

DOMANDE DI BIOCHIMICA ALIMENTARE

1) Cosa sono le «scleroproteine»?

È una classe di proteine stabilita dalla classificazione di Osborne del 1909, questa classificazione raggruppa le proteine in funzione del mezzo di dispersione. In particolare le scleroproteine sono di norma insolubili in tutte le soluzioni, non si sciolgono perché sono legate da una quantità enorme di legami covalenti ponte disolfuro, oppure legami covalenti formati facendo una base di Schiff. Sono un esempio di questa categoria le cheratine che costituiscono le unghie e i capelli.

2) Cosa si intende per «salting in» e «salting out»?

Quando aggiungo sale ad una soluzione aumento la forza ionica, all'aumentare della forza ionica miglioro la solubilità delle globuline e anche le albumine, che erano già solubili a forza ionica 0, lo diventano ancora di più. Questo aumento di solubilità è dovuto al fatto che le proteine sono degli aggregati stabilizzati da attrazioni elettrostatiche, aumentando la forza ionica le cariche presenti sulle proteine non interagiscono più tra loro ma con gli ioni aggiunti alla soluzione. La fase di aumento della solubilità delle proteine al crescere della forza ionica è detta salting-in. Quando la forza ionica si alza troppo si ha un crollo della solubilità delle proteine: questa è la fase di salting-out. Il salting-out avviene perché aumentando la concentrazione salina, tutte le molecole d'acqua della soluzione sono impegnate nella solvatazione del sale e quindi viene meno l'azione strutturante dell'acqua, ciò determina l'esposizione e l'aggregazione di tutti i residui idrofobici determinando la precipitazione della proteina.

3) Presentare un esempio di gel stabilizzato da legami a idrogeno

Un esempio di gel stabilizzato da legami idrogeno è la gelatina di origine animale, mettendo collagene in soluzione acquosa e portandolo a temperature elevate si rompono i legami idrogeno che tengono insieme la tripla elica. Se faccio raffreddare la soluzione ottenuta, si formano legami idrogeno tra il CO e NH del collagene, non si può riformare la tripla elica ma si forma un reticolo tridimensionale che ingloba acqua. Il reticolo ha una disposizione casuale ed è stabilizzato solo da ponti idrogeno, è una struttura reversibile perché scaldandola ritorna liquida.

4) Perché la solubilità di proteine è minima al loro punto isoelettrico?

Perché al punto isoelettrico la carica netta è pari a zero (il numero di cariche positive equivale a quello delle cariche negative) quindi non sono presenti cariche che si respingono, le proteine si possono avvicinare per formare aggregati insolubili. Il valore del pH corrispondente al punto isoelettrico sarà anche il valore per cui la proteina avrà il minor numero di cariche possibili, quindi la minor capacità di trattenere acqua.

5) Presentare un esempio di gel stabilizzato da legami disolfuro

L'uovo può diventare un gel perché all'interno contiene acqua che quando solidifica viene incorporata. L'albume dell'uovo è composto da ovoalbumina, ciascuna molecola di essa contiene 5 cisteine: 3 libere e 2 che formano un legame disolfuro. Alzando la temperatura è reso possibile lo scambio di disolfuri, i legami intra molecolari diventano inter molecolari, e vengono esposti i residui idrofobici che interagiscono tra loro appiccicandosi.

6) Lega più acqua una proteina che contiene 20 Glu e 80 Asn nella sua sequenza, oppure una che contiene 20 Asn e 80 Glu?

Lega più acqua la miscela contenente 20 Asn e 80 Glu, sono entrambi due amminoacidi polari, ma Asn non ha catena laterale carica, invece il glutammato ha una catena laterale polare carica. La proteina che lega più acqua è quella con più cariche, ammesso che il pH sia compatibile con l'esistenza di cariche,

7) Presentare un esempio di gel stabilizzato da ioni Ca^{2+}

Il tofu è un gel stabilizzato da ioni calcio. Per la sua produzione si parte da un estratto proteico di globuline di soia, viene aggiunta una sorgente di calcio che va ad interagire con le abbondanti cariche negative presenti sulle proteine della soia. Le varie catene proteiche condividono ioni calcio bivalenti. Quello che si

forma è quindi un reticolo stabilizzato da interazioni ioniche che incorpora acqua al suo interno, quindi è un gel. Le interazioni che lo stabilizzano non sono sensibili alla temperatura.

8) Quali caratteristiche strutturali o compositive fanno sì che le gliadine siano solubili solo in alcoli?

Secondo la classificazione di Osborne appartengono alla classe delle prolamine, si trovano solo nei cereali dove svolgono la funzione di proteine di deposito. Sono solubili solo in alcol perché sono composti molto apolari, composte da glutammina e asparagina.

Hanno moltissimi amminoacidi idrofobici, quindi la possibilità che una proteina di questo tipo sia solubile in acqua è nulla, quindi è necessario un solvente più apolare per rompere le interazioni idrofobiche tra le proteine. Posso anche diminuire la spinta entropica dell'acqua utilizzando agenti caotropi o utilizzando una combinazione di temperatura e detergenti.

9) Come mai alcuni ioni hanno azione destrutturante?

Hanno azione destrutturante gli ioni che si solvatano poco in acqua o che non si solvatano per niente, questi riescono a penetrare nella cavità proteica stabilizzata da interazioni elettrostatiche, interferiscono con queste interazioni, facendo collassare la struttura della proteina.

10) Perché una eccessiva acidificazione dello yoghurt porta ad una separazione di fasi?

Perché abbassando il pH si arriva al punto isoelettrico della caseina che diventa insolubile e si separa completamente dal siero. Per evitare che ciò avvenga dobbiamo evitare che si arrivi al punto isoelettrico, ci si ferma a un pH leggermente più alto, in modo che la caseina conservi un po' di carica, così che possa trattenere un po' d'acqua: in questo modo si ottiene una struttura dello yogurt più compatta.

11) Quale componente proteica della caseina è glicosilata, e in quale regione?

La K-caseina è ricca di residui glicosilati che sono esclusivamente posti nella porzione C-terminale, c'è quindi una netta separazione tra la parte idrofobica e idrofila della proteina. La k-caseina si trova maggiormente nelle submicelle più esterne, quindi i residui glicosilati sono esposti all'esterno della micella di caseina.

12) Qual è la frazione di ligando associata ad una proteina, data una K_d pari a 1 mM, e una concentrazione di ligando e proteina entrambi pari a 2 mM?

$$K_d = \frac{[P_{tot} - PL][L_{tot} - PL]}{[PL]}$$

Bisogna trovare PL:

$$1 = \frac{(2-PL)^2}{PL} \quad (2 - PL)^2 = 1 \quad PL = 1$$

13) Quali tipi di legami chimici si possono stabilire tra una proteina e un acido grasso?

Si può stabilire un'interazione elettrostatica, tra il gruppo carbossile dell'acido grasso e delle cariche positive presenti sulla proteina, oppure si può stabilire un'interazione idrofobica tra la catena idrocarburica degli acidi grassi e i residui apolari presenti nella struttura della proteina. Un caso esplicativo di queste interazioni tra acidi grassi e proteina è rappresentato dall'albumina serica, essa è organizzata in modo da avere un grande solco idrofobico al suo centro, che funge da sito di legame per gli acidi grassi.

14) Presentare un esempio di «denaturazione interfacciale»

Un esempio di denaturazione interfacciale è la schiuma, cioè un'emulsione in cui c'è un velo d'acqua che separa ambienti riempiti con gas. Il bianco d'uovo è largamente utilizzato in questi sistemi perché all'interno presenta due proteine glicosilate, l'albumina e l'ovomucoide. Montando il bianco d'uovo con una frusta incorporiamo aria in questa soluzione acquosa di proteine, il fatto che viene applicata un'azione meccanica vigorosa e intensa denatura le proteine, srotolandosi la proteina espone i suoi residui idrofobici, che si pongono verso la parte del sistema dove non c'è acqua, nel caso della schiuma la parte apolare è rappresentata dal gas. In questo modo è stato ottenuto un sistema costituito da bolle d'aria separate da

una regione acquosa detta lamella, le lamelle si incontrano in regioni specifiche che si chiamano punti nodali. Questo sistema non è perfettamente stabile perché l'acqua delle lamelle evapora e causa la fuoriuscita di gas. Per fare durare di più la schiuma è necessario qualcosa che si leghi all'acqua rallentando la velocità di evaporazione, come ad esempio lo zucchero e il glicerolo). Nel caso dell'albume già la presenza dell'ovomucoide svolge le funzioni di zucchero e glicerolo, perché contiene molto zucchero ed è molto viscoso.

15) Perché una proteina si denatura in modo diverso sulla superficie di una gocciolina lipidica e di un solido idrofobico?

La proteina su una gocciolina lipidica subisce delle modificazioni significative perché una parte della struttura proteica penetra la fase apolare, espone i suoi residui idrofobici e perde il suo disavvolgimento, il triptofano si sposta dal sito di quenching ed emette molta energia che si può misurare attraverso il fluorimetro. Nel caso di un solido la proteina non penetra la fase solida, la proteina si denatura ed espone i suoi residui idrofobici, ma l'emissione di energia del triptofano che si è spostato dal sito di quenching è contenuta perché è comunque legato a qualcosa di idrofobico e non è esposto al solvente.

16) Quali indicazioni strutturali si possono ricavare dallo studio della fluorescenza dei residui di triptofano?

La posizione del triptofano è indice delle modificazioni strutturali di proteine. La fluorescenza intrinseca di proteine legata alla collocazione del triptofano dipende da solvente, pH, forza ionica, agenti caotropi e la struttura. Il triptofano normalmente si trova nel sito di quenching dove emette luce molto energetica, ma questa energia viene assorbita da altri amminoacidi come cisteina e arginina. Quando il triptofano si sposta dal sito di quenching emette molta energia che non viene assorbita dagli amminoacidi, questo è possibile misurarlo con un fluorimetro. Quindi grazie all'utilizzo di un fluorimetro possiamo valutare lo spettro di emissione del triptofano e valutare se la proteina è presente alla struttura nativa oppure è denaturata.

17) Quali fattori contribuiscono alla stabilità di una schiuma?

Per fare durare di più una schiuma è necessario aggiungere qualcosa che si leghi all'acqua e che ne rallenti l'evaporazione, questi possono essere ad esempio lo zucchero e il glicerolo. Il glicerolo essendo più viscoso dell'acqua rallenta lo scorrimento verso i punti nodali (punti di incontro tra le lamelle, cioè le regioni acquose che separano le bolle d'aria in una schiuma. Nel caso dell'albumina l'ovomucoide che è ricca di zucchero e molto viscosa, impedisce l'evaporazione dell'acqua e in secondo luogo impedisce lo scorrimento dell'acqua verso i punti nodali.

18) Fornite una spiegazione molecolare per la presenza (e la quantità relativa) degli ingredienti presenti in una maionese commerciale (li trovate elencati sull'etichetta in ordine decrescente di abbondanza)

La presenza di acqua è dovuta all'utilizzo di uova essiccate. Senape e zucchero sono utilizzati per una questione di gusto, lo zucchero serve anche a correggere l'acidità del limone o dell'aceto. L'EDTA è un chelante, evita che il ferro del tuorlo crei radicali liberi che ossidano i doppi legami degli acidi grassi. L'amido è l'ingrediente che fa da viscosizzante, cioè aiuta la stabilità dell'emulsione, ritardando il movimento delle goccioline lipidiche le une verso le altre. Se non c'è amido vuol dire che sono state utilizzate uova intere, l'albume durante la pastorizzazione denatura le sue proteine che esercitano la funzione viscosizzante. L'acido citrico è un chelante e l'acido ascorbico è antiossidante (entrambi presenti nel succo di limone).

19) Sulla base dei dati di immunoreattività presentati nelle slides, cercate di rispondere a chi vi chiede se un gelato sia meglio del latte fresco per un bambino sensibile a BLG

Quando BLG, varca la mucosa si scatena una risposta immunitaria incontrollata in soggetti sensibili come i bambini. I bambini sono sensibili a BLG perché la loro cellule intestinali non sono ancora saldate e quando BLG riesce a passare tra queste viene attaccata da moltissime immunoglobuline. I frammenti di BLG sono pericolosi quando sono in emulsione, si formerebbero polimeri che vengono attaccati più facilmente dagli anticorpi. Quindi verrà scatenata una risposta immunitaria maggiore ed incontrollata nel caso del gelato, perché BLG è legata a particelle di grasso. Quindi per un bambino sensibile a BLG è meglio il latte fresco.

20) Sulla base dei dati di digeribilità presentati nelle slides, indicate quale di questi alimenti sia una miglior sorgente di cisteina (che consideriamo derivare solo dalla digestione di BLG): a) latte fresco intero; b) latte fresco intero con polvere di cacao; c) gelato al cioccolato

Nessuno di questi alimenti è una buona sorgente di cisteina. Le uniche proteine che contengono una significativa quantità di cisteina che sono le sieroproteine sono quelle che si denaturano quando noi prepariamo un'emulsione, quindi il gelato è una miglior sorgente di cisteina. La presenza dipende dal grado di lavorazione e dalla denaturazione delle uniche proteine che contengono quantità significative di cisteina (le sieroproteine).

21) Perché una proteina denaturata ad una interfaccia liquido-liquido e ad una interfaccia solido-liquido assumono strutture diverse?

Le modificazioni strutturali sono diverse, perché se ho una fase oleosa le porzioni idrofobiche della proteina penetrano all'interno della fase non acquosa. Se ho una superficie idrofobica solida queste regioni non penetrano all'interno del solido e continuano a toccare la proteina che si trova dall'altra parte. Quindi la conformazione della proteina è diversa a seconda che le regioni idrofobiche riescono a penetrare all'interno nella fase apolare o siano costrette a rimanere sulla superficie.

22) Perché la digeribilità di una proteina ad un'interfaccia può cambiare in ragione delle dimensioni delle particelle nella fase non acquosa?

Se metto una proteina in presenza di particelle solide e vado a valutare la sensibilità alle proteasi. Se prendo una particella solida piccola e una sensibilmente più grossa, i prodotti di idrolisi che ottengo non sono gli stessi. La proteina si denatura quando vede la superficie idrofobica, il modo con cui interagisce dipende da quanta proteina ho e quanto è curva la superficie.

Una proteasi che vuole tagliare la proteina lavora in modo diverso in base a come la proteina è attaccata alla particella. Se la particella è grande la proteina sarà completamente adesa ad essa, se la proteina è piccola no. Per questo motivo la dimensione delle particelle della fase non acquosa influenza l'azione delle proteasi.

23) Provate ad esprimere con parole vostre la differenza tra temperatura e calore

La temperatura indica lo stato termico di un corpo, cioè l'agitazione delle molecole che lo costituiscono. Il calore invece è una forma di energia che viene trasferita tra due corpi che si trovano a temperatura differente. Nel caso della denaturazione delle proteine è l'azione termica della temperatura, non del calore, ad operare una denaturazione fisica.

24) Commentare un esempio di modificazione covalente di amminoacidi indotta da un trattamento termico, illustrandone le possibili conseguenze.

La formazione di furosina è un esempio di modificazione covalente indotta dal trattamento termico, si forma per reazione tra l'ammino gruppo della catena laterale della lisina e uno zucchero riducente, comporta una perdita di valore nutrizionale e di digeribilità dell'alimento a causa della mancata accessibilità dell'amminoacido lisina che è bersaglio della tripsina nel tratto digestivo. La furosina è un marcatore di qualità, in quanto fa capire se l'alimento è stato sottoposto ad un trattamento termico troppo severo, il suo contenuto ha precisi limiti legali.

25) Perché la formazione di aggregati proteici in seguito ad un trattamento termico è funzione della concentrazione della proteina?

Perché il fenomeno che avviene come esito finale di un trattamento termico è proprio la formazione di aggregati tra proteine, essa dipende dalla facilità con cui una proteina denaturata, incontra un'altra proteina denaturata. A concentrazioni basse le proteine non si incontrano tra loro e quindi hanno i siti idrofobici esposti, tanto più è alta la concentrazione proteica, tanto più è probabile che le proteine si incontrino e formino quindi aggregati.

26) Come fareste a vedere se una modificazione strutturale (ad esempio, una variazione nello spettro di fluorescenza di TRP) è reversibile o irreversibile?

Quando una proteina subisce un trattamento denaturante nella maggior parte dei casi raggiunge una fase intermedia, dove la proteina è detta transientemente modificata, in questa fase se viene rimosso l'agente denaturante la proteina è in grado di tornare alla struttura nativa. Quindi per valutare se la modificazione è reversibile o non lo è misuro la fluorescenza del triptofano. Dopo di che provo a rimuovere l'agente denaturante e misuro la variazione nello spettro di fluorescenza del triptofano. Se la fluorescenza della seconda misurazione è diminuita significa che la modificazione della proteina era reversibile, perché rimuovendo l'agente denaturante è tornata alla struttura nativa.

27) Quali parametri contribuiscono a definire «PSH», l'indice che esprime l'idrofobicità superficiale di proteine?

L'indice superficiale di idrofobicità delle proteine è il rapporto tra i siti presenti e la costante di dissociazione di questi siti (F_{max}/K_d). Il numero di siti presenti (F_{max}) si valuta aggiungendo un marcatore di fluorescenza in quantità saturante, esprime quante molecole di marcatore sono legate per unità di massa alla proteina, più siti idrofobici ci sono più vedo la fluorescenza. La costante di dissociazione si trova calcolando il 50% dei siti presenti, quindi quando avrò metà dei siti occupati la concentrazione di marcatore libero è pari alla costante di dissociazione (K_d).

28) Commentare un esempio di variazione della stabilità di una struttura proteica in ragione della composizione dell'ambiente.

Un agente ambientale che modifica la stabilità di una proteina è il pH. Un esempio lo si può vedere nel processo di produzione dello yogurt. Se si abbassa il pH aumentano le cariche positive e diminuiscono le cariche negative, in questo modo le micelle di caseina interagiscono tra loro formando un gel, lo yogurt. Abbassando il pH si arriva al punto isoelettrico della caseina che diventa insolubile e si separa completamente dal siero. Per evitare che ciò avvenga dobbiamo evitare che si arrivi al punto isoelettrico, ci si ferma a un pH leggermente più alto, in modo che la caseina conservi un po' di carica, così che possa trattenere un po' d'acqua: in questo modo si ottiene una struttura dello yogurt più compatta.

29) Cosa si intende per «conformero transiente» nel processo di denaturazione di una proteina?

Un conformero transiente, è il conformero di una proteina che è stata sottoposta ad un'agente denaturante, ma rimuovendo l'agente denaturante può tornare alla struttura nativa. Questa specie transiente viene ottenuta nello stato intermedio di denaturazione, spesso nei processi alimentari è di questo conformero che abbiamo bisogno. Un' esempio tangibile è la maionese, in questo caso serve che le proteine dell'albume espungano le regioni idrofobiche in modo da stabilizzare l'interfaccia acqua-olio; se invece viene utilizzata una proteina totalmente denaturata le proteine si associano tra loro e non sono in grado di stabilizzare niente.

30) E' più termostabile una proteina senza modificazioni post-traduzionali, una proteina glicosilata, o una proteina fosforilata?

In linea di massima le proteine glicosilate sono più stabili perché l'acqua nelle immediate vicinanze della proteina non è libera di muoversi. Lo zucchero lega l'acqua facendo legami idrogeno, mentre i fosfati fanno interazioni elettrostatiche con l'acqua. Nella pratica è più difficile modificare con temperatura una proteina glicosilata, non si può dare una risposta certa perché è difficile trovare una proteina sia in forma glicosilata che in forma fosforilata. I determinanti del processo di denaturazione e aggregazione non sono i gruppi glicosilati o fosforilati.

31) Perché il glicerolo viene spesso usato per stabilizzare enzimi commerciali?

Il glicerolo stabilizza la struttura di una proteina perché (come il saccarosio) è una molecola organica che contiene più di una funzione alcolica. Gli ossidrili alcolici presenti in queste molecole interagiscono con l'acqua, rendendo meno efficace l'azione devastante che l'acqua ha sulla struttura delle proteine. La funzione più importante è quella di limitare l'azione devastante che l'acqua potenzialmente ha sui legami che stabilizzano una struttura proteica.

32) Perché un alimento trattato ad altissime pressioni isostatiche non cambia la sua forma?

Perché la pressione è isostatica, è la stessa cosa che succede quando un sub fa immersioni ad elevate profondità. Essendo il sub fatto di liquido ed immerso in un liquido non c'è alterazione della forma perché la pressione è isostatica. L'unica cosa che si comprime nel sistema sono le porzioni gassose, nel caso in cui schiacciamo le porzioni di liquido attorno all'alimento che è anch'esso liquido la pressione si distribuisce uniformemente all'interno del mio sistema.

33) A cosa è principalmente dovuto l'effetto di un trattamento ad altissime pressioni?

Comprimendo l'acqua con un'altissima pressione, perde la sua capacità strutturante: in questo modo si ha una denaturazione a freddo delle macromolecole che erano organizzate grazie alla spinta entropica dell'acqua. Il tutto avviene senza avere svantaggi in termini di accelerazione delle reazioni chimiche, che invece avrei a temperature elevate.

34) Cosa potreste osservare misurando la fluorescenza di una miscela di proteine e ANS durante un trattamento ad altissime pressioni?

ANS è un marcatore che diventa fluorescente solo quando adeso a una superficie idrofobica. Alzando la pressione si vede un piccolo aumento della fluorescenza. Se viene alzata ancora si vede che la fluorescenza si sviluppa più velocemente. Se si alza ancor di più si vede una scomparsa di siti idrofobici, perché si appiccicano l'uno all'altro rendendosi indisponibili a legare ANS.

35) Perché gli effetti di un trattamento HP su una proteina solubile come ovoalbumina sono meno sensibili se sono presenti il sale o lo zucchero?

La formazione del reticolo è dovuta alle interazioni tra regioni idrofobiche e tra legami disolfuro. Per far sì che le regioni idrofobiche si accoppino ci deve essere la funzione strutturante dell'acqua. Nel momento in cui ci sono co-soluti l'acqua spinge meno con la sua spinta entropica. Quindi non è che sale e zucchero impediscono la denaturazione, ma impediscono l'aggregazione delle proteine denaturate. Non c'è sufficiente acqua libera per spingere le molecole di OVA l'una contro l'altra.

36) Perché la BLG non forma polimeri quando sottoposta ad un trattamento HP?

BLG viene modificata ad altissime pressioni, ma gli effetti del trattamento sono pienamente reversibili. Togliendo la pressione, la struttura torna quella della proteina nativa. Non forma polimeri, perché se la proteina si disavvolge il volume che occupa è maggiore di quello della proteina nativa quindi torna alla struttura originaria. Per la formazione di polimeri occorre che avvenga il disavvolgimento della regione ad alfa elica sotto il quale è posta la cisteina 121 (unica Cys libera, che può fare legami disolfuro), ad alte pressioni è difficile che quest'elica si sposti.

37) Provate a individuare le ragioni per cui la denaturazione di BLG trattata ad alte pressioni è reversibile, e quella di OVA non lo è.

La struttura di OVA e BLG è molto diversa, hanno dimensioni diverse (OVA è più grande). OVA è glicosilata e BLG no. C'è una differenza di stabilità tra le proteine BLG ha il barile stabilizzato da 2 legami di solfuro e solo una regione ad alfa elica mobile, OVA è molto meno stabile di BLG. La BLG quando esposta ad alte pressioni espone un tiolo, ma una volta che interrompo l'alta pressione il tiolo torna al suo posto. OVA è irreversibile, perché una volta che ho stirato le strutture ad alfa elica, non possono tornare al loro posto. Sono due proteine con diversa stabilità intrinseca e quando rendo l'acqua non in grado di esercitare la sua spinta entropica una proteina fa una modificazione reversibile (BLG) e l'altra no (OVA).

38) La forma «S» di ovoalbumina è generata da un trattamento termico ad elevato pH. Secondo voi, ne contiene di più l'albumine crudo, quello pastorizzato, o quello in polvere ottenuto per essiccazione «spray drying»?

L'uovo fresco ha un pH di 9,5, quando non è più tanto fresco ha un pH di circa 8, però non c'è nessun effetto della temperatura. L'albumine pastorizzato ha un pH di circa 8 e viene trattato ad una temperatura di 62 °C. L'albumine essiccato ha un pH di 8 e viene sottoposto ad un trattamento a temperature molto

elevate perché è necessario far evaporare tutta l'acqua, quindi sono quelle le condizioni più favorevoli alla generazione di "S" OVA.

39) E' appropriato inquadrare il trattamento con radiazioni ionizzanti nella famiglia delle modalità di «denaturazione fisica»?

Le radiazioni sono un agente denaturante fisico, ma la denaturazione che impartiscono è una denaturazione chimica. Non si aggiungono agenti chimici ma si creano in seguito al processo che provoca la radiolisi dell'acqua, che genera radicale idrossilico e idrogeno con un solo elettrone. Ad esempio si possono generare sulfini e sulfoni aggiungendo ossigeno allo zolfo della cisteina, e se il trattamento è molto violento si possono rompere anche i legami peptidici.

40) A che cosa è dovuto l'effetto antigerminativo dei trattamenti con radiazioni ionizzanti?

Le radiazioni ionizzanti vengono utilizzate per inibire la germogliazione dei tuberi e dei bulbi come patate, cipolle e aglio permettendo l'estensione del periodo di commercializzazione. Quando le radiazioni colpiscono il materiale biologico vengono generate specie estremamente reattive. Quando vanno ad impattare con l'acqua si verifica la radiolisi dell'acqua, viene prodotto idrogeno con un elettrone e il radicale idrossilico. La radiazione danneggia il materiale genetico degli organismi con cui entra in contatto impedendone la riproduzione mediante danneggiamento dei tessuti germinali. Ci sono paesi molto permissivi per quanto riguarda il trattamento con radiazioni ionizzanti.

41) Ipotizzate per quali ragioni si usa l'ozono per sanitzizzare ambienti in cui si è registrata la presenza di coronavirus

L'ozono ha un potere ossidante molto alto, infatti è in grado di danneggiare le pareti e le membrane delle cellule.

42) Perché il pane all'olio diventa rafferma più lentamente del pane comune?

L'aggiunta di grasso all'impasto (che si dispone sulla superficie del granulo d'amido) può rallentare il processo di retrogradazione perché rallenta il riassorbimento dell'acqua da parte dei granuli di amido.

43) Perché il pane integrale non è mai croccante?

Se per fare il pane utilizzo farina integrale è importante ricordare che contiene fibra, essa è in grado di legarsi all'acqua. Quindi non avviene water transfer, le proteine del sistema non saranno mai prive di acqua e non potranno mai formare lo strato di proteine disidratate che conferisce croccantezza.

44) Perché il pane integrale diventa rafferma molto lentamente?

Perché la perdita di acqua è più lenta visto che la fibra trattiene l'acqua e la rilascia con molta difficoltà. È presente dell'acqua in eccesso legata ai polisaccaridi presenti nella fibra che non è facile far evaporare.

45) A che cosa è dovuta la lunga «shelf-life» del panettone?

Perché il panettone è ricco in lipidi che si dispongono intorno all'amido e quindi l'acqua abbandona l'amido per passare alle proteine più difficilmente. Inoltre il panettone viene prodotto con una doppia lievitazione e il lievito consuma l'amido che si ricristallizza lentamente essendo poco, rallentando l'indurimento provocato dal rafferma.

46) Per quale ragione una michetta croccante rammollisce rapidamente in un giorno di pioggia?

Il pane è un sistema termodinamicamente instabile perché l'acqua tende a passare ancora dall'amido alle proteine, se le proteine riassorbono acqua si ha la perdita di croccantezza. In una giornata di pioggia l'umidità è maggiore e quindi le proteine oltre all'acqua dell'impasto assorbono anche l'acqua dell'ambiente, per questo motivo rammollisce più rapidamente.

47) Che differenza c'è tra pane secco e pane rafferma?

Il rafferma si ha quando l'amido cede l'acqua alle proteine, dentro la struttura dell'amido si vengono a creare interazioni tra strutture di amilosio e amilopectina, ciò comporta l'indurimento della struttura. Mentre il pane secco è l'ultimo stadio, in cui è evaporata tutta l'acqua presente.

48) Cosa consente al pane di recuperare croccantezza se lo passiamo qualche istante nel microonde?

Con l'aumento di temperatura le proteine ricedono l'acqua all'amido, le proteine disidratate formano un sottile velo che riconferisce la croccantezza. Non si può fare con il pane secco perché è presente acqua nel sistema.

49) Provate a descrivere cosa succede – dal punto di vista molecolare - quando mettete nel microonde pane o pizza surgelati

È importante sottolineare che se intendo un pane intendo un prodotto già preventivamente cotto, mentre una pizza potrebbe essere anche soltanto precotta (come le comuni pizze surgelate). Nel pane appena sfornato l'acqua sta all'interno dell'amido, se la congelo, l'acqua congela e quindi non è libera di muoversi. Inserendo il pane nel microonde, le molecole d'acqua vengono poste in agitazione, l'acqua viene scongelata e il pane torna fresco come prima.

La pizza nel microonde non cuoce, perché l'acqua è legata alle proteine non essendo cotta. Se quindi non abbiamo dato il tempo perché l'acqua transiti dalle proteine all'amido e mettiamo la pizza nel microonde, l'acqua raggiunge i 100° C quando sta attorno alle proteine.

50) Su quale fase del processo si può intervenire per rendere possibile (legalmente, almeno in paesi che non siano l'Italia) produrre spaghetti utilizzando farina di grano tenero?

Il sistema per produrre pasta che resista alla cottura fatta con il grano tenero è quello di essiccare ad altissima temperatura. Il grano tenero è stabilizzato da legami idrofobici, ad alte temperature prevalgono i legami covalenti in modo che l'amido non venga perso in cottura.

51) Perché per «invertire» un emulsione – come nel caso del burro - occorre lavorare a basse temperature?

L'operazione di zangolatura (delle pale sbattono i globuli di grasso gli uni contro gli altri) si fa a bassa temperatura perché si vuole invertire un'emulsione cioè trasformare la panna (grasso in acqua) in un'emulsione di acqua in grasso. A bassa temperatura (intorno a 6-10 gradi) il burro è solido, quindi le goccioline di grasso sbattono le une contro le altre e vengono compattate.

52) Perché l'omogenizzazione del latte viene condotta a temperature elevate, e la produzione della maionese no, nonostante si tratti comunque di stabilizzare una dispersione di grasso in acqua?

il calore nell'omogenizzazione del latte è necessario per sfruttare la fusione dei globuli di grasso e frantumarli in goccioline più piccole con dimensione simili tra loro, per fare la maionese che si fa con grassi insaturi non serve alzare la temperatura perché l'olio è già abbastanza fluido. Se il trattamento ad alte temperature venisse effettuato nel caso della maionese, le proteine dell'uovo si denaturerebbero e non sarebbero più in grado di stabilizzare l'emulsione. Mentre le caseine del latte si denaturano a temperature più elevate, quindi non ci sono problemi per il riscaldamento.

53) Quali misure di «solubilizzazione differenziale» mettereste in atto per capire la natura dei legami che stabilizzano il reticolo proteico in un hamburger vegetale?

Se non so da quale tipo di legami è tenuto insieme l'hamburger, l'unico sistema per saperlo è fare la misura di solubilità differenziale (prima che venga cotto), che consiste nell'andare a vedere quali proteine si sciolgono in NaCl (si rompono i legami ionici), quante si sciolgono se tratto sia con NaCl che con urea (si rompono i legami idrofobici) e infine uso sale, urea e un agente in grado di rompere i legami disolfuro come il mercaptoetanolo.

54) Cosa rende possibile produrre pasta all'uovo da farina di grano tenero?

Perché nel grano tenero prevalgono le interazioni idrofobiche, quindi interagiscono facilmente con l'uovo e si crea un reticolo in cui è presente l'amido e rimane intrappolato all'interno e quindi resiste alla cottura. Le proteine della farina si associano a quelle dell'uovo formando un reticolo più stabile.

55) Cosa succede aggiungendo acqua a semola o farina?

L'acqua aggiunta alla semola o alla farina non tocca l'amido, va sulle proteine e impartisce la flessibilità strutturale, intervenendo poi con un trattamento meccanico vengono stirate queste proteine portando alla formazione di legami idrofobici e legami disolfuro.

56) Quali famiglie di proteine del grano sono responsabili – rispettivamente – della tenacità e dell'elasticità di un impasto?

Le gliadine sono responsabili della tenacità dell'impasto, sono proteine monomeriche che si sciolgono in etanolo al 40%, hanno una zona ripetitiva di unità di prolina e glutammina. Esistono diversi tipi di gliadine (alfa, beta, gamma e omega). Alfa, beta e gamma hanno residui di cisteina impegnati in legami disolfuro intra proteina, mentre le omega non contengono residui di cisteina, infatti sono facili da estrarre anche in un prodotto che ha subito un trattamento. Le glutenine sono le proteine responsabili dell'elasticità dell'impasto, sono polimeriche, hanno dei tioli liberi che vanno a formare un reticolo di legami disolfuro interproteina. L'aggiunta di acqua comporta l'associazione di questa ai residui polari di HMW, questo fenomeno consente alle proteine di rigonfiarsi, ed è essenziale per conferire alle proteine la capacità di deformarsi quando sottoposte al trattamento meccanico.

57) Perché gli gnocchi non si disfano nell'acqua al momento della cottura?

Perché negli gnocchi c'è una certa quantità di farina, non sono fatti solo con patate. La farina è un agente reticolante, le proteine della farina assorbono la parte dell'acqua presente nel sistema, sviluppano un reticolo all'interno dell'impasto. Basta solvatare l'amido che c'è all'interno della farina per avere un materiale che sta insieme.

58) Cosa rende diversa una farina da pane da una per biscotti?

In una farina per biscotti ci sono meno proteine che in una farina da pane. Più proteine ci sono più solido è il reticolo proteico che si forma al momento dell'impasto. Farine per dolci hanno un reticolo più blando (ci sono meno proteine), per fare il pane (più alveolato) sono necessarie più proteine.

59) Provate a descrivere le modificazioni chimiche e biochimiche che si accompagnano alla produzione di besciamella

La prima fase consiste nel fondere il burro insieme alla farina, una miscela di lipidi e amido della farina e proteine del glutine e una piccola quantità d'acqua (15%). Il burro si scioglie e i suoi lipidi si inseriscono nella cavità apolare all'interno delle molecole a spirale che sono presenti nella molecola di amilosio e nella molecola di amilopectina. Abbiamo una fase polare: le proteine con l'acqua assorbita e una fase apolare che è il granulo d'amido, quindi i trigliceridi all'interno del burro vanno a rivestire la superficie del granulo d'amido. Il rivestimento del granulo d'amido condiziona il passaggio di acqua da una fase all'altra. La miscela viene scaldata e viene unita al latte, ma posso utilizzare un qualsiasi altro liquido perché il latte non contribuisce in nessun modo, serve solo per il contenuto di acqua. Se non ci aggiungessimo questo eccesso di acqua non riusciremmo a gelatinizzare l'amido, cioè trasformare l'amido dalla forma non cotta che è presente nella farina a quella cotta presente nella besciamella (la salsa è più digeribile e più viscosa). Gli zuccheri del latte contribuiscono a dare un colore e la crosticina a seguito di reazioni di Maillard durante la cottura.

60) Su quali legami e su quale molecola agiscono gli enzimi proteolitici utilizzati in caseificazione?

Per la caseificazione si usa la rennina, essa è una miscela in cui sono contenute quantità variabili di chimosina e pepsina. La chimosina taglia in corrispondenza del legame tra Phe105 e Met106 della K-caseina, questo taglio proteolitico elimina la porzione C terminale della K caseina (estremamente idrofila). La pepsina, invece, è specifica per gli amminoacidi idrofobici.

61) Cosa caratterizza le diverse preparazioni di caglio presenti in commercio?

I produttori di caglio mettono a disposizione dei caseifici una varietà di enzimi coagulanti, il rapporto tra chimosina e pepsina caratterizza il caglio. Non tutte le miscele di caglio sono uguali perché sono caratterizzate da proporzioni diverse di chimosina e pepsina. Una differenza di queste proporzioni (pepsina-chimosina) può essere dovuta in base all'età dell'animale da cui viene ottenuta la rennina: nel caso di un

animale giovane, che ha come unico alimento il latte, prevale la chimosina; nel caso di un animale adulto diventa la pepsina la proteasi prevalente.

62) Perché la formazione del coagulo dopo l'evento proteolitico primario richiede temperature superiori a 37°C?

Perché la temperatura deve essere sufficientemente alta, per far sì che non solo le proteine si aggregino, ma si ottenga un riarrangiamento dovuto all'esposizione di ulteriori siti idrofobici. Questo comporta la formazione di un reticolo polimerico proteico all'interno del quale viene inglobata l'acqua presente nel sistema. L'acqua all'interno del sistema verrà persa mediante rottura della cagliata, per i formaggi come grana e parmigiano viene effettuato un successivo riscaldamento intorno ai 55° C, che si chiama colpo di fiamma, per provocare una maggiore espulsione di acqua dalla cagliata.

63) 4) Provate ad associare le dimensioni dei granelli in cui viene rotta la cagliata al tipo di formaggio: a) noce; b) chicco di riso; 1) Taleggio; 2) Grana

La rottura della cagliata consiste nella rottura della struttura macroscopica del reticolo polimerico. Questa operazione serve a separare la parte più ricca in caseina (la cagliata vera e propria) dalla parte contenente siero e quindi eliminare acqua dal sistema.

Più i pezzi in cui viene rotta sono piccoli, maggiore sarà la perdita d'acqua. Se si vuole produrre un formaggio ricco in proteine e povero in acqua, come il Grana, è necessario rompere la cagliata in pezzi più piccoli, quindi grandi come un chicco di riso (2-b). Se si vuole produrre un formaggio più molle, come il taleggio, la cagliata va rotta in pezzi più grandi, quindi come una noce (1-a).

64) Perché le cinetiche di coagulazione sono diverse partendo da latti diversamente trattati?

Il coagulo enzimatico da caseina nativa si forma dopo la rimozione della porzione glicosilata della K-caseina, si ha l'interazione dei residui idrofobici e la formazione di un aggregato (in conseguenza alle temperature sopra il 37°C).

Se sottopongo le molecole di caseina ad un trattamento di termizzazione intenso (sopra i 70°C), la micella si riarrangia, le regioni idrofobiche possono essere esposte e interagire tra loro. Per cui se faccio agire la rennina su una micella che ha subito un trattamento termico non so come agirà, perché la struttura è diversa. È molto probabile che i prodotti e la velocità di una proteina modificata dal calore siano diversi da quelli sulla proteina che ha una conformazione diversa.

65) A quale attività enzimatica è associata la «fragranza» tipica dei formaggi erborinati?

È dovuta all'azione delle lipasi che vengono aggiunte al latte, perché dipende dal rilascio di acidi grassi a catena corta (propionato, butirato e capronato). Le lipasi di origine funginea lavorano su acidi grassi a catena corta e rilasciano componenti che danno queste caratteristiche di sapidità all'alimento.

66) Cosa indica il rapporto NPN/azoto totale?

Evidenzia l'attività degli enzimi proteolitici, perché mette in luce il rapporto tra proteine rimaste intatte e quante sono state trasformate in piccole catene o addirittura in amminoacidi liberi. Per distinguere l'azoto presente come proteine da quello presente in altre forme (NPN) si utilizza l'insolubilità delle proteine in acido tricloroacetico, in cui sono invece solubili i piccoli peptidi. Ad esempio nel processo di produzione del formaggio aumenta l'azoto non proteico.

67) Come mai il lisozima viene aggiunto al Grana Padano, ma non al Parmigiano Reggiano?

Il lisozima è un enzima termostabile (quindi sopravvive alla lavorazione del formaggio) che rompe le pareti dei microrganismi, i formaggi a lunga stagionatura possono ospitare Clostridium, le cui spore generano bolle all'interno della forma creando spaccature, per evitare ciò viene aggiunto il lisozima.

Viene aggiunto nel latte per Grana Padano e non in quello per il Parmigiano, perché le bovine che producono latte volto alla produzione di Parmigiano Reggiano non mangiano insilati e quindi nella filiera non ci sono clostridi, non è quindi necessario a inserire questo enzima nella formulazione.

68) Cosa distingue alfa-amilasi da beta-amilasi?

L'alfa-amilasi è un endoenzima, cioè taglia all'interno di catene formate da molecole di glucosio unite da legame alfa-1,4 glicosidico. La beta-amilasi è un esoenzima che lavora sui legami alfa-1,4, cioè rimuove molecole di maltosio partendo dall'estremità non riducente (dal C4).

69) Perché l'aggiunta di beta-amilasi diminuisce i tempi di fermentazione di un impasto per prodotti da forno?

Perché la beta-amilasi dà come prodotto della sua idrolisi maltosio. *Saccharomyces cerevisiae* può crescere più facilmente e fermentare più velocemente in presenza di disaccaridi come il maltosio. Inoltre in *Saccharomyces* ha un trasportatore per il maltosio più efficiente di quello per il glucosio, quindi può essere portato all'interno della cellula con più facilità. Quindi gli enzimi che degradano l'amido servono per far trovare gli zuccheri già pronti per il metabolismo di *Saccharomyces cerevisiae*, consentendogli di svilupparsi più velocemente, diminuendo così i tempi di riposo del prodotto.

70) Qual è il ruolo delle amilasi nel determinare il colore dei prodotti da forno?

Gli zuccheri semplici, che derivano dall'idrolisi delle amilasi, contribuiscono al colore del prodotto. Questo è dovuto a reazioni di Maillard o reazioni di cristallizzazione degli zuccheri. Gli amminoacidi reagiscono con gli zuccheri, in presenza di acqua, dando il tipico colore dei prodotti da forno. Inoltre in questo processo vengono generate anche le tipiche note aromatiche.

71) Perché l'aggiunta di enzimi che idrolizzano polisaccaridi porta a un'accesa shelf-life dei prodotti da forno?

L'intervento di questi enzimi si traduce come un ritardo dei fenomeni di cristallizzazione dell'amido. Se l'amido è stato scisso difficilmente si associa. Inoltre viene ritardato il rafforzamento: la cessione dell'acqua dall'amido alle proteine è influenzata dall'idrolisi dell'amido, perché gli zuccheri semplici a differenza dell'amido sono solubili ed è più difficile che l'acqua torni alle proteine.

72) Su quali proprietà di un vino può avere impatto il trattamento di mosto d'uva con enzimi che idrolizzano polisaccaridi?

In campo enologico questi enzimi consentono il rilascio delle molecole aromatiche, che sono volatili, e quindi percepibili come aroma, solo nella forma non legata agli zuccheri. Utilizzando questi enzimi, si può avere il rilascio controllato di aromi (quando anche le altre caratteristiche del vino sono ottimali) e non in maniera casuale rischiando di perdere le altre caratteristiche.

73) Da dove vengono le lipasi utilizzate nei prodotti da forno, e cosa le distingue da quelle utilizzate per altri scopi?

Tutte le lipasi preferiscono gli acidi grassi a catena corta. Non tutte però tagliano allo stesso modo, alcuni tagliano in mezzo alla molecola e altri alle estremità. È proprio la selettività nel taglio che distingue le lipasi usate nei prodotti da forno rispetto a quelle per altri prodotti.

74) In che modo l'aggiunta di glucosio ossidasi interviene nel modulare le proprietà meccaniche di un impasto?

L'acqua ossigenata, prodotta nella riossidazione della flavina presente come cofattore nell'enzima, induce l'ossidazione dei tioli presenti nelle proteine del glutine (in particolare le glutenine) formando così ponti disolfuro che consentono di avere un reticolo più compatto.

75) A quali componenti è dovuta la caratteristica «umami» di estratti di lievito?

La produzione di estratto di lievito si basa sull'utilizzo sequenziale di enzimi a partire da lievito. Utilizzando Sali d'ammonio quaternario vengono separate le proteine dagli acidi nucleici. I nucleotidi vengono depolimerizzati con un enzima depolimerizzante e si ottengono dei semi nucleotidi. L'IMP è migliore dell'AMP quindi un'enzima deammilasi stacca l'ammino gruppo e lo rimpiazza con un ossidrilico ottenendo IMP. I responsabili del sapore umami dell'estratto di lievito sono appunto i mononucleotidi IMP e AMP, ottenuti attraverso questo processo che prevede l'utilizzo di specifici enzimi che vengono prodotti a mano in Giappone.

76) Perché l'idrolisi di polisaccaridi può migliorare la resa in olio da drupe (olive) senza ricorrere all'uso di solventi?

Nella produzione dell'olio dopo che viene strizzata la pasta di olive, affiora l'olio e l'acqua più pesante va sul fondo. All'interfaccia tra le due macrofasi si forma una fase mista fatta di polimeri che derivano dalle pareti delle cellule vegetali che intrappolano al loro interno goccioline d'olio. L'olio ha un certo valore commerciale, quindi è necessario recuperare l'olio intrappolato nei polimeri della fase mista. Intervenendo con solventi l'olio non può più essere venduto come olio extravergine d'oliva, perdendo quindi il suo valore. Se invece si tagliano le matrici polimeriche polisaccaridiche mediante l'uso di enzimi, si evita che l'olio rimanga intrappolato e per recuperarlo devono essere utilizzati solventi. Inoltre se l'olio viene trattato con enzimi può essere venduto come olio extravergine d'oliva.

77) Quali enzimi sono contenuti nelle cosiddette «macerasi»?

Le macerasi sono una combinazione di enzimi cellulolitici, emicellulolitici e pectinolitici. Il rapporto tra questi enzimi è diverso in base all'alimento che deve essere trattato. Le macerasi sono utilizzate sia per migliorare il prodotto, sia le caratteristiche di solubilità e stabilità del prodotto finito.

78) In che modo alcune glucosidasi possono contribuire al rilascio di aromi da vegetali?

Nel caso del vino le macerasi (enzimi con attività glucosidasica) contribuiscono al rilascio di aromi tagliando il legame tra alcoli superiori (sostanza odorosa) e gli zuccheri. Senza la rottura di questo legame gli alcoli superiori resterebbero in soluzione e non verrebbe percepito l'odore caratteristico.

Prima che venisse modificato il genoma del pompelmo per eliminare gli alcaloidi, il succo veniva trattato con glucosidasi che rimuovendo la porzione glicosidica non veniva percepito il gruppo amaro.

79) Perché quasi tutti gli enzimi utilizzati a scopo analitico usano sequenze di reazioni in cui si produce o consuma NADH?

Perché la formazione o la scomparsa del NADH può essere monitorata misurando l'assorbanza a 340 nm ed è proporzionale alla quantità di analita presente nel campione.

80) Quali enzimi potreste utilizzare per la determinazione enzimatica di etanolo con metodi spettrofotometrici?

Per il dosaggio dell'etanolo si potrebbe utilizzare l'enzima alcol deidrogenasi che porta alla produzione di acetaldeide, dopo di che si usa l'enzima aldeide deidrogenasi che porta alla formazione di acido acetico. Utilizzare due enzimi insieme mi dà la sicurezza che tutto l'etanolo venga trasformato in acido acetico. Visto che entrambi gli enzimi producono NADH, e questo è quello che posso vedere attraverso misure spettrofotometriche, viene raddoppiata la sensibilità del dosaggio. Quindi l'azione combinata di questi due enzimi migliora la sensibilità e sposta l'equilibrio nella direzione desiderata.

81) Come si può verificare la presenza di beta-galattosidasi in un prodotto delattosato?

È necessario acquistare un dosaggio per la beta-galattosidasi, che contiene un galatto-piranoside coniugato con un para-nitro-fenolo. Se rompo il legame tra questi, si libera para-nitro-fenolo che in ambiente alcalino è giallo. Quindi se vedo la formazione di giallo so che all'interno c'è un'attività galattosidica.

82) Cosa si intende per «determinazione enzimatica «dead point»?

Significa che il sondaggio di tipo analitico fatto mediante enzimi è fatto aspettando il raggiungimento dell'equilibrio, cioè il substrato dell'enzima (il prodotto da determinare) viene consumato totalmente. Per far sì che tutto il substrato venga convertito in prodotto l'equilibrio della reazione va spostato verso la formazione del prodotto.

83) Citare e commentare un esempio di reazione enzimatica che possa essere seguita valutando la variazione di pH.

Un esempio può essere la reazione con glucosio ossidasi, enzima che contiene una flavina nel sito attivo come cofattore. Fa reagire il glucosio con ossigeno e si forma acido gluconico e acqua ossigenata. Per misurare la velocità di reazione questo enzima posso sfruttare tre fattori:

- la reattività dell'acqua ossigenata: utilizzando un composto che si colora in presenza di acqua ossigenata
- misurare la scomparsa di ossigeno, quindi la scomparsa di substrato
- misurare l'abbassamento di pH dato dalla formazione di acido gluconico. Quest'ultimo viene definito come il sistema meno costoso per misurare l'attività enzimatica, infatti basta semplicemente guardare la variazione di pH.

84) Un trattamento termico porta all'inattivazione del 70% dell'attività di un enzima in 5 min. Stimare il $t_{1/2}$ della reazione che porta alla sua inattivazione.

$$\ln\left(\frac{0,3}{1}\right) = -K \times 5 \quad K = 0,24 \text{ min}^{-1}$$

$$t_{1/2} = \frac{-\ln 0,5}{0,24} = 2,88 \text{ min}$$

85) Quale di questi enzimi è più termostabile, viste le informazioni fornite dai produttori: A, $t_{1/2}$ 2 min; B, k' 4 min^{-1} ; C, k' 0.016 h^{-1} ?

A: $t_{1/2} = 2 \text{ min}$

B: $t_{1/2} = \frac{-\ln 0,5}{4} = 0,17 \text{ min}$

C: $t_{1/2} = \frac{-\ln 0,5}{(0,016:60)} = 2599 \text{ min}$

Quello più termostabile è la C perché ci mette più tempo a perdere il 50% dell'attività originaria.

86) Quali attività enzimatiche (e di quale origine) sono rilevanti per la produzione di peptidi bioattivi?

I peptidi bioattivi vengono generati tramite tagli proteolitici che alterano la struttura della proteina. Gli enzimi proteolitici coinvolti possono essere sia quelli della materia prima, sia quelli prodotti dai microrganismi aggiunti come agente di trasformazione. I microrganismi per crescere hanno bisogno di aminoacidi e quindi producono proteasi che cercano di recuperare azoto per la crescita del batterio. Lo stesso enzima e la stessa proteina possono dare peptidi bioattivi diversi, perché non sempre un certo enzima agisce allo stesso modo sulla proteina (dipende dalla conformazione di questa e quindi anche dal trattamento che ha subito).

87) In che modo le trasformazioni subite dalla materia prima possono condizionare la formazione di peptidi bioattivi?

Non basta sapere la sequenza amminoacidica della proteina per predire che genererà peptidi bioattivi, perché le modalità e l'ordine in cui intervengono gli enzimi proteolitici dipende dalla conformazione assunta dalla proteina e quindi dal trattamento che essa ha subito.

Nella proteina sono presenti un certo quantitativo di lisina e fenilalanina, ma non sempre questi residui sono accessibili all'enzima che li deve tagliare, se l'enzima non riesce a scinderla essa verrà tagliata da un altro enzima, quindi i prodotti di idrolisi non saranno gli stessi.

Ad esempio ci sono peptidi bioattivi diversi presenti nei formaggi a pasta dura che invece non si trovano nel taleggio, perché la modalità con cui è stata alterata la struttura delle caseine è diversa.

88) Quali sono le dimensioni minime di un peptide bioattivo?

È di 4 aminoacidi. Un esempio di peptide bioattivo costituito da solo 4 aminoacidi è il glicomacropptide che è un potente inibitore dell'enzima che fa alzare la pressione, è quindi contenuto nei farmaci per l'ipertensione.

89) Che cosa sono le caseomorfine?

Alcuni peptidi derivati dall'idrolisi della caseina assomigliano a dei peptidi prodotti dal cervello, le endorfine. Ci sono delle porzioni di caseina che hanno esattamente la stessa sequenza amminoacidica presente nelle endorfine e quindi possono essere rilasciati in circolo in seguito all'assunzione di alimenti a base di latte e provocare la stessa situazione di benessere provocata dalle endorfine. Questo fenomeno spiega l'effetto calmante di una tazza di latte caldo prima del sonno.

90) Quali proteine alimentari rappresentano la fonte più rilevante dei fosfopeptidi utilizzati come veicolanti del calcio?

Le proteine alimentari fonte più rilevante di fosfopeptidi sono le alfa-caseine e le beta-caseine. Si formano perché in presenza di fosfati gli enzimi non sono in grado di scindere completamente la proteina e quindi si originano questi casein-fosfopeptidi. Essi sono degli efficaci trasportatori di metalli, come il calcio, infatti il calcio nella cellula è sempre "accompagnato" da fosfopeptidi che impediscono la sua espulsione e la sua precipitazione. Questi peptidi per il trasporto del calcio si aggregano tra loro a formare una sorta di gabbia.

91) Qual è l'ordine di grandezza della concentrazione del calcio in una cellula umana: 10^{-3} M; 10^{-6} M; 10^{-9} M?

Il calcio in una cellula umana ha una concentrazione di 1 nanomolare, quindi 10^{-9} M.

92) Presentare e commentare un esempio di «ammina biogenica», discutendone l'origine.

L'istamina è un'ammina biogenica, che deriva dalla decarbossilazione dell'istidina. Si ottiene da una spinta degradazione enzimatica, fino ad ottenere singoli amminoacidi, dopodiché l'evento più comune in cui possono incorrere questi è la decarbossilazione. L'istamina viene rilasciata da alcune cellule in cui viene accumulata per scatenare il riflesso infiammatorio in altre cellule. La presenza dell'istamina negli alimenti è legata all'invecchiamento dell'alimento, se l'alimento non ha subito processi di fermentazione se ne trova un microgrammo per grammo, mentre per gli alimenti invecchiati si può trovare un contenuto in istamina 100 volte maggiore.

93) Quali sono le principali famiglie di enzimi che utilizzano ossigeno molecolare?

Il nostro organismo ha un ampio corredo di enzimi ossidativi. Cioè enzimi in grado di utilizzare ossigeno molecolare come agente ossidante. Questi enzimi ossidativi appartengono a diverse categorie:

- ossidasi flaviniche: come la glucosio ossidasi, la xantina ossidasi.. essi prendono il substrato lo ossidano e l'ossigeno si riduce ad acqua ossigenata.
- mono ossigenasi: nel prodotto entra un solo atomo di ossigeno che viene ridotto ad acqua, questa famiglia è coinvolta nel metabolismo degli xenobiotici.
- diossigenasi: negli umani non è presente questa famiglia di enzimi. Agiscono inserendo contemporaneamente due atomi di ossigeno nel substrato.

94) Perché l'acido citrico previene l'imbrunimento della frutta, e l'acido acetico no?

Perché gli enzimi responsabili dell'ossidazione e quindi dell'imbrunimento enzimatico della frutta sono metallo enzimi. L'acido citrico previene l'imbrunimento perché oltre ad essere un acido, e quindi abbassa il pH, è un chelante quindi sequestra i metalli. Mentre l'azione dell'acido acetico si limita ad abbassare il pH perché non è un chelante.

95) A cosa serve la nixtamalizzazione?

Serve per riuscire a staccare la niacina da una famiglia di proteine che la rende non biodisponibile. Consiste nel trattamento alcalino a caldo consente il rilascio di niacina rendendola così assorbibile a livello intestinale. La nixtamalizzazione la dobbiamo alla tradizione dei popoli andini di cuocere il mais in acqua e cenere, attualmente esiste un processo industriale brevettato detto enzymatic nixtamalization che impiega proteasi per facilitare gli eventi che si verificano durante la nixtamalizzazione tradizionale.

La niacina, detta anche vitamina PP, previene la pellagra, una malattia che si verifica nei paesi in via di sviluppo, associata a povertà, mal nutrizione e in zone dove il mais costituisce il principale alimento.

96) Quali sono le principali classi di proteine «antinutrizionali»

Sono gli inibitori di proteasi, i sequestranti di micronutrienti e gli allergeni.

Gli inibitori di proteasi sono abbondantissime e sono un efficace strumento di difesa per tutti i prodotti che non sono in grado di difendersi, come i vegetali e le uova. Se le proteasi non funzionano l'uomo rischia di non avere un corretto apporto di amminoacidi essenziali. Come esempio si può vedere l'inibitore della tripsina, esso si ancora al sito dove normalmente andrebbe una lisina da tagliare, una volta che l'inibitore è attaccato non si stacca più perché il resto della struttura proteica stabilizza fortemente il legame, quindi la tripsina non è più in grado di funzionare.

I sequestranti di micronutrienti sono proteine in grado di sequestrare micronutrienti. L'esempio più celebre è l'avidina, essa ha un'affinità straordinariamente alta per la biotina e quindi la sequestra; se mangiamo albume crudo essa è in eccesso rispetto alla biotina, quindi il risultato è un'avitaminosi legata al sequestro della biotina ad opera dell'avidina.

Gli allergeni sono proteine problematiche quando si trovano all'interno degli alimenti, in loro presenza il sistema immunitario di un soggetto sensibile scatena una risposta in cui sono coinvolte immunoglobuline specifiche.

97) Qual è la natura chimica di un allergene?

Un allergene è una proteina che causa in soggetti sensibili una risposta immunitaria in cui intervengono le immunoglobuline specifiche.

L'allergene si lega sulla superficie delle cellule B del sistema immunitario e simultaneamente si lega a due molecole di anticorpo. L'allergene viene condiviso tra cellule B e cellule T helper. Una parte di queste cellule si differenzia e diventano cellule di memoria (cellule che si specializzano in un anticorpo in grado di riconoscere l'allergene). Le cellule del plasma producono le immunoglobuline che vanno a legarsi sulle cellule che manifestano i sintomi dell'allergia, cioè i mastociti. In presenza di allergene l'anticorpo presente sulla superficie del mastocita scatena la risposta cellulare, che causa il rilascio di ammine biogeniche che vanno ad agire su una serie di tessuti.

L'allergene deve essere sufficientemente grande da consentire il legame simultaneo di due molecole di anticorpo, l'allergene deve avere almeno 30 amminoacidi.

98) Perché proteine con massa inferiore a 3 kDa non sono considerate un potenziale pericolo per soggetti allergici?

Perché una proteina per essere considerata allergene deve consentire il legame simultaneo di due molecole di anticorpo, sia nell'induzione del processo di memoria, sia quando si ha il rilascio di istamina da parte dei mastociti. Quindi piccole molecole non possono funzionare da allergene.

99) Cosa distingue un epitopo sequenziale da uno conformazionale?

Gli epitopi sono regioni della struttura proteica che vengono riconosciute dagli anticorpi, essi possono trovarsi sia vicini che lontani nella struttura della molecola.

Gli epitopi sequenziali sono le regioni della struttura primaria, mentre gli epitopi conformazionale sono legati alla struttura della proteina.

La differenza fondamentale tra questi è che gli anticorpi che riconoscono gli epitopi sequenziali e conformazionali non sono gli stessi. Gli epitopi conformazionali sono sensibili alla struttura della proteina e quindi vengono distrutti dai processi, mentre gli epitopi sequenziali sono resistenti ai processi e possono essere rimossi solo tagliando la proteina con appositi enzimi.

100) Perché è difficile stabilire un limite legale per la presenza di allergeni in alimenti?

Stabilire un limite legale per la presenza di allergeni alimentari è difficile a causa dell'estrema variabilità della risposta individuale dei pazienti. Infatti è possibile che un paziente risponda in un modo diverso da un altro in base a quantità di allergene o porzioni della sequenza amminoacidica diversa. Quindi viene definito come limite di sicurezza quello che non dà risposta del 90% degli individui, utilizzando un minimo di una trentina di soggetti.

101) Quali sono le principali tipologie di dosaggi ELISA?

Sono i test ELISA non competitivo e competitivo. Il quello non competitivo sulla superficie del pozzetto viene adeso l'anticorpo. Viene inserito il campione nel pozzetto, se esso contiene l'antigene verrà catturato sulla superficie del pozzetto. Dopo di che inserisco nel sistema un secondo anticorpo modificato chimicamente collegandolo ad una molecola di enzima. Il secondo anticorpo si lega sulla superficie di antigene rimasta scoperta. Si aggiunge il substrato dell'enzima e si quantifica il prodotto colorato, più antigene ho nel sistema più colore si forma.

In quello competitivo indiretto si fissa l'antigene sulla superficie del pozzetto, aggiungendo l'anticorpo esso si attacca all'antigene, viene aggiunto l'anticorpo secondario con attaccato l'enzima e si quantifica la formazione del prodotto. In presenza di analita, se l'analita contiene il campione ci sarà una competizione tra l'antigene in soluzione e l'antigene presente sulla superficie del pozzetto, quindi si abbassa la quantità di molecole di anticorpo legate alla superficie del pozzetto, mettendo l'anticorpo secondario con l'enzima avrò una minor quantità di prodotto. Al crescere dell'antigene ho una diminuzione del segnale.

In quello competitivo diretto l'anticorpo primario è legato alla superficie del pozzetto e si lega alla molecola da determinare con legata una proteina carrier. L'anticorpo secondario marcato con l'enzima riconosce la proteina carrier e si lega, in presenza dell'analita in soluzione viene impedito il legame tra l'anticorpo primario e la proteina carrier, che quindi non può essere riconosciuta dall'anticorpo secondario.

102) Per quale tipo di allergene è preferibile usare un dosaggio ELISA di tipo competitivo?

È necessario utilizzare il dosaggio di tipo competitivo quando l'antigene non è abbastanza grande da consentire il simultaneo legame di due anticorpi, come previsto dal dosaggio non competitivo. I dosaggi competitivi sono di due tipi: diretto e indiretto.

In quello competitivo indiretto si fissa l'antigene sulla superficie del pozzetto, aggiungendo l'anticorpo esso si attacca all'antigene, viene aggiunto l'anticorpo secondario con attaccato l'enzima e si quantifica la formazione del prodotto. In presenza di analita, se l'analita contiene il campione ci sarà una competizione tra l'antigene in soluzione e l'antigene presente sulla superficie del pozzetto, quindi si abbassa la quantità di molecole di anticorpo legate alla superficie del pozzetto, mettendo l'anticorpo secondario con l'enzima avrò una minor quantità di prodotto. Al crescere dell'antigene ho una diminuzione del segnale.

In quello competitivo diretto l'anticorpo primario è legato alla superficie del pozzetto e si lega alla molecola da determinare con legata una proteina carrier. L'anticorpo secondario marcato con l'enzima riconosce la proteina carrier e si lega, in presenza dell'analita in soluzione viene impedito il legame tra l'anticorpo primario e la proteina carrier, che quindi non può essere riconosciuta dall'anticorpo secondario.

103) In cosa consiste la procedura di «blotting» utilizzata per verificare la presenza di un allergene?

Nel blotting non si lavora in un pozzetto, ma su una membrana idrofobica. Il vantaggio della procedura di blotting è che posso ad esempio applicare sulla superficie della membrana idrofobica diversi tipi di antigene e vedere quali vengono riconosciuti dagli anticorpi di un paziente. Posso quindi vedere in una sola volta a cosa è allergico un paziente.

104) Quali sono le principali difficoltà connesse all'utilizzo di determinazioni immunochimiche su alimenti?

Possono esserci problematiche legate all'anticorpo perché è difficile ottenere anticorpi specifici per la porzione di proteina responsabile della risposta sgradevole che insorge. Possono esserci problematiche relative all'antigene, esso può essere troppo piccolo per il test scelto oppure potrebbe non legarsi al pozzetto. Potrebbero esserci problematiche legate alla solubilizzazione della specie da determinare.

105) Qual è la principale differenza tra allergie e intolleranze alimentari?

La sintomatologia può essere simile, ma la loro eziologia è completamente diversa. La principale differenza è che le allergie scatenano una risposta immunitaria coinvolgendo immunoglobuline specifiche, mentre le intolleranze non hanno nulla a che vedere con il sistema immunitario.

106) A cosa è dovuta l'intolleranza al lattosio, e come viene superata?

L'intolleranza al lattosio è dovuta al decremento di beta galattosidasi, enzima responsabile dell'idrolisi del lattosio in glucosio e galattosio. Il lattosio che non viene scisso viene fermentato dai simbionti intestinali, provocando flatulenza e malessere diffuso. Viene superata grazie all'utilizzo di prodotti delattosati, in cui per operare l'idrolisi del lattosio vengono utilizzati enzimi di origine funginea. I prodotti delattosati in commercio sono prodotti aggiungendo l'enzima al latte e lasciandolo agire, la produzione del latte delattosato ha costi contenuti.

107) Quali sono gli alimenti più «problematici» per gli intolleranti all'istamina?

Il contenuto di istamina è maggiore negli alimenti fermentati e invecchiati. Quindi gli alimenti più problematici per gli intolleranti all'istamina sono: i formaggi stagionati, le carni affumicate, i salumi, conserve a base di pesce, frutti di mare, crauti, la birra, l'aceto, nei funghi (senza dimenticare che si trovano anche nei formaggi erborinati) il vino rosso e tutti i vini ottenuti da uva rossa da cui è stata rimossa la buccia come lo Champagne.

108) Quale micronutriente è coinvolto nell'ossidazione del solfito e dei suoi derivati?

Il micronutriente coinvolto nell'ossidazione del solfito è il molibdeno. L'enzima solfito ossidasi utilizza molibdeno come cofattore, ossida il solfito a solfato e passa i due elettroni che restano a componenti della catena respiratoria mitocondriale. Il molibdeno come cofattore di questo enzima è un esempio di correlazione tra l'assunzione di micronutrienti e la capacità di reagire a xenobiotici come il solfito.

109) Date - in non più di 20 parole - una definizione di «celiachia»

Detta anche enteropatia da glutine, la celiachia è una malattia autoimmune causata da predisposizione genetica e discontinuità dell'epitelio intestinale

110) Quali sono le caratteristiche molecolari dei peptidi responsabili della celiachia?

Il peptide tossico responsabile della celiachia è formato da 33 amminoacidi. Questo peptide presenta diverse sequenze ripetute di amminoacidi idrofobici. La struttura è altamente idrofobica e quindi è in grado di passare le membrane, è ricca in prolina e quindi non ha struttura secondaria.

111) Qual è il limite del contenuto in glutine perché un alimento possa venir definito «gluten-free»?

Secondo il CODEX alimentarius ci sono due classi: gli alimenti naturalmente privi di glutine, per i quali non possono essere superati i 10 mg/ kg di gliadina e quindi i 20 mg/kg di glutine; e gli alimenti resi privi di glutine, per i quali non possono essere superati i 100 mg/kg di gliadina e quindi i 200 mg/kg di glutine. In Italia l'ultima classe di composti non esiste e si fa riferimento solo alla prima, che obbedisce agli stessi limiti del CODEX.

112) Cosa differenzia i vari formati utilizzati per la determinazione immunochimica del contenuto in glutine di alimenti?

Il test che viene fatto prima di effettuare un dosaggio immunochimico ELISA vero e proprio è un test semiquantitativo in stick. Se si ha il sospetto che un certo alimento contenga più glutine del dovuto si prende uno stick e si effettua uno strep test. Dopodiché si può vedere se qualcosa è stato riconosciuto dagli anticorpi presenti sullo stick. Questi dosaggi sono guida per i test veri e propri che sono ELISA non competitivo e ELISA competitivo indiretto.

Si possono usare il test ELISA a sandwich (non competitivo) in cui l'anticorpo è presente sulla superficie del pozzetto, se la gliadina si attacca viene riconosciuta dal secondo anticorpo che converte qualcosa di incolore in qualcosa di colorato. La scala di questo dosaggio è lineare, la risposta in termini di colore cresce al crescere della quantità di gliadina presente nel campione.

Se la sequenza tossica non è presente intera molecola, ma in peptidi più piccoli è necessario fare il test ELISA competitivo indiretto. L'antigene è adeso sulla superficie del pozzetto, ad esso si lega l'anticorpo di Mendez che viene riconosciuto da un anticorpo secondario marcato con un enzima. Se non c'è niente nel campione ci si ritrova una montagna di enzima attaccato, se invece nel campione è presente la proteina riconosciuta dall'anticorpo si ha un decremento della quantità di enzima presente. Al crescere dell'antigene

diminuisce la risposta in termini di colore. La scala di questo dosaggio non è lineare, essendo esponenziale basta un minimo errore per far sì che il risultato sia spostato.

113) Quali «ingredienti» sono necessari per solubilizzare il glutine prima della determinazione analitica?

Il glutine è una proteina insolubile in acqua, per fare determinazioni analitiche è invece necessario che la proteina si presenti in soluzione. Per i materiali non processati basta solo l'estrazione con etanolo, se invece si tratta di alimenti processati (sottoposti ad esempio ad impastamento) vanno rotti anche i legami covalenti intermolecolari (di solfuro). Per rompere i disolfuri è necessario aggiungere 5-mercaptetanolo o DTT, nel caso di alimenti processati in cui sono presenti altre interazioni oltre ai disolfuri è necessario aggiungere agenti caotropi. Se invece si tratta di piccoli peptidi è sufficiente l'etanolo.

114) Il *Penicillium* usato per produrre gorgonzola viene cresciuto su pane grattugiato, di cui se ne aggiungono circa 20 g/per quintale di latte, con una resa di circa 20 kg di formaggio per quintale di latte. Quale sarà il contenuto atteso in glutine nel formaggio, assumendo (per sicurezza) che il glutine sia la sola proteina presente nel pane, che contiene il 10% circa di proteine?

Il 10% di 20 g è 2 g: questi 2 g di proteine del glutine resistono a tutte le fasi di lavorazione del formaggio e rimangono anche nel prodotto finito.

Quindi ci sono 2 g di glutine in 30 Kg di formaggio e quindi 0,1 g/Kg di formaggio.