

28 ottobre 2015

METODICHE UTILIZZATE NELL'ANALISI DELLE PROTEINE.

Esistono diversi tipi di separazione delle proteine.

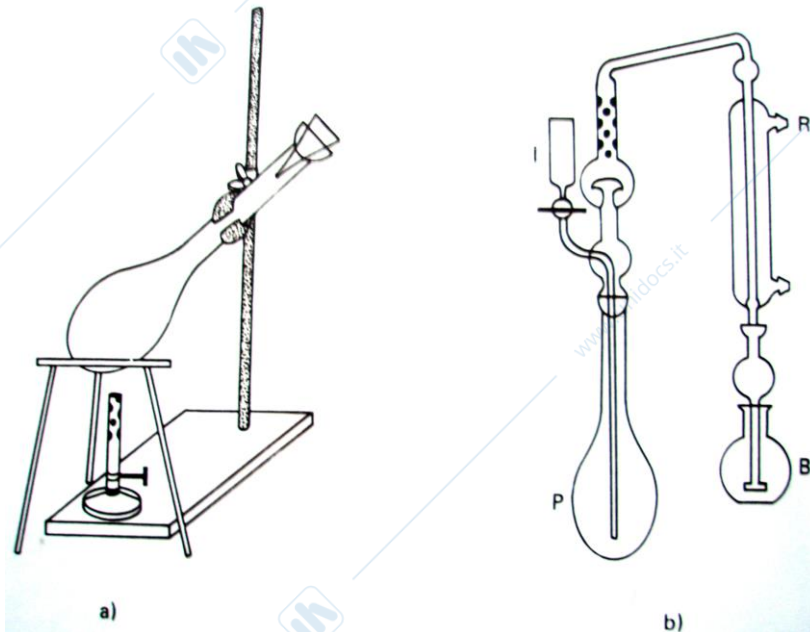
Come separare le proteine:

- Metodi di solubilità differenziata: (Ossia la separazione e successivo isolamento di diverse componenti proteiche, in base alla loro diversa solubilità) Ad esempio se prendo un alimento e lo metto in acqua, si solubilizzano solo le albumine; successivamente posso eliminare tale frazione, introdurre una soluzione salina separando quindi le globuline etc.
- Si possono usare precipitazioni con soluzioni saline o alcoliche. Anche questa metodica utilizza il "Principio della Solubilità": infatti alcune proteine, ad un certo valore di Ph, raggiungono il loro punto isoelettrico (ogni proteina, al proprio punto isoelettrico infatti, tende a precipitare).
- Dosaggio delle proteine.
- Tecniche per purificazione o separazione di proteine: dialisi, gel filtrazione, cromatografia a scambio ionico e affinità.
- Tecniche analitiche, cromatografiche, HPLC con diverse colonne, elettroforetiche, immunochimiche (di cui la più comunemente usata nell'analisi degli alimenti è la tecnica ELISA).

METODO KJELDAHL: strumentazione del passato.

Avviene in 3 fasi:

1. Mineralizzazione/ digestione.
2. Distillazione di NH_3 .
3. Determinazione quantitativa di NH_3 prodotto.



Con questo metodo si effettua un dosaggio delle proteine, mediante la determinazione del contenuto di azoto; infatti si prende in considerazione che le componenti cellulari con il maggior tenore di azoto siano le proteine (il rimanente, ossia ad esempio l'azoto contenuto negli acidi nucleici, incide poco sull'azoto totale). Questa è la fase di digestione del campione: essenziale perché consente di fare la trasposizione dall'azoto alla proteina.

- Palloncino di forma piriforme (ossia un palloncino allungato verso l'alto) per evitare gli schizzi + imbuto sopra.
- Dentro: mettere il **campione pesato** (g) e lo si riscalda su piastra riscaldante.

- Aggiungere **Acido Solforico** concentrato come solvente (*ecco perché bisogna evitare gli schizzi!*); è un fortissimo disidratante e per questo motivo ci consente di digerire, in maniera importante, il campione.
- Aggiungere **Solfato di Sodio**: innalza il punto di ebollizione della miscela al fine di favorire la digestione.
- Aggiungere **Ebollitori + Catalizzatori** (Sali di rame o selenio).
- Aggiungere **H2O2** per accelerare il trattamento: anche questa componente viene utilizzata per facilitare la digestione.

COSA SUCCEDDE DENTRO:

Tutto il materiale organico diventa CO₂, H₂O, NH₃. H₂O andrà poi ad evaporare a causa dell'elevata Temperatura.

Mediante la digestione, l'acido solforico con il solfato d'ammonio innalza la temperatura di ebollizione e quindi il campione si carbonizza (la miscela assume una colorazione nerastra). Poco a poco arriviamo a un colorino azzurro-trasparente, limpida → la reazione è finita. Così facendo otteniamo il composto di nostro interesse, ossia l'NH₃, presente in forma di NH₄⁺ legata al solfato (solfato d'ammonio).

A questo punto devo far raffreddare il pallone e lo trasferisco poi in un distillatore.

Nel serbatoio si aggiunge Soda al fine di neutralizzare l'acido solforico in eccesso. Si fa scendere questa nel pallone, il tutto mentre abbiamo in funzione lo strumento di distillazione. Nel pallone, quando calo la soda, si forma solfato di sodio che sposta l'equilibrio dagli ioni NH₄⁺ a "NH₃ libera" che viene separata e raccolta in "quantità NOTA" di acido in eccesso. NH₃ viene poi raffreddata e ricade nella beuta. Nel palloncino ho acido solforico titolato (ossia di cui conosco esattamente la concentrazione). L'ammoniaca con l'acido fa una titolazione. Userò una quantità di acido in eccesso e farò una retro titolazione.

In laboratorio, la digestione è automatizzata = immette automaticamente NaOH.

$$N\% = [(V-V') \times 1.4 / p] \times 100$$

- **V**: volume di acido solforico finale (che noi mettiamo nel palloncino, in cui ricade NH₃).

- **V'**: volume che uso per la retro titolazione.

- **(V-V')** = trovo il volume ricavato dall'ammoniaca distillata, ossia quello titolato.

- **1,4** = 14 x 0,1 → 14 è il PM di N; 0,1 è la Normalità che comunemente si usa per fare questa prova (della soda ed acido solforico).

- **p** = peso del campione.

Così facendo trovo la % di N nel campione. Da N uso dei "Fattori di Conversione" per passare alla proteina. Uso un valore medio se ho una miscela di ingredienti (es. nel wurstel) → 6.25 (16% N). in alternativa uso dei parametri più precisi per altri alimenti:

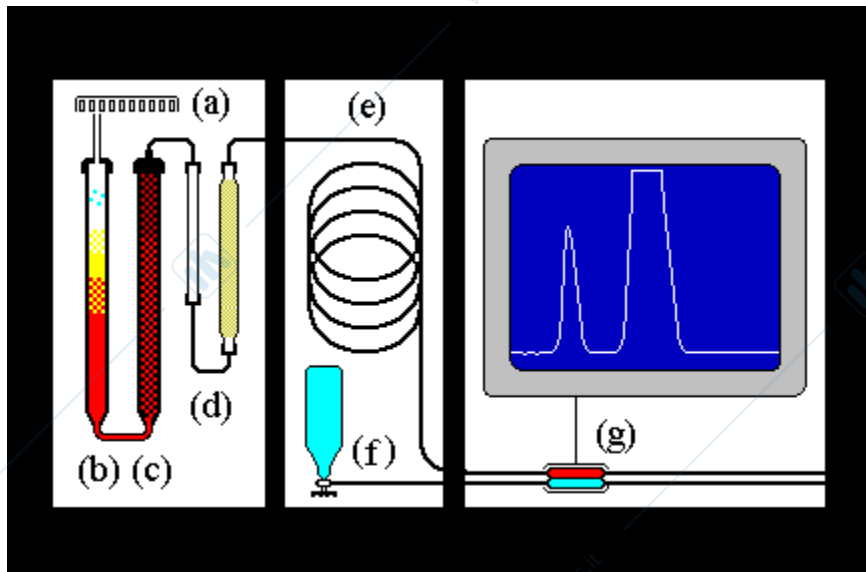
- Latte: 6.38 (15,7%)
- Cereali: 5.70 (17,5%)

Questi fattori di conversione derivano dalla percentuale di azoto contenuta in questi alimenti. Una proteina normalmente contiene il 16% di N, quindi il fattore di conversione è 6,25.

DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE CON ANALIZZATORE DI AZOTO:

Va usato quando devo fare tante analisi in un giorno. È un sistema complesso, con una camera di combustione in cui vi è "Rame Puro", utilizzato per facilitare l'ossidazione del campione.

Il Cu si esaurisce → costo elevato.



Anziché liberare ammoniaca, liberiamo $N + CO_2 + H_2O$. Queste ultime vengono eliminate dal sistema. L'azoto entra poi nella colonna cromatografica, dove verrà rilevato tramite che un picco nel detector (corrispondente ad "Azoto Molecolare"). Questo strumento dosa anche volumi molto piccoli.

ANALISI DEGLI AMMINOACIDI:

Bilancio tra amminoacidi essenziali e non essenziali, con riferimento alle proteine dell'uovo che sono il nostro metro di riferimento.

Le proteine hanno un legame peptidico fortissimo, difficilissimo da rompere. Al fine di quest'analisi è quindi necessario digerire le proteine da analizzare. Comunemente, questa digestione viene fatta per idrolisi acida → si usa HCl 6 N x 22-24 ore in stufa a 100-120 °C. Ci vuole molta energia per rompere i legami peptidici.

Gli aa vengono separati con tecniche diverse:

- **Analizzatore di amminoacidi** (strumento presente in laboratori in cui tale analisi è di routine)
- **HPLC.**
- **TLC.**

Non è molto facile avere gli amminoacidi, partendo da una data proteina. Una proteina in natura, sciolta in un tampone, assorbe a 280 nm (zona UV). Le proteine assorbono a tale lunghezza d'onda, in quanto i "Cromofori" (ossia strutture di una molecola responsabili dell'assorbimento della radiazione elettromagnetica) sono "Amminoacidi Aromatici", ossia anelli con doppi legami coniugati: per tal motivo, gli amminoacidi vengono dosati mediante "Rivelazione di Fluorescenza".

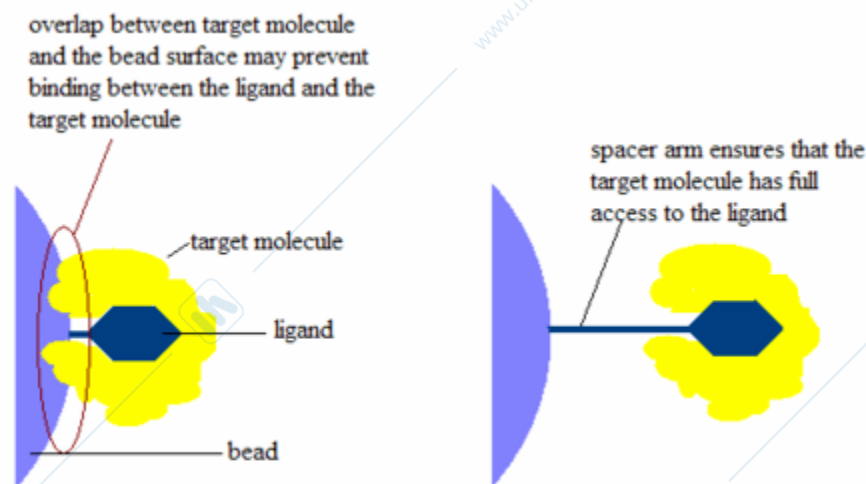
Prima del rivelatore, la molecola deve essere legata. Siccome gli amminoacidi, a parte gli aromatici, non riusciamo a vederli, dobbiamo usare un derivatizzante.

CROMATOGRAFIE IN COLONNA:

- A. **Gel filtrazione:** la colonna è di vetro e può avere dimensioni diverse, all'interno della quale si versano resine già preparate da aziende. Queste resine hanno al loro interno sferule piccolissime, vengono messe in tamponi e assumono le caratteristiche di un gel. Ogni sferula del gel, ha al suo interno dei pori (tunnel) con diverse dimensioni. C'è una separazione tra proteine diverse. Il campione va caricato cima e comincio a far scendere il liquido che eluisce le mie proteine → queste si separano. Prima scendono le proteine più grosse e poi quelle sempre più piccole. Le proteine piccole entrano in tutti i pori → occupano un volume molto grande. Quelle grosse passano solo all'esterno delle sferule. In questo modo, usando resine fatte apposta, separo le proteine.

L'applicazione più comune è la dialisi (metodica che ha lo scopo di eliminare i Sali da una soluzione proteica): i Sali pesano centinaia di Dalton, le proteine anche 100.000. i Sali che sono piccoli, rimangono indietro → tolgo i Sali dalla proteina.

- B. **Scambio ionico:** la colonna contiene un gel ma questa volta è diverso → qui abbiamo sferule con cariche in superficie (+ o – in base a ciò che devo fare). Carico il campione: le proteine si attaccheranno alla carica opposta. Conoscendo i “Punti Iso-Elettrici” e la proteina, trattengo in colonna quella che m’interessa ed elimino le altre. Devo conoscere la mia proteina → la eluisco alla fine, per purificarla.
- C. **Cromatografia di affinità:** Si usa spesso nell’analisi degli alimenti, diversamente dalle altre. Sfrutta l’affinità biologica tra una molecola ed un ligando, formando un complesso. Il ligando sarà sempre in colonna e potrà essere un “Substrato Enzimatico” (se voglio bloccare un enzima), un “Ligando di un Recettore” (se voglio bloccare il recettore sulla colonna), “Antigene per un Anticorpo” (più usata) o viceversa. Il giusto ligando si lega così che io possa eliminare ciò che non mi interessa per l’analisi e poi eluisco ciò che mi interessa per purificarlo. Carico il campione in colonna, uso un solvente per fare l’eluizione. Le molecole cominciano a scendere e raccolgo le molecole che non mi interessano: vengono giù prima perché non si legano. Quelle che ci interessano solo legate → le devo staccare. Normalmente si usano dei bracci mobili: si migliora il legame, riducendo l’impedimento sterico.



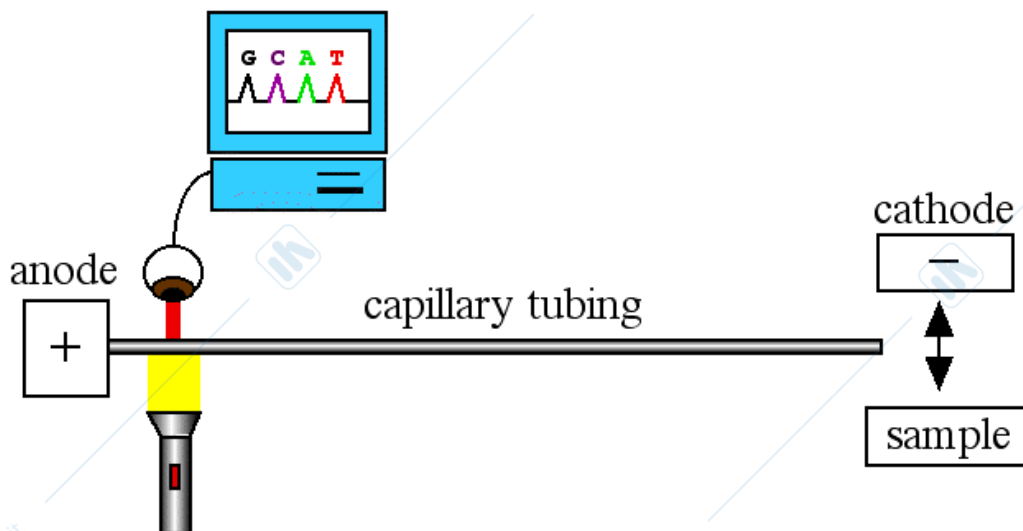
Alcune molecole si legano perfettamente, altre non del tutto → queste si staccheranno durante l’eluizione, e questo è il motivo per cui il riconoscimento non è preciso.

Come faccio a far scendere le proteine che mi interessano: devo usare condizioni più drastiche. Diversi modi:

1. *Denaturazione del ligando:* uso una soluzione che denatura il ligando (es. per le micotossine). La colonna poi la si butta.
2. *Competizione:* uso un ligando in quantità elevata, che rimuove l’altro.

ELETTROFORESI CAPILLARE:

Applicazione limitata. Strumenti simili a HPLC.



Questa separazione avviene in base alla carica delle molecole, quindi per "Elettroforesi".

Il campo elettrico è applicato ad una colonna di acciaio, riempita con un gel dove viene iniettato il campione. Il campione si muove secondo la sua carica.

(+) : anodo; (-) : catodo.

Le molecole più cariche corrono di più. Avremo un "Elettroferogramma" che permette di dosare alcune molecole.

Le proteine cambiano la carica in base al pH.

LIPIDI: Lipos = grasso.

Sulle etichette alimentari:

La frazione grassa viene chiamata: grasso.

Zuccheri: carboidrati di cui zuccheri: per "Carboidrati" si intendono tutti gli elementi appartenenti a questa famiglia, mentre per "Zuccheri" si intendono i "Carboidrati Semplici"

Caratteristiche:

- Insolubili in acqua,
- Solubili in alcuni solventi.

Classificazione in base al fatto che siano più o meno solidi a temperatura ambiente.

- Grasso liquido a T. ambiente: olio. (a T. molto basse, cristallizzano). Origine vegetale tranne qualche eccezione (olio di cocco e palma: sono solidi).
- Grasso solido a T. ambiente: grassi solidi o concreti → burro, lardo. Sono di origine animale.

- Acidi grassi SATURI: solo legami semplici; sono solidi a T. ambiente (25 °C) e sono di origine animale.

- Acidi Grassi INSATURI: uno o più doppi legami, liquidi a T. ambiente; origine vegetale. Possono essere cis o trans.

Normalmente gli "Acidi Grassi Insaturi Naturali" sono CIS. (TRANS si trovano nelle margarine)

Da ricordare:

Stearico (C18) → Oleico (18:1) → linoleico (18:2) → linolenico (18:3). Sono gli acidi grassi di grandissima importanza negli alimenti. Gli ultimi due sono essenziali (ossia che devono essere assunti necessariamente con la dieta).

Negli alimenti, gli acidi grassi sono strutturati in trigliceridi (come nel nostro organismo). → un glicerolo con 3 acidi grassi.

Gli acidi grassi vengono staccati dalle lipasi che si trovano nel succo pancreatico. Gli acidi biliari sono emulsionanti di cui abbiamo bisogno perché le lipasi di natura proteica è idrofila, non riesce a venire a contatto con il grasso. Gli emulsionanti tengono insieme una parte lipofila ed una idrofila.

L'idrolisi fisiologica nell'alimento, è un fatto negativo: si perde qualità del prodotto.

Principali fonti alimentari:

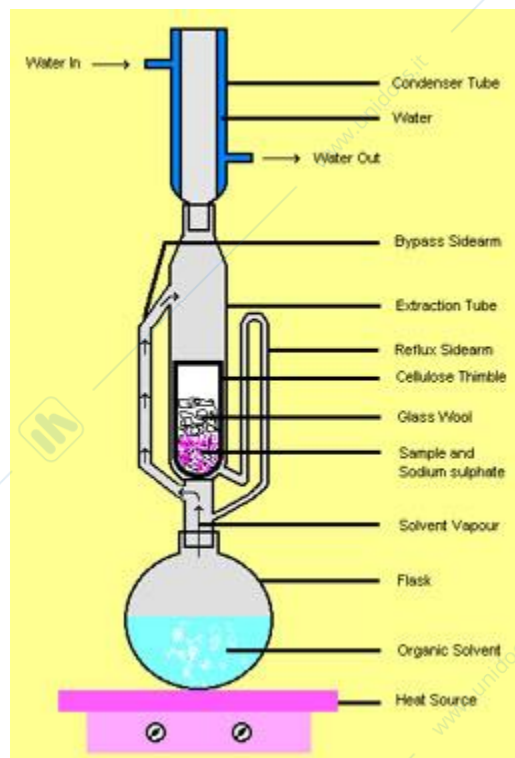
- **Saturi:** palmitico e stearico in carne, uovo, latte.
- **Monoinsaturi:** oleico lo si trova in oli vegetali e soprattutto nell'olio d'oliva.
- **Polinsaturi:** linoleico e linoleico → di origine vegetale ma sono più abbondanti negli oli di semi.
- **Insaturi a lunga catena:** DHA (docosaesaenoico) e EPA (eicosapentaenico) nel pesce e nel latte materno in base a quanto pesce mangia la madre.

SAPONIFICAZIONE:

S'intende la scissione del legame estereo nella molecola del trigliceride. Si ottiene per:

- Scissione enzimatica
- Per saponificazione chimica con basi. (NaOH, KOH)

1° metodo per la DETERMINAZIONE DEI GRASSI: estrattore Soxhlet.



Questa è una metodica di laboratorio ancora in uso, in quanto relativamente efficiente e di basso costo.

Consente di effettuare un dosaggio quantitativo della frazione grassa di un alimento.

- Manto per scaldare.
- Pallone con solvente di estrazione, compatibile con l'analisi che dobbiamo effettuare. Normalmente si usa l'esano o l'etere di petrolio. L'etere etilico non si usa in quanto esplosivo molto facilmente. L'esano invece è sicuro per l'operatore e costa poco.

Pulisco dentro e fuori il pallone, lo peso (vuoto) e metto dentro l'esano.

Sopra: provetto di cellulosa permeabile, chiamato "Ditale". All'interno di questo dispositivo (ovvero nella camera di estrazione), mettiamo il campione, pesato esattamente. Accendiamo il manto riscaldante, l'esano inizia a riscaldarsi, e quindi ad evaporare. I vapori salgono nel refrigerante: l'esano torna liquido e ricade nel ditale. Il liquido sale a poco a poco nel ditale, chiuso da una valvola. Quando il liquido raggiunge un certo livello, si apre la valvola e il liquido torna giù, ricominciando il ciclo. Solitamente si lascia estrarre per un paio di ore e poi si ferma. Si prende il pallone, si fa evaporare il solvente che può essere recuperato ed utilizzato.

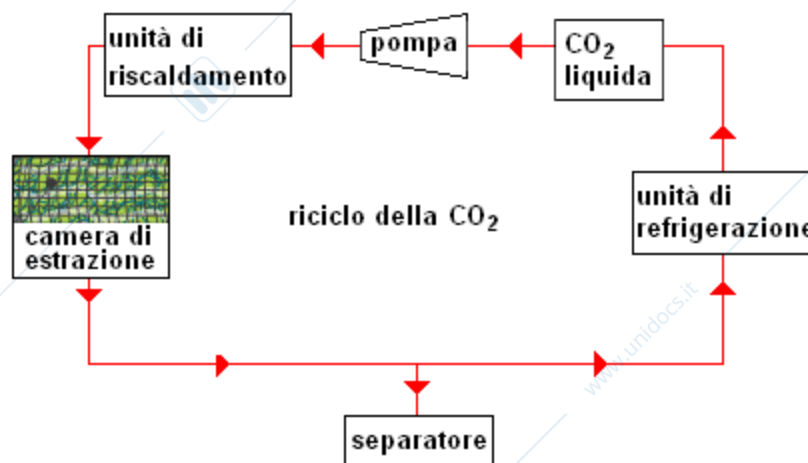
Per quantificare i grassi, ripeso il pallone dopo averlo pulito esternamente. Tolgo la tara e lo riporto al peso iniziale del campione.

Questo sistema viene usato per i **solidi** (salami, formaggi etc.). Questo sistema non può essere utilizzato per i liquidi, in quanto ricadendo nel "Ditale" (Poroso) tenderebbe ad essere assorbito dallo stesso, ricadendo nell'esano.

Funzionamento di questo metodo, in altre parole: dopo aver inserito il campione nella camera d'estrazione e il solvente nel pallone, ha inizio l'operazione di estrazione. Il solvente viene portato ad ebollizione e quindi passa prima nell'estrattore e poi nel condensatore, ricadendo a questo punto, come condensato, nella camera di estrazione (=ditale), dove era stato precedentemente caricato il soluto. Il solvente passa la carta filtrante, portando con sé il soluto e viene poi spillato da un condotto laterale, dove si accumulano il soluto in basso, ed il solvente in alto. Il solvente viene poi ricircolato da qui, al pallone.

Il risultato finale è che il materiale nel ditale è sottoposto ad un ripetuto impregnamento nel solvente puro e questo rende il processo + efficiente.

2° metodo per la DETERMINAZIONE DEI GRASSI: estrattore a CO₂ supercritica (CO₂ supercritica = anidride carbonica in fase liquida) → sostituisce industrialmente il comune solvente organico, usato per estrarre il componente attivo dei prodotti naturali; è poco costosa.



Si usa anche per fare estratti vegetali, quali la caffeina.

Non vi sono solventi da eliminare. (smaltire i solventi costa tantissimo).

Funzionamento del sistema: la CO₂ può essere immagazzinata sia in fase gassosa sia liquida; è poi compressa mediante una pompa, al di sopra della sua pressione critica. La CO₂ compressa è quindi riscaldata sopra la sua temperatura critica, in un riscaldante, producendo CO₂ supercritica. Tutte le parti della camera di pulizia, sono pulite dall'esposizione alla CO₂ supercritica. Tipicamente, la camera di pulizia include un agitatore per accelerare il processo.

La CO₂ supercritica contiene particelle contaminanti dissolte, che sono espulse in una camera separatrice, dove il biossido di carbonio supercritico è decomposto e ritorna in fase liquida, per essere immagazzinato e riutilizzato. Questo ciclo chiuso per il recupero di CO₂, comporta che anche solo una piccola frazione della soluzione detergente, debba essere rimpiazzata x compensare le perdite del sistema. Le parti pulite possono essere rimosse dalla camera e sono pronte per la fase successiva del processo di lavorazione, dal momento che non è richiesta alcuna procedura d'essiccazione e risciacquo x rimuovere i residui, dalla soluzione detergente.

ASPETTI NUTRIZIONALI dei lipidi:

In un soggetto di 70 kg, il 14% del peso totale è costituito da lipidi → 90'000 Kcal a disposizione (un mese di scorte). Sono la fonte di energia + comune. Permettono l'isolamento termico → mantenimento T. Servono per le integrità delle membrane cellulari, per l'assorbimento di vitamine liposolubili, sono precursori delle prostaglandine. Quanto più giovane è l'organismo, quanta più energia ha bisogno. L'adulto ha bisogno di 1g per kg di peso corporeo, i bambini dai 3 a 5 g.

Non devono apportare più del 30% delle kcal e i saturi non devono essere più del 10%. I trans devono essere il meno possibile.

Digestione: si basa sull'idrolisi dei trigliceridi ad opera delle lipasi, ad opera dei Sali biliari → emulsioni → digestione.

Assorbimento: nei villi intestinali. I neonati non riescono ad assorbire gli acidi grassi velocemente.

COLESTEROLO:

Ha diversi ruoli, non si può stare senza colesterolo.

Precursore di:

- ✓ Vitamina D,
- ✓ Sali biliari,
- ✓ Ormoni steroidei.

Rientra nelle membrane. Viene considerato un sorvegliato speciale dal punto di vista salutistico. La colesterolemia è legata alle patologie cardiovascolari. Gli uomini sono più a rischio. L'apporto di colesterolo quotidiano non deve superare i 300 mg al giorno. Un uovo, basta per l'apporto quotidiano di colesterolo al giorno → se ne possono mangiare due alla settimana, se non si hanno patologie.

PATOLOGIE LEGATE AD ABUSO DI LIPIDI:

- ❖ Obesità.
- ❖ Aterosclerosi, patologie cardiovascolari.
- ❖ Ipercolesterolemie ed iperlipemie.
- ❖ Promotori tumorali: colon, mammella, retto..
- ❖ Ipercolesterolemia familiare, ipertrigliceridemia familiare: malattie genetiche. La seconda è una patologia benigna: mettendo il soggetto a terapia con dieta a base di olio di pesce; la prima non è facilmente curabile. Entrambe sono a trasmissione dominante: la patologia è tale anche se uno solo dei due genitori la porta. I livelli di colesterolo arrivano intorno ai 350 per gli etero, gli omo a 1000. L'ipercolesterolemia viene curata con le statine e dieta.

DHA/EPA: contenuti in pesce azzurro (mare del nord).

- L'olio di pesce non è la panacea di tutti i mali. È diventato anche un integratore alimentare.
- La qualità e concentrazione di acidi grassi polinsaturi può essere molto diversa
- Hanno scarsissimo effetto sul colesterolo
- Intervengono sulla trigliceridemia: terapia d'elezione.