot} \frac{(F_0 - F)}{F_0} \quad \text{(Εξίσωση 4.3)}$$

Όπου $[Q]_{tot}$ και $[P]_{tot}$ είναι οι συνολικές συγκεντρώσεις αποσβέστη και φθοροφόρου στο σύστημα. Η εξίσωση 4.2, η οποία είναι μια προσέγγιση, απλοποιείται περαιτέρω υποθέτοντας ότι $[Q] \approx [Q]_{tot}$. [van de Weert et al (2011)]

Οι θερμοδυναμικές σταθερές πρόσδεσης φθοροφόρου-αποσβέστη μπορούν να υπολογιστούν σύμφωνα με την εξίσωση Van't Hoff (εξ. 4.4), όπου ΔH , ΔS , ΔG , είναι μεταβολή της ενθαλπίας, της εντροπίας και της ελεύθερης ενέργειας αντίστοιχα και R είναι η παγκόσμια σταθερά αερίων ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) [Wei et al. (2018)]. Για τον υπολογισμό είναι αναγκαία η μέτρηση της K_s σε ένα εύρος θερμοκρασιών.

$$\Delta H = d(\Delta G/T)/d(1/T)$$

(Εξίσωση 4.4)

$$\Delta G = -RT \ln K_s$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$\ln K_s = -\Delta H/RT + \Delta S/R$$

Οι αλληλεπιδράσεις μικρών μορίων με (βιολογικά) μακρομόρια περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου, δυνάμεις Van der Waals, ηλεκτροστατικές έλξεις και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (μερική απομάκρυνση μη-πολικών οντοτήτων από το νερό). Συνήθως όταν $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ οι κύριες δυνάμεις είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, όταν $\Delta H \approx 0$, $\Delta S > 0$, οι κύριες δυνάμεις θεωρούνται οι ηλεκτροστατικές έλξεις και όταν $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, κύριες δυνάμεις είναι οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals [Ross et al (1981), Tang et al (2014)]. Τα συμπεράσματα αυτά έχουν προκύψει από έναν μεγάλο αριθμό πειραμάτων πρόσδεσης μικρών μορίων σε βιομόρια, όπως οι πρωτεΐνες και το DNA.

4.1.2.1 Διορθώσεις απορρόφησης για το inner-filter effect

Το inner-filter effect αναφέρεται στην απορρόφηση (ή οπτική διασπορά) φωτός στο μήκος κύματος διέγερσης ή εκπομπής από τις ενώσεις που υπάρχουν στο υπό μελέτη διάλυμα. Συνήθως, τα οπτικά των εμπορικών φασματοφωτομέτρων φθορισμού εστιάζουν στο φως διέγερσης και συλλέγουν την εκπομπή από το κέντρο της κυψελίδας. Επομένως, όταν η απορρόφηση στο μήκος κύματος διέγερσης είναι σημαντική, τότε φτάνει λιγότερο φως στο κέντρο του δείγματος και έτσι μειώνεται ο φθορισμός του φθοροφόρου, ενώ η απορρόφηση στο μήκος κύματος εκπομπής μειώνει το φως εκπομπής που φτάνει στον ανιχνευτή. Αυτό είναι ένα πρόβλημα το οποίο δημιουργείται όταν ο υποκαταστάτης που χρησιμοποιείται απορροφά στα μήκη κύματος διέγερσης ή/και εκπομπής. Το φαινόμενο μπορεί να μειώσει την φαινομενική ένταση φθορισμού και έτσι να αλλοιώσει τα δεδομένα απόσβεσης.

Εάν η γεωμετρία του οργάνου είναι τέτοια ώστε η ένταση που συλλέγεται να προέρχεται ακριβώς από το κέντρο της κυψελίδας, τότε το inner-filter effect μπορεί να εκτιμηθεί από την εξίσωση 4.5. Όπου F_{cor} και F_{obs} είναι οι διορθωμένες και οι πειραματικές εντάσεις φθορισμού και A_{exc} και A_{em} είναι οι απορροφήσεις του διαλύματος στα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα που προκαλούνται από την προσθήκη υποκαταστάτη (σε κυψελίδα μήκους διαδρομής 1 cm). [Lakowicz (2006), van de Weert et al (2011)]

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{(A_{exc} + A_{em})/2} \quad \text{(Εξίσωση 4.5)}$$

4.1.3 Σύγχρονος φθορισμός

Η φασματομετρία σύγχρονου φθορισμού έχει γίνει ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση των διαμορφωτικών αλλαγών των πρωτεϊνών λόγω παρουσίας άλλων μορίων (αποσβέστες). Τα φάσματα λαμβάνονται μέσω ταυτόχρονης σάρωσης της διέγερσης (excitation) και της μονοχρωματικής εκπομπής (emission) ενός φασματοφωτομέτρου φθορισμού, με σταθερή διαφορά μήκους κύματος εκπομπής-διέγερσης ($\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$). Στο σύγχρονο φάσμα, διατηρείται η ευαισθησία που σχετίζεται με τον φθορισμό, προσφέρονται όμως αρκετά πλεονεκτήματα όπως η στένωση των φασματικών ζωνών, η αύξηση της επιλεκτικότητας με φασματική απλοποίηση και η μείωση του χρόνου μέτρησης στην ανάλυση πολλών συστατικών [Pacheco et al (2013)]. Σε σύγκριση με τη συμβατική τεχνική φθορισμού, το φάσμα αυτό είναι ικανό να εξαλείψει την παρεμβολή της σκέδασης Rayleigh με σάρωση παράλληλη προς την ακτίνα σκέδασης Rayleigh παρέχοντας έτσι απλοποιημένα φάσματα με στενές κορυφές [Li et al (2012)]. Η ιδέα του σύγχρονου φθορισμού παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τον Lloyd και η βασική θεωρία διατυπώθηκε από τον Vo-Dinh. Η σχέση που αντιπροσωπεύει την εξίσωση της σύγχρονης φασματομετρίας είναι:

$$I_s(\lambda, \lambda') = KcdE_x(\lambda')E_M(\lambda) \quad \text{(Εξίσωση 4.6)}$$

$$\lambda = \lambda' + \Delta\lambda \quad \text{(Εξίσωση 4.7)}$$

όπου I_s είναι η ένταση φθορισμού, λ και λ' είναι το μήκος κύματος εκπομπής και διέγερσης αντίστοιχα, K είναι ένας σταθερός παράγοντας, c είναι η συγκέντρωση του αναλύτη, d είναι το μήκος διαδρομής της κυψελίδας και τα E_x και E_M είναι το φάσμα διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα [Pacheco et al (2013)].

Η βελτίωση της ευαισθησίας αυτής της τεχνικής αντικατοπτρίζεται στην Εξ. (4.6), η οποία περιλαμβάνει δύο συναρτήσεις αντί για μία, όπως συμβαίνει στη συμβατική μέθοδο φωταύγειας. Επιπλέον, εισάγεται και ένας νέος βαθμός επιλεκτικότητας από την παράμετρο $\Delta\lambda$ που μπορεί να επιλεγθεί από τον πειραματιστή [Pacheco et al (2013)].

Ο Miller [Fuller et al (1979)] έδειξε την εφαρμογή αυτής της μεθόδου στην ανάλυση φθορισμού της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης. Σε μικρές τιμές $\Delta\lambda$, ο σύγχρονος φθορισμός ενός μίγματος τυροσίνης-τρυπτοφάνης είναι χαρακτηριστικός της τυροσίνης, ενώ σε μεγάλες τιμές $\Delta\lambda$ τα φάσματα είναι παρόμοια με εκείνα της τρυπτοφάνης.

Τα φάσματα σύγχρονου φθορισμού χρησιμοποιούνται συχνά για τον χαρακτηρισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός αποσβέστη και των πρωτεϊνών, καθώς, όπως αναφέρεται σε πολλά άρθρα, μπορεί να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το μοριακό μικροπεριβάλλον κοντά στα μόρια του χρωμοφόρου. Επίσης αντανακλούν την επίδραση των υποκαταστατών στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών [Tang et al (2014)]. Τα φάσματα σύγχρονου φθορισμού για $\Delta\lambda = 15$ nm εστιάζουν στα κατάλοιπα τυροσίνης μιας πρωτεΐνης, ενώ τα σύγχρονα φάσματα φθορισμού σε $\Delta\lambda = 60$ nm εστιάζουν στα κατάλοιπα τρυπτοφάνης. Μια γενική μέθοδος για τη μελέτη του περιβάλλοντος των κατάλοιπων αμινοξέων είναι η μέτρηση της πιθανής μετατόπισης στο μέγιστο μήκος κύματος των φασμάτων του σύγχρονου φθορισμού. Η μετατόπιση στη θέση του μέγιστου οφείλεται σε αλλαγές στην πολικότητα ή στην υδροφοβικότητα γύρω από το χρωμοφόρο. Όταν η υδροφοβικότητα μειώνεται, το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής θα παρουσιάσει ερυθρή μετατόπιση. Αντίθετα, όταν αυξάνεται η υδροφοβικότητα θα παρουσιάσει κυανή μετατόπιση. [Tang et al (2014), Pacheco et al (2013)]

4.1.4 Ενίσχυση φθορισμού

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η εκπομπή ενός φθοροφόρου μπορεί να αυξηθεί παρουσία άλλων μορίων. Αυτό συμβαίνει στις ανθοκυανίνες που αλληλεπιδρούν με μερικές από τις πρωτεΐνες και τους πολυσακχαρίτες στην παρούσα διατριβή. Η ενίσχυση του φθορισμού μπορεί να προέρχεται από μηχανισμούς μεταφοράς ενέργειας φθορισμού, από αύξηση της

απορρόφησης των δεσμευμένων ειδών ή από αλλαγή της γεωμετρίας ή της σταθερότητας της διεγερμένης κατάστασης. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις η κβαντική απόδοση αυξάνεται.

Ένας φαινομενολογικός τρόπος μοντελοποίησης ενίσχυσης φθορισμού βασίζεται στην εξίσωση Benesi-Hildebrand (B-H), [Kuntz et al (1968)] που προήλθε αρχικά από μοντέλα αύξησης απορρόφησης UV-vis και τροποποιήθηκε για φθορισμό [Bhattacharyya et al (1994), Kapp et al (1990), Ma et al (2012)]. Η εξίσωση B-H (εξίσωση 4.8) ισχύει πραγματικά για σύνδεση 1:1 μεταξύ δύο μορίων, του φθοροφόρου (B) και του υποκαταστάτη (P).

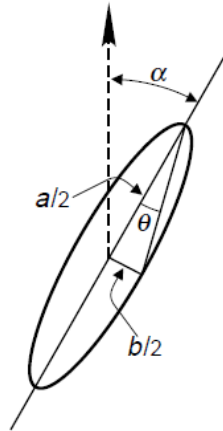
$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta F_{\max}} + \frac{1}{K \Delta F_{\max}} \times \frac{1}{[P]} \quad \text{(Εξίσωση 4.8)}$$

Όπου $\Delta F = F - F_0$ είναι η ενίσχυση φθορισμού, το ΔF_{\max} είναι το μέγιστο αυτής της ποσότητας, το K είναι η σταθερά πρόσδεσης και $[P]$ είναι η συγκέντρωση του υποκαταστάτη. Η εξίσωση εφαρμόζεται συνήθως με την περαιτέρω προσέγγιση $[P] \approx [P]_{\text{tot}}$. Στην πραγματικότητα αποτελεί οριακή μορφή μιας πιο γενικής εξίσωσης (εξίσωση 4.9) τριών παραμέτρων, όπου n είναι η στοιχειομετρία της αντίδρασης $P + nB \rightleftharpoons PB_n$, $[B]_{\text{tot}}$ και $[P]_{\text{tot}}$ είναι οι συνολικές συγκεντρώσεις της ανθοκυανίνης και της πρωτεΐνης. Η εξ. (4.8) προέρχεται από την εξ. (4.9) στην περίπτωση όπου $n = 1$ και εφαρμόζοντας το όριο $K[B]_{\text{tot}} \ll 1$, $[P] \approx [P]_{\text{tot}}$. Το μειονέκτημα της εξ. (4.9) είναι ότι περιέχει τρεις παραμέτρους που σε κάποιο βαθμό διασυνδέονται.

$$n[P]_{\text{tot}} = [B]_{\text{tot}} \frac{\Delta F}{\Delta F_{\max}} \left(1 + \frac{1}{K \left\{ [B]_{\text{tot}} \left(1 - \frac{\Delta F}{\Delta F_{\max}} \right) \right\}^n} \right) \quad \text{(Εξίσωση 4.9)}$$

4.2 Κυκλικός διχρωισμός

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού είναι μια από τις ταχύτερες μεθόδους για την απόκτηση δομικών πληροφοριών για βιομόρια και βασίζεται στις διαφορετικές απορροφήσεις αριστερά και δεξιά κυκλικά πολωμένου φωτός ασύμμετρων μορίων. Συγκεκριμένα μια οπτικά ενεργή ουσία απορροφά διαφορετικά την δεξιά κυκλικά πολωμένη ακτινοβολία από την αριστερά κυκλικά πολωμένη. Η άνιση απορρόφηση των δύο συνιστώντων διανυσμάτων έχει ως αποτέλεσμα το συνιστάμενο διάνυσμα να ιχνογραφεί μια έλλειψη, να είναι δηλαδή ελλειπτικά πολωμένο (σχήμα 4.3). Το φαινόμενο αυτό καλείται κυκλικός διχρωισμός. [Juhl et al (2012),iii]



Σχήμα 4.3: Παρουσιάζεται η έλλειψη, με κύριο άξονα a και δευτερεύοντα άξονα b , η οποία σχηματίζεται από την προβολή του διανύσματος του ηλεκτρικού πεδίου για ελλειπτικά πολωμένο φως και φαίνεται η οπτική γωνία περιστροφής “ α ” και η ελλειπτικότητα “ θ ” [Serdyuk 2007].

Ο κυκλικός διχρωσμός (CD) ορίζεται ως η διαφορά, ΔA , μεταξύ της απορρόφησης του αριστερά κυκλικά πολωμένου (A_l) και του δεξιά κυκλικά πολωμένου φωτός (A_r), όπως φαίνεται στην εξ. 4.10. Ως $\Delta \epsilon$ συμβολίζεται το δεκαδικό γραμμομοριακό ΔA , C είναι η συγκέντρωση και l είναι το μήκος της οπτικής διαδρομής στο δείγμα. Το CD μπορεί επίσης να οριστεί με βάση τη μοριακή ελλειπτικότητα. Η ελλειπτικότητα, θ και ο κυκλικός διχρωσμός, ΔA , σχετίζονται μέσω της εξίσωσης 4.11, όπου η γωνία θ εκφράζεται σε μοίρες, ο όρος $\ln 10$ εμφανίζεται στην εξίσωση επειδή το ΔA ορίστηκε με βάση το δεκαδικό λογάριθμο και $[\theta]$ είναι η μοριακή ελλειπτικότητα [Serdyuk 2007].

$$\Delta A = A_l - A_r = \Delta \epsilon C l \quad \text{(Εξίσωση 4.10)}$$

$$\theta = 180(\ln 10)\Delta A / 4\pi = 32.98\Delta A \quad \text{(Εξίσωση 4.11)}$$

$$[\theta] = 100\theta / C l$$

$$[\theta] = 3298\Delta \epsilon$$

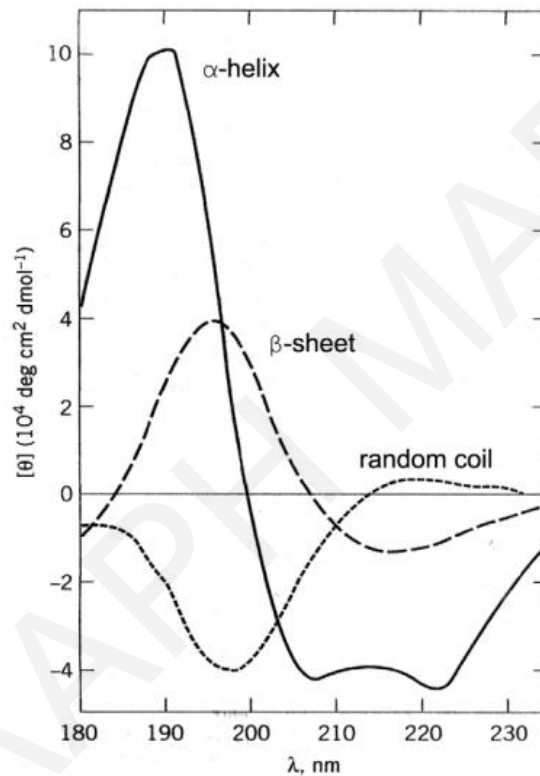
Τα φάσματα κυκλικού διχρωσμού καταγράφουν την ελλειπτικότητα δείγματος ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Κατά προσέγγιση τα φάσματα CD πρωτεϊνών οφείλονται στη διαμόρφωση του πεπτιδικού σκελετού ως α -έλικα, β -πτυχωτή επιφάνεια και τυχαίο σπείραμα (random coil). Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζονται φάσματα αναφοράς κυκλικού διχρωσμού για την α -έλικα, β -πτυχωτή επιφάνεια και τυχαίο σπείραμα (random coil). Η μέτρηση CD πραγματοποιείται συνήθως μεταξύ 190 και 250 nm, καθώς οι πεπτιδικοί δεσμοί απορροφούν

σε αυτό το εύρος μήκους κύματος και αποκαλύπτει κυρίως πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Αυτά τα δομικά στοιχεία χαρακτηρίζονται από καθορισμένες τιμές απορρόφησης. Οι α-έλικες παρουσιάζουν δύο ελάχιστα στα 222 και 208 nm και ένα μέγιστο στα 193 nm, ενώ τα β-φύλλα παρουσιάζουν μόνο ένα ελάχιστο στα 218 nm και ένα μέγιστο στα 195 nm. Οι πρωτεΐνες με άτακτες δομές (disordered structures), όπως οι μετουσιωμένες πρωτεΐνες και τα ολιγοπεπτίδια και τα πολυπεπτίδια με δισουλφιδικούς δεσμούς, εμφανίζουν αρνητική ζώνη στα 195 nm [Juhl et al (2012)].

Η ανάλυση και η ερμηνεία των φασμάτων CD πραγματοποιείται μέσω βάσεων δεδομένων. Όταν οι συντεταγμένες από την κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και το NMR άρχισαν να διατίθενται σε τράπεζες δεδομένων πρωτεϊνών για ένα μεγάλο αριθμό δομών, προέκυψε η ευκαιρία όχι μόνο να επιβεβαιωθούν οι δευτεροταγείς δομές που προβλέπονται από τα φάσματα CD, αλλά και να δημιουργηθούν βάσεις δεδομένων για φάσματα CD που αντιστοιχούν σε διαφορετικές οικογένειες δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως σύνολα βάσης για την προσαρμογή φασμάτων «άγνωστων» πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό επιλύθηκαν προβλήματα που αφορούσαν την προσεκτική ανάλυση των ίδιων των δομών, προκειμένου να προσδιοριστούν και να καθοριστούν τα όρια για τις διάφορες δευτεροταγείς δομές και να αντιμετωπιστούν οι αποκλίσεις από την «τελειότητα» σε κάθε τύπο δευτεροταγούς δομής [Serdyuk 2007]. Το φάσμα CD μιας άγνωστης δομής προσαρμόζεται σήμερα πάνω σε έναν πίνακα από γνωστές δομές με στόχο να εντοπισθούν τα ποσοστά δευτεροταγών δομών που αποδίδουν με το μικρότερο σφάλμα το λαμβανόμενο σήμα CD.

Η φασματοσκοπία CD χρησιμοποιείται εκτενώς για τη μελέτη χειρόμορφων μορίων όλων των τύπων και μεγεθών, αλλά οι πιο σημαντικές εφαρμογές της είναι στη μελέτη μεγάλων βιολογικών μορίων. Μια πρωταρχική χρήση είναι στην ανάλυση της δευτεροταγούς δομής ή της διαμόρφωσης των μακρομορίων, ιδιαίτερα των πρωτεϊνών, καθώς η δευτεροταγής δομή είναι ευαίσθητη στο περιβάλλον, τη θερμοκρασία, το pH. Ο κυκλικός διχρωσμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παρατηρηθεί πώς η δευτεροταγής δομή αλλάζει με τις περιβαλλοντικές συνθήκες ή την αλληλεπίδραση με άλλα μόρια. Το CD λόγω αρωματικών ομάδων, όπως η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη, στο εγγύς UV (near-UV) (όπου απορροφούν αυτά τα κατάλοιπα) είναι ευαίσθητο στην τριτοταγή δομή. Το CD είναι επίσης ιδιαίτερα βοηθητικό στις μελέτες

αναδίπλωσης πρωτεϊνών, επειδή το σήμα CD ενός μη δομημένου (unstructured) πολυπεπτιδίου είναι πολύ διαφορετικό από τα σήματα που προκύπτουν από οργανωμένες δευτεροταγείς δομές. Ωστόσο, ο περιορισμός του κυκλικού διχρωισμού είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο ρυθμιστικά διαλύματα με μικρές συγκεντρώσεις αλάτων, καθώς οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων οδηγούν σε ισχυρές απορροφήσεις υποβάθρου. Επιπλέον, σπάνια μπορούν να συλλεχθούν πληροφορίες για συγκεκριμένα κατάλοιπα. [Juhl et al (2012), Serdyuk (2007), in.3]



Σχήμα 4.4: CD φάσματα αναφοράς για α-έλικα, β-πτυχωτή και τυχαίο σπείραμα υπολογισμένα από τα φάσματα σφαιρικών πρωτεϊνών γνωστής δομής. ^[in.2]

4.3 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)

Η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) προτάθηκε από τον E. Freire και τους συνεργάτες του το 1990. Η μέθοδος αυτή είναι μοναδική καθώς σε ευνοϊκές πειραματικές συνθήκες παρέχει, εκτός από το μέγεθος της μεταβολής της ενθαλπίας κατά τη πρόσδεση, τιμές για τη συγγένεια πρόσδεσης και τις μεταβολές της εντροπίας. Επειδή αυτές οι παράμετροι

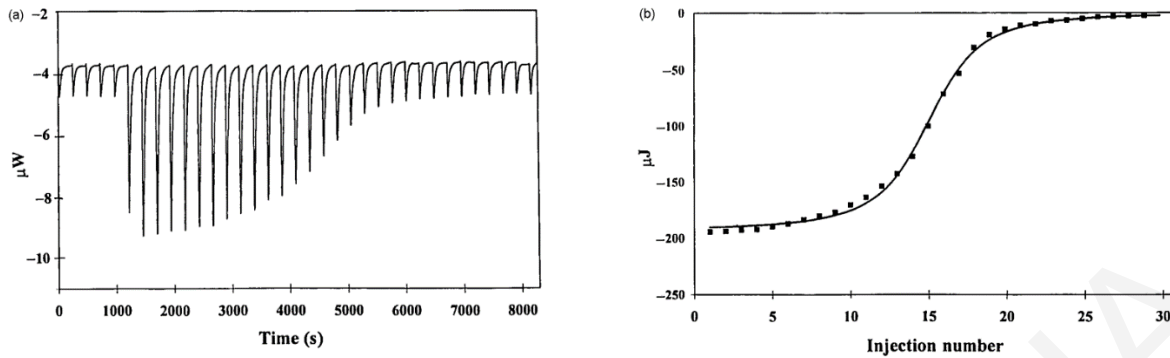
καθορίζουν πλήρως την ενεργειακή διαδικασία της πρόσδεσης, η ITC παίζει ολοένα και σημαντικότερο ρόλο στη λεπτομερή μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-υποκαταστατών και στις σχετικές προσεγγίσεις μοριακού σχεδιασμού (π.χ. στο σχεδιασμό φαρμάκων) [Serdyuk 2007]. Όταν μια πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με έναν υποκαταστάτη, απελευθερώνεται ή απορροφάται θερμότητα. Ο προσδιορισμός αυτής της θερμότητας δίνει την απαραίτητη εικόνα του μηχανισμού αλληλεπίδρασης. Η τεχνική ITC είναι η μόνη τεχνική που μετρά αυτήν την ανταλλαγή θερμότητας και ως εκ τούτου παρέχει λεπτομερείς θερμοδυναμικές πληροφορίες σχετικά με τη διαδικασία πρόσδεσης. Η μέθοδος ITC είναι πολύ γενικότερη και μπορεί να μετρήσει οποιαδήποτε ενθαλπία, π.χ. αραίωσης, διάλυσης, ρόφησης κ.α. φυσικών διεργασιών [Fernandes et al (2020)].

Η κυψελίδα αντίδρασης στο ITC έχει συνήθως όγκο κοντά στο 1 mL και περιέχει ένα από τα αντιδραστήρια. Το άλλο αντιδραστήριο προστίθεται στην κυψελίδα με έγχυση σε μικρούς όγκους (2-10 μL), και ανάδευση. Η ποσότητα ισχύος (millijoules per second ή watts) που απαιτείται για τη διατήρηση σταθερής διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ του λουτρού αντίδρασης (reaction bath) και της κυψελίδας αναφοράς μετريέται από το θερμιδόμετρο. Η θερμότητα που απορροφάται ή απελευθερώνεται από τη χημική αντίδραση προσδιορίζεται από το ολοκλήρωμα της καμπύλης ισχύος κατά τον κατάλληλο χρόνο [Serdyuk 2007].

Στο Σχήμα 4.5 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα πειράματος ITC μεταξύ πρωτεΐνης-υποκαταστάτη. Η ποσότητα που απεικονίζεται στον άξονα y είναι η χρονική εξάρτηση της απαιτούμενης ισχύος για τη διατήρηση σταθερής διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ των κυψελίδων μέτρησης και αναφοράς. Κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μία έγχυση, και η ολοκλήρωσή της (μετά την αφαίρεση του υποβάθρου λόγω αραίωσης του υποκαταστάτη, μηχανικών αποτελεσμάτων ανάμιξης κ.λπ.) με τη θερμότητα που σχετίζεται με την ποσότητα πρόσδεσης (q_j) (Εξ. 4.12). Οι κορυφές κανονικά πρέπει να είναι προοδευτικά μικρότερες με κάθε έγχυση, επειδή υπάρχει λιγότερη ελεύθερη πρωτεΐνη, η οποία είναι διαθέσιμη για πρόσδεση. Όταν η πρωτεΐνη κορεσθεί, το ύψος της κορυφής αντιπροσωπεύει το επίπεδο του υποβάθρου (background level). Η ενθαλπία της πρόσδεσης συναρτηθεί του αριθμού έγχυσης απεικονίζεται στο σχήμα 4.5(b) [Serdyuk 2007].

$$q_j = \nu \Delta H \Delta[L_{j,\text{bound}}]$$

(Εξίσωση 4.12)



Σχήμα 4.5: Πειραματικές καμπύλες ITC πρόσδεσης πρωτεΐνης-υποκαταστάτη: (a) Ισχύς που απαιτείται για τη διατήρηση σταθερής διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ των κυψελίδων μέτρησης και αναφοράς ως συνάρτηση του χρόνου. (b) ενθαλπία πρόσδεσης ως συνάρτηση του αριθμού των εγχύσεων [Serdyuk 2007].

Η ποσότητα θερμότητας q_j που απορροφάται ή απελευθερώνεται στην έγχυση j υπολογίζεται από την εξ. 4.12, όπου v είναι ο όγκος της κυψελίδας αντίδρασης και $\Delta[L_{j,\text{bound}}]$ είναι η μεταβολή στη συγκέντρωση του προσδεμένου υποκαταστάτη μετά την έγχυση j . Η θερμότητα q_j είναι ανάλογη με την ποσότητα του υποκαταστάτη, $v \Delta[L_{j,\text{bound}}]$, που προσδένεται στη πρωτεΐνη.

Εάν, επιπλέον, η σταθερά ισορροπίας, K_a , της αντίδρασης είναι γνωστή από άλλες μετρήσεις (όπως τιτλοδότηση φθορισμού) η μεταβολή ελεύθερης ενέργειας Gibbs, ΔG και συνεπώς η μεταβολή εντροπίας, ΔS , της αντίδρασης μπορούν να υπολογιστούν χρησιμοποιώντας την εξίσωση Van't Hoff (εξ.4.4) και η θερμοδυναμική της αντίδρασης ορίζεται πλήρως [Serdyuk 2007].

Σε ιδανικές περιπτώσεις, από ένα μόνο πείραμα, το ITC επιτρέπει τον προσδιορισμό της σταθεράς πρόσδεσης (K_a), της στοιχειομετρίας (n), της ελεύθερης ενέργειας Gibbs (ΔG), της ενθαλπίας (ΔH) και της εντροπίας (ΔS) της πρόσδεσης, παρέχοντας έτσι πληθώρα σημαντικών δεδομένων [Fernandes et al (2020)].

Συγκεκριμένα, το ITC επιτρέπει την άμεση μέτρηση των σταθερών πρόσδεσης στο εύρος mM έως nM με τη δυνατότητα επέκτασης αυτού του εύρους σε μM μέσω πειραμάτων ανταγωνισμού. Οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις που χαρακτηρίζονται από σταθερές πρόσδεσης στην περιοχή mM απαιτούν υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και υποκαταστάτη, ενώ οι

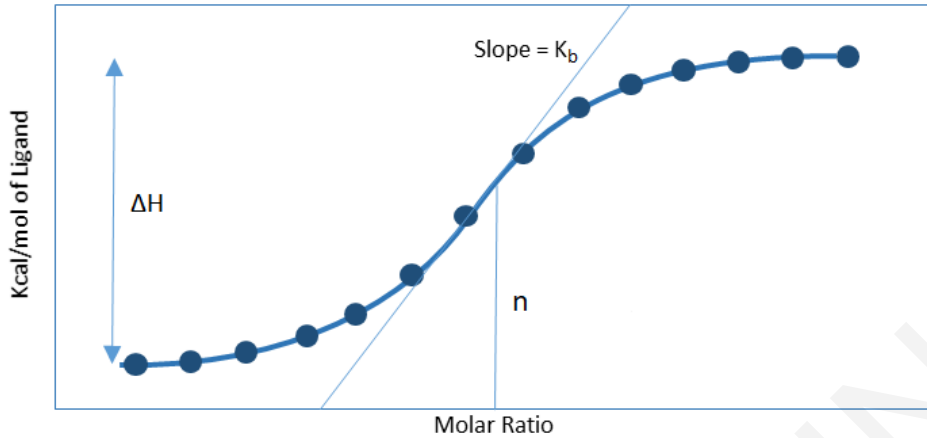
ισχυρές αλληλεπιδράσεις, που χαρακτηρίζονται από σταθερές στο εύρος nM έως pM, απαιτούν πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις. Η στοιχειομετρία (n) παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης των πρωτεϊνών. Επίσης όσο αφορά τις θερμοδυναμικές παραμέτρους, περισσότερο αρνητική τιμή ΔG σημαίνει ισχυρότερη πρόσδεση και θετική τιμή εντροπίας υποδεικνύει υψηλότερο βαθμό αταξίας. Οι ευνοϊκές τιμές εντροπίας συνδέονται συχνά με την απελευθέρωση μορίων νερού από ένα μακρομόριο, ενώ οι αρνητικές τιμές εντροπίας συχνά συνδέονται με περιορισμούς διαμόρφωσης. [Manuscript et al (2015)].

4.3.1 Διόρθωση μη επεξεργασμένων δεδομένων ITC

Κατά την πραγματοποίηση ενός πειράματος ITC που εξετάζει την αντίδραση μεταξύ του διαλύματος a που βρίσκεται στη σύριγγα και του διαλύματος b που βρίσκεται στην κυψελίδα δείγματος του θερμιδομέτρου, οι θερμότητες που μετριοούνται αφορούν τις εξής διαδικασίες: Τη θερμότητα αλληλεπίδρασης των δύο διαλυμάτων (Q_r), τη θερμότητα αραιώσης του διαλύματος a, π.χ του υποκαταστάτη ($Q_{dil,ligand}$), τη θερμότητα αραιώσης του διαλύματος b, π.χ ενός μακρομορίου ($Q_{dil,molecule}$) και τη θερμότητα αραιώσης του διαλύτη (Q_{blank}). Για να ληφθεί η σωστή θερμότητα αλληλεπίδρασης των δύο διαλυμάτων (Q_{corr}) είναι απαραίτητο να γίνει διόρθωση των δεδομένων θερμότητας. Είναι απαραίτητο να γίνουν κάποια τυφλά πειράματα που περιλαμβάνουν: πείραμα αραιώσης του υποκαταστάτη (κατά το οποίο το διάλυμα a τιτλοδοτείται με διαλύτη στην κυψελίδα του δείγματος), πείραμα αραιώσης του μακρομορίου, π.χ πρωτεΐνης (κατά το οποίο γίνεται έγχυση διαλύτη από τη σύριγγα στο διάλυμα 2 στη κυψελίδα του δείγματος) και πείραμα αραιώσης του διαλύτη (κατά το οποίο γίνεται έγχυση διαλύτη από τη σύριγγα στη κυψελίδα του δείγματος που περιέχει επίσης διαλύτη. Η εξίσωση για τη διόρθωση της θερμότητας δίνεται από την Εξίσωση 4.13:

$$Q_{corr} = Q_r - Q_{dil,ligand} - Q_{dil,molecule} - Q_{blank} \quad (\text{Εξίσωση 4.13})$$

Έπειτα από τη διόρθωση των θερμοτήτων κατασκευάζεται γραφική παράσταση της διορθωμένης θερμότητας αλληλεπίδρασης ανά mol του μορίου το οποίο εγχέεται, δηλαδή της γραμμομοριακής μεταβολής στην ενθαλπία, ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία (Σχήμα 4.6). [Freyer et al (2008)]



Σχήμα 4.6: Γραφική παράσταση διορθωμένης συνολικής θερμότητας αλληλεπίδρασης ως προς τη μοριακή αναλογία (mol υποκαταστάτη / mol μακρομορίου). ^[in.4]

4.3.2 Εξαγωγή θερμοδυναμικών παραμέτρων

Στην παρούσα διατριβή η επιτυχής εξαγωγή των θερμοδυναμικών παραμέτρων βασίζεται στη χρήση μη γραμμικής παλινδρόμησης καμπυλών ελάχιστων τετραγώνων (nonlinear least squares curve fitting), χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο μοντέλο που περιγράφει την υπό μελέτη αλληλεπίδραση.

Στην παρούσα μελέτη, M είναι η πρωτεΐνη BSA και L είναι η ανθοκυανίνη. Χρησιμοποιείται μοντέλο με n θέσεις ισοδύναμης πρόσδεσης των μικρών μορίων (ανθοκυανινών) πάνω σε ένα μόριο πρωτεΐνης. *[Brown et al (2009)]*

$$Q = \frac{n [M]_t V_0 \Delta H}{2} \left[1 + \frac{[L]_t}{n[M]_t} + \frac{1}{c} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_t}{n[M]_t} + \frac{1}{c} \right)^2 - \frac{4[L]_t}{n[M]_t}} \right] \quad (\text{Εξίσωση 4. 14})$$

όπου n είναι ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης ανά μακρομόριο, V_0 είναι ο πραγματικός όγκος της κυψελίδας του οργάνου (effective cell volume), $[M]_t$ και $[L]_t$ είναι οι συνολικές συγκεντρώσεις του μακρομορίου και του υποκαταστάτη αντίστοιχα και c είναι μια παράμετρος χωρίς μονάδες που ορίζεται στην Εξίσωση 4.15:

$$c = nK_b [M]_t = n \frac{[M]_t}{K_d} \quad (\text{Εξίσωση 4. 15})$$

όπου K_b είναι η σταθερά πρόσδεσης και K_d είναι η σταθερά διάσπασης συμπλόκου ($K_d=1/K_b$). Η παράμετρος c είναι σημαντική για την ανάλυση των πειραμάτων ITC, επειδή επηρεάζει το σχήμα των καμπυλών τιτλοδότησης, την εύρεση των ισοδύναμων mole που απαιτούνται για τον κορεσμό των θέσεων πρόσδεσης στον υποδοχέα και τη γενικότερη ακρίβεια των παραμέτρων πρόσδεσης (n , K , ΔH).

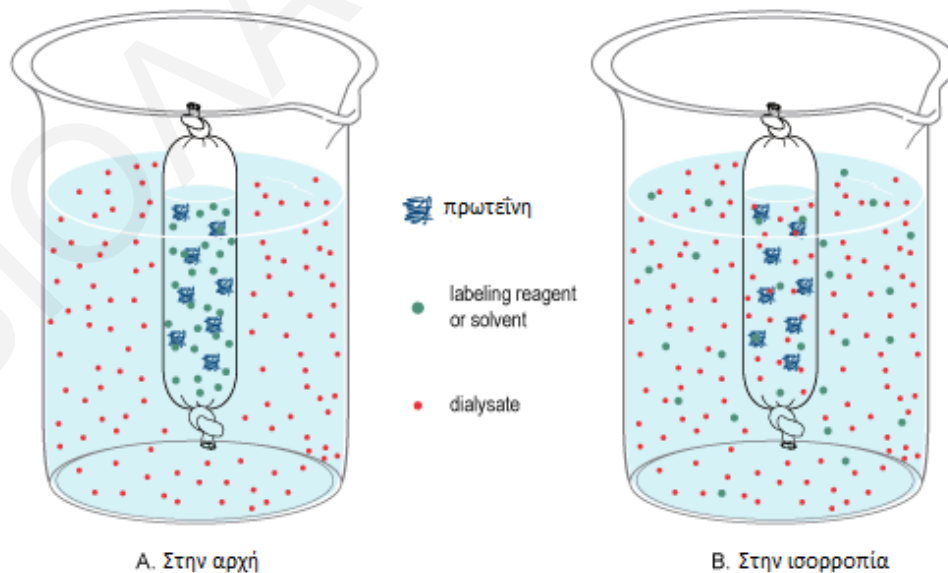
4.4 Διαπίδυση

Οι μεμβράνες διαπίδυσης (dialysis tubing), επίσης γνωστές ως μεμβράνες Visking, είναι τεχνητές ημιπερατές μεμβράνες (semi-permeable membrane tubing) που χρησιμοποιούνται σε τεχνικές διαχωρισμού, διευκολύνοντας τη ροή μικροσκοπικών μορίων σε διάλυμα με βάση τη διαφορική διάχυση. Στο πλαίσιο της έρευνας της επιστήμης της ζωής, οι μεμβράνες διαπίδυσης χρησιμοποιούνται συνήθως για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων μικρών μορίων όπως τα άλατα, οι αναγωγικοί παράγοντες ή οι χρωστικές από μεγαλύτερα μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες, το DNA ή οι πολυσακχαρίτες. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται επίσης συχνά ως βοηθητικό μέσο για την επίδειξη των αρχών της διάχυσης, της ώσμωσης, της κίνησης Brown και της κίνησης των μορίων σε μια περιοριστική μεμβράνη.^[in.5]

Σήμερα, οι μεμβράνες διαπίδυσης για εργαστηριακές εφαρμογές διατίθενται σε διάφορες διαστάσεις και αποκοπές μοριακού βάρους (molecular-weight cutoffs-MWCO) και βρίσκονται επίσης σε μια ποικιλία διαφορετικών προδιαμορφωμένων συσκευών (preformatted devices), βελτιώνοντας σημαντικά την απόδοση και την ευκολία χρήσης. Οι αποκοπές μοριακού βάρους κυμαίνονται από 1-1000 000 kDa και τα μεγέθη των πόρων κυμαίνονται συνήθως από 10–100Å για μεμβράνες με MWCO 1K-50K. Ο προσδιορισμός της αποκοπής μοριακού βάρους είναι το αποτέλεσμα του αριθμού και του μέσου μεγέθους των πόρων που δημιουργούνται κατά την παραγωγή της μεμβράνης. Η αποκοπή μοριακού βάρους αναφέρεται συνήθως στη μικρότερη μέση (average) μοριακή μάζα ενός τυπικού μορίου που δεν θα διαχέεται αποτελεσματικά κατά μήκος της μεμβράνης κατά την διαπίδυση. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η αποκοπή μοριακού βάρους μιας μεμβράνης δεν είναι απόλυτα καθορισμένη τιμή. Τα μόρια με μάζα κοντά στο MWCO της μεμβράνης, θα διαχέονται κατά μήκος της βραδύτερα από τα μόρια που είναι σημαντικά μικρότερα από το MWCO. Οι μεμβράνες διαπίδυσης για

εργαστηριακή χρήση συνήθως κατασκευάζονται από κυτταρίνη, τροποποιημένη κυτταρίνη ή συνθετικό πολυμερές (οξική κυτταρίνη, νιτροκυτταρίνη). Οι μεμβράνες διαπίδυσης οι οποίες κατασκευάζονται από πολυσουλφόνη, πολυαιθεροσουλφόνη (PES), χαραγμένο (etched) πολυανθρακικό ή κολλαγόνο χρησιμοποιούνται για συγκεκριμένες ιατρικές εφαρμογές, ή για επεξεργασία νερού και τροφίμων. [Stancheva (2008), [in.5]]

Ένα πείραμα διαπίδυσης συμβαίνει όταν ένα δείγμα περιέχεται σε σακούλι κυτταρίνης και βυθίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα. Λόγω του μεγέθους των πόρων της μεμβράνης, μεγάλα μόρια στο δείγμα δεν μπορούν να περάσουν δια μέσου της, περιορίζοντας έτσι τη διάχυση τους από το σακούλι με το δείγμα (sample chamber). Αντίθετα, μικρά μόρια θα διαχέονται ελεύθερα κατά μήκος της μεμβράνης και θα επιτυγχάνουν ισορροπία σε ολόκληρο τον όγκο του διαλύματος, αλλάζοντας έτσι τη συνολική συγκέντρωση αυτών των μορίων στο δείγμα και στο ρυθμιστικό διάλυμα (dialysate) (Σχήμα 4.7). Μόλις επιτευχθεί ισορροπία, η τελική συγκέντρωση των μορίων εξαρτάται από τους όγκους των σχετικών διαλυμάτων και εάν το εξισορροπημένο ρυθμιστικό διάλυμα αλλαχθεί με νέο, μέσω διάχυσης θα μειωθεί περαιτέρω η συγκέντρωση των μικρών μορίων στο δείγμα. Η διαπίδυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για εισαγωγή είτε για αφαίρεση μικρών μορίων από ένα δείγμα, επειδή μικρά μόρια κινούνται ελεύθερα κατά μήκος της μεμβράνης και στις δύο κατευθύνσεις. Αυτό την καθιστά χρήσιμη τεχνική για μια ποικιλία εφαρμογών. [in.5, in.6]



Σχήμα 4.7: Σακούλι διαπίδυσης στην αρχή και στην ισορροπία. [in.6]

Στην παρούσα διατριβή μοντελοποιήθηκε η αλληλεπίδραση των μορίων ανθοκυανίνης (A) με τα μόρια πρωτεΐνης (P). Ο υπολογισμός πρέπει να λαμβάνει υπόψη την ποσότητα ανθοκυανίνης που απορροφάται στο σακούλι διαπίδυσης. Αυτό γίνεται με ανάλυση των αποτελεσμάτων ενός παράλληλου πειράματος απουσία πρωτεΐνης. Στις παρακάτω εξισώσεις θεωρείται ότι δεν υπάρχει σημαντική ισορροπία Donnan, η οποία θα μετατόπιζε την κατανομή ισορροπίας. Με $[A]_{in}$ την αρχική συγκέντρωση της ανθοκυανίνης μέσα στο σακούλι διαπίδυσης και $[A]_{eq}$ τη συγκέντρωση ισορροπίας που μετράται μετά την επίτευξη ισορροπίας, το ισοζύγιο μάζας (mass balance) είναι:

$$[A]_{in}V_{in} = [A]_{eq}V_{tot} + n_{ads} = [A]_{eq}V_{tot} + \Gamma_{ads}S_m = [A]_{eq}V_{tot} + \frac{\Gamma_{ads}^{max}K_a[A]_{eq}}{1+K_a[A]_{eq}}S_m \quad (\text{Εξίσωση 4.16})$$

Όπου n_{ads} , Γ_{ads} , Γ_{ads}^{max} είναι τα moles ανθοκυανίνης που είναι προσροφημένα στη μεμβράνη, η ειδική προσρόφηση (mol/m^2) και η τιμή κορεσμού της αντίστοιχα. Η προσρόφηση μοντελοποιείται ως ισόθερμος Langmuir με K_a την σταθερά ισορροπίας της προσρόφησης. Εάν η προσρόφηση στη μεμβράνη απέχει πολύ από τον κορεσμό ($K_a[A]_{eq} \ll 1$), τότε η Εξίσωση (4.16) γίνεται:

$$[A]_{eq} \approx \left(\frac{V_{in}}{V_{tot} + \Gamma_{ads}^{max}K_aS_m} \right) [A]_{in} = \left(\frac{V_{in}}{V_{tot} + D} \right) [A]_{in} \quad (\text{Εξίσωση 4.17})$$

Από τη γραμμική σχέση μεταξύ των $[A]_{eq}$ και $[A]_{in}$ λαμβάνεται η παράμετρος D, η οποία έχει διαστάσεις όγκου. Η παραδοχή τότε είναι ότι το D δεν θα αλλάξει παρουσία μιας πρωτεΐνης, στην οποία τα μόρια της ανθοκυανίνης μπορεί να προσδεθούν. Σε αυτήν την περίπτωση, η υπόλοιπη ισορροπία μπορεί να γραφτεί ως:

$$[A]_{in}V_{in} = [A]_{eq}V_{tot} + n_{ads} + n_b = [A]_{eq}V_{tot} + D[A]_{eq} + n_b \quad (\text{Εξίσωση 4.18})$$

$$\Rightarrow n_b = [A]_{in}V_{in} - (V_{tot} + D)[A]_{eq}$$

Όπου n_b είναι τα συνολικά moles ανθοκυανίνης που προσδέονται με μόρια πρωτεΐνης εντός του σακουλιού διαπίδυσης. Εάν n_p είναι ο αριθμός των moles πρωτεΐνης, τότε μπορούμε να ορίσουμε την ποσότητα $r = n_b/n_p$ (moles προσδεδωμένης ανθοκυανίνης ανά mole πρωτεΐνης). Ένα διάγραμμα $r/[A]_{eq}$ ως προς r ονομάζεται γραφική παράσταση Scatchard [Cantor et al (1980)] και το σχήμα και η ανάλυσή του μπορούν να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τον τύπο πρόσδεσης των ανθοκυανινών στις πρωτεΐνες ή τους πολυσακχαρίτες.

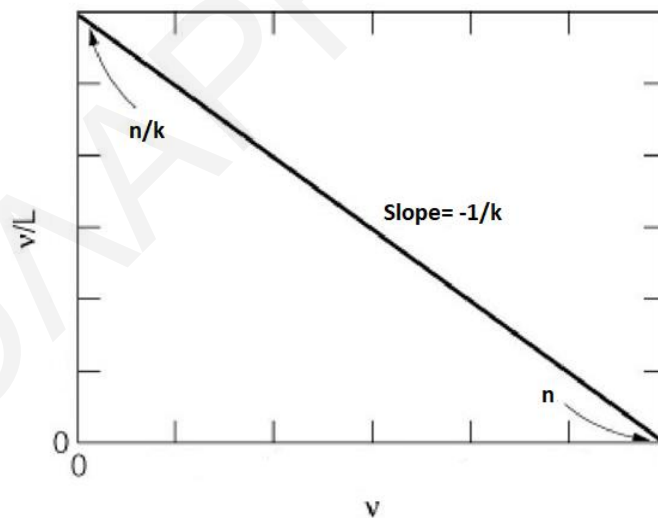
4.4.1 Γραφικές παραστάσεις Scatchard (Scatchard plots)

Η γραφική παράσταση Scatchard είναι μια μέθοδος ανάλυσης των δεδομένων της πρόσδεσης υποκαταστάτη σε κατάσταση ισορροπίας. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού των θέσεων πρόσδεσης σε έναν υποδοχέα, ακόμα και όταν αυτές οι θέσεις εμφανίζουν συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις ή όταν υπάρχουν περισσότερα από ένα είδη θέσεων πρόσδεσης. Οι πειραματικές παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή γραφικής παράστασης Scatchard είναι η συγκέντρωση του ελεύθερου υποκαταστάτη $[L]$ και ο μέσος αριθμός μορίων υποκαταστάτη που συνδέονται σε ένα μόριο υποδοχέα r ή ν , σε μια συγκεκριμένη συνολική συγκέντρωση υποκαταστάτη σε κατάσταση ισορροπίας, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως.

Η γραφική παράσταση Scatchard στην απλούστερη περίπτωση (ανεξάρτητη πρόσδεση μορίων σε μακρομόριο με μία μόνο θέση πρόσδεσης) είναι γραμμική με αποτέμνουσα στον άξονα y ίση με n/k ($=nK_a$), αποτέμνουσα στον άξονα x ίση με n και κλίση ίση με $-1/k$ ($=-K_a$) (Σχήμα 4.8) και ακολουθεί την εξίσωση 4.19, όπου k είναι η σταθερά διάστασης.

$$\nu/(L) = n/k - \nu/k$$

(Εξίσωση 4.19)



Σχήμα 4.8: Γραφική παράσταση Scatchard για πανομοιότυπες, ανεξάρτητες θέσεις πρόσδεσης. [Cantor et al (1980)]

Είναι σαφές ότι αυτό το διάγραμμα παρέχει έναν απλό τρόπο προσδιορισμού των δύο παραμέτρων n και k που χαρακτηρίζουν την ισορροπία της πρόσδεσης. Σε πολλές περιπτώσεις,

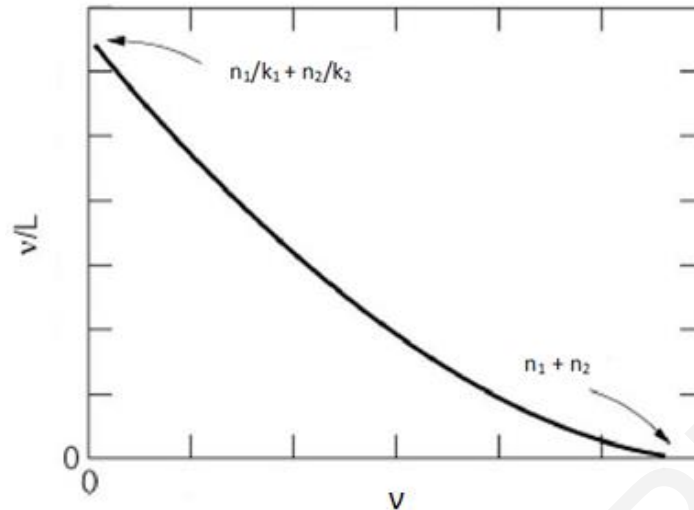
για γραφική παράσταση Scatchard είναι καμπύλη και όχι γραμμική. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι υπάρχουν περισσότερα από ένα είδη θέσεων πρόσδεσης. Εάν υπάρχουν n_1 ανεξάρτητες θέσεις με μικροσκοπική σταθερά διάστασης k_1 και n_2 θέσεις με σταθερά διάστασης k_2 , και ούτω καθεξής, τότε ισχύει μια εξίσωση ανάλογη με την εξίσωση 4.19 (εξίσωση 4.20). Οι εξισώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των παραμέτρων n_i και k_i από μια γραφική παράσταση.

$$v = \sum_i \frac{n_i(L)/k_i}{1+(L)/k_i} \quad \text{(Εξίσωση 4.20)}$$

Το Σχήμα 4.9 είναι μια απεικόνιση για ένα διάγραμμα Scatchard στην περίπτωση δύο κατηγοριών ανεξάρτητων θέσεων. Το διάγραμμα στο Σχήμα 4.9 μπορεί να εξηγηθεί ως εξής. Μια εφαπτομένη γραμμή σχεδιάζεται στο διάγραμμα γύρω από το σημείο $v=0$. Η αποτέμνουσα στον άξονα y αυτής της γραμμής είναι $n_1/k_1+n_2/k_2$. Ως πρώτη προσέγγιση μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αποτέμνουσα καθορίζεται κυρίως από το μικρότερο k (ορίζεται ως k_1) και ότι είναι ίση με n_1/k_1 . Παρομοίως, η αποτέμνουσα στον άξονα x στην τομή της εφαπτομένης γραμμής θεωρείται ως πρώτη εκτίμηση ίση με n_1 . Με εκτιμώμενα τα n_1 και k_1 , μπορούμε να αφαιρέσουμε από τα δεδομένα τη συμβολή των ισχυρότερων θέσεων πρόσδεσης (μικρότερες τιμές k). Στη συνέχεια μπορούμε να κατασκευάσουμε ένα νέο διάγραμμα που μπορεί να αναλυθεί σύμφωνα με την εξίσωση 4.19 προκειμένου να ληφθούν προσεγγιστικές τιμές των παραμέτρων n_2 και k_2 .

Η πρώτη εκτίμηση όλων των παραμέτρων μπορεί να βελτιωθεί με μια περαιτέρω επανάληψη και ούτω καθεξής. Καθ' όλη τη διαδικασία, χρησιμοποιείται ο περιορισμός ότι το n_1+n_2 ισούται με την αποτέμνουσα της εφαπτομένης στον άξονα x . Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι το $\sum_i (\frac{n_i}{k_i})$ να ισούται με την παρατηρούμενη αποτέμνουσα στον άξονα y .

[Cantor et al (1980)]



Σχήμα 4.9: Γραφική παράσταση Scatchard για σύστημα με δύο θέσεις πρόσδεσης. [Cantor et al (1980)]

Η ανάλυση των γραφικών παραστάσεων Scatchard παρουσιάζει αρκετούς περιορισμούς. Αρχικά και οι δύο ποσότητες $v/[L]$ και v περιέχουν πειραματικά σφάλματα. Ως εκ τούτου, ο υπολογισμός της κλίσης και της αποτέμνουσας μιας γραμμικής γραφικής παράστασης Scatchard με απλά ελάχιστα τετράγωνα δεν είναι στατιστικά έγκυρος. Μια καλύτερη προσέγγιση για τη στατιστική ανάλυση είναι να προσαρμόζεται το n ως συνάρτηση του $[L]$ απευθείας στην εξίσωση για ένα μοντέλο πρόσδεσης. Γενικά, τα μη γραμμικά γραφήματα Scatchard είναι εξαιρετικά δύσκολο να ερμηνευθούν. Η ανάλυση Scatchard ενισχύει την προβολή των δεδομένων πρόσδεσης που λαμβάνονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποκαταστάτη. Τέλος, στην περίπτωση των καμπύλων διαγραμμάτων, όπως αυτό στο Σχήμα 4.9, η διάκριση των πραγματικών μοριακών ιδιοτήτων ενός υποδοχέα (receptor) απαιτεί επιπρόσθετα ανεξάρτητα πειράματα, πέρα από την ανάλυση Scatchard. Για αυτό και στην παρούσα διατριβή, γίνεται συνδυασμός διάφορων μεθόδων για την ανάλυση τέτοιων διαγραμμάτων.^[in.7]

4.4.2 Διαγράμματα Hill

Η μη γραμμικότητα διαγράμματος Scatchard μπορεί να οφείλεται και σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων που προσδένονται. Για τους σκοπούς της επεξεργασίας δεδομένων όταν εμπλέκεται η συνεργιστική αλληλεπίδραση υποκαταστατών, είναι συνήθης πρακτική η χρήση ημι-εμπειρικής προσέγγισης και, στη συνέχεια η ερμηνεία της φυσικής

σημασίας των εμπειρικών παραμέτρων που λαμβάνονται. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται στην υπόθεση ότι η δέσμευση για μέρος της περιοχής κορεσμού της αλληλεπίδρασης μπορεί να περιγραφεί από εξισώσεις που φαινομενικά μοιάζουν με αυτές για ένα απείρως συνεργιστικό σύστημα. Στην ακραία περίπτωση της άπειρης συνεργιστικότητας, η πρόσδεση μπορεί να αναπαρασταθεί ως αντίδραση «all-or-none» (εξίσωση 4.21). Ο Hill αρχικά πρότεινε ότι όλες οι μορφές πρόσδεσης υποκαταστάτη μπορούν να αναπαρασταθούν με αλληλεπίδραση ενός σταδίου μεταξύ των μορίων του μακρομορίου και των υποκαταστατών σύμφωνα με την πιο κάτω αντίδραση με φαινομενική σταθερά διάστασης, K_n για τις θέσεις αλληλεπίδρασης:



$$K_n = [ML_n] / [M][L]^n$$

όπου M είναι το μακρομόριο και L ο υποκατάτης.

Τα διαγράμματα Hill κατασκευάζονται με βάση την εξίσωση 4.22, όπου ουσιαστικά προκύπτει ως ο λογάριθμος της εξίσωσης Hill-Langmuir, για να ληφθεί ευθεία γραμμή.

$$\log \left[\frac{\bar{y}}{1-\bar{y}} \right] = \alpha_H \log[L] - \log K_d = \alpha_H \log[L] - \alpha_H \log K_A \quad (\text{Εξίσωση 4.22})$$

Όπου \bar{y} είναι το κλάσμα της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης υποδοχέα που προσδένει τον υποκαταστάτη ($\bar{y}=v/n$), [L] είναι η συγκέντρωση του ελεύθερου μη προσδεδεμένου υποκαταστάτη, K_d είναι η φαινομενική σταθερά διάστασης, K_A είναι η συγκέντρωση υποκαταστάτη που οδηγεί σε μισή πλήρωση των θέσεων πρόσδεσης και α_H είναι η σταθερά του Hill ($1 \leq \alpha_H \leq n$), η οποία είναι δείκτης της συνεργιστικότητας.

Τα δεδομένα της πρόσδεσης μπορούν να γραφτούν ως \log [δεσμευμένες θέσεις] / [ελεύθερες θέσεις] ως προς \log [ελεύθερου υποκαταστάτη] (διάγραμμα Hill). Η κλίση του διαγράμματος δίνει τον συντελεστή Hill, α_H . Όταν $\alpha_H=n$ τότε το σύστημα συμπεριφέρεται απόλυτα συνεργιστικά, όταν $\alpha_H=1$ δεν υπάρχει συνεργιστικότητα (μία θέση που δεν αλληλεπιδρά). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η κατασκευή του διαγράμματος Hill απαιτεί γνώση της συγκέντρωσης των ελεύθερων θέσεων του υποδοχέα. Αυτό επιτυγχάνεται συνήθως, γνωρίζοντας τον συνολικό αριθμό των πιθανών θέσεων και αφαιρώντας από αυτόν τον αριθμό θέσεων που προσδέεται ο υποκαταστάτης. Υπό αυτήν την έννοια, η κατασκευή διαγραμμάτων Hill δεν είναι τόσο ισχυρή μέθοδος όσο η κατασκευή διαγραμμάτων Scatchard, η οποία δεν

απαιτεί γνώση του συνολικού αριθμού των θέσεων, n , αλλά παρέχει μια εκτιμώμενη τιμή για αυτήν την παράμετρο. Ωστόσο, ο συντελεστής Hill παρέχει μια πολύ χρήσιμη ποσοτική μέτρηση της έκτασης των συνεργιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πιθανών θέσεων. [*Cantor et al (1980), Dahlquist (1978)*]

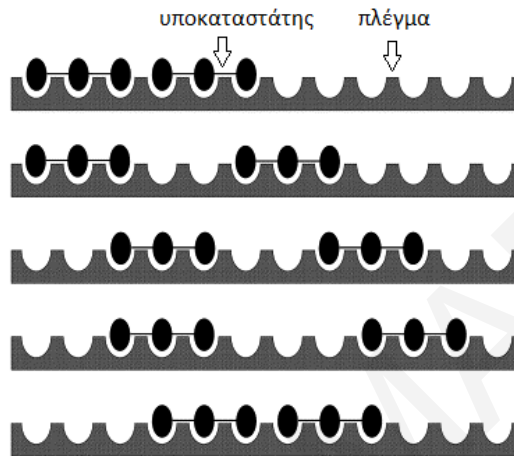
4.4.1.1 Αλληλεπίδραση μεγάλων υποκαταστατών με αλυσίδες επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων

Κατά την μελέτη της ισορροπίας πρόσδεσης υποκαταστατών σε βιολογικά συστήματα, μια περίπτωση με μεγάλο ενδιαφέρον είναι η αλληλεπίδραση μεγάλων υποκαταστατών με αλυσίδες επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων, όπως είναι τα διπλά ελικοειδή νουκλεϊκά οξέα και πολλά συνθετικά πολυμερή. Αυτά τα συστήματα έχουν ειδικά στατιστικά χαρακτηριστικά που είναι αρκετά διαφορετικά από τις καταστάσεις που περιεγράφηκαν προηγουμένως. Για τέτοια συστήματα υπάρχει μια θεωρία η οποία αναπτύχθηκε από τους J.D. McGhee και P.H.von Hippel (1974).

Αρχικά, υποθέτουμε ένα μακρομόριο κατασκευασμένο από N ταυτόσημες επαναλαμβανόμενες μονάδες. Για παράδειγμα, σε ένα ελικοειδές νουκλεϊκό οξύ, οι επαναλαμβανόμενες μονάδες θα μπορούσαν να είναι οι φωσφορικές ομάδες ή οι μονάδες σακχάρου. Αν υποθέσουμε ότι ένας υποκαταστάτης L καταλαμβάνει ℓ συνεχόμενες μονάδες της αλυσίδας, ο κορεσμός του μακρομορίου με L οδηγεί σε N / ℓ προσδεδεμένα μόρια υποκαταστάτη ανά αλυσίδα. Ο υποκαταστάτης θεωρείται ότι μπορεί να καταλάβει οποιοσδήποτε ℓ διαδοχικές μονάδες της αλυσίδας. Η αρχικά κενή αλυσίδα περιέχει $N - \ell + 1$ πιθανές θέσεις που μπορεί να καταλάβει ο πρώτος υποκαταστάτης. Έτσι, κατά την έναρξη της τιτλοδότησης με υποκαταστάτη, υπάρχουν πολλές περισσότερες πιθανές θέσεις από τις θέσεις N / ℓ που μπορούν να καταληφθούν σε κατάσταση κορεσμού.

Το Σχήμα 4.10 απεικονίζει τις στατιστικές πολυπλοκότητες του πλέγματος για την περίπτωση $N=12$ και $\ell=3$. Το v αντιπροσωπεύει τα moles του υποκαταστάτη L που προσδένεται ανά mole πλέγματος. Σε κορεσμό $v=N/\ell=4$ προσδεδεμένα μόρια υποκαταστάτη ανά πλέγμα. Το Σχήμα 4.10 δείχνει ότι δημιουργείται μια ποικιλία μικροκαταστάσεων όταν προσδεθούν μόλις $v=2$ υποκαταστάτες στην αλυσίδα. Λόγω της διάταξης των υποκαταστατών κάποιες αλυσίδες

δεν μπορούν να φιλοξενήσουν επιπλέον υποκαταστάτες, ενώ άλλες μπορούν να πάρουν ακόμη δύο. Όλες αυτές οι μικροκαταστάσεις είναι σε ισορροπία με τη συγκέντρωση του ελεύθερου υποκαταστάτη, και πρέπει να ληφθούν υπόψη σε οποιαδήποτε προσπάθεια για τον υπολογισμό της καμπύλης πρόσδεσης. [Cantor et al (1980)]



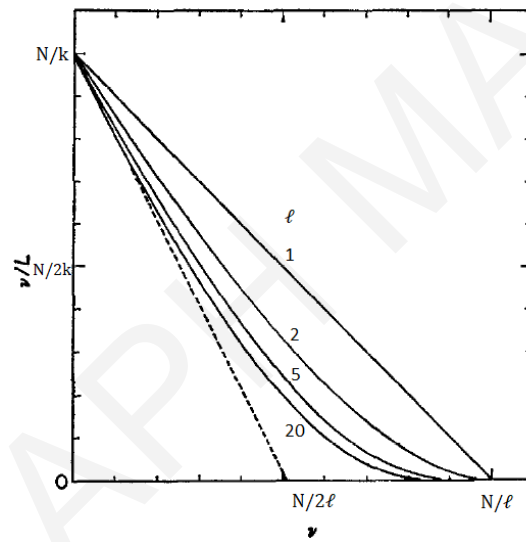
Σχήμα 4.10: Απεικόνιση μικροκαταστάσεων στην περίπτωση δύο υποκαταστατών που προσδένονται στο πλέγμα, με $l=3$ και $N=12$. [Cantor et al (1980)]

Για να υπολογιστεί η συμπεριφορά πρόσδεσης στο μακρομόριο σε τέτοιες περιπτώσεις συστημάτων χρησιμοποιείται η εξίσωση 4.23. Η εξίσωση 4.23, μπορεί να συγκριθεί με την αντίστοιχη ισοδύναμη εξίσωση 4.19 για τη σύνδεση υποκαταστάτη L σε n πανομοιότυπες ανεξάρτητες θέσεων στις οποίες το φαινόμενο "επικάλυψης" δεν είναι υπαρκτό. Για $l=1$ η εξίσωση 4.23 μετατρέπεται στην εξίσωση 4.19, όπως αναμένεται. Ωστόσο, όταν $l>1$, τότε ο τελευταίος παράγοντας στην εξίσωση 4.23 είναι πάντα μικρότερος από τη μονάδα και διαφέρει από αυτή ανάλογα με το v . Αυτό δημιουργεί έντονη μη γραμμικότητα στα γραφήματα Scatchard ($v/(L)$ ως προς v). Επίσης τα γραφήματα για $l>1$ βρίσκονται πάντα κάτω από τα γραφήματα για την περίπτωση $l=1$.

$$v/(L) = \frac{N(1-lv/N)}{k} \left(\frac{1-lv/N}{1-(l-1)v/N} \right)^{l-1} \quad \text{(Εξίσωση 4.23)}$$

Στο Σχήμα 4.11 παρουσιάζονται μερικές γραφικές παραστάσεις Scatchard για τιμές l μεταξύ 1 και 20, με $k=1$ M. Για ευκολία, στη σύγκριση των γραφικών παραστάσεων, η τετμημένη

δίνεται σε μονάδες $1/\ell$. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο πλήρης κορεσμός επιτυγχάνεται όταν $v = n = N/\ell$. Ωστόσο, καθώς αυξάνεται το ℓ , η καμπυλότητα των γραφημάτων γίνεται πιο εμφανής. Αυτό συμβαίνει επειδή το μακρομόριο για εντροπικούς λόγους δεν μπορεί να κορεσθεί, με την αντίσταση να γίνεται πιο έντονη καθώς αυξάνεται το ℓ . Έτσι, ο στατιστικά μεγάλος αριθμός μικροκαταστάσεων (microstates) που παράγονται σε δεδομένο βαθμό μερικού κορεσμού δίνει ισχυρή εντροπική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια, η οποία χάνεται φυσικά, καθώς η πρόσδεση προχωρά στο πλήρως κορεσμένο μακρομόριο, το οποίο αποτελείται από μόνο μια μικροκατάσταση. Ως αποτέλεσμα, για μεγάλους υποκαταστάτες ο κορεσμός δεν είναι πρακτικά εφικτός. [Cantor et al (1980)]



Σχήμα 4.11: Γράφημα Scatchard για πρόσδεση υποκαταστάτη σε μακρομόριο με διάφορες τιμές ℓ και $k=1M$. [McGhee et al (1974)]

Η αποτέμνουσα του άξονα x της γραφικής παράστασης Scatchard στο Σχήμα 4.11 είναι N/ℓ , η οποία αντιστοιχεί στο n στην εξίσωση 4.19. Ωστόσο, η αποτέμνουσα του άξονα y είναι N/k , που δεν είναι η ίδια με την αποτέμνουσα (n/k) που προκύπτει χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.19. Αυτή η διάκριση είναι σημαντικό να αναγνωριστεί κατά τη λήψη παραμέτρων από γραφικές παραστάσεις Schatchard που περιλαμβάνουν πρόσδεση υποκαταστάτη σε αλυσίδες ομοπολυμερών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Πειραματικό Μέρος

5.1 Χημικά

- Κόκκινο λάχανο, βατόμουρα
- Μητρικό διάλυμα ανθοκυανινών $3.34 \times 10^{-4} \text{M}$ (βατόμουρα, κόκκινο λάχανο)
- Υδροχλωρικό οξύ ($0.01 \text{M}, 10^{-3} \text{M}, 10^{-4} \text{M}$), διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου ($0.05 \text{M}, 0.1 \text{M}$), αιθανόλη, μεθανόλη, οξιμισμένη μεθανόλη: 0.01% (v/v) HCl σε μεθανόλη, διάλυμα 0.1M χλωριούχο νάτριο, οξικό οξύ.
- Διβασιικό φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4), $99+\%$, M.B:141.96, Εταιρεία: Acros Organics
- Μονοβασικό φωσφορικό νάτριο, $99+\%$, ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), M.B:137.99, Εταιρεία: Acros Organics
- οξικό νάτριο, M.B = 82.0343 g/mol , Εταιρεία: Merck
- Χλωριούχο κάλιο (KCl), M.B: 74.5513 g/mol , Εταιρεία: Fluka
- Αλβουμίνη βόειου ορού, M.B: 66430.3 g/mol , Εταιρεία: Roche
- Whey protein isolate, M.B (β -lactoglobulin): 18.4 kDa , Εταιρεία: Agropur
- Καζεϊνικό νάτριο από βόειο γάλα (grade III), M.B: 23000 g/mol , Εταιρεία: Sigma Aldrich
- Χιτοζάνη (low molecular weight), M.B: $50\ 000\text{-}190\ 000 \text{ g/mol}$, M.B_{monomer}: 180 g/mol , Εταιρεία: Sigma Aldrich
- Πηκτίνη, M.B_{monomer}: 194.14 g/mol , Εταιρεία: Agros Organics
- Θεϊκή χονδροϊτίνη, M.B_{monomer}: 515 g/mol , Εταιρεία:
- Αλγινικό νάτριο, M.B_{monomer}: 216.12 g/mol , Εταιρεία: Sigma Aldrich
- Μεμβράνη διαπίδυσης από κυτταρίνη: μέσο εύρος: 33 mm (1.3 in.), Εταιρεία: Sigma Aldrich
- Μεμβράνη διαπίδυσης βενζοϋλιωμένη: μέσο εύρος: 32 mm (1.27 in.), Εταιρεία: Sigma Aldrich

5.2 Παρασκευή διαλυμάτων:

5.2.1 Παρασκευή μητρικού υδατικού διαλύματος οξικών (ρυθμιστικό διάλυμα) συγκέντρωσης 0.01M σε συνθήκες $\text{pH}=4$:

Σε ογκομετρική φιάλη του 1L τοποθετήθηκαν 0.186g οξικό νάτριο και 0.464g οξικό οξύ. Η φιάλη συμπληρώθηκε με νερό μέχρι την χαραγή. Ακολούθησε μέτρηση του pH του διαλύματος το οποίο ήταν 4 .

5.2.2 Παρασκευή μητρικού υδατικού διαλύματος φωσφορικών (ρυθμιστικό διάλυμα) συγκέντρωσης 0.01M σε συνθήκες $\text{pH}=6$:

Σε ογκομετρική φιάλη του 1L τοποθετήθηκαν 0.1943g διβασιικού φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4) και 1.191g μονοβασικού φωσφορικού νατρίου ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Ακολούθησε μέτρηση του pH του διαλύματος το οποίο ήταν 6 .

5.2.3 Παρασκευή μητρικού υδατικού διαλύματος φωσφορικών (ρυθμιστικό διάλυμα) συγκέντρωσης 0.01M σε συνθήκες pH=7 :

Σε ογκομετρική φιάλη του 1L τοποθετήθηκαν 0.820g διβασικού φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4) και 0.583g μονοβασικού φωσφορικού νατρίου ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Ακολούθησε μέτρηση του pH του διαλύματος το οποίο ήταν 7.

5.2.4 Παρασκευή διαλύματος 0.2N KCl – 0.2N HCl (25:67) σε συνθήκες pH=1 :

Σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL τοποθετήθηκαν 0.372g χλωριούχου καλίου και 0.416mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Η φιάλη συμπληρώθηκε με νερό μέχρι την χαραγή. Ακολούθησε ρύθμιση του pH του διαλύματος.

5.2.5 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος 1N οξικού νατρίου–1N υδροχλωρικού οξέος–νερό (100:60:90) σε συνθήκες pH=4.5 :

Σε ογκομετρική φιάλη των 200 mL τοποθετήθηκαν 2.952g οξικού νατρίου και 2.51mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Η φιάλη συμπληρώθηκε με νερό μέχρι την χαραγή. Ακολούθησε ρύθμιση του pH του διαλύματος.

5.2.6 Παρασκευή μητρικού διαλύματος ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 0.334mM:

Σε ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκαν x mL ανθοκυανίνης, τα οποία λήφθηκαν από το πυκνό εκχύλισμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης y και συμπληρώθηκε με υδατικό διάλυμα ρυθμιστικού μέχρι την χαραγή.

5.2.7 Παρασκευή διαλυμάτων των πρωτεϊνών (BSA, WPI και καζεϊνικό νάτριο) συγκέντρωσης 1mg/mL σε συνθήκες pH=4 και pH=6 (BSA,WPI) και pH=7 (καζεϊνικό νάτριο):

Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 0.1g πρωτεΐνης και προστέθηκαν περίπου 70-80 mL μητρικού ρυθμιστικού διαλύματος, ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να διαλυθεί το στερεό και στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι την χαραγή. Ακολούθησε μέτρηση του pH του διαλύματος.

5.2.8 Παρασκευή διαλυμάτων των πολυσακχαριτών χιτοζάνης και πηκτίνης συγκέντρωσης 1mg/mL σε συνθήκες pH=4 και pH=3.2 αντίστοιχα:

Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 0.1g πολυσακχαρίτη και προστέθηκαν περίπου 70-80 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 1-2 ώρες μέχρι να διαλυθεί το στερεό και στην συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι την χαραγή. Ακολούθησε μέτρηση του pH του διαλύματος.

5.2.9 Παρασκευή διαλύματος θειικής χονδροϊτίνης συγκέντρωσης 25mg/mL σε συνθήκες pH=3.2:

Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 2.5g θειικής χονδροϊτίνης και προστέθηκαν περίπου 70-80 mL διαλύματος υδροχλωρικού οξέος 10^{-3}M . Ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου

1-2 ώρες μέχρι να διαλυθεί το στερεό και στην συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστέθηκε διάλυμα HCl μέχρι την χαραγή. Ακολούθησε μέτρηση του pH του διαλύματος.

5.2.10 Παρασκευή διαλύματος αλγινικού νατρίου συγκέντρωσης 12.5 mg/mL σε συνθήκες pH=4:

Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 1.25g αλγινικού νατρίου και προστέθηκαν περίπου 70-80 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα για περίπου 1-2 ώρες μέχρι να διαλυθεί το στερεό και στην συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι την χαραγή. Ακολούθησε μέτρηση του pH του διαλύματος.

5.3 Συσκευές

Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (UV 1900 Shimadzu), συσκευή φυγοκέντρωσης, Περιστροφικός εξατμιστήρας (rotary evaporator) με αντλία κενού ή αναρροφητήρα νερού (40 ° C), blender, πεχάμετρο, φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300, φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-8300, φασματοφωτόμετρο κυκλικού διχρωϊσμού: JASCO J-815, θερμοδόμετρο ισοθερμικής τιτλοδότησης: Nano ITC, TA Instruments, HPLC Shimadzu (Kyoto, Japan) εφοδιασμένο με αντλία (LC-10AD), ανιχνευτή PDA (SPD-M20A), αυτόματο δειγματολήπτη (SIL-20AHT) και θερμοστατούμενο φούρνο (CTO-10ASVP).

5.4 Απομόνωση των ανθοκυανινών

5.4.1. Απομόνωση ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο

Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά φύλλα κόκκινου λαχανικού κόπηκαν σε μικρά κομμάτια. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με συνεχή ανάμειξη 25 g αυτών των φύλλων και 50 mL μέσου εκχύλισης (οξιτισμένη υδατική αιθανόλη (75-25% v/v EtOH-HCl 1%), σε μια μονάδα ανάμειξης. Η διάρκεια επαφής ήταν περίπου 1 λεπτό. Το εκχύλισμα της ανθοκυανίνης διηθήθηκε για την αφαίρεση των χονδροκόκκων. Το λαμβανόμενο διήθημα φυγοκεντρήθηκε στις 6000 rpm για 15 λεπτά, ούτως ώστε να απομακρυνθούν τα πολύ λεπτά αιωρούμενα σωματίδια. [Chandrasekhar et al (2012)]

Για την ανάλυση του υπερκείμενου χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο UV-VIS.

Η συγκέντρωση της ανθοκυανίνης εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διαφορικού pH, μέσω της εξίσωσης [Fuleki et al 1968]:

$$\text{Συγκέντρωση ανθοκυανίνης (mg/L)} = \frac{\Delta A * M_w * DF * 10^3}{\epsilon * L} \quad (\text{Εξίσωση 5.1})$$

Όπου:

$$\Delta A = (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \quad (\text{Εξίσωση 5.2})$$

M_w : Μοριακή μάζα ανθοκυανίνης (449.2 g/mol) (cyanidine 3-glucoside)

DF : Συντελεστής αραίωσης (dilution factor)

ϵ : Συντελεστής απόσβεσης για την ανθοκυανίνη = 26 900 L/cm*mol (cyanidine 3-glucoside)

L : μήκος διαδρομής (path length) (1cm)

10^3 : συντελεστής για μετατροπή από g σε mg

Για τον υπολογισμό της απορρόφησης ΔA χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα οξικού νατρίου και 1N HCl για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος με pH=4.5. Διαλύματα 0.2N KCl και 0.2N HCl χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος με pH=1. Η απορρόφηση που οφείλεται στις ανθοκυανίνες του δείγματος υπολογίστηκε από την εξίσωση 5.2. Το $A_{\lambda_{\max}}$ είναι η απορρόφηση στο μέγιστο μήκος κύματος (για παράδειγμα: 530 nm) και η τιμή A_{700} αφαιρείται ως διόρθωση που προκύπτει από την παρουσία διαφόρων φαινολικών και άλλων ουσιών.

5.4.2 Απομόνωση ανθοκυανινών από βετόμουρα

Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση 50g φυτικού υλικού σε 100mL οξινισμένης μεθανόλης. Το μίγμα αφέθηκε να εκχυλίζεται όλη τη νύχτα στους 4°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner και εκχύλιση εκ νέου του φυτικού υλικού με οξινισμένη μεθανόλη μέχρις ότου να προκύψει ένα ελαφρώς χρωματισμένο εκχύλισμα (τρεις εκχυλίσσεις επαρκούν). Τα διηθήματα μεταφέρθηκαν σε φιάλη βρασμού και εξατμίστηκε η μεθανόλη σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 40° C υπό κενό. Σημαντική μείωση του ρυθμού εξατμίστη ήταν ένδειξη ότι το υπολειμματικό υγρό είναι κυρίως νερό. Η συγκέντρωση του εναπομένου εκχυλίσματος ανθοκυανίνης εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διαφορικού pH που περιγράφηκε προηγουμένως. [Rodriguez-Saona et al (2001)]

5.5 Τιτλοδότηση ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο και βατόμουρα με υδροξείδιο του νατρίου

Πειραματική διαδικασία:

Αρχικά η προχοΐδα πληρώθηκε με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 0.1M. Σε κωνική φιάλη τοποθετήθηκαν 10mL εκχυλίσματος ανθοκυανίνης (βατόμουρων, κόκκινου λάχανου). Το εκχύλισμα οξινίστηκε με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 2M πρώτου ξεκινήσει η τιτλοδότηση. Στη συνέχεια ξεκίνησε η σταδιακή προσθήκη διαλύματος NaOH 0.1M στο εκχύλισμα της ανθοκυανίνης, με ταυτόχρονη καταγραφή του pH του διαλύματος στην κωνική φιάλη και μελέτη της αλλαγής του χρώματος της ανθοκυανίνης.

5.6 Φασματομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

5.6.1 Φάσματα απορρόφησης ανθοκυανινών από βατόμουρα και κόκκινο λάχανο σε διάφορα pH

Πειραματική διαδικασία:

Για τη διατήρηση της ιοντικής ισχύος όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου 0.1M. Σε σφαιρικές φιάλες των 10mL παρασκευάστηκαν διαλύματα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 8.35×10^{-6} M, τα οποία λήφθηκαν με αραιώση από το μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 3.34×10^{-4} M, και ρυθμίστηκαν σε διαφορετικά pH (2,3,4,5,6,7,8,10,12) με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος και υδροξειδίου του νατρίου. Στη συνέχεια λήφθηκαν τα φάσματα απορρόφησης UV-vis των διαλυμάτων στο εύρος 200-800 nm.

5.6.2 Προσδιορισμός γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης

Πειραματική διαδικασία:

Σε σφαιρική φιάλη των 10mL παρασκευάστηκε διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 8.35×10^{-6} M, το οποίο λήφθηκε με αραιώση από το μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 3.34×10^{-4} M, σε οξινισμένη μεθανόλη. Στη συνέχεια λήφθηκαν τα φάσματα απορρόφησης UV-vis στο εύρος 200-800 nm. Για τον προσδιορισμό του ποσοστού ακυλίωσης και γλυκοζυλίωσης καταγράφηκαν οι τιμές των απορροφήσεων στα 440 nm (A_{440}), στην περιοχή των 310-320 nm ($A_{acylation-max}$), και η μέγιστη απορρόφηση στην περιοχή του ορατού ($A_{visible-max}$).

5.7 Φασματοσκοπία φθορισμού

5.7.1 Φθορισμός ανθοκυανινών

5.7.1.1 Διέγερση σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος pH=3 και pH=6

Πειραματική Διαδικασία:

Για τη μελέτη του φθορισμού της ανθοκυανίνης πραγματοποιήθηκε διέγερση σε διάφορα μήκη κύματος στο εύρος (i) 240-300 nm, (ii) 310-350 nm (iii) 500-570 nm. Σε σφαιρική φιάλη παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 2.23×10^{-6} M (ii) ή 8.35×10^{-6} M (ii, iii) το οποίο λήφθηκε με αραίωση από το μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 3.34×10^{-4} M. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής:

- (i) Μήκος κύματος διέγερσης: 240-300 nm, αρχή φάσματος: 250-310 nm, τέλος φάσματος: 550nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm, 5 nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 280 nm.
- (ii) Μήκος κύματος διέγερσης: 310-350 nm, αρχή φάσματος: 320-360nm, τέλος φάσματος: 700nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm, 5 nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 380 nm.
- (iii) Μήκος κύματος διέγερσης: 500-570 nm, αρχή φάσματος: 510-580 nm, τέλος φάσματος: 800 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm, 5 nm.

Όλα τα στατικά φάσματα διορθώθηκαν για το inner-filter effect [Parker et al (1957)]. Αν και μια ακριβής διόρθωση για το inner-filter effect μπορεί να είναι αρκετά περίπλοκη [Credi et al (2014), Kubista et al (1994)], έχουμε εφαρμόσει μια απλή κατά προσέγγιση διόρθωση όπως περιγράφεται από τους Sur et al (1979) και τους van de Weert et al (2011):

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{(A_{ex} + A_{em})/2} \quad \text{(Εξίσωση 4.5)}$$

Όπου F_{cor} και F_{obs} είναι οι διορθωμένες και οι πειραματικές εντάσεις φθορισμού, και A_{exc} και A_{em} είναι οι απορροφήσεις του διαλύματος στα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής αντίστοιχα. Η διόρθωση αυτή αποδεικνύεται κρίσιμη όταν κάποιος μελετά την απόσβεση του φθορισμού πρωτεϊνών από τις ανθοκυανίνες αλλά είναι αμελητέα όταν μελετά την επίδραση των πρωτεϊνών στον φθορισμό της ανθοκυανίνης.

5.7.2 Έλεγχος γραμμικότητας φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα pH=3 και pH=6

Πειραματική Διαδικασία:

Για τη μελέτη του εύρους γραμμικότητας φθορισμού της ανθοκυανίνης σε pH=3 και pH=6 παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα 10 mL με συγκεντρώσεις ανθοκυανίνης 0.56 μM , 1.11 μM , 2.23 μM , 3.89 μM , 4.45 μM , 5.56 μM , 6.68 μM , 7.79 μM , 8.90 μM και 10.02 μM που λήφθηκαν με αραιώση από το μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 0.334 mM. Πραγματοποιήθηκε διέγερση σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος: 260 nm, 330 nm και 560 nm για το pH=3 και 270 nm, 330 nm και 560 nm για το pH=6.

5.7.3 Αλληλεπίδραση ανθοκυανινών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες

Πίνακας 5.1: Σύνοψη πειραμάτων φθορισμού για μελέτη αλληλεπίδρασης ανθοκυανινών με διάφορα βιομόρια.

Ανθοκυανίνη βατόμουρα	Πρωτεΐνες	pH που μελετήθηκε το σύστημα
	Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)	4 και 6
	Πρωτεΐνη ορού γάλακτος (isolate)	4 και 6
	Καζεϊνικό νάτριο	7
	Πολυσακχαρίτες	pH
	Χιτοζάνη	4
	Πηκτίνη	3.2
	Θεική χονδροϊτίνη	3.2
	Αλγινικό νάτριο	4
Ανθοκυανίνη κόκκινο λάχανο	Πρωτεΐνες	pH
	Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)	4

5.7.3.1. Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)

5.7.3.1.1 Μελέτη γραμμικότητας φθορισμού της BSA σε pH=6

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν διαλύματα BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=6 με συγκεντρώσεις 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.33 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.6 mg/mL που λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα της BSA συγκέντρωσης 1mg/mL. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής: Μήκος κύματος διέγερσης: 280, αρχή φάσματος: 300 nm, τέλος φάσματος: 500 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 2.5 nm (ex.), 2.5 nm (em.).

5.7.3.1.2 Μελέτη φθορισμού της BSA παρουσία ανθοκυανίνης pH=4 και pH=6

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα BSA-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.25 mg/mL (3.76×10^{-6} M) η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 1mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανίνης 0 μ M, 1.11 μ M, 1.67 μ M, 2.23 μ M, 2.78 μ M, 3.34 μ M, 3.89 μ M, 4.45 μ M, 5 μ M, 5.56 μ M, 6.12 μ M, 6.68 μ M, 7.23 μ M, 7.79 μ M, 8.35 μ M, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 334 μ M. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διέγερση των μιγμάτων στα 280 nm. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής: Μήκος κύματος διέγερσης: 280 nm, αρχή φάσματος: 300 nm, τέλος φάσματος: 500 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 2.5 nm (ex.), 2.5 nm (em.).

5.7.3.1.3 Σύγχρονος φθορισμός BSA pH=4

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα BSA-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.25 mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0 μ M, 1.11 μ M, 2.23 μ M, 3.34 μ M, 4.45 μ M, 5.56 μ M, 6.68 μ M. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-8300) ήταν οι εξής: αρχή φάσματος: 250 nm, τέλος φάσματος: 400nm, Δλ: (i) 15 nm, (ii) 50 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 1 nm (ex.), 2.5 nm (em.).

5.7.3.1.4 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία BSA

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα BSA-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση ανθοκυανίνης 4.45×10^{-6} M (66.6μL) η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 3.34×10^{-4} M και συγκεντρώσεις BSA 0.1mg/mL, 0.2mg/mL, 0.3mg/mL, 0.4mg/mL, 0.5mg/mL, 0.6mg/mL, 0.7mg/mL, 0.8mg/mL, 0.9mg/mL οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το μητρικό διάλυμα της BSA συγκέντρωσης 1 mg/mL. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διέγερση των μιγμάτων σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος: (i) 330 nm και (ii) 560 nm. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής:

- (i) Μήκος κύματος διέγερσης: 330 nm, αρχή φάσματος: 340 nm, τέλος φάσματος: 700 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 380 nm και
- (ii) Μήκος κύματος διέγερσης: 560 nm, αρχή φάσματος: 570 nm, τέλος φάσματος: 800 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.).

5.7.3.2 Πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Whey protein isolate)

5.7.3.2.1 Μελέτη γραμμικότητας φθορισμού της WPI σε συνθήκες pH=6

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν διαλύματα WPI με συγκεντρώσεις 0.025 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.075 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.35 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.67 mg/mL που λήφθηκαν με αραιώση από το υδατικό διάλυμα της WPI συγκέντρωσης 1mg/mL. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής: Μήκος κύματος διέγερσης: 280, αρχή φάσματος: 300 nm, τέλος φάσματος: 500 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 2.5 nm (ex.), 5 nm (em.).

5.7.3.2.2 Μελέτη φθορισμού της WPI παρουσία ανθοκυανίνης pH=4 και pH=6

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα WPI-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.1 mg/mL η οποία λήφθηκε από μητρικό

διάλυμα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 1mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0 μ M, 1.11 μ M, 2.23 μ M, 3.34 μ M, 4.45 μ M, 5 μ M, 5.56 μ M, 6.68 μ M, 7.79 μ M, 8.90 μ M, 10 μ M, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 334 μ M. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διέγερση των μιγμάτων στα 280 nm. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής: Μήκος κύματος διέγερσης: 280 nm, αρχή φάσματος: 300 nm, τέλος φάσματος: 500 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 2.5 nm (ex.), 5 nm (em.).

5.7.3.2.3 Σύγχρονος φθορισμός WPI pH=4

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα WPI-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.1 mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0 μ M, 1.11 μ M, 2.23 μ M, 3.34 μ M, 4.45 μ M, 5.56 μ M, 6.68 μ M. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-8300) ήταν οι εξής: αρχή φάσματος: 250 nm, τέλος φάσματος: 400nm, $\Delta\lambda$: (i) 15 nm, (ii) 50 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 2.5 nm (ex.), 2.5 nm (em.).

5.7.3.2.4 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία WPI

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα WPI-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση ανθοκυανίνης 4.45×10^{-6} M η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 3.34×10^{-4} M και συγκεντρώσεις WPI 0.1mg/mL, 0.2mg/mL, 0.3mg/mL, 0.4mg/mL, 0.5mg/mL, 0.6mg/mL, 0.7mg/mL, 0.8mg/mL, 0.9mg/mL οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το μητρικό διάλυμα της WPI συγκέντρωσης 1 mg/mL. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διέγερση των μιγμάτων σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος: (i) 330 nm και (ii) 560 nm. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής: (i) Μήκος κύματος διέγερσης: 330 nm, αρχή φάσματος: 340 nm, τέλος φάσματος: 700 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 380 nm και (ii) Μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, αρχή φάσματος: 570 nm, τέλος φάσματος: 800 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.).

5.7.3.3 Καζεϊνικό νάτριο

5.7.3.3.1 Μελέτη γραμμικότητας φθορισμού του καζεϊνικού νατρίου σε συνθήκες pH=7

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν διαλύματα καζεϊνικού νατρίου με συγκεντρώσεις 0.04 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.35 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.45 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.6 mg/mL που λήφθηκαν με αραιώση από το υδατικό διάλυμα του καζεϊνικού νατρίου συγκέντρωσης 1mg/mL. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής: Μήκος κύματος διέγερσης: 280 nm, αρχή φάσματος: 300 nm, τέλος φάσματος: 500 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 2.5 nm (ex.), 5 nm (em.).

5.7.3.3.2 Μελέτη φθορισμού της WPI παρουσία ανθοκυανίνης pH=4 και pH=6

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα καζεϊνικού νατρίου-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.25 mg/mL η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 1mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0 μM, 1.11μM, 2.23 μM, 3.34 μM, 4.45 μM, 5.56 μM, 6.68 μM οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 334 μM. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-8300) ήταν οι εξής: Μήκος κύματος διέγερσης: 280 nm, αρχή φάσματος: 300 nm, τέλος φάσματος: 500 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 1 nm (ex.), 2.5 nm (em.).

5.7.3.3.3 Σύγχρονος φθορισμός καζεϊνικού νατρίου pH=7

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα καζεϊνικού νατρίου-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.25 mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0 μM, 1.11μM, 2.23 μM, 3.34 μM, 4.45 μM, 5.56 μM, 6.68 μM. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-8300) ήταν οι εξής: αρχή φάσματος: 250 nm, τέλος φάσματος: 400 nm, Δλ: (i) 15 nm, (ii) 50 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 1 nm (ex.), 2.5 nm (em.).

5.7.3.3.4 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία καζεϊνικού νατρίου pH=7

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα καζεϊνικού νατρίου-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση ανθοκυανίνης 4.45×10^{-6} M η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 3.34×10^{-4} M και συγκεντρώσεις καζεϊνικού νατρίου 0.1mg/mL, 0.2mg/mL, 0.3mg/mL, 0.4mg/mL, 0.5mg/mL, 0.6mg/mL, 0.7mg/mL, 0.8mg/mL, 0.9mg/mL οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το μητρικό διάλυμα του καζεϊνικού νατρίου συγκέντρωσης 1 mg/mL. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διέγερση των μιγμάτων σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος: (i) 330nm και (ii) 560nm. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-8300) ήταν οι εξής:

- (i) Μήκος κύματος διέγερσης: 330 nm, αρχή φάσματος: 340 nm, τέλος φάσματος: 800 nm, εύρος ταινίας διέγερσης,εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 380 nm και
- (ii) Μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, αρχή φάσματος: 570 nm, τέλος φάσματος:900 nm, εύρος ταινίας διέγερσης,εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.).

5.7.3.4 Χιτοζάνη

5.7.3.4.1 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία χιτοζάνης pH=4

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα χιτοζάνης-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση ανθοκυανίνης 4.45×10^{-6} M η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 3.34×10^{-4} M και συγκεντρώσεις χιτοζάνης 0.1mg/mL, 0.2mg/mL, 0.3mg/mL, 0.4mg/mL, 0.5mg/mL, 0.6mg/mL, 0.7mg/mL, 0.8mg/mL, 0.9mg/mL οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το μητρικό διάλυμα της χιτοζάνης συγκέντρωσης 1 mg/mL. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διέγερση των μιγμάτων σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος: (i)260 nm (ii) 330 nm και (iii) 560 nm. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής:

- (i) Μήκος κύματος διέγερσης: 260 nm, αρχή φάσματος: 270 nm, τέλος φάσματος: 550 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 280 nm.
- (ii) Μήκος κύματος διέγερσης: 330 nm, αρχή φάσματος: 340 nm, τέλος φάσματος: 800 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 380 nm.
- (iii) Μήκος κύματος διέγερσης: 560 nm, αρχή φάσματος: 570 nm, τέλος φάσματος: 900 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.).

5.7.3.5 Πηκτίνη

5.7.3.5.1 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία πηκτίνης pH=3.2

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα πηκτίνης-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση ανθοκυανίνης 4.45×10^{-6} M η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 3.34×10^{-4} M και συγκεντρώσεις πηκτίνης 0.1mg/mL, 0.2mg/mL, 0.3mg/mL, 0.4mg/mL, 0.5mg/mL, 0.6mg/mL, 0.7mg/mL, 0.8mg/mL, 0.9mg/mL οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το μητρικό διάλυμα της πηκτίνης συγκέντρωσης 1 mg/mL. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διέγερση των μιγμάτων σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος: (i) 260 nm (ii) 330 nm και (iii) 560 nm. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής:

- (i) Μήκος κύματος διέγερσης: 260 nm, αρχή φάσματος: 270 nm, τέλος φάσματος: 550 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 280 nm.
- (ii) Μήκος κύματος διέγερσης: 330 nm, αρχή φάσματος: 340 nm, τέλος φάσματος: 800 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 380 nm.
- (iii) Μήκος κύματος διέγερσης: 560 nm, αρχή φάσματος: 570 nm, τέλος φάσματος: 900 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.).

5.7.3.6 Θεϊκή χονδροϊτίνη

5.7.3.6.1 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία θεϊκής χονδροϊτίνης pH=3.2

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα θεϊκής χονδροϊτίνης-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση ανθοκυανίνης 4.45×10^{-6} M η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 3.34×10^{-4} M και συγκεντρώσεις θεϊκής χονδροϊτίνης 0.1mg/mL, 0.2mg/mL, 0.3mg/mL, 0.4mg/mL, 0.5mg/mL, 0.6mg/mL, 0.7mg/mL, 0.8mg/mL, 0.9mg/mL οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το μητρικό διάλυμα της θεϊκής χονδροϊτίνης συγκέντρωσης 25 mg/mL. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διέγερση των μιγμάτων σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος: (i) 260 nm (ii) 330 nm και (iii) 560 nm. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής:

- (i) Μήκος κύματος διέγερσης: 260 nm, αρχή φάσματος: 270nm, τέλος φάσματος: 550 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 280 nm.

- (ii) Μήκος κύματος διέγερσης: 330 nm, αρχή φάσματος: 340 nm, τέλος φάσματος: 800 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 380 nm.
- (iii) Μήκος κύματος διέγερσης: 560 nm, αρχή φάσματος: 570 nm, τέλος φάσματος: 900 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.).

5.7.3.7 Αλγινικό νάτριο

5.7.3.7.1 Μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία αλγινικού νατρίου pH=4

Πειραματική Διαδικασία:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα θειικής χονδροϊτίνης-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση ανθοκυανίνης 4.45×10^{-6} M η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 3.34×10^{-4} M και συγκεντρώσεις αλγινικού νατρίου 0.1mg/mL, 0.2mg/mL, 0.3mg/mL, 0.4mg/mL, 0.5mg/mL, 0.6mg/mL, 0.7mg/mL, 0.8mg/mL, 0.9mg/mL οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το μητρικό διάλυμα της θειικής χονδροϊτίνης συγκέντρωσης 12.5 mg/mL. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διέγερση των μιγμάτων σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος: (i) 260 nm (ii) 330 nm και (iii) 560 nm. Οι συνθήκες στο όργανο φθορισμού (JASCO FP-6300) ήταν οι εξής:

- (i) Μήκος κύματος διέγερσης: 260nm, αρχή φάσματος: 270 nm, τέλος φάσματος: 550 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 280 nm.
- (ii) Μήκος κύματος διέγερσης: 330 nm, αρχή φάσματος: 340 nm, τέλος φάσματος: 800 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 380 nm.
- (iii) Μήκος κύματος διέγερσης: 560 nm, αρχή φάσματος: 570 nm, τέλος φάσματος: 900 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.).

5.8 Κυκλικός διχρωϊσμός

5.8.1 Αλληλεπίδραση BSA-ανθοκυανίνη από βατόμουρα σε συνθήκες pH=4

Πειραματικό μέρος:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα BSA-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.05 mg/mL (7.5×10^{-7} M) η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 1mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 2.23μM, 4.45μM, 8.88 μM, 12μM, 17.8 μM, 20 μM, 25 μM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 334 μM. Το φάσμα του ρυθμιστικού διαλύματος καταγράφηκε ως αναφορά και ακολούθως αφαιρέθηκε από το φάσμα μίγματος

ανθοκυανίνης/πρωτεΐνης. Οι συνθήκες στο όργανο κυκλικού διχρωϊσμού ήταν οι εξής: αρχή φάσματος: 180 nm, τέλος φάσματος: 350 nm, bandwidth: 2 nm, ταχύτητα σάρωσης: 50 nm/min, συνολικές μετρήσεις ανά δείγμα (accumulations): 2, ευαισθησία: standard.

Τα φάσματα CD αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SELCON3 από το σύνολο προγραμμάτων Dicroprot (δωρεάν λογισμικό που διανέμεται από το Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, France, Deleage et al. 1993) για τον υπολογισμό των δευτεροταγών δομικών στοιχείων των πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν ως η μέση ελλειπτικότητα υπολείμματος (mean residue ellipticity-MRE), που ορίζεται από την εξίσωση 5.3, όπου θ_{obs} είναι η πειραματική ελλειπτικότητα σε mdeg, C είναι η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε M, n είναι ο αριθμός των κατάλοιπων αμινοξέων στην πρωτεΐνη και l είναι το μήκος διαδρομής σε cm.

$$MRE = \frac{\theta_{obs}}{10 \times n \times C \times l} \quad (\text{Εξίσωση 5.3})$$

5.8.2 Αλληλεπίδραση WPI-ανθοκυανίνη από βατόμουρα σε συνθήκες pH=4

Πειραματικό μέρος:

Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα WPI-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.05 mg/mL (2.715×10^{-6} M) η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 1mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 2.23μM, 4.45μM, 8.88 μM, 12μM, 17.8 μM, 20 μM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 334 μM. Οι συνθήκες στο όργανο κυκλικού διχρωϊσμού ήταν οι εξής: αρχή φάσματος: 180 nm, τέλος φάσματος: 350 nm, bandwidth: 2 nm, ταχύτητα σάρωσης: 50 nm/min, συνολικές μετρήσεις ανά δείγμα (accumulations): 2, ευαισθησία: standard.

5.9 Πειράματα διαπίδυσης

5.9.1 Μembranes διαπίδυσης – ανθοκυανίνη σε συνθήκες pH=4 – κατασκευή γραφήματος

[Anthocyanin]_{free} vs [Anthocyanin]_{total}

Πειραματικό μέρος:

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία είχε αποκοπή μοριακού βάρους 12–14 kDa. Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν διαλύματα ανθοκυανινών

συγκέντρωσης 4.45 μ M, 6.68 μ M, 22.3 μ M, 44.5 μ M, 150 μ M, 250 μ M, 350 μ M, 450 μ M, 600 μ M, 700 μ M, 800 μ M, οι οποίες λήφθηκαν με αραίωση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 334 μ M και 7647 μ M. Στη συνέχεια τα διαλύματα (10mL) τοποθετήθηκαν στις μεμβράνες διαπίδυσης και βυθίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα pH=4 (11mL). Μετά από 72 ώρες (χρόνος που αποδείχθηκε επαρκής για την εξισορρόπηση-equilibration) αξιολογήθηκε η διάχυση των ανθοκυανινών παρακολουθώντας την απορρόφηση του προϊόντος διαπίδυσης στα 276 nm και 518.5 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού. Η συγκέντρωση της «ελεύθερης» ανθοκυανίνης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας μια καμπύλη βαθμονόμησης.

5.9.2 Αλληλεπίδραση BSA-ανθοκυανίνη βατόμουρα σε συνθήκες pH=4

Πειραματικό μέρος:

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία είχε αποκοπή μοριακού βάρους 12–14 kDa. Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα BSA-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.25 mg/mL, η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 1mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 4.45 μ M, 6.68 μ M, 22.3 μ M, 44.5 μ M, 150 μ M, 250 μ M, 350 μ M, 450 μ M, 600 μ M, 700 μ M, 800 μ M, οι οποίες λήφθηκαν με αραίωση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 334 μ M και 7647 μ M. Στη συνέχεια τα διαλύματα ανθοκυανίνης-BSA (10mL), τοποθετήθηκαν στις μεμβράνες διαπίδυσης και βυθίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα pH=4 (11mL). Μετά από 72 ώρες αξιολογήθηκε η διάχυση των ανθοκυανινών παρακολουθώντας την απορρόφηση του προϊόντος διαπίδυσης στα 276 nm και 518.5 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.9.2.1 Παράλληλο πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανίνη-BSA και ανθοκυανίνη με έλεγχο απορρόφησης σε διάφορους χρόνους για την κατασκευή διαγράμματος Absorbance vs time (min)

Πειραματικό μέρος:

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία είχε αποκοπή μοριακού βάρους 12–14 kDa. Παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα: (i) BSA-εκχύλισμα ανθοκυανίνης, με

συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.25mg/mL και συγκέντρωση ανθοκυανίνης 150Mm και (ii) διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 150μM. Στη συνέχεια τα διαλύματα ανθοκυανίνης-BSA (10mL) και ανθοκυανίνης (10mL), τοποθετήθηκαν στις μεμβράνες διαπίδυσης και βυθίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα pH=4 (10mL). Η διάχυση των ανθοκυανινών αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση του προϊόντος διαπίδυσης στα 276 nm και 518.5 nm στα 30, 60, 120, 180, 240 και 315 λεπτά σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.9.3 Αλληλεπίδραση WPI-ανθοκυανίνη βατόμουρα σε συνθήκες pH=4

Πειραματικό μέρος:

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία είχε αποκοπή μοριακού βάρους 12–14 kDa. Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα WPI-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.1 mg/mL, η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 1mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 6.68 μM, 22.3μM, 44.5 μM, 150 μM, 250 μM, 350 μM, 450 μM, 600 μM, 700 μM, 800 μM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 334 μM και 7647μM. Στη συνέχεια τα διαλύματα ανθοκυανίνης-WPI (10mL), τοποθετήθηκαν στις μεμβράνες διαπίδυσης και βυθίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα pH=4 (11mL). Μετά από 72 ώρες αξιολογήθηκε η διάχυση των ανθοκυανινών παρακολουθώντας την απορρόφηση του προϊόντος διαπίδυσης στα 276 nm και 518.5 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.9.4 Αλληλεπίδραση χιτοζάνης-ανθοκυανίνη βατόμουρα σε συνθήκες pH=4

Πειραματικό μέρος:

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία είχε αποκοπή μοριακού βάρους 12–14 kDa. Σε ογκομετρικές φιάλες παρασκευάστηκαν μίγματα χιτοζάνης-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πολυσακχαρίτη 0.4 mg/mL, η οποία λήφθηκε από μητρικό διάλυμα συγκέντρωσης 1mg/mL και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 6.68

μM, 22.3μM, 44.5 μM, 150 μM, 250 μM, 350 μM, 450 μM, 600 μM, 700 μM, 800 μM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 334 μM και 7647μM. Στη συνέχεια τα διαλύματα ανθοκυανίνης-χιτοζάνης (10mL), τοποθετήθηκαν στις μεμβράνες διαπίδυσης και βυθίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα pH=4 (11mL). Μετά από 72 ώρες αξιολογήθηκε η διάχυση των ανθοκυανινών παρακολουθώντας την απορρόφηση του προϊόντος διαπίδυσης στα 276 nm και 518.5 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.10 Πειράματα θολερότητας

5.10.1 Μελέτη θολερότητας διαλυμάτων ανθοκυανίνης σε συνθήκες pH=4

Πειραματικό μέρος:

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάστηκαν διαλύματα εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, συγκεντρώσεων 0.123 mM, 0.246 mM, 0.369 mM, 0.492 mM, 0.615 mM, 0.738 mM, 0.861 mM, 0.984 mM, 1.107 mM, 1.231 mM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 1.846 mM. Η θολερότητα των ανθοκυανινών αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 650 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού. Αυτό το μεγάλο μήκος κύματος επιλέχθηκε για να ελαχιστοποιηθεί η απορρόφηση των ανθοκυανινών.

5.10.2 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-BSA σε συνθήκες pH=4

Πειραματικό μέρος:

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάστηκαν μίγματα BSA-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.333, 1 και 1.67 mg/mL η οποία λήφθηκε από μητρικά διαλύματα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 1, 3 και 5 mg/mL αντίστοιχα και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0.123 mM, 0.246 mM, 0.369 mM, 0.492 mM, 0.615 mM, 0.738 mM, 0.861 mM, 0.984 mM, 1.107 mM, 1.231 mM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 1.846 mM. Η θολερότητα αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 650 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.10.3 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-WPI σε συνθήκες pH=4**Πειραματικό μέρος:**

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάστηκαν μίγματα WPI-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.333, 1 και 1.67 mg/mL η οποία λήφθηκε από μητρικά διαλύματα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 1, 3 και 5 mg/mL αντίστοιχα και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0.123 mM, 0.246 mM, 0.369 mM, 0.492 mM, 0.615 mM, 0.738 mM, 0.861 mM, 0.984 mM, 1.107 mM, 1.231 mM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 1.846 mM. Η θολερότητα αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 650 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.10.4 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-καζεΐνικού νατρίου σε συνθήκες pH=7**Πειραματικό μέρος:**

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάστηκαν μίγματα καζεΐνικού νατρίου-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.077 και 0.333 mg/mL η οποία λήφθηκε από μητρικά διαλύματα της πρωτεΐνης συγκέντρωσης 0.23 και 1 mg/mL αντίστοιχα και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0.123 mM, 0.246 mM, 0.369 mM, 0.492 mM, 0.615 mM, 0.738 mM, 0.861 mM, 0.984 mM, 1.107 mM, 1.231 mM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 1.846 mM. Η θολερότητα αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 650 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.10.5 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-χιτοζάνης σε συνθήκες pH=4**Πειραματικό μέρος:**

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάστηκαν μίγματα χιτοζάνης-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.167 και 0.333 mg/mL η οποία λήφθηκε από μητρικά διαλύματα πολυσακχαρίτη συγκέντρωσης 0.5 και 1 mg/mL αντίστοιχα και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0.123 mM, 0.246 mM, 0.369 mM, 0.492 mM, 0.615 mM, 0.738

mM, 0.861 mM, 0.984 mM, 1.107 mM, 1.231 mM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 1.846 mM. Η θολερότητα αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 650 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.10.6 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-πηκτίνης σε συνθήκες pH=4

Πειραματικό μέρος:

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάστηκαν μίγματα πηκτίνης-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.333, 1 και 1.67 mg/mL η οποία λήφθηκε από μητρικά διαλύματα πολυσακχαρίτη συγκέντρωσης 1, 3 και 5 mg/mL αντίστοιχα και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0.123 mM, 0.246 mM, 0.369 mM, 0.492 mM, 0.615 mM, 0.738 mM, 0.861 mM, 0.984 mM, 1.107 mM, 1.231 mM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 1.846 mM. Η θολερότητα αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 650 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.10.7 Μελέτη θολερότητας μιγμάτων ανθοκυανίνης-θειική χονδροϊτίνη σε συνθήκες pH=4

Πειραματικό μέρος:

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάστηκαν μίγματα θειικής χονδροϊτίνης-εκχυλίσματος ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.333, 1 και 1.67 mg/mL η οποία λήφθηκε από μητρικά διαλύματα πολυσακχαρίτη συγκέντρωσης 1, 3 και 5 mg/mL αντίστοιχα και συγκεντρώσεις ανθοκυανινών 0.123 mM, 0.246 mM, 0.369 mM, 0.492 mM, 0.615 mM, 0.738 mM, 0.861 mM, 0.984 mM, 1.107 mM, 1.231 mM, οι οποίες λήφθηκαν με αραιώση από το διάλυμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 1.846 mM. Η θολερότητα αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση των διαλυμάτων στα 650 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού.

5.11 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Χρησιμοποιήθηκε αναλυτική στήλη Waters SPHERISORB 5 μ M ODS1 4.6x250mm. Πραγματοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση με 100% ακετονιτρίλιο και 100% μεθανόλη. Ο όγκος της έγχυσης ήταν 20 μ L, ο ρυθμός ροής (flow rate) ήταν 1mL/min και η θερμοκρασία 25°C. Τα δείγματα διηθήθηκαν μέσω φίλτρου Millipore 0.45- μ m. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 260, 276, 340, 357, 520, 610 και 620 nm. Το εκχύλισμα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 7.65mM αραιώθηκε 10 φορές πριν από την ανάλυση.

5.12 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)

Με ITC μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των ανθοκυανινών με την BSA και την WPI σε pH=4. Αρχικά όλα τα διαλύματα (ανθοκυανινών, πρωτεϊνών, ρυθμιστικό διάλυμα) πριν τοποθετηθούν στο θερμιδόμετρο απαρείωνονταν σε σταθμό απαέρωσης στους 25°C κάτω από κενό και ανάδευση με σκοπό να αφαιρεθούν τυχόν φυσαλίδες που περιέχονται στο διάλυμα. Η κυψελίδα δείγματος γεμιζόταν με 1mL διαλύματος της πρωτεΐνης ή του ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολούθως η σύριγγα έγχυσης χωρητικότητας 250 μ L γεμιζόταν με το διάλυμα της ανθοκυανίνης ή του ρυθμιστικού διαλύματος, γινόταν τοποθέτηση της σύριγγας στο έμβολο του οργάνου και ακολούθως τοποθέτηση του εμβόλου στο θερμιδόμετρο. Πριν την έναρξη του πειράματος ρυθμίζονταν οι επιθυμητές παράμετροι διεξαγωγής του πειράματος, δηλαδή ο όγκος έγχυσης δείγματος (8 μ L) και ο χρόνος μεταξύ των διαδοχικών εγχύσεων, ο οποίος ήταν 800s για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και ο συνολικός αριθμός των εγχύσεων (30). Ακολούθως ξεκινούσε η ανάδευση του δείγματος στην κυψελίδα (250 rpm) και άρχιζε το πείραμα με περίοδο εξισορρόπησης της θερμοκρασίας και του υπόβαθρου (baseline). Με το τέλος του κάθε πειράματος λαμβανόταν το συνολικό θερμόγραμμα και πίνακας με τις θερμότητες κάθε έγχυσης όπως προέκυπταν από ολοκλήρωση των κορυφών του θερμογράμματος από το όργανο. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν πειράματα ITC με διαλύματα ανθοκυανίνης συγκέντρωσης 0.3 mM, 1.2 mM και 2.4mM στην σύριγγα, συγκεντρώσεις BSA 0.015 mM, 0.03 mM και WPI 0.027 mM στην κυψελίδα σε pH=4. Οι θερμότητες της αραιώσεως της ανθοκυανίνης και του διαλύτη (ρυθμιστικό) καταγράφηκαν και αφαιρέθηκαν από τα δεδομένα των πειραμάτων αλληλεπίδρασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**Επεξεργασία και Συζήτηση Αποτελεσμάτων****6.1. Απομόνωση ανθοκυανινών από φυσικές πηγές****6.1.1. Απομόνωση ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο**

Παρουσιάζεται ένα παράδειγμα προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών στο διάλυμα που εκχυλίζεται από κόκκινο λάχανο, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διαφορικού pH, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (κεφάλαιο 2 στο υποκεφάλαιο 2.2.5.1.3), χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο UV-vis. Η συγκέντρωση της ανθοκυανίνης υπολογίζεται με βάση την εξίσωση 2.2 της βιβλιογραφίας στο υποκεφάλαιο 2.2.5.1.3.

Μέσο εκχύλισης είναι το νερό. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκε αραίωση 10 φορές του αρχικού διαλύματος που προέκυψε από την διαδικασία της απομόνωσης.

Πίνακας 6.1: Πειραματικά αποτελέσματα εκχύλισης της ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο με μέσο εκχύλισης το νερό.

Ρυθμιστικό Διάλυμα	Απορρόφηση στα 520.5 nm	Απορρόφηση στα 700 nm
1 ^η μέτρηση με KCl (pH=1)	0.787	0.002
2 ^η μέτρηση με KCl (pH=1)	0.780	0.001
Μέσος όρος →	0.7835	0.0015

Ρυθμιστικό Διάλυμα	Απορρόφηση στα 538.5 nm	Απορρόφηση στα 700 nm
1 ^η μέτρηση με CH ₃ COONa (pH=4.5)	0.106	0.003
2 ^η μέτρηση με CH ₃ COONa (pH=4.5)	0.108	0.003
Μέσος όρος →	0.107	0.003

$$\text{Συγκέντρωση της χρωστικής ανθοκυανίνης (mg/L)} = \frac{\Delta A * M_w * DF * 10^3}{\epsilon * L} \quad (\text{Εξίσωση 2.2})$$

Όπου:

$$\Delta A = (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{\text{pH}4.5} \rightarrow \Delta A = (0.7835 - 0.0015) - (0.107 - 0.003) = 0.678$$

$$M_w = 449.2 \text{ g/mol} \quad (\text{cyanidine 3-glucoside})$$

$$DF = 10$$

$\epsilon = 26\,900 \text{ L/cm} \cdot \text{mol}$ (cyanidine 3-glucoside)

$L = 1 \text{ cm}$

$$C(\text{mg/mL}) = \frac{0.678 \cdot 449.2 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 10 \cdot 10^3}{26900 \frac{\text{L}}{\text{cm} \cdot \text{mol}} \cdot 1 \text{ cm}} = 113.22 \text{ mg/L} \rightarrow \boxed{C_{\text{ανθοκυανίνης}} = 113.22 \text{ mg/L}}$$

6.1.2. Απομόνωση ανθοκυανινών από βατόμουρα

Παρουσιάζεται ένα παράδειγμα προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών στο διάλυμα που εκχυλίζεται από βατόμουρα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διαφορικού pH, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (κεφάλαιο 2 στο υποκεφάλαιο 2.2.5.1.3). Η συγκέντρωση της ανθοκυανίνης υπολογίζεται με βάση την εξίσωση 2.2 της βιβλιογραφίας στο υποκεφάλαιο 2.2.5.1.3.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκε αραίωση 100 φορές του αρχικού διαλύματος που προέκυψε από την διαδικασία της απομόνωσης.

Πίνακας 6.2: Πειραματικά αποτελέσματα εκχύλισης της ανθοκυανίνης από βατόμουρα.

Ρυθμιστικό Διάλυμα	Απορρόφηση στα 510 nm	Απορρόφηση στα 700 nm
1 ^η μέτρηση με KCl (pH=1)	2.329	0.002
2 ^η μέτρηση με KCl (pH=1)	2.440	0.005
Μέσος όρος →	2.3845	0.0035

Ρυθμιστικό Διάλυμα	Απορρόφηση στα 517 nm	Απορρόφηση στα 700 nm
1 ^η μέτρηση με CH ₃ COONa (pH=4.5)	0.259	0.002
2 ^η μέτρηση με CH ₃ COONa (pH=4.5)	0.254	0.002
Μέσος όρος →	0.2565	0.002

$$C(\text{mg/mL}) = \frac{2.1265 \cdot 449.2 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 100 \cdot 10^3}{26900 \frac{\text{L}}{\text{cm} \cdot \text{mol}} \cdot 1 \text{ cm}} = 3551.02 \text{ mg/L} \rightarrow \boxed{C_{\text{ανθοκυανίνης}} = 3551.02 \text{ mg/L}}$$

Με ανάλογο τρόπο έγιναν όλοι οι υπολογισμοί των συγκεντρώσεων των ανθοκυανινών στα μητρικά διαλύματα που προκύπτουν από κάθε νέα απομόνωση. Παρατηρούμε ότι οι

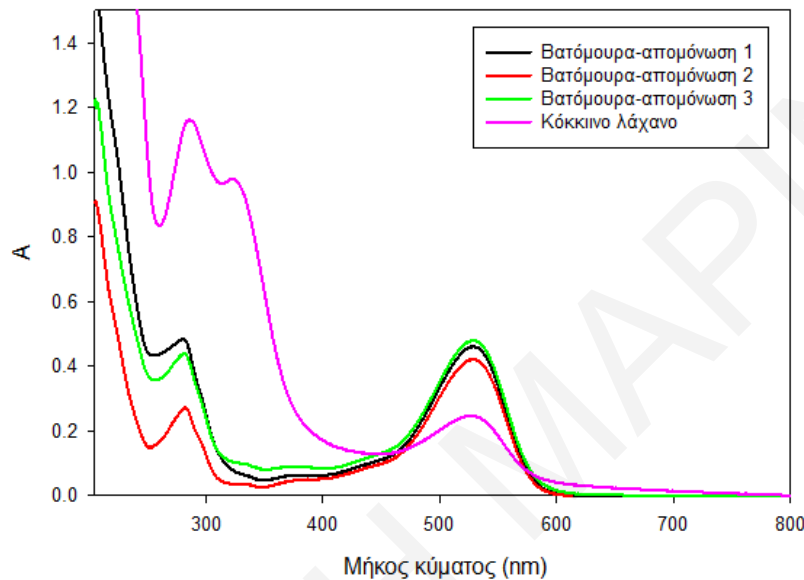
συγκεντρώσεις των μητρικών διαλυμάτων των ανθοκυανινών από τις δύο πηγές, κόκκινο λάχανο και βατόμουρα, διαφέρουν και συγκεκριμένα η συγκέντρωση που προκύπτει από την εκχύλιση από τα βατόμουρα είναι 30-40 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση που προκύπτει από το κόκκινο λάχανο. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι τα εκχυλίσματα των ανθοκυανινών από τις δύο αυτές πηγές παρουσιάζουν διαφορετικό μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης στην περιοχή του ορατού. Συγκεκριμένα στην περίπτωση των ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο παρατηρείται μέγιστη απορρόφηση στα 520-530 nm, ενώ στην περίπτωση των ανθοκυανινών από βατόμουρα στα 510-517 nm. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στο εκχύλισμα του κόκκινου λάχανου υπάρχουν διαφορετικές ανθοκυανιδίνες (κυανιδίνη, δελφινιδίνη, πελαργονιδίνη, πεονιδίνη) από αυτές που υπάρχουν στο εκχύλισμα των βατόμουρων (κυανιδίνη) και οι αναλογίες των κυρίαρχων ανθοκυανιδινών είναι διαφορετικές.

6.2. Προσδιορισμός γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης

Για τον προσδιορισμό του βαθμού γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης λήφθηκαν φάσματα απορρόφησης με συγκέντρωση ανθοκυανίνης 4mg/L σε 0.01% οξιμισμένη μεθανόλη στο εύρος 200-800 nm. Οι περισσότερες αναφορές στη βιβλιογραφία χρησιμοποιούν τον συγκεκριμένο διαλύτη [Durst et al (2001, Hong et al (1990)]. Η ακυλίωση στο C-δακτύλιο προσδιορίστηκε από το λόγο των απορροφήσεων $A_{acyl-max}/A_{vis-max}$, όπου $A_{acyl-max}$ είναι η κορυφή στα 310-320 nm. Αν ο λόγος των απορροφήσεων είναι πολύ χαμηλός τότε δεν υπάρχει ακυλίωση. Αν ο λόγος είναι 0.5-0.7 (48-71%) τότε υπάρχει μια ομάδα ακυλίου (48-71%), ενώ αν ο λόγος είναι 0.8-1.1(83-107%) τότε υπάρχουν δύο ομάδες ακυλίου. Από το φάσμα UV επίσης διακρίθηκε η 3-έναντι της 3,5-γλυκοσυλίωσης, από το λόγο των απορροφήσεων $A_{440}/A_{vis-max}$. Αν ο λόγος είναι $\geq 0,3$ το μόριο είναι 3-γλυκοζυλιωμένο (το υδροξύλιο στη θέση 5 είναι ελεύθερο), ενώ εάν ο λόγος είναι < 0.2 τότε το μόριο είναι 3,5-διγλυκοζυλιωμένο. [Durst et al (2001)]

Στο Σχήμα 6.1 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα προσδιορισμού του ποσοστού γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης των ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο. Ο λόγος των απορροφήσεων $A_{acyl-max}/A_{vis-max}$ ήταν 3.942, υποδεικνύοντας την ύπαρξη ακυλίωσης στο δακτύλιο. Η ακυλίωση γίνεται συνήθως με υδροζυλιωμένο αρωματικό οργανικό οξύ, όπως το κινναμικό οξύ. Εκτός από την ακυλίωση με κινναμικό οξύ, οι ανθοκυανίνες ακυλιώνονται και με οξικό ή μαλωνικό οξύ, όμως

η ανίχνευση τέτοιας ακυλίωσης δεν είναι δυνατή με μετρήσεις UV-vis, επειδή οι ομάδες αυτές δεν έχουν χαρακτηριστική απορρόφηση. Επίσης ο λόγος των απορροφήσεων $A_{440}/A_{vis-max}$ προσδιορίστηκε ίσος με 0.521, υποδεικνύοντας ότι το μόριο είναι 3-γλυκοζυλιωμένο (το υδροξύλιο στη θέση 5 είναι ελεύθερο).



Σχήμα 6.1: Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων ανθοκυανινών σε οξινισμένη μεθανόλη.

Στο ίδιο σχήμα παρουσιάζεται και ένα δεύτερο παράδειγμα προσδιορισμού του ποσοστού υποκατάστασης υδροξυλίου στο C-δακτύλιο των ανθοκυανινών από βατόμουρα ($C_{\text{πυκνό}}=3703\text{mg/L}$) (σχήμα 6.1). Όσον αφορά την ακυλίωση του δακτυλίου, δεν παρατηρήθηκε κορυφή στην περιοχή των 310-320 nm υποδεικνύοντας έτσι ότι δεν υπάρχει ακυλίωση στον δακτύλιο (με κινναμικό οξύ). Ο λόγος των απορροφήσεων $A_{440}/A_{vis-max}$ προσδιορίστηκε ίσος με 0.246, υποδεικνύοντας ότι το μόριο είναι 3-γλυκοζυλιωμένο (το υδροξύλιο στη θέση 5 είναι ελεύθερο).

Στον Πίνακα 6.3 συνοψίζονται τα προαναφερθέντα αποτελέσματα και παρουσιάζονται επιπλέον και άλλες μετρήσεις προσδιορισμού του βαθμού γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης των ανθοκυανινών. Από τον πίνακα βλέπουμε ότι τα βατόμουρα είναι μη ακυλιωμένα στο δακτύλιο, ενώ το κόκκινο λάχανο είναι ακυλιωμένο. Επίσης και στις δύο περιπτώσεις, ο δακτύλιος είναι 3-γλυκοζυλιωμένος.

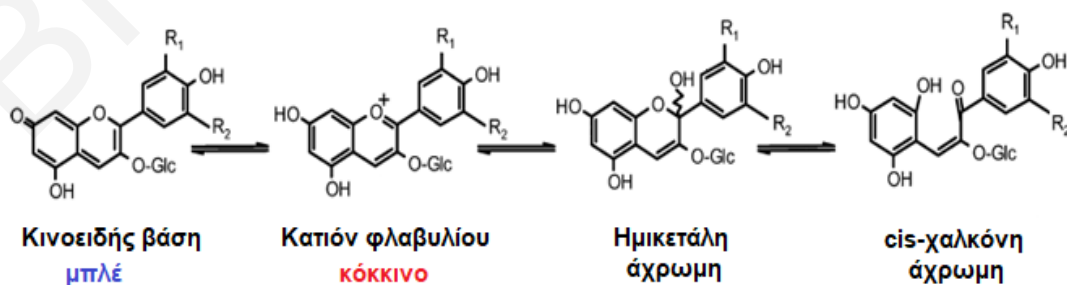
Πίνακας 6.3: Αποτελέσματα προσδιορισμού του ποσοστού γλυκοζυλίωσης και ακυλίωσης στις δύο πηγές απομόνωσης.

Πηγή απομόνωσης	Συγκέντρωση ανθοκυανίνης (mg/L)	$A_{440}/A_{vis-max}$	$A_{acyl-max}/A_{vis-max}$
Κόκκινο λάχανο	113.38	0.52 3-γλυκοζυλιωμένο	3.94
Βατόμουρα 1	3702.97	0.25 3-γλυκοζυλιωμένο	Δεν υπάρχει ακυλίωση με κινναμικό οξύ
Βατόμουρα 2	4881.92	0.21	Δεν υπάρχει ακυλίωση με κινναμικό οξύ
Βατόμουρα 3	3551.02	0.22	Δεν υπάρχει ακυλίωση με κινναμικό οξύ

6.3. Φάσματα UV ανθοκυανίνης σε διάφορα pH και μελέτη αλλαγής χρώματος ανθοκυανίνης ανάλογα με το pH

Βιβλιογραφικά, γίνεται αναφορά στις ανθοκυανίνες ως «δείκτες pH». Αυτό συμβαίνει διότι το χρώμα των διαλυμάτων των ανθοκυανινών ποικίλλει ανάλογα με το pH και κυμαίνεται από ερυθρό σε όξινο διάλυμα, μωβ σε ουδέτερο pH έως μπλε σε αλκαλικό διάλυμα. Το κόκκινο χρώμα οφείλεται στο άλας οξονίου της χρωστικής, ενώ το μωβ και το μπλε χρώμα σχετίζονται με το σχηματισμό κινόνης στον δακτύλιο C. Η μωβ περιοχή συνήθως θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει την κινουειδή βάση και η μπλέ περιοχή το άλας της βάσης (Σχήμα 6.2).

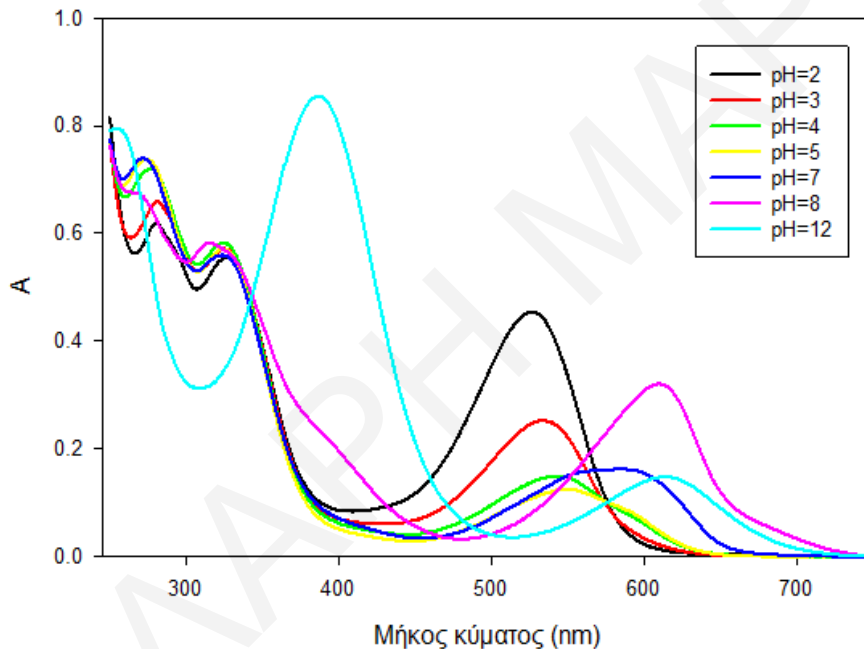
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φάσματα UV-vis των ανθοκυανινών από το κόκκινο λάχανο και τα βατόμουρα που προκύπτουν κατά την τιτλοδότηση με 0.1M υδροξειδίου του νατρίου, για τη μελέτη αλλαγής χρώματος των ανθοκυανινών ανάλογα με το pH.



Σχήμα 6.2: Μορφές ισορροπίας των ανθοκυανινών.

6.3.1 Φάσματα UV και Τιτλοδότηση ανθοκυανίνης από κόκκινο λαχάνο

Στο σχήμα 6.3 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης του κόκκινου λάχανου σε διάφορα pH. Για τη λήψη των φασμάτων UV-vis το εκχύλισμα αραιώθηκε σε συγκέντρωση 10 mg/L και για τη διατήρηση της ιοντικής ισχύος όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου 0.1M. Η τιτλοδότηση έγινε με αρχικό όγκο ανθοκυανίνης 10mL ($C_{\text{antho}}=120$ mg/L). Στον Πίνακα Π.2 στο παράρτημα καταγράφονται οι χρωματικές αλλαγές της ανθοκυανίνης από το κόκκινο λάχανο, καθώς μεταβάλλεται το pH με την σταδιακή προσθήκη 0.1 M υδροξειδίου του νατρίου.

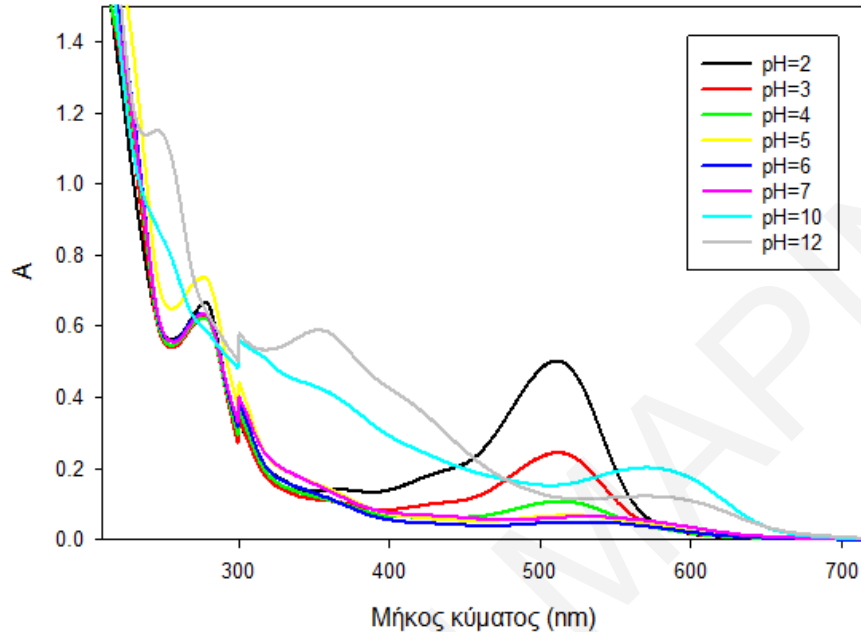


Σχήμα 6.3: Φάσματα απορρόφησης UV-vis εκχυλισμάτων ανθοκυανίνης από κόκκινα λάχανα σε διάφορα pH.

6.3.2 Φάσματα UV και Τιτλοδότηση ανθοκυανίνης από βατόμουρα

Στο σχήμα 6.4 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης από βατόμουρα σε διάφορα pH. Για τη λήψη των φασμάτων UV το εκχύλισμα αραιώθηκε σε συγκέντρωση 4 mg/L και για τη διατήρηση της ιοντικής ισχύος όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου 0.1M. Η τιτλοδότηση έγινε με αρχικό όγκο διαλύματος ανθοκυανίνης 10mL ($C_{\text{antho}}=210$ mg/L). Στον Πίνακα Π.2 στο παράρτημα καταγράφονται οι χρωματικές αλλαγές

διαλυμάτων ανθοκυανίνης που προκύπτει από βατόμουρα, καθώς μεταβάλλεται το pH με την σταδιακή προσθήκη 0.1 M υδροξειδίου του νατρίου.



Σχήμα 6.4: Φάσματα απορρόφησης UV-vis εκχυλισμάτων ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε διάφορα pH.

Από τις κορυφές στα φάσματα UV-vis προκύπτει το συμπέρασμα ότι το εκχύλισμα του κόκκινου λάχανου έχει πιο περίπλοκη σύσταση από το εκχύλισμα της ανθοκυανίνης από τα βατόμουρα, γεγονός που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία [Wolf et al (1956)], όπως φαίνεται από τις επιπλέον περιοχές χρώματος. Συγκεκριμένα το κόκκινο λάχανο περιλαμβάνει περιοχές χρώματος: κόκκινο (pH 1-2.5), ανοιχτό κόκκινο (pH 2.5-3.3), ροζ (pH 3.3-4.7), μωβ (pH 4.7-5.85), λιλά (pH 5.85-7.6) μπλέ (pH 7.6-8.7), παγωνί (pH 8.7-9.4), πράσινο (pH 9.4-12.6), ανοιχτό πράσινο (pH 12.6-13.2) και κίτρινο (pH 13.2). Αυτή η μεγάλη ποικιλία χρωμάτων από τα εκχυλίσματα του κόκκινου λάχανου μπορεί να οφείλεται στο περίπλοκο μείγμα ουσιών που συνυπάρχουν. Αντίθετα τα βατόμουρα περιλαμβάνουν περιοχές χρώματος: κόκκινο (pH 1-5), βυσσινί (pH 5-6.7), σκούρο βυσσινί (pH 7-8.5), πρασινωπό (pH 9-13) και λαδί (pH 13.2).

Από τα φάσματα UV-vis της ανθοκυανίνης του κόκκινου λαχάνου στο Σχήμα 6.3 παρατηρούμε ότι στο pH=2 υπάρχει ισχυρή απορρόφηση στα 530 nm. Στο pH=3 το ύψος της κορυφής

απορρόφησης έχει μειωθεί και η θέση της μέγιστης απορρόφησης αρχίζει να μετατοπίζεται ελαφρώς (3 nm) προς την ερυθρή περιοχή. Σε pH=4 η μετατόπιση προς την ερυθρή περιοχή είναι πιο εμφανής και η μέγιστη απορρόφηση είναι στα 544 nm. Με περαιτέρω αύξηση του pH, η κορυφή απορρόφησης αυξάνεται περαιτέρω και μετατοπίζεται προς το ερυθρό άκρο του φάσματος (στο pH=5 στα 550 nm, στο pH=7 στα 585 nm), και στο pH=8 το μέγιστο βρίσκεται στα 610 nm. Στο pH=12 συνοδευόμενη από την αλλαγή χρώματος της ανθοκυανίνης από πράσινο σε κίτρινο, αυτή η κορυφή απορρόφησης έχει εξαλειφθεί και η μέγιστη απορρόφηση εμφανίζεται τώρα σε πολύ μικρότερα μήκη κύματος, κάτω από 400 nm (στα 387 nm). Αυτά τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας [Wahyuningsih et al (2017), Wolf et al (1956)].

Από τα φάσματα UV της ανθοκυανίνης από τα βατόμουρα στο Σχήμα 6.4 παρατηρούμε ότι στο pH=2 υπάρχει έντονη απορρόφηση στα 511 nm. Στο pH=3 το ύψος της κορυφής απορρόφησης έχει μειωθεί, όμως δεν παρατηρείται μετατόπιση στη θέση της μέγιστης απορρόφησης. Στο εύρος pH=4-6 η κορυφή απορρόφησης μειώνεται περαιτέρω και μετατοπίζεται ελαφρώς (5-10 nm) προς την ερυθρή περιοχή. Με περαιτέρω αύξηση του pH, η κορυφή απορρόφησης αυξάνεται περαιτέρω και μετατοπίζεται προς το ερυθρό άκρο του φάσματος, στο pH=7 βρίσκεται στα 530 nm και στο pH=10 η κορυφή βρίσκεται στα 570 nm. Στο pH=12 η κορυφή απορρόφησης στα 570 nm μειώνεται και η μέγιστη απορρόφηση εμφανίζεται τώρα σε πολύ μικρότερα μήκη κύματος, κάτω από 400 nm.

Τα φάσματα UV-vis μπορούν να υποδείξουν την ύπαρξη ορισμένων ανθοκυανιδινών. Το μέγιστο μήκος κύματος για ενώσεις με βάση την πελαργονιδίνη έχει παρατηρηθεί περίπου στα 502-506 nm, για την κυανιδίνη στα 512-520 nm, για την πεονιδίνη στα 517-520 nm, για τη δελφινιδίνη στα 525 nm, για την πετουινιδίνη στα 526-529 nm και για την μαλβινιδίνη στα 530 nm [Shipp et al (2010)]. Τα βατόμουρα εμφανίζουν μέγιστη κορυφή απορρόφησης στα 511-515 nm και έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι η κυριότερη ανθοκυανιδίνη στα βατόμουρα είναι η κυανιδίνη. Το κόκκινο λάχανο παρουσιάζει μέγιστη κορυφή απορρόφησης γύρω στα 530 nm, άρα δεν μπορούμε με αυτό το κριτήριο να εκτιμήσουμε με ακρίβεια τις κύριες ανθοκυανιδίνες που το απαρτίζουν. Ωστόσο είναι γενικά δύσκολο να ταυτοποιηθούν οι ανθοκυανιδίνες από τα φάσματα UV-vis, διότι συνήθως τα εκχυλίσματα από φυσικές πηγές περιέχουν περισσότερες

από μια ανθοκυανιδίνες, κάτι το οποίο έχει αποδειχθεί βιβλιογραφικά μέσω του HPLC. Όσο αφορά τα βατόμουρα, μέσω της λήψης χρωματογραφημάτων HPLC [Filip et al (2012)] έχει αποδειχθεί ότι η κυρίαρχη ανθοκυανίνη είναι η κυανιδίνη-3-γλυκοζυλιωμένη και η αντίστοιχη ανθοκυανιδίνη είναι η κυανιδίνη.

Από τα φάσματα UV-vis και από την μελέτη αλλαγής του χρώματος ανάλογα με το pH, συμπεραίνουμε ότι τα εκχυλίσματα από τα βατόμουρα είναι απλούστερα από αυτά από το κόκκινο λάχανο. Συγκεκριμένα τα πρώτα εμφανίζουν δύο κορυφές στα φάσματα UV-vis σε σχέση με τις τρεις κορυφές που παρατηρούνται από τα δεύτερα, όπου η επιπλέον κορυφή οφείλεται στην ακυλίωση στο C-δακτύλιο. Επίσης τα εκχυλίσματα από βατόμουρα εμφανίζουν λιγότερες περιοχές χρώματος και λιγότερες μετατοπίσεις στα φάσματα UV-vis. Τα παραπάνω οφείλονται στο γεγονός ότι πρώτον τα εκχυλίσματα από βατόμουρα είναι απλούστερα (λιγότερες ανθοκυανιδίνες και ανθοκυανίνες) και δεύτερον όπως έχει αποδειχθεί πειραματικά οι ανθοκυανίνες από τα βατόμουρα δεν είναι ακυλιωμένες στο C-δακτύλιο. Ένα προφανές πλεονέκτημα των βατόμουρων ως πηγή ανθοκυανινών είναι ότι τα εκχυλίσματα είναι πυκνότερα κατά 30-40 φορές.

6.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια σημαντική τεχνική για την ταυτοποίηση των ανθοκυανινών και των ανθοκυανιδινών που απαρτίζουν τα εκχυλίσματα. Βιβλιογραφικά υπάρχουν αρκετές μέθοδοι HPLC για την ταυτοποίηση των ανθοκυανινών σε εκχυλίσματα από διάφορα μούρα, όλες όμως χρησιμοποιούν βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution) [Chen et al (2014), Durst et al (2001), Filip et al (2012)]. Για τα εκχυλίσματα από βατόμουρα χρησιμοποιείται συγκεκριμένη μέθοδος με διαλύτη A 100% ακετονιτρίλιο και διαλύτη B 5% ακετονιτρίλιο, 10% οξικό οξύ, και 1% φωσφορικό οξύ [Fan-Chiang et al (2006)].

Έγινε προσπάθεια για τη λήψη χρωματογραφημάτων HPLC με την μέθοδο των Fan-Chiang et al (2006). Ωστόσο στο όργανο HPLC που χρησιμοποιήθηκε (HPLC Shimadzu της ερευνητικής ομάδας αναλυτικής Χημείας της καθηγήτριας Κ.Καπνίση) δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν κινητές φάσεις με υψηλές συγκεντρώσεις οξέων (χαμηλά pH). Τελικά πραγματοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση με 100% ακετονιτρίλιο είτε 100% μεθανόλη. Βιβλιογραφικά ωστόσο η

ισοκρατική έκλυση δεν χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση τέτοιων ουσιών και συνεπώς οι κορυφές που εμφανίστηκαν στα χρωματογραφήματα δεν ήταν δυνατόν να ταυτοποιηθούν ενώ δεν υπήρξε ικανοποιητικός διαχωρισμός των κορυφών. Σκοπός της παρούσας διατριβής δεν ήταν η ανάπτυξη μεθόδου για ταυτοποίηση των ανθοκυανινών, επομένως λόγω της μη διαθεσιμότητας καθαρών ουσιών των ανθοκυανιδινών και της μη ύπαρξης πρότυπης μεθόδου για ισοκρατική έκλυση δεν έγινε δυνατή η ταυτοποίηση των ανθοκυανινών στα εκχυλίσματα. Τα χρωματογραφήματα HPLC παρουσιάζονται στο παράρτημα (Π.11).

6.5 Φασματοσκοπία φθορισμού

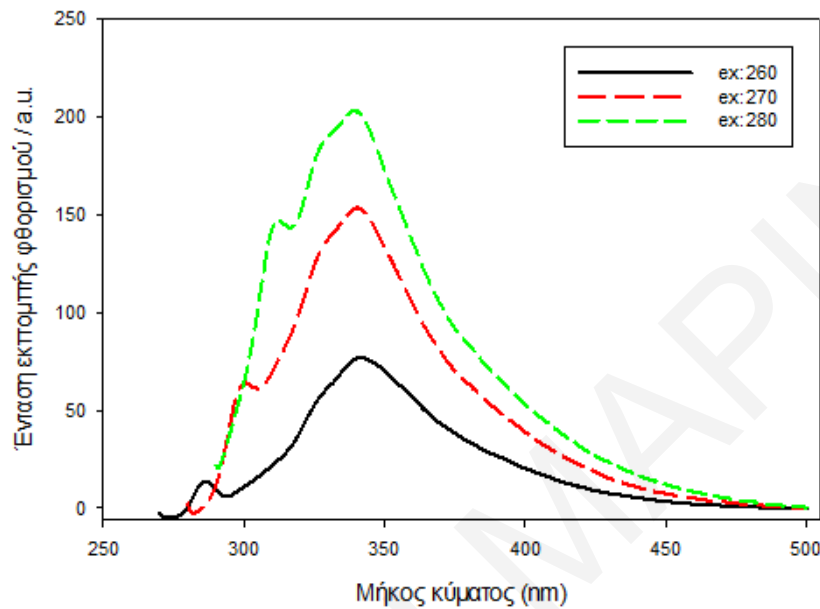
6.5.1. Φθορισμός ανθοκυανινών

Ο φθορισμός των ανθοκυανινών μελετήθηκε σε pH=3 και σε pH=6. Έχει αναφερθεί και προηγουμένως ότι υπάρχουν τέσσερις κύριες μορφές ανθοκυανίνης που συνυπάρχουν στην ισορροπία: το κατιόν φλαβυλίου (κόκκινο), η κινουειδής βάση (μπλέ), η άχρωμη ψευδοβάση της καρβινόλης και η άχρωμη χαλκόνη (Σχήμα 6.2). Οι ανθοκυανίνες είναι σταθερές σε όξινες και ελαφρώς όξινες συνθήκες (pH=1-3), όπου βρίσκονται κυρίως υπό τη μορφή του κατιόντος φλαβυλίου. Σε pH > 4, οι ανθοκυανίνες υιοθετούν τις μορφές της καρβινόλης και της χαλκόνης. Η σχετική σύνθεση των διαφορετικών μοριακών δομών των ανθοκυανινών που συνυπάρχουν σε υδατικό διάλυμα εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία. [Kamiloglu et al (2015)] Η επιλογή λοιπόν των τιμών pH 3 και 6 έγινε για τη μελέτη της σταθερότερης μορφής της ανθοκυανίνης (κατιόν φλαβυλίου) που μας ενδιαφέρει κυρίως στην παρούσα διατριβή και για τη μελέτη των διαφοροποιήσεων που συμβαίνουν στα φάσματα φθορισμού σε pH=6, όπου συνυπάρχουν και άλλες μορφές ανθοκυανινών.

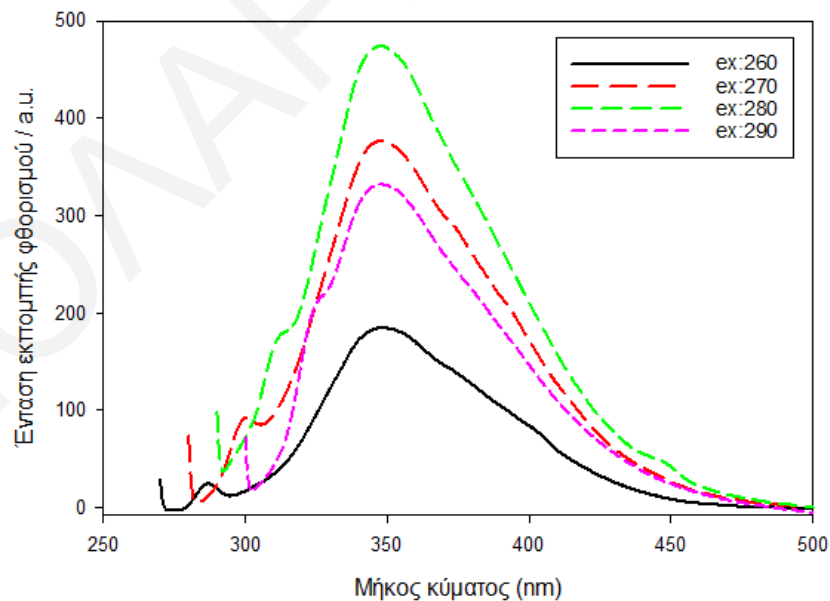
Με βάση τις κορυφές που παρουσιάστηκαν στα φάσματα UV-vis σε pH=3 και σε pH=6, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές διέγερσης των ανθοκυανινών σε τρία διαφορετικά εύρη μηκών κύματος. Η διέγερση πραγματοποιήθηκε στα εύρη 240-280 nm, 320-350 nm, και 550-570 nm, όπου και παρατηρήθηκαν οι κορυφές απορρόφησης UV-vis. Σκοπός των πειραμάτων αυτών ήταν η επιλογή του κατάλληλου μήκους κύματος διέγερσης για την μελέτη της επίδρασης διάφορων βιομορίων στο φθορισμό των ανθοκυανινών.

6.5.1.1. Φθορισμός ανθοκυανινών από βατόμουρα

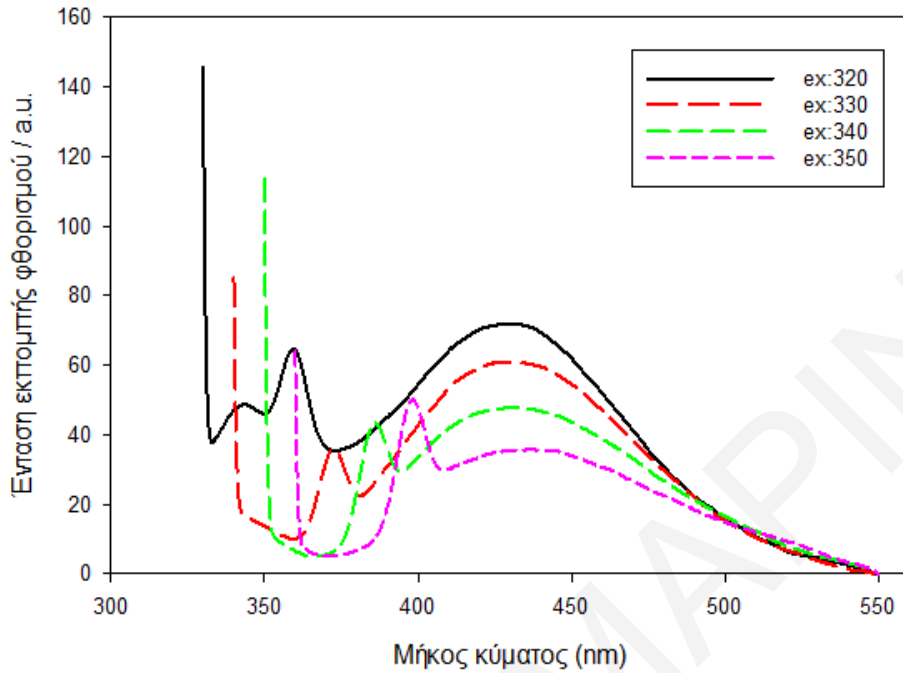
Πιο κάτω παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού των ανθοκυανινών από βατόμουρα σε pH=3 και pH=6.



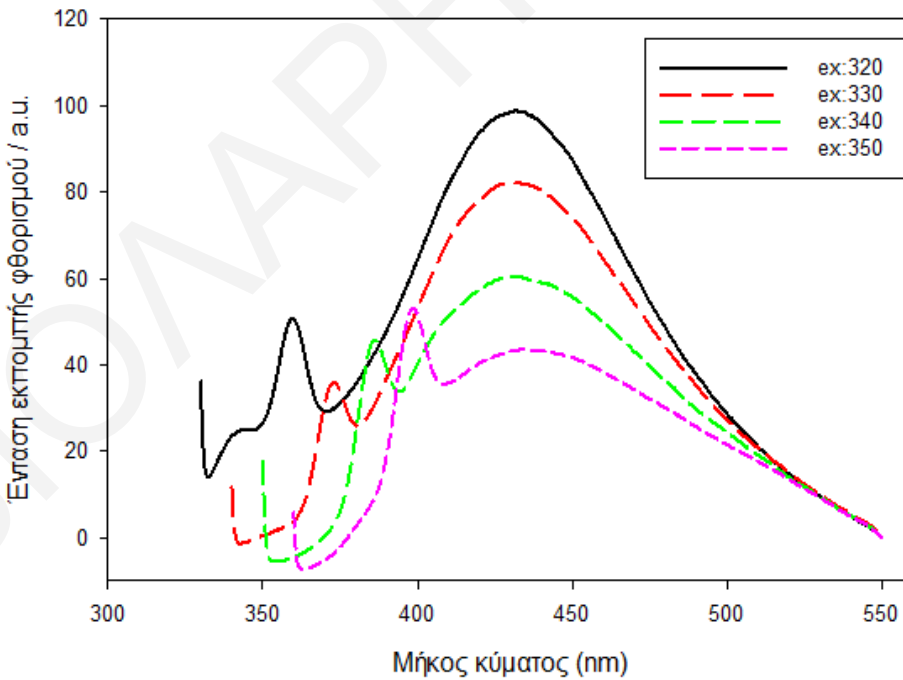
Σχήμα 6.5: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 260-280 nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=1\text{mg/L}=2.23 \times 10^{-6}\text{M}$).



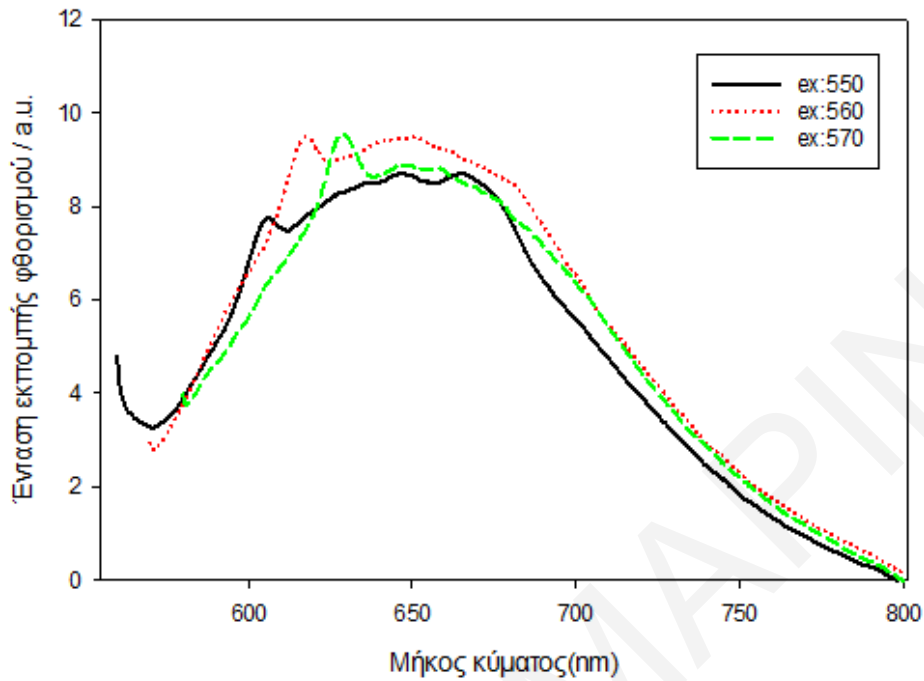
Σχήμα 6.6: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 260-290 nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=1\text{mg/L}=2.23 \times 10^{-6}\text{M}$).



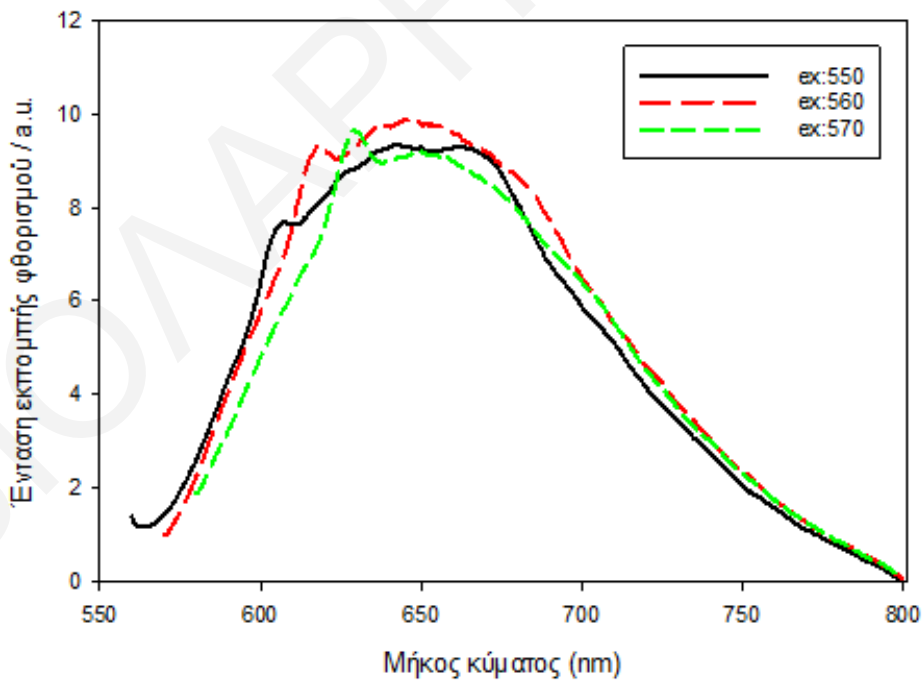
Σχήμα 6.7: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 320-350 nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=3.75\text{mg/L}=8.35 \times 10^{-6}\text{M}$).



Σχήμα 6.8: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 320-350 nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=3.75\text{mg/L}=8.35 \times 10^{-6}\text{M}$).



Σχήμα 6.9: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 550-570 nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=3.75\text{mg/L}=8.35 \times 10^{-6}\text{M}$).



Σχήμα 6.10: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα με διέγερση στο εύρος 550-570 nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=3.75\text{mg/L}=8.35 \times 10^{-6}\text{M}$).

Τα φάσματα φθορισμού που λήφθηκαν υποδεικνύουν ότι μπορούν να διακριθούν τουλάχιστον τρεις ζώνες φθορισμού στο εξεταζόμενο εκχυλίσμα. Από τα διάφορα μήκη κύματος που μελετήθηκαν στις τρεις ζώνες επιλέχθηκαν τα εξής για τη μελέτη επίδρασης των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών στο φθορισμό της ανθοκυανίνης στη παρούσα διατριβή:

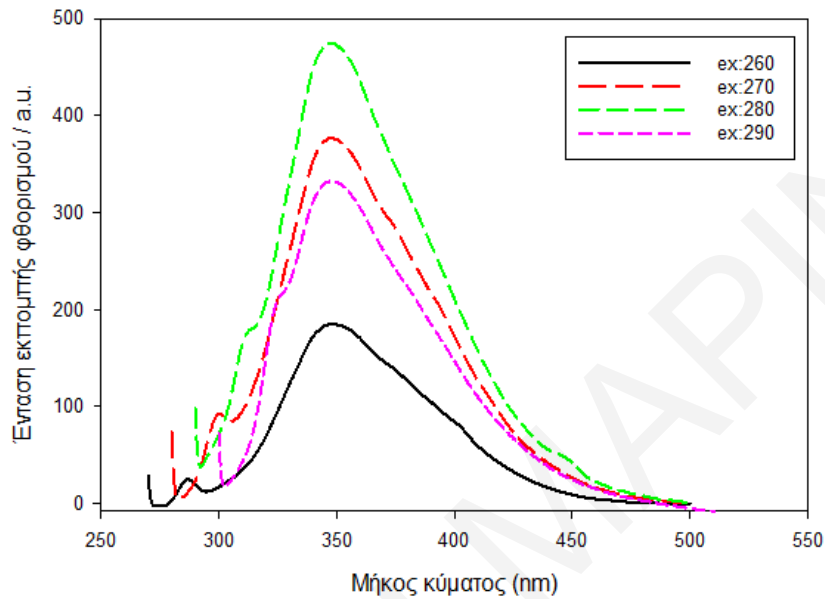
- Μήκος κύματος διέγερσης: 260 nm, αρχή φάσματος: 270 nm, τέλος φάσματος: 550 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 280nm.
- Μήκος κύματος διέγερσης: 330 nm, αρχή φάσματος: 340 nm, τέλος φάσματος: 800 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.) χρησιμοποίηση φίλτρου 380 nm.
- Μήκος κύματος διέγερσης: 560 nm, αρχή φάσματος: 570 nm, τέλος φάσματος: 900 nm, εύρος ταινίας διέγερσης, εκπομπής: 5 nm (ex.), 5 nm (em.).

Η χρησιμοποίηση των φίλτρων έγινε για τη μείωση της κορυφής Raman του νερού που εμφανιζόταν στην αρχή του φάσματος. Η επιλογή των προαναφερθέντων μηκών κύματος διέγερσης έγινε με βάση τη κορυφή εκπομπής που παρουσίασε ταυτόχρονα μεγάλη ένταση και στην οποία η κορυφή Raman του νερού βρισκόταν πιο μακριά (\downarrow nm) και με χαμηλή ένταση. Για το μήκος κύματος διέγερσης 260 nm παρατηρείται η πιο ισχυρή ένταση φθορισμού. Συγκεκριμένα, η ένταση φθορισμού αυξάνεται για μήκος κύματος διέγερσης από τα 560 nm, στα 330 nm και τέλος στα 260 nm. Όσον αφορά την επίδραση του pH, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές τόσο στα μήκη κύματος εκπομπής όσο και στις εντάσεις των κορυφών.

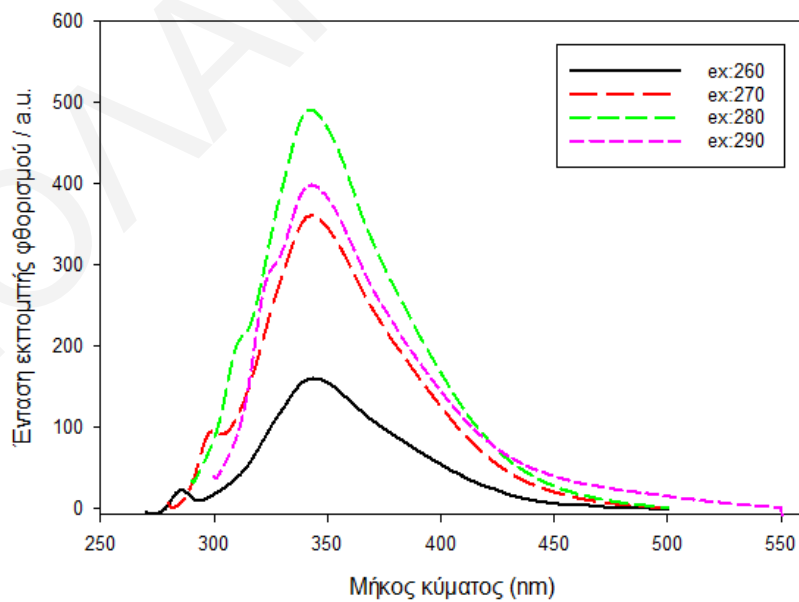
Βιβλιογραφικά αναφέρθηκε ότι οι χαλκόνες έχουν εκπομπές φθορισμού στο φασματικό εύρος 420–450 nm (λ_{exc} 320–340 nm), ενώ η ημιακεταλική μορφή (καρβινόλη) στα 370 nm και το κατιόν φλαβιλίου εμφανίζει ασθενή εκπομπή φθορισμού στο φασματικό εύρος 570-620 nm (λ_{exc} =520 nm) και η κινσοειδής βάση ως ανιόν έχει φάσματα εκπομπής φθορισμού στην περιοχή των 600-665 nm [Rakic et al (2015)]. Τα φάσματα φθορισμού των ανθοκυανινών δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα περιέχουν πολλά φθορίζοντα συστατικά, τα οποία μπορεί να είναι διαφορετικές ενώσεις ανθοκυανίνης, άλλες φθορίζουσες ενώσεις που υπάρχουν στα εκχυλίσματα, διαφορετικές ιοντικές και ταυτομερείς μορφές αυτών των ενώσεων, ή διαφορετικά κέντρα φθορισμού που δημιουργούνται από μόρια της ίδιας της ένωσης ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης με το μικροπεριβάλλον [Drabent et al (1999)]. Τα πειραματικά δεδομένα που λήφθηκαν με τη μελέτη του φθορισμού της ανθοκυανίνης υποδηλώνουν ότι υπάρχουν τουλάχιστον τρία διαφορετικά είδη φθορισμού στα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, γεγονός που συμφωνεί με τη μελέτη των Drabent et al (1999).

6.5.1.2 Φθορισμός ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο

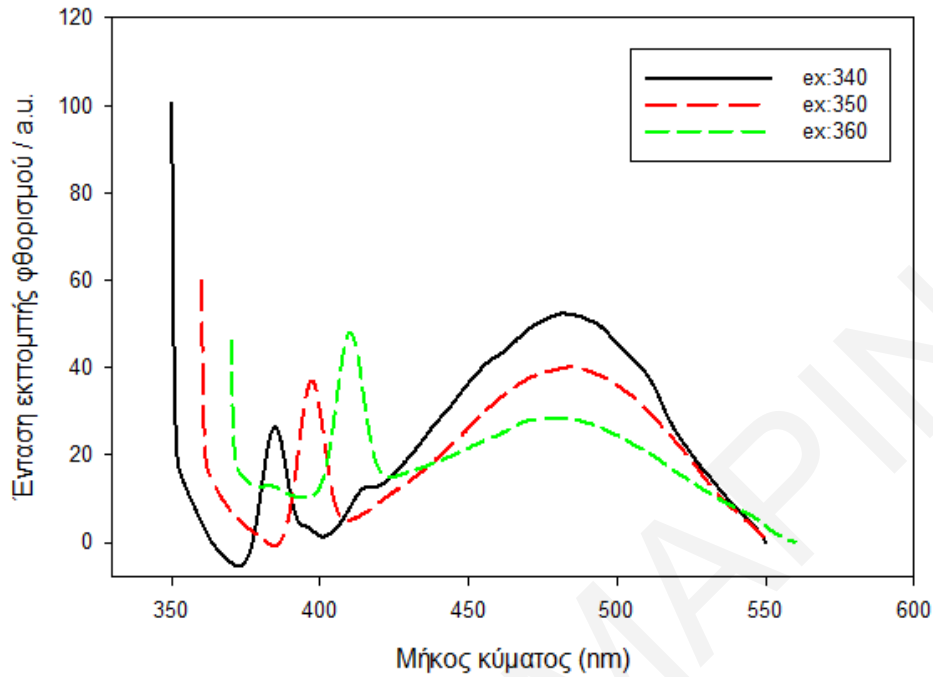
Πιο κάτω παρουσιάζονται τα φάσματα φθορισμού των ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο σε pH=3 και pH=6.



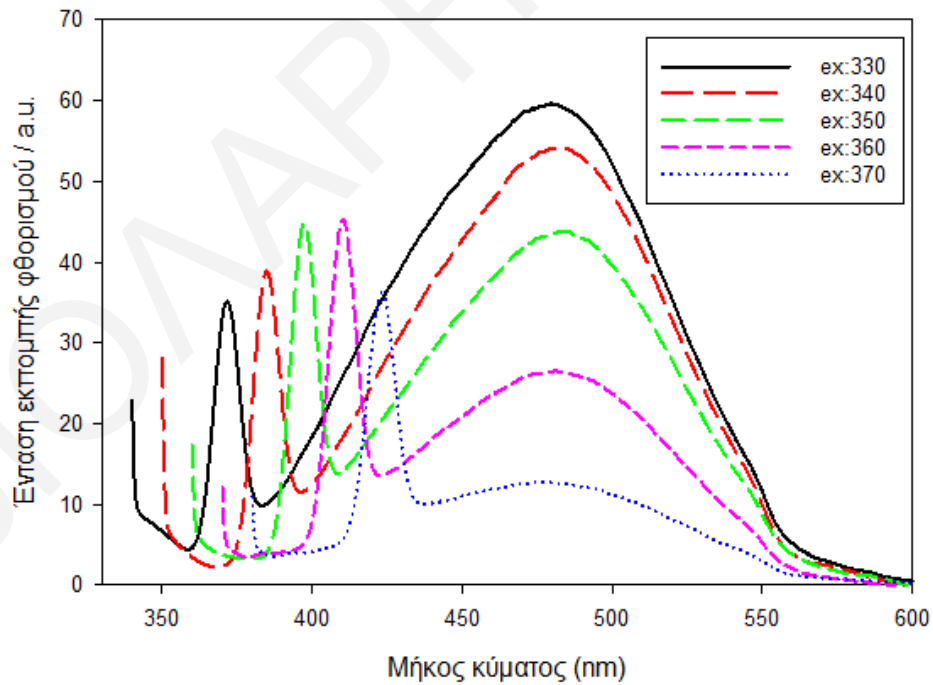
Σχήμα 6.11: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 260-290 nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=1.5\text{mg/L}=3.34 \times 10^{-6}\text{M}$).



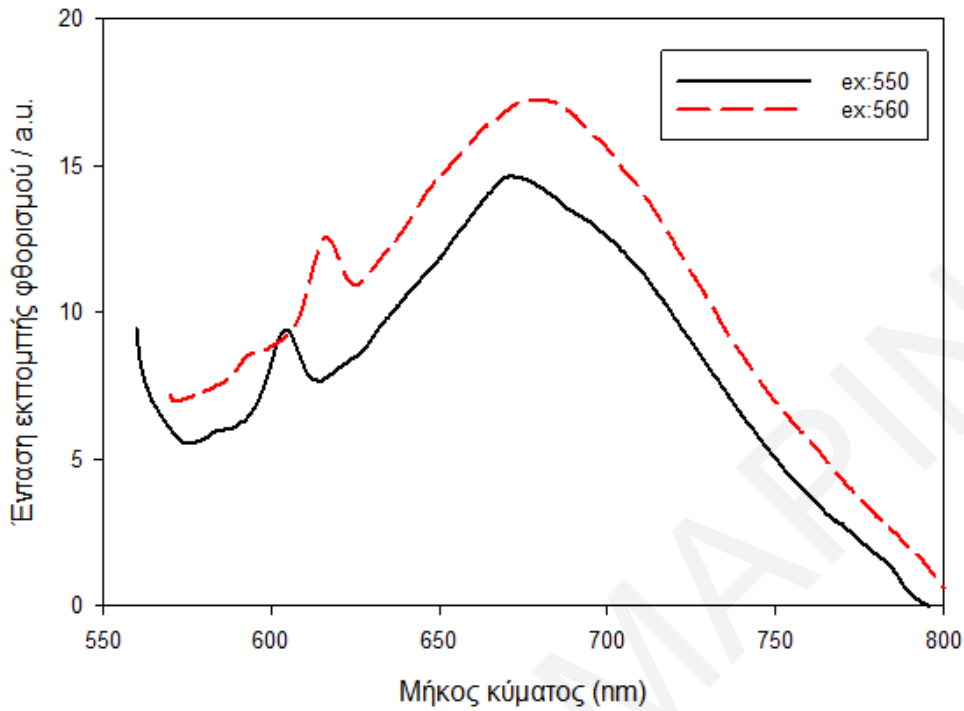
Σχήμα 6.12: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 260-290 nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=1.5\text{mg/L}=3.34 \times 10^{-6}\text{M}$).



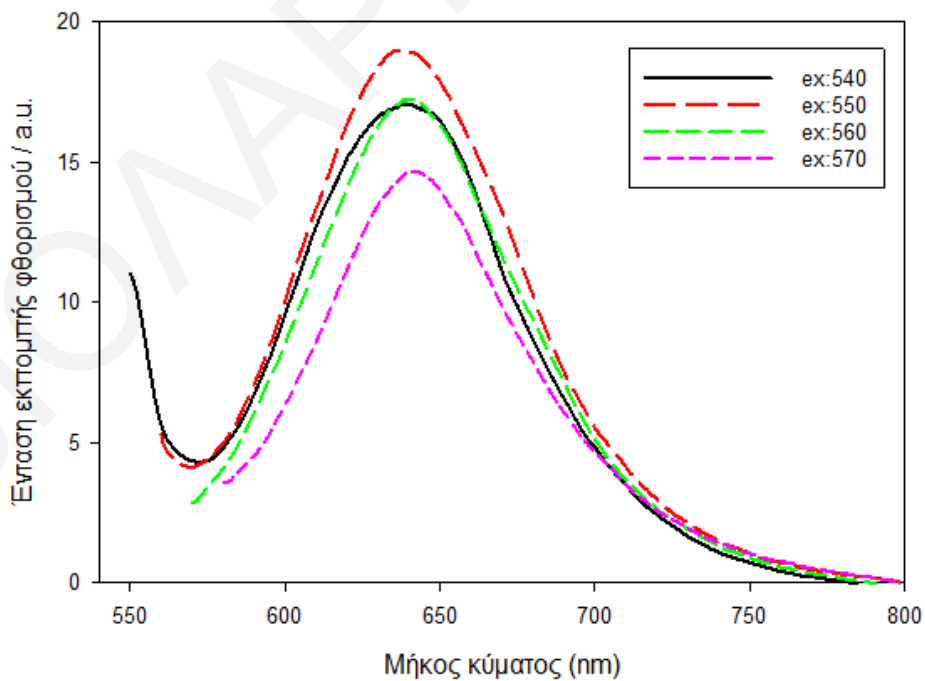
Σχήμα 6.13: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 340-360 nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=1.5\text{mg/L}=3.34 \times 10^{-6}\text{M}$).



Σχήμα 6.14: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 330-370 nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=1.5\text{mg/L}=3.34 \times 10^{-6}\text{M}$).



Σχήμα 6.15: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 550-560 nm σε pH=3 ($C_{\text{antho}}=3\text{mg/L}=6.68 \times 10^{-6}\text{M}$).



Σχήμα 6.16: Φάσματα φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με διέγερση στο εύρος 540-570 nm σε pH=6 ($C_{\text{antho}}=3\text{mg/L}=6.68 \times 10^{-6}\text{M}$).

Από τα φάσματα φθορισμού που λήφθηκαν στα τρία διαφορετικά εύρη μηκών κύματος διέγερσης, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές, όπως και στην περίπτωση των ανθοκυανινών από βατόμουρα. Ο χαρακτήρας αυτών των φασμάτων υποδεικνύει ότι μπορούν επίσης να διακριθούν τουλάχιστον τρεις ζώνες φθορισμού στο εξεταζόμενο εκχύλισμα. Από τα διάφορα μήκη κύματος που μελετήθηκαν στις τρεις ζώνες, επιλέχθηκαν τα ίδια μήκη κύματος διέγερσης όπως και στην περίπτωση των βατόμουρων για να μπορεί στη συνέχεια της διατριβής να γίνει σύγκριση μεταξύ των δύο πηγών στα περαιτέρω πειράματα φθορισμού. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές του φθορισμού στα δύο pH.

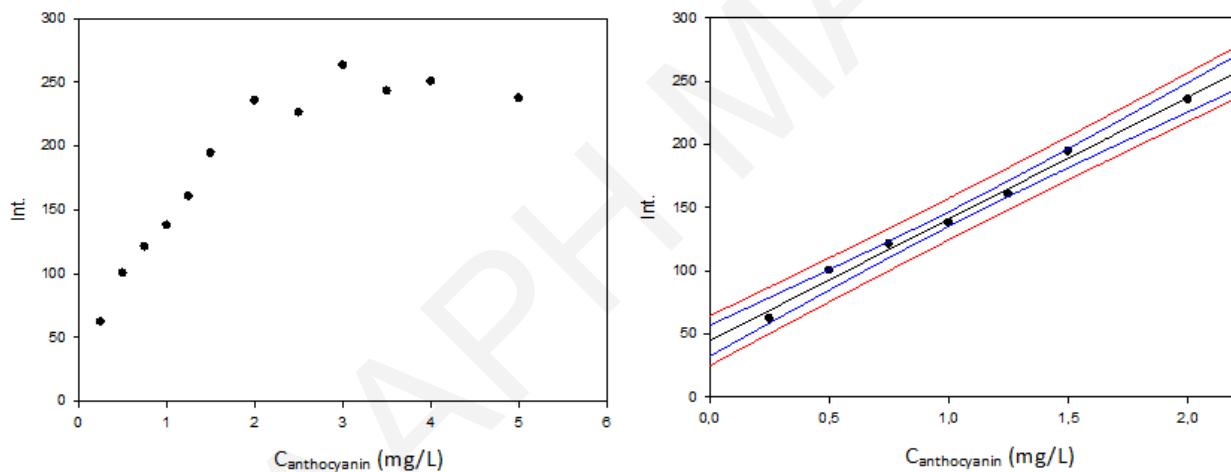
Σημαντική διαφοροποίηση στα φάσματα των δύο πηγών παρατηρήθηκε ωστόσο στο εύρος μήκους κύματος διέγερσης 330-370 nm. Συγκεκριμένα οι ανθοκυανίνες από βατόμουρα στο συγκεκριμένο εύρος παρουσιάζουν κορυφή εκπομπής στα 430 nm, ενώ οι ανθοκυανίνες από κόκκινο λάχανο παρουσιάζουν κορυφή εκπομπής στα 480nm. Αυτό ίσως να οφείλεται στην ύπαρξη δύο κορυφών απορρόφησης (~280 nm και ~320 nm) στο φάσμα UV-vis των ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο στην περιοχή των 200-350 nm, σε σχέση με την μια κορυφή απορρόφησης (~280 nm) που παρατηρείται στην περίπτωση των βατόμουρων ή να οφείλεται στις διαφορετικές ουσίες που υπάρχουν στις δύο πηγές απομόνωσης.

6.5.2 Γραμμικότητα φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα

Για να διεξαχθούν σωστά τα πειράματα φθορισμού, ελέγχθηκε η περιοχή συγκεντρώσεων όπου ο φθορισμός των ανθοκυανινών είναι γραμμικός. Απόκλιση από τη γραμμικότητα μπορεί να οφείλεται στην απορρόφηση (inner filter effect) και σε φαινόμενα αυτοαπόσβεσης ή/και συσσωμάτωσης. Ο έλεγχος της γραμμικότητας του φθορισμού των ανθοκυανινών πραγματοποιήθηκε και για τα τρία βασικά μήκη κύματος διέγερσης (260 nm, 330 nm, 560 nm) στις δύο συνθήκες pH 3 και 6. Παρακάτω παρουσιάζεται ένα παράδειγμα γραφικής παράστασης της μέγιστης έντασης φθορισμού ως προς την συγκέντρωση της ανθοκυανίνης, με διέγερση στα 260 nm σε pH=6 (Σχήμα 6.17). Τα δεδομένα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4.

Πίνακας 6.4: Δεδομένα πειραμάτων γραμμικότητας φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα pH=6.

$C_{\text{anthocyanin}}$ (mg/L)	Ένταση
0.25	61.97
0.50	100.12
0.75	120.98
1.00	137.68
1.25	160.30
1.50	194.30
2.00	235.35
2.50	226.08
3.00	263.12
3.50	242.85
4.00	250.46
5.00	237.25

**Σχήμα 6.17:** Γραφική παράσταση της μέγιστης έντασης φθορισμού έναντι της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών.

Από το Σχήμα 6.17, παρατηρείται γραμμική συμπεριφορά ($R=0.9956$) μέχρι την συγκέντρωση ανθοκυανίνης 2mg/L (4.45×10^{-6} M - με βάση αναφοράς την κυανιδίνη). Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 2mg/L παρατηρείται απόκλιση από την γραμμική συμπεριφορά. Για αυτό τον λόγο τα πειράματα μελέτης φθορισμού των ανθοκυανινών όταν αυτές αλληλεπιδρούν με συστατικά των τοιχωμάτων των γαλακτωμάτων (βιομόρια) διεξάχθηκαν σε σταθερή συγκέντρωση ανθοκυανίνης 2mg/L. Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε και από τον έλεγχο γραμμικότητας στα μήκη κύματος διέγερσης 330 nm και 560 nm σε pH 3 και 6.

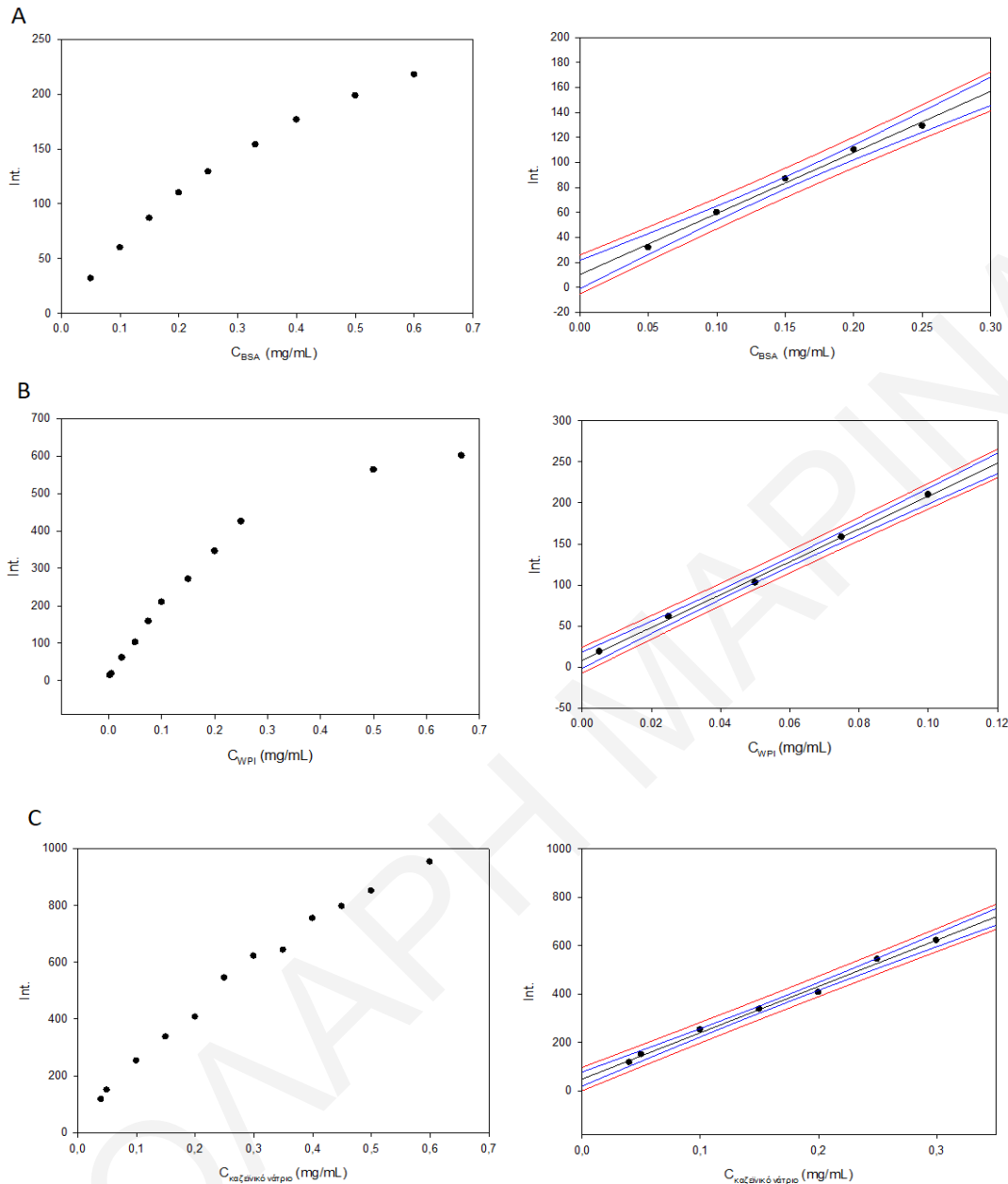
6.5.3 Γραμμικότητα φθορισμού βιομορίων

Για τη μελέτη της επίδρασης των ανθοκυανινών στο φθορισμό των βιομορίων (φαινόμενα απόσβεσης), ελέγχθηκε η περιοχή συγκεντρώσεων όπου ο ενδογενής φθορισμός των πρωτεϊνών είναι γραμμικός. Ο έλεγχος της γραμμικότητας του φθορισμού πραγματοποιήθηκε για την BSA (pH=6), την WPI (pH=6) και το καζεϊνικό νάτριο (pH=7) στο μήκος κύματος διέγερσης 280 nm. Τα δεδομένα των πειραμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5 και οι γραφικές παραστάσεις της μέγιστης έντασης φθορισμού ως προς την συγκέντρωση των πρωτεϊνών παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.18.

Πίνακας 6.5: Δεδομένα πειραμάτων γραμμικότητας φθορισμού BSA (pH=6), WPI (pH=6) και καζεϊνικού νατρίου (pH=7).

C_{BSA} (mg/mL)	Ένταση φθορισμού	C_{WPI} (mg/mL)	Ένταση φθορισμού	$C_{καζ.νατρ.}$ (mg/mL)	Ένταση φθορισμού
0.050	32.013	2×10^{-3}	14.471	0.040	117.576
0.100	60.137	5×10^{-3}	18.799	0.050	150.520
0.150	86.989	0.025	61.494	0.100	252.783
0.200	110.184	0.050	102.673	0.150	337.349
0.250	129.267	0.075	158.338	0.200	407.214
0.333	153.867	0.100	210.010	0.250	544.507
0.400	176.611	0.150	271.441	0.300	621.667
0.500	198.681	0.200	345.701	0.350	642.776
0.600	217.700	0.250	425.202	0.400	754.212
		0.500	562.997	0.450	796.736
		0.666	600.754	0.500	850.852
				0.600	953.063

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Σχήμα 6.18: Γραφική παράσταση της μέγιστης έντασης φθορισμού έναντι της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών Α) BSA, Β)WPI C)καζεϊνικό νάτριο.

Από το Σχήμα 6.18, παρατηρείται γραμμική συμπεριφορά για την BSA ($R=0.9971$), την WPI ($R=0.9990$) και το καζεϊνικό νάτριο ($R=0.9974$) μέχρι την συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.25 mg/mL, 0.1 mg/mL και 0.3 mg/mL αντίστοιχα. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τις προαναφερθείσες τιμές παρατηρείται απόκλιση από τη γραμμική συμπεριφορά. Για αυτό τον λόγο τα πειράματα

μελέτης της απόσβεσης του φθορισμού των πρωτεϊνών στην παρουσία των ανθοκυανινών πραγματοποιήθηκαν σε αυτές τις συγκεντρώσεις.

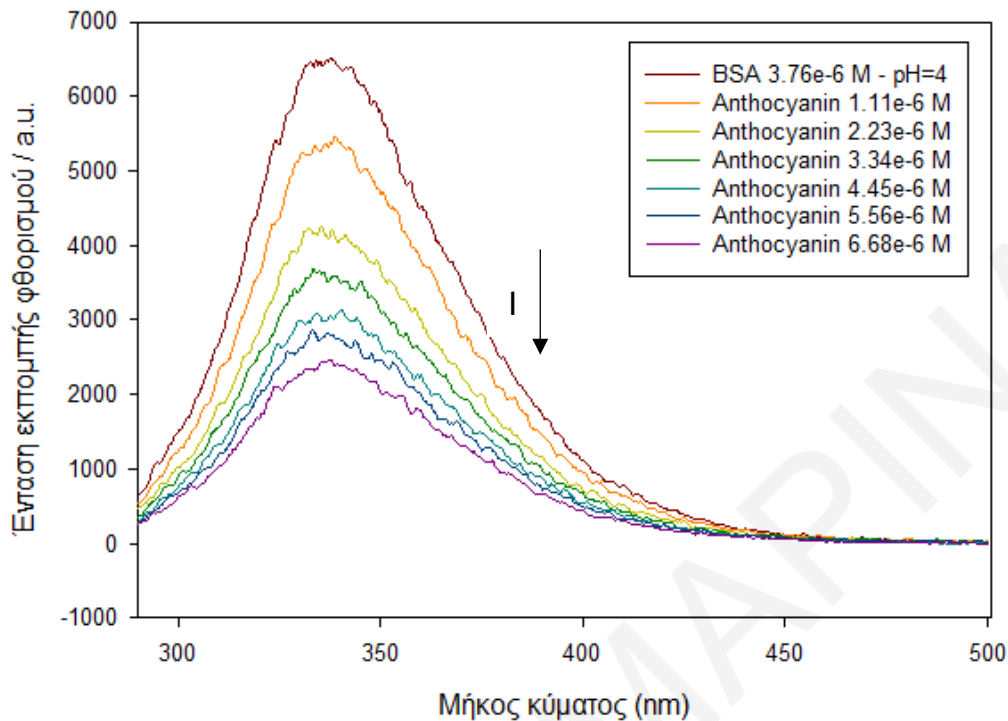
6.5.4 Αλληλεπίδραση ανθοκυανινών με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες

Η αλληλεπίδραση των ανθοκυανινών με τα βιομόρια μελετήθηκε με συνδυασμό πειραματικής και υπολογιστικής προσέγγισης από φάσματα φθορισμού, διαγράμματα Stern-Volmer και Benesi-Hildebrand. Η θεωρητική ανάλυση των πειραμάτων φθορισμού περιλαμβάνει παραμέτρους, όπως οι σταθερές απόσβεσης Stern-Volmer, οι σταθερές πρόσδεσης και οι αριθμοί θέσεων πρόσδεσης.

Ως φυσική πηγή απομόνωσης των ανθοκυανινών, για τη συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα βατόμουρα και όχι το κόκκινο λάχανο. Οι ανθοκυανίνες από βατόμουρα είναι απλούστερα μίγματα. Όπως έχει βρεθεί τα βατόμουρα περιέχουν παράγωγα μίας μόνο ανθοκυανιδίνης, της κυανιδίνης [Filip et al (2012)]. Τα βιομόρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη φθορισμού στην παρούσα διατριβή είναι οι πρωτεΐνες: αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), πρωτεΐνη ορού του γάκατος (WPI) και καζεϊνικό νάτριο και οι πολυσακχαρίτες: χιτοζάνη, πηκτίνη,θειική χονδροϊτίνη και αλγινικό νάτριο. Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν δύο ολοκληρωμένα παραδείγματα αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών από βατόμουρα με την αλβουμίνη βόειου ορού και τη χιτοζάνη σε pH=4.

6.5.4.1 Μελέτη φθορισμού αλβουμίνης βόειου ορού στην παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα

Στο Σχήμα 6.19 παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού της BSA στην παρουσία ανθοκυανίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4. Χρησιμοποιήθηκε σταθερή συγκέντρωση πρωτεΐνης ($0.25\text{mg/mL}=3.76 \times 10^{-6}\text{ M}$) και συγκεντρώσεις ανθοκυανίνης από $1.11 \times 10^{-6}\text{ M}$ ($=0.5\text{mg/L}$) μέχρι $6.68 \times 10^{-6}\text{ M}$ ($=3\text{mg/L}$). Τα φάσματα καταγράφηκαν με διέγερση στα 280 nm όπου διεγείρονται τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης και τυροσίνης [Lakowicz (2006)]. Οι εντάσεις φθορισμού που μετρήθηκαν στα λ_{max} διορθώθηκαν για το inner filter effect σύμφωνα με την εξίσωση (4.5) (υποκεφάλαιο 4.1.2.1) για τους περαιτέρω υπολογισμούς.

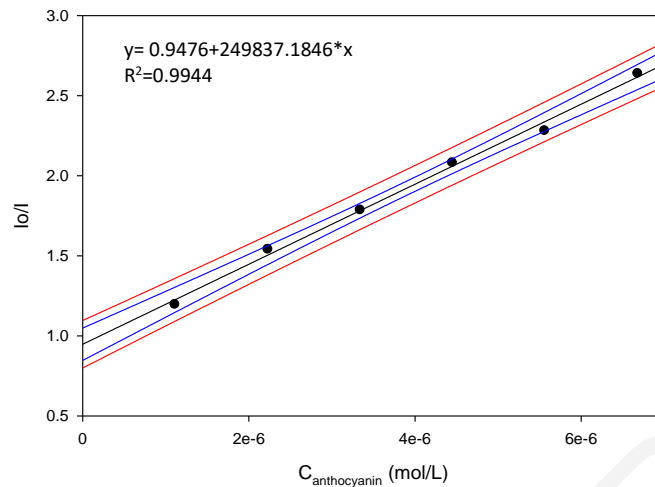


Σχήμα 6.19: Φάσματα φθορισμού BSA στην παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 280 nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 1 nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 2.5 nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-8300.

Η μέγιστη εκπομπή της κορυφής BSA ήταν κοντά στα 340 nm, ενώ δεν υπήρχε εκπομπή φθορισμού για την ανθοκυανίνη σε αυτές τις συνθήκες οργάνου (πολύ χαμηλή ένταση). Από το Σχήμα 6.19, βλέπουμε ότι με την προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης ανθοκυανίνης στο διάλυμα της BSA, η ένταση ενδογενούς φθορισμού της πρωτεΐνης μειώνεται, δηλαδή αποσβένεται, αποδεικνύοντας ότι οι ανθοκυανίνες αλληλεπιδρούν με την BSA.

6.5.4.1.1 Μηχανισμός απόσβεσης φθορισμού της BSA από τις ανθοκυανίνες

Πιο κάτω (Σχήμα 6.20) παρουσιάζεται το διάγραμμα S-V, το οποίο κατασκευάστηκε για την ανάλυση της απόσβεσης φθορισμού της BSA. Το διάγραμμα S-V παρουσιάζει καλή γραμμικότητα, επομένως μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι υπάρχει ένας μοναδικός τύπος απόσβεσης, μόνο δυναμική ή μόνο στατική απόσβεση.



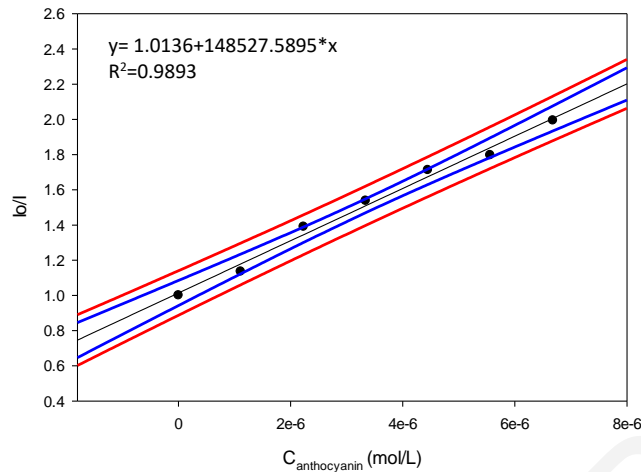
Σχήμα 6.20: Διάγραμμα Stern-Volmer απόσβεσης της BSA από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=4.

Στη βιβλιογραφία ορισμένες μελέτες διορθώνουν τα διαγράμματα S-V, λόγω παρουσίας του inner-filter effect, το οποίο αναφέρεται στην απορρόφηση φωτός στο μήκος κύματος διέγερσης ή εκπομπής από τις ενώσεις που υπάρχουν στο υπό μελέτη διάλυμα [Fonin et al (2014), Kumar et al (2019), Parker et al (1957), van de Weert et al (2011)]. Στην παρούσα διατριβή όλα τα στατικά φάσματα διορθώθηκαν για το inner-filter effect. Στο Σχήμα 6.21 παρουσιάζεται το διορθωμένο διάγραμμα Stern-Volmer και στον πίνακα 6.6 παρουσιάζονται οι σταθερές απόσβεσης S-V, έπειτα από υπολογισμούς για το διορθωμένο και μη διάγραμμα S-V. Οι σταθερές απόσβεσης ισούνται με την κλίση των διαγραμμάτων S-V (υποκεφάλαιο 4.1.2 Εξ.4.1). Όπως παρατηρούμε από τον πίνακα 6.6 οι σταθερές K_{sv} μειώνονται σημαντικά έπειτα από τη διόρθωση για το inner-filter effect, το οποίο υποδεικνύει τη σημαντικότητα αυτής της διόρθωσης.

Πίνακας 6.6: Τιμές K_{sv} , K_a , n του συστήματος BSA-ανθοκυανίνες pH=4.

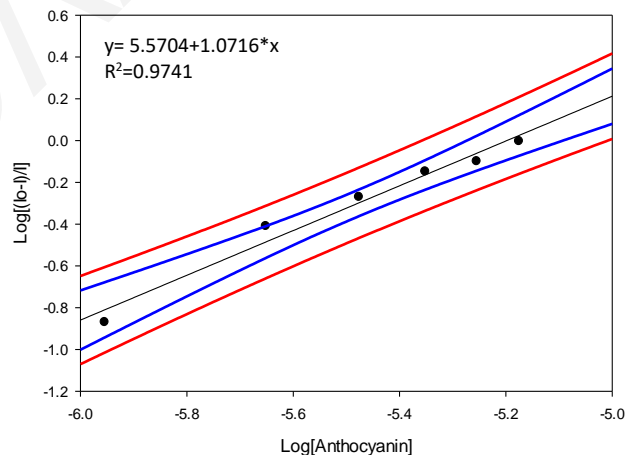
BSA-ανθοκυανίνες βατόμουρα	$K_{sv} (M^{-1}) \pm \Delta(K_{sv})$	K_a/M^{-1}	$\text{Log}K_a \pm \Delta(\text{Log}K_a)$	n
Διάγραμμα S-V (χωρίς διόρθωση)	250000 ± 23000	1.5×10^6	6.18 ± 0.88	1.15 ± 0.16
$\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ (χωρίς διόρθωση)	208000 ± 18000	1.9×10^5	5.28 ± 0.35	0.99 ± 0.06
$\Delta\lambda=50 \text{ nm}$ (χωρίς διόρθωση)	242000 ± 18000	7.8×10^5	5.90 ± 0.54	1.10 ± 0.10
Διορθωμένο διάγραμμα S-V (inner-filter effect)	148000 ± 18000	3.7×10^5	5.57 ± 1.33	1.07 ± 0.24
Μη γραμμική παλινδρόμηση (inner-filter effect)	148000 ± 18000	$(7.6 \pm 10.6) \times 10^4$		0.92 ± 0.26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



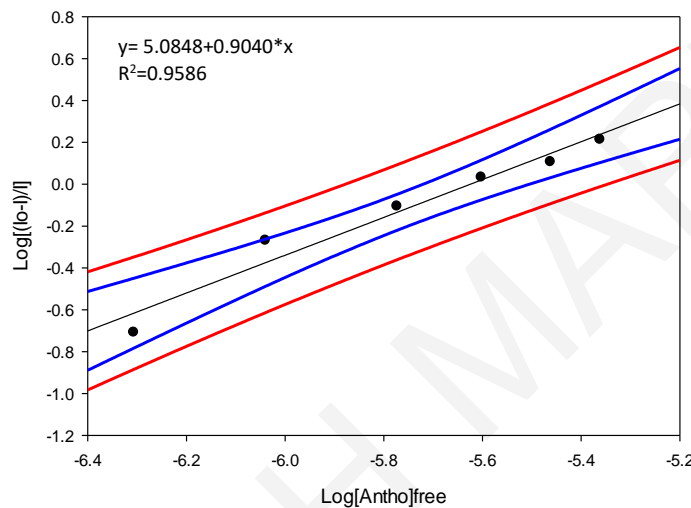
Σχήμα 6.21: Διορθωμένο διάγραμμα (για την εξάλειψη του inner-filter effect) Stern-Volmer απόσβεσης της BSA από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=4.

Η σταθερά πρόσδεσης K_a , και ο αριθμός θέσεων πρόσδεσης n , υπολογίστηκαν με βάση την τροποποιημένη εξίσωση Stern-Volmer (υποκεφάλαιο 4.1.2 Εξ. 4.2), μέσω κατασκευής λογαριθμικού διαγράμματος $[(F_0-F)/F]$ ως προς $[Q]_{\text{tot}}$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.6. Το διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.22. Ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης ήταν κοντά στο 1, το οποίο έδειξε ότι η πρόσδεση μεταξύ της ανθοκυανίνης και της BSA ήταν 1:1 και οι σταθερές πρόσδεσης ήταν κοντά στην τιμή 10^5 L/mol. Αυτά τα δεδομένα έδειξαν ότι η ανθοκυανίνη μπορεί να συνδεθεί με μέτρια ένταση με την πρωτεΐνη βόειου ορού.



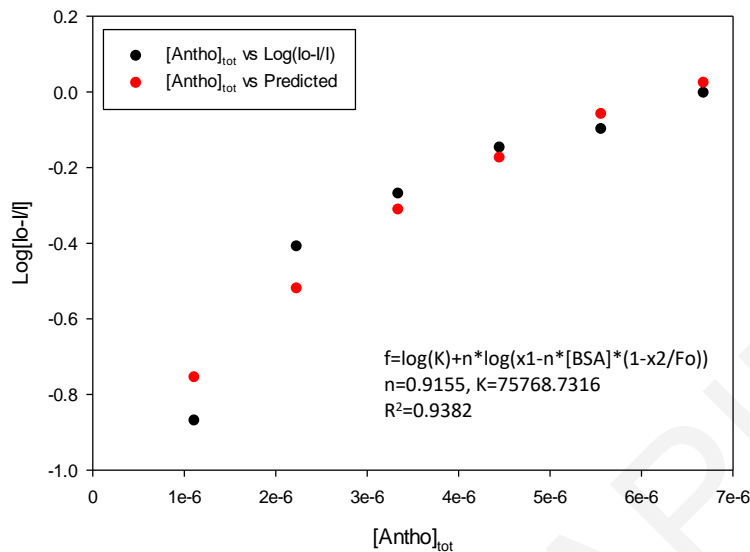
Σχήμα 6.22: Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[(I_0-I)/I_0]$ έναντι της συνολικής συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε pH=4.

Το λογαριθμικό διάγραμμα S-V που παρουσιάστηκε στο Σχήμα 6.22, κατασκευάζεται με βάση την εξίσωση 4.2 (τμήμα 4.1.2), η οποία ουσιαστικά είναι προσέγγιση. Συγκεκριμένα γίνονται οι παραδοχές ότι το σύμπλοκο δεν φθορίζει καθόλου και ότι $[Q]_{free} \approx [Q]_{tot}$. Για να ελέγξουμε αν η τελευταία παραδοχή ισχύει κατασκευάστηκε αντίστοιχο λογαριθμικό διάγραμμα ως προς τη συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης (Σχήμα 6.23). Η συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.3 (τμήμα 4.1.2) και θέτοντας $n=1$.



Σχήμα 6.23: Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[(I_0-I)/I_0]$ έναντι της ελεύθερης συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε $pH=4$.

Η σταθερά πρόσδεσης που προκύπτει από τη συγκεκριμένη ανάλυση είναι $1.22 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ($\text{Log}K: 5.08 \pm 1.51$), η οποία είναι 3 φορές μικρότερη από την αντίστοιχη σταθερά που υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την παραδοχή ότι $[Q]=[Q]_{tot}$. Αυτό δείχνει ότι στο συγκεκριμένο σύστημα μελέτης δεν ισχύει αυτή η προσέγγιση. Επομένως, για έναν πιο σωστό υπολογισμό των σταθερών πρόσδεσης και του αριθμού των θέσεων πρόσδεσης κατασκευάστηκαν διαγράμματα $\text{Log}[(I_0-I)/I]$ ως προς την συνολική συγκέντρωση της ανθοκυανίνης, χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση με βάση τις εξισώσεις 4.2 και 4.3 (Σχήμα 6.24).



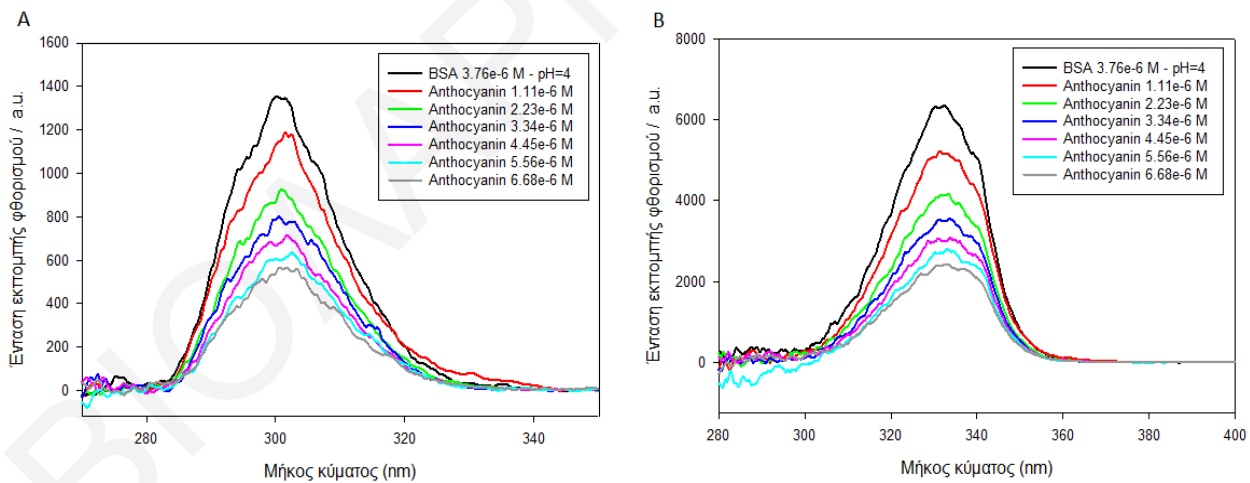
Σχήμα 6.24: Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[(I_0-I)/I_0]$ έναντι της συνολικής συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε pH=4, χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση.

Τα αποτελέσματα της μη γραμμικής παλινδρόμησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.6. Παρατηρούμε ότι η σταθερά πρόσδεσης που υπολογίστηκε χωρίς κάποια παραδοχή είναι σχεδόν 5 φορές μικρότερη από την σταθερά που υπολογίστηκε από το λογαριθμικό διάγραμμα S-V ως προς το λογάριθμο της συνολικής συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης και περίπου 1.5 φορά μικρότερη από αυτήν που υπολογίστηκε από το αντίστοιχο λογαριθμικό διάγραμμα S-V ως προς το λογάριθμο της ελεύθερης συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης.

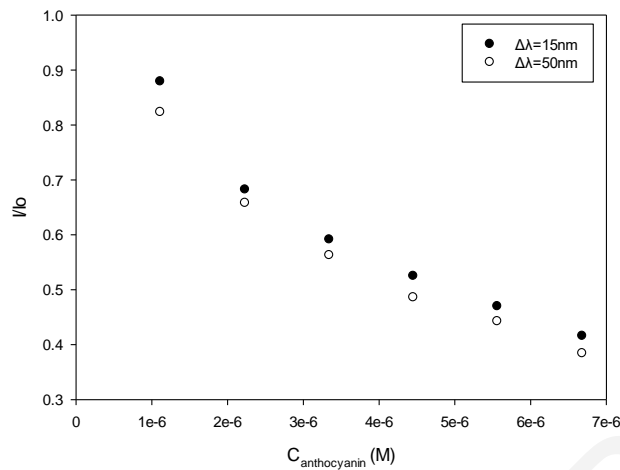
6.5.4.1.2 Σύγχρονα φάσματα φθορισμού

Τα σύγχρονα φάσματα φθορισμού αντανakλούν την επίδραση των υποκαταστατών στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών. Τα σύγχρονα φάσματα φθορισμού των πρωτεϊνών στα μήκη κύματος μέγιστης εκπομπής σχετίζονται με την υδροφοβικότητα της περιοχής όπου βρίσκεται το φθοροφόρο. Όταν η υδροφοβικότητα μειώνεται, το μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής θα παρουσιάσει ερυθρή μετατόπιση. Αντίθετα, όταν αυξάνεται η υδροφοβικότητα θα παρουσιάσει κυανή μετατόπιση.

Τα σύγχρονα φάσματα φθορισμού σε $\Delta\lambda = 15$ nm αντανακλούν τα κατάλοιπα τυροσίνης της BSA στο μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής, και τα σύγχρονα φάσματα φθορισμού σε $\Delta\lambda=50$ nm αντανακλούν το μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής των κατάλοιπων τρυπτοφάνης. Στο Σχήμα 6.25 παρουσιάζονται τα σύγχρονα φάσματα φθορισμού της BSA κατά την προσθήκη διαφόρων ποσοτήτων ανθοκυανίνης. Το μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής δεν αλλάζει αισθητά (~ 1 -2nm). Αυτό δείχνει ότι η μεταβολή υδροφοβικότητας στο περιβάλλον των καταλοίπων τρυπτοφάνης και τυροσίνης είναι ελάχιστη. Στον πίνακα 6.6 παρουσιάζονται οι σταθερές απόσβεσης, πρόσδεσης και ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης για τα φάσματα σύγχρονου φθορισμού της BSA (χωρίς διόρθωση για το inner-filter effect). Οι σταθερές S-V, βλέπουμε ότι έχουν παραπλήσιες τιμές για το φάσμα φθορισμού της BSA και για το σύγχρονο φθορισμό σε $\Delta\lambda=15$ και 50 nm. Επίσης με την κατασκευή διαγράμματος I/I_0 ως προς τη συγκέντρωση ανθοκυανίνης (Σχήμα 6.26) για τα δύο φάσματα σύγχρονου φθορισμού βλέπουμε ότι η συμπεριφορά της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης είναι παρόμοια, γεγονός που επιβεβαιώνει το συμπέρασμα ότι αποσβένονται και τα δύο αυτά κατάλοιπα με τον ίδιο βαθμό παρουσία της ανθοκυανίνης.



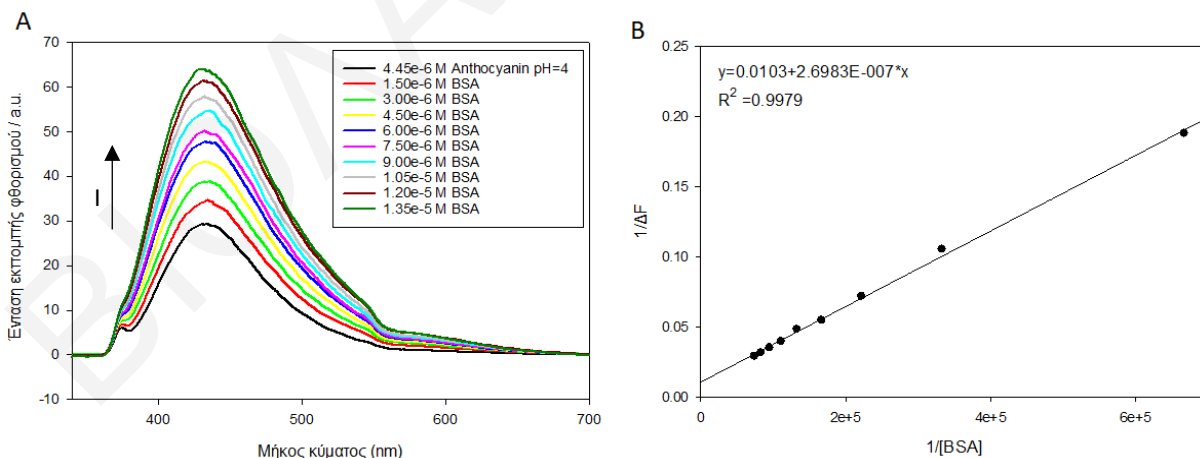
Σχήμα 6.25: Φάσματα σύγχρονου φθορισμού της BSA (σταθερή συγκέντρωση BSA 3.76×10^{-6} M) απουσία και παρουσία ανθοκυανινών : (A) $\Delta\lambda=15$ nm, (B) $\Delta\lambda = 50$ nm σε pH=4.



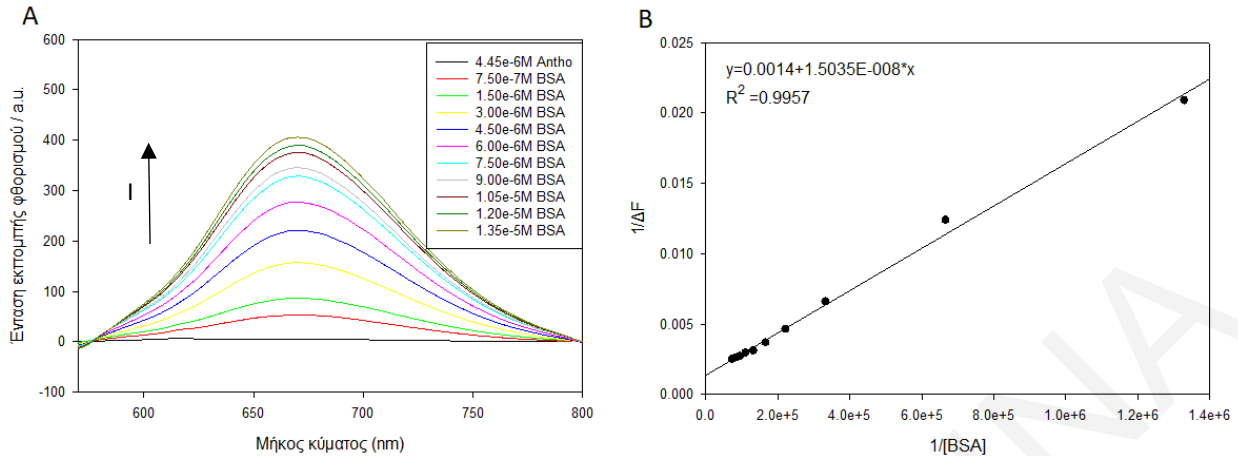
Σχήμα 6.26: Διάγραμματα I/I_0 στο λ_{max} ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης για $\Delta\lambda=15$ και $\Delta\lambda=50$ nm.

6.5.4.2 Μελέτη φθορισμού ανθοκυανίνης στην παρουσία αλβουμίνης βόειου ορού

Πιο κάτω παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού της ανθοκυανίνης στην παρουσία BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε $\text{pH}=4$, που καταγράφηκαν με διέγερση στα 330 nm (σχήμα 6.27 (A)) και 560 nm (σχήμα 6.28 (A)). Χρησιμοποιήθηκε σταθερή συγκέντρωση ανθοκυανίνης 4.45×10^{-6} M και συγκεντρώσεις BSA από 1.5×10^{-6} M μέχρι 1.35×10^{-5} M. Στην παρουσία των πρωτεϊνών δεν πραγματοποιήθηκε διέγερση της ανθοκυανίνης στα 260 nm, διότι οι πρωτεΐνες διεγείρονται στα 280 nm.



Σχήμα 6.27: (A) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε $\text{pH}=4$ (μήκος κύματος διέγερσης: 330 nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5 nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5 nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 380 nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300. (B) Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε $\text{pH}=4$ παρουσία BSA (διέγερση: 330 nm).



Σχήμα 6.28: (A) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 560 nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5 nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5 nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300. (B) Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4 παρουσία BSA (διέγερση: 560 nm).

Από τα φάσματα φθορισμού της ανθοκυανίνης στα δύο μήκη κύματος διέγερσης, παρατηρείται ενίσχυση του ενδογενούς φθορισμού της ανθοκυανίνης, αντί της απόσβεσης που παρατηρήθηκε στην περίπτωση μελέτης φθορισμού της πρωτεΐνης. Σε αυτή την περίπτωση η περαιτέρω ανάλυση δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαγράμματα Stern-Volmer. Ένας τρόπος μοντελοποίησης τέτοιων δεδομένων βασίζεται στην εξίσωση Benesi Hildebrand (B-H), η οποία ισχύει πραγματικά για σύνδεση 1:1 (τμήμα 4.1.4 Εξ. 4.8). Η εξίσωση B-H προβλέπει τις σταθερές πρόσδεσης (K) των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο μορίων, του φθοροφόρου και του υποκαταστάτη. Στα σχήματα 6.29 (B) και 6.30 (B) παρουσιάζονται τα διαγράμματα B-H της ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία της BSA με μήκη κύματος διέγερσης 330 nm και 560 nm αντίστοιχα. Τα δύο διαγράμματα είναι γραμμικά με αποτέμνουσα ίση με $1/\Delta F_{\max}$ και σταθερά πρόσδεσης ίση με τον λόγο αποτέμνουσα/κλίση του διαγράμματος. Η σταθερά πρόσδεσης K , έπειτα από υπολογισμούς για την αλληλεπίδραση της ανθοκυανίνης από βατόμουρα με την BSA βρέθηκε ίση με $38200 \pm 11400 \text{ M}^{-1}$ και $93100 \pm 31000 \text{ M}^{-1}$ για τη διέγερση στα 330 nm και 560 nm αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι οι δύο σταθερές πρόσδεσης διαφέρουν σημαντικά. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι οι ενώσεις των ανθοκυανινών που διεγείρονται στα δύο διαφορετικά μήκη κύματος είναι διαφορετικές. Επίσης ο ενδογενής φθορισμός της ανθοκυανίνης με διέγερση στα 560 nm απουσία της BSA έχει πολύ χαμηλή ένταση και με σταδιακή προσθήκη της BSA ο φθορισμός της ανθοκυανίνης αυξάνεται δραματικά (20 φορές)

υποδεικνύοντας ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τις ενώσεις που διεγείρονται στο συγκεκριμένο μήκος κύματος σε σχέση με τη διέγερση στα 330 nm όπου με προσθήκη ίδιας ποσότητας BSA η ένταση φθορισμού ενισχύεται μόνο 2 φορές.

6.5.4.3 Σύγκριση ανθοκυανινών από βατόμουρα με ανθοκυανίνες από κόκκινο λάχανο

6.5.4.3.1 Αλληλεπίδραση ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο με την BSA σε pH=4

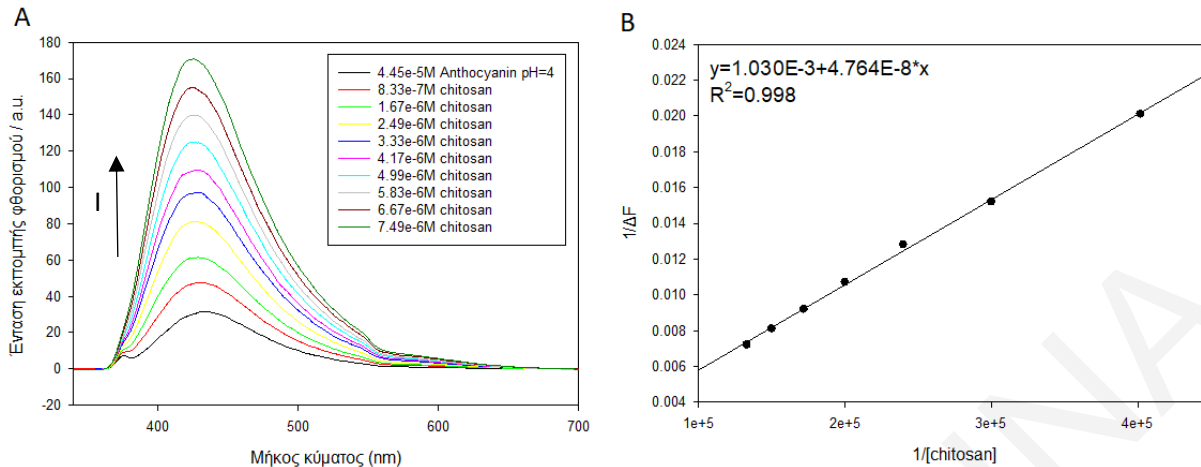
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στα πειράματα μελέτης αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών με τα διάφορα βιομόρια, ως πηγή ανθοκυανίνης χρησιμοποιήθηκαν τα βατόμουρα και όχι το κόκκινο λάχανο λόγω της πολυπλοκότητάς του μίγματος ανθοκυανινών που προκύπτουν από το τελευταίο. Ωστόσο πραγματοποιήθηκε και ένα πείραμα μέτρησης φθορισμού των ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο στην παρουσία BSA για σύγκριση των δύο πηγών απομόνωσης. Τα αποτελέσματα του πειράματος μελέτης φθορισμού της BSA παρουσία της ανθοκυανίνης (κόκκινο λάχανο και βατόμουρα) και μελέτης φθορισμού της ανθοκυανίνης των δύο πηγών παρουσία της πρωτεΐνης παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.7. Οι δύο πηγές ανθοκυανινών παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά στο φθορισμό. Από τα διαγράμματα απόσβεσης της BSA παρατηρούμε ότι η σταθερά απόσβεσης για τις ανθοκυανίνες Λ είναι μικρότερη από αυτή για τις ανθοκυανίνες Β, όμως η σταθερά πρόσδεσης είναι μεγαλύτερη. Όσο αφορά την ενίσχυση φθορισμού, με ανάλυση μέσω κατασκευής διαγραμμάτων B-H, οι ανθοκυανίνες Λ παρουσίασαν 10 φορές μικρότερη σταθερά πρόσδεσης στη διέγερση των 330 nm και λίγο μικρότερη στη διέγερση των 560 nm. Αυτό ενισχύει την άποψη ότι τα αποτελέσματα στα δύο μήκη κύματος διέγερσης αφορούν διαφορετικά μόρια στο μίγμα των ανθοκυανινών.

Πίνακας 6.7: Τιμές K_{sv} , K , n του συστήματος BSA-ανθοκυανίνες Λ και συστήματος BSA-ανθοκυανίνες B (χωρίς διόρθωση inner-filter effect).

Ανθοκυανίνες από βατόμουρα				
Απόσβεση φθορισμού - Stern-Volmer				
Πρωτεΐνες	$K_{sv} (M^{-1}) \pm \Delta(K_{sv})$	K/M^{-1}	$\text{Log}K \pm \Delta(\text{Log}K)$	n
BSA (pH=4)	250000 ± 23000 $(25 \pm 2.3) \times 10^4$	1.5×10^6	6.18 ± 0.88	1.15 ± 0.16
Ενίσχυση φθορισμού - Benesi-Hildebrand				
Πρωτεΐνες		$K \pm \delta K (M^{-1})$		
BSA (pH=4) μ.δ: 330 nm		38200 ± 11400		
BSA (pH=4) μ.δ: 560 nm		93100 ± 31000		
Ανθοκυανίνες από κόκκινο λάχανο				
Απόσβεση φθορισμού-Stern-Volmer				
Πρωτεΐνες	$K_{sv} (M^{-1}) \pm \Delta(K_{sv})$	K/M^{-1}	$\text{Log}K \pm \Delta(\text{Log}K)$	n
BSA (pH=4)	180000 ± 8000 $(18 \pm 0.8) \times 10^4$	3.8×10^6	6.58 ± 0.71	1.26 ± 0.13
Ενίσχυση φθορισμού - Benesi-Hildebrand				
Πρωτεΐνες		$K \pm \delta K (M^{-1})$		
BSA (pH=4) μ.δ: 330 nm		4000 ± 46000		
BSA (pH=4) μ.δ: 560 nm		79000 ± 22000		

6.5.4.4 Μελέτη φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία χιτοζάνης

Πραγματοποιήθηκε μελέτη φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία χιτοζάνης. Η χιτοζάνη ως πολυσακχαρίτης δεν παρουσιάζει φθορισμό. Πιο κάτω παρουσιάζονται τα φάσματα εκπομπής φθορισμού της ανθοκυανίνης στην παρουσία χιτοζάνης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4, που καταγράφηκαν με διέγερση στα 330 nm (Σχήμα 6.29(A)). Χρησιμοποιήθηκε σταθερή συγκέντρωση ανθοκυανίνης 4.45×10^{-6} M και συγκεντρώσεις χιτοζάνης από 8.33×10^{-7} M μέχρι 7.49×10^{-6} M.



Σχήμα 6.29: (A) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία χιτοζάνης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 330 nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5 nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5 nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300. (B) Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4 παρουσία χιτοζάνης (διέγερση: 330 nm).

Στα φάσματα φθορισμού της ανθοκυανίνης με διέγερση στα 330 nm, παρατηρήθηκε ενίσχυση του ενδογενούς φθορισμού της ανθοκυανίνης. Επομένως για την ανάλυση των φασμάτων φθορισμού κατασκευάστηκε διάγραμμα B-H. Στο Σχήμα 6.29 (B) παρουσιάζεται το διάγραμμα B-H της ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία της χιτοζάνης στο μήκος κύματος διέγερσης 330 nm. Το μοριακό βάρος της χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν 120 000 g/mol. Το διάγραμμα B-H παρουσιάζει καλή γραμμικότητα ($R^2=0.998$). Η σταθερά πρόσδεσης K είναι $20900 \pm 11700 \text{ M}^{-1}$. Τα φάσματα φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία χιτοζάνης με διέγερση στα 260 nm και 560 nm, είχαν περίπου σταθερή ένταση κατά την προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης χιτοζάνης, δεν παρατηρήθηκε απόσβεση ή ενίσχυση φθορισμού, και επομένως δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση αυτών των φασμάτων. Αυτό υποδεικνύει ότι οι δύο ουσίες του μίγματος ανθοκυανινών που διεγείρονται στα συγκεκριμένα μήκη κύματος δεν αλληλεπιδρούν με το μόριο της χιτοζάνης.

6.5.4.6 Σύνοψη αποτελεσμάτων των πειραμάτων φθορισμού

Στον Πίνακα 6.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων μελέτης φθορισμού των πρωτεϊνών παρουσία της ανθοκυανίνης από βατόμουρα έπειτα από ανάλυση μέσω διαγραμμάτων S-V. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων φθορισμού της WPI και

του καζεϊνικού νατρίου παρουσία ανθοκυανίνης πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή διαγραμμάτων S-V, όπως παρουσιάστηκε λεπτομερώς προηγουμένως για την BSA. Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού αυτών των δύο πρωτεϊνών παρουσία ανθοκυανίνης διορθώθηκαν επίσης για το inner-filter effect.

Πίνακας 6.8: Σύνοψη πειραματικών αποτελεσμάτων από διαγράμματα Stern-Volmer για αλληλεπίδραση ανθοκυανίνης από βατόμουρα με πρωτεΐνες με διέγερση σε μήκος κύματος 280 nm (διόρθωση για inner-filter effect).

Πρωτεΐνες	$K_{sv} (M^{-1}) \pm \Delta(K_{sv})$	K/M^{-1}	$\text{LogK} \pm \Delta(\text{LogK})$	n
BSA pH=4				
Λογαριθμικό διάγραμμα S-V	148000 ± 18000 $(15 \pm 1.8) \times 10^4$	3.7×10^5	5.57 ± 1.33	1.07 ± 0.24
Μη γραμμική παλινδρόμηση		$(7.6 \pm 10.6) \times 10^4$		0.92 ± 0.26
BSA pH=6				
Λογαριθμικό διάγραμμα S-V	168000 ± 13000 $(17 \pm 1.3) \times 10^4$	4.7×10^5	5.67 ± 0.43	1.09 ± 0.08
Μη γραμμική παλινδρόμηση		$(1.2 \pm 11.7) \times 10^5$		0.95 ± 0.07
WPI pH=4				
Λογαριθμικό διάγραμμα S-V	56000 ± 5000 $(56 \pm 5) \times 10^3$	9.4×10^4	4.98 ± 0.49	1.04 ± 0.09
Μη γραμμική παλινδρόμηση		$(7.9 \pm 11.3) \times 10^4$		1.01 ± 0.11
WPI pH=6				
Λογαριθμικό διάγραμμα S-V	56000 ± 5000 $(56 \pm 5) \times 10^3$	1.1×10^5	5.05 ± 1.16	1.05 ± 0.21
Μη γραμμική παλινδρόμηση		$(7.1 \pm 2.6) \times 10^4$		0.99 ± 0.27
Καζεϊνικό νάτριο pH=7				
Λογαριθμικό διάγραμμα S-V	150000 ± 20000 $(15 \pm 2.0) \times 10^4$	7.2×10^4	4.86 ± 0.78	0.93 ± 0.14
Μη γραμμική παλινδρόμηση		922 ± 669		0.54 ± 0.04

Από τον Πίνακα 6.8 με βάση τη σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer, φαίνεται ότι οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με την BSA και το καζεϊνικό νάτριο και μικρότερη αλληλεπίδραση με την WPI. Από τα πειράματα με την BSA και την WPI σε δύο διαφορετικά pH 4 και 6, παρατηρούμε ότι οι τιμές των σταθερών S-V είναι παραπλήσιες. Αυτό δείχνει ότι ίσως το φορτίο της ανθοκυανίνης παραμένει ίδιο στα δύο αυτά pH, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται περαιτέρω και από τη μελέτη αλλαγής του χρώματος της ανθοκυανίνης ανάλογα με το pH όπου

το ερυθρό χρώμα των ανθοκυανινών παραμένει μέχρι τιμή pH ~6.5 – 7. Επίσης στη βιβλιογραφία έχει βρεθεί ότι το pK_a των ανθοκυανινών (η συγκεκριμένη μελέτη αναφέρεται στις ανθοκυανίνες από κόκκινο λάχανο) είναι 6.8-7.2 [Chigurupati et al (2002)], που σημαίνει ότι σε pH κάτω από αυτή την τιμή η κυανιδίνη έχει θετικό φορτίο. Οι μελέτες των ανθοκυανινών δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν σε αλκαλικά pH, όπου οι ανθοκυανίνες είναι ασταθείς και αποικοδομούνται. Όσο αφορά τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης n που προκύπτει από τα λογαριθμικά διαγράμματα αυτός ήταν κοντά στο 1, το οποίο έδειξε ότι η πρόσδεση μεταξύ της ανθοκυανίνης και των τριών πρωτεϊνών ακολουθεί στοιχειομετρία 1:1, δηλαδή κατά μέσο όρο ένα μόριο ανθοκυανίνης αλληλεπιδρά με ένα μόριο πρωτεΐνης. Οι σταθερές πρόσδεσης με βάση το λογαριθμικό διάγραμμα S-V ήταν της τάξης 10^5 L/mol. Η ισχυρή πρόσδεση υποκαταστάτη σε ενεργό κέντρο ενζύμου οδηγεί σε τιμές σταθερών πρόσδεσης της τάξης 10^6 - 10^9 M⁻¹. Οι σταθερές πρόσδεσης που υπολογίστηκαν από τα διαγράμματα $\text{Log}[(I_0-I)/I]$ ως προς τη συνολική συγκέντρωση της ανθοκυανίνης με μη γραμμική παλινδρόμηση σε όλα τα συστήματα είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες τιμές που υπολογίστηκαν από τα διαγράμματα $\text{log}[(I_0-I)/I]$ ως προς το λογάριθμο της συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης. Εντύπωση δημιουργεί η περίπτωση του καζεϊνικού νατρίου, όπου η σταθερά πρόσδεσης που λαμβάνεται από τη μη γραμμική παλινδρόμηση είναι περίπου 80 φορές μικρότερη και ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης δεν είναι ίσος με 1. Το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι το ίδιο με τις άλλες δύο πρωτεΐνες που μελετήθηκαν. Θα ήταν χρήσιμο να μελετηθεί η αλληλεπίδραση αυτή περαιτέρω μελλοντικά. Επίσης για όλα τα συστήματα ελέγχθηκε η παραδοχή $[Q] \approx [Q]_{\text{tot}}$, κατασκευάζοντας λογαριθμικά διαγράμματα S-V ως προς τη συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης. Οι παρατηρήσεις είναι οι ίδιες όπως στην περίπτωση της BSA. Όλα αυτά τα δεδομένα έδειξαν ότι οι ανθοκυανίνες μπορούν να προσδεθούν με μέτρια ένταση στις τρεις πρωτεΐνες.

Σε pH=4 οι ανθοκυανίνες, η BSA ($pI=4.8$) και η WPI ($pI=5.2$) είναι θετικά φορτισμένες. Συνεπώς η ελκτική αλληλεπίδραση που παρατηρείται μεταξύ των μορίων πρέπει να οφείλεται σε δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται. Σε pH=6 οι ανθοκυανίνες έχουν συνολικά μηδενικό ή θετικό φορτίο, ενώ η BSA και η WPI έχουν αρνητικό φορτίο. Σε pH=7 οι ανθοκυανίνες είναι ουδέτερες και το καζεϊνικό νάτριο ($pI=5$) είναι αρνητικά φορτισμένο. Οι σταθερές πρόσδεσης K που υπολογίστηκαν βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους. Αυτό υποδεικνύει ότι υπερισχύουν

πάντα οι ίδιες δυνάμεις, άρα τελικά συμπεραίνουμε ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δεν είναι τόσο σημαντικές.

Τα αποτελέσματα των φασμάτων σύγχρονου φθορισμού της WPI και του καζεϊνικού νατρίου στην παρουσία ανθοκυανινών είναι παρόμοια με την περίπτωση της BSA. Τα μήκη κύματος μέγιστης εκπομπής δεν μετατοπίστηκαν αισθητά (~1-2 nm) και αυτό έδειξε ότι η μεταβολή υδροφοβικότητας στο περιβάλλον των καταλοίπων τρυπτοφάνης και τυροσίνης ήταν ελάχιστη. Επίσης οι σταθερές απόσβεσης, πρόσδεσης και ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης για τα φάσματα σύγχρονου φθορισμού των πρωτεϊνών ήταν παρόμοιες με τις τιμές που προέκυψαν από τα κανονικά φάσματα εκπομπής, υποδεικνύοντας ότι και τα δύο κατάλοιπα αποσβένονται στον ίδιο βαθμό παρουσία ανθοκυανίνης.

Στον Πίνακα 6.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων φθορισμού των ανθοκυανινών παρουσία των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών όπως προέκυψαν μετά από ανάλυση μέσω διαγραμμάτων Benesi-Hildebrand.

Πίνακας 6.9: Σύνοψη πειραματικών αποτελεσμάτων από διαγράμματα Benesi-Hildebrand για αλληλεπίδραση ανθοκυανίνης από βατόμουρα με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες.

Πρωτεΐνες	K ± δK (M⁻¹)
BSA (pH=4) μ.δ: 330 nm	38200 ± 11400
BSA (pH=4) μ.δ: 560 nm	93100 ± 31000
BSA (pH=6) μ.δ: 330 nm	13200 ± 4700
BSA (pH=6) μ.δ: 560 nm	28500 ± 6800
WPI (pH=4) μ.δ: 330 nm	8630 ± 3070
WPI (pH=4) μ.δ: 560 nm	66600 ± 9300
WPI (pH=6) μ.δ: 330 nm	19300 ± 10200
WPI (pH=6) μ.δ: 560 nm	48800 ± 3500
Καζεϊνικό νάτριο (pH=7) μ.δ: 330 nm	71000 ± 52000
Καζεϊνικό νάτριο (pH=7) μ.δ: 560 nm	9000 ± 11000
Πολυηλεκτρολύτες (MB_{μονομερούς})	K ± δK (M⁻¹)
Θεική χονδροϊτίνη (pH=3) μ.δ: 330nm	130 ± 50
Χιτοζάνη (pH=4) μ.δ: 330 nm	27 ± 15
Πηκτίνη (pH=3) μ.δ: 330 nm	2.43 ± 94.50
Αλγινικό νάτριο (pH=4) μ.δ: 330 nm	2.06 ± 1.67
Πολυηλεκτρολύτες (MB_{πολυμερούς})	K ± δK (M⁻¹)
Χιτοζάνη (pH=4) μ.δ: 330 nm	21600 ± 11000

Από τον Πίνακα 6.9 συγκρίνοντας τις BSA και WPI, φαίνεται ότι σε pH=4 οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με την BSA και στα δύο μήκη κύματος διέγερσης, ενώ σε pH=6 παρουσιάζουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με την WPI. Στα πειράματα μελέτης φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία BSA και WPI παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ του υποκαταστάτη και του φθοροφόρου στο μήκος κύματος διέγερσης των 560 nm. Η συγκεκριμένη κορυφή εκπομπής, έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι αντιστοιχεί στις ανθοκυανιδίνες, και στην περίπτωση των βατόμουρων αντιστοιχεί στην κυανιδίνη. Στην περίπτωση του καζεϊνικού νατρίου (pH=7) λήφθηκαν τιμές σταθερών πρόσδεσης με αρκετά μεγάλα σφάλματα με μεγαλύτερη τιμή για τη διέγερση στα 330 nm. Οι τιμές K δεν συμφωνούν για τις διεγέρσεις στα 330 και 560 nm, κάτι που μας λέει ότι διεγείρονται διαφορετικά μόρια, που αλληλεπιδρούν διαφορετικά με τις πρωτεΐνες.

Η μελέτη των μεταβολών του φθορισμού των ανθοκυανινών παρουσία πολυσακχαριτών δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι δεν γνωρίζουμε τα ακριβή μοριακά βάρη των πολυμερών, εκτός από την περίπτωση της χιτοζάνης. Οι αναφερόμενες σταθερές πρόσδεσης στη βάση συγκέντρωσης μονομερών έχουν μικρές τιμές και μεγάλα σφάλματα και δεν μπορούν να συγκριθούν με τις αντίστοιχες τιμές αλληλεπίδρασης ανθοκυανινών με πρωτεΐνες. Στα φάσματα φθορισμού της ανθοκυανίνης παρουσία πολυσακχαριτών με διέγερση στα 330 nm παρατηρήθηκε ενίσχυση του ενδογενούς φθορισμού των ανθοκυανινών. Με διέγερση στα 260 nm και 560 nm, τα φάσματα δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά κατά την προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης πολυσακχαριτών, εκτός από την περίπτωση της θειικής χονδροϊτίνης και του αλγινικού νατρίου όπου παρατηρήθηκε μικρή μείωση στην ένταση του φθορισμού (απόσβεση). Ωστόσο δεν έγινε επιτυχής ανάλυση αυτών των δεδομένων και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι δεν γνωρίζουμε το ακριβές μοριακό βάρος των πολυσακχαριτών και έτσι οι προκύπτουσες σταθερές S-V δεν έχουν πολύ νόημα και δεν μπορούν να συγκριθούν με αυτές που προκύπτουν από τις πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα γενικά συνιστούν περαιτέρω απόδειξη ότι στα διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης υπάρχουν τρεις τουλάχιστον ουσίες από το μίγμα των ανθοκυανινών που αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο με τα μόρια των πολυσακχαριτών. Μεταξύ των πολυσακχαριτών χιτοζάνης, πηκτίνης, αλγινικού νατρίου και θειικής χονδροϊτίνης τη μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με τις ανθοκυανίνες παρουσιάζει η τελευταία. Η χιτοζάνη

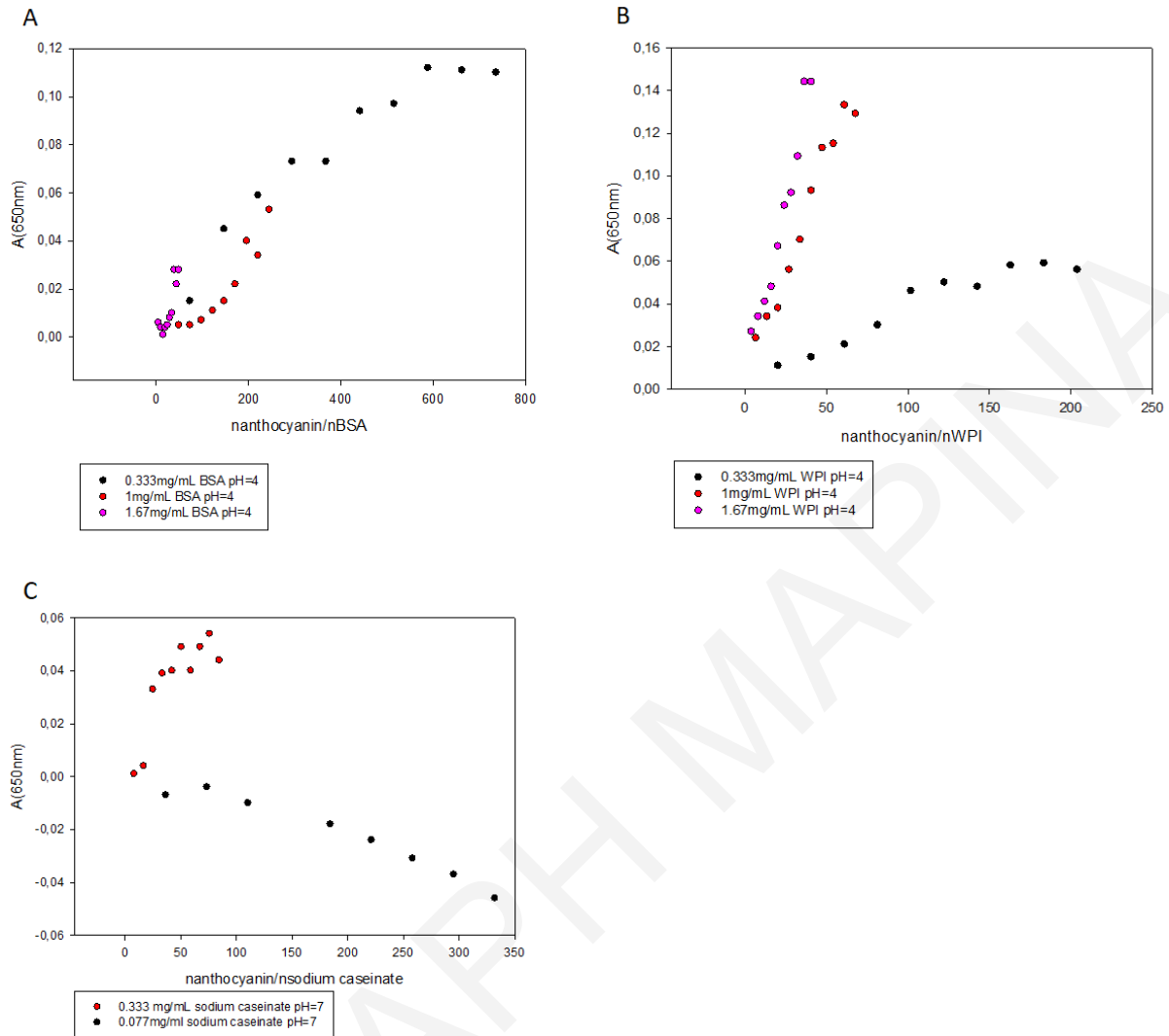
($pK_a=6.3$) σε $pH=4$ έχει θετικό φορτίο, η πηκτίνη σε $pH=3$ ($pK_a=3.5$) έχει θετικό φορτίο ενώ η θειική χονδροϊτίνη ($pK_a=1.5-2$) σε $pH=3$ και το αλγινικό νάτριο ($pK_a=3.2$) σε $pH=4$ έχουν αρνητικό φορτίο. Άρα η ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη θειική χονδροϊτίνη ίσως οφείλεται στις ισχυρότερες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, αφού οι ανθοκυανίνες σε $pH=3$ βρίσκονται υπό τη μορφή του κατιόντος φλαβυλίου (θετικό φορτίο). Ωστόσο για περαιτέρω μελέτη των αλληλεπιδράσεων με άλλες μεθόδους επιλέχθηκε η χιτοζάνη που χρησιμοποιείται περισσότερο ως συστατικό στα τοιχώματα των πολυστρωματικών γαλακτωμάτων.

Τα διαγράμματα Benesi-Hildebrand έχουν κάποιους περιορισμούς. Αρχικά ισχύουν για πρόσδεση 1:1 μεταξύ δύο μορίων και επίσης οι σταθερές πρόσδεσης που προκύπτουν από τους υπολογισμούς έχουν πολύ μεγάλα σφάλματα. Ωστόσο είναι από τις ελάχιστες μεθόδους που υπάρχουν για την ανάλυση πειραμάτων ενίσχυσης φθορισμού.

6.6 Θολερότητα

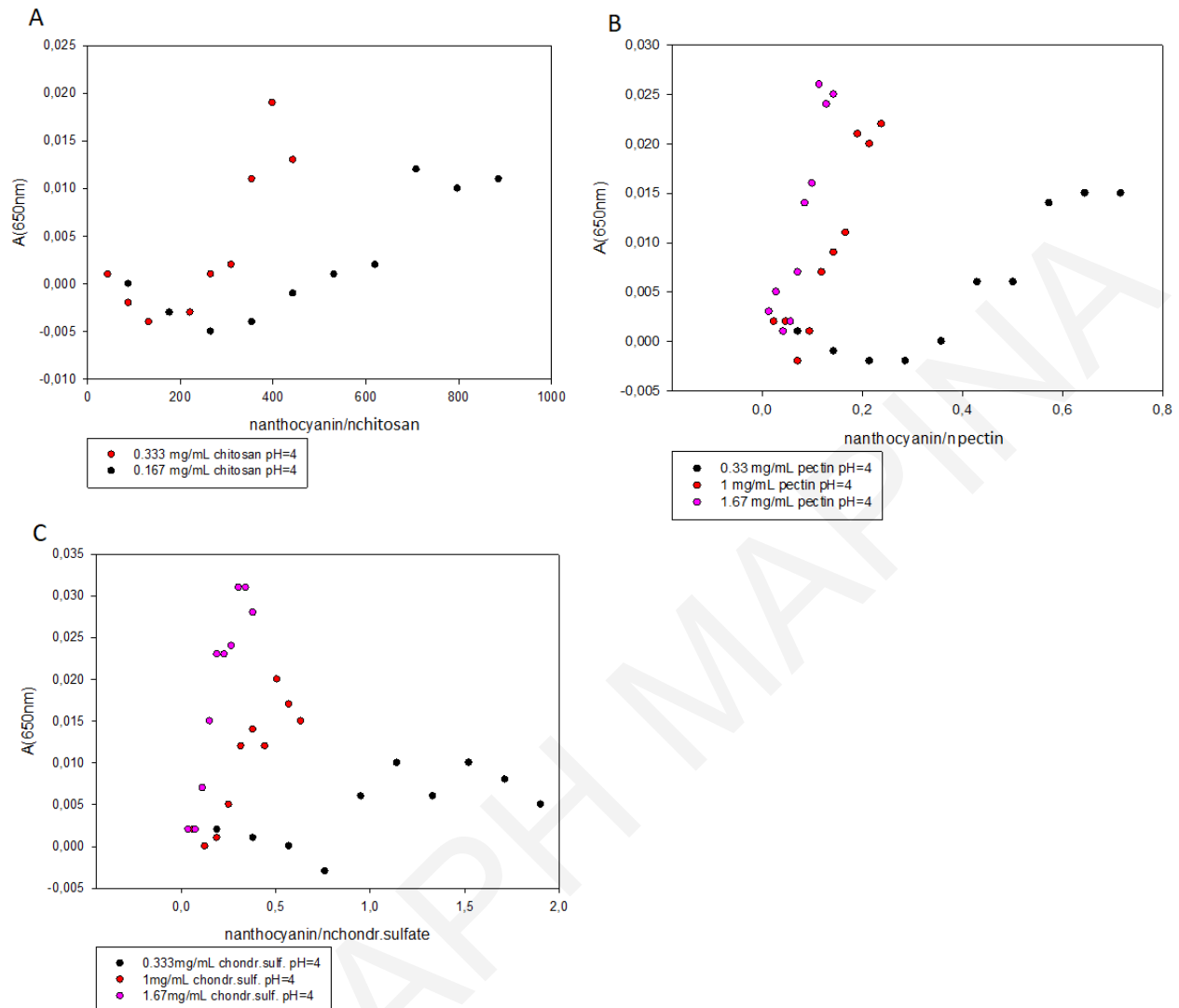
Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις θολερότητας διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών ή των πολυσακχαριτών και αλλάζοντας τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης. Αυτές οι μετρήσεις καθορίζουν τα εύρη συγκεντρώσεων που θα χρησιμοποιηθούν σε πειράματα διαπίδυσης και ITC, όπου η σκέδαση που προκαλείται από τη συσσωμάτωση μπορεί να επηρεάσει τις μετρήσεις. Στο Σχήμα 6.30 η θολερότητα στα 650 nm απεικονίζεται ως συνάρτηση της γραμμομοριακής αναλογίας ανθοκυανίνης προς πρωτεΐνη για διαφορετικές τιμές συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε διάλυμα $pH=4$ και αντίστοιχα στο Σχήμα 6.31 παρουσιάζεται η θολερότητα για τους πολυσακχαρίτες. Ο άξονας y είναι στην πραγματικότητα η ποσότητα $\Delta A_{650}=A_{650}([Antho],[P])-A_{650}(0,[P])$ για οποιαδήποτε συγκέντρωση πρωτεΐνης $[P]$ (A : απορρόφηση). Αυτή η ποσότητα θα είναι ίση με το μηδέν, εκτός εάν η παρουσία ανθοκυανίνης προκαλεί μετρήσιμη αύξηση της θολερότητας σε ένα κατά τα άλλα διαυγές διάλυμα πρωτεΐνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Σχήμα 6.30: Διαγράμματα απορρόφησης στα 650 nm ως προς το λόγο (A) moles ανθοκυανίνης/moles BSA σε pH=4, (B) moles ανθοκυανίνης/moles WPI σε pH=4 και (C) moles ανθοκυανίνης/moles καζεϊνικό νάτριο σε pH=7.

Όλα τα διαγράμματα θολερότητας που παρουσιάζονται στο σχήμα 6.30 και 6.33 είναι διορθωμένα ως προς την απορρόφηση που εμφανίζει η ανθοκυανίνη στα 650 nm στην απουσία βιομορίων. Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων θολερότητας στα διαλύματα ανθοκυανίνης-καζεϊνικού νατρίου που παρασκευάστηκαν με συγκέντρωση μεγαλύτερη από 0.333 mg/mL καταβυθίστηκε ίζημα με αποτέλεσμα να μην μπορεί να μετρηθεί η θολερότητα διαλυμάτων μεγαλύτερης συγκέντρωσης όπως στα υπόλοιπα βιομόρια. Από τα σχήματα φαίνεται ότι η κρίσιμη τιμή της γραμμομοριακής αναλογίας ανθοκυανινών/βιομόρια στην οποία ανιχνεύεται συσσωμάτωση (η τιμή στον άξονα x όπου παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης στα 650 nm) μειώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών/πολυσακχαριτών.



Σχήμα 6.31: Διαγράμματα απορρόφησης στα 650 nm ως προς το λόγο (A) moles ανθοκυανίνης/moles χιτοζάνης, (B) moles ανθοκυανίνης/moles πηκτίνης και (C) moles ανθοκυανίνης/moles θειικής χονδροϊτίνης σε pH=4.

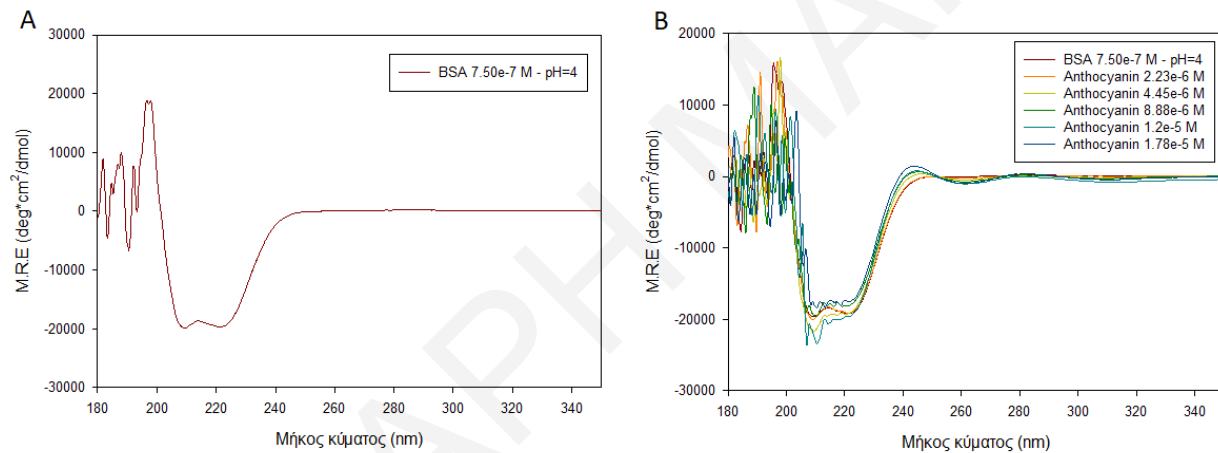
Από τις προαναφερθείσες μελέτες φθορισμού και θολερότητας των ανθοκυανινών με τα βιομόρια, επιλέχθηκαν τρία συστήματα που παρουσίασαν σημαντικότερη αλληλεπίδραση για να διερευνηθεί περαιτέρω ο τρόπος αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών με τα βιομόρια με τη χρήση και άλλων συνδυαστικών πειραμάτων. Τα τρία βιομόρια που επιλέχθηκαν είναι η BSA, η WPI και η χιτοζάνη. Αυτά τα τρία μόρια χρησιμοποιούνται συχνότερα σε μελέτες στη βιβλιογραφία, διότι οι δομές τους και οι ιδιότητές τους είναι περισσότερο μελετημένες, ενώ παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον ως συστατικά σε τοιχώματα σταγονιδίων γαλακτωμάτων.

6.7 Κυκλικός διχρωσμός

Ο κυκλικός διχρωσμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παρατηρηθεί πώς η δευτεροταγής δομή μιας πρωτεΐνης αλλάζει με την αλληλεπίδραση με άλλα μόρια. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις κυκλικού διχρωσμού για ποσοτική ανάλυση των αλλαγών στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών (BSA και WPI) απουσία και παρουσία ανθοκυανινών.

6.7.1 Επίδραση του εκχυλίσματος ανθοκυανίνης στη δευτεροταγή δομή της BSA

Τα φάσματα CD της BSA απουσία και παρουσία ανθοκυανινών, εκφρασμένα ως η μέση ελλειπτικότητα υπολείμματος (MRE), παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.32 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.10.



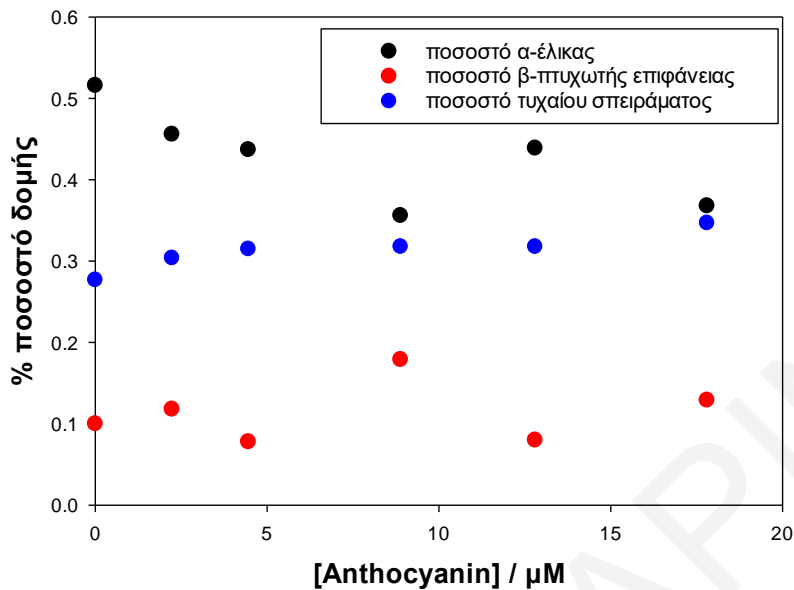
Σχήμα 6.32: Φάσματα κυκλικού διχρωσμού εκφρασμένα ως η μέση ελλειπτικότητα υπολείμματος (MRE) (A) BSA απουσία ανθοκυανινών σε pH=4 μM (B) BSA παρουσία και απουσία ανθοκυανινών σε pH=4.

Πίνακας 6.10: Ανάλυση CD δευτεροταγούς δομής της ελεύθερης BSA και της πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τις ανθοκυανίνες.

Συγκέντρωση Ανθοκυανίνης (M)	% α έλικα	% β πτυχωτή επιφάνεια	% β στροφή	% πολυπρολίνη II	% τυχαία σπείρα	RMS σφάλμα
0	51.6	10.0	7.4	6.4	27.7	1.44
2.23×10^{-6}	45.6	11.8	7.6	7.2	30.4	1.69
4.45×10^{-6}	43.7	7.8	8.5	7.7	31.5	1.97
8.88×10^{-6}	35.6	17.9	7.5	8.1	31.8	2.23
12.0×10^{-6}	43.9	8.0	8.5	7.8	31.8	1.99
17.8×10^{-6}	36.8	12.9	8.5	10.1	34.7	1.52

Τα αποτελέσματα των φασμάτων CD για το σύστημα BSA-ανθοκυανίνες σε pH=4 αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SELCON3 (που είναι ενσωματωμένο στο σύνολο προγραμμάτων DICROPROT). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν ως η μέση ελλειπτικότητα υπολείμματος που ορίζεται από την εξίσωση 5.3 (τμήμα 5.8.1), όπου η συγκέντρωση της BSA (C) είναι 7.5×10^{-7} M σε όλες τις μετρήσεις και ο αριθμός των κατάλοιπων αμινοξέων στην BSA (n) είναι 583. Στις πλείστες περιπτώσεις ο θόρυβος σε χαμηλά μήκη κύματος ήταν μεγάλος και για αυτό γίνεται προσαρμογή στο εύρος 190-250 nm. Τα σφάλματα όπως φαίνονται στον Πίνακα 6.10 είναι αποδεκτά ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις ανθοκυανίνης, όπου όμως αρχίζει ο κυματισμός του σήματος σε μεγάλα μήκη κύματος. Το σήμα ελλειπτικότητας που παρατηρείται στην περιοχή του εγγύς UV (250–330 nm) με μορφή κυματισμού παρουσία της ανθοκυανίνης μπορεί να οφείλεται στη συσσωμάτωση των αντιοξειδωτικών είτε να είναι κάποιο συστηματικό σφάλμα οργάνου.

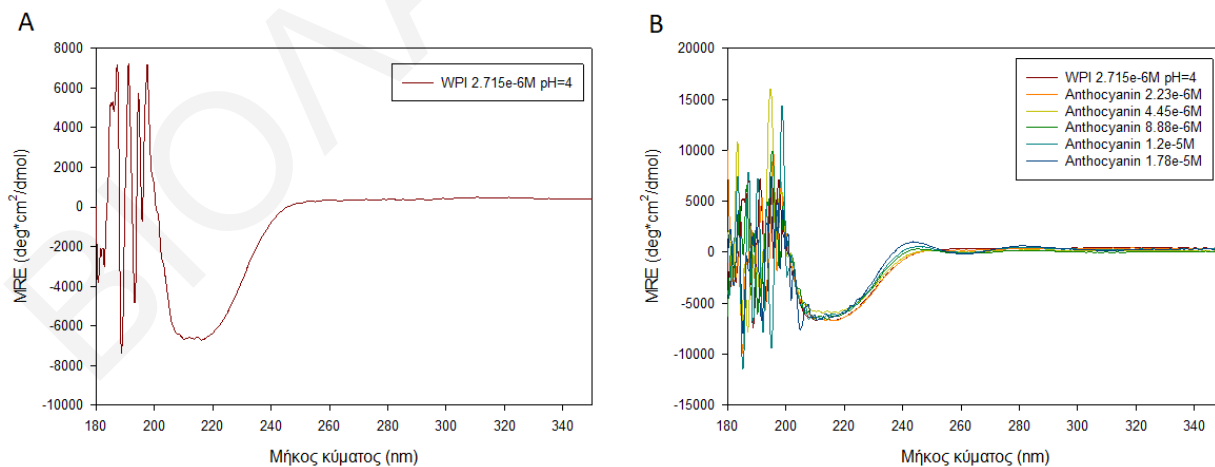
Στο φάσμα CD της πρωτεΐνης απουσία αντιοξειδωτικού παρατηρείται μια θετική κορυφή περίπου στα 195 nm και δύο αρνητικές ζώνες στην περιοχή UV κοντά στα 208 και 222 nm, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές της α -έλικας της πρωτεΐνης και συμφωνούν με τη βιβλιογραφία [Tang et al (2014), Wei et al (2018), Zuo et al (2015)]. Η προσθήκη της ανθοκυανίνης προκαλεί σταδιακή παραμόρφωση του φάσματος. Από τα αποτελέσματα στον Πίνακα 6.10 φαίνεται καθαρά ότι με αύξηση των ανθοκυανινών ελαττώνεται το ποσοστό της α -έλικας στη BSA και αυξάνει το ποσοστό τυχαίας σπείρας. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις ανθοκυανινών υπάρχει θόρυβος λόγω απορρόφησης σε μικρά μήκη κύματος και απόκλιση από το 0 μετά τα 250 nm, οπότε αυξάνει το σφάλμα προσαρμογής. Το % ποσοστό δομής των δευτεροταγών δομικών μοτίβων της BSA ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.33. Η μετρήσιμη μείωση του περιεχομένου σε α -έλικα αποκάλυψε ότι η δευτεροταγής δομή της BSA άλλαξε με την αλληλεπίδραση με την ανθοκυανίνη. Επισημαίνεται ότι το πρόγραμμα SELCON3 δεν προσδιορίζει τα σφάλματα στα εκτιμώμενα ποσοστά των δευτεροταγών δομών.



Σχήμα 6.33: Παρουσιάζεται διάγραμμα του % ποσοστού δομής της BSA σε α-έλικα, β-στροφή και τυχαίο σπείραμα ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης.

6.7.2 Επίδραση του εκχυλίσματος ανθοκυανίνης στη δευτεροταγή δομή της WPI

Τα φάσματα CD της WPI απουσία και παρουσία ανθοκυανινών, εκφρασμένα ως η μέση ελλειπτικότητα υπολείμματος (MRE), παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.34 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.11.



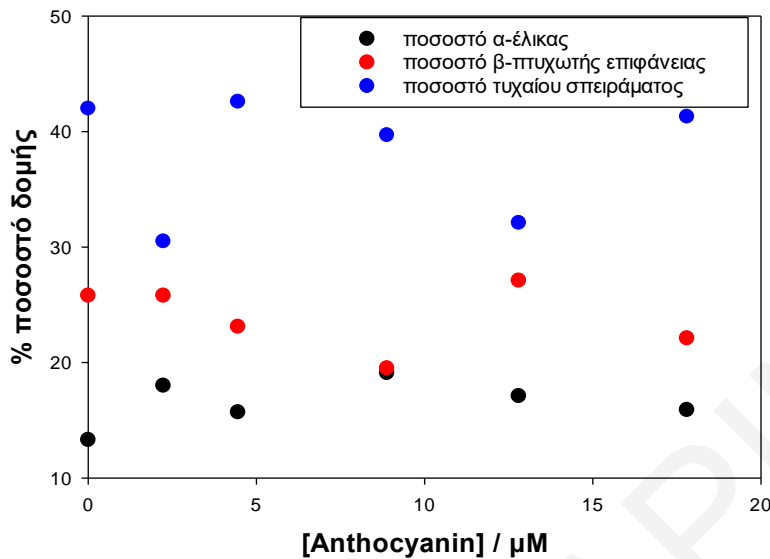
Σχήμα 6.34: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού εκφρασμένα ως η μέση ελλειπτικότητα υπολείμματος (MRE) (A) WPI απουσία ανθοκυανινών σε pH=4 μM (B) WPI παρουσία και απουσία ανθοκυανινών σε pH=4.

Πίνακας 6.11: Ανάλυση CD δευτεροταγούς δομής της ελεύθερης WPI και της πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τις ανθοκυανίνες.

Συγκέντρωση Ανθοκυανίνης (M)	% α έλικα	% β πτυχωτή επιφάνεια	% β στροφή	% πολυπρολίνη II	% τυχαία σπείρα	RMS σφάλμα
0	13.3	25.8	10.4	6.8	42.0	0.55
2.23×10^{-6}	18.0	25.8	11.5	10.0	30.5	0.68
4.45×10^{-6}	15.7	23.1	12.5	7.4	42.6	0.84
8.88×10^{-6}	19.1	19.5	11.8	7.1	39.7	0.82
12.0×10^{-6}	17.1	27.1	12.6	10.0	32.1	0.96
17.8×10^{-6}	15.9	22.1	9.3	7.3	41.3	0.90

Τα αποτελέσματα των φασμάτων CD για το σύστημα WPI-ανθοκυανίνες σε pH=4 αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SELCON3. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν ως η μέση ελλειπτικότητα υπολείμματος που ορίζεται από την εξίσωση 5.3 (τμήμα 5.8.1), όπου η συγκέντρωση της WPI (C) είναι 2.715×10^{-6} M σε όλες τις μετρήσεις και ο αριθμός των κατάλοιπων αμινοξέων στην WPI (n) είναι 162. Στις πλείστες περιπτώσεις ο θόρυβος σε χαμηλά μήκη κύματος ήταν πολύ μεγάλος, ακόμα και στο εύρος 190-210 nm. Τα σφάλματα δεν φαίνονται μεγάλα, αλλά η ποιότητα των δεδομένων δεν είναι πολύ καλή.

Στο φάσμα CD της WPI παρατηρείται αρνητική κορυφή στα 216 nm, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία [Chandrapala et al (2011), de Jongh et al (2001), Zhao et al (2017)]. Από τα αποτελέσματα στον Πίνακα 6.11 φαίνεται ότι με αύξηση της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα η διαμόρφωση της WPI. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις ανθοκυανινών υπάρχει θόρυβος σε μικρά μήκη κύματος και απόκλιση από το 0 μετά τα 250 nm, οπότε αυξάνει ελαφρά το σφάλμα προσαρμογής. Το % ποσοστό των δευτεροταγών δομικών μοτίβων της WPI ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.35. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η δευτεροταγής δομή της WPI δεν αλλάζει ιδιαίτερα έπειτα από αλληλεπίδραση με την ανθοκυανίνη.



Σχήμα 6.35: Παρουσιάζεται διάγραμμα του % ποσοστού δομής της WPI σε α -έλικα, β -στροφή και τυχαίο σπείραμα ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης.

6.8 Πειράματα διαπίδυσης

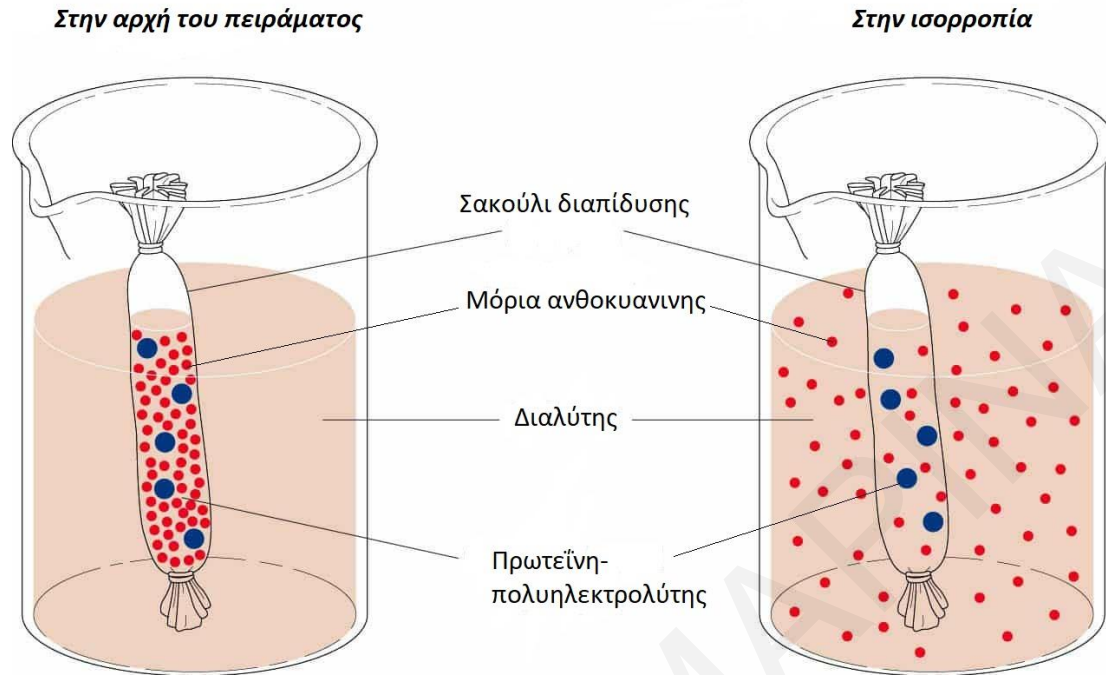
Για περαιτέρω μελέτη των αλληλεπιδράσεων των ανθοκυανινών με την BSA, την WPI και την χιτοζάνη πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαπίδυσης (dialysis). Στα πειράματα αυτά αρχικά χρησιμοποιήθηκε βενζοϋλιωμένη μεμβράνη διαπίδυσης, η οποία είχε αποκοπή μοριακού βάρους 2 kDa. Ωστόσο μετά από μια σειρά πειραμάτων διαπιστώθηκε ότι δεν ήταν δυνατή η ολική απομάκρυνση της ανθοκυανίνης από το σακούλι διαπίδυσης προς το εξωτερικό ρυθμιστικό διάλυμα για να επέλθει ισορροπία. Βιβλιογραφικά, το μοριακό βάρος της ανθοκυανίνης είναι ίσο με 449.2 g/mol (cyanidine 3-glucoside). Από αυτό το πείραμα μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι κάποια μόρια στο μίγμα των ανθοκυανινών περιέχουν διάφορα σάκχαρα και οργανικά οξέα με αποτέλεσμα να αυξάνεται το μοριακό βάρος και να μην μπορεί όλη η ανθοκυανίνη να διαπεράσει τη μεμβράνη διαπίδυσης. Έτσι, στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια μεμβράνη διαπίδυσης από κυτταρίνη, η οποία είχε αποκοπή μοριακού βάρους 12-14 kDa. Ωστόσο, αυτή η αποκοπή μοριακού βάρους ίσως είναι οριακή για τα διάφορα βιομόρια τα οποία έχουν μοριακό βάρος κοντά σε αυτή την τιμή. Είναι σημαντικό στα πειράματα αυτά να μην εξέρχεται ποσότητα των βιομορίων προς το ρυθμιστικό διάλυμα, αφού η ανάλυση των δεδομένων βασίζεται στην απορρόφηση UV-vis των ανθοκυανινών. Γι'

αυτό πριν από κάθε πείραμα διεξαγόταν δοκιμή με βιομόρια απουσία ανθοκυανίνης, για να διαπιστωθεί η μη διαπερατότητα της μεμβράνης από πρωτεΐνες ή πολυσακχαρίτες. Η ανάλυση των πειραμάτων διαπίδυσης βασίζεται στην εξίσωση 4.18 η οποία εξηγήθηκε στο θεωρητικό μέρος. Όπου $[A]_{in}=[Antho]_{tot}$ είναι η αρχική συγκέντρωση της ανθοκυανίνης μέσα στο σακούλι διαπίδυσης, $[A]_{eq}=[Antho]_{free}$ είναι η συγκέντρωση ισορροπίας που μετράται μετά την επίτευξη ισορροπίας, n_b είναι τα συνολικά moles ανθοκυανίνης που προσδένονται με μόρια πρωτεΐνης εντός του σακουλιού διαπίδυσης, D είναι παράμετρος με διαστάσεις όγκου, V_{in} ο όγκος του διαλύματος μέσα στο σακούλι διαπίδυσης και V_{tot} το άθροισμα του όγκου του διαλύματος που βρίσκεται μέσα στο σακούλι διαπίδυσης και του όγκου του διαλύτη που βρίσκεται στο εξωτερικό.

$$n_b = [A]_{in}V_{in} - (V_{tot} + D)[A]_{eq} = [Antho]_{tot}V_{in} - (V_{tot} + D)[Antho]_{free} \quad \text{(Εξίσωση 4.18)}$$

Όπως αναφέρθηκε η ανάλυση των δεδομένων βασίζεται στην απορρόφηση UV-vis των ανθοκυανινών. Στο φάσμα UV-vis των ανθοκυανινών από βατόμουρα υπάρχουν δύο κορυφές απορρόφησης, στα 276 nm και στα 518.5 nm. Για να είναι δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ελεύθερης ανθοκυανίνης $[Antho]_{free}$ από τα πειράματα διαπίδυσης, πριν από κάθε πείραμα κατασκευαζόταν καμπύλη βαθμονόμησης των ανθοκυανινών στα συγκεκριμένα μήκη κύματος.

Στο Σχήμα 6.36 παρουσιάζεται παράδειγμα πειράματος διαπίδυσης. Λόγω του μεγέθους των πόρων της μεμβράνης, τα βιομόρια με μεγαλύτερο μοριακό βάρος από την αποκοπή της μεμβράνης (12-14 kDa), δεν μπορούν να τη διαπεράσουν. Αντίθετα, οι ανθοκυανίνες θα διαχέονται ελεύθερα δια μέσου της μεμβράνης και θα επιτυγχάνουν ισορροπία σε ολόκληρο τον όγκο του διαλύματος. Στην ισορροπία, η τελική συγκέντρωση των ανθοκυανινών εξαρτάται από τους όγκους των διαλυμάτων εντός και εκτός της σακούλας.



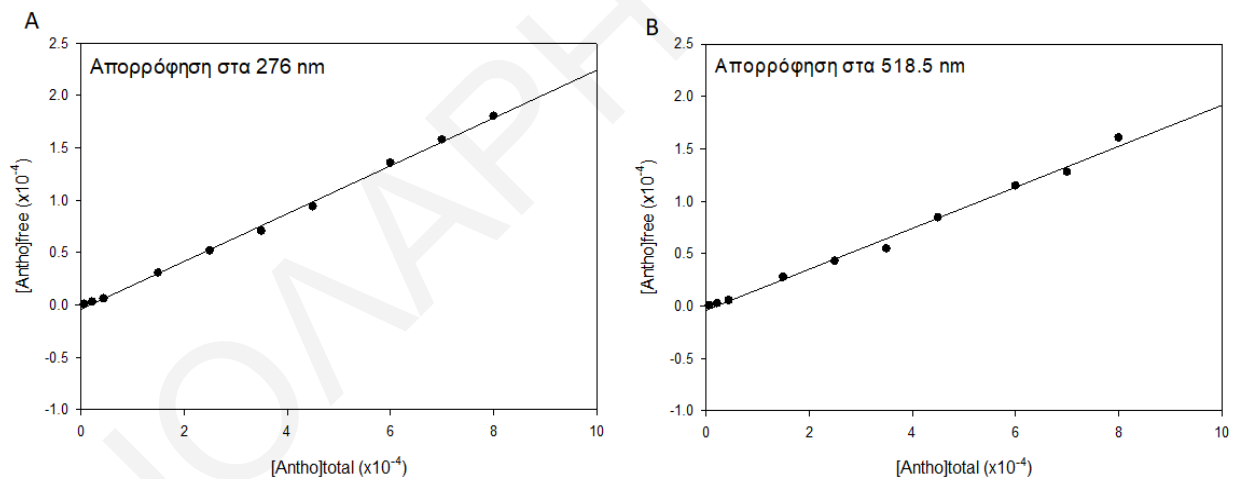
Σχήμα 6.36: Σακούλι διαπίδυσης στην αρχή του πειράματος και στην ισορροπία.

6.8.1 Υπολογισμός παραμέτρου D

Η παράμετρος D στην εξίσωση 4.18, η οποία έχει διαστάσεις όγκου, λαμβάνεται από τη γραμμική σχέση μεταξύ των $[\text{Anthocyanin}]_{\text{free}}$ και $[\text{Anthocyanin}]_{\text{total}}$ σε πείραμα που γίνεται στην απουσία βιομορίων. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν έλεγχος της απορρόφησης UV-vis των ανθοκυανινών, μέχρις ότου παρατηρηθεί σταθερή απορρόφηση. Ο χρόνος που αποδείχθηκε επαρκής για την εξισορρόπηση στο σύστημα αυτό ήταν 72 ώρες. Μετά την εξισορρόπηση μετρήθηκε η τελική συγκέντρωση ισορροπίας των ανθοκυανινών καταγράφοντας την απορρόφηση στο εξωτερικό διάλυμα στα 276 nm και 518.5 nm. Όπου χρειαζόταν γινόταν 10 φορές αραιώση (DF=10) για να μετρηθεί η απορρόφηση. Η συγκέντρωση της «ελεύθερης» ανθοκυανίνης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας μια καμπύλη βαθμονόμησης (διάγραμμα απορρόφησης στα 276 nm και 518.5 nm ως προς τη συγκέντρωση ανθοκυανίνης). Στον Πίνακα 6.12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού και στα Σχήματα 39 (A) και 39 (B) παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης της ελεύθερης ανθοκυανίνης ως προς τη συγκέντρωση της συνολικής στα 276 nm και 518.5 nm αντίστοιχα.

Πίνακας 6.12: Απορροφήσεις και συγκεντρώσεις «ελεύθερων» ανθοκυανινών στα 276 nm και 518.5 nm.

[Antho] _{total}	276 nm → D=0.022			518.5 nm → D=0.018		
	A ₂₇₆	Cantho _{free} (mg/L)	[Antho] _{free} (M)	A _{518.5}	Cantho _{free} (mg/L)	[Antho] _{free} (M)
6.68x10 ⁻⁶	0.031	0.28	6.30x10 ⁻⁷	0.003	0.40	8.90x10 ⁻⁷
2.23x10 ⁻⁵	0.0825	1.25	2.79x10 ⁻⁶	0.006	1.10	2.45x10 ⁻⁶
4.45x10 ⁻⁵	0.154	2.61	5.82x10 ⁻⁶	0.013	2.40	5.34x10 ⁻⁶
1.50x10 ⁻⁴	0.088 (DF=10)	13.70	3.05x10 ⁻⁵	0.007 (DF=10)	14	3.12x10 ⁻⁵
2.50x10 ⁻⁴	0.139 (DF=10)	23.21	5.17x10 ⁻⁵	0.013 (DF=10)	24	5.34x10 ⁻⁵
3.50x10 ⁻⁴	0.184 (DF=10)	31.70	7.06x10 ⁻⁵	0.017 (DF=10)	32	7.12x10 ⁻⁵
4.50x10 ⁻⁴	0.239 (DF=10)	42.10	9.37x10 ⁻⁵	0.023 (DF=10)	44	9.80x10 ⁻⁵
6.00x10 ⁻⁴	0.339 (DF=10)	60.90	1.36x10 ⁻⁴	0.034 (DF=10)	66	1.47x10 ⁻⁴
7.00x10 ⁻⁴	0.391 (DF=10)	70.81	1.58 x10 ⁻⁴	0.041 (DF=10)	79	1.76x10 ⁻⁴
8.00x10 ⁻⁴	0.445 (DF=10)	80.94	1.80x10 ⁻⁴	0.045 (DF=10)	88	1.96x10 ⁻⁴



Σχήμα 6.37: Διαγράμματα απορρόφησης της «ελεύθερης» ανθοκυανίνης ως προς τη συγκέντρωση της συνολικής ανθοκυανίνης (A) στα 276 nm, (B) στα 518 nm.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ένα παράδειγμα υπολογισμού της παραμέτρου D. Η κλίση του διαγράμματος στο Σχήμα 37 (A) είναι ίση με:

$$\text{κλίση} = \frac{dC_{free}}{dC_{tot}} = \frac{V_{in}}{V_{tot} + D} = 0.231 \quad \text{(Εξίσωση 6.1)}$$

Στα πειράματα διαπίδυσης ο όγκος των διαλυμάτων των ανθοκυανινών μέσα στη μεμβράνη (V_{in}) είναι ίσος με 10mL και ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος στο εξωτερικό (V_o) είναι ίσος με 11mL, επομένως ο συνολικός όγκος (V_{tot}) είναι ίσος με 21mL. Η παράμετρος D για την απορρόφηση στα 276 nm τότε υπολογίζεται:

$$\frac{dC_{free}}{dC_{tot}} = \frac{0.01L}{0.021L+D} = 0.231 \rightarrow D = 0.02229 \approx 0.022 \text{ L} \quad (\text{Εξίσωση 6.2})$$

Αντίστοιχα υπολογίστηκε και η παράμετρος D για την απορρόφηση της ανθοκυανίνης στα 518.5 nm και είναι ίση με 0.018 L. Σε αυτό το σημείο γίνεται παραδοχή ότι η παράμετρος D δεν θα αλλάξει παρουσία μιας πρωτεΐνης, στην οποία τα μόρια της ανθοκυανίνης μπορεί να προσδεθούν.

6.8.2 Αλληλεπίδραση BSA με ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4

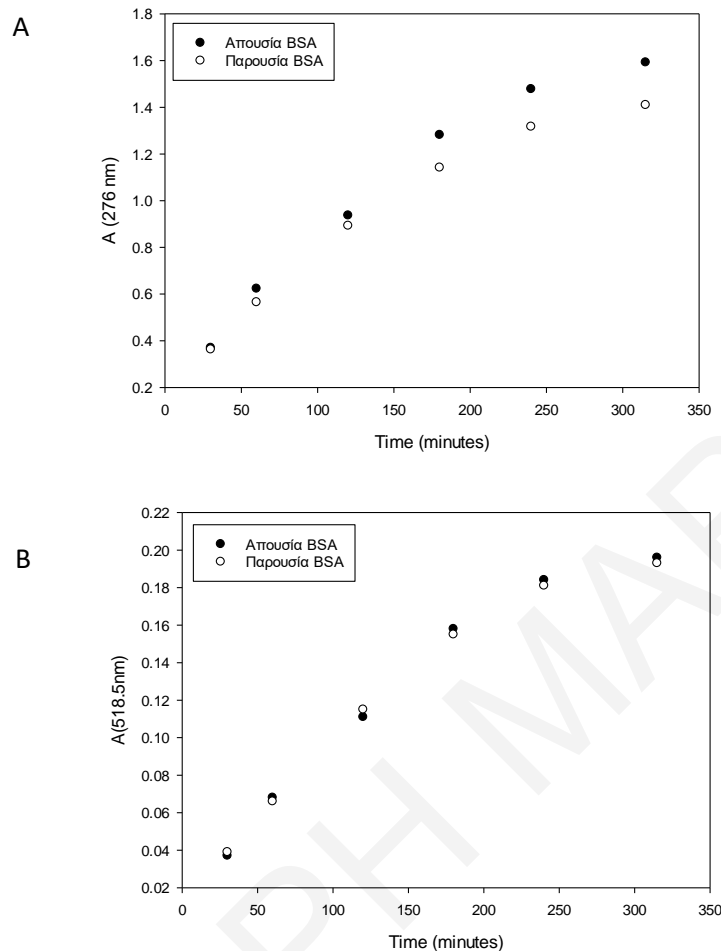
6.8.2.1 Παράλληλο πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών παρουσία και απουσία BSA με έλεγχο απορρόφησης σε διάφορους χρόνους

Στο πείραμα αυτό διάλυμα ανθοκυανίνης σε νερό και ανθοκυανίνης σε διάλυμα BSA σε νερό (10mL) βυθίστηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=4 (11mL). Η διάχυση των ανθοκυανινών αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση στο εξωτερικό διάλυμα στα 276 και 518.5 nm στα 30, 60, 120, 180, 240 και 315 λεπτά σε ένα φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού. Στον Πίνακα 6.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού και στα Σχήματα 6.40 και 6.41 παρουσιάζονται τα διαγράμματα απορρόφησης στα 276 και 518.5 nm ως προς το χρόνο.

Πίνακας 6.13: Αποτελέσματα παράλληλου πειράματος διαπίδυσης ανθοκυανίνης απουσία και παρουσία BSA σε pH=4.

[Ανθοκυανίνη]= 1.5×10^{-4} M			[Ανθοκυανίνη]= 1.5×10^{-4} M/[BSA]= 3.76×10^{-6} M		
Time (minutes)	Απορρόφηση (276 nm)	Απορρόφηση (518.5 nm)	Time (minutes)	Απορρόφηση (276 nm)	Απορρόφηση (518.5 nm)
30	0.370	0.037	30	0.363	0.039
60	0.623	0.068	60	0.565	0.066
120	0.937	0.111	120	0.893	0.115
180	1.282	0.158	180	1.142	0.155
240	1.478	0.184	240	1.317	0.181
315	1.592	0.196	315	1.410	0.193

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6



Σχήμα 6.38: (A) Διάγραμμα απορρόφησης (276 nm) ως προς το χρόνο που αντιστοιχεί στην απελευθέρωση της ανθοκυανίνης μέσω μεμβράνης διαπίδυσης και (B) διάγραμμα απορρόφησης (518.5 nm) ως προς το χρόνο απουσία (●) και παρουσία (○) BSA.

Στο πείραμα διαπίδυσης που πραγματοποιήθηκε σε pH 4 με μέτρηση απορρόφησης στα 518.5 nm δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη διέλευση των ανθοκυανινών παρουσία και απουσία BSA (Σχήμα 6.38 (B)). Αντίθετα στο πείραμα διαπίδυσης που διεξάχθηκε σε pH 4 με μέτρηση απορρόφησης UV-vis στα 276 nm παρατηρήθηκε μείωση της απορρόφησης των ανθοκυανινών παρουσία BSA, ως αποτέλεσμα ισχυρότερης αλληλεπίδρασης με τη BSA (Σχήμα 6.38 (A)). Η απορρόφηση UV-vis των ανθοκυανινών στα 518.5 nm, είναι πολύ χαμηλή και επομένως τα αποτελέσματα είναι λιγότερο αξιόπιστα. Από τον πίνακα 6.13 βλέπουμε ότι η απορρόφηση UV-vis των ανθοκυανινών στα 518.5 nm είναι περίπου 10 φορές μικρότερη από την απορρόφηση UV-vis στα 276 nm. Ωστόσο η διαφορά συμπεριφοράς στα 276 και 518.5 nm

υποδεικνύει ότι στα δύο μήκη κύματος ανιχνεύονται διαφορετικά μόρια στο μίγμα (εκείνα που απορροφούν στα 518.5 nm δεν προσδένονται στη BSA).

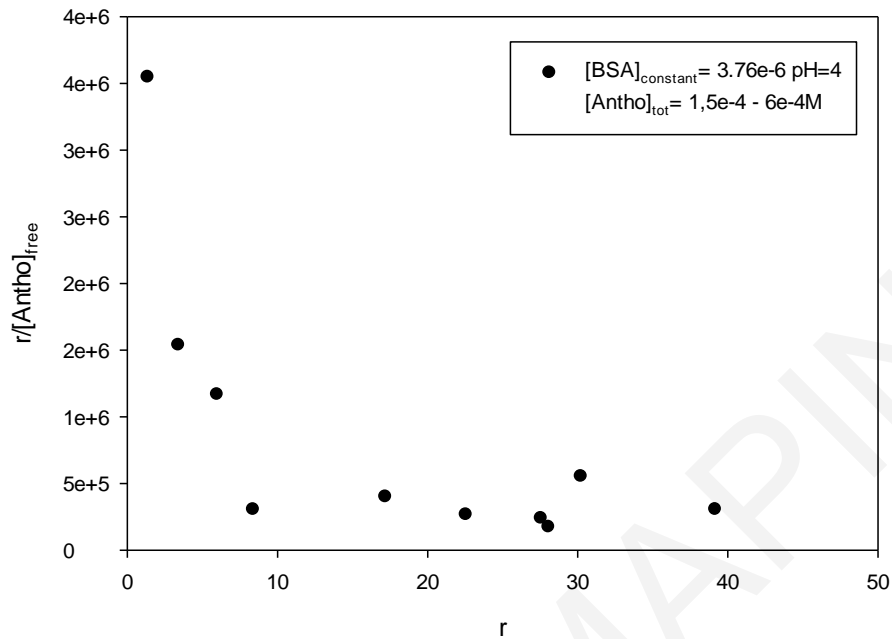
6.8.2.2 Πείραμα διαπίδυσης BSA-ανθοκυανίνες pH=4

6.8.2.2.1 Διαγράμματα Scatchard

Στο πείραμα αυτό διαλύματα ανθοκυανίνης-BSA (10mL) βυθίστηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=4 (11mL). Η διάχυση των ανθοκυανινών αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση του προϊόντος διαπίδυσης στα 276 και 518.5 nm μετά από 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Όπου χρειαζόταν γινόταν 10 φορές αραίωση (DF=10) για μέτρηση της απορρόφησης. Η συγκέντρωση της «ελεύθερης» ανθοκυανίνης σε mg/L υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας καμπύλη βαθμονόμησης και στη συνέχεια μετατράπηκε σε mol/L με βάση το μοριακό βάρος της cyanidine-3-glucoside. Από την $[Antho]_{free}$ υπολογίζεται ο αριθμός προσδεδεμένων mol ανθοκυανινών σε πρωτεΐνες, n_b , με βάση την εξ. 4.18. Από το n_b υπολογίζεται στη συνέχεια ο λόγος $r = n_b/n_p$. Στον Πίνακα 6.14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού από τη μέτρηση της απορρόφησης στα 276 nm και στον Πίνακα 6.15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μέτρηση της απορρόφησης στα 518.5 nm. Από τα αποτελέσματα αυτά κατασκευάζονται τα διαγράμματα Scatchard $r/[Antho]_{free}$ ως προς r και παρουσιάζονται στα Σχήματα 6.42 και 6.43 για απορροφήσεις στα 276 και 518.5 nm αντίστοιχα.

Πίνακας 6.14: Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης BSA-ανθοκυανινών σε pH=4 από το πείραμα διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.18 και υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι σταθερή και ίση με 3.76×10^{-6} M ($n_p = C_p \cdot V_{in} = 3.76 \times 10^{-8}$ M).

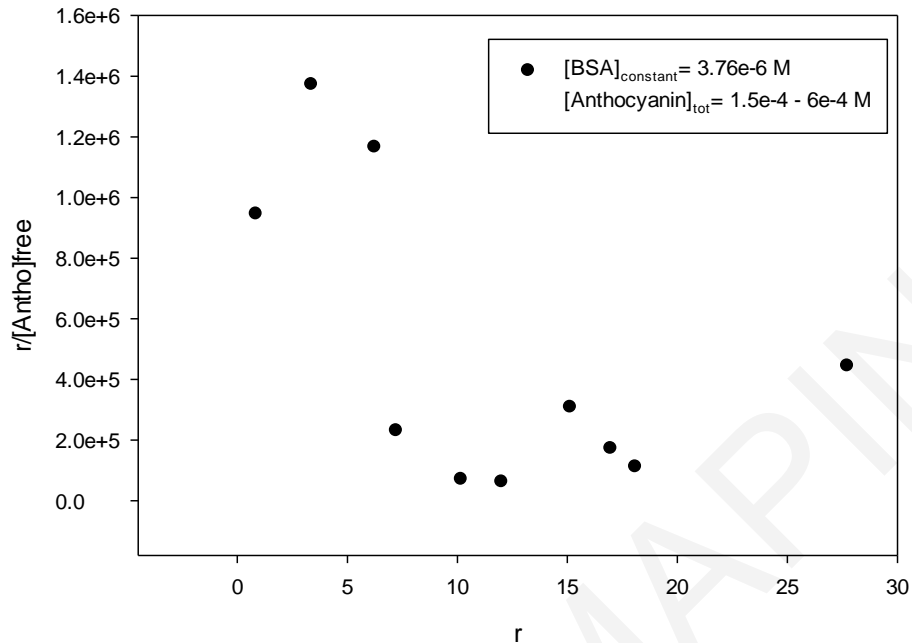
Απορρόφηση (276 nm)	$C_{anthocyanin}$ (mg/L)	$[Anthocyanin]_{total}$ (M)	$[Antho]_{free}$ (M)	n_b (mol)	$r = n_b/n_p$	$r/[Antho]_{free}$ (M ⁻¹)
0.025	0.169	6.68×10^{-6}	3.78×10^{-7}	5.04×10^{-8}	1.34	3548593
0.068	0.990	2.23×10^{-5}	2.21×10^{-6}	1.28×10^{-7}	3.39	1538361
0.137	2.292	4.45×10^{-5}	5.1×10^{-6}	2.24×10^{-7}	5.96	1168186
0.080 (DF=10)	12.30	1.50×10^{-4}	2.74×10^{-5}	3.15×10^{-7}	8.37	305598.1
0.118 (DF=10)	19.24	2.50×10^{-4}	4.28×10^{-5}	6.46×10^{-7}	17.18	401010.2
0.146 (DF=10)	24.53	3.50×10^{-4}	5.46×10^{-5}	1.14×10^{-6}	30.21	553269.9
0.217 (DF=10)	37.90	4.50×10^{-4}	8.44×10^{-5}	8.48×10^{-7}	22.54	267156.7
0.289 (DF=10)	51.51	6.00×10^{-4}	1.15×10^{-4}	1.04×10^{-6}	27.55	240261.2
0.391 (DF=10)	57.36	7.00×10^{-4}	1.28×10^{-4}	1.47×10^{-6}	39.15	306614.1
0.445 (DF=10)	72.07	8.00×10^{-4}	1.60×10^{-4}	1.05×10^{-6}	28.04	174804.1



Σχήμα 6.39: Γραφική παράσταση Scatchard από πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών παρουσία BSA σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

Πίνακας 6.15: Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης BSA-ανθοκυανινών σε pH=4 από το πείραμα διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.18 και υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι σταθερή και ίση με 3.76×10^{-6} M ($n_p = C_p \cdot V_{in} = 3.76 \times 10^{-8}$ M).

Απορρόφηση (518.5 nm)	C _{anthocyanin} (mg/L)	[Anthocyanin] _{total} (M)	[Antho] _{free} (M)	n _b (mol)	r=n _b /n _p	r/[Antho] _{free} (M ⁻¹)
0.003	0.4	6.68×10^{-6}	8.90×10^{-7}	3.18×10^{-8}	0.84	946447
0.006	1.1	2.23×10^{-5}	2.45×10^{-6}	1.26×10^{-7}	3.36	1373274
0.013	2.4	4.45×10^{-5}	5.34×10^{-6}	2.34×10^{-7}	6.23	1166467
0.008 (DF=10)	14	1.50×10^{-4}	3.12×10^{-5}	2.71×10^{-7}	7.21	231345
0.012 (DF=10)	22	2.50×10^{-4}	4.89×10^{-5}	5.69×10^{-7}	15.13	308922
0.015 (DF=10)	28	3.50×10^{-4}	6.23×10^{-5}	1.04×10^{-6}	27.72	444681
0.023 (DF=10)	44	4.50×10^{-4}	9.79×10^{-5}	6.38×10^{-7}	16.96	173162
0.033 (DF=10)	64	6.00×10^{-4}	1.42×10^{-4}	3.82×10^{-7}	10.16	71343
0.037 (DF=10)	72	7.00×10^{-4}	1.60×10^{-4}	6.79×10^{-7}	18.08	112825
0.044 (DF=10)	86	8.00×10^{-4}	1.91×10^{-4}	4.51×10^{-7}	11.99	62661



Σχήμα 6.40: Γραφική παράσταση Scatchard από πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών παρουσία BSA σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm.

Από το διάγραμμα Scatchard στο Σχήμα 6.39 με βάση την απορρόφηση στα 276 nm παρατηρούμε μείωση του όρου $r/[Antho]_{free}$ μέχρι το σημείο όπου το r ισούται με 10-15. Σε μεγαλύτερο r οι τιμές $r/[Antho]_{free}$ είναι κοντά στο μηδέν στα πλαίσια του σφάλματος. Με μια πρώτη εκτίμηση από την αποτέμνουσα της εφαπτομένης του διαγράμματος στον άξονα x , μπορεί να υπολογιστεί η παράμετρος n (αριθμός θέσεων πρόσδεσης), η οποία είναι περίπου ίση με 8-12. Αντίστοιχα από το διάγραμμα Scatchard στο Σχήμα 6.40 με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm, καταλήγουμε περίπου στα ίδια συμπεράσματα. Το διάγραμμα αυτό δεν είναι ωστόσο αρκετά αξιόπιστο, λόγω της χαμηλής απορρόφησης των ανθοκυανινών στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, ωστόσο είναι μια περαιτέρω επιβεβαίωση του αριθμού θέσεων πρόσδεσης. Λόγω της μορφής των δύο αυτών διαγραμμάτων, η οποία δεν είναι γραμμική όπως παρατηρείται στην απλούστερες περιπτώσεις και λόγω αδυναμίας εφαρμογής του μοντέλου δύο θέσεων πρόσδεσης, το οποίο δεν ισχύει στην περίπτωση της BSA, απαιτείται η κατασκευή διαγραμμάτων Hill.

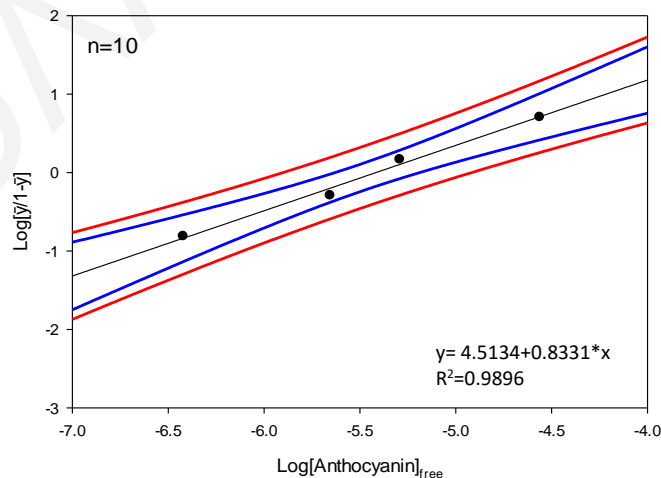
6.8.2.2 Διαγράμματα Hill

Η μη γραμμικότητα που παρατηρήθηκε στα διαγράμματα Scatchard μπορεί να οφείλεται και σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων που προσδένονται, δηλαδή σε συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις. Τα διαγράμματα Hill κατασκευάζονται με βάση την εξίσωση 4.22:

$$\log \left[\frac{\bar{y}}{1-\bar{y}} \right] = \alpha_H \log[L] - \log K_d = \alpha_H \log[L] - \alpha_H \log K_A \quad (\text{Εξίσωση 4.22})$$

Όπου \bar{y} είναι το κλάσμα της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης υποδοχέα που προσδένει τον υποκαταστάτη ($\bar{y}=r/n$), $[L]$ είναι η συγκέντρωση του ελεύθερου μη προσδεμένου υποκαταστάτη, K_d είναι η φαινομενική σταθερά διάστασης, K_A είναι η συγκέντρωση υποκαταστάτη που οδηγεί σε 50% πλήρωση των θέσεων πρόσδεσης και α_H είναι η σταθερά του Hill ($1 \leq \alpha_H \leq n$), η οποία είναι δείκτης της συνεργιστικότητας.

Για να προσδιοριστεί ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης μέσω των διαγραμμάτων Hill πρέπει αρχικά να υποτεθεί κάποιο n και στη συνέχεια το διάγραμμα με την καλύτερη γραμμικότητα υποδεικνύει το n του συστήματος. Από τα διαγράμματα Scatchard ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης είναι περίπου ίσος με 8-15. Γι' αυτό κατασκευάστηκαν διαγράμματα Hill σε αυτό το εύρος τιμών n με βάση την απορρόφηση των ανθοκυανινών στα 276 και 518.5 nm. Στο Σχήμα 6.41 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα διαγράμματος Hill με την υπόθεση ότι το $n=10$ για τον υπολογισμό των παραμέτρων α_H , K_d και K_A (με βάση τα δεδομένα για την απορρόφηση στα 276 nm). Τα υπόλοιπα διαγράμματα Hill παρουσιάζονται στο παράρτημα (Π.6, Π.7).



Σχήμα 6.41: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

Η κλίση του διαγράμματος δίνει τον συντελεστή Hill, α_H και η αποτέμνουσα δίνει τις σταθερές K_d και K_A . Για να μπορεί να συγκριθεί ο συντελεστής Hill με τη βιβλιογραφία, η τιμή που προκύπτει από την κλίση πρέπει να πολλαπλασιαστεί με την τιμή 2.303 (αλλαγή βάσης λογαρίθμων). Θέτοντας $n=10$ στην εξίσωση 4.22 προκύπτει συντελεστής Hill 1.911, σταθερά K_d 3.07×10^{-5} και K_A 3.82×10^{-6} . Όταν $\alpha_H=n$ τότε το σύστημα συμπεριφέρεται απόλυτα συνεργιστικά, όταν $\alpha_H=1$ δεν υπάρχει συνεργιστικότητα (μία θέση που δεν αλληλεπιδρά). Συνεπώς στην αλληλεπίδραση με την BSA, όταν ένα μόριο ανθοκυανίνης ροφηθεί στην επιφάνεια της BSA, διευκολύνεται η πρόσδεση των υπόλοιπων μορίων.

Στους Πίνακες 6.18 και 6.19 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα διαγράμματα Hill με βάση την απορρόφηση στα 276 και 518.5 nm αντίστοιχα, θέτοντας διαφορετικές τιμές n . Παρατηρούμε ότι καθώς αυξάνουμε την τιμή n η γραμμικότητα (R^2) μειώνεται. Αυτό υποδεικνύει ότι ίσως ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης είναι λίγο μικρότερος ή ίσος με 10.

Πίνακας 6.16: Σύνοψη αποτελεσμάτων αλληλεπίδρασης BSA-ανθοκυανινών σε $pH=4$ από τα διαγράμματα Hill (276 nm).

n	R^2	$\alpha_H \pm \Delta(\alpha_H)$	α_H (*2.303)	K_d (M)	$\text{Log}K_d \pm \Delta(\text{Log}K_d)$	K_A (M)	$\text{Log}K_A \pm \Delta(\text{Log}K_A)$
9	0.9896	1.02 ± 0.06	2.349	1.91×10^{-6}	-5.72 ± 2.40	2.57×10^{-6}	-5.59 ± 3.34
10	0.9808	0.83 ± 0.06	1.911	3.07×10^{-5}	-4.51 ± 0.33	3.82×10^{-6}	-5.42 ± 2.40
11	0.9876	0.75 ± 0.25	1.727	1.15×10^{-4}	-3.94 ± 1.40	5.35×10^{-6}	-5.27 ± 2.57
12	0.9845	0.69 ± 0.26	1.589	2.68×10^{-4}	-3.57 ± 1.46	7.21×10^{-6}	-5.14 ± 2.88
13	0.9815	0.66 ± 0.28	1.519	4.91×10^{-4}	-3.31 ± 1.52	9.43×10^{-6}	-5.02 ± 3.12
14	0.9788	0.63 ± 0.28	1.451	7.83×10^{-4}	-3.11 ± 1.56	1.21×10^{-5}	-4.92 ± 3.31
15	0.9765	0.61 ± 0.29	1.404	1.14×10^{-3}	-3.11 ± 1.56	1.51×10^{-5}	-4.82 ± 3.46

Πίνακας 6.17: Σύνοψη αποτελεσμάτων αλληλεπίδρασης BSA-ανθοκυανινών σε $pH=4$ από τα διαγράμματα Hill (518.5 nm).

n	R^2	$\alpha_H \pm \Delta(\alpha_H)$	α_H (*2.303)	K_d (M)	$\text{Log}K_d \pm \Delta(\text{Log}K_d)$	K_A (M)	$\text{Log}K_A \pm \Delta(\text{Log}K_A)$
8	0.9092	1.21 ± 1.16	2.787	2.83×10^{-7}	-6.60 ± 6.27	6.54×10^{-6}	-5.45 ± 7.36
9	0.8642	1.01 ± 1.21	2.326	4.645×10^{-6}	-5.33 ± 6.54	5.047×10^{-6}	-5.30 ± 9.11
10	0.8410	0.91 ± 1.20	2.096	1.989×10^{-5}	-4.70 ± 6.48	6.801×10^{-6}	-5.17 ± 9.87
11	0.8262	0.85 ± 1.18	1.958	5.055×10^{-5}	-4.30 ± 6.39	8.845×10^{-6}	-5.05 ± 10.30

Οι σταθερές Hill (K_A) μπορούν να συγκριθούν με τις σταθερές πρόσδεσης (K) που υπολογίστηκαν από την ανάλυση φθορισμού μέσω λογαριθμικών διαγραμμάτων αν υποθέσουμε ότι $K_{Hill} \approx \frac{1}{K}$ αφού $\bar{y} = \frac{r}{n} = \frac{K [L]^a}{1+K[L]^a}$. Υποθέτοντας ότι ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης είναι ίσος με 10 προκύπτουν σταθερές Hill $(2.6 \pm 14.4) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (276 nm) και $(1.5 \pm 18.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (518.5 nm). Από τα πειράματα φθορισμού οι σταθερές πρόσδεσης είναι $(3.7 \pm 11.3) \times 10^5$ (λογαριθμικό διάγραμμα S-V) και $(7.6 \pm 10.6) \times 10^4$ (μη γραμμική παλινδρόμηση). Παρατηρούμε ότι οι σταθερές που προκύπτουν από όλες τις μεθόδους έχουν την ίδια τάξη μεγέθους.

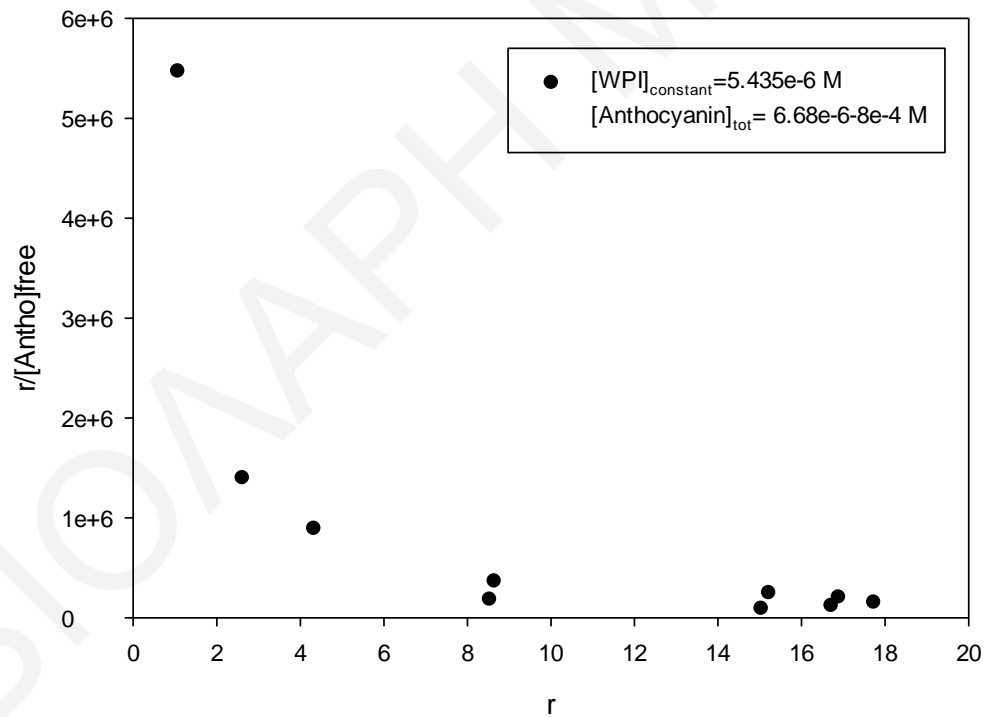
6.8.3 Πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών στην παρουσία WPI σε pH=4

6.8.3.1 Διαγράμματα Scatchard

Διαλύματα ανθοκυανίνης-WPI (10mL) σε σακούλες βυθίστηκαν σε ογκομετρικούς κυλίνδρους που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=4 (11mL). Η διάχυση των ανθοκυανινών αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση του προϊόντος διαπίδυσης στα 276 και 518.5 nm μετά από 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Όπου χρειαζόταν γινόταν 10 φορές αραιώση (DF=10). Η συγκέντρωση της «ελεύθερης» ανθοκυανίνης σε mg/L υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας μια καμπύλη βαθμονόμησης και στη συνέχεια μετατράπηκε σε mol/L με βάση το μοριακό βάρος της cyanidine 3-glucoside. Στον Πίνακα 6.18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού με μέτρηση απορρόφησης στο εξωτερικό διάλυμα στα 276 nm και στον Πίνακα 6.19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα με μέτρηση απορρόφησης στο εξωτερικό διάλυμα στα 518.4 nm. Από τα αποτελέσματα αυτά κατασκευάζονται τα διαγράμματα Scatchard $r/[Antho]_{free}$ ως προς r με βάση την απορρόφηση στα 276 και 518.5 nm και παρουσιάζονται στα Σχήματα 6.45 και 6.46 αντίστοιχα.

Πίνακας 6.18: Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης WPI-ανθοκυανινών σε pH=4 από το πείραμα διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.18 και υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι σταθερή και ίση με 5.435×10^{-6} M ($n_p = C_p * V_{in} = 5.435 \cdot 10^{-8}$ M).

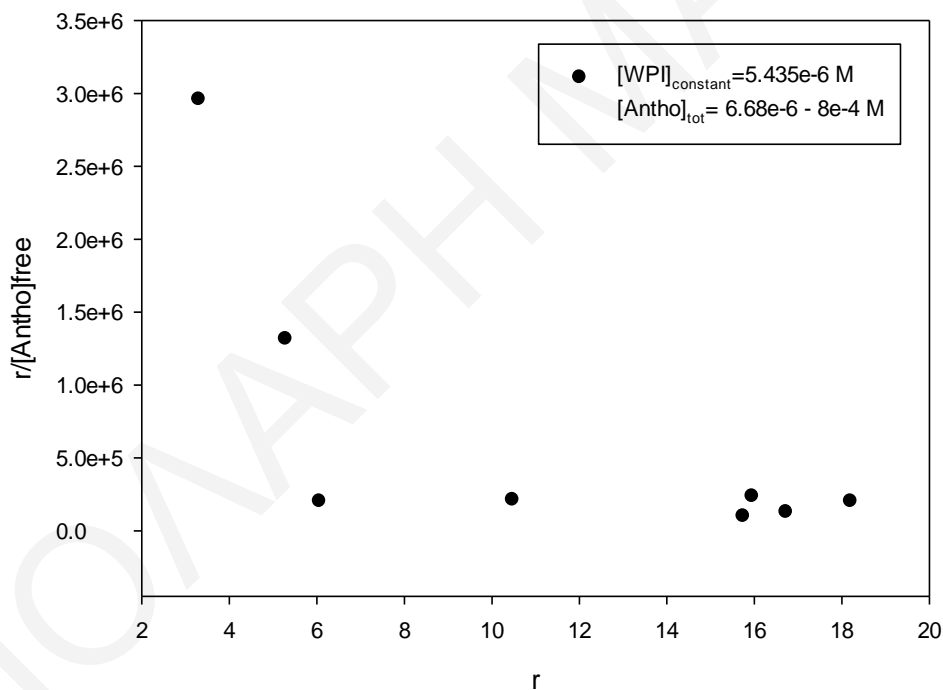
Απορρόφηση (276 nm)	Canthocyanin (mg/L)	[Anthocyanin] _{total} (M)	[Antho] _{free} (M)	n _b (mol)	r=n _b /n _p	r/[Antho] _{free} (M ⁻¹)
0.032	0.31	6.68×10^{-6}	1.96×10^{-7}	5.83×10^{-8}	1.072876	5471068
0.074	1.10	2.23×10^{-5}	1.87×10^{-6}	1.42×10^{-7}	2.61437	1398807
0.143	1.32	4.45×10^{-5}	4.85×10^{-6}	2.35×10^{-7}	4.324627	891675.8
0.093(DF=10)	14.53	1.50×10^{-4}	2.38×10^{-5}	4.70×10^{-7}	8.643691	363210.8
0.128(DF=10)	21.13	2.50×10^{-4}	4.70×10^{-5}	4.64×10^{-7}	8.531258	181364.9
0.163(DF=10)	27.74	3.50×10^{-4}	6.17×10^{-5}	8.27×10^{-7}	15.21702	246448.1
0.213(DF=10)	37.17	4.50×10^{-4}	8.27×10^{-5}	9.18×10^{-7}	16.88828	204095.1
0.293(DF=10)	52.26	6.00×10^{-4}	1.16×10^{-4}	9.64×10^{-7}	17.73016	152399.4
0.351(DF=10)	63.21	7.00×10^{-4}	1.41×10^{-4}	9.08×10^{-7}	16.71331	118772.6
0.411(DF=10)	74.53	8.00×10^{-4}	1.66×10^{-4}	8.17×10^{-7}	15.04039	90649.96



Σχήμα 6.42: Γραφική παράσταση Scatchard ανθοκυανινών – WPI σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

Πίνακας 6.19: Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης WPI-ανθοκυανινών σε pH=4 από το πείραμα διαπίδυσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.18 και υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι σταθερή και ίση με 5.435×10^{-6} M ($n_p = C_p \cdot V_{in} = 5.435 \cdot 10^{-8}$ M).

Απορρόφηση (518.5 nm)	Canthocyanin (mg/L)	[Anthocyanin] _{total} (M)	[Antho] _{free} (M)	n _b (mol)	r=n _b /n _p	r/[Antho] _{free} (M ⁻¹)
0.003	0.49	6.68×10^{-6}	1.11×10^{-6}	1.79×10^{-7}	3.294	2960651
0.006	1.80	2.23×10^{-5}	4.01×10^{-6}	2.87×10^{-7}	5.281	1317859
0.0123	13.30	4.45×10^{-5}	2.97×10^{-5}	3.29×10^{-7}	6.054	203866.7
0.009 (DF=10)	22.00	1.50×10^{-4}	4.90×10^{-5}	5.69×10^{-7}	10.467	213715.8
0.012 (DF=10)	30.00	2.50×10^{-4}	6.68×10^{-5}	8.67×10^{-7}	15.946	238761.1
0.016 (DF=10)	40.00	3.50×10^{-4}	8.90×10^{-5}	9.89×10^{-7}	18.194	204323.8
0.021 (DF=10)	57.90	4.50×10^{-4}	0.000129	9.09×10^{-7}	16.722	129511.8
0.030 (DF=10)	70.10	6.00×10^{-4}	0.000156	8.56×10^{-7}	15.741	101012



Σχήμα 6.43: Γραφική παράσταση Scatchard συστήματος ανθοκυανινών - WPI από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm.

Από το διάγραμμα Scatchard στο σχήμα 6.42 με βάση την απορρόφηση στα 276 nm παρατηρούμε μείωση του όρου $r/[Antho]_{free}$ μέχρι το σημείο όπου το r ισούται με 8-10. Σε μεγαλύτερο r οι τιμές $r/[Antho]_{free}$ είναι περίπου μηδενικές στα πλαίσια του σφάλματος. Με μια

πρώτη εκτίμηση από την αποτέμνουσα της εφαιπτομένης του διαγράμματος στον άξονα x , μπορεί να υπολογιστεί η παράμετρος n (αριθμός θέσεων πρόσδεσης), η οποία είναι περίπου ίση με 8-10. Αντίστοιχα από το διάγραμμα Scatchard στο Σχήμα 6.43 με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm, καταλήγουμε περίπου στα ίδια συμπεράσματα. Το διάγραμμα αυτό όπως και στην περίπτωση της BSA δεν είναι αρκετά αξιόπιστο, λόγω της χαμηλής απορρόφησης των ανθοκυανινών στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, ωστόσο είναι μια επιπλέον επιβεβαίωση του αριθμού θέσεων πρόσδεσης. Λόγω της μορφής των δύο αυτών διαγραμμάτων, η οποία δεν είναι γραμμική όπως παρατηρείται στην απλούστερες περιπτώσεις και λόγω αδυναμίας εφαρμογής του μοντέλου δύο θέσεων πρόσδεσης το οποίο δεν ισχύει στην περίπτωση της WPI, απαιτείται η κατασκευή διαγραμμάτων Hill.

6.8.3.2 Διαγράμματα Hill

Από τα διαγράμματα Scatchard ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης είναι περίπου ίσος με 8-10. Γι' αυτό κατασκευάστηκαν διαγράμματα Hill σε αυτό το εύρος τιμών n με βάση την απορρόφηση των ανθοκυανινών στα 276 nm. Τα διαγράμματα Hill του συστήματος WPI-ανθοκυανίνες παρουσιάζονται στο παράρτημα (Π.8). Στον Πίνακα 6.20 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα διαγράμματα Hill με βάση την απορρόφηση στα 276, θέτοντας διαφορετικές τιμές n . Παρατηρούμε ότι καθώς αυξάνουμε την τιμή n , η γραμμικότητα (R^2) αυξάνεται όμως ο συντελεστής Hill μειώνεται. Αυτό οφείλεται στην μέτρια ποιότητα των πειραματικών σημείων, ενώ ίσως ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης να είναι ίσος με χαμηλότερα τα n και όχι με τα ψηλότερα n που δοκιμάστηκαν. Επίσης από τους συντελεστές Hill ($\alpha_H > 1$) φαίνεται ότι στην αλληλεπίδραση με την WPI, όταν ένα μόριο ανθοκυανίνης ροφηθεί στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, διευκολύνεται η πρόσδεση των υπόλοιπων μορίων.

Πίνακας 6.20: Σύνοψη αποτελεσμάτων αλληλεπίδρασης WPI-ανθοκυανινών σε pH=4 από τα διαγράμματα Hill.

n	R ²	$\alpha_H \pm \Delta(\alpha_H)$	α_H (*2.303)	K _d (M)	LogK _d ± Δ(LogK _d)	K _A (M)	LogK _A ± Δ(LogK _A)
9	0.9347	0.89 ± 0.72	2.0497	1.180x10 ⁻⁵	-4.92 ± 4.01	3.085x10 ⁻⁶	-5.51 ± 6.30
10	0.9721	0.71 ± 0.36	1.635	1.812x10 ⁻⁴	-3.74 ± 2.04	5.445x10 ⁻⁶	-5.26 ± 3.95
11	0.9844	0.64 ± 0.24	1.474	5.861x10 ⁻⁴	-3.23 ± 1.36	8.345x10 ⁻⁶	-5.07 ± 2.88
12	0.9901	0.59 ± 0.18	1.359	1.219x10 ⁻³	-2.91 ± 1.00	1.204x10 ⁻⁵	-4.92 ± 2.26
13	0.9930	0.56 ± 0.14	1.289	2.057x10 ⁻³	-2.70 ± 0.80	1.664x10 ⁻⁵	-4.78 ± 1.87
14	0.9947	0.54 ± 0.12	1.244	3.073x10 ⁻³	-2.51 ± 0.67	2.234x10 ⁻⁵	-4.65 ± 1.62
15	0.9956	0.52 ± 0.10	1.196	4.242x10 ⁻³	-2.37 ± 0.59	2.921x10 ⁻⁵	-4.53 ± 1.45

Οι σταθερές Hill (K_A) μπορούν να συγκριθούν με τις σταθερές πρόσδεσης (K) από τον φθορισμό. Εάν υποθέσουμε ότι ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης είναι ίσος με 10 προκύπτει σταθερά Hill (1.8 ± 16.7)x10⁵ M⁻¹ (276 nm). Από τα πειράματα φθορισμού οι σταθερές πρόσδεσης είναι (9.4 ± 10.6) x10⁴ M⁻¹ (λογαριθμικό διάγραμμα S-V) και (7.9 ± 11.3)x10⁴ M⁻¹ (μη γραμμική παλινδρόμηση). Παρατηρούμε ότι οι σταθερές που υπολογίστηκαν με τις δύο μεθόδους είναι στην ίδια τάξη μεγέθους.

6.8.4 Πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών στην παρουσία χιτοζάνης σε pH=4

Στο πείραμα διαπίδυσης διαλύματα χιτοζάνης-ανθοκυανινών (10mL) βυθίστηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH=4 (11mL). Η διάχυση των ανθοκυανινών αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την απορρόφηση του προϊόντος διαπίδυσης στα 276 και 518.5 nm μετά από 72 ώρες από την έναρξη του πειράματος. Όπου χρειαζόταν γινόταν 10 φορές αραίωση (DF=10) για μέτρηση απορρόφησης. Η συγκέντρωση της «ελεύθερης» ανθοκυανίνης σε mg/L υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας καμπύλη βαθμονόμησης και στη συνέχεια μετατράπηκε σε mol/L με βάση το μοριακό βάρος της cyanidine-3-glucoside. Λόγω των χαμηλών απορροφήσεων του προϊόντος διαπίδυσης στα 518.5 nm, η ανάλυση του συστήματος χιτοζάνης-ανθοκυανίνης πραγματοποιήθηκε μόνο με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

Η χιτοζάνη ως πολυμερές έχει ειδικά στατιστικά χαρακτηριστικά που είναι αρκετά διαφορετικά από τις καταστάσεις που περιγράφηκαν προηγουμένως για την BSA και την WPI. Σε τέτοια

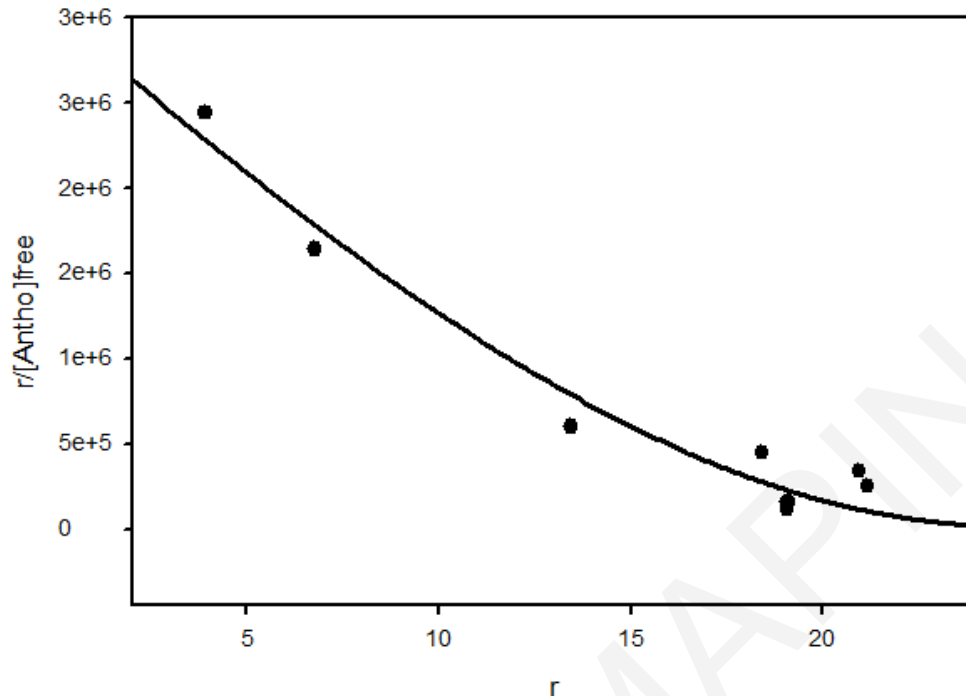
συστήματα τα διαγράμματα Scatchard περιγράφονται από θεωρία η οποία αναπτύχθηκε από τους J.D. McGhee και P.H.von Hippel (1974). Για να υπολογιστεί η συμπεριφορά πρόσδεσης στο μακρομόριο σε τέτοιες περιπτώσεις συστημάτων χρησιμοποιείται η εξίσωση 4.23.

$$v/(L) = \frac{N(1-lv/N)}{k} \left(\frac{1-lv/N}{1-(l-1)v/N} \right)^{l-1} \quad \text{(Εξίσωση 4.23)}$$

Στον Πίνακα 6.21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού με απορρόφηση του προϊόντος διαπίδωσης στα 276 nm. Από τα αποτελέσματα αυτά κατασκευάζεται το διάγραμμα Scatchard $r/[\text{Antho}]_{\text{free}}$ ως προς r . Το διάγραμμα Scatchard έπειτα από μοντελοποίηση με βάση την εξίσωση 4.23, παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.44. Από την προσαρμογή της εξίσωσης 4.23 προκύπτει ότι $\ell = 20.8 \pm 1.3$ και $k = (2.07 \pm 0.15) \times 10^{-4} \text{ M}$.

Πίνακας 6.21: Αποτελέσματα αλληλεπίδρασης χιτοζάνης - ανθοκυανινών σε pH=4 από το πείραμα διαπίδωσης, χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.23 και υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm. Η συγκέντρωση της χιτοζάνης είναι σταθερή και ίση με $8.33 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($n_p = C_p \cdot V_{in} = 8.33 \cdot 10^{-8} \text{ M}$).

Απορρόφηση (276 nm)	$C_{\text{anthocyanin}}$ (mg/L)	$[\text{Anthocyanin}]_{\text{total}}$ (M)	$[\text{Antho}]_{\text{free}}$ (M)	n_b (mol)	$r = n_b/n_p$	$r/[\text{Antho}]_{\text{free}}$ (M^{-1})
0.054	0.72	2.23×10^{-5}	1.60×10^{-6}	3.25×10^{-7}	3.897	2442117
0.114	1.85	4.45×10^{-5}	4.12×10^{-6}	5.63×10^{-7}	6.756	1641497
0.069 DF=10	10.06	1.50×10^{-4}	2.24×10^{-5}	1.12×10^{-6}	13.442	600440.1
0.114 DF=10	18.39	2.50×10^{-4}	4.09×10^{-5}	1.53×10^{-6}	18.414	449645.2
0.163 DF=10	27.74	3.50×10^{-4}	6.18×10^{-5}	1.74×10^{-6}	20.944	339210.7
0.217 DF=10	38.02	4.50×10^{-4}	8.46×10^{-5}	1.76×10^{-6}	21.169	250110.2
0.304 DF=10	54.43	6.00×10^{-4}	1.21×10^{-4}	1.59×10^{-6}	19.098	157605.6
0.334 DF=10	59.91	7.00×10^{-4}	1.33×10^{-4}	1.59×10^{-6}	19.075	113951.7



Σχήμα 6.44: Γραφική παράσταση Scatchard συστήματος χιτοζάνης-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4.

Αρχικά, υποθέτουμε ότι ένα μακρομόριο χιτοζάνης περιλαμβάνει κατά μέσον όρο 660 (N) ταυτόσημες επαναλαμβανόμενες μονάδες σακχάρων ($N=120\ 000/180$). Ο υποκαταστάτης L, δηλαδή οι ανθοκυανίνες, αλληλεπιδρούν με $\ell=20.8 \pm 1.3$ μονάδες της αλυσίδας του μακρομορίου, ο κορεσμός του μακρομορίου με L οδηγεί σε $31 (N / \ell)$ προσδεδεμένα μόρια υποκαταστάτη ανά αλυσίδα. Ο υποκαταστάτης θεωρείται ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει με οποιοσδήποτε ℓ γειτονικές μονάδες της αλυσίδας. Η αρχικά κενή αλυσίδα περιέχει $640 (N-\ell+1)$ πιθανές θέσεις που μπορεί να καταλάβει ο πρώτος υποκαταστάτης. Έτσι, κατά την έναρξη της τιτλοδότησης με υποκαταστάτη, υπάρχουν πολλές περισσότερες πιθανές θέσεις από τις θέσεις N/ℓ που μπορούν να καταληφθούν σε κατάσταση κορεσμού.

Η σταθερά πρόσδεσης που προέκυψε για την αλληλεπίδραση της χιτοζάνης με τις ανθοκυανίνες από το διάγραμμα B-H είναι ίση με $21600 \pm 11000 \text{ M}^{-1}$. Η σταθερά πρόσδεσης k που προέκυψε από τα Scatchard Plots είναι $5000 \pm 350 \text{ M}^{-1}$. Παρατηρούμε ότι οι σταθερές βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους, ωστόσο δεν μπορούν να συγκριθούν απόλυτα, καθώς δεν αποδίδουν ακριβώς την ίδια αλληλεπίδραση.

6.9 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)

Τα πειράματα Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC) είχαν ως σκοπό τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών από βατόμουρα με τις πρωτεΐνες BSA και WPI και τη διερεύνηση συμπεριφοράς συσσωμάτωσης μεγαλύτερης κλίμακας. Η θερμιδομετρία ITC χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της συγγένειας πρόσδεσης και των μεταβολών της ενθαλπίας που σχετίζονται με τις αλληλεπιδράσεις των προαναφερθέντων μορίων.

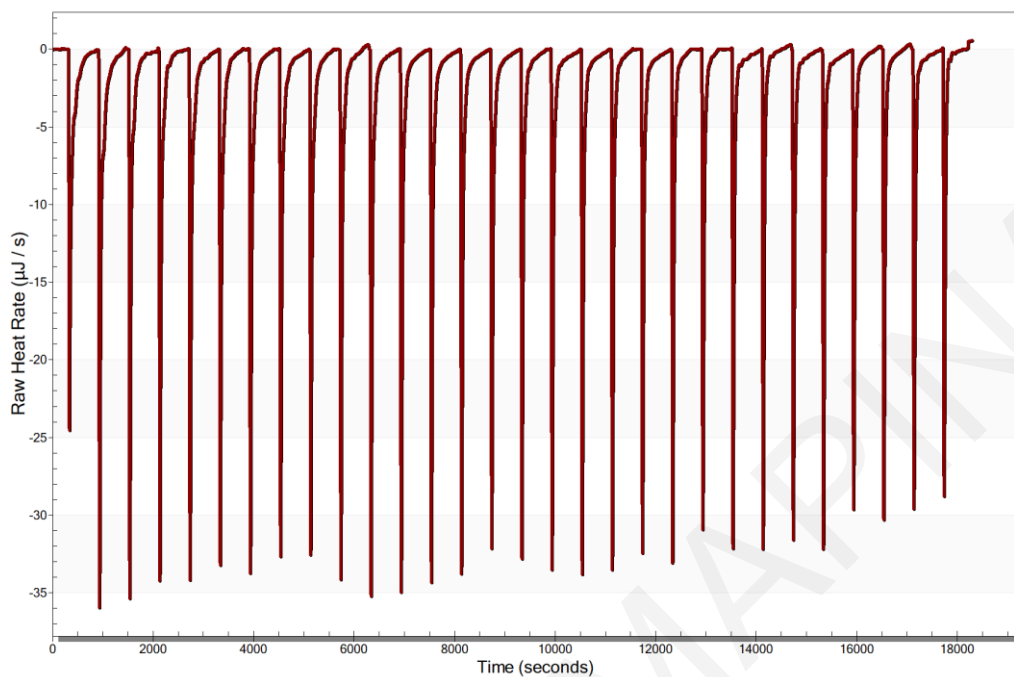
Στα πειράματα θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης οι πρωτεΐνες τοποθετούνται στην κυψελίδα ITC ενώ οι ανθοκυανίνες εγχέονται σε αυτό το διάλυμα χρησιμοποιώντας μια σύριγγα. Η θερμότητα της αλληλεπίδρασης που προκύπτει από την αντίδραση πρέπει να διορθωθεί ως προς τη θερμότητα αραιώσης τόσο των ανθοκυανινών όσο και της πρωτεΐνης:

$$Q_{tot} = Q_r - Q_{dil,Antho} - Q_{dil,P} - Q_{w,w} \quad (\text{Εξίσωση 4.16})$$

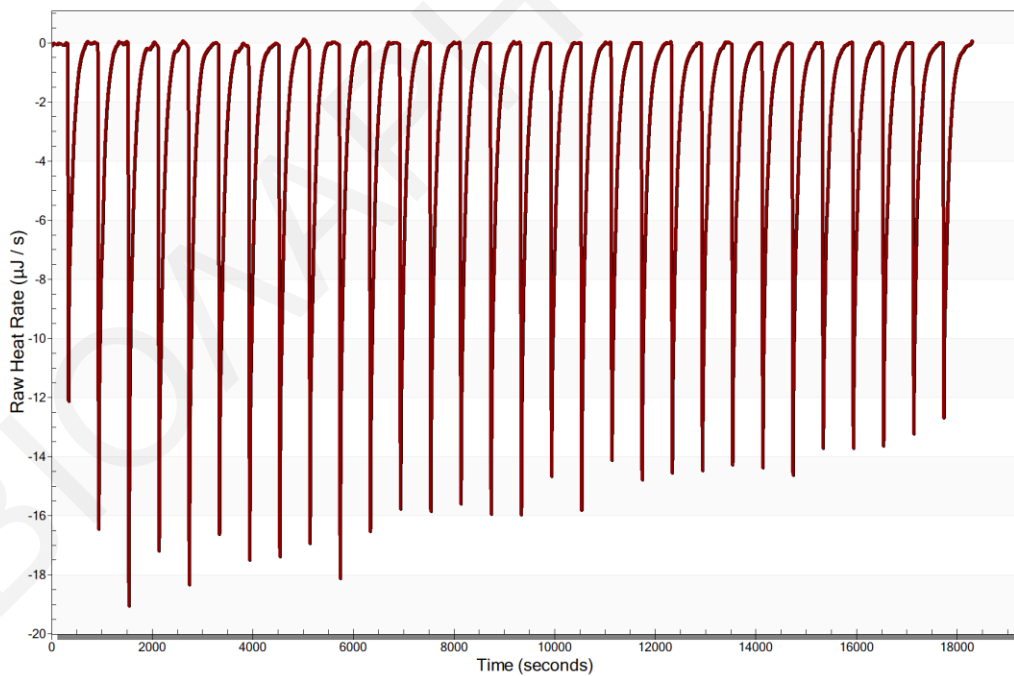
Στην εξίσωση 4.16 το Q_r είναι η θερμότητα της αντίδρασης μεταξύ του διαλύματος ανθοκυανίνης στη σύριγγα και του διαλύματος πρωτεΐνης στην κυψελίδα. Όταν ένα διάλυμα ανθοκυανίνης εγχέεται σε καθαρό νερό στην κυψελίδα, λαμβάνεται η θερμότητα $Q_{dil,Antho}$, η οποία μπορεί να είναι αρκετά σημαντική λόγω του υψηλού λόγου αραιώσης σε κάθε έγχυση. Το $Q_{dil,P}$ λαμβάνεται όταν εγχέεται νερό από τη σύριγγα στο διάλυμα πρωτεΐνης που βρίσκεται στην κυψελίδα και συχνά μπορεί να αγνοηθεί. Ο όρος $Q_{w,w}$ (θερμότητα κατά την έγχυση νερού σε νερό) είναι συνήθως αμελητέος και παρέχει μέτρο του θορύβου του οργάνου. Το Q_{tot} μεταφράζεται σε διαφορική ενθαλπία της αντίδρασης, ΔH_r , διαιρώντας με τα γραμμομόρια που εγχέονται σε κάθε ένεση. Στη συνέχεια λαμβάνεται ένα θερμογράμμα με γραφική παράσταση του ΔH_r ως συνάρτηση της «τρέχουσας» γραμμομοριακής αναλογίας της ανθοκυανίνης προς την πρωτεΐνη στο διάλυμα της κυψελίδας.

6.9.1 Μελέτη αλληλεπίδρασης ανθοκυανινών με BSA σε pH=4

Τα μη επεξεργασμένα δεδομένα που λαμβάνονται από το ITC είναι σε μορφή θερμογράμματος, δηλαδή λαμβάνεται η γραφική παράσταση της ισχύος ως προς το χρόνο. Στο Σχήμα 6.45 παρουσιάζεται το θερμογράμμα αλληλεπίδρασης διαλύματος 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.03mM BSA και στο Σχήμα 6.46 το αντίστοιχο θερμογράμμα για την αραιώση της ανθοκυανίνης.

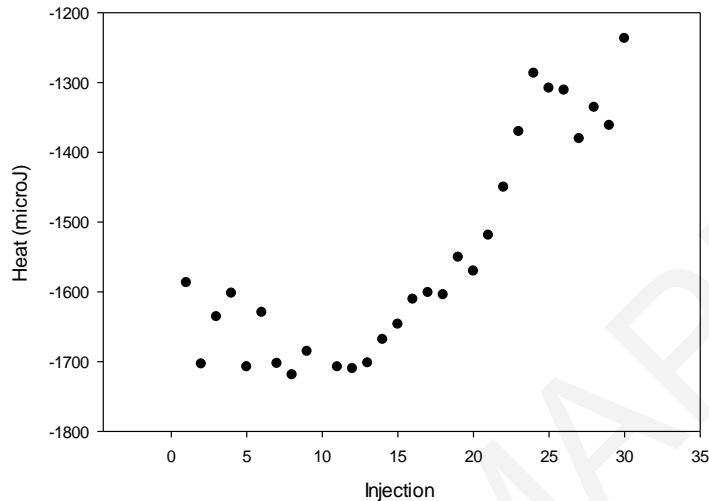


Σχήμα 6.45: Θερμόγραμμα αντίδρασης 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.03mM BSA σε pH=4.



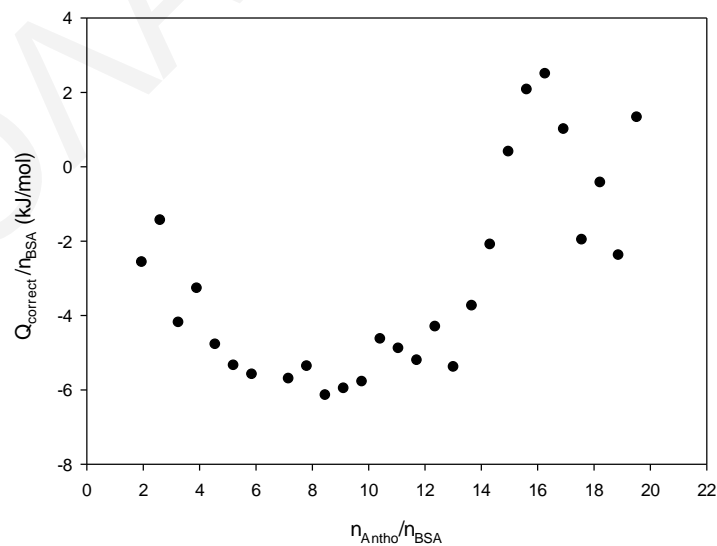
Σχήμα 6.46: Θερμόγραμμα αραίωσης 2.4mM ανθοκυανίνης.

Στη συνέχεια οι κορυφές των θερμογραμμάτων ολοκληρώνονται από το όργανο ITC και λαμβάνεται η τιμή της θερμότητας ανά έγχυση. Οι θερμότητες ανά έγχυση για την αλληλεπίδραση 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.03mM BSA παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.47.



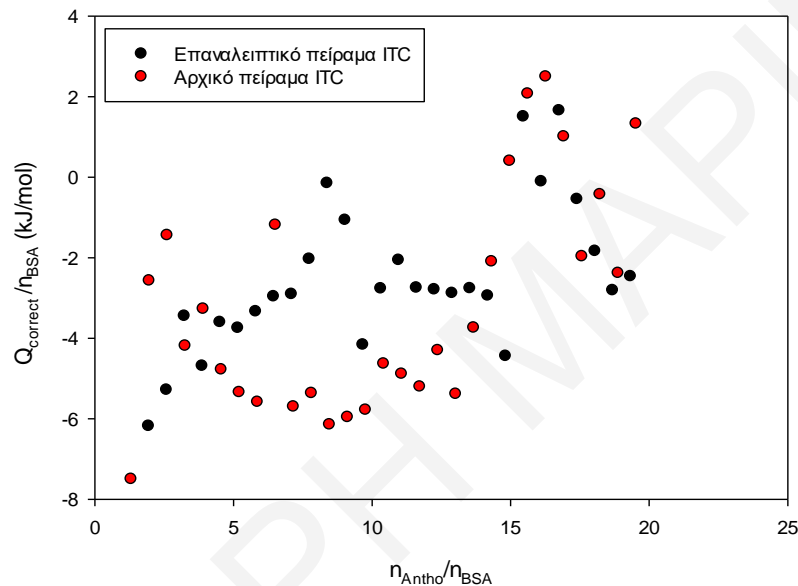
Σχήμα 6.47: Θερμότητα ανά έγχυση όπως προκύπτει από την ολοκλήρωση των κορυφών του θερμογράμματος του Σχ. 6.45.

Η διορθωμένη θερμότητα αλληλεπίδρασης κάθε έγχυσης προκύπτει όπως περιγράφηκε πιο πάνω από την αφαίρεση των τριών διορθωτικών πειραμάτων αραίωσης από τη θερμότητα αλληλεπίδρασης της αντίδρασης. Πιο κάτω παρουσιάζεται ενδεικτικά το διάγραμμα διορθωμένης θερμότητας ανά mol μορίου που εγχέεται ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία της αντίδρασης.



Σχήμα 6.48: Διορθωμένη θερμότητα αλληλεπίδρασης 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.03mM BSA σε pH=4. Η θερμότητα εκφράζεται αν mol πρωτεΐνης στο διάλυμα.

Μετά από τη διόρθωση παρατηρούμε ότι προκύπτει διάγραμμα με αρκετά μικρές θερμότητες που υποδεικνύουν την ύπαρξη μάλλον ασθενών αλληλεπιδράσεων. Αφαιρώντας τις τιμές θερμότητας της αραίωσης από τις θερμότητες της αντίδρασης προκύπτουν αυτές οι μικρές τιμές, επειδή οι τιμές των θερμοτήτων της αντίδρασης και των θερμοτήτων της αραίωσης είναι πολύ κοντινές και έχουν διακυμάνσεις. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε εκ νέου και τα συγκριτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα που ακολουθεί.



Σχήμα 6.49: Σύγκριση πειραμάτων αλληλεπίδρασης 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.03mM BSA σε pH=4.

Παρατηρούμε ότι τα δύο πειράματα ITC συμφωνούν ως προς το γεγονός ότι έχουν μετρηθεί πολύ μικρές θερμότητες. Οι τιμές της διορθωμένης θερμότητας που προκύπτουν είναι κοντά στο μηδέν και παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις, που στην περίπτωση του δεύτερου πειράματος απαγορεύουν τη θεωρητική ανάλυση.

6.9.1.1 Εξαγωγή θερμοδυναμικών παραμέτρων

Για την εξαγωγή των θερμοδυναμικών παραμέτρων n , K και ΔH χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο για n ισοδύναμες θέσεις πρόσδεσης για την ανθοκυανίνη πάνω σε κάθε μόριο πρωτεΐνης, όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 4.3.2 [Brown et al (2009)] :

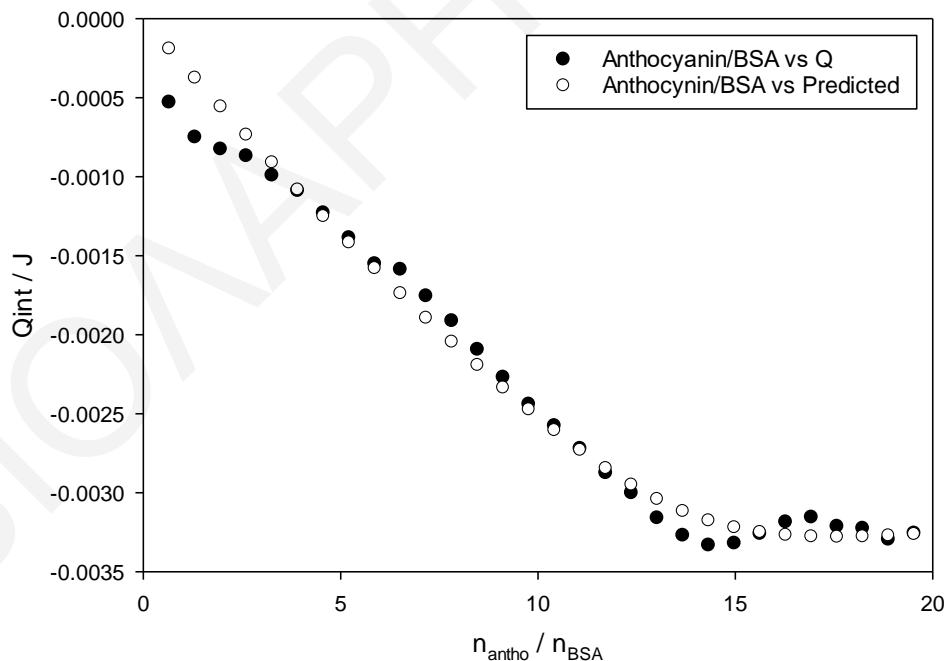
$$Q = \frac{n [M]_t V_o \Delta H}{2} \left[1 + \frac{[L]_t}{n[M]_t} + \frac{1}{c} - \sqrt{\left(1 + \frac{[L]_t}{n[M]_t} + \frac{1}{c} \right)^2 - \frac{4[L]_t}{n[M]_t}} \right] \quad (\text{Εξίσωση 4.17})$$

όπου το c είναι μια παράμετρος χωρίς μονάδες που ορίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$c = nK_b [M]_t = n \frac{[M]_t}{K_d} \quad (\text{Εξίσωση 4.18})$$

όπου K_b είναι η σταθερά πρόσδεσης και K_d είναι η σταθερά διάσπασης του συμπλόκου ($K_d=1/K_b$) και οι υπόλοιπες ποσότητες στην Εξ. 4.17 περιγράφονται στο θεωρητικό μέρος. Η Εξ. (4.17) περιγράφει την ολοκληρωτική θερμότητα της αντίδρασης, που υπολογίζεται από αθροίσματα των διαφορικών θερμοτήτων του Σχ. 6.48.

Τα αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων του Σχ. 6.48 παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.50.

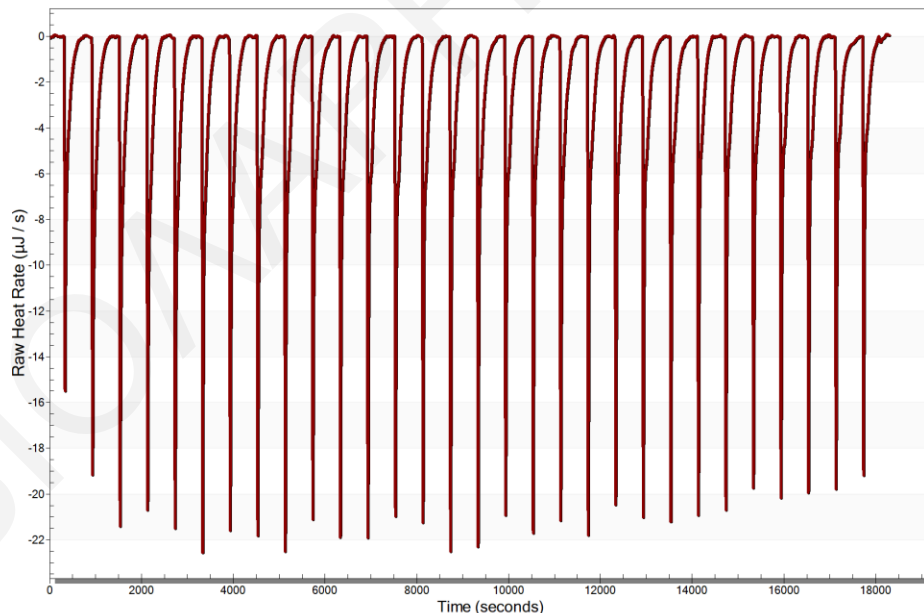


Σχήμα 6.50: Διάγραμμα ολοκληρωτικής θερμότητας ως προς το γραμμομοριακό λόγο ανθοκυανίνης/BSA έπειτα από προσαρμογή του μοντέλου για η ισοδύναμες θέσεις πρόσδεσης για την ανθοκυανίνη πάνω σε κάθε μόριο πρωτεΐνης. Αλληλεπίδραση 2.4mM ανθοκυανίνη με 0.03mM BSA σε pH=4.

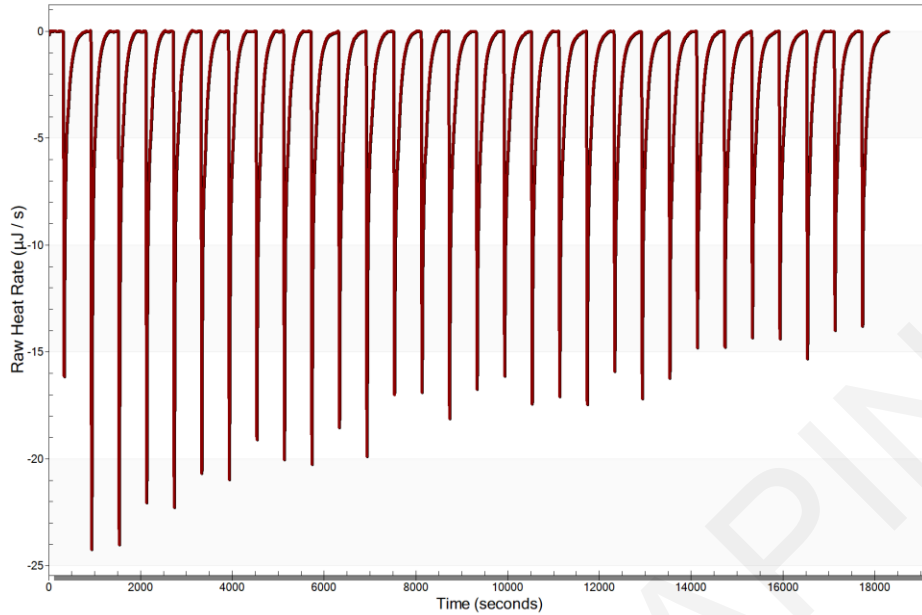
Οι παράμετροι που προκύπτουν από το μοντέλο ενός τύπου ισοδύναμων θέσεων πρόσδεσης είναι: $n = 14.2 \pm 0.5$ (μόρια ανθοκυανίνης ανά μόριο BSA), $\Delta H = -10.0 \pm 0.4$ kJ/mol και $K_b = (1.9 \pm 1.8) \times 10^5$ M⁻¹. Η σταθερά K_b δεν προκύπτει με ακρίβεια, επειδή τα δεδομένα για τις διαφορικές θερμότητες δεν έχουν τη μορφή καλής σιγμοειδούς καμπύλης, ωστόσο η τάξη μεγέθους βρίσκεται σε συμφωνία με τις άλλες μεθόδους. Η τιμή της ενθαλπίας πρόσδεσης (ΔH) που προκύπτει είναι μικρή (εξώθερμη αντίδραση), που αποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση ανθοκυανινών και BSA βασίζεται σε ασθενείς διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης n είναι σε ικανοποιητική συμφωνία με τη μέθοδο διαπίδυσης και δείχνει ότι πολλά μόρια συμμετέχουν στην πρόσδεση.

6.9.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης ανθοκυανινών με WPI σε pH=4

Στο σχήμα 6.51 παρουσιάζεται το θερμόγραμμα αλληλεπίδρασης διαλύματος 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.027mM WPI και στο Σχήμα 6.52 η θερμότητα αραιώσης της ανθοκυανίνης.

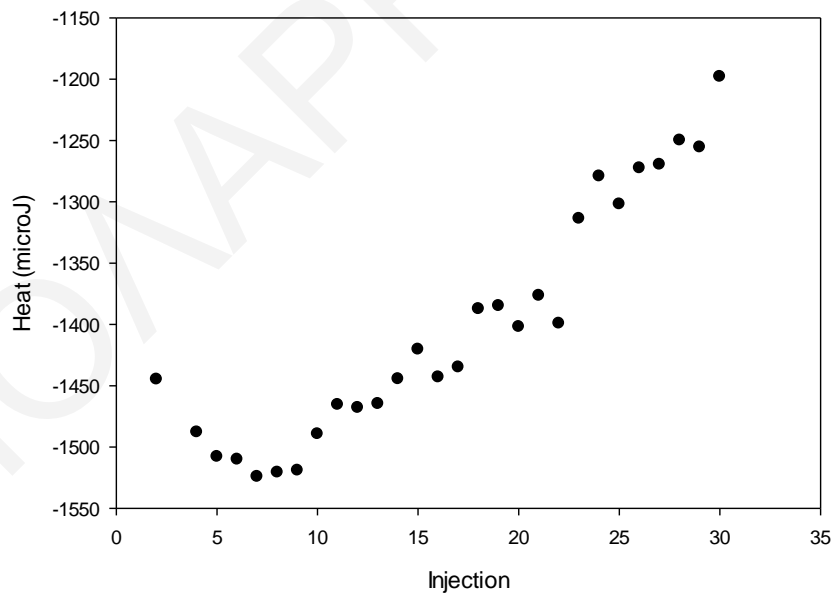


Σχήμα 6.51: Θερμόγραμμα αντίδρασης 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.027mM WPI σε pH=4.



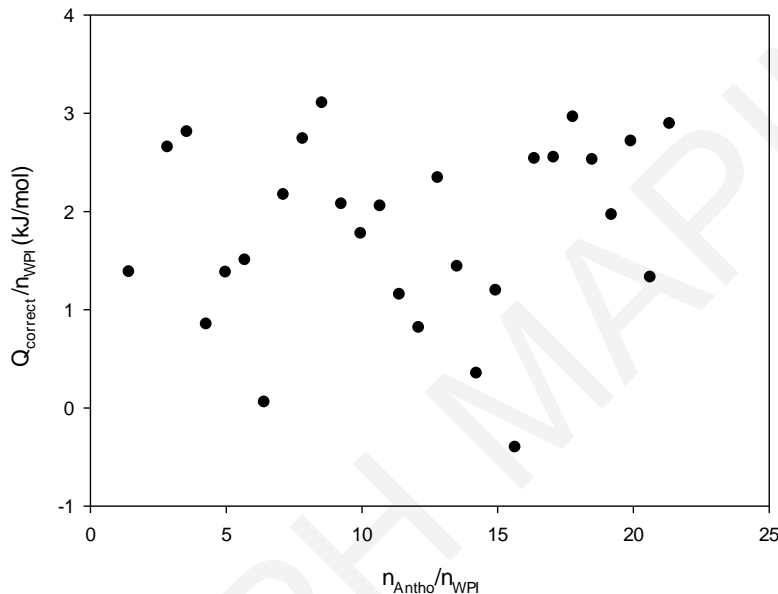
Σχήμα 6.52: Θερμόγραμμα αραιώσης 2.4mM ανθοκυανίνης.

Οι θερμότητες ανά έγχυση για την αλληλεπίδραση 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.027mM WPI παρουσιάζονται στο σχήμα 6.53.



Σχήμα 6.53: Θερμότητα ανά έγχυση όπως προκύπτει από την ολοκλήρωση των κορυφών του θερμογράμματος του Σχ. 6.51.

Η διορθωμένη θερμότητα αλληλεπίδρασης κάθε έγχυσης προκύπτει όπως περιγράφηκε προηγουμένως από την αφαίρεση των τριών διορθωτικών πειραμάτων αραίωσης από τη θερμότητα αλληλεπίδρασης της αντίδρασης. Πιο κάτω παρουσιάζεται ενδεικτικά το διάγραμμα διορθωμένης θερμότητας ανά mol μορίου που εγχέεται ως προς τη γραμμομοριακή αναλογία της αντίδρασης.



Σχήμα 6.54: Διορθωμένη θερμότητα αλληλεπίδρασης 2.4mM ανθοκυανίνης με 0.027mM WPI σε pH=4.

Μετά από την αφαίρεση των τριών θερμοτήτων διόρθωσης από τις θερμότητες της αντίδρασης παρατηρούμε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ανθοκυανινών και της WPI είναι πολύ ασθενείς. Οι τιμές των θερμοτήτων (kJ/mol) είναι πολύ μικρές και παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις. Από το συγκεκριμένο πείραμα δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε πιθανή τιμή μοριακής αναλογίας πρωτεΐνης/ανθοκυανίνης, στην οποία οι αλληλεπιδράσεις μηδενίζονται.

Γενικά, ενώ τα θερμογράμματα των επί μέρους πειραμάτων παρουσιάζουν σταθερό υπόβαθρο και ομαλές κορυφές, μετά την αφαίρεση της θερμότητας που προκύπτει από την αραίωση της ανθοκυανίνης λαμβάνονται διορθωμένα διαγράμματα τα οποία παρουσιάζουν μικρές θερμότητες και έντονες διακυμάνσεις. Αυτό ίσως οφείλεται στα εκχυλίσματα των ανθοκυανινών τα οποία έχουν περίπλοκη σύσταση και περιέχουν πολλές προσμίξεις. Η μορφή των πειραματικών δεδομένων του Σχ. 6.54 δεν επιτρέπει την εφαρμογή θερμοδυναμικού μοντέλου για την εξαγωγή παραμέτρων αλληλεπίδρασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Ανακεφαλαίωση, Συμπεράσματα και Μελλοντική Εργασία

7.1 Ανακεφαλαίωση των κυριότερων αποτελεσμάτων

Σκοπός της παρούσας διατριβής μάστερ ήταν η μελέτη αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών, οι οποίες απομονώνονται από φυτικές πρώτες ύλες, με βιομόρια που χρησιμοποιούνται στα τοιχώματα πολυστρωματικών γαλακτωμάτων. Μελετώντας τα βασικά φασματικά χαρακτηριστικά των ανθοκυανινών, σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να εξεταστεί πως τα είδη αυτά αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες και τους πολυσακχαρίτες με απώτερο στόχο τη σταθεροποίησή τους σε υδατικά διαλύματα. Οι μελέτες διεξάχθηκαν με βασικές μεθόδους: τη φασματοσκοπία UV-vis, τη φασματοσκοπία φθορισμού (απόσβεση, ενίσχυση και σύγχρονος), τον κυκλικό διχρωισμό, τη διαπίδυση και τη θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC). Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δημιουργείται για πρώτη φορά μια πληρέστερη εικόνα για τις αλληλεπιδράσεις μιγμάτων ανθοκυανινών σε υδατικό διάλυμα με συγκεκριμένες πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, που χρησιμοποιούνται σε γαλακτώματα στην τεχνολογία τροφίμων.

7.1.1 Ανακεφαλαίωση φασματικών χαρακτηριστικών των ανθοκυανινών

Η απομόνωση των ανθοκυανινών στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε από δύο φυτικές πηγές, το κόκκινο λάχανο και τα βατόμουρα. Μέσω μελέτης των φασματικών χαρακτηριστικών των εκχυλισμάτων των δύο πηγών αποδείχθηκε ότι τα εκχυλίσματα από βατόμουρα είναι απλούστερα μίγματα (λιγότερες ανθοκυανιδίνες και ανθοκυανίνες, με την υπόθεση ότι υπάρχει μόνο μια ανθοκυανιδίνη, η κυανιδίνη [*Filip et al (2012)*]) και δεν είναι ακυλιωμένα στο C-δακτύλιο. Το κόκκινο λάχανο (ανθοκυανίνες Λ) εμφανίζει περισσότερες αλλαγές χρώματος με το pH και περισσότερες κορυφές στα φάσματα UV-vis σε σχέση με τα εκχυλίσματα από βατόμουρα (ανθοκυανίνες Β). Ένα προφανές επιπλέον πλεονέκτημα των βατόμουρων ως πηγή ανθοκυανινών είναι ότι τα εκχυλίσματα έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση ανθοκυανινών κατά 30-40 φορές. Ως φυσική πηγή απομόνωσης των ανθοκυανινών, για την μελέτη της αλληλεπίδρασης με τα βιομόρια χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια τα βατόμουρα και όχι το κόκκινο λάχανο.

Τα φάσματα φθορισμού που λήφθηκαν υποδεικνύουν ότι μπορούν να διακριθούν τουλάχιστον τρεις ζώνες φθορισμού στα εξεταζόμενα εκχυλίσματα, σε συμφωνία με τη μελέτη των *Drabent et al (1999)*. Όσον αφορά την επίδραση του pH (3 και 6), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές τόσο στα μήκη κύματος εκπομπής όσο και στις εντάσεις των κορυφών. Τα φάσματα φθορισμού των ανθοκυανινών δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα περιέχουν πολλά φθορίζοντα συστατικά, τα οποία μπορεί να είναι διαφορετικές ενώσεις ανθοκυανίνης, άλλες φθορίζουσες ενώσεις που υπάρχουν στα εκχυλίσματα, διαφορετικές ιοντικές και ταυτομερείς μορφές αυτών των ενώσεων, ή διαφορετικά κέντρα φθορισμού που δημιουργούνται από μόρια της ίδιας της ένωσης ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης με το μικροπεριβάλλον [*Drabent et al (1999)*].

7.1.2 Ανακεφαλαίωση αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη φασματοσκοπία φθορισμού

7.1.2.1 Αλληλεπίδραση ανθοκυανινών με πρωτεΐνες

Στην παρούσα διατριβή τα στατικά φάσματα φθορισμού που λήφθηκαν στη μελέτη φθορισμού των πρωτεϊνών παρουσία ανθοκυανινών, διορθώθηκαν για το inner-filter effect. Οι σταθερές K_{sv} , που υπολογίστηκαν από τα διαγράμματα S-V, μειώθηκαν σημαντικά έπειτα από τη διόρθωση για το inner-filter effect, το οποίο υποδεικνύει τη σημαντικότητα αυτής της διόρθωσης. Με βάση τη σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer, φαίνεται ότι οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με την BSA και το καζεϊνικό νάτριο και μικρότερη αλληλεπίδραση με την WPI. Από τα πειράματα σε δύο διαφορετικά pH (4 και 6), οι τιμές των σταθερών S-V είναι παραπλήσιες υποδεικνύοντας ότι ίσως το φορτίο της ανθοκυανίνης να παραμένει το ίδιο στα δύο αυτά pH, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται περαιτέρω και από τη μελέτη αλλαγής του χρώματος της ανθοκυανίνης ανάλογα με το pH όπου το ερυθρό χρώμα των ανθοκυανινών παραμένει μέχρι τιμή pH ~6.5 – 7.

Στη βιβλιογραφία [*Fu et al (2020)*, *Gong et al (2021)*, *Tang et al (2014)*] συνηθίζεται να κατασκευάζονται λογαριθμικά διαγράμματα S-V με βάση την εξίσωση 4.2, η οποία είναι προσέγγιση. Ωστόσο μετά από έλεγχο αποδείχθηκε ότι στα συγκεκριμένα συστήματα μελέτης αυτή η προσέγγιση δεν ισχύει ($[Q] \neq [Q]_{tot}$). Για έναν πιο σωστό υπολογισμό των σταθερών πρόσδεσης και του αριθμού των θέσεων πρόσδεσης κατασκευάστηκαν διαγράμματα $\text{Log}[(I_0 - I)/I]$ ως προς την συνολική συγκέντρωση της ανθοκυανίνης και εξήχθησαν οι παράμετροι πρόσδεσης

K και n με μη-γραμμική παλινδρόμηση. Οι σταθερές πρόσδεσης που υπολογίστηκαν χωρίς κάποια παραδοχή (μη γραμμική παλινδρόμηση) για την αλληλεπίδραση των ανθοκυανινών με την BSA και την WPI βρίσκονται στην ίδια τάξη μεγέθους (10^4 - 10^5 L/mol), αλλά είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες σταθερές που υπολογίστηκαν από το λογαριθμικό διάγραμμα S-V. Εξαιρέση αποτελεί η περίπτωση του καζεϊνικού νατρίου, όπου η σταθερά πρόσδεσης που λαμβάνεται από τη μη γραμμική παλινδρόμηση είναι περίπου 80 φορές μικρότερη και ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης δεν είναι ίσος με 1. Όσο αφορά τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης η για τις δύο άλλες πρωτεΐνες αυτός ήταν κοντά στο 1, το οποίο έδειξε ότι κατά μέσον όρο ένα μόριο ανθοκυανίνης αλληλεπιδρά με ένα μόριο πρωτεΐνης.

Τα φάσματα σύγχρονου φθορισμού που λήφθηκαν για τις τρεις πρωτεΐνες έδειξαν ότι η μεταβολή της υδροφοβικότητας στο περιβάλλον των καταλοίπων τρυπτοφάνης και τυροσίνης ήταν ελάχιστη και ότι οι τιμές των σταθερών απόσβεσης, πρόσδεσης και του αριθμού των θέσεων πρόσδεσης ήταν παρόμοιες με αυτές που προέκυψαν από τα κανονικά φάσματα εκπομπής.

Από τα πειράματα μελέτης φθορισμού των ανθοκυανινών Β παρουσία πρωτεϊνών στα δύο μήκη κύματος διέγερσης (330 nm και 560 nm), παρατηρήθηκε ενίσχυση του ενδογενούς φθορισμού της ανθοκυανίνης. Σε αυτή την περίπτωση η μοντελοποίηση των δεδομένων βασίζεται στην εξίσωση Benesi-Hildebrand (B-H), η οποία ισχύει για σύνδεση 1:1. Συγκρίνοντας τις σταθερές πρόσδεσης που προκύπτουν από τα διαγράμματα B-H, σε pH=4 οι ανθοκυανίνες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με την BSA, ενώ σε pH=6 παρουσιάζουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με την WPI. Παρατηρήθηκε ισχυρότερη αλληλεπίδραση στο μήκος κύματος διέγερσης των 560 nm (κορυφή εκπομπής που αντιστοιχεί στην κυανιδίνη). Στην περίπτωση του καζεϊνικού νατρίου (pH=7) λήφθηκαν τιμές σταθερών πρόσδεσης με αρκετά μεγάλα σφάλματα. Γενικά οι τιμές K που προσδιορίστηκαν από τις διεγέρσεις στα 330 και 560 nm δεν συμφωνούν μεταξύ τους, το οποίο υποδεικνύει ότι σε διαφορετικά μήκη κύματος διεγείρονται διαφορετικά μόρια, που αλληλεπιδρούν διαφορετικά με τις πρωτεΐνες.

7.1.2.2 Αλληλεπίδραση ανθοκυανινών με πολυσακχαρίτες

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες φθορισμού των ανθοκυανινών παρουσία πολυσακχαριτών, οι οποίοι δεν παρουσιάζουν φθορισμό. Με διέγερση στα 330 nm παρατηρήθηκε ενίσχυση του φθορισμού της ανθοκυανίνης και τα δεδομένα μοντελοποιήθηκαν με βάση την εξίσωση B-H. Μεταξύ των πολυσακχαριτών χιτοζάνης, πηκτίνης, αλγινικού νατρίου και θεικής χονδροϊτίνης τη μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με τις ανθοκυανίνες παρουσίασε η τελευταία γεγονός που ίσως οφείλεται στις ισχυρότερες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η μελέτη των μεταβολών του φθορισμού των ανθοκυανινών παρουσία πολυσακχαριτών δυσχεραίνεται από το γεγονός ότι δεν γνωρίζουμε τα ακριβή μοριακά βάρη των πολυμερών, εκτός από την περίπτωση της χιτοζάνης.

7.1.3 Ανακεφαλαίωση αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον κυκλικό διχρωισμό

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για ποσοτική ανάλυση των μεταβολών στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών BSA και WPI απουσία και παρουσία ανθοκυανινών. Στην περίπτωση της BSA, προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης των ανθοκυανινών οδήγησε σε μείωση του ποσοστού της α -έλικας και αύξησε το ποσοστό της τυχαίας σπείρας. Στην περίπτωση της WPI, αύξηση της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών δεν επηρέασε ιδιαίτερα την διαμόρφωση της πρωτεΐνης.

7.1.4 Ανακεφαλαίωση αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τα πειράματα διαπίδυσης

Τα πειράματα διαπίδυσης (dialysis) πραγματοποιήθηκαν για περαιτέρω μελέτη των αλληλεπιδράσεων των ανθοκυανινών με την BSA, την WPI και την χιτοζάνη. Στο πείραμα διαπίδυσης ανθοκυανινών με μέτρηση απορρόφησης στα 276 και 518.5 nm παρατηρήθηκε διαφορετική συμπεριφορά στη διέλευση από τη μεμβράνη διαπίδυσης, το οποίο δείχνει ότι ίσως πάλι ελέγχονται διαφορετικά μόρια στο μίγμα. Τα αποτελέσματα με βάση την απορρόφηση UV-vis στα 518.5 nm είναι λιγότερο αξιόπιστα.

Η κατασκευή των διαγραμμάτων Scatchard, οδηγεί μια πρώτη εκτίμηση της σημαντικής παραμέτρου n (μόρια ανθοκυανινών που αλληλεπιδρούν με ένα μόριο πρωτεΐνης ή πολυσακχαρίτη). Για την BSA από το διάγραμμα Scatchard εκτιμήθηκε ότι $n \approx 8-12$ και στη

συνέχεια μέσω κατασκευής διαγραμμάτων Hill υποδείχθηκε ότι ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης ίσως είναι λίγο μικρότερος από 10. Για την WPI από το διάγραμμα Scatchard η παράμετρος n εκτιμήθηκε περίπου ίση με 8-10 και μέσω κατασκευής διαγραμμάτων Hill μικρότερη ή ίση με 9. Οι συντελεστές Hill (α_H) ήταν μεγαλύτεροι από την μονάδα, υποδεικνύοντας ότι στην αλληλεπίδραση ανθοκυανινών με τις πρωτεΐνες υπάρχει συνεργιστικότητα. Στην περίπτωση πειράματος διαπίδυσης για τη μελέτη αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών με τη χιτοζάνη, η μαθηματική ανάλυση εναλλακτικών διαγραμμάτων Scatchard οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι ανθοκυανίνες θεωρείται ότι μπορούν να αλληλεπιδράσουν με οποιοσδήποτε 20.8 ± 1.3 γειτονικές μονάδες (μονομερή) της πολυμερικής αλυσίδας.

7.1.5 Ανακεφαλαίωση αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)

Η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης συνήθως αποτελεί ισχυρή μέθοδο, η οποία δίνει ξεκάθαρα και κατατοπιστικά αποτελέσματα για τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο στην παρούσα διατριβή μάστερ όπου μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με μίγματα ανθοκυανινών, η μέθοδος ITC σε τέτοια μίγματα δεν αποδείχθηκε ιδιαίτερα βοηθητική. Η εξαγωγή των θερμοδυναμικών παραμέτρων n , K και ΔH χρησιμοποιώντας μοντέλο για n ισοδύναμες θέσεις πρόσδεσης πραγματοποιήθηκε μόνο στην περίπτωση αλληλεπίδρασης των ανθοκυανινών με την BSA. Ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης n που υπολογίστηκε ίσος με 14.2 ± 0.5 (μόρια ανθοκυανίνης ανά μόριο BSA) συμφωνεί με τη μέθοδο διαπίδυσης ότι πολλά μόρια συμμετέχουν στην πρόσδεση. Η σταθερά πρόσδεσης $K = (1.9 \pm 1.8) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ αν και δεν προκύπτει με απόλυτη ακρίβεια, βρίσκεται σε συμφωνία με τις μεθόδους φθορισμού και διαπίδυσης.

7.2 Καταληκτικά Συμπεράσματα

Όπως φαίνεται από την παρούσα μελέτη, οι ανθοκυανίνες από φυτικά προϊόντα αλληλεπιδρούν αρκετά ισχυρά με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Τα πειράματα διαπίδυσης και ITC υποδεικνύουν ότι πολλά μόρια ανθοκυανίνης αλληλεπιδρούν ταυτόχρονα με τα βιομόρια, γεγονός που πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω, ενδεχομένως και με άλλες μεθόδους. Ιδιαίτερη

δυσκολία δημιουργεί το γεγονός ότι τα διαλύματα των ανθοκυανινών περιέχουν μίγματα μορίων, που πιθανά αλληλεπιδρούν διαφορετικά με τα βιομόρια, όπως έχει διαφανεί στις μετρήσεις φθορισμού και διαπίδυσης. Η θερμοδομετρία δείχνει ότι οι ενέργειες αλληλεπίδρασης είναι γενικά πολύ μικρές, ενισχύοντας την υπόθεση ότι η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες είναι κάποιο είδος επιφανειακής ρόφησης και όχι πρόσδεση σε ενεργά κέντρα, παρά το γεγονός ότι η διαμόρφωση της BSA μεταβάλλεται ελαφρά στην παρουσία ανθοκυανινών. Ανεξάρτητα από τις δυσκολίες που δημιουργεί η παρουσία μίγματος μορίων στα διαλύματα των ανθοκυανινών που χρησιμοποιήθηκαν, η παρούσα εργασία είναι η πρώτη βιβλιογραφικά που ελέγχει αλληλεπιδράσεις ανθοκυανινών – βιομορίων σε τέτοιο εύρος. Από την παρούσα μελέτη μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα με ποια συστατικά των γαλακτωμάτων αλληλεπιδρούν ισχυρότερα οι ανθοκυανίνες και σε ποιες αναλογίες αναμένεται να βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στις διεπιφάνειες των γαλακτωμάτων.

7.3 Μελλοντική Εργασία

Είναι πολύ σημαντικό να πραγματοποιηθούν διαδικασίες καθαρισμού και διαχωρισμού των συστατικών των ανθοκυανινών, καθώς οι ανθοκυανίνες απομονώνονται από τις διάφορες φυτικές πηγές και τα εκχυλίσματα που προκύπτουν είναι μίγματα με πολλά συστατικά, γεγονός που δυσχεραίνει την ανάλυση και καθιστά δύσκολη την προτυποποίηση των μιγμάτων τους. Επίσης η ανάλυση των φασμάτων ενίσχυσης φθορισμού με διαγράμματα Benesi-Hildebrand είναι από τις ελάχιστες μεθόδους που υπάρχουν για την ανάλυση πειραμάτων ενίσχυσης φθορισμού και θα ήταν χρήσιμο να δοκιμαστούν, να αναπτυχθούν και άλλες μέθοδοι. Μετρήσεις χρόνου ημιζωής χρονοεξαρτημένου φθορισμού των ανθοκυανινών θα έδιναν χρήσιμες πληροφορίες. Τέτοιες μετρήσεις δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες των αλληλεπιδράσεων με ισχυρές μεθόδους όπως η θερμοδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης, το NMR και η διαπίδυση, αν και όλες αυτές οι μέθοδοι ενισχύονται όταν η εργασία γίνεται με καθαρές ουσίες. Τέλος, είναι χρήσιμο να εφαρμοστούν τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής στη χρήση των ανθοκυανινών σε πολυστρωματικά γαλακτώματα για τη διατήρηση της οξειδωτικής σταθερότητας ευαίσθητων ελαίων για μακροχρόνια αποθήκευση.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Anwar, H.; Hussain, G.; Mustafa, I. Antioxidants from Natural Sources. *Antioxidants in Foods and Its Applications* **2018**.
- Atta, E. M.; Mohamed, N. H.; Abdelgawad, A. A. M. Antioxidants: An Overview On The Natural And Synthetic Types. *European Chemical Bulletin* **2017**, 6 (8), 365.
- Bhattacharyya J., Bhattacharyya M., Chakrabarty A. S., Chaudhuri U., Poddar R. K., Interaction of Chlorpromazine with Myoglobin and Hemoglobin, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 11,2049-2053.
- Bolattin, M. B.; Nandibewoor, S. T.; Joshi, S. D.; Dixit, S. R.; Chimatadar, S. A. Interaction between Carisoprodol and Bovine Serum Albumin and Effect of β -Cyclodextrin on Binding: Insights from Molecular Docking and Spectroscopic Techniques. *RSC Adv.* **2016**, 6 (68), 63463–63471.
- Brown, A. Analysis of Cooperativity by Isothermal Titration Calorimetry. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, 10 (8), 3457–3477
- Bunaciu, A. A.; Aboul-Enein, H. Y.; Fleschin, S. FTIR Spectrophotometric Methods Used for Antioxidant Activity Assay in Medicinal Plants. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2012**, 47 (4), 245–255.
- Caffall, K. H.; Mohnen, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **2009**, 344, 1879-1900.
- Cantor C. R., Schimmel P. R., Biophysical Chemistry, Vol. III (W. H. Freeman and Co, NY 1980)
- Carter, D. C.; Ho, J. X. Structure of Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.* **1994**, 45, 153–203.
- Chandrapala, J.; Zisu, B.; Palmer, M.; Kentish, S.; Ashokkumar, M. Effects of Ultrasound on the Thermal and Structural Characteristics of Proteins in Reconstituted Whey Protein Concentrate. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, 18 (5), 951–957.
- Chandrasekhar, J.; Madhusudhan, M. C.; Raghavarao, K. S. M. S. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food Bioprod. Process.* **2012**, 90, 615-623.
- Chen, X.; Parker, J.; Krueger, C. G.; Shanmuganayagam, D.; Reed, J. D. Validation of HPLC Assay for the Identification and Quantification of Anthocyanins in Black Currants. *Anal. Methods* **2014**, 6 (20), 8141–8147.
- Chigurupati, N.; Saiki, L.; Gayser, C., Jr; Dash, A. K. Evaluation of Red Cabbage Dye as a Potential Natural Color for Pharmaceutical Use. *Int. J. Pharm.* **2002**, 241 (2), 293–299.
- Corona, G.; Tang, F.; Vauzour, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J. P. E. Assessment of the Anthocyanidin Content of Common Fruits and Development of a Test Diet Rich in a Range of Anthocyanins. *J. Berry Res.* **2011**, 1 (4), 209–216.
- Credi, A.; Prodi, L. Inner Filter Effects and Other Traps in Quantitative Spectrofluorimetric Measurements: Origins and Methods of Correction. *J. Mol. Struct.* **2014**, 1077, 30–39.

- Dahlquist, F. W. The Meaning of Scatchard and Hill Plots. *Methods Enzymol.* **1978**, *48*, 270–299.
- Dangles, O.; Fenger, J. A. The Chemical Reactivity of Anthocyanins and Its Consequences in Food Science and Nutrition. *Molecules* **2018**, *23* (8).
- de Jongh, H. H.; Gröneveld, T.; de Groot, J. Mild Isolation Procedure Discloses New Protein Structural Properties of Beta-Lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* **2001**, *84* (3), 562–571.
- Drabent, R.; Pliszka, B.; Olszewska, T. Fluorescence Properties of Plant Anthocyanin Pigments. I. Fluorescence of Anthocyanins in Brassica Oleracea L. Extracts. *J. Photochem. Photobiol. B* **1999**, *50* (1), 53–58.
- Drabent, R.; Pliszka, B.; Huszcza-Ciołkowska, G.; Smyk, B. Ultraviolet Fluorescence of Cyanidin and Malvidin Glycosides in Aqueous Environment. *Spectrosc. Lett.* **2007**, *40* (1), 165–182.
- Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* **2001**, *00* (1), F1.3.1-F1.3.13.
- Fallourd, M. J.; Viscione, L. Ingredient Selection for Stabilisation and Texture Optimisation of Functional Beverages and the Inclusion of Dietary Fibre. In *Functional and Speciality Beverage Technology*; Elsevier. **2009**, 3–38.
- Fan-Chiang, H.-J.; Wrolstad, R. E. Anthocyanin Pigment Composition of Blackberries. *J. Food Sci.* **2006**, *70* (3), C198–C202
- Fee, C. J.; Billakanti, J. M.; Saufi, S. M. Methods for Purification of Dairy Nutraceuticals. In *Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*; Elsevier, **2013**; pp 450–482.
- Fernandes, A.; Oliveira, J.; Fonseca, F.; Ferreira-da-Silva, F.; Mateus, N.; Vincken, J. P.; de Freitas, V. Molecular Binding between Anthocyanins and Pectic Polysaccharides – Unveiling the Role of Pectic Polysaccharides Structure. *Food Hydrocoll.* **2020**, *102* (September 2019).
- Filip, M.; Vlassa, M.; Copaciu, F.; Coman, V. Identification of Anthocyanins and Anthocyanidins from Berry Fruits by Chromatographic and Spectroscopic Techniques to Establish the Juice Authenticity from Market. *J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC* **2012**, *25* (6), 534–541.
- Fonin, A. V.; Sulatskaya, A. I.; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K. Fluorescence of Dyes in Solutions with High Absorbance. Inner Filter Effect Correction. *PLoS One* **2014**, *9* (7), e103878.
- Freyer, M. W.; Lewis, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods Cell Biol.* **2008**, *84*, 79–113.
- Fu, X.; Belwal, T.; He, Y.; Xu, Y.; Li, L.; Luo, Z. Interaction and Binding Mechanism of Cyanidin-3-O-Glucoside to Ovalbumin in Varying PH Conditions: A Spectroscopic and Molecular Docking Study. *Food Chem.* **2020**, *320* (March).
- Fuleki, T.; Francis, F. J. *Quantitative Methods for Anthocyanins. 2. Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice.* **1968**, *33*, 78-83.

- Fuller, C. W.; Miller, J. N. Silver Medal Lectures. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.* **1979**, *16* (7), 199–208.
- Gong, S.; Yang, C.; Zhang, J.; Yu, Y.; Gu, X.; Li, W.; Wang, Z. Study on the Interaction Mechanism of Purple Potato Anthocyanins with Casein and Whey Protein. *Food Hydrocoll.* **2021**, *111* (June 2020), 106223.
- Graham, T. II. Liquid Diffusion Applied to Analysis. *Proc. R. Soc. Lond.* **1862**, *11* (0), 243–247.
- Hammann, F.; Schmid, M. Determination and Quantification of Molecular Interactions in Protein Films: A Review. *Materials (Basel)* **2014**, *7* (12), 7975–7996.
- Harborne, J. B. Spectral Methods of Characterizing Anthocyanins. *Biochem. J.* **1958**, *70* (1), 22–28.
- Harholt J.; Suttangkakul A.; Scheller H.V. Biosynthesis of Pectin. *Plant Phys.* **2010**, *153*, 384–395.
- Hong, V.; Wrolstad, R. E. Use of HPLC Separation/Photodiode Array Detection for Characterization of Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38* (3), 708–715.
- Horbowicz, M.; Grzesiuk, A.; DĘbski, H.; Kosson, R. Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human. *Veg. Crop. Res. Bull.* **2008**, *68*, 5–22.
- Juhl, C.; Beck-Sickinger, A. G. *Molecular Tools to Characterize Adiponectin Activity*, 1st ed.; Elsevier Inc., **2012**; Vol. 90.
- Kapp E. A., Daya S., Whiteley C. G., Protein-Ligand Interactions: Interaction of Nitrosamines with Nicotinic Acetylcholine Receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *167*, 1383-1392.
- Kelly, P.; Woonton, B. W.; Smithers, G. W. Improving the Sensory Quality, Shelf-Life and Functionality of Milk. In *Functional and Speciality Beverage Technology*; Elsevier. **2009**, 170–231.
- Khoo, H. E.; Azlan, A.; Tang, S. T.; Lim, S. M. Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and the Potential Health Benefits. *Food Nutr. Res.* **2017**, *61* (1).
- Klecker, C.; Nair, L. S. Matrix Chemistry Controlling Stem Cell Behavior. In *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*; Elsevier. **2017**, 195–213.
- Klinkesorn, U. The Role of Chitosan in Emulsion Formation and Stabilization. *Food Rev. Int.* **2013**, *29*, 371-393.
- Kubista, M.; Sjöback, R.; Eriksson, S.; Albinsson, B. Experimental Correction for the Inner-Filter Effect in Fluorescence Spectra. *Analyst* **1994**, *119* (3), 417–419.
- Kumar Panigrahi, S.; Kumar Mishra, A. Inner Filter Effect in Fluorescence Spectroscopy: As a Problem and as a Solution. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2019**, *41* (100318), 100318.
- Kuntz, I. D., Jr; Gasparro, F. P.; Johnston, M. D., Jr; Taylor, R. P. Molecular Interactions and the Benesi-Hildebrand Equation. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (18), 4778–4781.

- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Academic/Plenum; New York, Boston, Dordrecht, Moscow; **2006**; chapter 8.
- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Academic/Plenum; New York, Boston, Dordrecht, Moscow; **2006**; chapter 16.
- Li, Y.-Q.; Li, X.-Y.; Shindi, A. A. F.; Zou, Z.-X.; Liu, Q.; Lin, L.-R.; Li, N. Synchronous Fluorescence Spectroscopy and Its Applications in Clinical Analysis and Food Safety Evaluation. **2012**, 95–117.
- Liu, F.; Ma, C.; Gao, Y.; McClements, D. J. Food-Grade Covalent Complexes and Their Application as Nutraceutical Delivery Systems: A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, 16 (1), 76–95.
- Loureiro dos Santos, L. A. Natural Polymeric Biomaterials: Processing and Properties. In Reference Module in Materials Science and Materials Engineering; *Elsevier*, **2017**.
- Lu, R.; Li, W.-W.; Katzir, A.; Raichlin, Y.; Yu, H.-Q.; Mizaikoff, B. Probing the Secondary Structure of Bovine Serum Albumin during Heat-Induced Denaturation Using Mid-Infrared Fiberoptic Sensors. *Analyst* **2015**, 140 (3), 765–770.
- Ma J., Liu Y., Chen L., Xie Y., Wang L.-Y., Xie M.-X., Spectroscopic investigation on the interaction of 3,7-dihydroxyflavone with different isomers of human serum albumin, *Food Chem.* **2012**, 132, 663-670.
- Manuscript, A. Europe PMC Funders Group Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands. **2015**, 1008 (1), 357–388.
- McAtee, C. O.; Barycki, J. J.; Simpson, M. A. Emerging Roles for Hyaluronidase in Cancer Metastasis and Therapy. *Adv. Cancer Res.* **2014**, 123, 1–34.
- McGhee, J. D.; von Hippel, P. H. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-Operative and Non-Co-Operative Binding of Large Ligands to a One-Dimensional Homogeneous Lattice. *J. Mol. Biol.* **1974**, 86 (2), 469–489.
- Modler, H. W. Functional Properties of Nonfat Dairy Ingredients - A Review. Modification of Products Containing Casein. *J. Dairy Sci.* **1985**, 68 (9), 2195–2205.
- Mohnen, D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2008**, 11, 266-277.
- Ngouémazong, E. D.; Christiaens, S.; Shpigelman, A.; Loey, A.; Hendrickx, M. The Emulsifying and Emulsion-Stabilizing Properties of Pectin: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety* **2015**, 14, 705-718.
- Nicoué, E. E.; Savard, S.; Belkacemi, K. Anthocyanins in Wild Blueberries of Quebec: Extraction and Identification. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55 (14), 5626–5635.
- Nimse, S. B.; Pal, D. Free Radicals, Natural Antioxidants, and Their Reaction Mechanisms. *RSC Advances* **2015**, 5 (35), 27986–28006.
- Ogawa, S.; McClements, D. J.; Decker, E. A. Production and Characterization of O/W Emulsions Containing Cationic Droplets Stabilized by Lecithin–Chitosan Membranes [electronic resource]. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2806.

- Oprea, A.; Neamtu, A.; Stoica, B. A.; Vasile, C. Cellulose/chondroitin sulphate hydrogels as carriers for drug delivery applications. **2009**, 85-92.
- Pacheco, M. E.; Bruzzone, L. Synchronous Fluorescence Spectrometry: Conformational Investigation or Inner Filter Effect? *J. Lumin.* **2013**, *137*, 138–142.
- Pal, S.; Radavelli-Bagatini, S.; Ho, S.; McKay, J.-L.; Hagger, M.; Jane, M. Dairy Whey Proteins and Obesity. In *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity*; Elsevier, **2014**; pp 351–361.
- Parker, C. A.; Barnes, W. J. Some Experiments with Spectrofluorimeters and Filter Fluorimeters. *Analyst* **1957**, *82* (978), 606.
- Pliszka, B.; Olszewska, T.; Drabent, R. Fluorescence of Anthocyanin Pigments in Plant Extracts at Various PH. In *Light and Optics in Biomedicine*; Pluta, M., Cysewska-Sobusiak, A., Eds.; SPIE, 2001.
- Qi, P. X.; Onwulata, C. I. Physical Properties, Molecular Structures, and Protein Quality of Texturized Whey Protein Isolate: Effect of Extrusion Moisture Content. *J. Dairy Sci.* **2011**, *94* (5), 2231–2244.
- Rakic, V., P.; Ota, A., M.; Skrt, M., A.; Miljkovic, M., N.; Kostic, D., A.; Sokolovic, D., T.; Poklar-Ulrih, N., E. Investigation of Fluorescence Properties of Cyanidin and Cyanidin 3-o- β -Glucopyranoside. *Hem. Ind.* **2015**, *69* (2), 155–163.
- Ramawat, K. G.; Mérillon, J. M. Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. *Nat. Prod. Phytochem. Bot. Metab. Alkaloids, Phenolics Terpenes* **2013**, No. January, 1–4242.
- Roberts, J. J.; Martens, P. J. Engineering Biosynthetic Cell Encapsulation Systems. In *Biosynthetic Polymers for Medical Applications*; Elsevier. **2016**, 205–239.
- Rodriguez-Saona, L. E.; Wrolstad, R. E. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. **2001**, 00 (1).
- Ross, P. D.; Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry* **1981**, *20* (11), 3096–3102
- Schmid F.X., Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. *Encyclopedia of life sciences*. **2001**, 1-4.
- Serdyuk I.; Zaccai N.; Zaccai J. *Methods in Molecular Biophysics*; Cambridge: Cambridge University Press; **2007**.
- Sergey A. N. ; Robert A.F. ; Iben D. Approaches to chemical synthesis of pectic oligosaccharides. *An. Plant Rev.* **2011**, *41*, 65–92.
- Shipp, J., & Abdel-Aal, E.-S. M. Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *Open Food Science Journal* **2010**, *4*(1), 7–22.
- Southward, C. R. CASEIN AND CASEINATES | Methods of Manufacture. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; Elsevier. **2003**, 943–948.

- Speiciene, V.; Guilmineau, F.; Kulozik, U.; Leskauskaite, D. The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins. *Food Chem.* **2007**, *102*, 1048-1054.
- Stancheva, K.A. Applications of dialysis. *Oxidation Communications* **2008**, *31*(4), 758–775.
- Sudha, P. N.; Aisverya, S.; Nithya, R.; Vijayalakshmi, K. Industrial Applications of Marine Carbohydrates. *Adv. Food Nutr. Res.* **2014**, *73*, 145–181.
- Sur, S. S.; Rabbani, L. D.; Libman, L.; Breslow, E. Fluorescence Studies of Native and Modified Neurophysins. Effects of Peptides and PH. *Biochemistry* **1979**, *18* (6), 1026–1036.
- Taghvaei M; Jafari SM Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal Of Food Science And Technology* **2013**, *52*, 1272.
- Tang, L.; Zhang, D.; Xu, S.; Zuo, H.; Zuo, C.; Li, Y. Different Spectroscopic and Molecular Modeling Studies on the Interaction between Cyanidin-3-O-Glucoside and Bovine Serum Albumin. *Luminescence* **2014**, *29* (2), 168–175.
- van de Weert, M.; Stella, L. Fluorescence Quenching and Ligand Binding: A Critical Discussion of a Popular Methodology. *J. Mol. Struct.* **2011**, *998* (1–3), 144–150.
- Vo-Dinh, T. Multicomponent Analysis by Synchronous Luminescence Spectrometry. *Anal. Chem.* **1978**, *50* (3), 396–401.
- Wahyuningsih, S.; Wulandari, L.; Wartono, M. W.; Munawaroh, H.; Ramelan, A. H. The Effect of PH and Color Stability of Anthocyanin on Food Colorant. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2017**, *193*, 012047.
- Wei, J.; Xu, D.; Zhang, X.; Yang, J.; Wang, Q. Evaluation of Anthocyanins in Aronia Melanocarpa/BSA Binding by Spectroscopic Studies. *AMB Express* **2018**, *8* (1).
- Wolf, F. T. Absorption Spectra of the Anthocyanin Pigment of Red Cabbage: A Natural Wide-Range PH Indicator. *Physiol. Plant.* **1956**, *9* (4), 559–566.
- Xu, D.-P.; Li, Y.; Meng, X.; Zhou, T.; Zhou, Y.; Zheng, J.; Zhang, J.-J.; Li, H.-B. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18* (1), 96.
- Zhao, Z.; Li, H.; Zhao, M.; Li, Q. Structural and Surface Properties of Whey Protein from Buffalo Milk as Influenced by Exopolysaccharide. *Int. J. Food Prop.* **2017**, *20* (sup3), S2323–S2331.
- Zuo, H.; Tang, L.; Li, S.; Huang, J. Combined Multispectroscopic and Molecular Docking Investigation on the Interaction between Delphinidin-3-O-Glucoside and Bovine Serum Albumin. *Luminescence* **2015**, *30* (1), 110–117.

Βιβλιογραφικές πηγές από το διαδύκτιο:

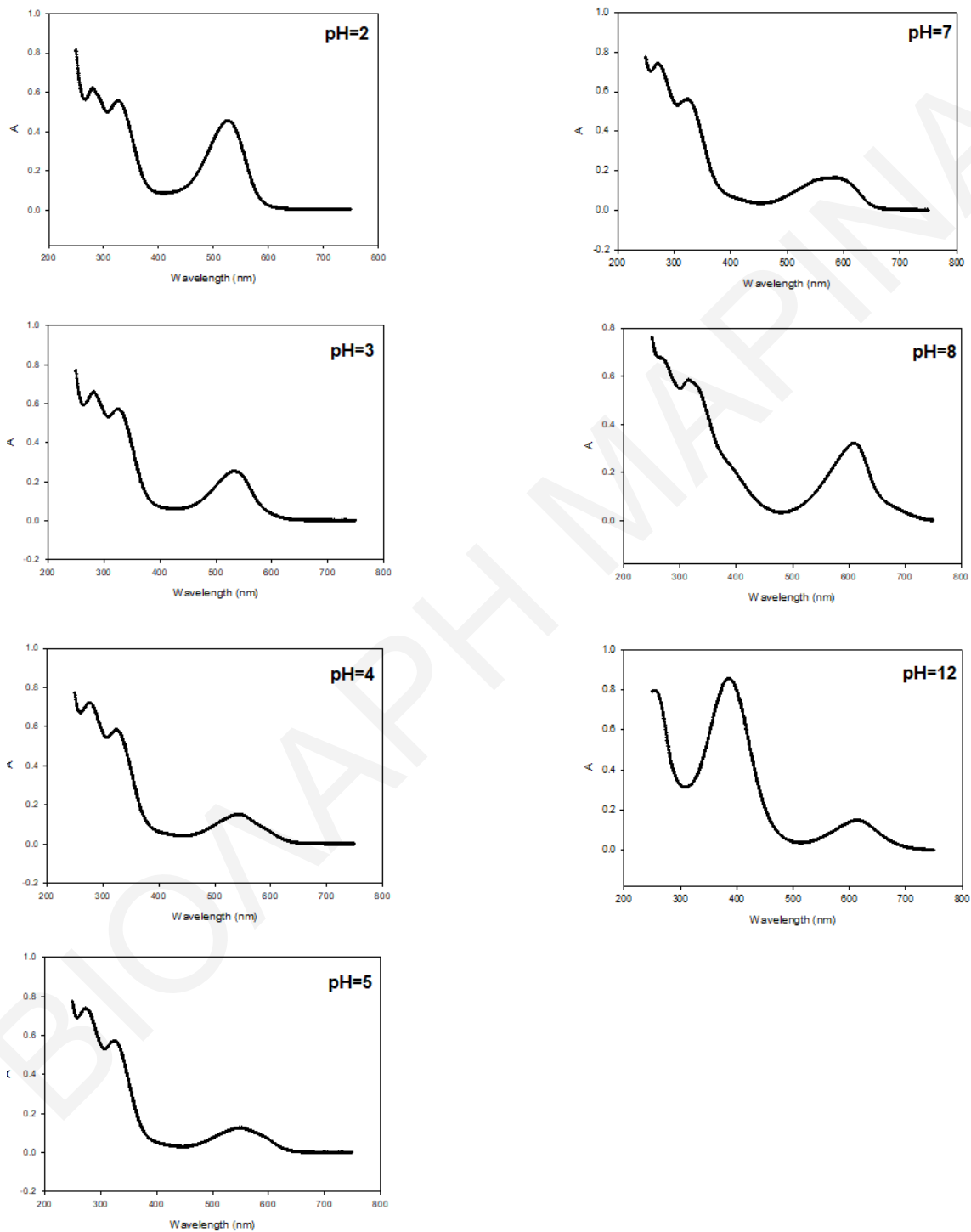
[in.1] https://theanalyticalscientist.com/fileadmin/tas/issues/App_Notes/Malvern-AN140821CharacterizationofWheyProteinIsolate.pdf (accessed Feb 2, 2021).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [in.2] https://eclass.duth.gr/modules/document/file.php/ALEX01106/Lectures/physico_05.pdf (accessed Feb 14, 2021).
- [in.3] <https://sbs.ntu.edu.sg/aboutus/BRC/SpecializedFacilitiesServices/Documents/Biomolecular%20Interactions/Circular%20Dichroism%20pdf.pdf> (accessed Feb 14, 2021).
- [in.4] https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Isothermal_titration_calorimetry&oldid=1005958200 (accessed Feb 16, 2021)
- [in.5] https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Dialysis_tubing&oldid=1001599497 (accessed Feb 20, 2021).
- [in.6] [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Dialysis_\(biochemistry\)&oldid=1003946043](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Dialysis_(biochemistry)&oldid=1003946043) (accessed Feb 20, 2021).
- [in.7] Scatchard Plot (Molecular Biology) <http://what-when-how.com/molecular-biology/scatchard-plot-molecular-biology/> (accessed Feb 21, 2021).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π.1. Φάσματα UV ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο

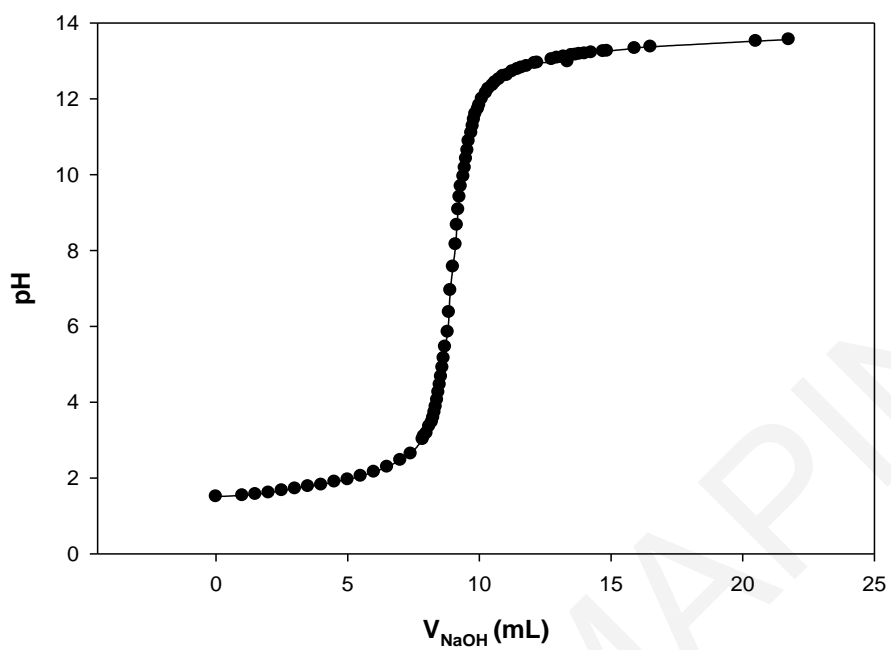


Σχήμα Π.1: Φάσματα απορρόφησης UV-vis ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο σε διάφορα pH.

Πίνακας Π.1: Χρωματικές αλλαγές της ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο με μεταβολή του pH.

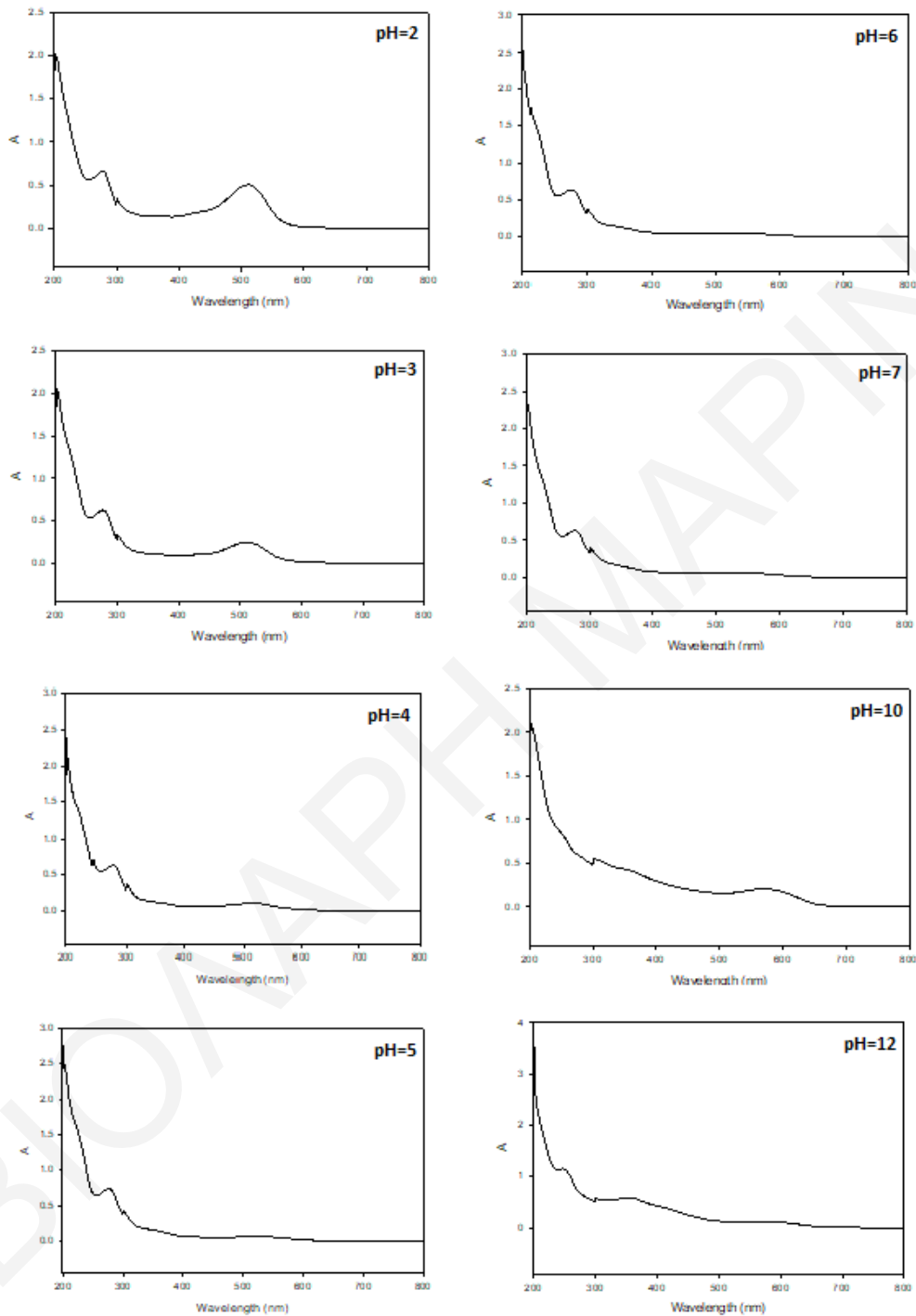
pH	V _{NaOH}	Χρώμα
1.51	0	Κόκκινο
1.54	1.00	
1.57	1.50	
1.61	2.00	
1.67	2.50	
1.72	3.00	
1.78	3.50	
1.82	4.00	
1.9	4.50	
1.96	5.00	
2.05	5.50	
2.16	6.00	
2.29	6.50	
2.47	7.00	
2.64	7.40	ανοιχτό κόκκινο
3.02	7.85	
3.1	7.90	
3.18	8.00	
3.36	8.10	Ρόζ
3.47	8.20	
3.59	8.25	
3.73	8.30	
3.88	8.35	
4.06	8.40	
4.26	8.45	
4.46	8.50	
4.67	8.55	
4.91	8.60	Μώβ
5.16	8.65	
5.46	8.70	
5.85	8.80	Λιλά
6.37	8.85	
6.95	8.90	
7.57	9.00	Μπλέ
8.16	9.10	
8.67	9.15	Παγωνί
9.08	9.20	
9.41	9.25	Πράσινο
9.69	9.30	
9.95	9.40	
10.18	9.45	
10.42	9.50	
10.64	9.55	
10.88	9.60	

11.1	9.70	
11.28	9.75	
11.45	9.80	
11.6	9.85	
11.73	9.95	
11.83	10.00	
12	10.10	
12.15	10.25	
12.26	10.35	
12.35	10.50	
12.43	10.60	
12.51	10.75	
12.6	10.90	
12.62	11.05	ανοιχτό πράσινο
12.72	11.25	
12.78	11.45	
12.82	11.60	
12.86	11.80	
12.94	12.10	
12.95	12.20	
12.98	13.35	
13.04	12.75	
13.08	12.95	
13.11	13.20	
13.15	13.50	Πρασινοκίτρινο
13.16	13.65	
13.18	13.80	σκούρο κίτρινο
13.19	14.00	
13.22	14.25	Κίτρινο
13.25	14.70	
13.26	14.85	
13.33	15.90	
13.37	16.50	
13.52	20.50	
13.56	21.75	



Σχήμα Π.2: Γραφική παράσταση pH ως προς προστιθέμενο όγκο 0.1 M NaOH σε διάλυμα 10mL της ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο.

Π.2. Φάσματα UV ανθοκυανίνης από βατόμουρα



Σχήμα Π.3: Φάσματα απορρόφησης UV-vis ανθοκυανινών από βατόμουρα σε διάφορα pH.

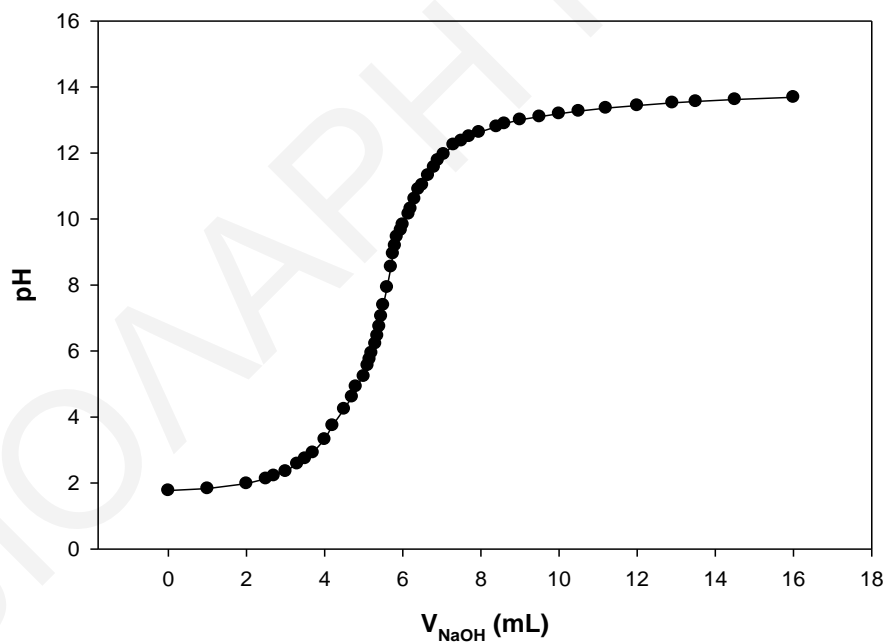
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π.2: Χρωματικές αλλαγές εκχυλισμάτων ανθοκυανινών από βατόμουρα με μεταβολή του pH.

pH	V _{NaOH}	Χρώμα
1.77	0	Κόκκινο
1.83	1.00	
1.98	2.00	
2.13	2.50	
2.22	2.70	
2.35	3.00	
2.58	3.30	
2.74	3.50	
2.92	3.70	
3.32	4.00	
3.74	4.20	
4.24	4.50	
4.61	4.70	
4.92	4.80	
5.23	5.00	Βυσσινί
5.56	5.10	
5.75	5.15	
5.94	5.20	
6.22	5.30	
6.46	5.35	
6.74	5.40	Βυσσινί
7.05	5.45	Βυσσινί
7.39	5.50	
7.93	5.60	
8.55	5.70	Μετάβαση
8.95	5.75	
9.19	5.80	Πρασινωπό
9.46	5.85	
9.66	5.95	
9.83	6.00	
10.15	6.15	
10.31	6.20	
10.61	6.30	
10.90	6.40	
11.03	6.50	
11.32	6.65	
11.57	6.80	
11.78	6.90	

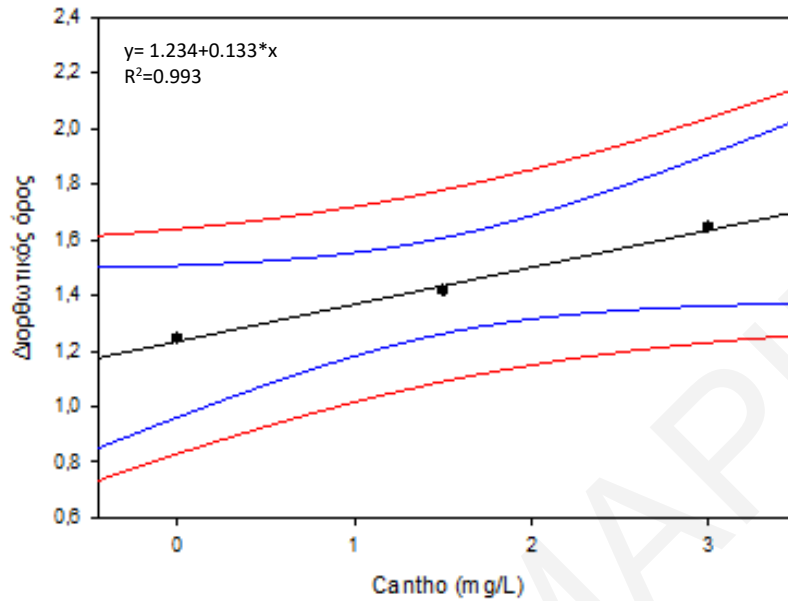
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

11.96	7.05	
12.25	7.30	
12.37	7.50	
12.50	7.70	
12.63	7.95	
12.80	8.40	
12.89	8.60	
13.01	9.00	
13.10	9.50	Πρασινωπό Λαδί
13.19	10.00	
13.27	10.50	
13.36	11.20	
13.44	12.00	
13.52	12.90	
13.56	13.50	
13.62	14.50	
13.69	16.00	

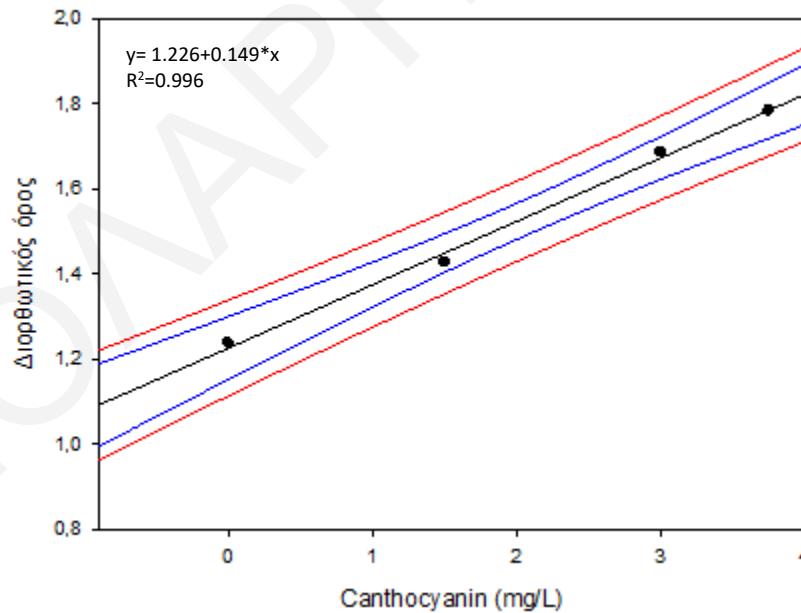


Σχήμα Π.4: Γραφική παράσταση pH ως προς προστιθέμενο όγκο 0.1 M NaOH σε 10 mL διαλύματος ανθοκυανινών από βατόμουρα.

Π.3 Διόρθωση πειραμάτων φθορισμού για inner-filter effect

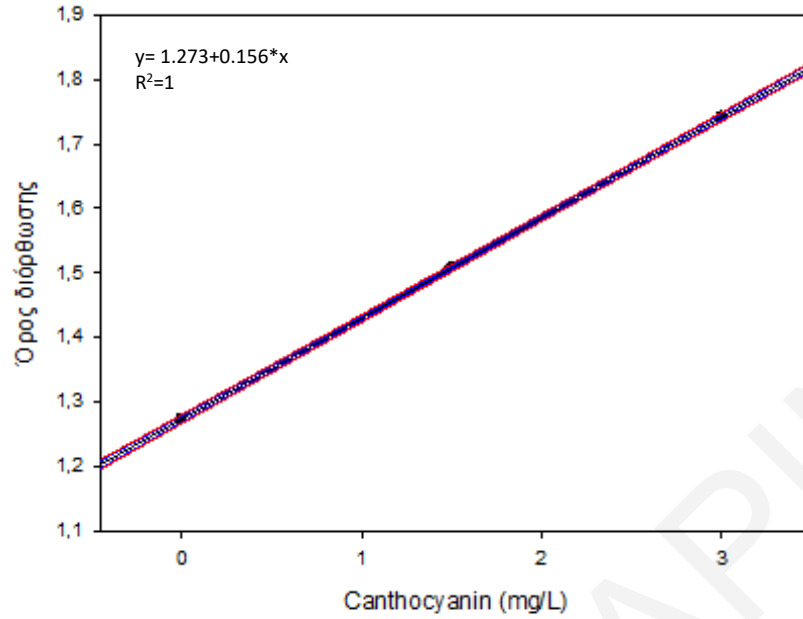


Σχήμα Π.5: Διάγραμμα διορθωτικού όρου ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης για το σύστημα BSA-ανθοκυανίνες pH=4.

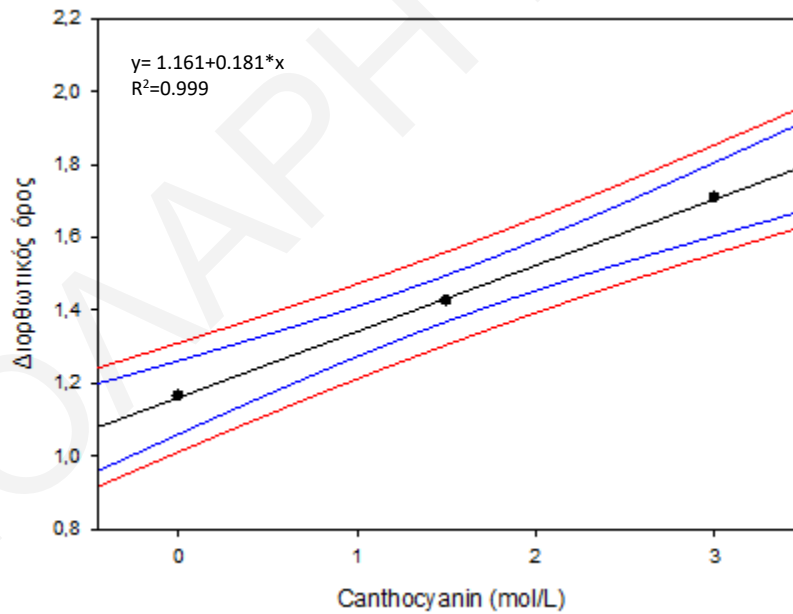


Σχήμα Π.6: Διάγραμμα διορθωτικού όρου ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης για το σύστημα BSA-ανθοκυανίνες pH=6.

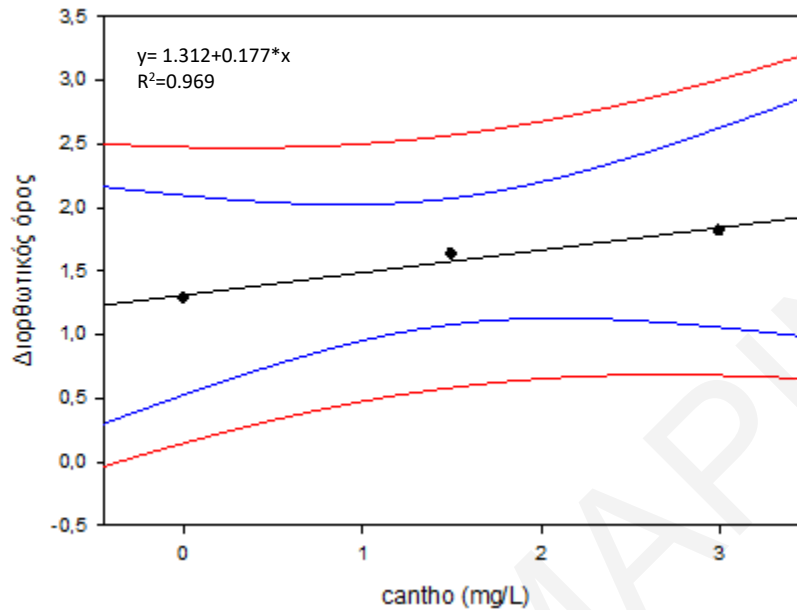
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Σχήμα Π.7: Διάγραμμα διορθωτικού όρου ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης για το σύστημα WPI-ανθοκυανίνες pH=4.

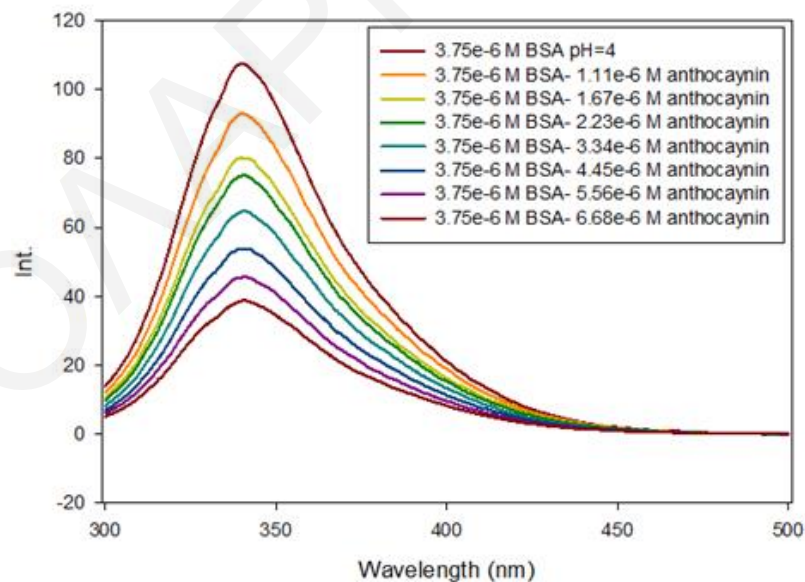


Σχήμα Π.8: Διάγραμμα διορθωτικού όρου ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης για το σύστημα WPI-ανθοκυανίνες pH=6.



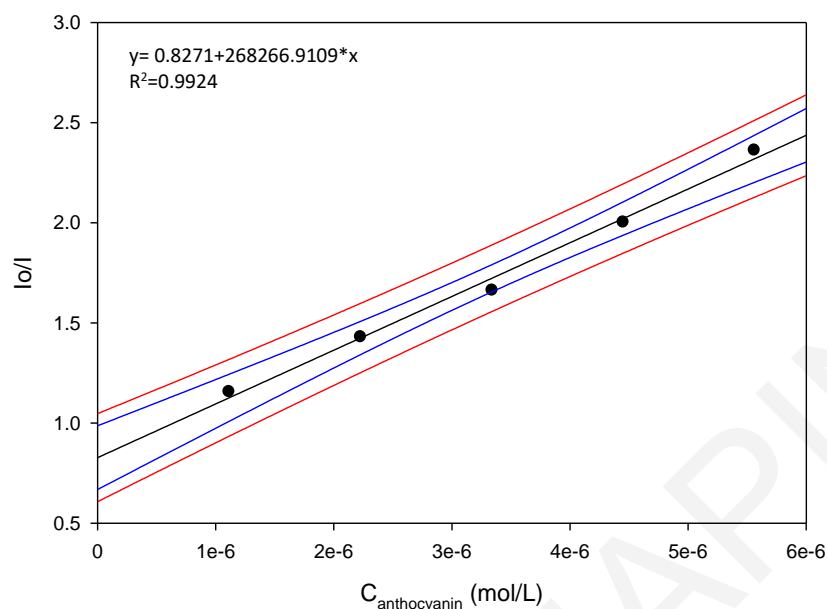
Σχήμα Π.9: Διάγραμμα διορθωτικού όρου ως προς τη συγκέντρωση της ανθοκυανίνης για το σύστημα καζεϊνικό νάτριο-ανθοκυανίνες pH=7.

Π.4 Μελέτη απόσβεσης φθορισμού πρωτεϊνών παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα

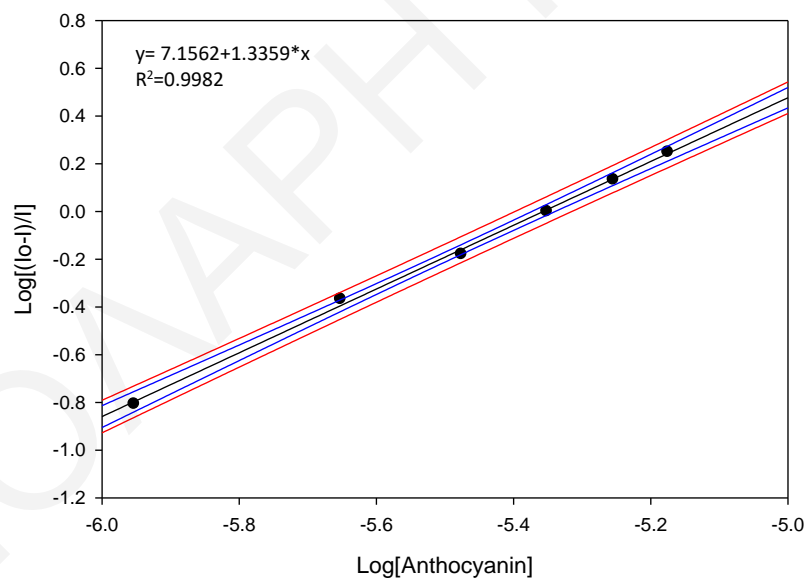


Σχήμα Π.10: Φάσματα φθορισμού BSA στην παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 280nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 2.5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

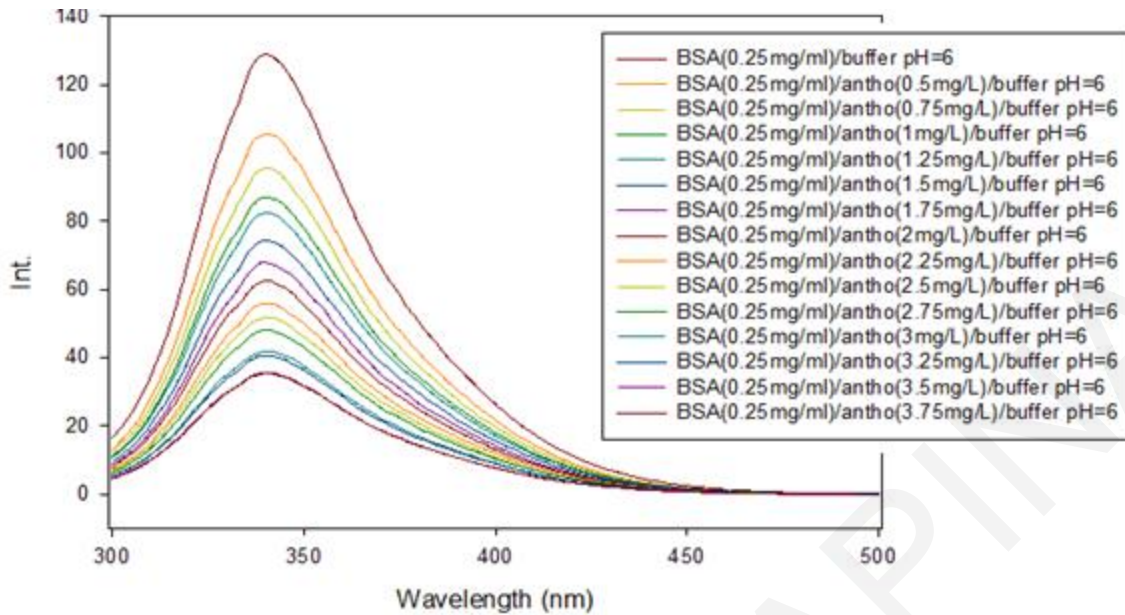


Σχήμα Π.11: Διάγραμμα Stern-Volmer απόσβεσης της BSA από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=4.

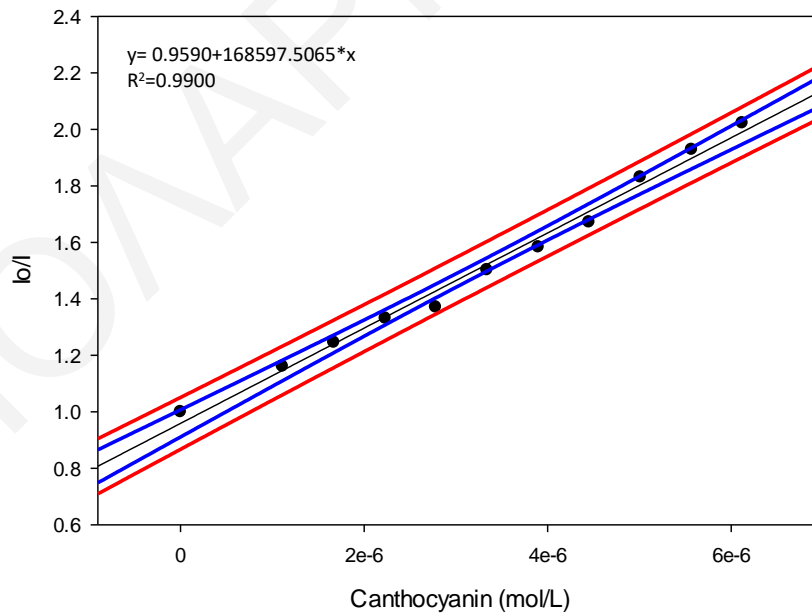


Σχήμα Π.12: Λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[(I_0 - I)/I]$ έναντι της συνολικής συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε pH=4.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

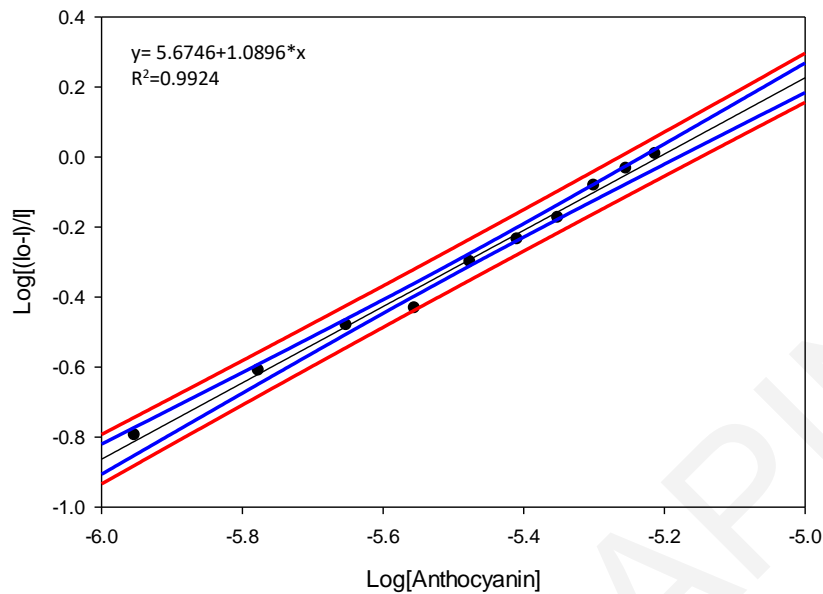


Σχήμα Π.13: Φάσματα φθορισμού BSA στην παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=6 (μήκος κύματος διέγερσης: 280nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 2.5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

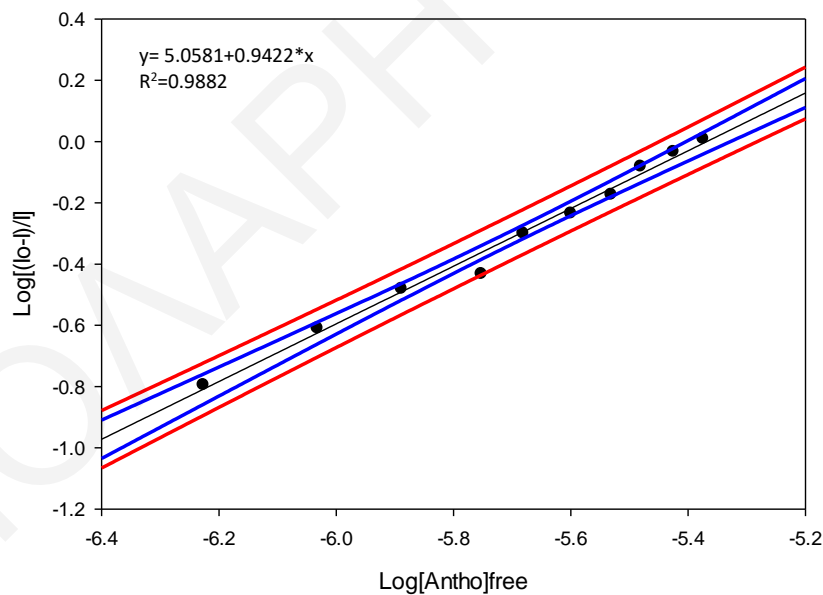


Σχήμα Π.14: Διορθωμένο διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης της BSA από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=6.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

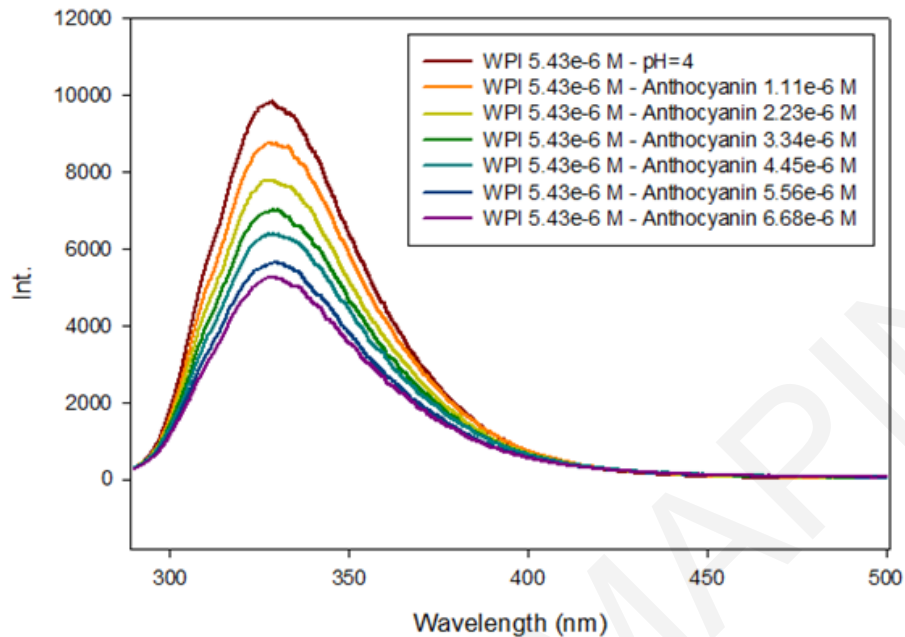


Σχήμα Π.15: Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης της BSA από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=6.

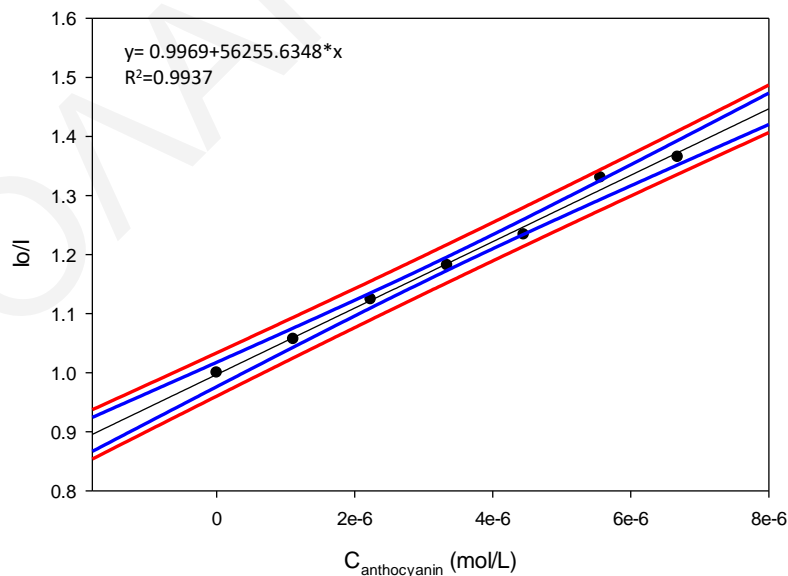


Σχήμα Π.16: Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης της BSA ως προς τη συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=6.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

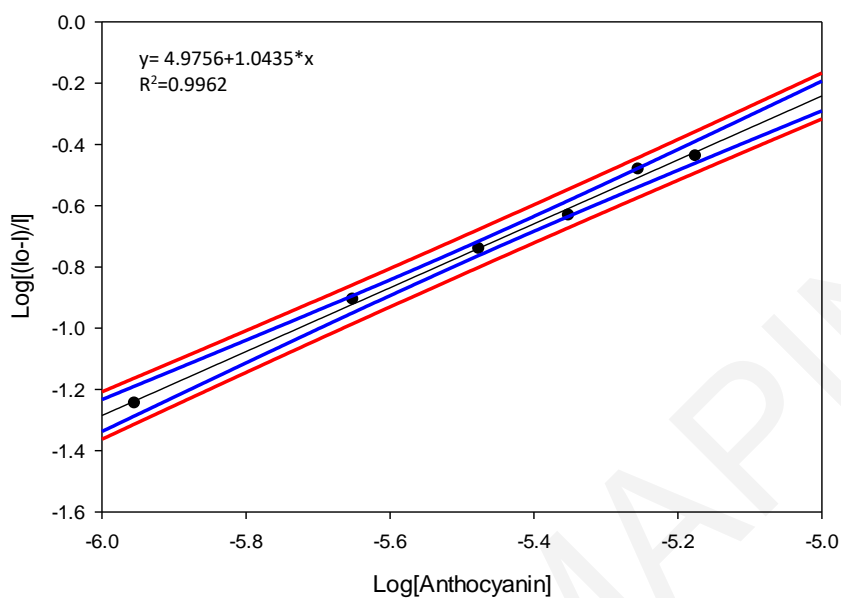


Σχήμα Π.17: Φάσματα φθορισμού WPI στην παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 280nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 1nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 2.5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-8300.

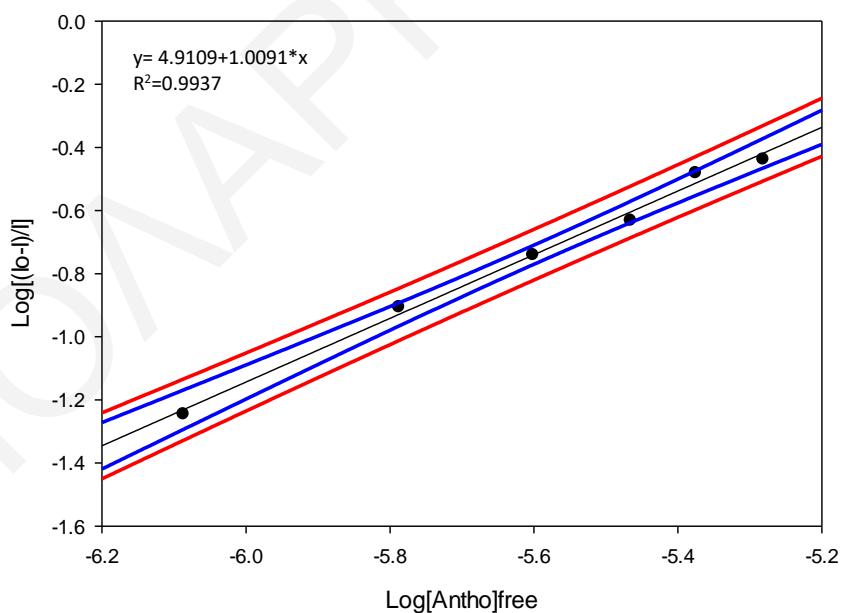


Σχήμα Π.18: Διορθωμένο διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης της WPI από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=4.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

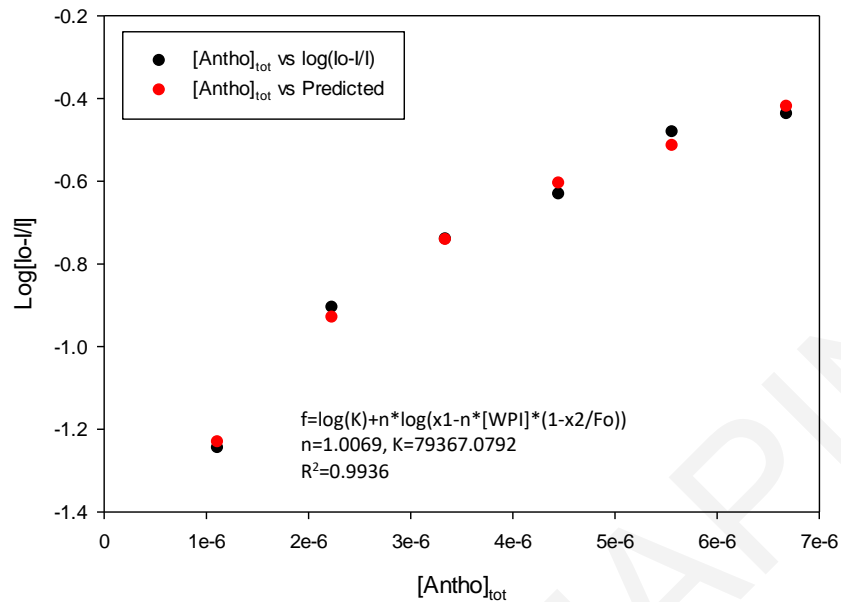


Σχήμα Π.19: Διορθωμένο διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης της WPI από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=4.

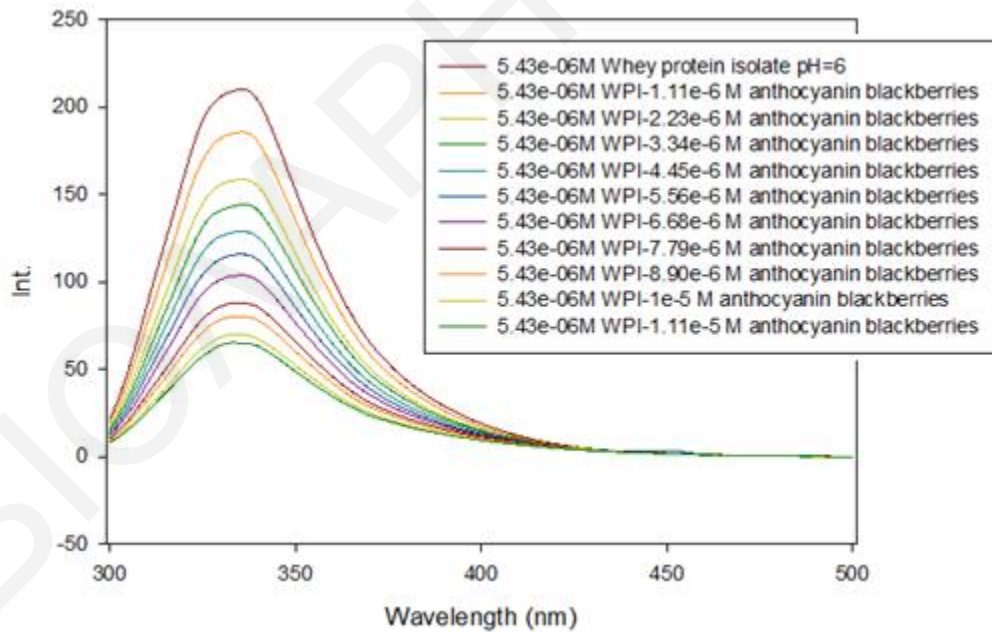


Σχήμα Π.20: Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης της WPI ως προς τη συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης pH=4.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

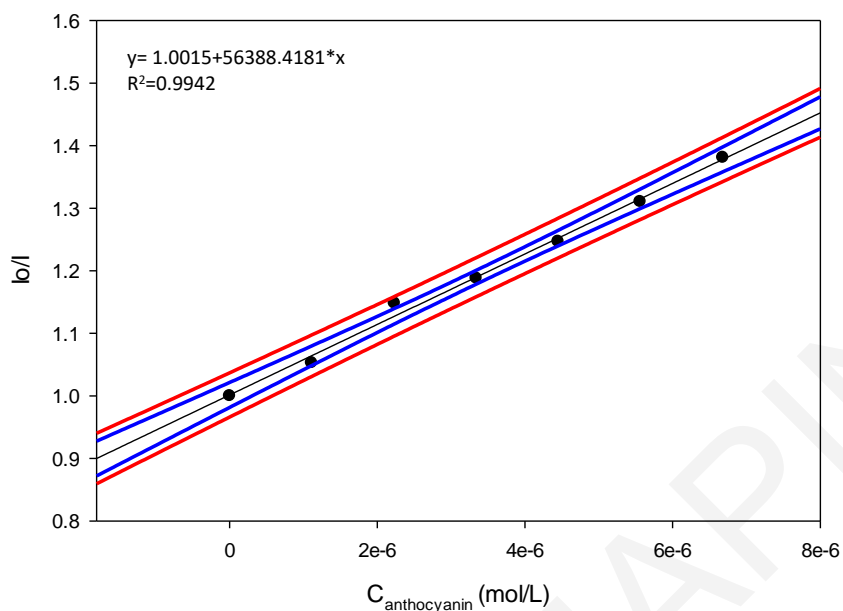


Σχήμα Π.21: Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα S-V [(I₀-I)/I₀] έναντι της συνολικής συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε pH=4 του συστήματος WPI-ανθοκυανίνες, χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση.

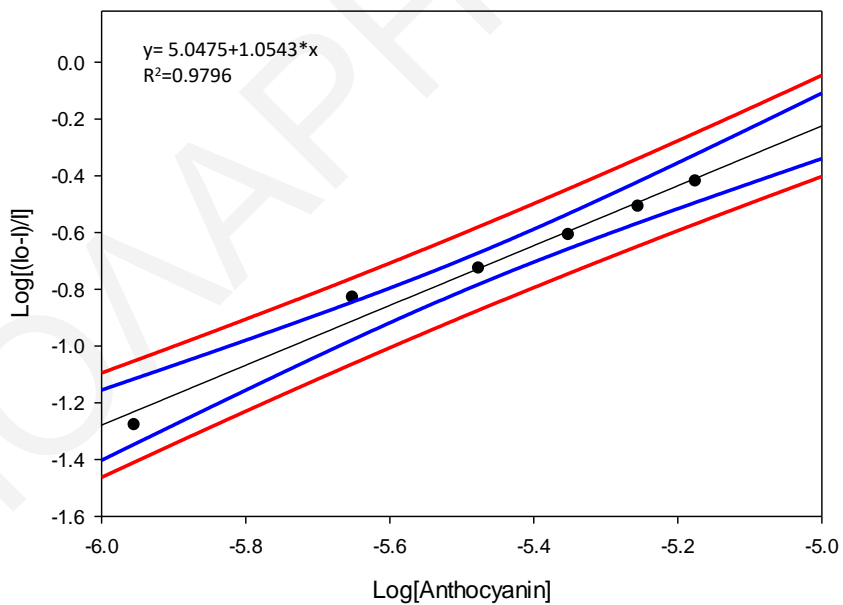


Σχήμα Π.22: Φάσματα φθορισμού WPI στην παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH=6 (μήκος κύματος διέγερσης: 280nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 2.5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

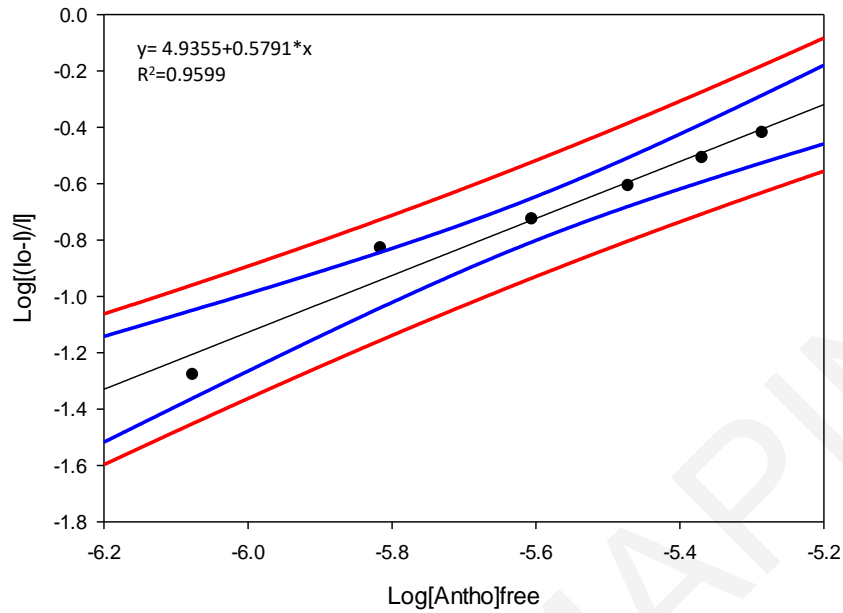


Σχήμα Π.23: Διορθωμένο διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης της WPI από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=6.

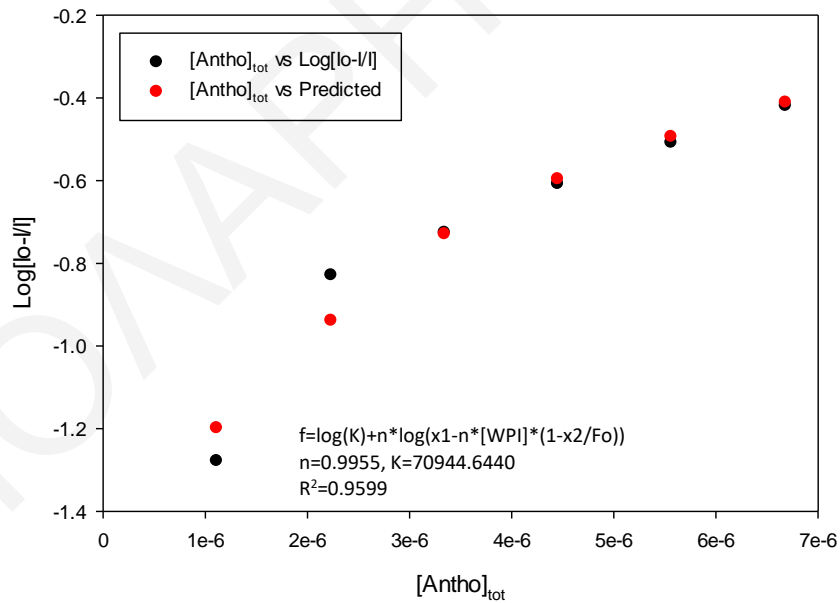


Σχήμα Π.24: Διορθωμένο διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης της WPI από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=6.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

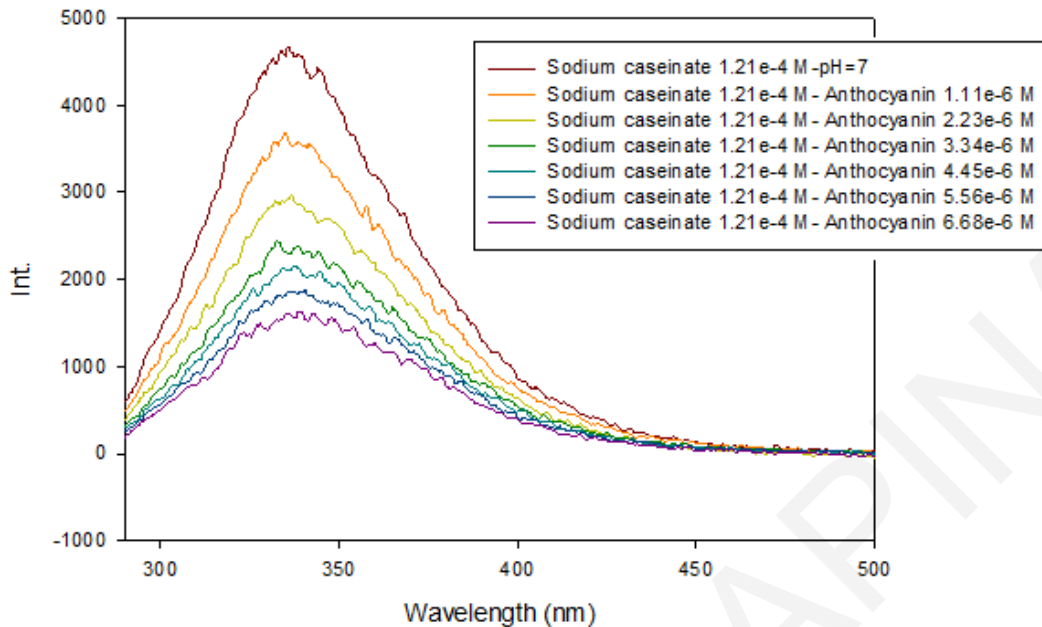


Σχήμα Π.25: Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης της WPI ως προς τη συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης pH=6.

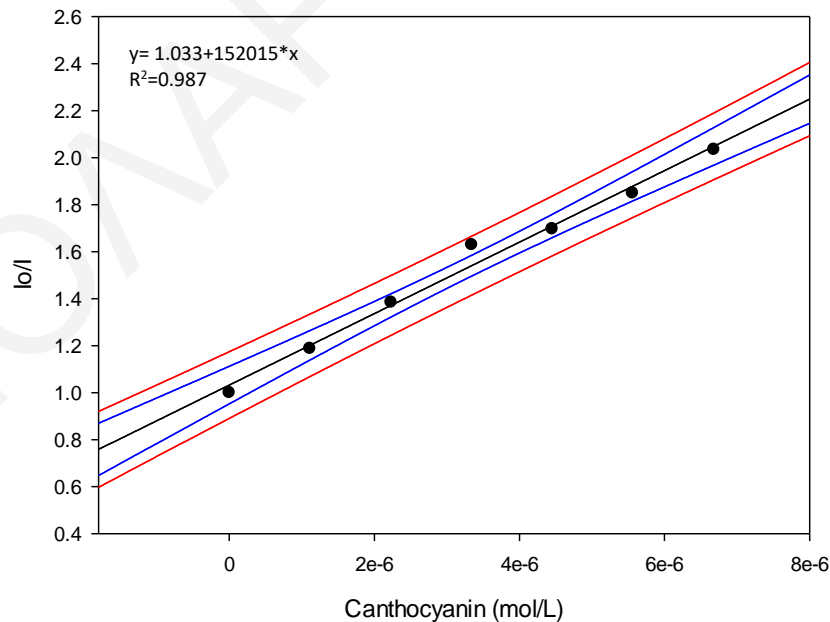


Σχήμα Π.26: Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα S-V [(I₀-I)/I₀] έναντι της συνολικής συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε pH=6 του συστήματος WPI-ανθοκυανίνες, χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

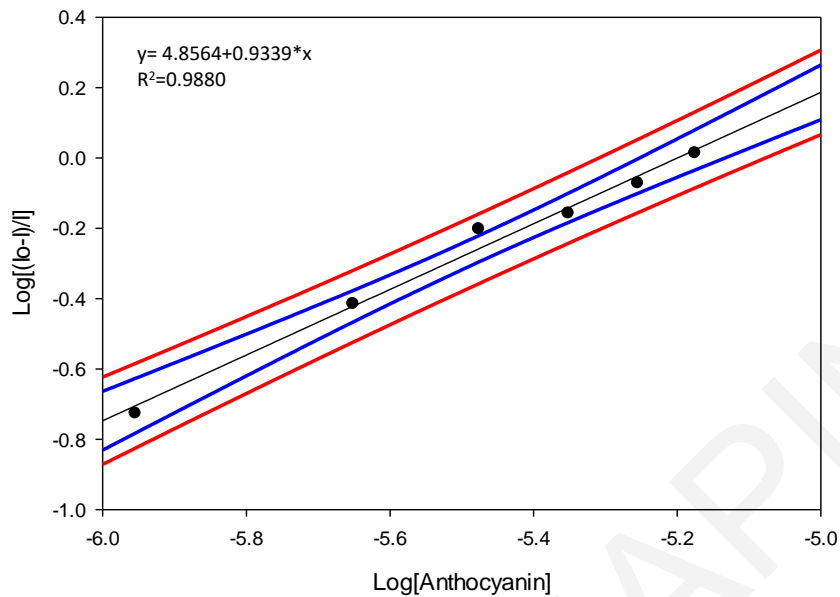


Σχήμα Π.27: Φάσματα φθορισμού καζεϊνικού νατρίου στην παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=7 (μήκος κύματος διέγερσης: 280nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 1nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 2.5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-8300.

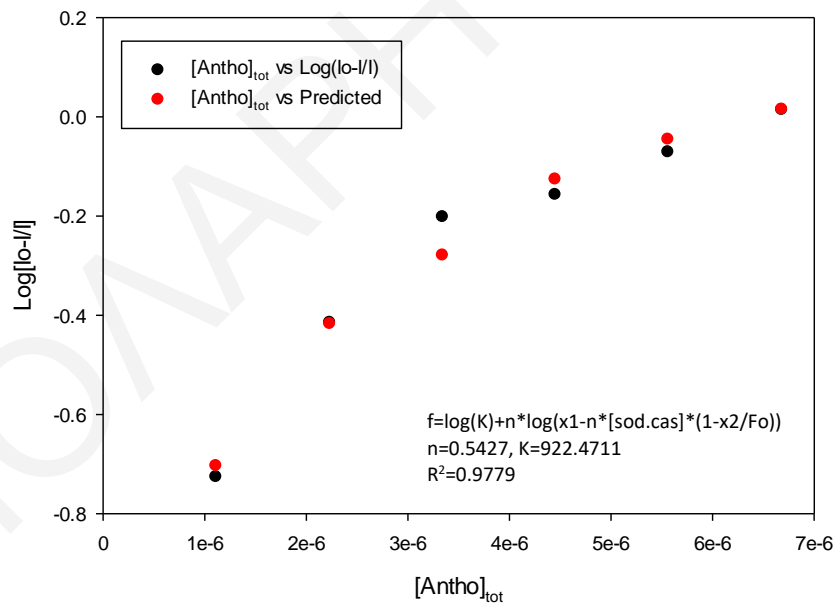


Σχήμα Π.28: Διορθωμένο διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης του καζεϊνικού νατρίου από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=7.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

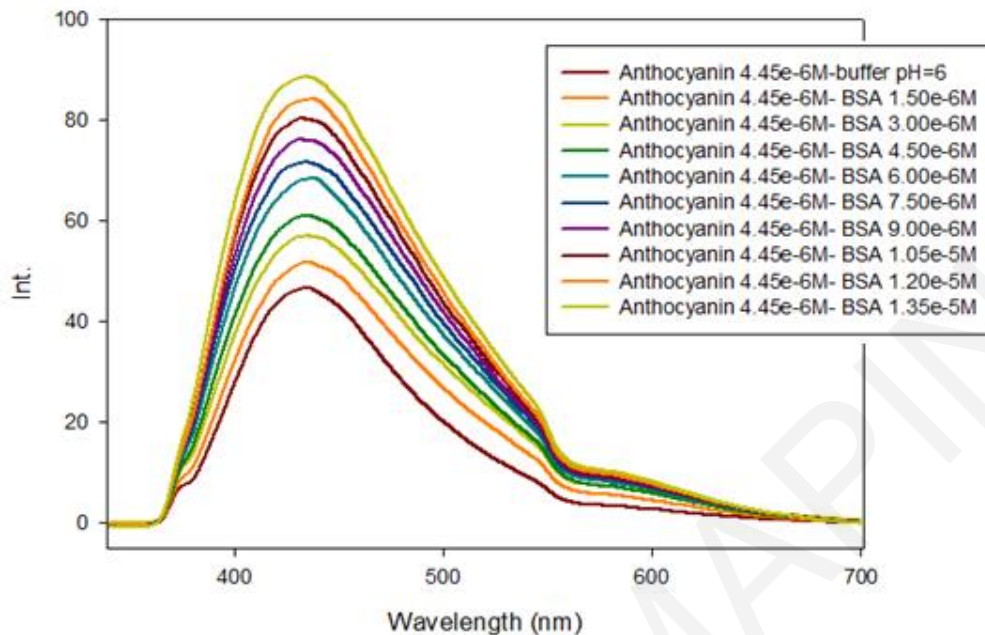


Σχήμα Π.29: Διορθωμένο διάγραμμα Stern-Volmer (inner-filter effect) απόσβεσης του καζεϊνικού νατρίου από τις ανθοκυανίνες (βατόμουρα) pH=7.

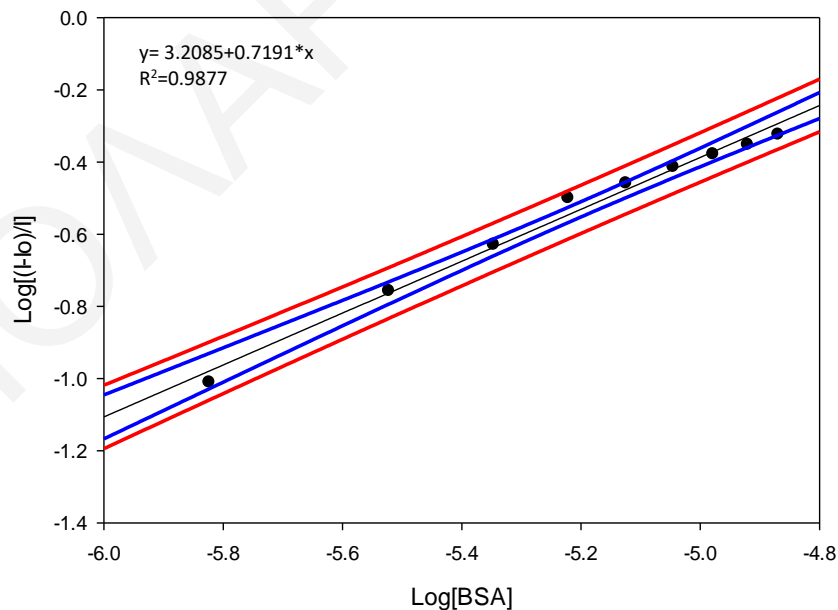


Σχήμα Π.30: Διορθωμένο λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[(I_0-I)/I_0]$ έναντι της συνολικής συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε pH=7 του συστήματος καζεϊνικού νατρίου-ανθοκυανίνες, χρησιμοποιώντας μη γραμμική παλινδρόμηση.

Π.5 Μελέτη ενίσχυσης φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα παρουσία πρωτεϊνών

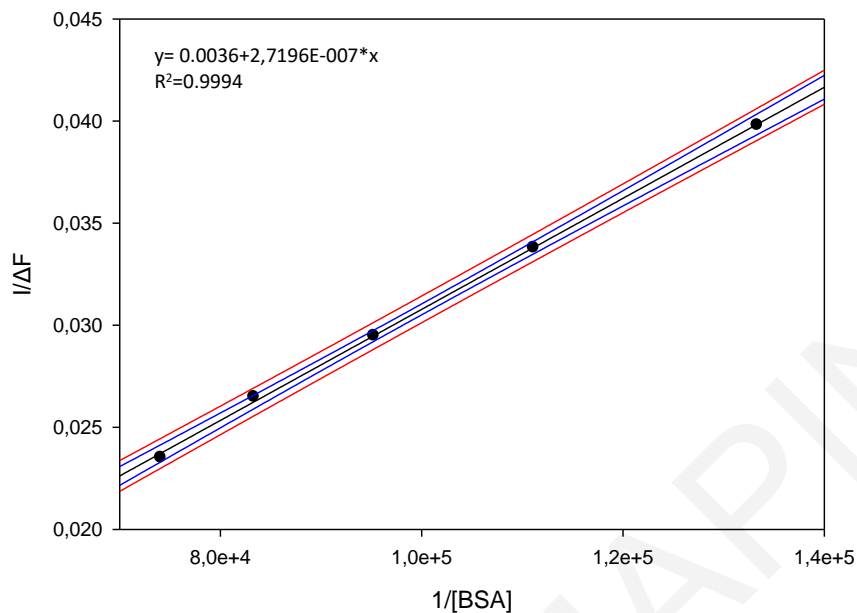


Σχήμα Π.31: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία BSA σε pH=6 (μήκος κύματος διέγερσης: 330nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 380nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

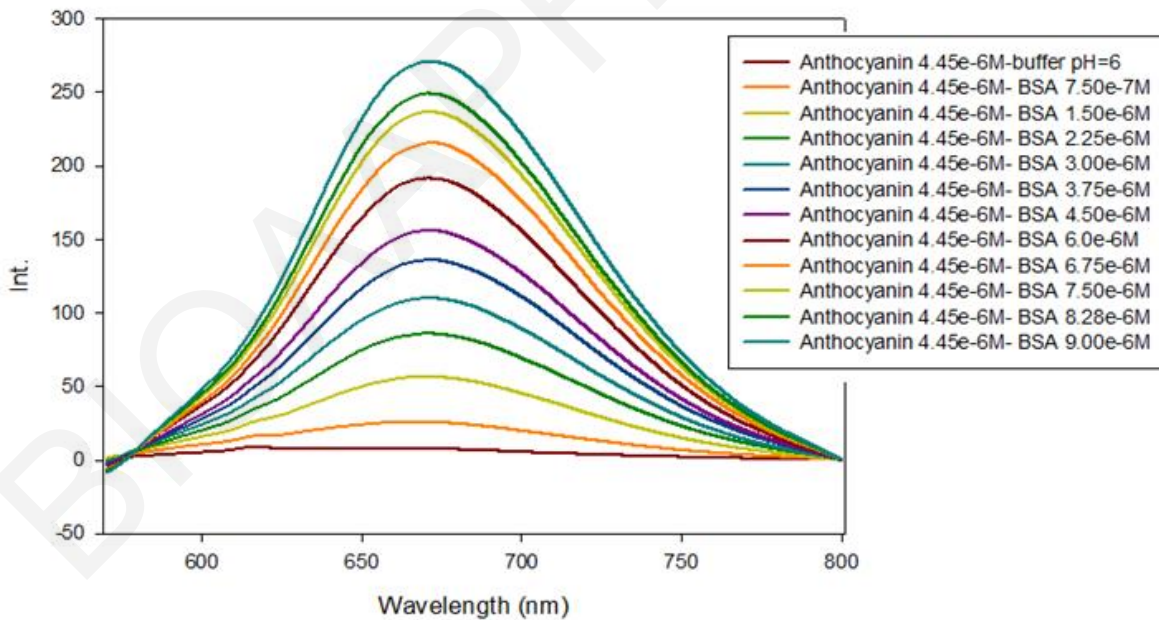


Σχήμα Π.32: Λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[(I-I_0)/I]$ ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=6 παρουσία BSA (διέγερση: 330nm).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

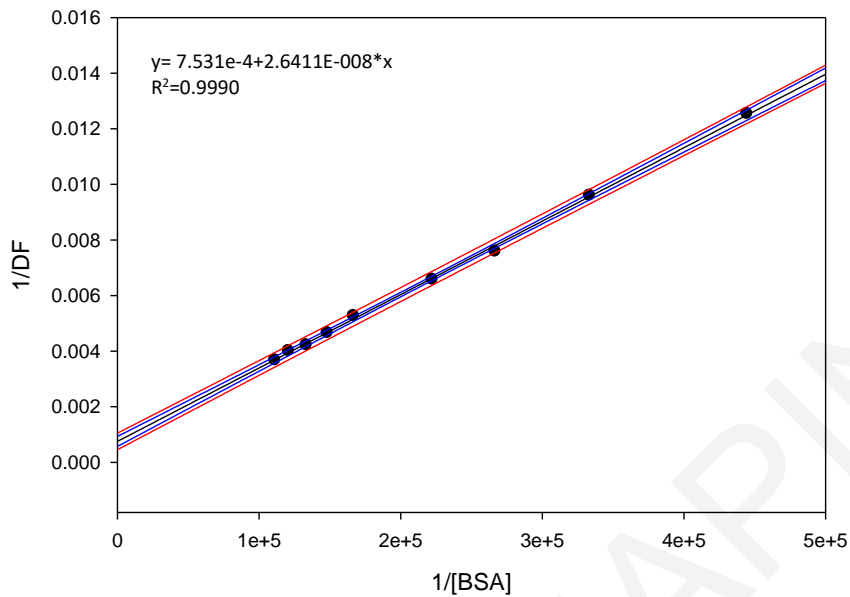


Σχήμα Π.33: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=6 παρουσία BSA (διέγερση: 330nm).

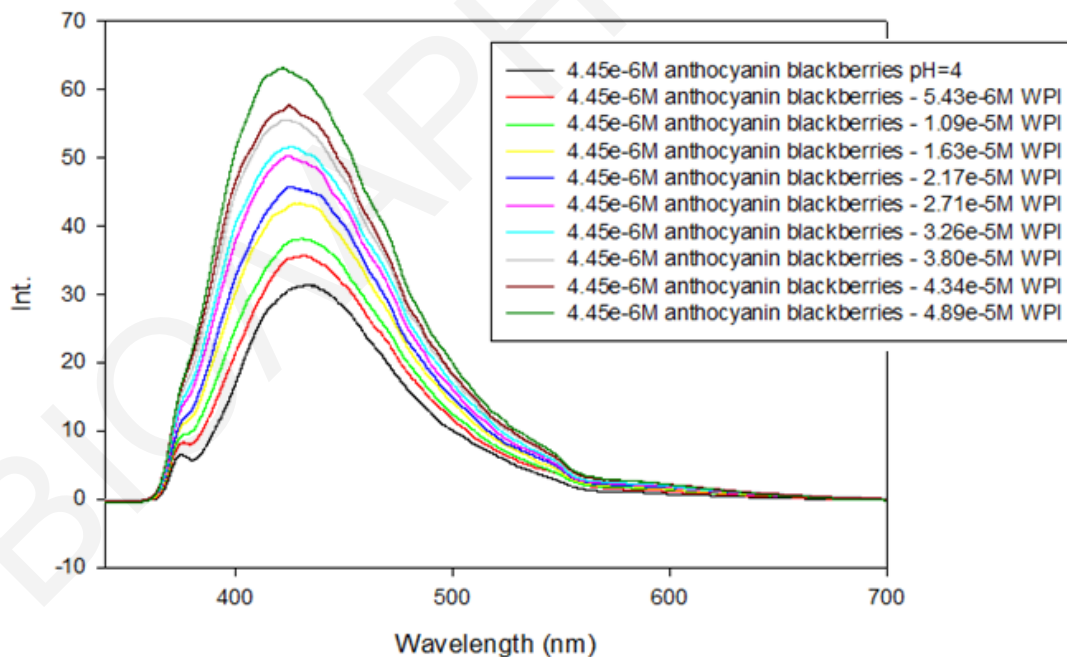


Σχήμα Π.34: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία BSA σε pH=6 (μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

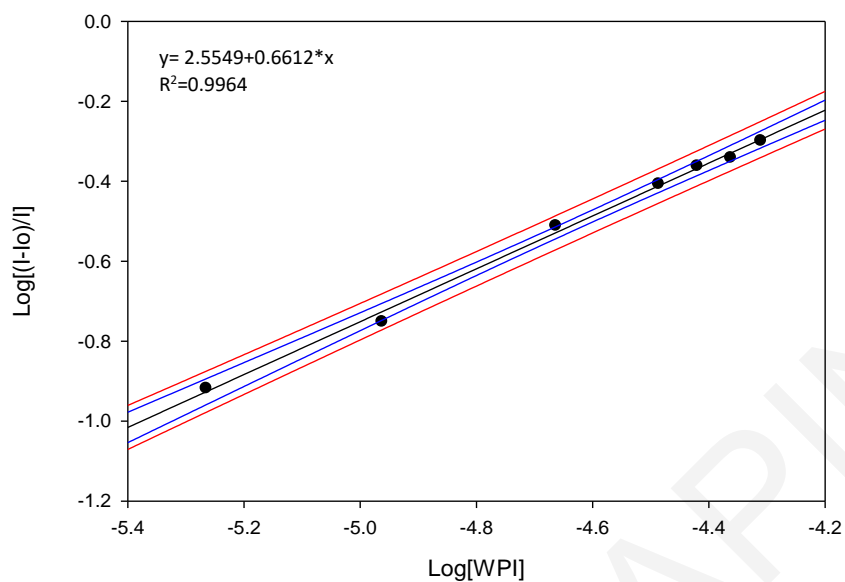


Σχήμα Π.35: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=6 παρουσία BSA (διέγερση: 560nm).

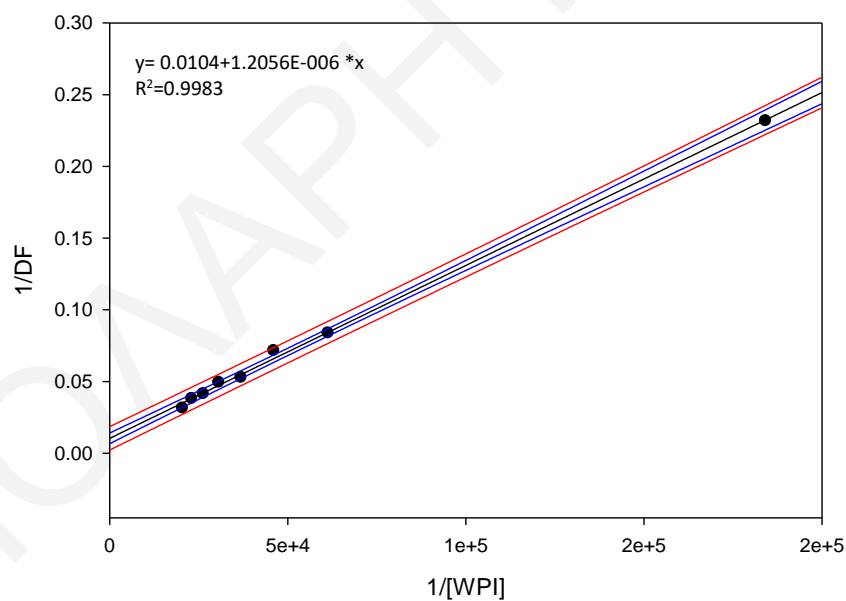


Σχήμα Π.36: (A) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία WPI σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 330nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 1nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 2.5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 380nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

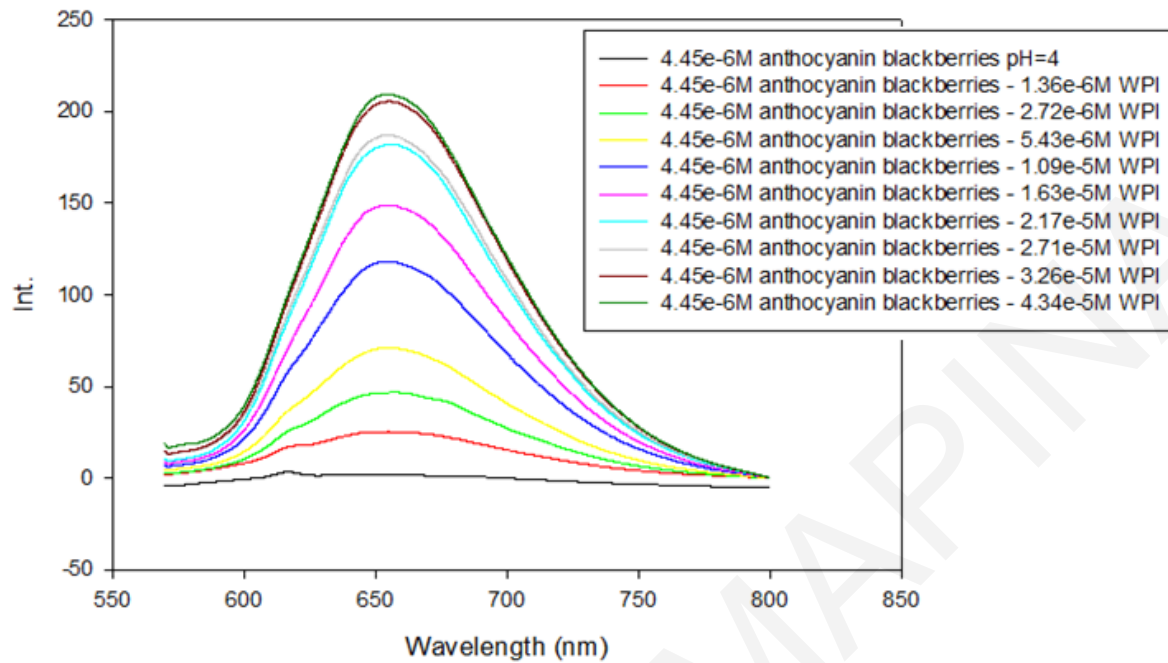


Σχήμα Π.37: Λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[I_0/I]$ ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4 παρουσία WPI (διέγερση: 330nm).

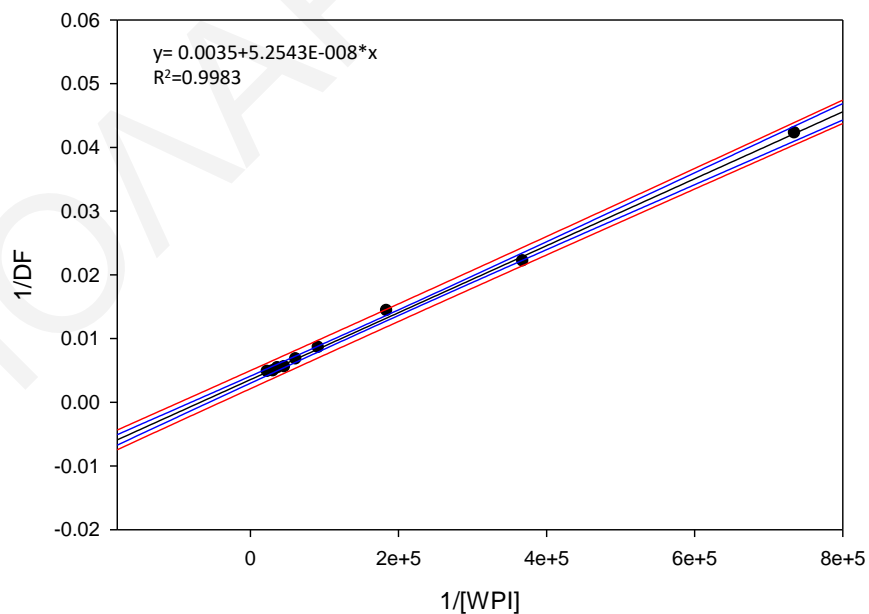


Σχήμα Π.38: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4 παρουσία WPI (διέγερση: 330nm).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

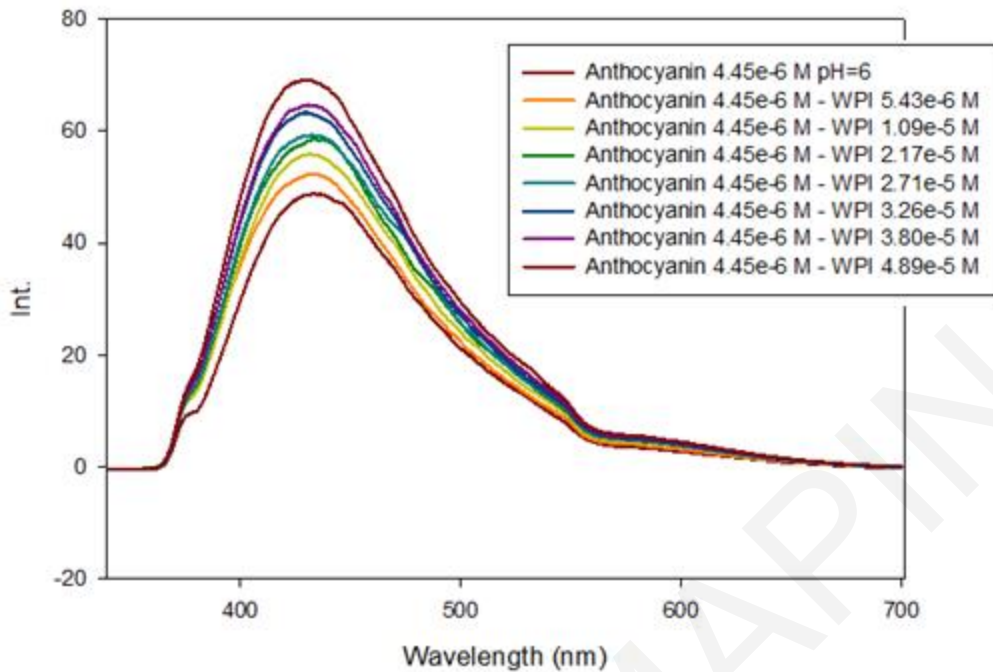


Σχήμα Π.39: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία WPI σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

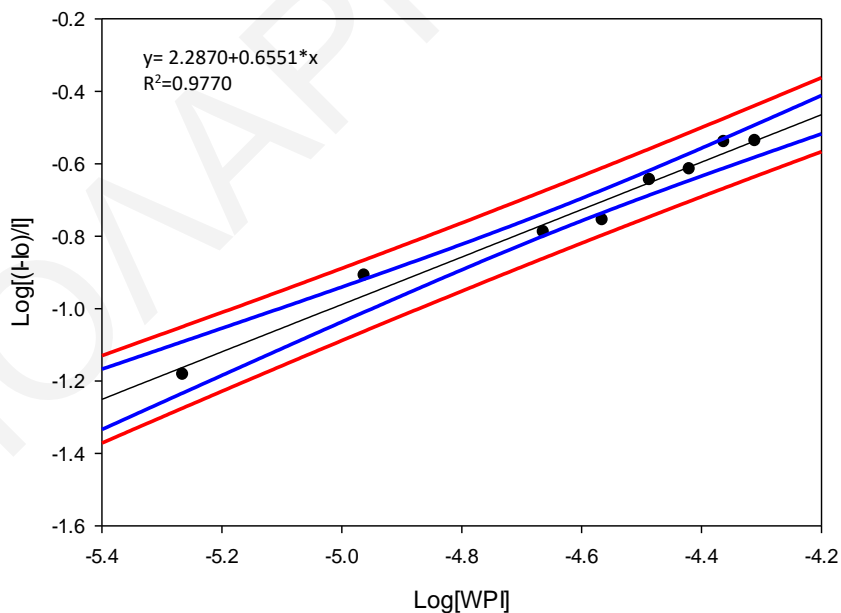


Σχήμα Π.40: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4 παρουσία WPI (διέγερση: 560nm).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

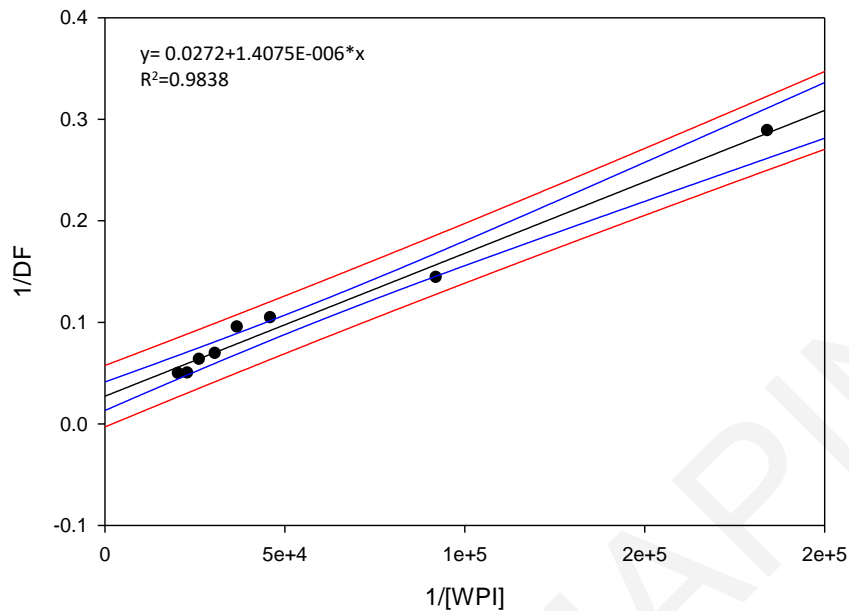


Σχήμα Π.41: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία WPI σε pH=6 (μήκος κύματος διέγερσης: 330nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 380nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

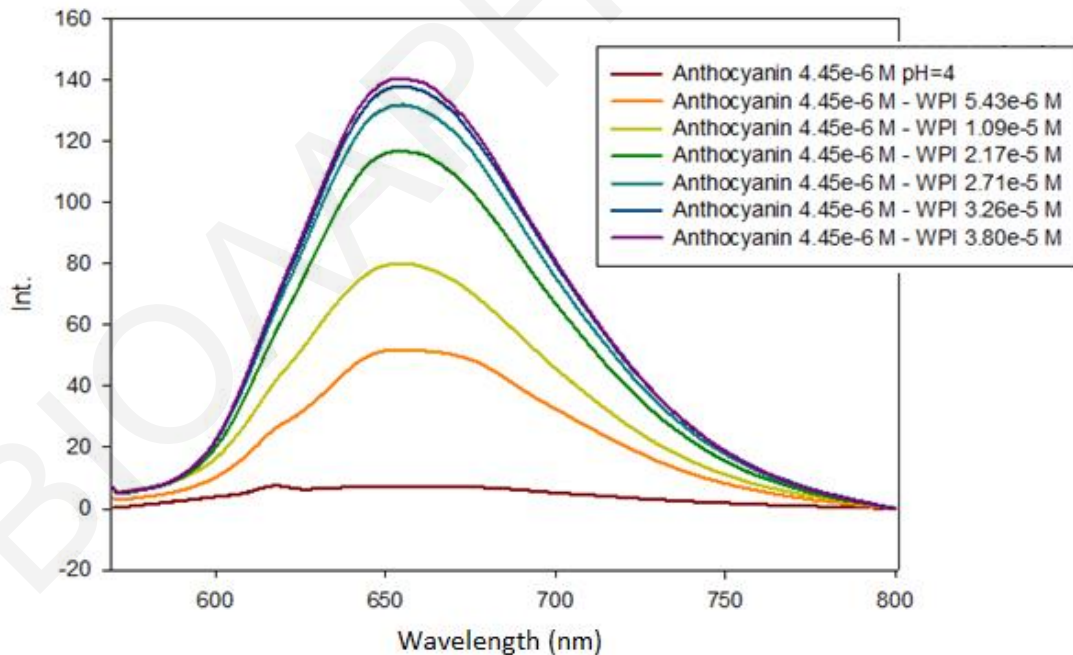


Σχήμα Π.42: Λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[I-I_0]/I$ ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=6 παρουσία WPI (διέγερση: 330nm).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

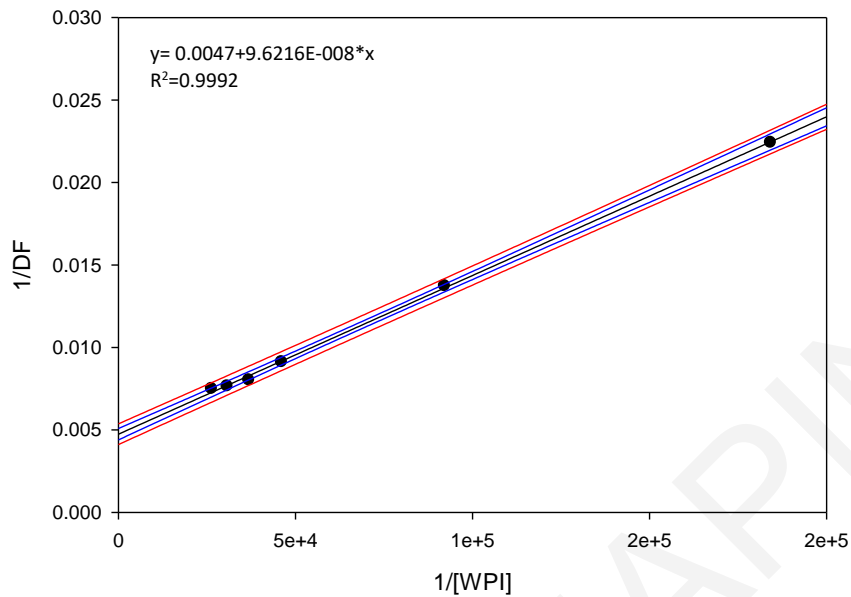


Σχήμα Π.43: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=6 παρουσία WPI (διέγερση: 330nm).

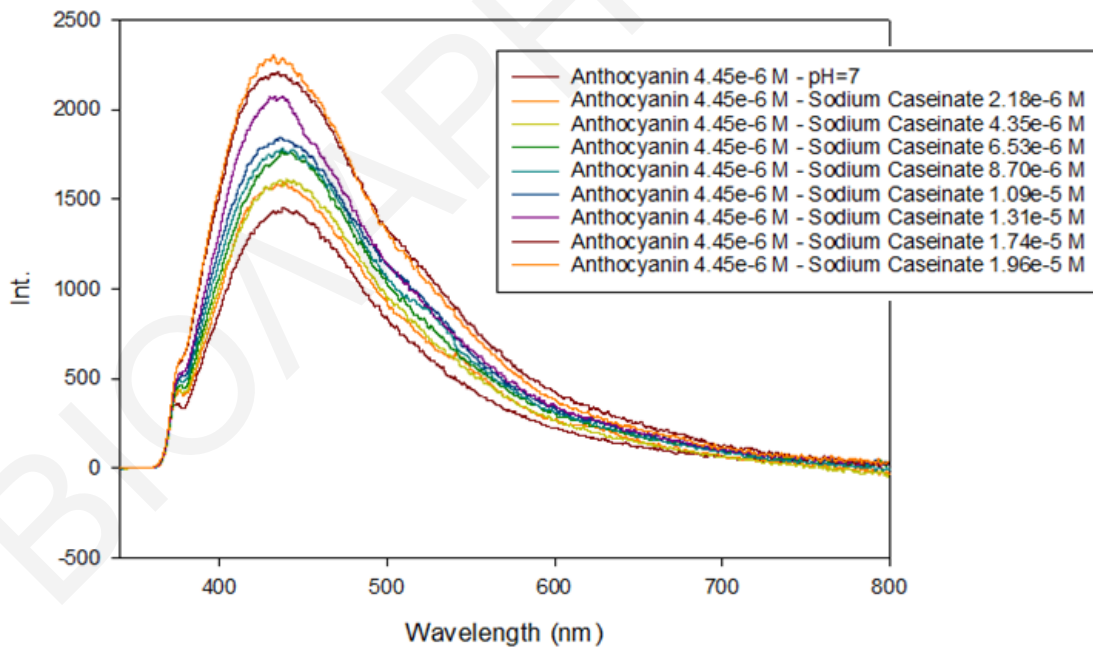


Σχήμα Π.44: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία WPI σε pH=6 (μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

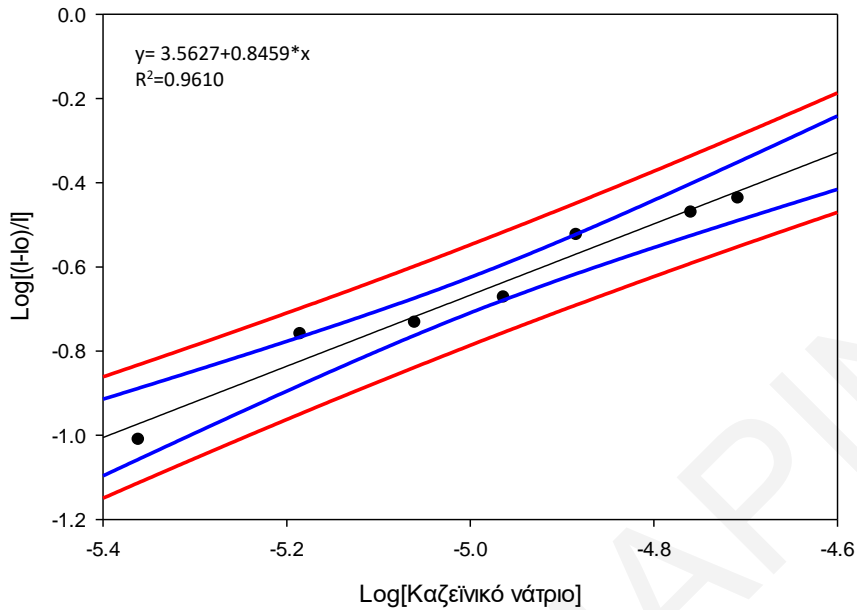


Σχήμα Π.45: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε $pH=6$ παρουσία WPI (διέγερση: 560nm).

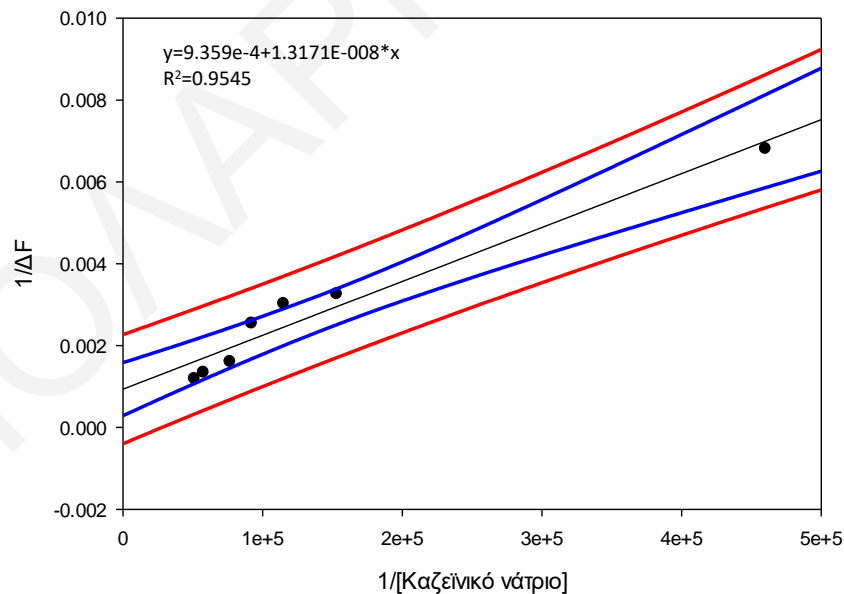


Σχήμα Π.46: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία καζεϊνικού νατρίου σε $pH=7$ (μήκος κύματος διέγερσης: 330nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 380nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

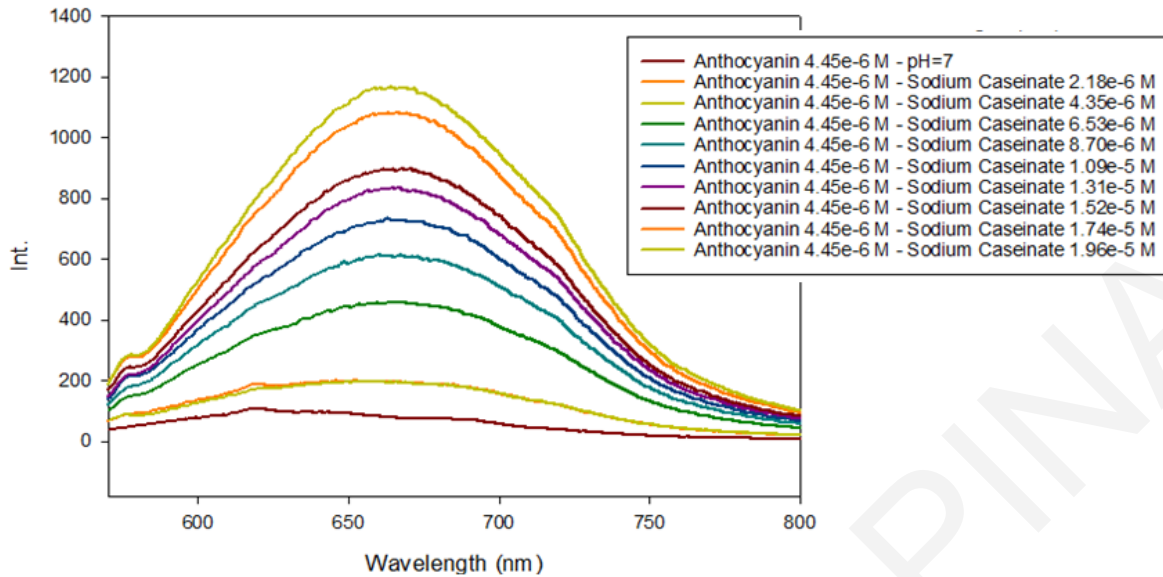


Σχήμα Π.47: Λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[I-I_0/I]$ ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=7 παρουσία καζεϊνικού νατρίου (διέγερση: 330nm).

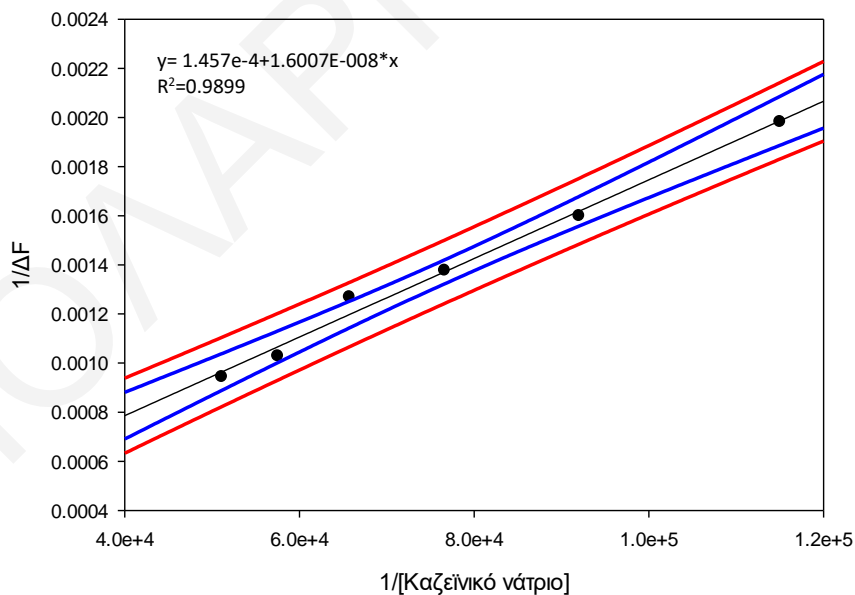


Σχήμα Π.48: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=7 παρουσία καζεϊνικού νατρίου (διέγερση: 330nm).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

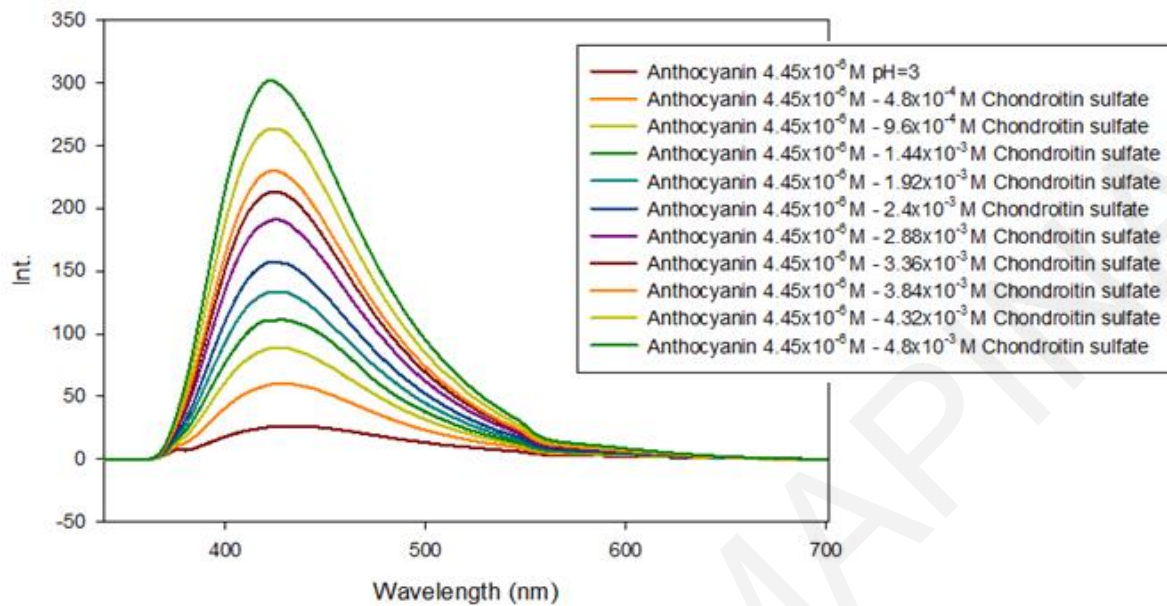


Σχήμα Π.49: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία καζεϊνικού νατρίου σε pH=7 (μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

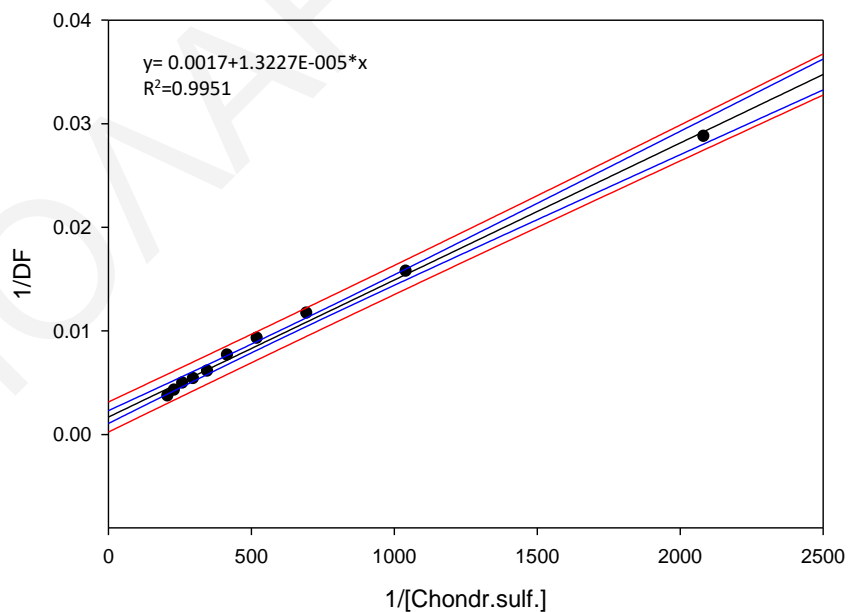


Σχήμα Π.50: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=7 παρουσία καζεϊνικού νατρίου (διέγερση: 560nm).

Π.6 Μελέτη ενίσχυσης φθορισμού ανθοκυανινών από βατόμουρα παρουσία πολυσακχαριτών

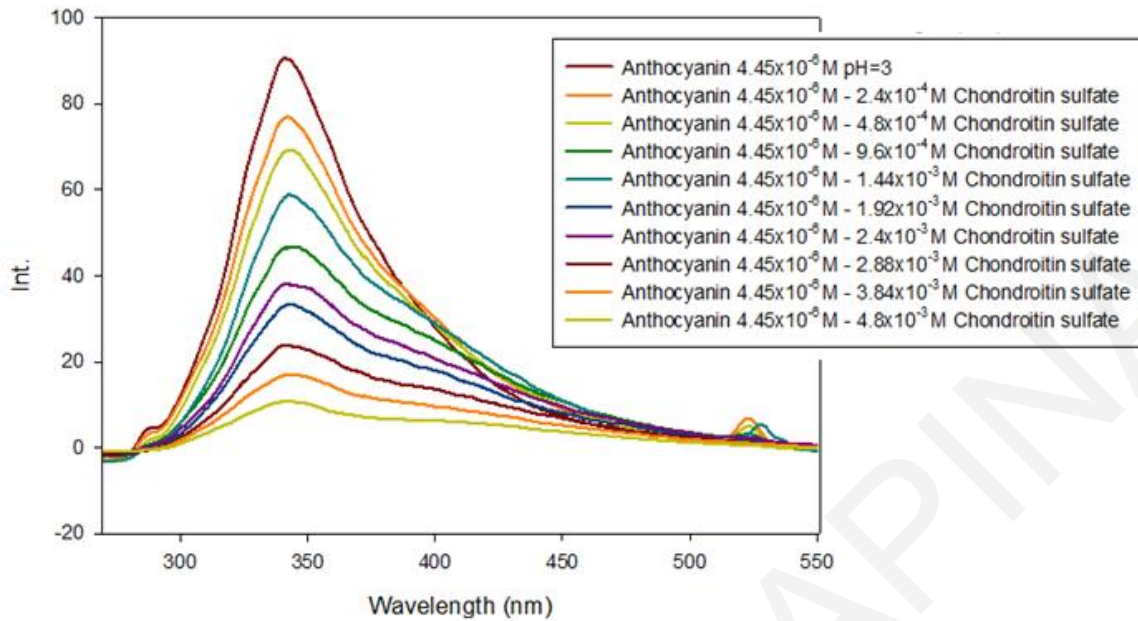


Σχήμα Π.51: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία θειικής χονδροϊτίνης σε pH=3 (μήκος κύματος διέγερσης: 330nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 380nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

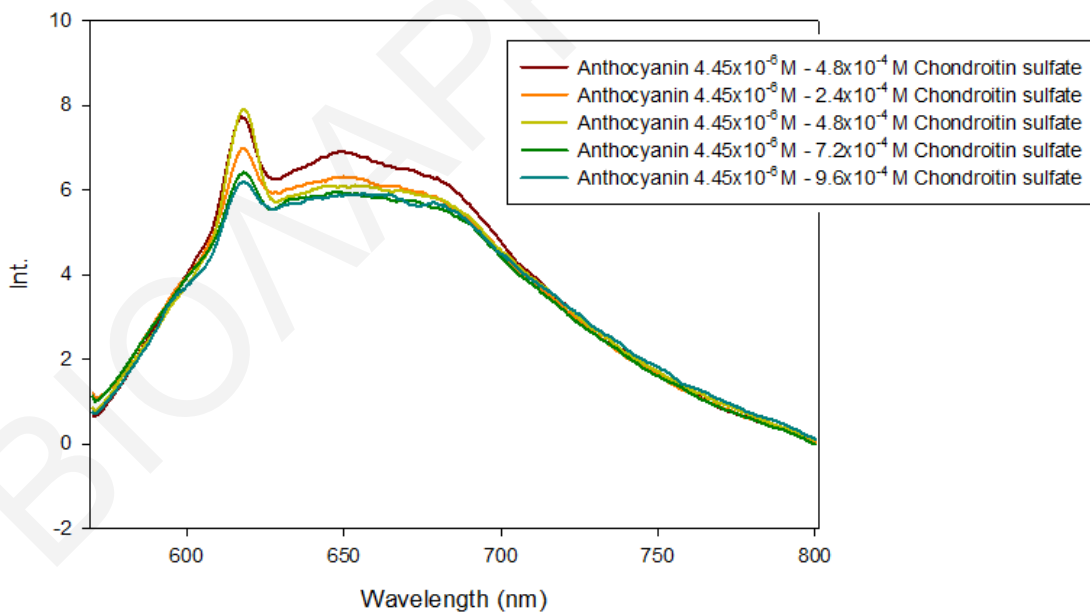


Σχήμα Π.52: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=3 παρουσία θειικής χονδροϊτίνης (διέγερση: 330nm).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

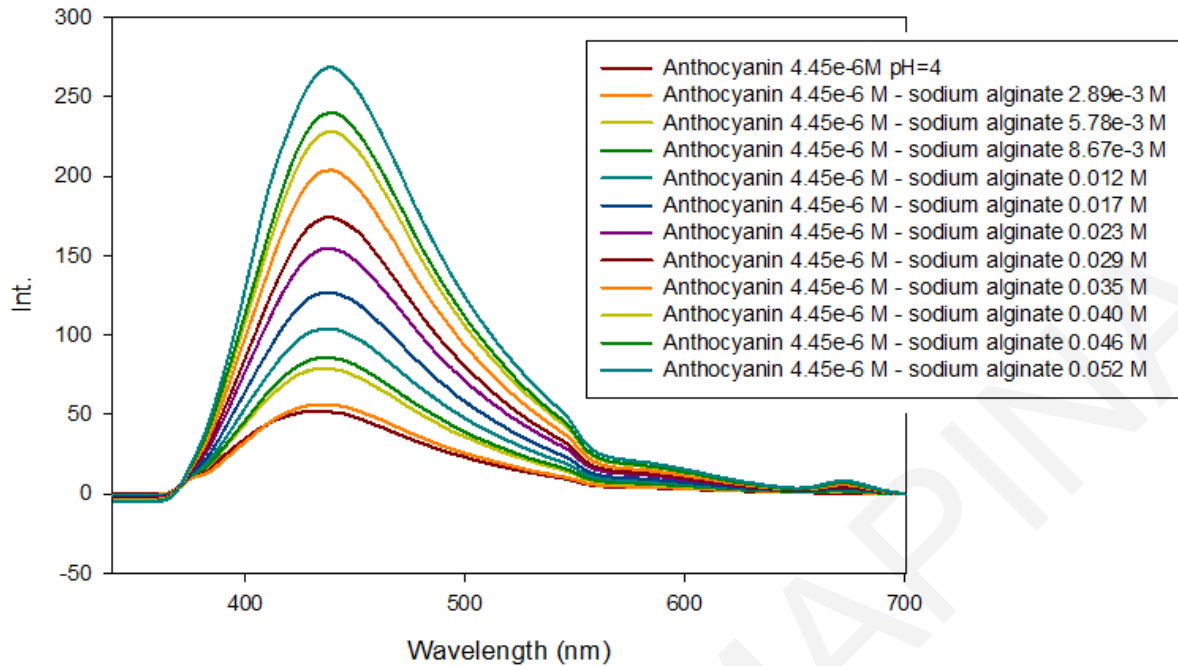


Σχήμα Π.53: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία θεικής χονδροϊτίνης σε pH=3 (μήκος κύματος διέγερσης: 260nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 280nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

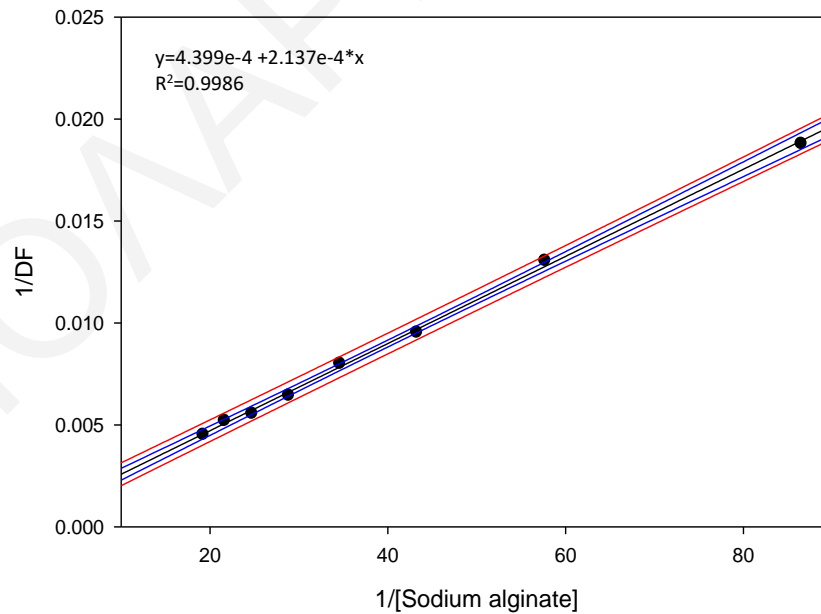


Σχήμα Π.54: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία θεικής χονδροϊτίνης σε pH=3 (μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

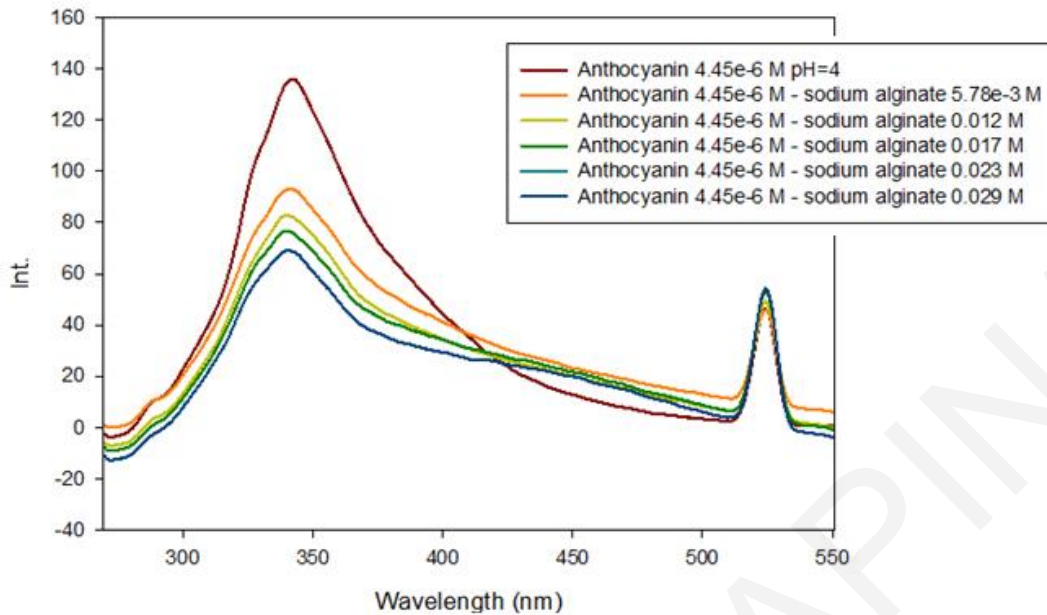


Σχήμα Π.55: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία αλγινικού νατρίου σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 330nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 380nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

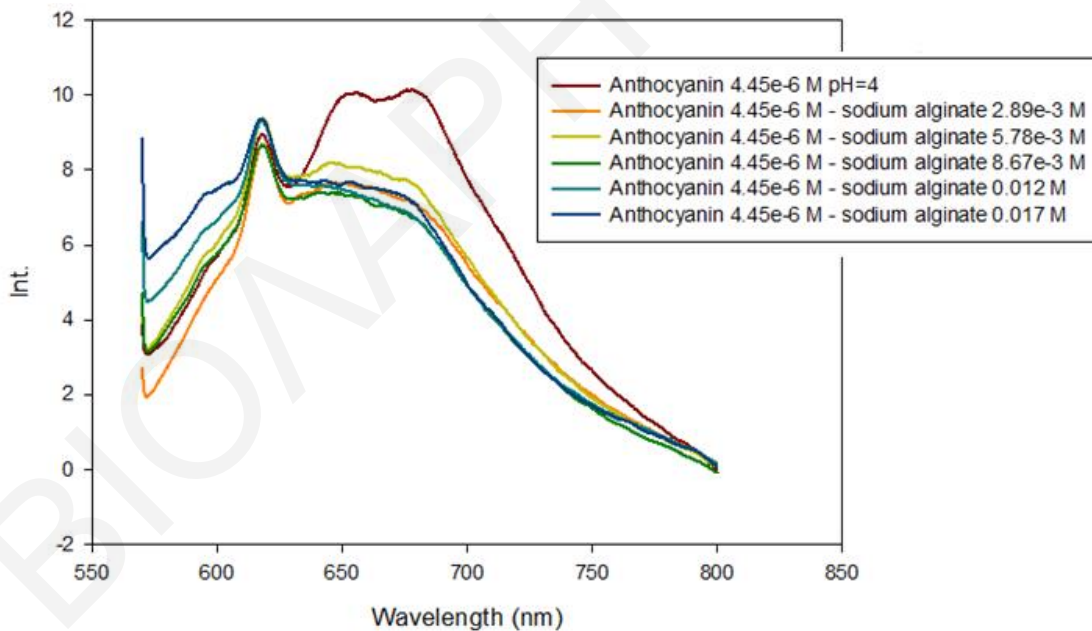


Σχήμα Π.56: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4 παρουσία αλγινικού νατρίου (διέγερση: 330nm).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

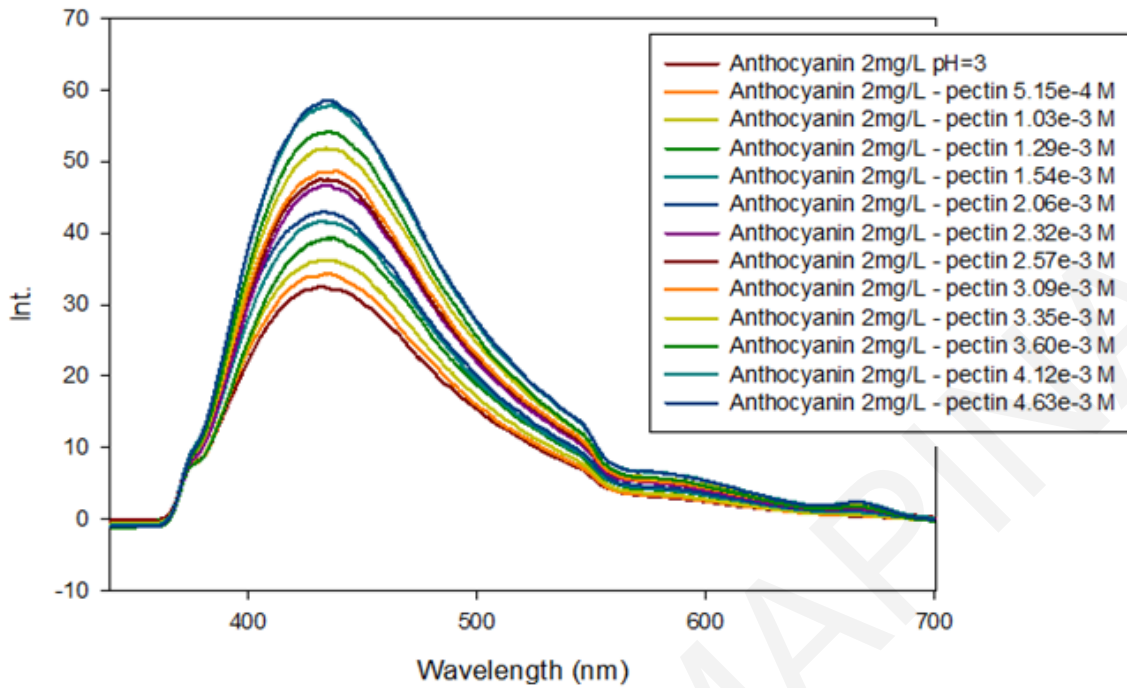


Σχήμα Π.57: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία αλγινικού νατρίου σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 260nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 280nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

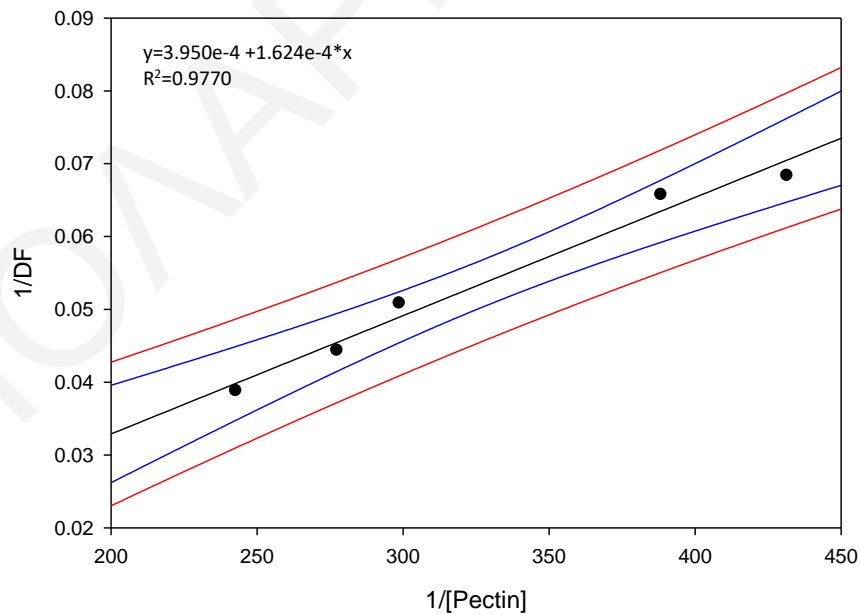


Σχήμα Π.58: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία αλγινικού νατρίου σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

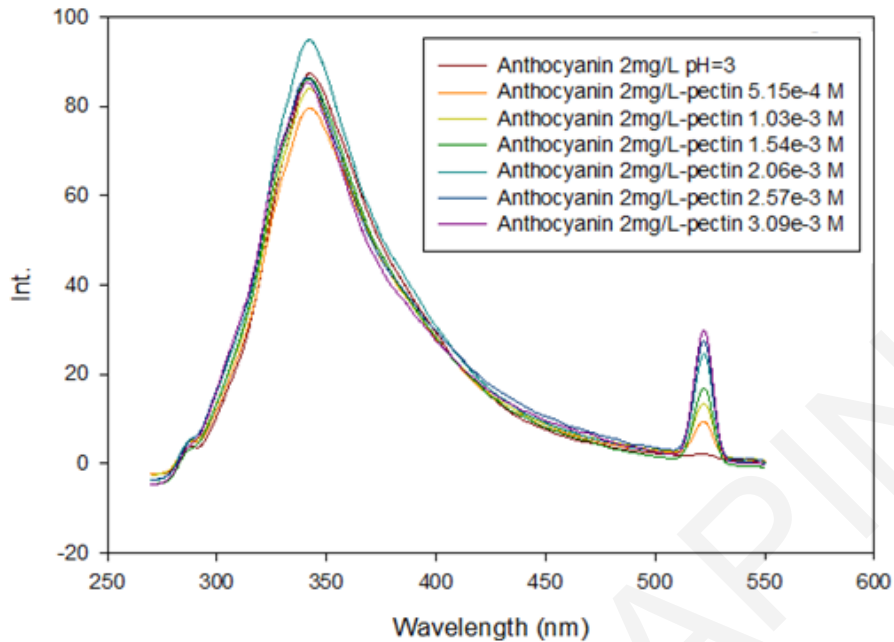


Σχήμα Π.59: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία πηκτίνης σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 330nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 380nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

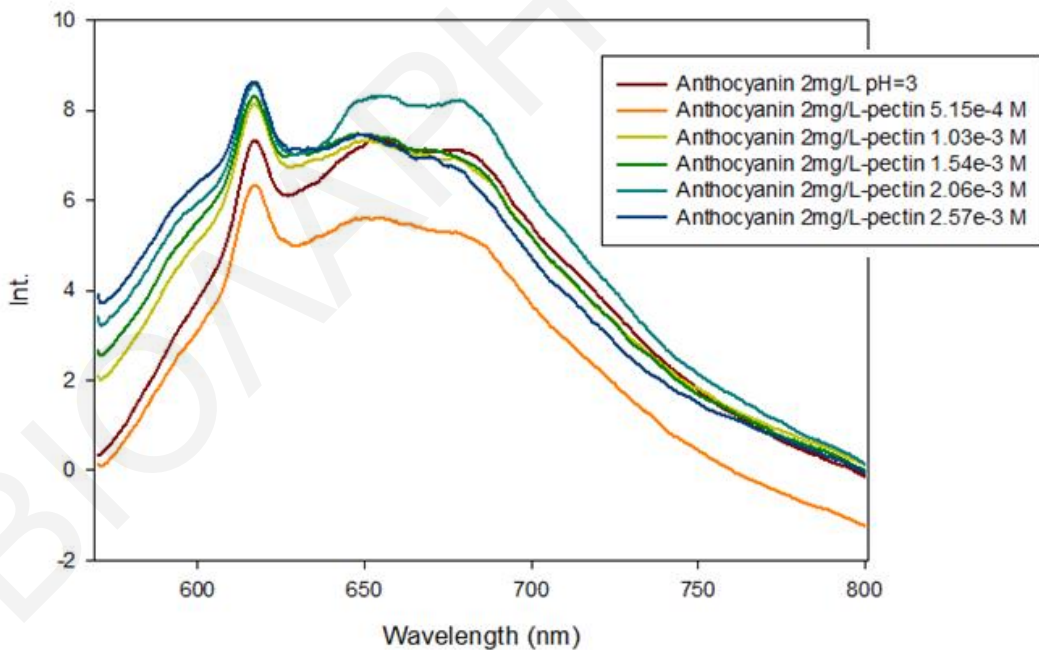


Σχήμα Π.60: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από βατόμουρα σε pH=4 παρουσία πηκτίνης (διέγερση: 330nm).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

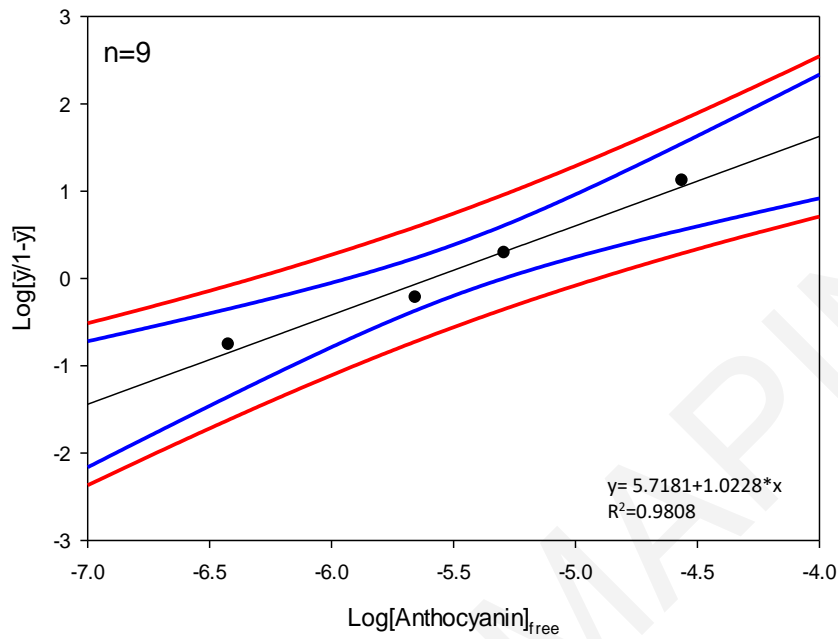


Σχήμα Π.61: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία πηκτίνης σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 260nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 280nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

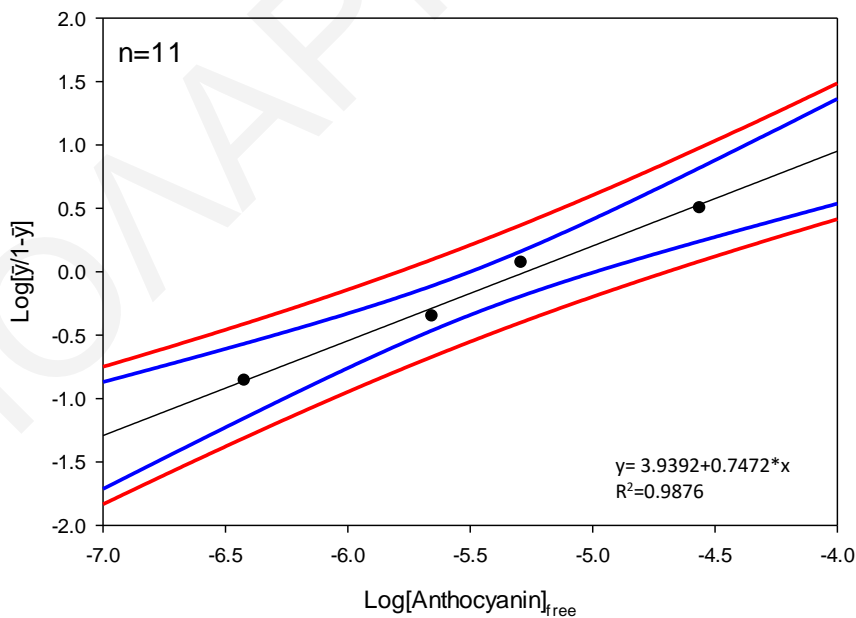


Σχήμα Π.62: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από βατόμουρα στην παρουσία πηκτίνης σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

Π.6 Διαγράμματα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες με βάση την απορρόφηση στα 276nm

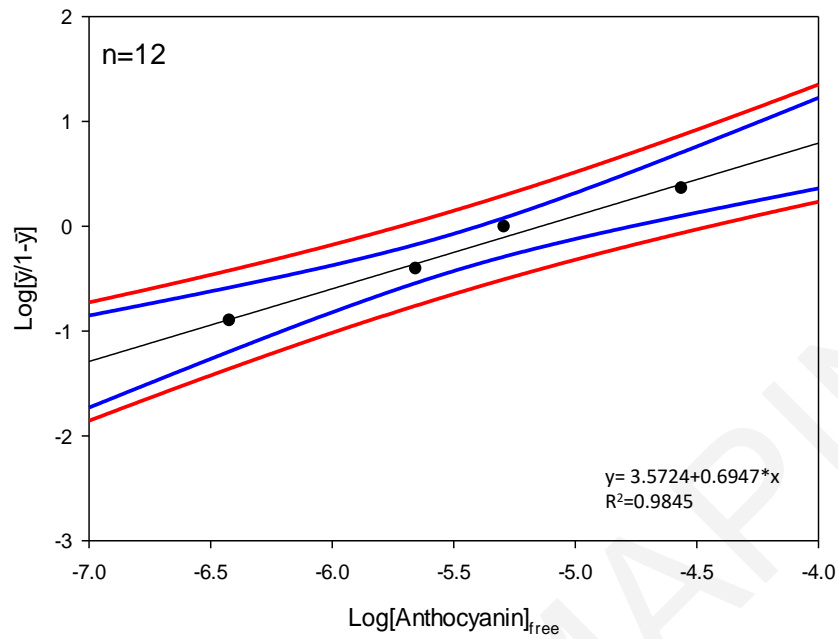


Σχήμα Π.63: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

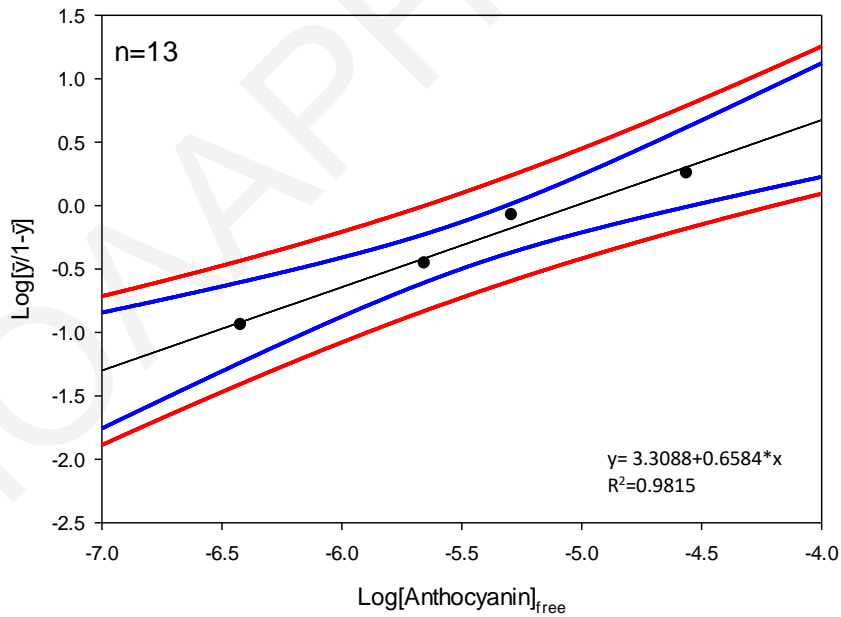


Σχήμα Π.64: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

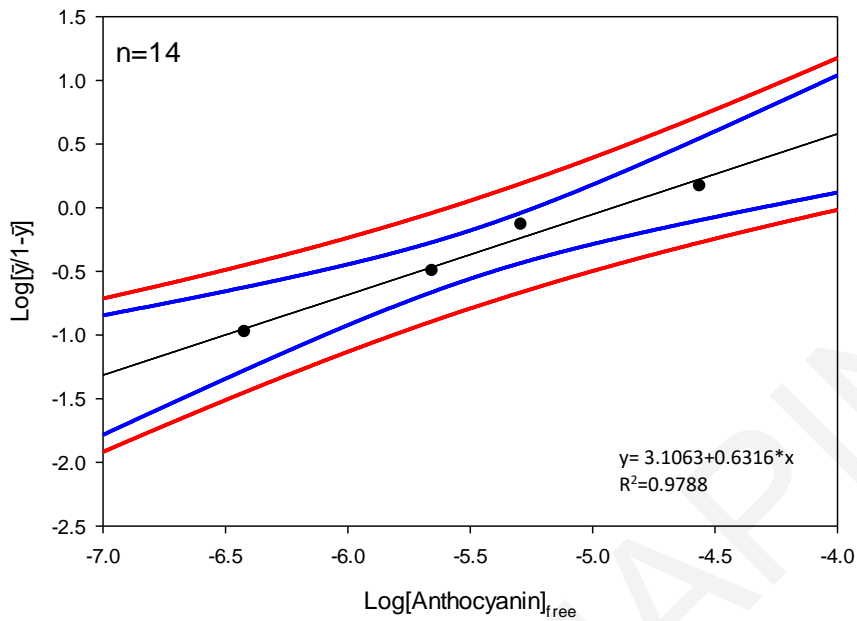


Σχήμα Π.65: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

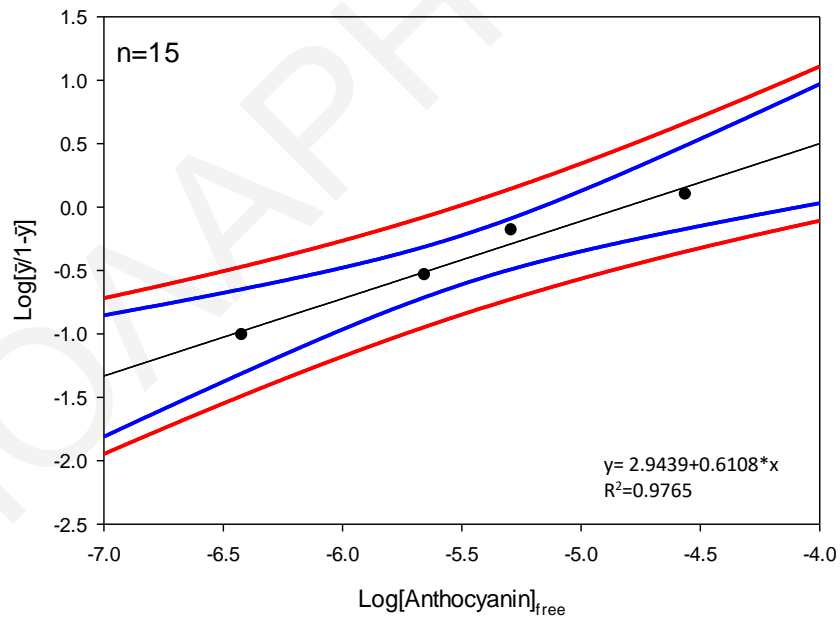


Σχήμα Π.66: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

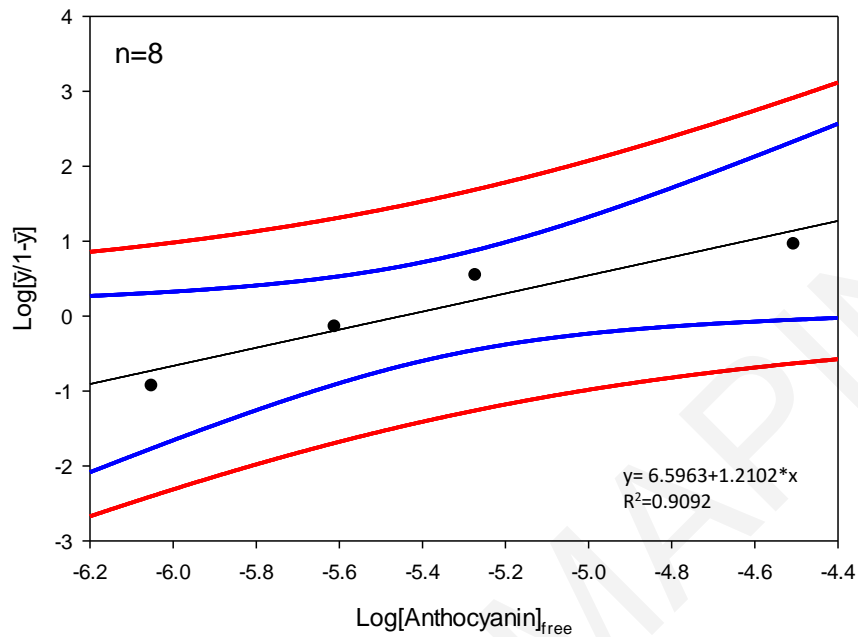


Σχήμα Π.67: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

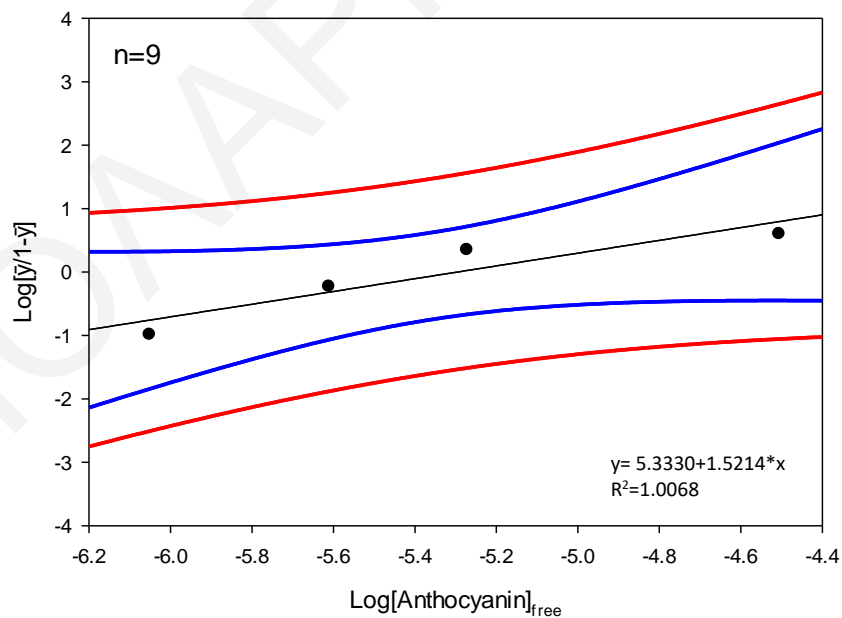


Σχήμα Π.68: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

Π.7 Διαγράμματα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες με βάση την απορρόφηση στα 518.5nm

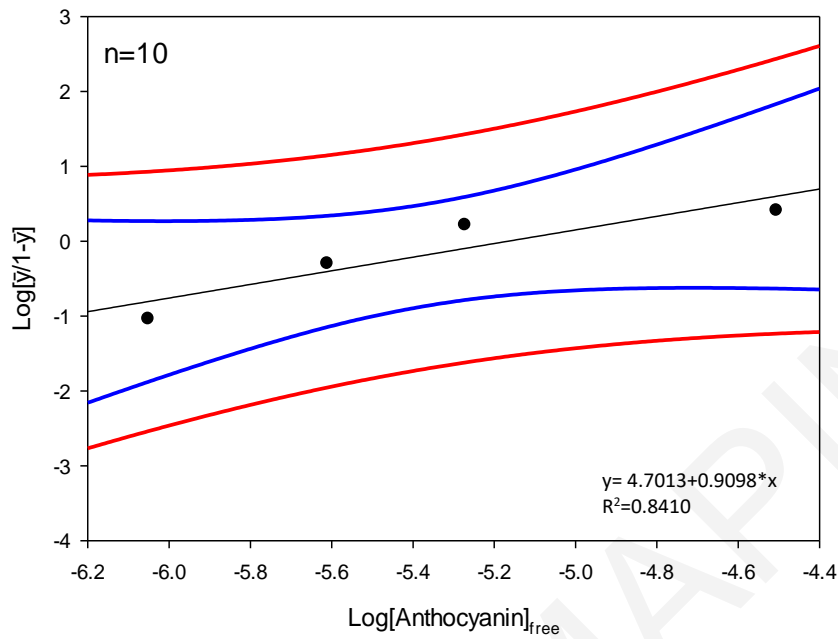


Σχήμα Π.69: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm.

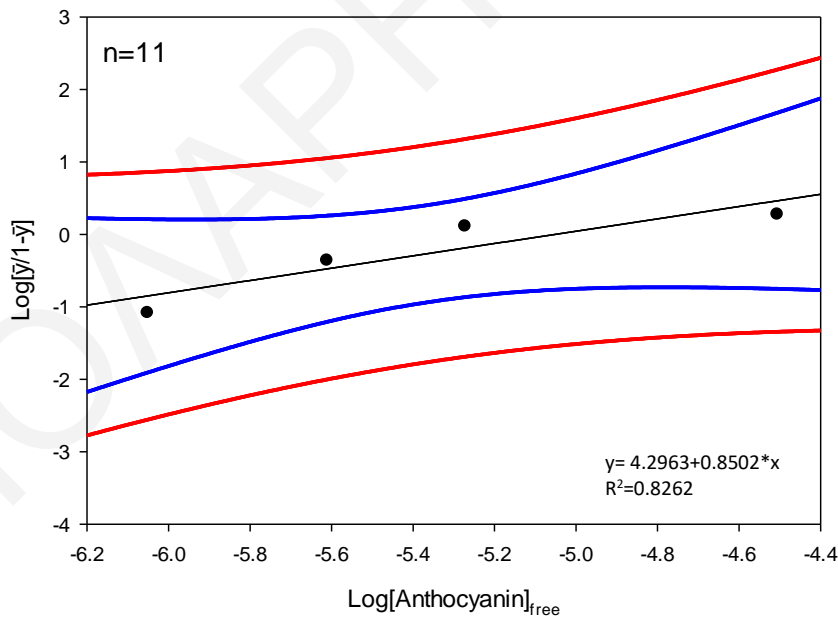


Σχήμα Π.70: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

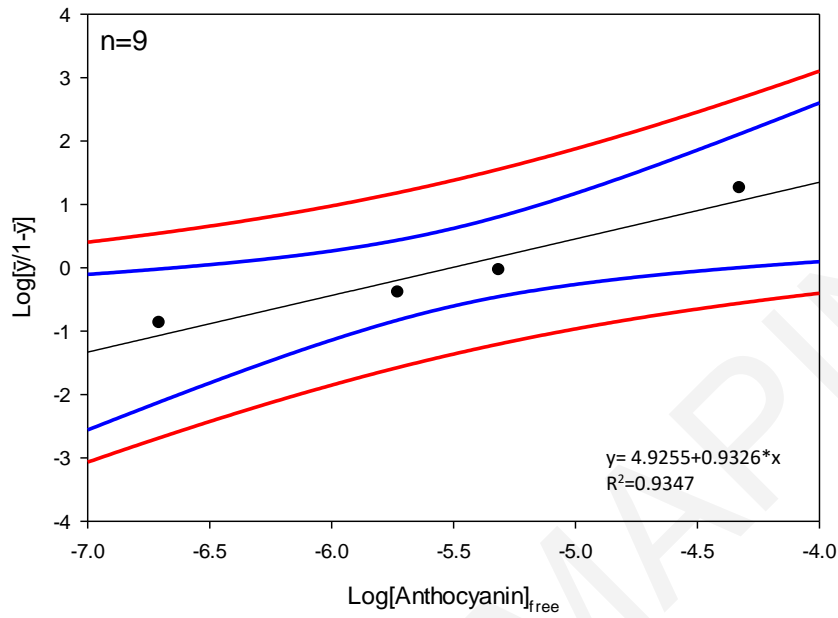


Σχήμα Π.71: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm.

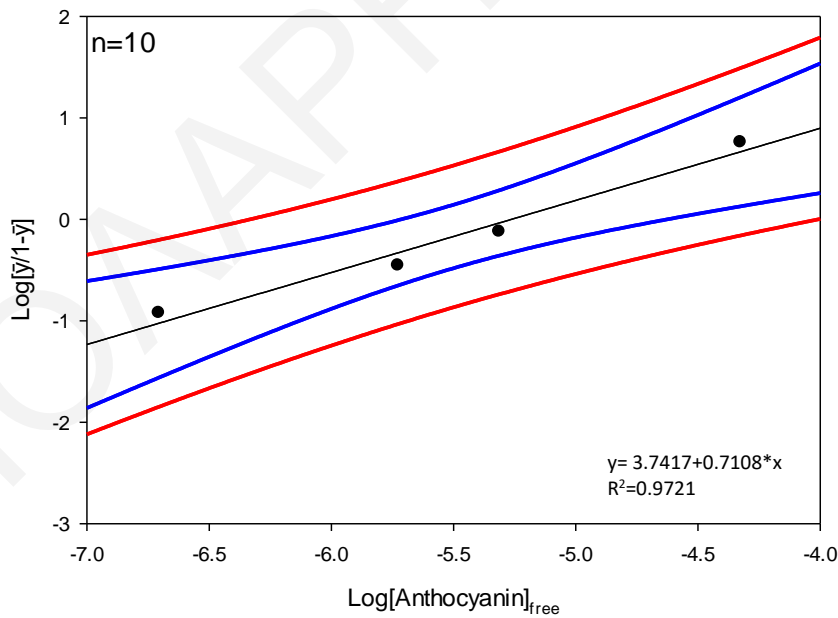


Σχήμα Π.72: Διάγραμμα Hill συστήματος BSA-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 518.5 nm.

Π.8 Διαγράμματα Hill συστήματος WPI-ανθοκυανίνες με βάση την απορρόφηση στα 276nm

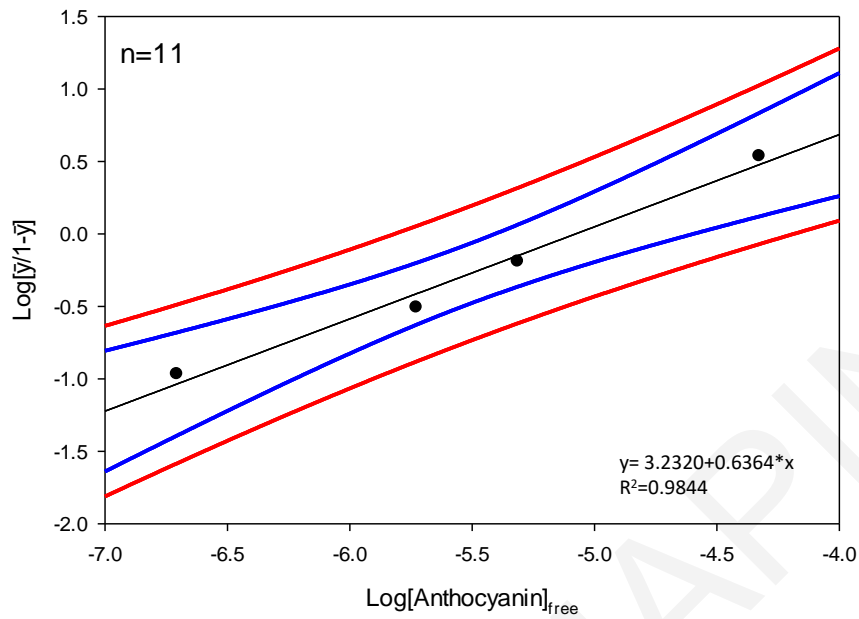


Σχήμα Π.73: Διάγραμμα Hill συστήματος WPI-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

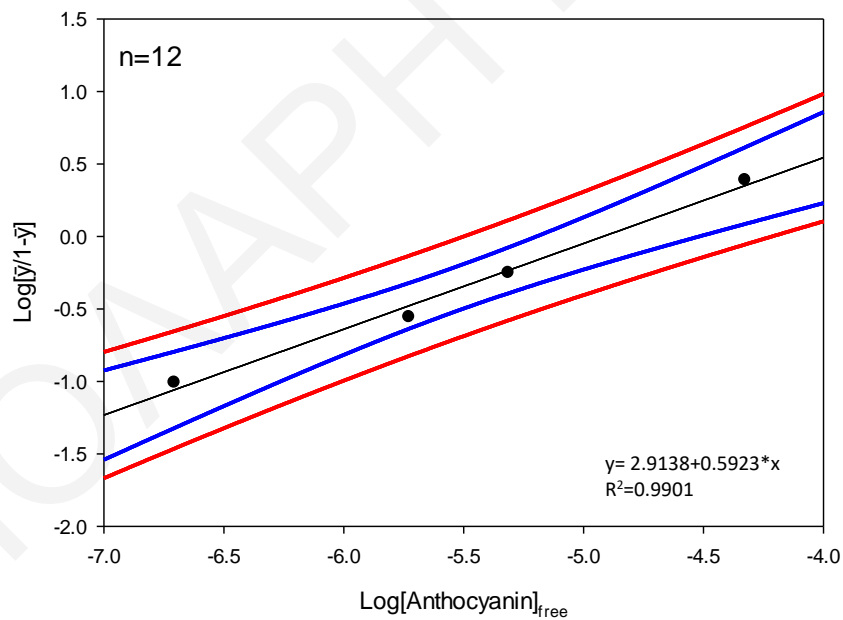


Σχήμα Π.74: Διάγραμμα Hill συστήματος WPI-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

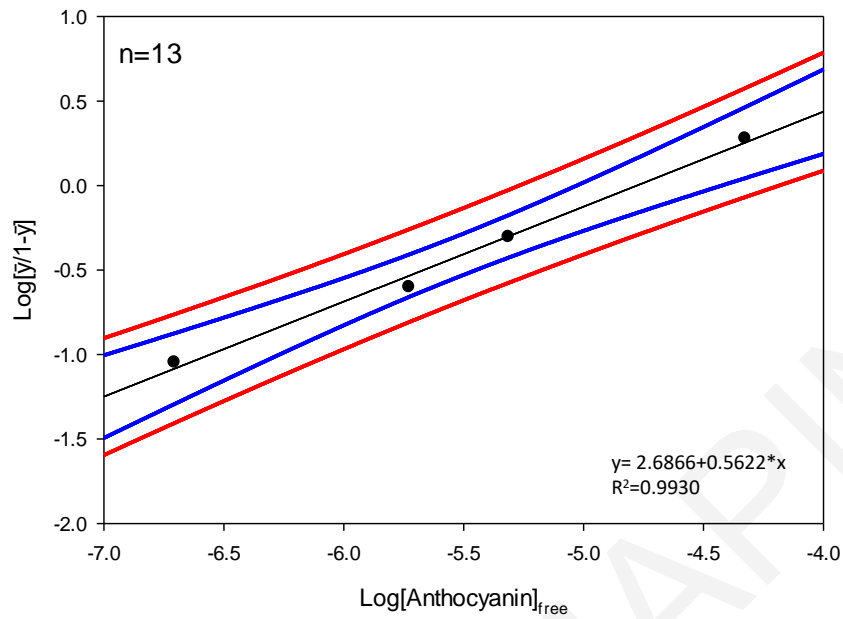


Σχήμα Π.75: Διάγραμμα Hill συστήματος WPI-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

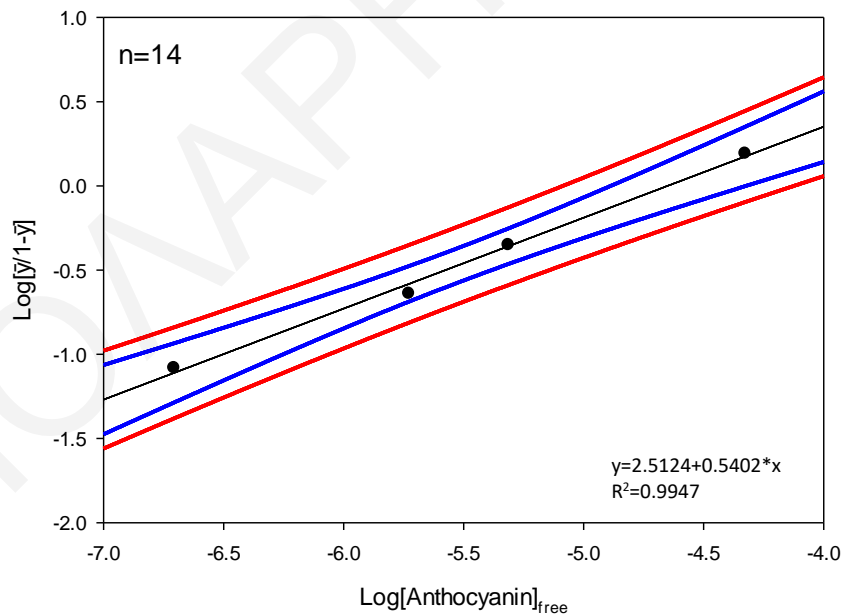


Σχήμα Π.76: Διάγραμμα Hill συστήματος WPI-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

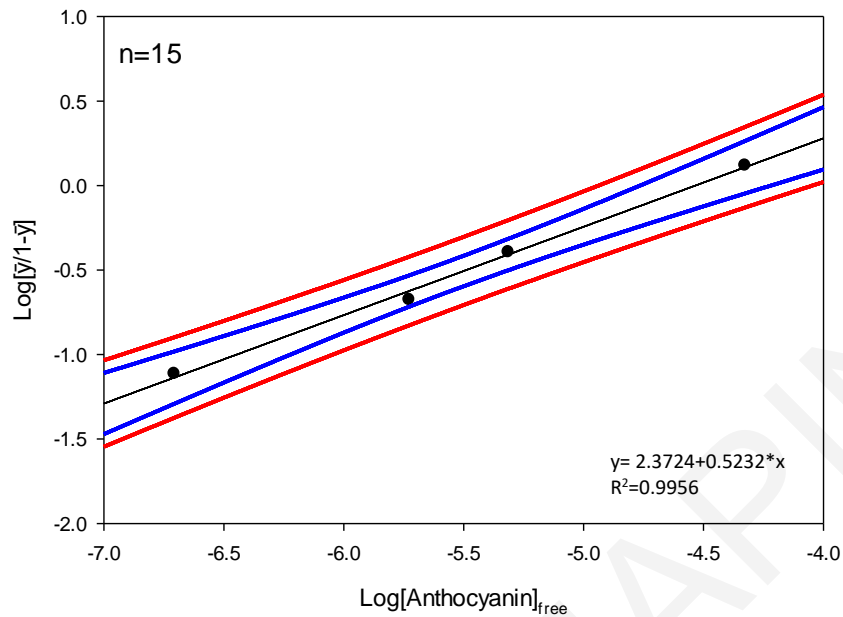


Σχήμα Π.77: Διάγραμμα Hill συστήματος WPI-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.



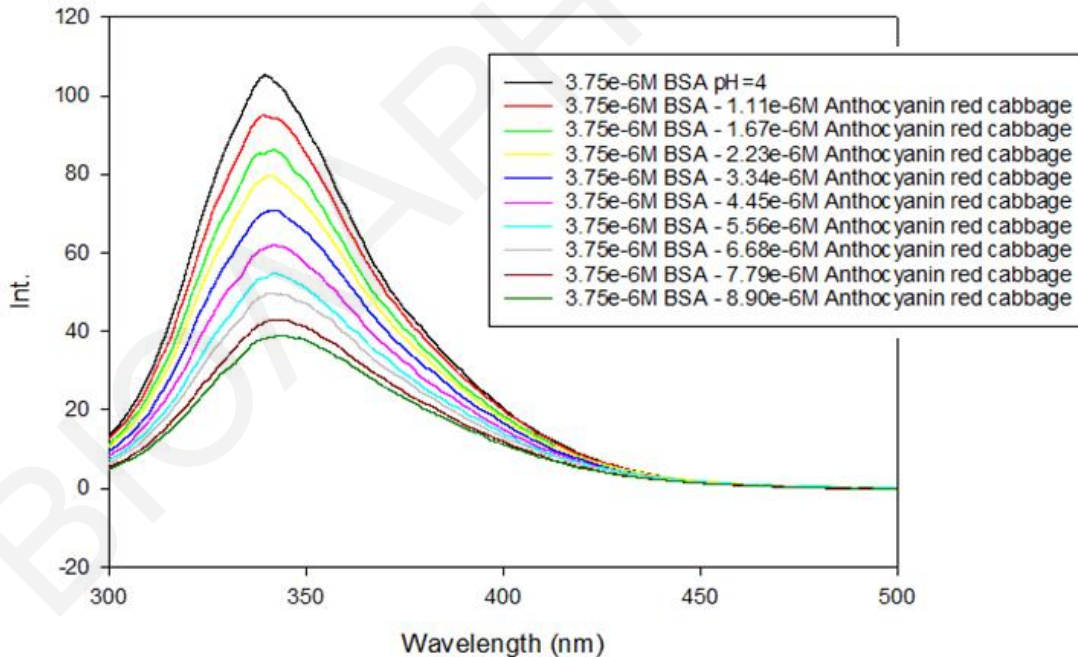
Σχήμα Π.78: Διάγραμμα Hill συστήματος WPI-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



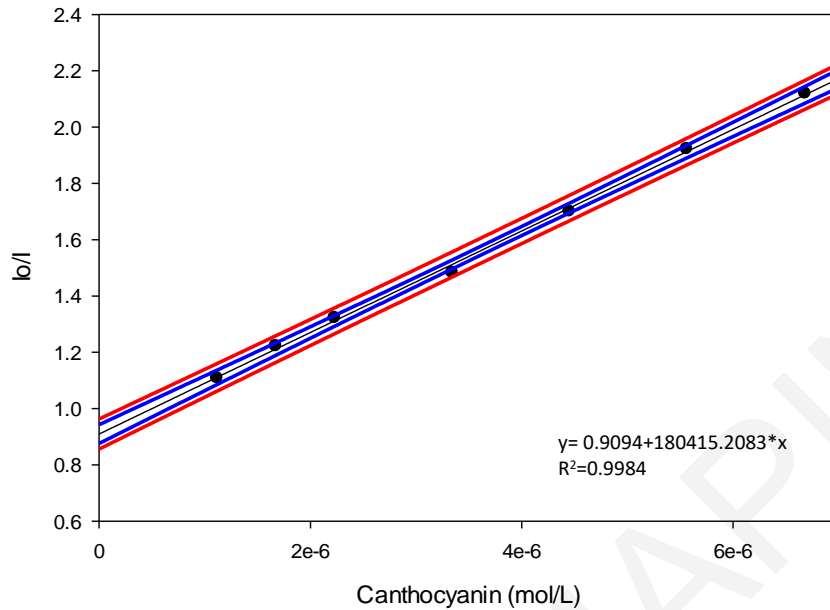
Σχήμα Π.79: Διάγραμμα Hill συστήματος WPI-ανθοκυανίνες από βατόμουρα σε pH=4, υπολογίζοντας την συγκέντρωση της ελεύθερης ανθοκυανίνης με βάση την απορρόφηση στα 276 nm.

Π.9 Μελέτη απόσβεσης φθορισμού πρωτεϊνών παρουσία ανθοκυανίνης από βατόμουρα

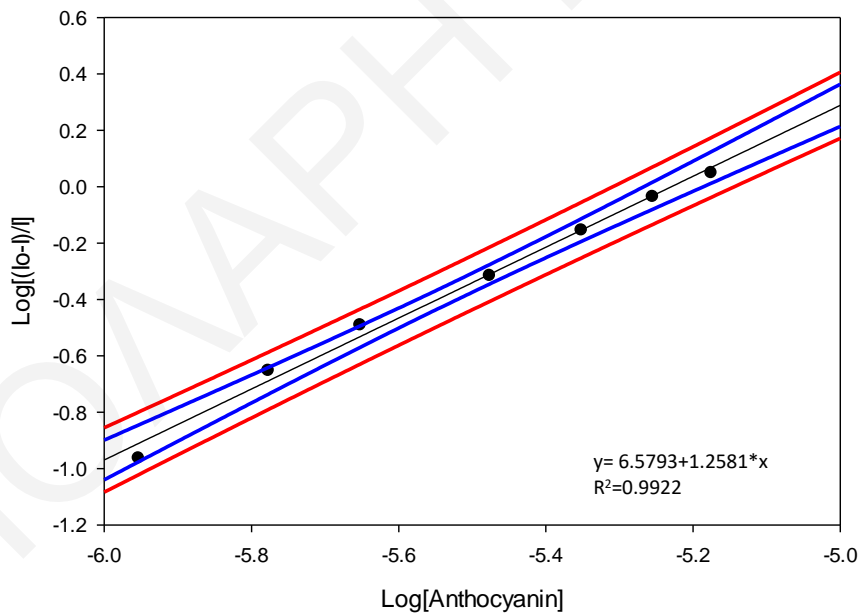


Σχήμα Π.80: Φάσματα φθορισμού BSA στην παρουσία ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο pH=7 (μήκος κύματος διέγερσης: 280nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 2.5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 2.5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

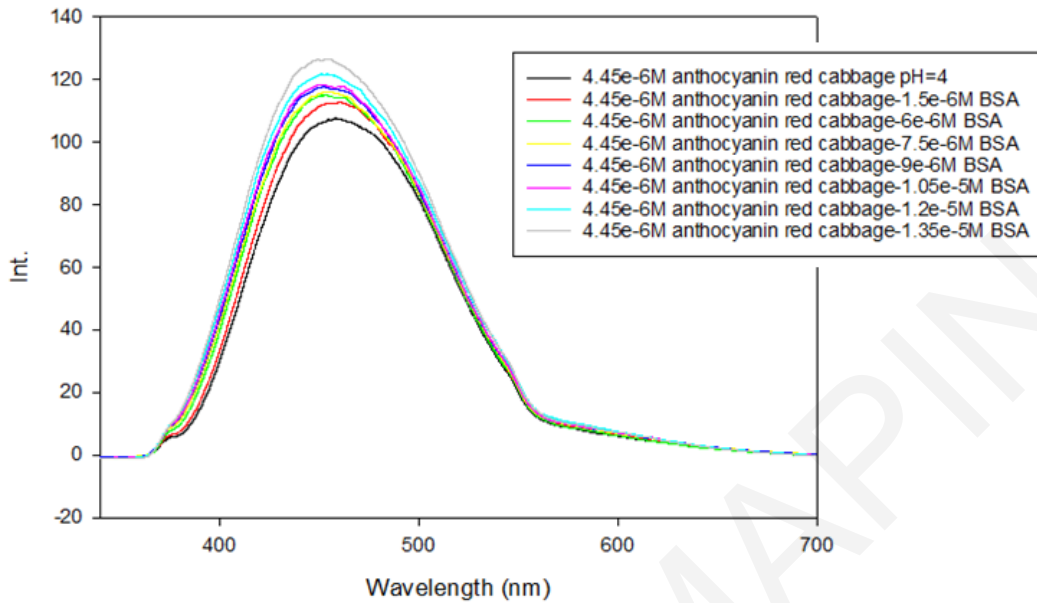


Σχήμα Π.81: Διάγραμμα Stern-Volmer απόσβεσης της BSA από τις ανθοκυανίνες (κόκκινο λάχανο) pH=4.

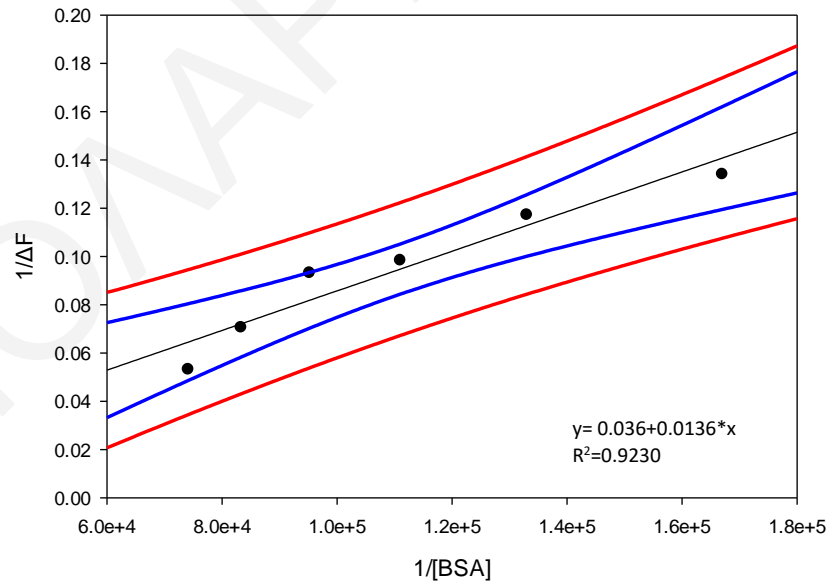


Σχήμα Π.82: Λογαριθμικό διάγραμμα S-V $[(I_0-I)/I_0]$ έναντι της συνολικής συγκέντρωσης της ανθοκυανίνης σε pH=4.

Π.10 Μελέτη ενίσχυσης φθορισμού ανθοκυανινών από κόκκινο λάχανο παρουσία BSA

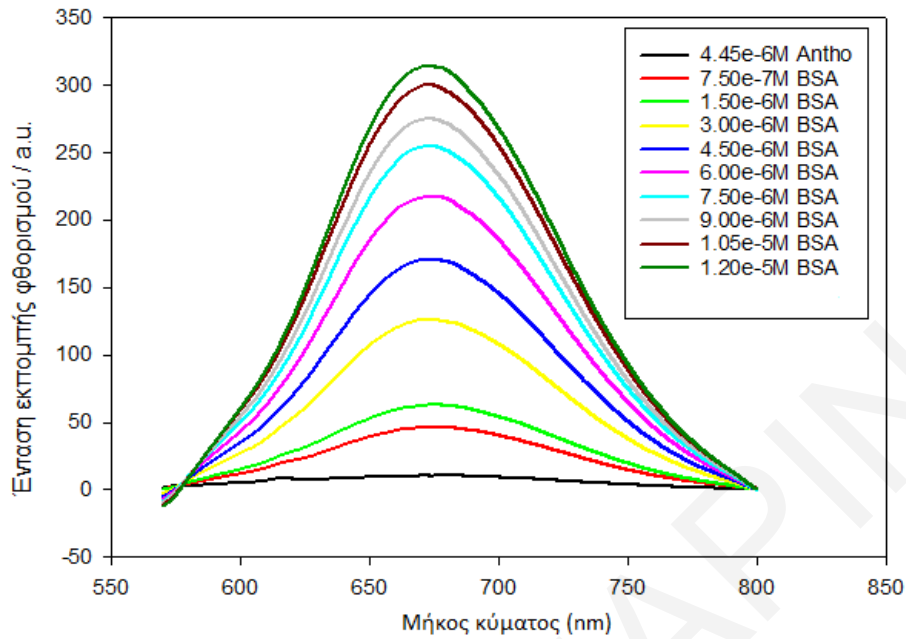


Σχήμα Π.83: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο στην παρουσία BSA σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 330nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm, χρησιμοποίηση φίλτρου 380nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.

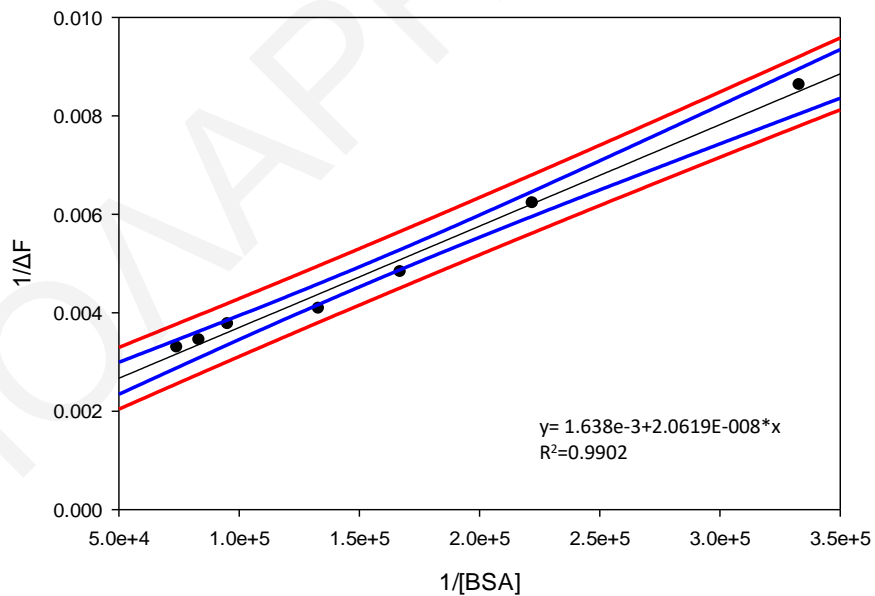


Σχήμα Π.84: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο σε pH=4 παρουσία BSA (διέγερση: 330nm).

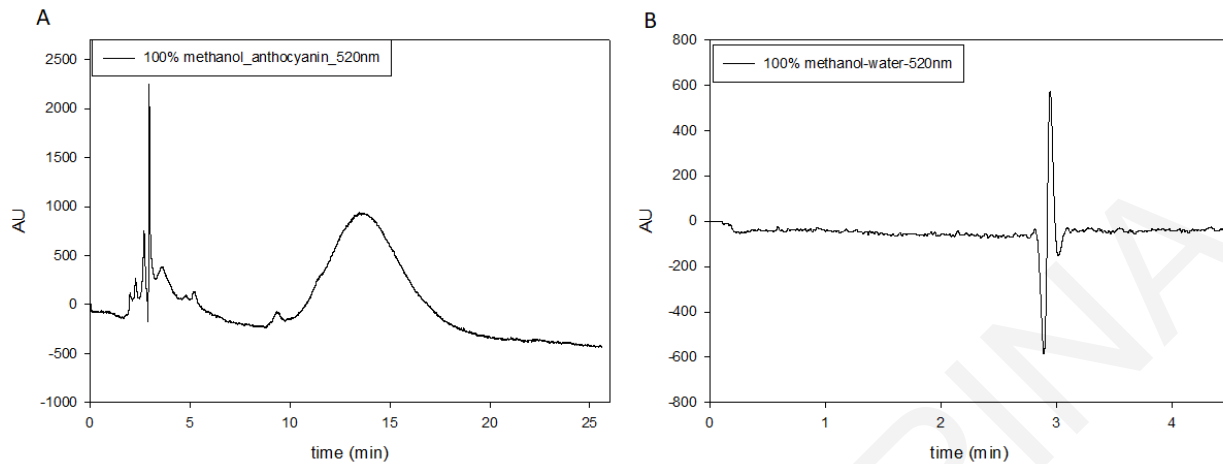
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Σχήμα Π.85: (Α) Φάσματα φθορισμού ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο στην παρουσία BSA σε pH=4 (μήκος κύματος διέγερσης: 560nm, εύρος ταινίας διέγερσης: 5nm, εύρος ταινίας εκπομπής: 5nm). Φασματοφωτόμετρο φθορισμού: JASCO FP-6300.



Σχήμα Π.86: Διάγραμμα Benesi-Hildebrand ενίσχυσης φθορισμού της ανθοκυανίνης από κόκκινο λάχανο σε pH=4 παρουσία BSA (διέγερση: 560nm).

Π.11 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης – Εκχύλισμα ανθοκυανινών από βατόμουρα

Σχήμα Π.87: Χρωματογράφημα HPLC ανθοκυανινών από βατόμουρα. Ισοκρατική έκλουση: 100% μεθανόλη (Ανίχνευση στα 520nm).

Στο σχήμα Π.87 παρατηρούμε ότι εμφανίζεται κορυφή στα ~14 λεπτά, όμως τα συστατικά δεν διαχωρίζονται. Βιβλιογραφικά δεν χρησιμοποιείται η ισοκρατική έκλουση για την ταυτοποίηση τέτοιων ουσιών και συνεπώς οι κορυφές που εμφανίστηκαν στα χρωματογραφήματα δεν ήταν δυνατόν να ταυτοποιηθούν, ενώ δεν υπήρξε ικανοποιητικός διαχωρισμός των κορυφών.