

Analisi delle Proteine



Elementi che costituiscono le proteine: idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno e zolfo;

tra cui l'azoto è l'elemento più distintivo → nei cibi, l'azoto varia da 13,4% a 19,1%.

L'analisi delle proteine nei cibi è complicato dal fatto che alcuni componenti possiedono proprietà chimico-fisiche simili.

Es. L'azoto non proteico può derivare da amminoacidi liberi, piccoli peptidi, acidi nucleici, fosfolipidi, ammino zuccheri, vitamine, ioni ammonio ecc...

Azoto totale = azoto proteico (maggior parte) + azoto non proteico (solubile, aminico)

Diverse metodiche per la determinazione del contenuto proteico, basati sulla determinazione:

- di azoto;
- del legame peptidico;
- di amminoacidi aromatici;
- legame a sonde;
- reazioni colorimetriche.

L'analisi delle proteine è richiesta quando si vuole sapere:

1. Contenuto delle proteine totali
2. Contenuto di una proteina in una miscela
3. Contenuto proteico durante l'isolamento e la purificazione
4. Azoto non proteico
5. Composizione degli amminoacidi
6. Valore nutritivo di una proteina

Analisi quantitative

Diversi metodi per la quantificazione delle proteine totali:

1. Dosaggio spettrofotometrico diretto;
2. Determinazione dell'azoto;
3. Metodi colorimetrici.

1. Dosaggio spettrofotometrico diretto

Metodo più semplice e più vantaggioso: permette il riutilizzo del campione esaminato.

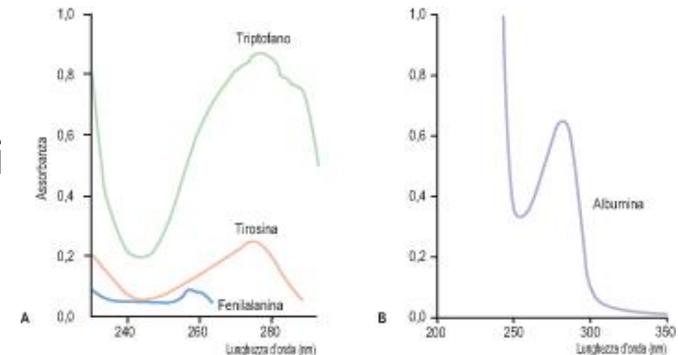
Si basa sulla determinazione dell'**assorbanza a 280 nm** (triptofano, tirosina e fenilalanina).

L'assorbimento varia in base alla composizione in aa della proteina.

$$\text{mg proteine/ml} = 1,55 * A_{280} - 0,76 * A_{260}$$

A_{260} = assorbanza a 260 nm, dovuta agli acidi nucleici

Svantaggio: limitazione di specificità e precisione.



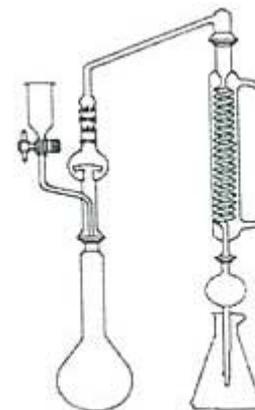
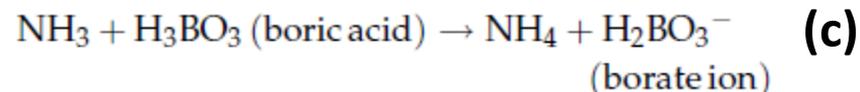
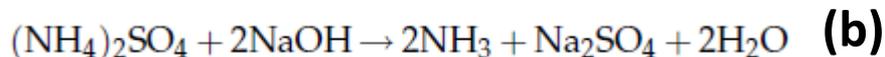
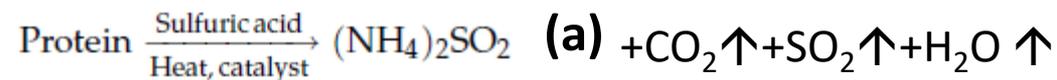
2. Determinazione dell'azoto totale

E' la metodica più precisa per la determinazione delle proteine totali, ma è complessa.

Due metodi: *metodo di Kjeldahl* e *metodo di Dumas*.

Metodo di Kjeldahl

- Digestione del materiale a caldo con acido solforico e conversione dell'azoto organico in solfato d'ammonio non volatile **(a)**.
- Neutralizzazione del digerito con una base (in eccesso) formando ammoniaca **(b)**, distillata ed intrappolata come ammonio in una soluzione di acido bórico (in quantità nota) **(c)**.
- L'acido bórico restante viene retro-titolato con NaOH → moli NH₃ = moli totali acido- moli di NaOH consumate (acido non reagito) **(d)**.



Vantaggi

1. Applicabile a tutti i tipi di cibi
2. Economica
3. Accurata
4. Metodo modificato anche per misurare microgrammi di proteine
5. Può essere automatizzato

Svantaggi

1. Misura l'azoto totale, non solo quello di origine proteica
2. Richiede molto tempo (almeno 2 ore)
3. Precisione minore rispetto ai metodi colorimetrici
4. Impiega reagenti pericolosi

3. Metodi colorimetrici

Basati sulla formazione di complessi colorati di proteine con alcuni reattivi.

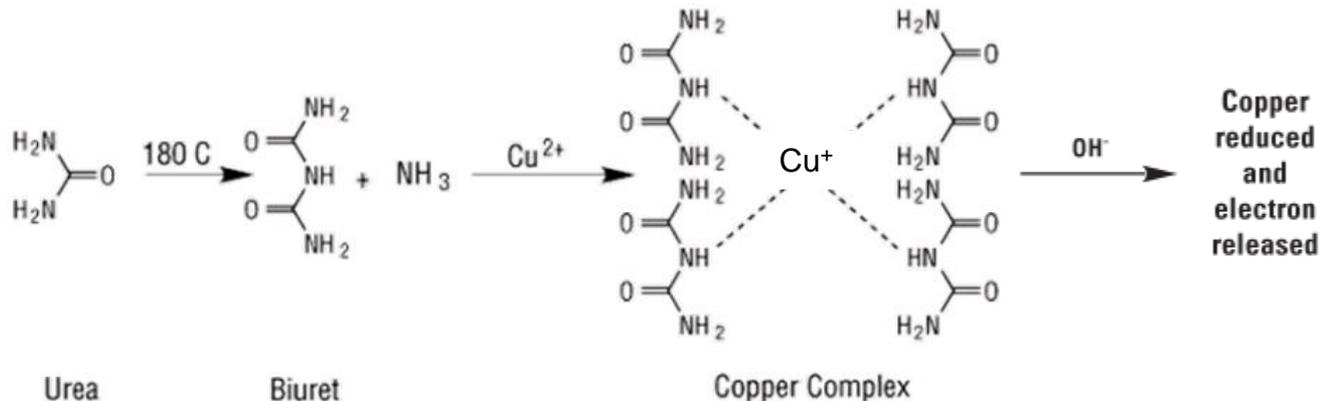
Principali metodi:

- a) **Metodo del Biureto**
- b) **Metodo di Lowry**
- c) **Metodo di Bradford (o del Blue Coomassie)**
- d) **Metodo dell'Acido Bicinconinico**

a) *Metodo del Biureto*

Aggiungendo alla soluzione proteica una soluzione rameica in ambiente basico, si ottiene una colorazione viola-porpora con un max assorbimento a 540 nm.

Dovuto alla formazione di un complesso tetra-coordinato del rame con legami peptidici (es. biureto, peptidi e proteine): il rame viene poi ridotto.



Applicazioni in campo alimentare:

E' stato usato per determinare il contenuto proteico in cereali, carne, soia, concentrazione di proteine isolate e come test qualitativo per il cibo animale.

Vantaggi

1. Meno costoso del metodo di Kjeldhal, più rapido e semplice.
2. Poche sostanze di natura non proteica interferiscono con il dosaggio.
3. Non dosa l'azoto da sorgenti non proteiche o non peptidiche.

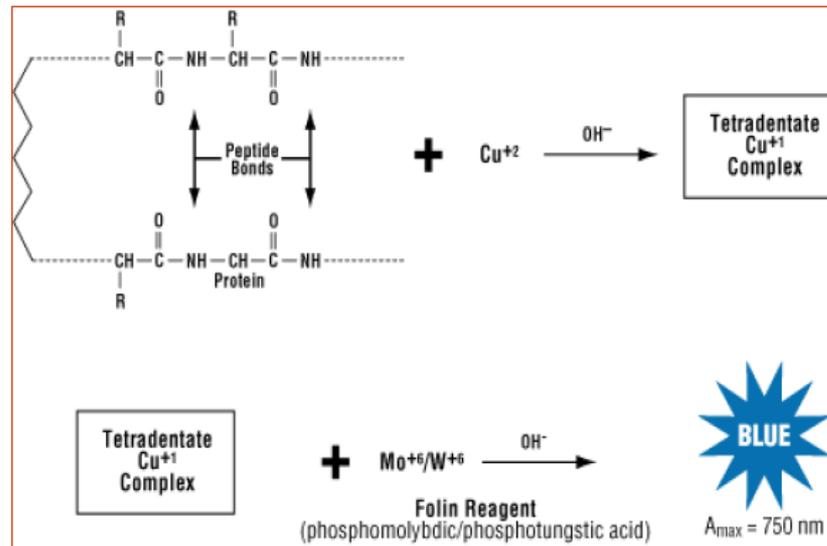
Svantaggi

1. Poco sensibile rispetto ad altri metodi (almeno 2-4 mg di proteine per saggio).
2. Alte concentrazioni di sali d'ammonio interferiscono con il dosaggio.
3. Il colore può variare a seconda delle proteine (la gelatina dà una reazione rosa-porpora).
4. La soluzione può essere opalescente a causa di alto contenuto di lipidi e carboidrati.
5. Non è un metodo assoluto: necessaria una **curva di taratura** (e.g. con BSA).

b) Metodo di Lowry

Combina la reazione del biureto con la riduzione del reattivo fosfomolibdico-fosfotungstico per i fenoli, il **reattivo di Folin-Ciocalteu**.

Gli ioni rameosi prodotti dai legami peptidici, e le tirosine e triptofani delle proteine reagiscono con il reattivo di Folin formando un colore blu (750 nm), per la formazione di blu di tungsteno e blu di molibdeno.



Applicazioni:

Viene usato soprattutto in campo biochimico, data la sua semplicità e sensibilità. In campo alimentare non è usato spesso: prima necessita di una estrazione delle proteine.

Vantaggi

1. Molto sensibile: 50-100 volte più sensibile del biureto; 10-20 volte più sensibile dell'assorbimento UV.
2. Meno sensibile alla torbidità del campione.
3. Più specifico di altri metodi.
4. Semplice (1-1,5 ore per il dosaggio).

Svantaggi

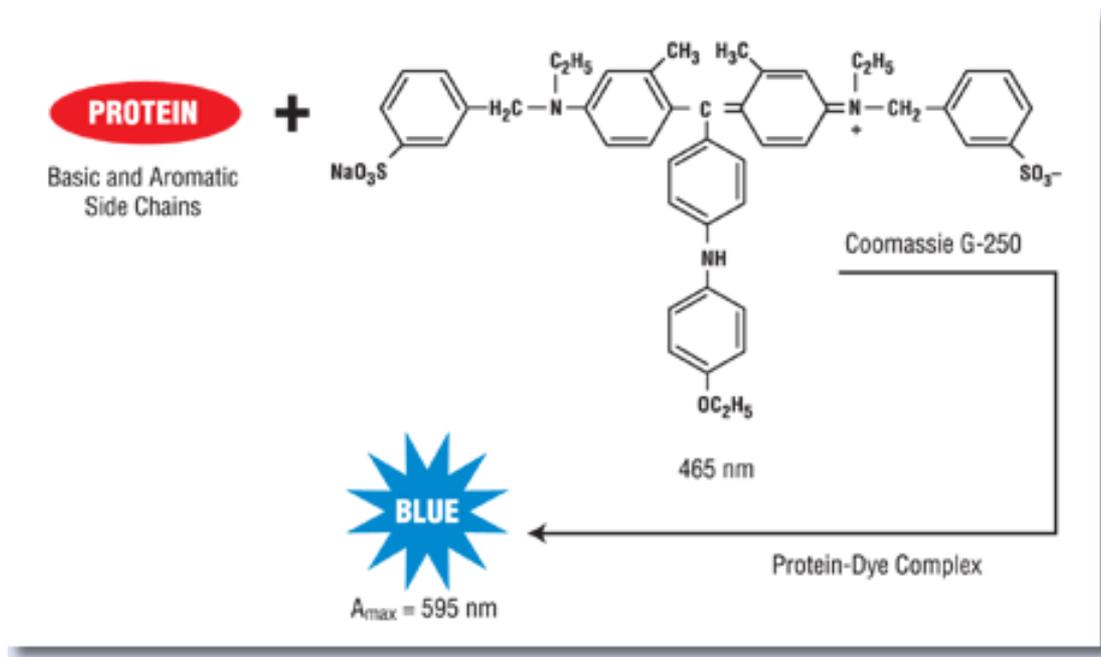
1. Il colore può variare a seconda della proteina maggiormente rispetto al biureto.
2. Il colore non è strettamente proporzionale alla concentrazione proteica.
3. Diverse sostanze interferiscono (saccarosio, lipidi, fosfati, monosaccaridi).
4. Alte concentrazioni di zuccheri riducenti, solfato d'ammonio, e composti sulfidrilici interferiscono con la reazione.

c) Metodo di Bradford (o del Blue Coomassie)

Sfrutta l'uso di un colorante, il Coomassie Brilliant Blue G250.

Quando si lega alle proteine, cambia colore da rossiccio a blu con il massimo di assorbimento a 595 nm.

Si lega alle catene laterali degli amminoacidi basici (positivi, interazioni elettrostatiche) e aromatici (interazioni idrofobiche) cambiando lo spettro di assorbimento rispetto al colorante non legato.



Applicazioni:

In campo alimentare, è stato usato per determinare le proteine nella birra, nel mosto e nelle patate. Usato in campo biochimico per la quantificazione grazie alla sua buona sensibilità, rapidità e minor interferenze rispetto al Lowry.

Vantaggi

1. Rapido: reazione completa in 2 minuti.
2. Riproducibile.
3. Sensibile.
4. Nessuna interferenza da ammonio solfato, polifenoli, carboidrati, o cationi come K^+ , Na^+ ed Mg^{2+} .

Svantaggi

1. Interferenze di detergenti ionici e non ionici (es. SDS e Triton X-100).
2. Il complesso proteina-colorante si può legare alle cuvette di quarzo.
3. Il colore varia con diversi tipi di proteine: scelta attenta dello standard di riferimento.

d) Metodo dell'Acido Bicinconinico

Proteine e peptidi riducono gli ioni rameici a rameosi in ambiente basico (*reazione del Biureto*).

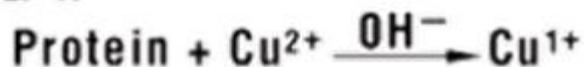
Gli ioni rameosi reagiscono con il reagente di Acido Bicinconinico (BCA) verde mela, per formare un complesso viola-porpora (1 ione rameoso chelato da 2 molecole di BCA).

Il colore viene misurato alla lunghezza d'onda di 562 nm, ed è lineare con la concentrazione proteica da microgrammi fino a 2 mg/ml.

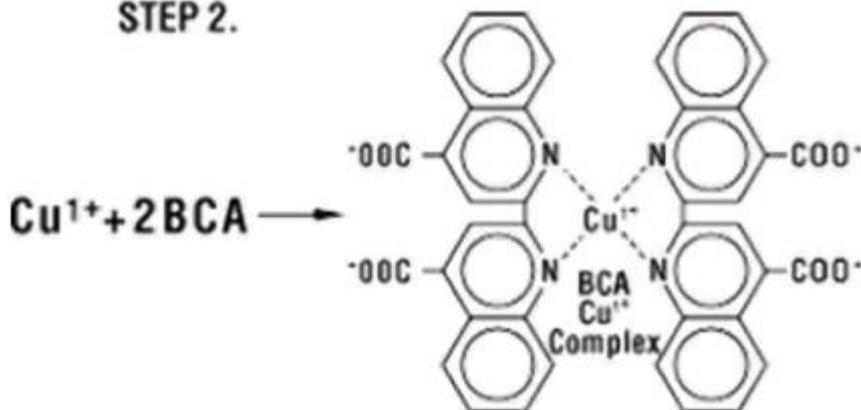
Contribuiscono al colore legami peptidici, cisteina, cistina, triptofano, tirosina.

NB. La reazione avviene per 30 minuti a 37°C, 15 minuti a 60°C o 2 ore a RT.

STEP 1.



STEP 2.



Applicazioni:

Viene usato per la quantificazione proteica durante i processi di purificazione ed isolamento delle proteine.

Non è ancora stato usato per la determinazione nei cibi.

Vantaggi

1. Sensibilità compatibile o maggiore (micro-metodo, 0.5-10 µg di proteina) del Lowry.
2. Reazione in un unico passaggio, più semplice del Lowry.
3. Il reagente è più stabile del reagente di Lowry.
4. Detergenti non ionici e tamponi non interferiscono con il dosaggio.
5. Concentrazioni medie di reagenti denaturanti (Urea e Cloruro di Guanidinio) non interferiscono.

Svantaggi

1. Il colore non è stabile nel tempo.
2. Ogni composto capace di ridurre Cu^{2+} a Cu^{+} formerà colore.
3. Gli zuccheri riducenti interferiscono maggiormente rispetto al Lowry.
4. Variazioni nella colorazione tra le proteine simile al metodo di Lowry.

Analisi Immunochemiche

Utilizzate per identificare una particolare proteina: sfruttano l'elevata specificità antigene-anticorpo.

RIA (Radio Immuno Assay)

Utilizza antigeni marcati radioattivamente per quantificare l'antigene di interesse in un campione tramite un metodo competitivo: maggiore [] antigene nel campione, minore la radioattività (misurata con uno scintillatore).

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

Non usa specie radioattive, ma anticorpi secondari coniugati ad enzimi per la rilevazione della concentrazione dell'antigene: > assorbanza → > [] antigene

