

La biofisica a tavola con uova, ricotta e formaggio: raccontare l'aggregazione biopolimerica a scuola

*Maria Rosalia Mangione, Rosina Noto, Fabio Librizzi, Silvia Vilasi,
Vincenzo Martorana, Rita Carrotta*

Istituto di Biofisica (CNR), Palermo

Lo studio dell'aggregazione biopolimerica è rilevante in diversi campi di ricerca, dalla medicina alla scienza alimentare alla biotecnologia. Un approccio biofisico allo studio di un sistema consiste nel costruire un modello descritto da poche variabili capaci di rappresentarlo in modo semplificato e di fornire predizioni sul suo comportamento. La biofisica usa tra le sue armi l'interazione tra radiazione e materia per ottenere informazioni sui sistemi in esame.

Strutture prodotte dall'aggregazione biopolimerica e in particolare dall'aggregazione proteica si ritrovano nelle marmellate, nei formaggi, nella ricotta e nelle creme alimentari. Seppure con diversi elementi aggreganti, questi sistemi mostrano un comportamento dettato da comuni interazioni tra le molecole.

Questo contributo ha l'obiettivo di raccogliere esperimenti semplici ma informativi sullo stato della materia e i suoi possibili cambiamenti. Gli esperimenti, proposti in varie occasioni a studenti della scuola secondaria, utilizzano materie prime di uso quotidiano come uova e latte, perturbate mediante stimoli di tipo meccanico, termodinamico o chimico. La produzione del formaggio e della ricotta è un esempio di come da uno stesso elemento, il latte, selezionando opportunamente le componenti su cui si lavora, è possibile ottenere risultati diversi. I cambiamenti di stato vengono osservati macroscopicamente ad occhio nudo dove possibile. Le proprietà della luce e la sua interazione con macromolecole di dimensioni paragonabili alla sua lunghezza d'onda permettono di rivelare oggetti di dimensioni inferiori al micron. Gli esperimenti reali sono accompagnati da esperimenti computazionali virtuali e interattivi che permettono di traslare su una scala microscopica i fenomeni osservati, favorendo una comprensione più profonda dei meccanismi dell'aggregazione biomolecolare.

1. Introduzione

Un biopolimero è una catena di molecole collegate tra loro da legami covalenti. Le unità base possono essere aminoacidi (proteine), zuccheri (polisaccaridi) o nucleotidi (RNA e DNA). I biopolimeri tutti sono caratterizzati da diversi gradi di struttura, che vanno dalla semplice sequenza lineare (primaria), all'organizzazione locale tra vicini (secondaria), all'arrangiamento tridimensionale tra gruppi di atomi lontani in sequenza ma interagenti tra loro (terziaria) e infine all'assemblaggio di più catene (quaternaria).

Oltre ai legami covalenti, che determinano la catena, le unità molecolari interagiscono con tutto ciò che sta loro attorno, incluso ovviamente il solvente e quegli atomi della stessa o di un'altra catena che si trovano loro vicini. Queste interazioni intra e intermolecolari determinano la struttura tridimensionale del biopolimero, che dipende dal solvente e dai parametri fisici come pressione e temperatura.

Nel caso specifico delle proteine, di cui ci occuperemo nei nostri esperimenti, si individua una "struttura" (intesa sempre dal punto di vista statistico e dinamico) detta nativa, che è data dal corretto ripiegamento (*fold*ing) della catena peptidica ed è quella funzionale in condizioni fisiologiche. Le proteine sono caratterizzate da una temperatura detta di denaturazione (tipicamente 40-70 °C) sopra la quale esse si srotolano (*un*fold*ing*), poiché i movimenti atomici risultanti dall'aumento dell'energia termica rompono le interazioni che nel loro insieme stabilizzano la struttura nativa. Le interazioni di cui parliamo sono interazioni elettrostatiche, legami idrogeno, interazioni di van der Waals e interazioni cosiddette idrofobiche. Le prime tre danno luogo ad un immagazzinamento di energia, l'entalpia, mentre le ultime contribuiscono all'energia libera del sistema con un termine che deriva dalle sue possibilità configurazionali, quindi alla sua entropia.

Il sistema propriamente detto è il biopolimero più il solvente. Perturbare il solvente può destabilizzare la proteina che, dapprima in equilibrio, si ritrova nel nuovo contesto in una conformazione che non è più di minima energia; pertanto, il sistema tende a riaggiustarsi raggiungendo un minimo energetico corrispondente ad un nuovo ensemble di stati. La possibilità di compiere cambiamenti conformazionali a seguito di stimoli esterni è spesso funzionale per le proteine; alcune perturbazioni, tuttavia, possono portare a strutture errate (*mis*fold*ing*), con conseguenze anche catastrofiche. Il *mis*fold*ing* infatti, oltre a implicare una perdita di funzionalità può portare ad aggregazione intermolecolare patologica, per via dell'esposizione al solvente di gruppi idrofobici che nella

conformazione nativa si trovano nascosti all'interno della proteina. Una tipica forma di aggregazione proteica è quella amiloide, in cui ciascuna proteina si lega alle altre tramite un gran numero di legami idrogeno, in una struttura detta foglietto beta, ordinata e molto stabile. Durante il processo si formano aggregati di dimensioni diverse, da piccoli oligomeri fino a fibre composte da migliaia di proteine. Questi aggregati, in particolare i piccoli oligomeri, risultano tossici per le cellule dell'organismo e sembrano essere i responsabili di molte malattie da *misfolding*, alcune neurodegenerative (morbo di Alzheimer, di Parkinson, corea di Huntington, ecc.) in cui l'azione tossica si esercita sulle cellule neuronali (Chiti, Dobson, 2017).

Esistono tuttavia anche fenomeni di aggregazione proteica funzionali, importantissimi per gli organismi viventi (ad esempio i microtubuli nel citoscheletro, o il collagene nei tessuti).

2. *Esperimenti divulgativi*

La conoscenza scientifica scaturisce spesso dall'esperienza quotidiana. Su questa base, a partire da sostanze comuni ricche di proteine, come uovo e latte, proponiamo degli esperimenti che portano a comprendere fenomeni generali legati all'aggregazione proteica.

2.1

L'uovo (figura 1) è costituito da albume (circa 60%), tuorlo (circa 30%) e guscio (circa 10%). L'acqua è la componente principale sia del tuorlo (50%) che dell'al-

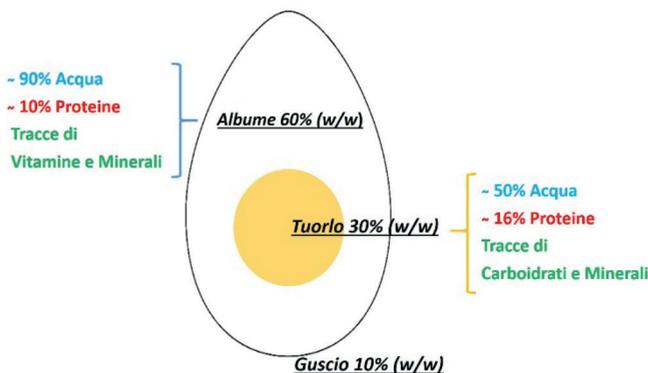


Figura 1
Composizione dell'uovo

bume (90%), praticamente il 70% del peso dell'uovo. Le proteine sono presenti sia nell'albume che nel tuorlo dove in più sono contenuti dei grassi (10%).

L'albume contiene circa 40 proteine diverse insieme a tracce di minerali, vitamine e glucosio. Una di queste proteine, l'ovomucina, è responsabile della struttura laminare dell'albume che ostacola la penetrazione fin al tuorlo di microbi. Fa infatti da linker collegando le altre proteine disperse nella soluzione, creando una struttura a rete su larga scala di tipo gel. Negli esperimenti che seguono, l'albume è sottoposto a stimoli di tipo meccanico e chimico.

2.1.1. *Denaturazione meccanica dell'albume – Neve proteica.* L'albume, agitato energicamente con una frusta, subisce una trasformazione da gel a schiuma. L'energia meccanica porta alla rottura dei legami che stabilizzano le proteine causandone la denaturazione: le parti idrofobiche, ora esposte all'esterno, in presenza delle bolle d'aria inglobate durante la sbattitura, interagiscono con queste piuttosto che con l'acqua. Si crea così una rete proteica che intrappola aria al suo interno. La schiuma è infatti un miscuglio eterogeneo tra un liquido e un gas. Inizialmente la schiuma è leggera ma continuando con la sollecitazione meccanica raggiunge una consistenza densa e stabile. Infatti, le prime bolle facilitano l'inserimento di nuova aria e l'effetto meccanico promuove la denaturazione di nuove proteine che disperdono più finemente e meglio l'aria inglobata rendendo più voluminosa e stabile la schiuma (figura 2).



Figura 2
Albumi montati a neve

2.1.2. *Denaturazione chimica dell'albumina – Albuma ubriaco*. Una “cottura” poco comune, ma di facile realizzazione, è quella che si ottiene con l'alcol. Se si aggiunge dell'alcol etilico all'albumina di un uovo, mescolando il composto dopo qualche minuto si osserva un cambiamento di colore e consistenza. L'aspetto ricorda quello del bianco d'uovo cotto sul fornello. L'alcol aggiunto all'albumina altera l'ambiente intorno alle proteine causandone un cambiamento conformazionale. L'alcol infatti offre alle porzioni idrofobiche, precedentemente nascoste all'acqua, la possibilità di nuove interazioni. Le proteine si srotolano e interagiscono tra loro formando una rete che intrappola parte del solvente (figura 3).



Figura 3
Albumi “cotti” in alcol

2.2

Il latte (figura 4) è costituito all'87% circa di acqua in cui sono disciolte proteine di vario tipo, insieme a grassi, vitamine e sali minerali. È possibile distinguere due tipi di proteine: le caseine, che costituiscono l'80% della componente proteica e le sieroproteine il rimanente 20%.

Le caseine (α , β , γ e κ) sono ricche di proline e serine, ma prive di cisteine. Si organizzano per interazioni di natura idrofobica in micelle cariche negativamente, che contengono calcio. Le micelle sono strutture globulari che si formano in ambiente acquoso dall'aggregazione di molecole aventi una parte idrofila e una parte idrofobica. Le parti idrofobiche della catena interagiscono tra loro

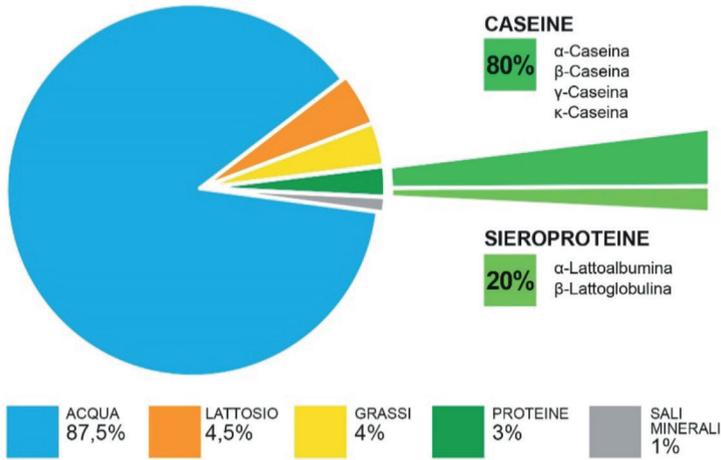


Figura 4
Composizione del latte

all'interno dell'aggregato mentre quelle idrofile vengono esposte all'esterno e interagiscono col solvente. Le micelle di caseina hanno dimensioni di centinaia di nanometri e risultano rivestite dalla componente κ che forma delle ciglia sulla superficie esterna e le rende stabili in soluzione (figura 5). Le micelle non tendono a coagulare per effetto della temperatura.

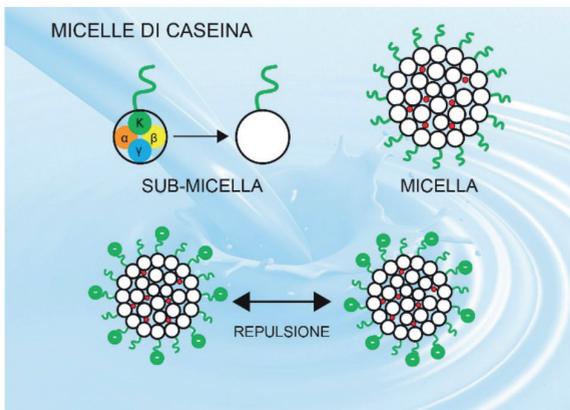


Figura 5
Struttura delle micelle di caseina

Le *sieroproteine* invece sono ricche di cisteine e legami tra coppie di cisteine, detti ponti zolfo. In condizioni native sono globulari e denaturano per effetto

La biofisica a tavola con uova, ricotta e formaggio

termico. Le principali componenti sono la α -lattoalbumina e la β -lattoglobulina (figura 6).

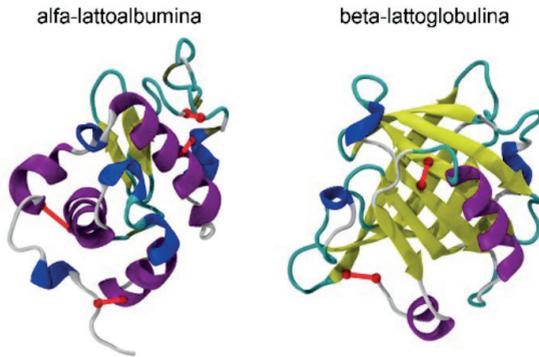


Figura 6
Struttura globulare
delle sieroproteine

Sul latte proponiamo due esperimenti, la preparazione del formaggio e della ricotta. Nel primo, la coagulazione delle caseine porta alla cagliata; nel secondo, le sieroproteine denaturando per effetto termico creano la caratteristica struttura della ricotta.

2.2.1. *Aggregazione delle caseine o caseificazione: acida e chimica* (figura 7). La coagulazione acida avviene con l'aggiunta di fermenti lattici che acidificano il lattosio e portano il pH a 4.6, punto isoelettrico della caseina; le micelle pertanto



Figura 7
Schema per
la caseificazione

coagulano e i minerali diventano solubili. La cagliata è poco compatta, adatta a formaggi morbidi. La coagulazione chimica avviene con l'aggiunta del caglio, contenente la chimosina, enzima che taglia le ciglia cariche della κ caseina, ottenendo un effetto destabilizzante sulle micelle con conseguente aggregazione. In questo caso si ottiene una cagliata tenace, adatta a formaggi a pasta dura (figura 8).

Prepariamo il formaggio: la cagliata

Ingredienti:

Latte fresco pastorizzato e caglio

- Scaldare 2L di latte fino a 37°C
- A fuoco spento, aggiungere 8g di caglio
- Coprire e lasciare riposare 1h fino alla comparsa della cagliata che sarà compatta e gelatinosa
- Rompere delicatamente la cagliata in piccoli frammenti, aumentando la superficie attraverso cui il siero fuoriesce, aggiungere qualche mestolo di acqua calda, mescolando sempre per far precipitare la cagliata
- Togliere tutto il siero e premere la massa con le mani per agevolare lo spurgo e compattarla, raccogliere nell'apposita "fascella" la parte aggregata
- Rimettere l'intera forma nel siero bollente per 15' per ottenere un formaggio ancora più compatto e asciutto di circa 250g.



Figura 8

Preparazione del formaggio con l'uso del caglio

2.2.2. *La ricotta: aggregazione termica del siero.* Dopo la preparazione del formaggio il siero è privo di gran parte delle caseine. Le sieroproteine denaturano sopra i 60°C, esponendo cisteine libere e ponti zolfo intramolecolari. Le cisteine agiscono come pinzette capaci di agganciarsi tra loro, tramite i ponti zolfo, contribuendo fortemente alla struttura proteica e alla sua stabilità. L'avvicinamento di due proteine per effetto dei moti diffusivi di natura termica, può portare casualmente all'incontro tra questi gruppi di atomi e all'eventuale creazione di nuovi ponti zolfo intermolecolari. L'aggiunta di latte fresco al siero riscaldato arricchisce la componente proteica presente. Anche le micelle di caseine partecipano così alla formazione della struttura proteica, creata dai

La biofisica a tavola con uova, ricotta e formaggio

legami interproteici tra le sieroproteine (figura 9). L'aggiunta di limone e sale facilita la coagulazione. L'innalzamento ulteriore della temperatura fino a 90 °C e il mescolamento favorisce la formazione di bolle d'aria che vengono inglobate nel reticolo determinando l'affioramento del fiocco proteico (figura 10).

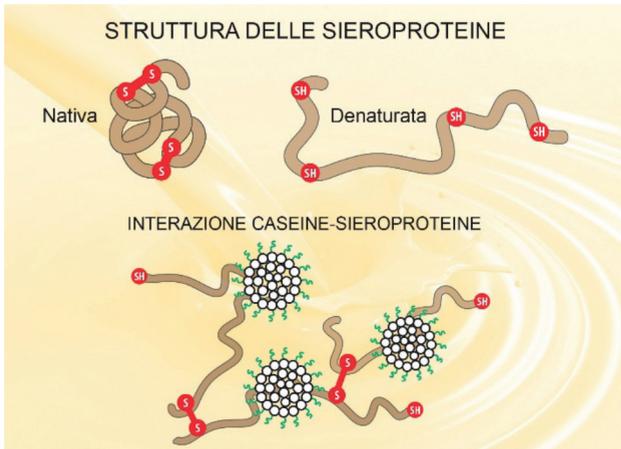


Figura 9
Meccanismo di aggregazione
tra sieroproteine e
arricchimento con caseine

Prepariamo la ricotta: ricuciamo il siero

Ingredienti:

Siero, latte fresco pastorizzato, sale e limone

- Filtrare e scaldare fino alla temperatura di 60°C il siero, ottenuto dai 2L di latte usati per la precedente preparazione del formaggio
- Aggiungere il latte tiepido (1/5), un cucchiaino di sale e, qualche goccia di limone per catalizzare la coagulazione
- Mescolare continuamente e delicatamente, sempre dal basso verso l'alto per inglobare aria e evitare che i flocculi in formazione si attacchino sul fondo
- Raggiunta la temperatura di circa 90°C, la ricotta comincia ad affiorare, quindi abbassare la fiamma del fornello
- Quando la ricotta è tutta in superficie in abbondanza, raccoglierla con la schiumarola nella "fascella".



Figura 10
Preparazione della ricotta

3. Misura dell'effetto degli stimoli

I cambiamenti di stato legati ai fenomeni di denaturazione-aggregazione proteica descritti nei nostri esperimenti sono associati a significative modificazioni facilmente osservabili. Ci sono però casi in cui è importante studiare processi analoghi anche in assenza di una fenomenologia macroscopica. Pensiamo ad esempio alla formazione di oligomeri proteici di tipo amiloide, specie di decine di nanometri, che, come già accennato, risultano tossici per i neuroni. Sarebbe molto utile riuscire a osservare il fenomeno in laboratorio, per comprenderlo al meglio. È qui che entra in gioco la fisica e in particolare l'insieme di fenomeni che si verificano quando la luce interagisce con le particelle di materia. Lo *scattering* è uno di questi, e si ha quando la luce interagendo con le particelle in sospensione viene diffusa in tutte le direzioni.

A tutti sarà capitato di osservare il pulviscolo quando un raggio di luce entra da una finestra socchiusa. Vediamo bene i granelli di polvere proprio perché diffondono la luce in ogni direzione.

Poiché l'intensità diffusa dipende dalla massa delle particelle, lo *scattering* è una tecnica ideale per monitorare un processo di crescita come è l'aggregazione. Inoltre dalla distribuzione dell'intensità ai diversi angoli si ottengono informazioni medie sull'evoluzione della forma delle specie presenti in soluzione (Johnson *et al.* 1995). La figura 11 mostra come la luce viene diffusa molto più intensamente dalla provetta con le particelle di dimensioni maggiori.

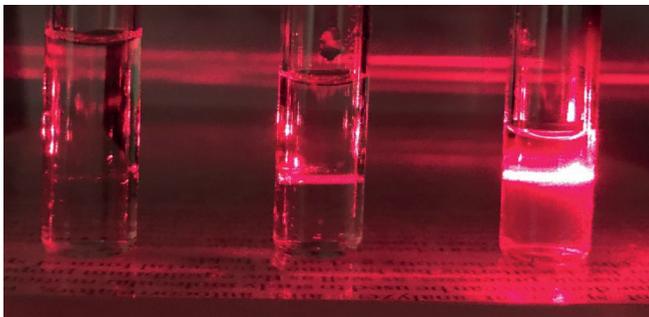


Figura 11

Un raggio laser attraversa in successione da sinistra una provetta con acqua pura, una sospensione di particelle di 0,7 micron e, in egual numero, di particelle di 4,5 micron

La biofisica a tavola con uova, ricotta e formaggio

È grazie a queste proprietà che si riesce a caratterizzare processi di aggregazione di peptidi e proteine coinvolti in severe malattie neurodegenerative (Carrotta *et al.* 2005).

4. Esperimenti Computazionali Interattivi

La spiegazione delle esperienze sopra descritte richiede principi generali che poggiano su meccanismi a livello molecolare. Nelle nostre esperienze divulgative l'utilizzo di una piattaforma di simulazione ci ha aiutato a far comprendere questi meccanismi alla base degli esperimenti sopra descritti. Tra le diverse piattaforme software disponibili per lo sviluppo di modelli bi- e tri-dimensionali che permettono un'interfaccia intuitiva con il sistema (aggiunta di molecole, modifica delle loro proprietà, variazione della temperatura) abbiamo utilizzato il *free package* Molecular Workbench (<http://mw.concord.org/modeler/index.html>), sviluppato da un consorzio di università americane e scritto in Java.

I modelli impiegati sono volti a illustrare l'importanza delle interazioni tra molecole nella materia liquida (figura 12) e, grazie all'introduzione di potenziali efficaci, il ruolo del solvente in fenomeni come il *fold*ing delle catene peptidiche o la formazione di micelle (figura 13).

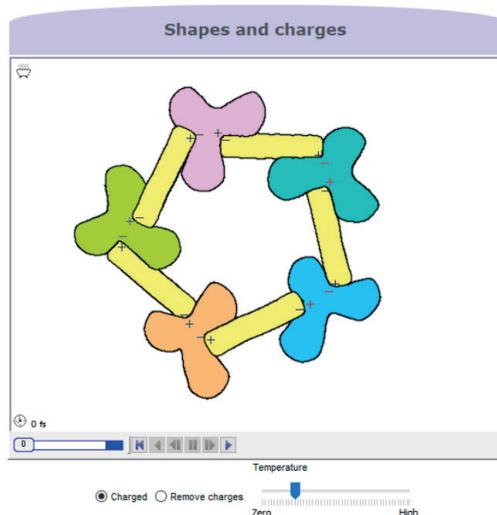


Figura 12
Interazioni elettrostatiche intermolecolari

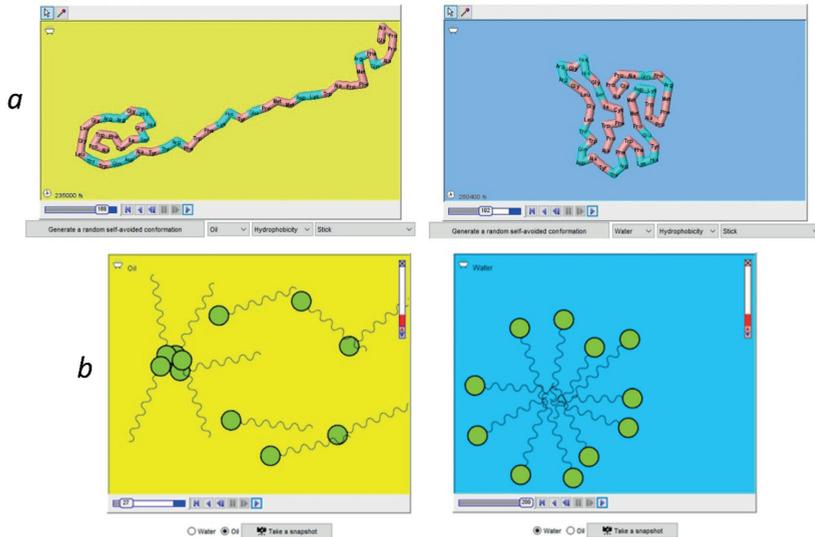


Figura 13

Ruolo del solvente. *Folding* (a) e formazione di micelle (b) in acqua e in olio

5. Conclusioni

Le esperienze divulgative qui riportate mostrano come dall'osservazione di fenomeni quotidiani può nascere una profonda comprensione di problematiche scientifiche di grande attualità.

Inoltre, l'uso di modelli interattivi permette di evidenziare giocosamente concetti profondi come l'intreccio tra processi deterministici e caos termico o la formazione spontanea di motivi complessi da componenti elementari.

Riferimenti bibliografici

- Carrotta R., Manno M., Bulone D., Martorana V., San Biagio P.L. (2005), *Protofibril Formation of Amyloid b-Protein at Low pH via a Non-cooperative Elongation Mechanism*, «J Biol Chem», 280, pp. 30001-30008.
- Chiti F., Dobson C.M. (2017), *Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade*, «Annual Review of Biochemistry» 86, pp. 27-68.
- Johnson Jr. Ch. S., Gabriel D.A. (1995), *Laser Light Scattering* (Dover Books on Physics), Mineola NY, Dover Publications.