

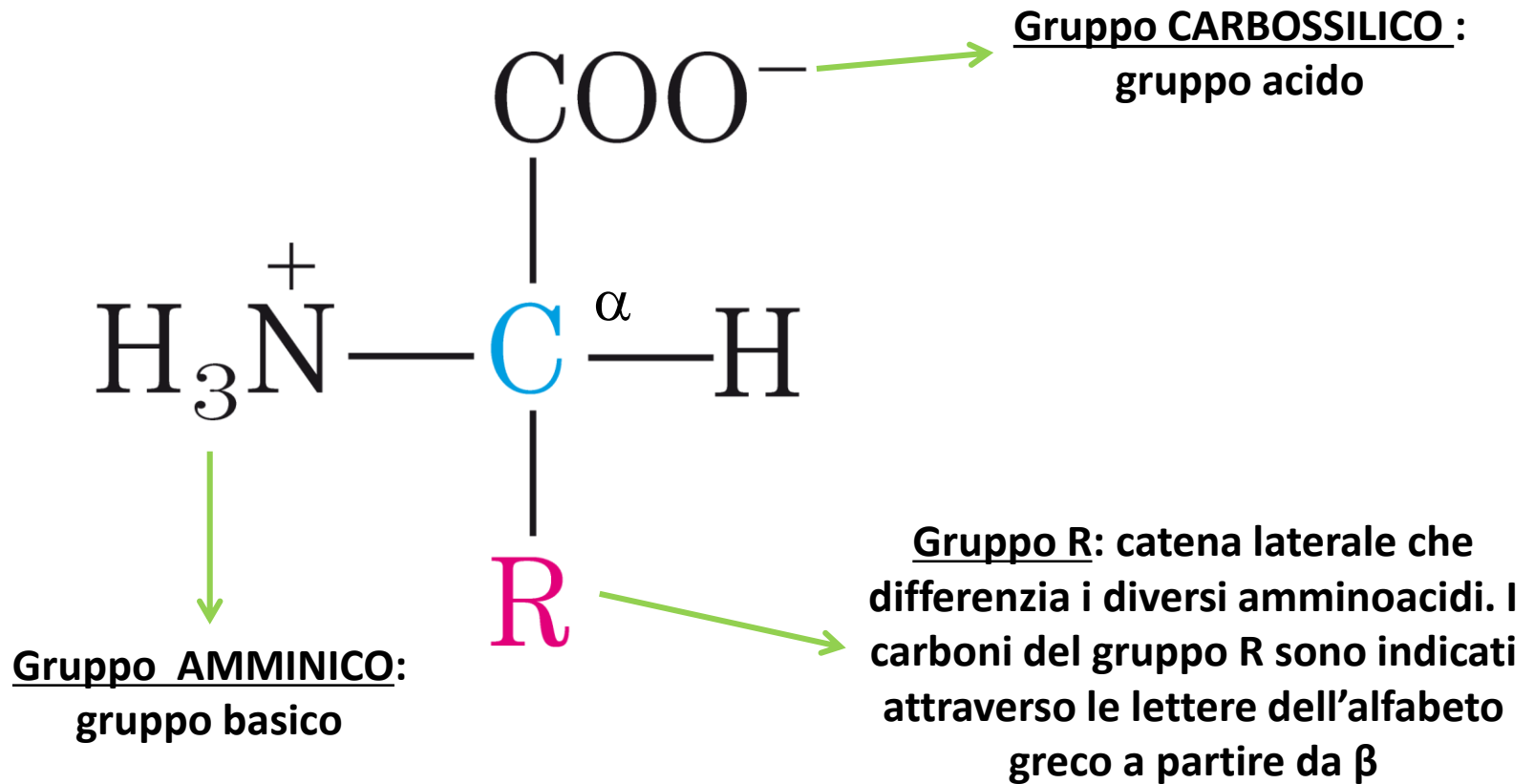
Chitinasi (famiglia PR3)



Proteina dominante nel succo d'uva matura

Proteine
(dal greco *proteius*, che
occupa la prima posizione)

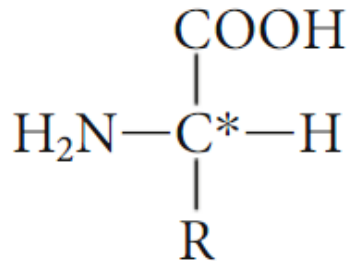
Struttura di un aminoacido



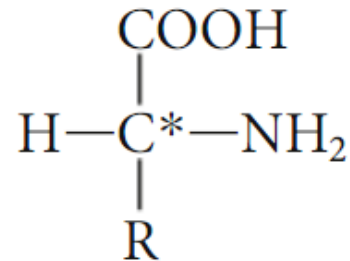
Gli α -amminoacidi delle proteine sono molecole chirali

Ad eccezione della glicina, nella quale $R = H$, tutti gli α -amminoacidi delle proteine mostrano quattro sostituenti diversi legati all'atomo di carbonio α che è quindi un centro stereogenico; la conseguenza è che ogni amminoacido esiste sotto forma di due isomeri ottici diversi (D e L).

Gli α -amminoacidi presenti nelle proteine appartengono sempre alla serie L.



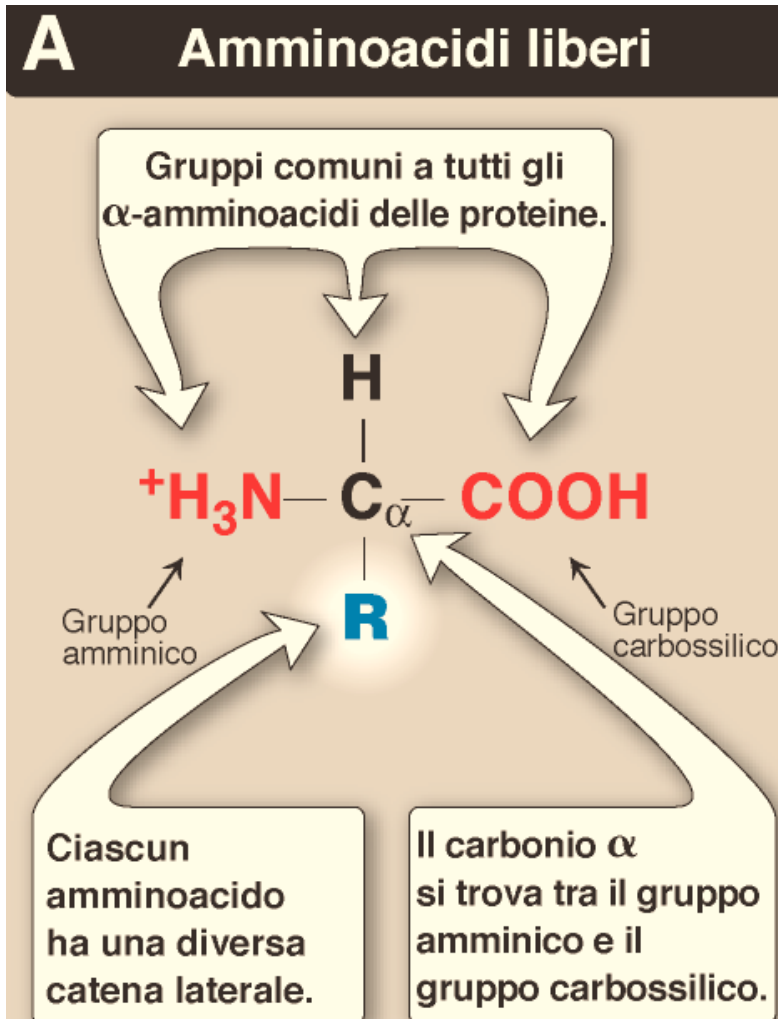
α -L-amminoacido



α -D-amminoacido

GLI AMMINOACIDI

sono classificati in base alla capacità del loro gruppo R di interagire con l'H₂O



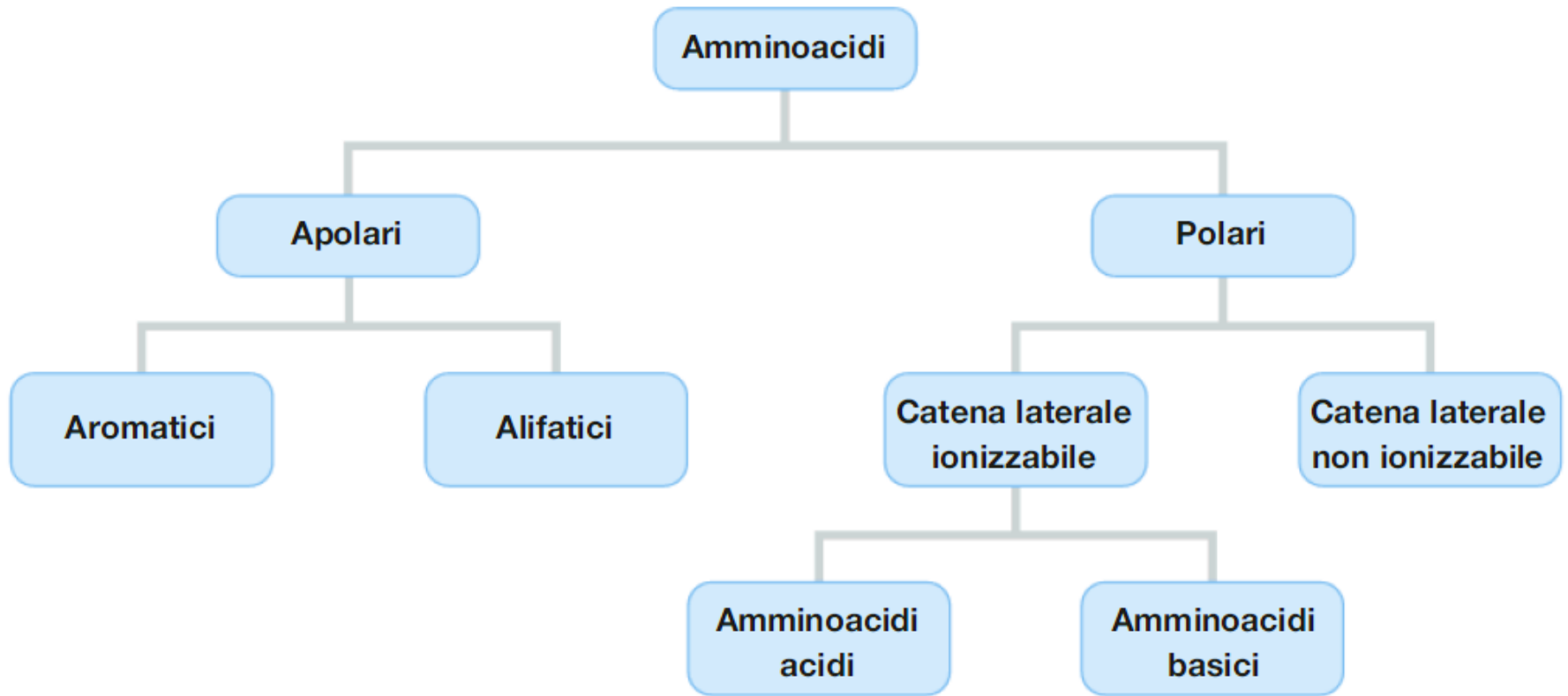
Sono presenti 20 catene laterali diverse che variano per:

- Dimensioni
- Carica
- Capacità di formare legami idrogeno
- Idrofobicità
- Reattività chimica

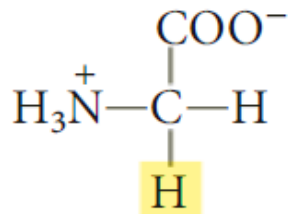
Suddivideremo gli amminoacidi in quattro gruppi in base alle caratteristiche generali dei loro gruppi R:

- Alifatici non polari
- Polari non carichi
- Carichi positivamente (basici)
- Carichi negativamente (acidi)

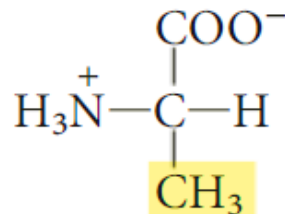
Classificazione degli amminoacidi in funzione delle caratteristiche della loro catena laterale:



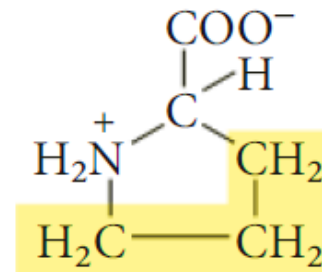
Gruppi R alifatici, apolari



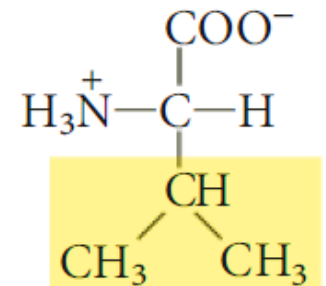
Glicina
Gly (G)



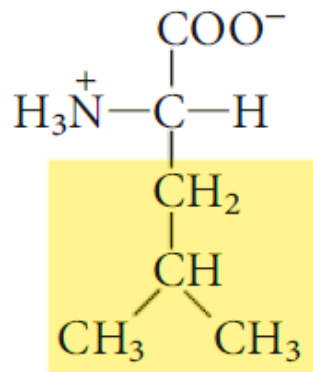
Alanina
Ala (A)



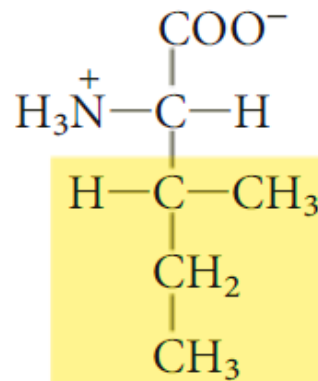
Prolina
Pro (P)



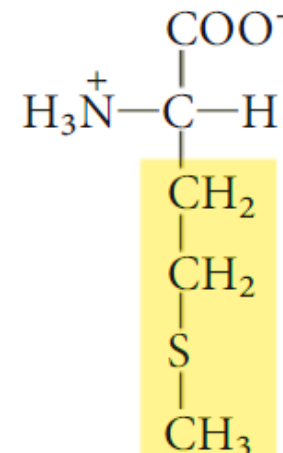
Valina
Val (V)



Leucina
Leu (L)

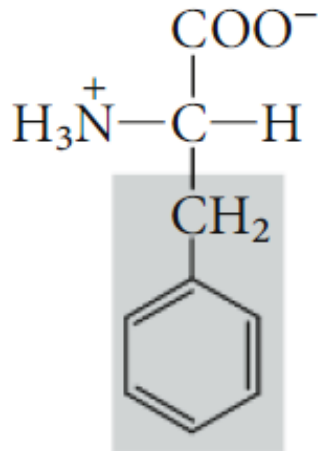


Isoleucina
Ile (I)

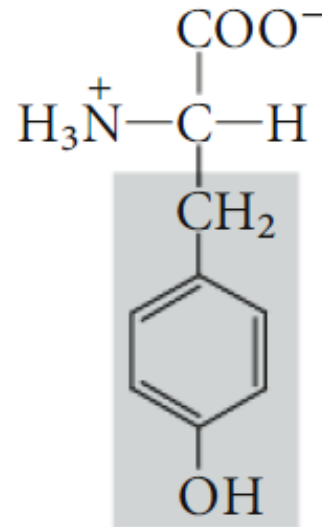


Metionina
Met (M)

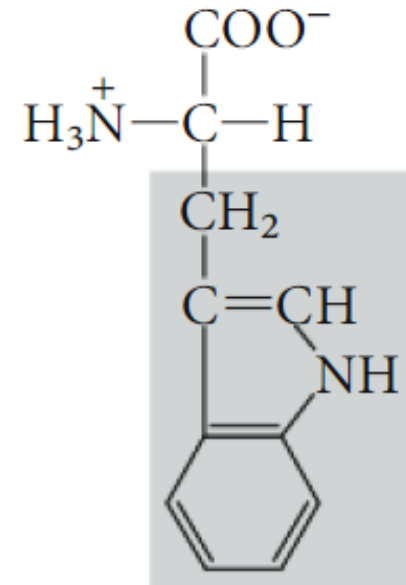
Gruppi R aromatici, apolari



Fenilalanina
Phe (F)

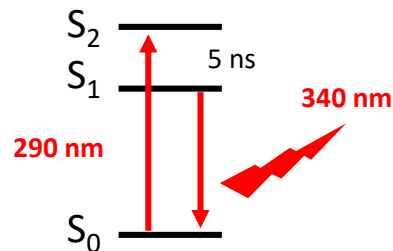
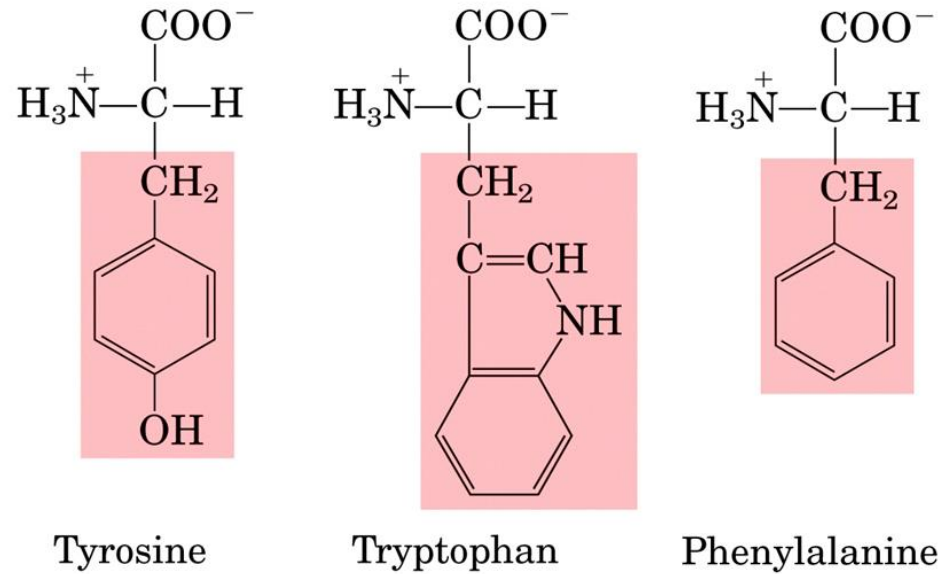
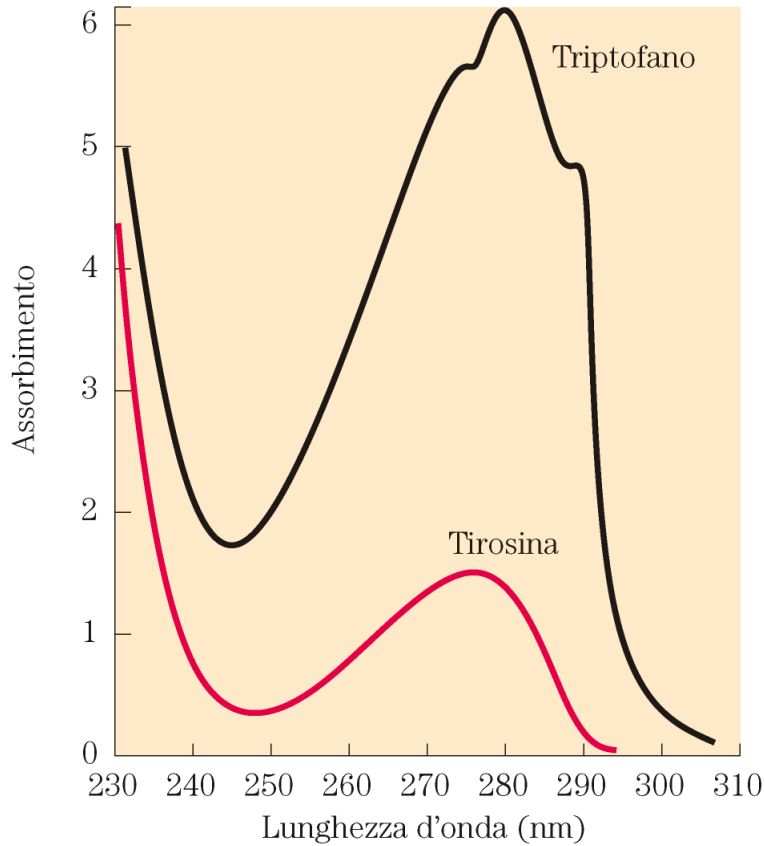


Tirosina
Tyr (Y)



Triptofano
Trp (W)

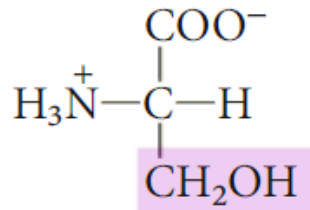
Assorbimento della luce ultravioletta da parte degli amminoacidi aromatici



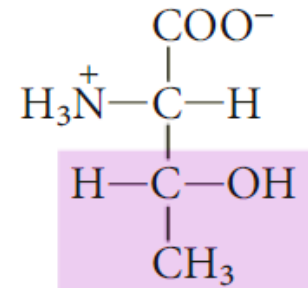
Fluorescenza del triptofano



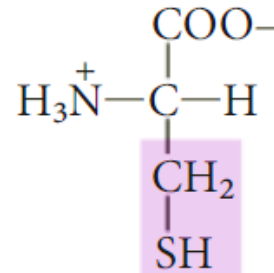
Gruppi R polari, non carichi



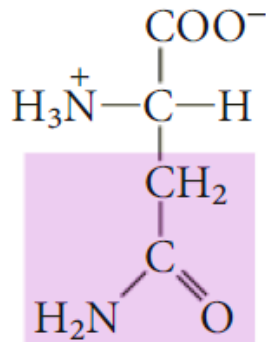
Serina
Ser (S)



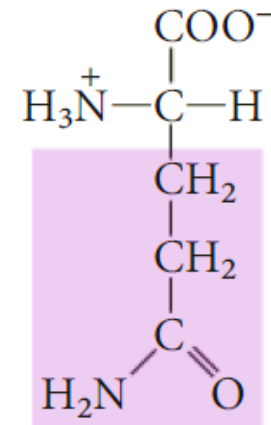
Treonina
Thr (T)



Cisteina
Cys (C)

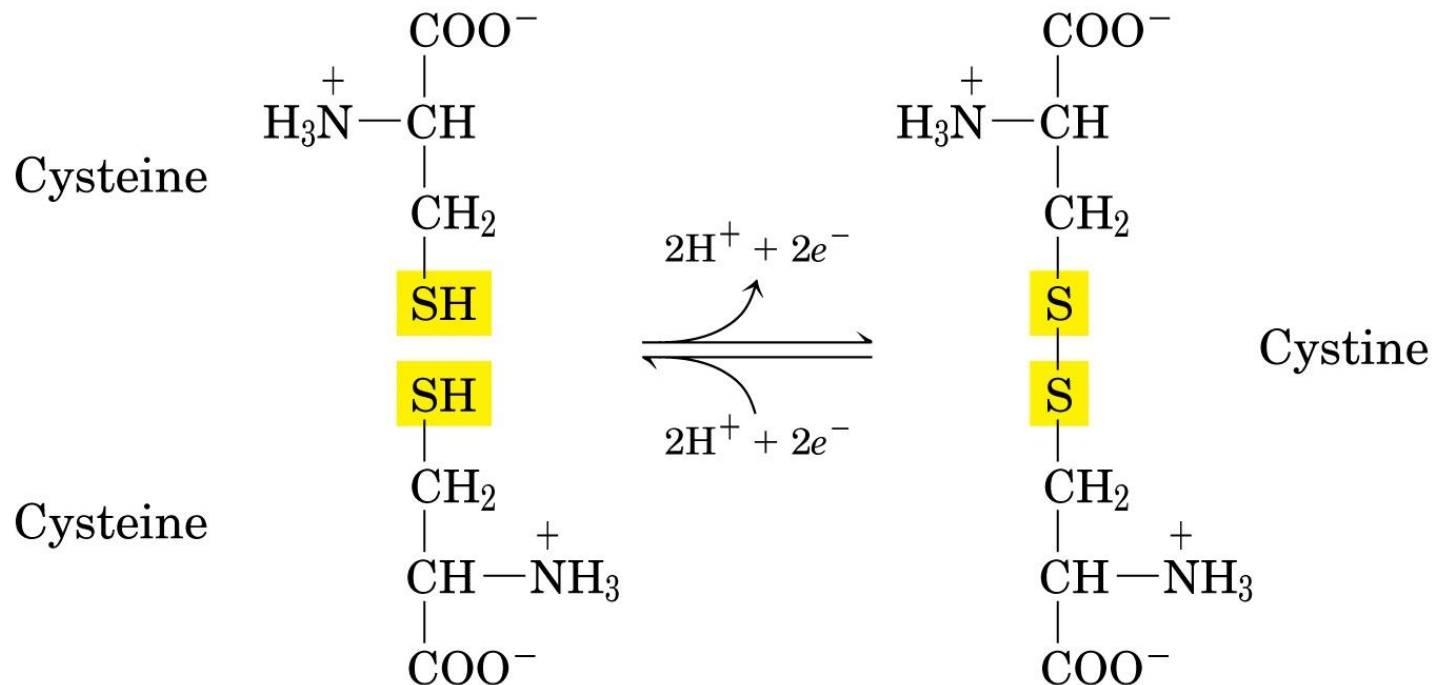


Asparagina
Asn (N)

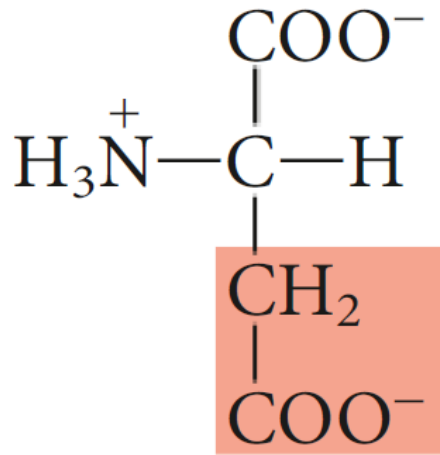


Glutammina
Gln (Q)

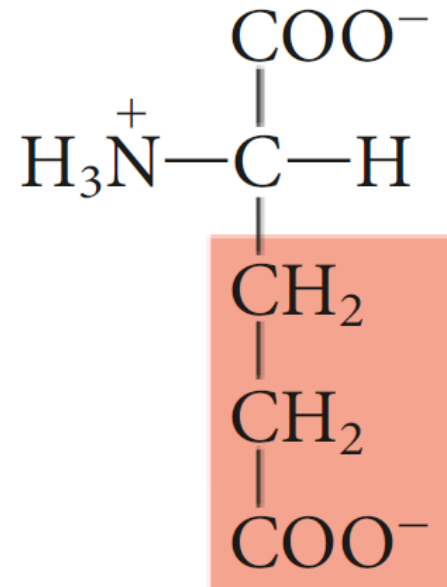
Ossidazione della cisteina



Gruppi R carichi negativamente, acidi

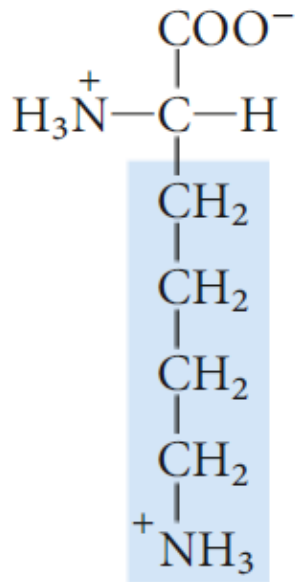


Aspartato
Asp (D)

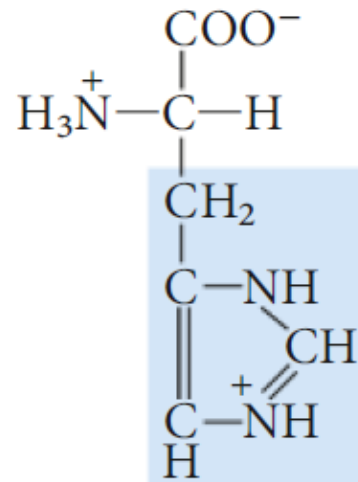


Glutammato
Glu (E)

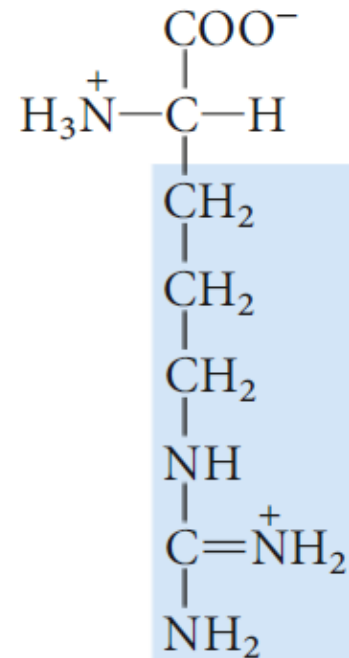
Gruppi R carichi positivamente, basici



Lisina
Lys (K)



Istidina
His (H)



Arginina
Arg (R)

Le proprietà di molte proteine dipendono dalla forma carica o neutra dei residui laterali dell'istidina

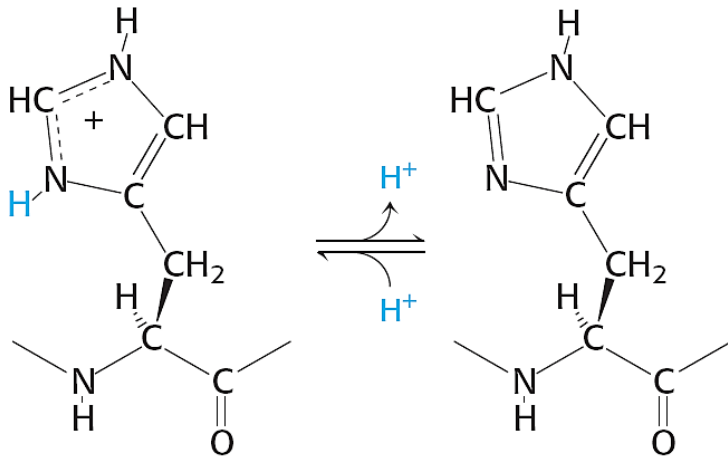


FIGURE 3.15 Histidine ionization. Histidine can bind or release protons near physiological pH.

L'istidina contiene un gruppo imidazolico che vicino al pH fisiologico può prendere o rilasciare protoni:

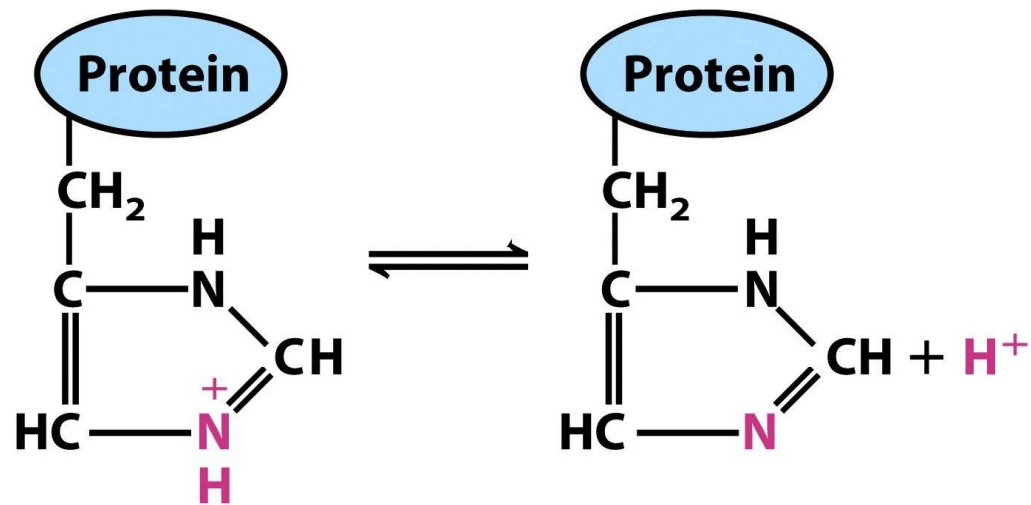
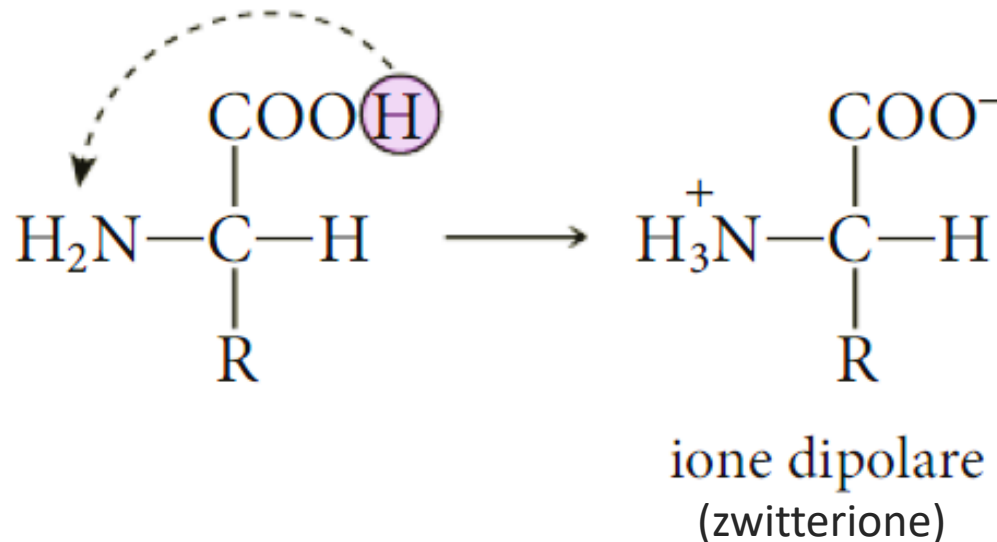


Figure 2-19
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

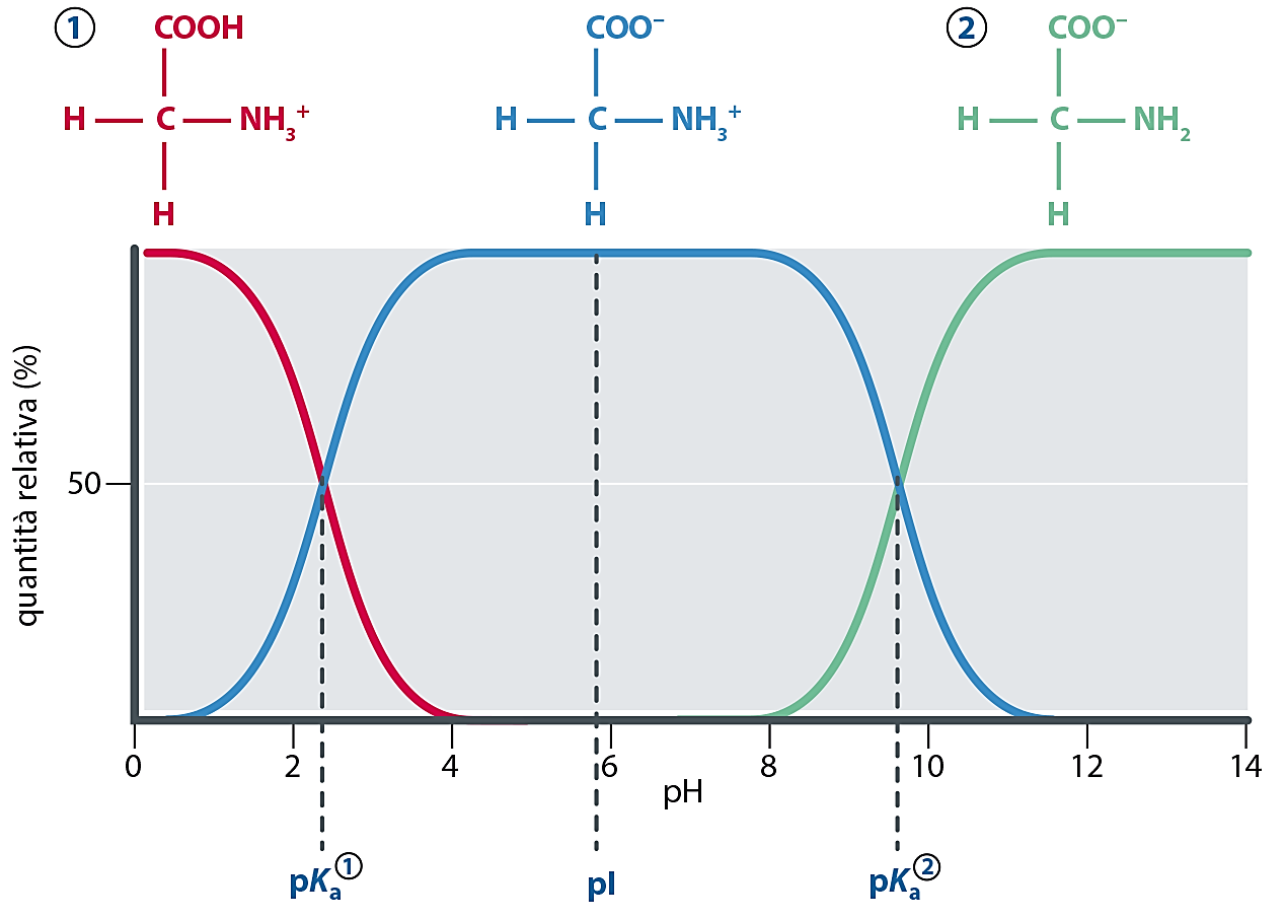
Il comportamento acido-base degli aminoacidi

I gruppi funzionali NH_2 e COOH sono ionizzabili e sensibili al pH dell'ambiente. L'atomo di azoto del gruppo amminico può accettare un protone e trasformarsi in NH_3^+ ; il gruppo carbossilico può cedere un protone e trasformarsi in COO^- .

Al valore di pH fisiologico (7,4) un aminoacido si presenta come ione dipolare (zwitterione) per trasferimento di un protone dal gruppo donatore acido al gruppo accettore basico.



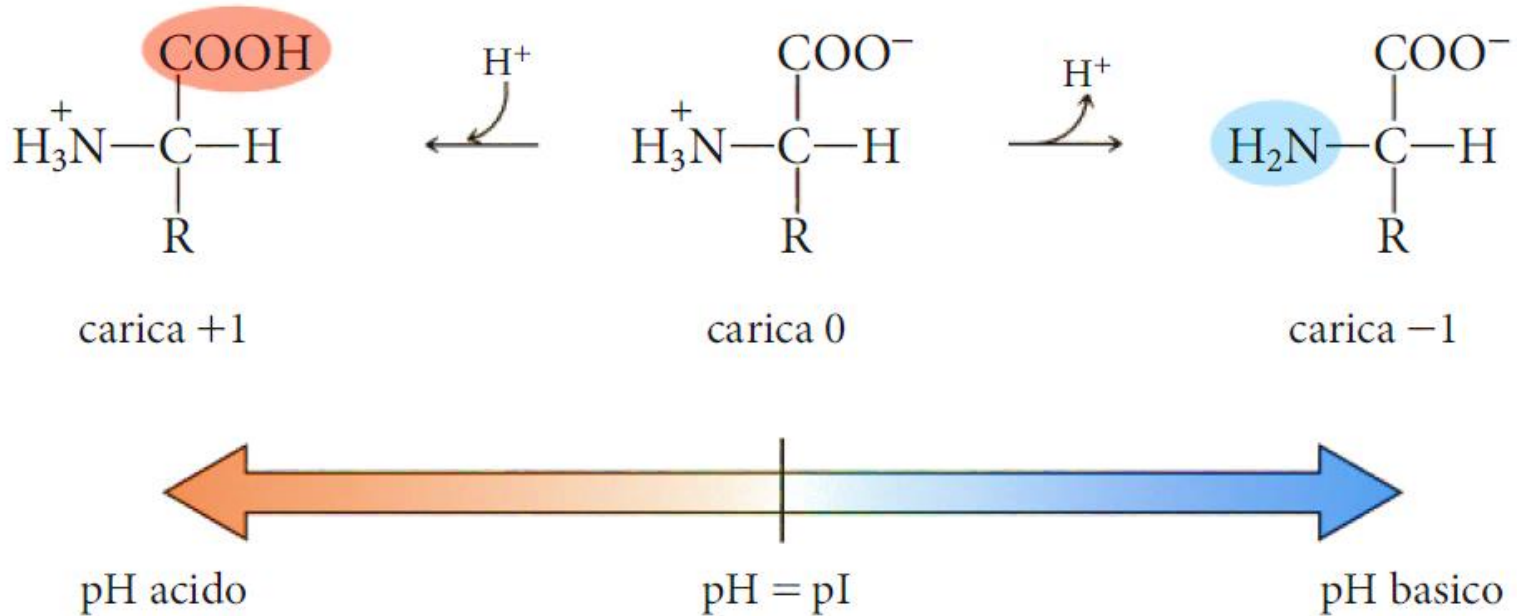
Ionizzazione di un aa a diversi valori di pH



In una **soluzione acida**, il gruppo COO^- accetta uno ione idrogeno e la carica elettrica dell'amminoacido passa **da 0 a +1**

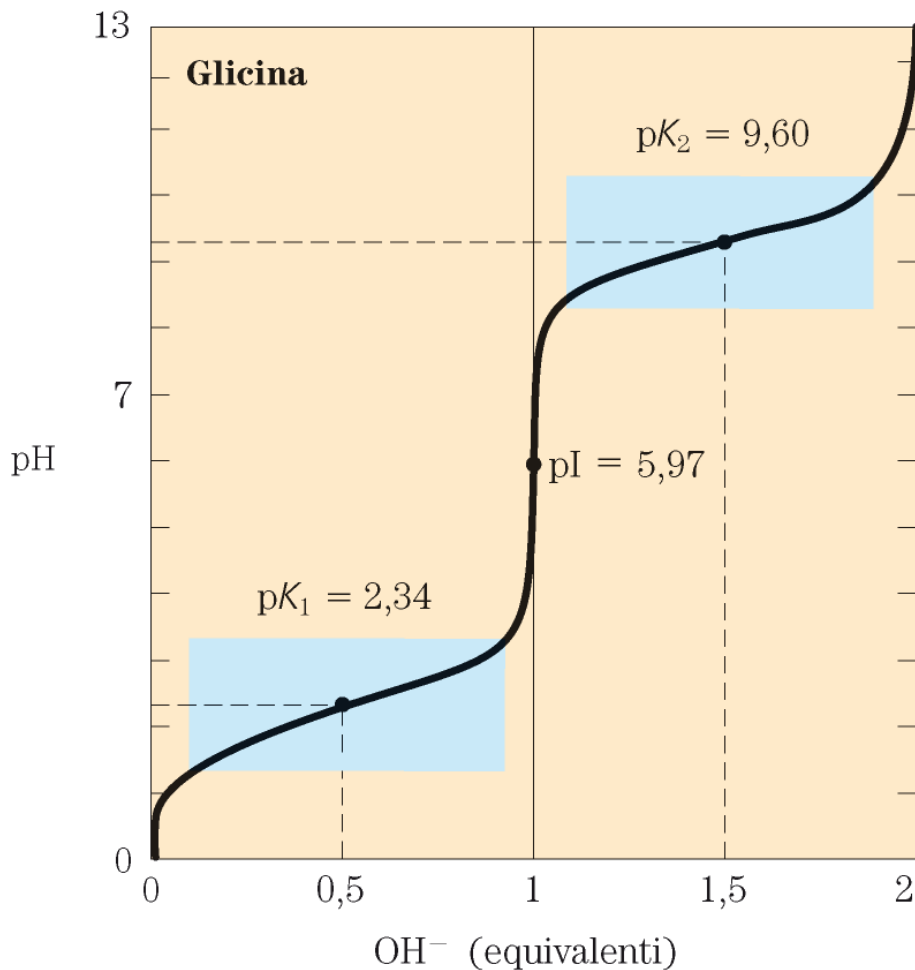
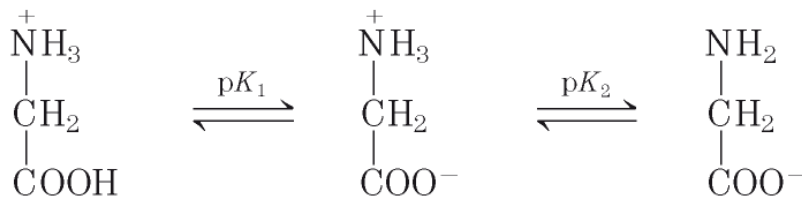
In una **soluzione basica**, il gruppo NH_3^+ cede un protone e la carica elettrica dell'amminoacido passa **da 0 a -1**

A valori di pH acido, un amminoacido presenta la carica positiva del gruppo NH_3^+ e mostra il gruppo COOH nella forma indissociata; a valori di pH basico, al contrario, un amminoacido presenta la carica negativa del gruppo COO^- e mostra il gruppo NH_2 nella forma indissociata.



Ogni amminoacido è caratterizzato da un **punto isoelettrico** (pI) che equivale al valore di pH in corrispondenza del quale l'amminoacido risulta essere elettricamente neutro.

Per la maggior parte degli α -amminoacidi, il punto isoelettrico è prossimo alla neutralità (pH = 7).



Curva di titolazione della glicina indica la reazione di ogni gruppo funzionale con lo ione H

L'equazione di Henderson-Hasselbach descrive la titolazione in ogni suo tratto:
 $\text{pH} = \text{p}K_a + \text{Log} [\text{A}^-]/[\text{AH}]$

Durante la titolazione si ha perdita di 2 H^+ in 2 tappe distinte:
 il pK di ogni tappa è il pH del punto centrale dei corrispondenti flessi

Il pI è il pH a cui la molecola non ha carica elettrica netta e non ha mobilità in un campo elettrico.

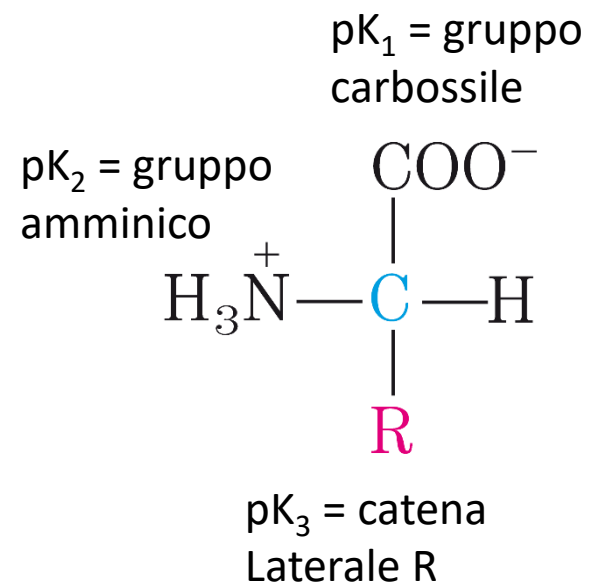
Al pI la molecola non ha potere tamponante

			pK ₁	pK ₂	pK ₃	pI
1	Asp	Acido aspartico	1,88	3,65	9,60	2,8
2	Glu	Acido glutammico	2,19	4,25	9,67	3,2
3	Ala	Alanina	2,34	9,69		6,0
4	Arg	Arginina	2,18	9,09	12,60	10,8
5	Asn	Asparagina	2,02	8,80		5,4
6	Cys	Cisteina	1,71	8,35	10,66	5,0
7	Phe	Fenilalanina	1,83	9,13		5,5
8	Gly	Glicina	2,34	9,60		6,0
9	Gln	Glutammina	2,17	9,13		5,7
10	Ile	Isoleucina	2,36	9,68		6,0
11	His	Istidina	1,80	5,99	9,07	7,5
12	Leu	Leucina	2,36	9,60		6,0
13	Lys	Lisina	2,20	8,90	10,28	9,6
14	Met	Metionina	2,28	9,21		5,7
15	Pro	Prolina	1,99	10,60		6,3
16	Ser	Serina	2,21	9,15		5,7
17	Tyr	Tirosina	2,20	9,11	10,07	5,7
18	Thr	Treonina	2,15	9,12		5,6
19	Trp	Triptofano	2,38	9,39		5,9
20	Val	Valina	2,32	9,62		6,0

dati delle tabelle adattati da:

Food chemistry, H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle - Springer

Physical chemistry of food, Pieter Walstra - Marcel Dekker, Inc.



L'istidina, la lisina e l'arginina sono considerati amminoacidi basici perché le loro catene laterali possiedono un gruppo contenente azoto che può esistere in forma protonata o deprotonata.

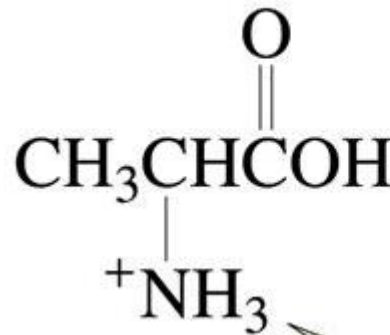
L'acido aspartico e glutammico sono considerati acidi perché hanno nella catena laterale un gruppo carbossilico con un valore di pKa basso

Punto isoelettrico degli amminoacidi

Si definisce punto isoelettrico (pI) il valore del pH al quale la molecola ha carica elettrica netta pari a 0

Per gli amminoacidi neutri, il punto isoelettrico (pI) è rappresentato dalla media dei pKa

$$pI = \frac{(pK_{a1} + pK_{a2})}{2}$$



$$pK_a = 2.34$$

alanine

$$pK_a = 9.69$$

$$pI = \frac{2.34 + 9.69}{2} = \frac{12.03}{2} = 6.02$$

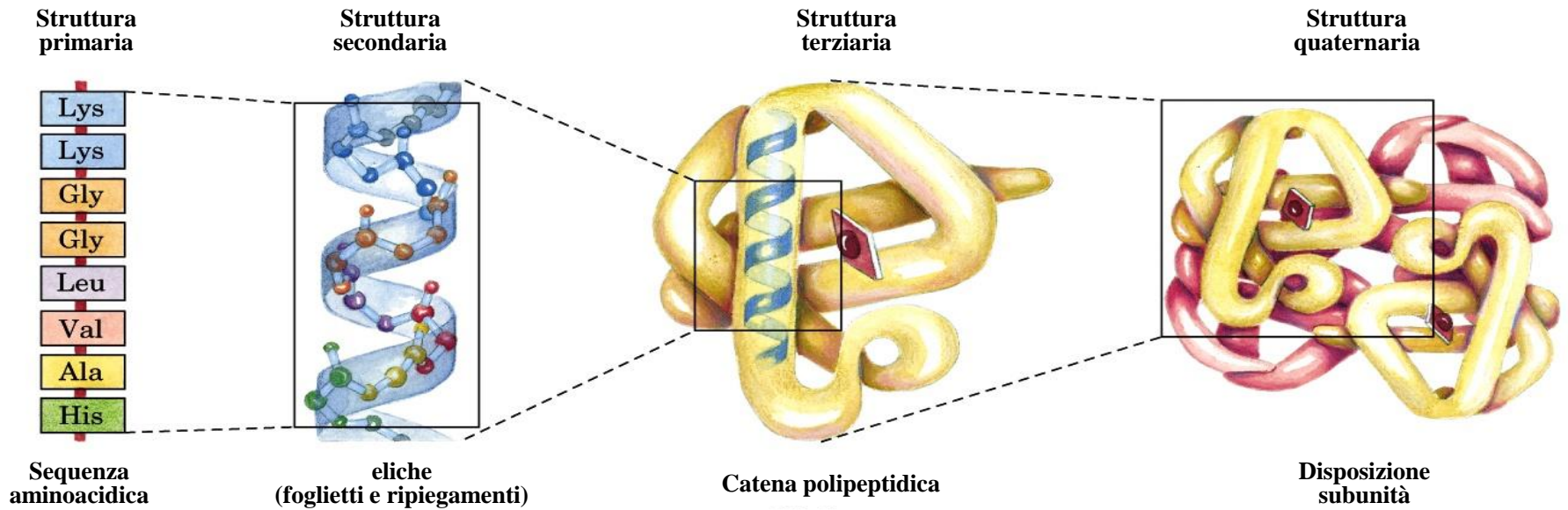
Table 5.2. Survey of ripening in Champagne grape varieties in 1986 (amino acid content expressed in mg/l) (Millery, 1988)

Sample dates	Chardonnay					Pinot Noir				Pinot Meunier		
	September			October		September		October		September		October
	8	16	22	7	8	10	22	2	8	16	22	5
Aspartic acid	44	38	16	41	47	33	18	77	33	31	21	31
Threonine	74	136	134	174	91	127	137	219	111	121	146	172
Serine	158	143	119	283	152	165	143	192	192	206	212	176
Glutamic acid	177	173	128	74	108	179	147	116	174	178	68	103
Glutamine	476	361	154	772	286	429	305	638	810	530	730	660
→ Proline	111	208	187	1123	64	135	147	396	232	365	582	294
Alanine	251	282	248	487	284	338	333	476	325	306	347	539
Citrulline	17	45	32	55	39	47	37	70	16	22	17	68
Valine	36	50	50	106	26	44	46	97	78	70	91	67
Cysteine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methionine	0	11	0	23	0	4	7	14	9	12	18	15
Isoleucine	17	39	38	97	6	29	35	84	58	45	72	61
Leucine	20	48	46	98	24	38	43	91	61	55	73	67
Tyrosine	7	14	8	28	12	16	12	21	14	12	19	16
Alanine (β)	0	0	0	38	0	0	0	0	0	0	0	2
Phenylalanine	29	39	35	119	-	25	35	85	90	64	108	55
γ -N-Butyric acid	18	18	42	218	12	20	41	118	14	43	100	191
Ethanolamine	5	11	5	20	5	9	9	1	5	5	8	1
Ornithine	1	18	3	3	1	14	9	14	1	1	1	23
Lysine	1	7	3	5	1	5	5	8	1	1	1	10
Histidine	17	27	22	38	34	24	24	30	34	30	52	31
Arginine	299	813	682	790	392	796	816	1379	393	419	569	1415
Total amino acids	1760	2482	1953	4590	1889	2478	2350	4124	2652	2518	3235	3997

Il tenore degli amminoacidi varia da una vendemmia all'altra da 1 a 4 g/L e costituisce dal 30 al 40% dell'azoto totale. La **prolina** è un amminoacido quantitativamente importante nei mosti e nei vini ma i lieviti non sono in grado di assimilare la prolina, per cui dopo la fermentazione alcolica il contenuto di questo amminoacido nel vino può essere maggiore di quello del mosto di partenza.

LA STRUTTURA DELLE PROTEINE

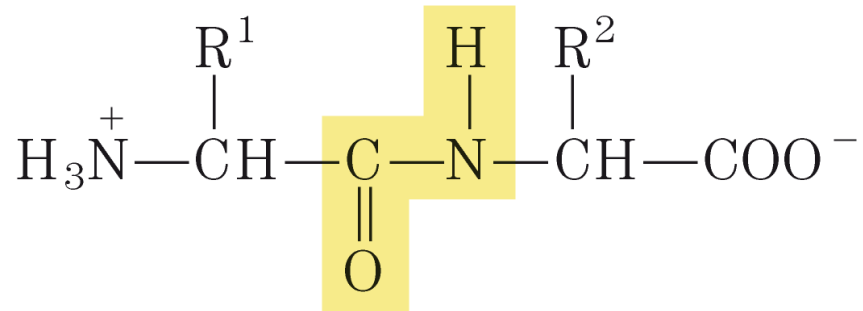
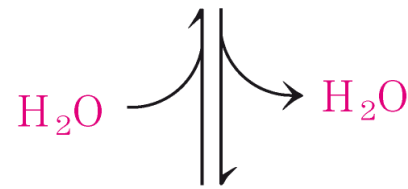
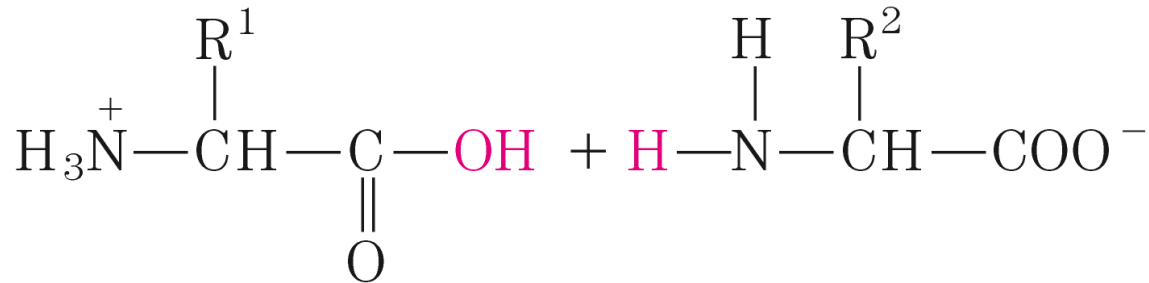
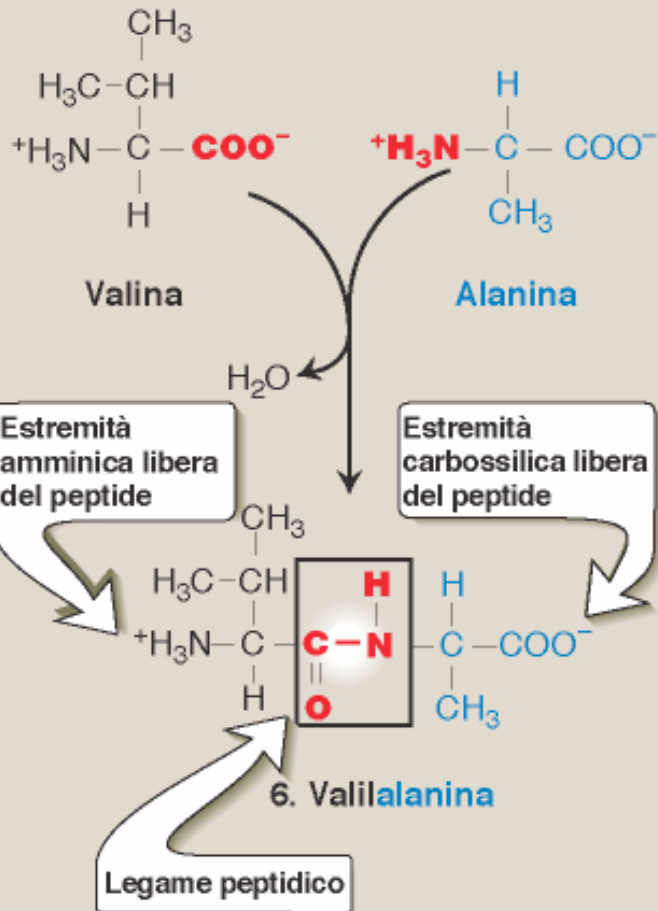
La struttura delle proteine viene suddivisa in quattro livelli di organizzazione:



Formazione di un legame peptidico per condensazione

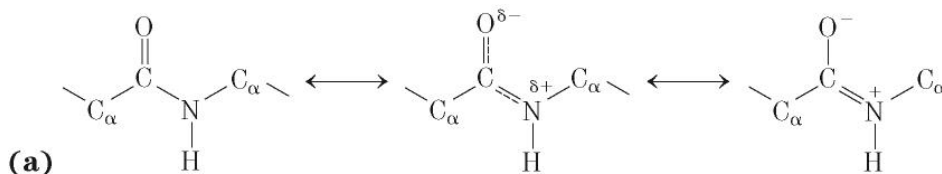
Due molecole di amminoacidi possono unirsi covalentemente mediante un legame ammidico, chiamato LEGAME PEPTIDICO, formando un DIPEPTIDE

A La formazione del legame peptidico

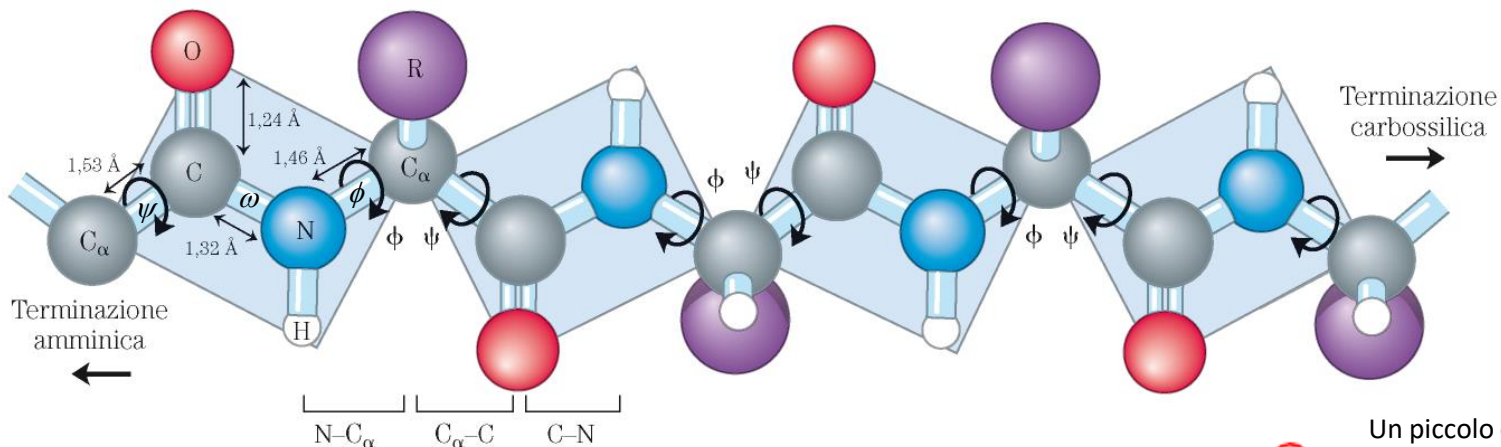


$$\Delta G = 21 \text{ kJ/mol}$$

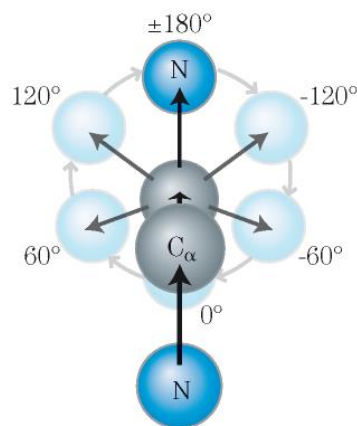
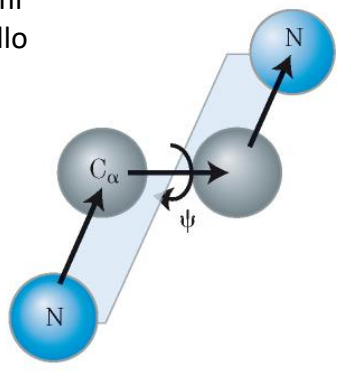
IL LEGAME PEPTIDICO: Struttura planare



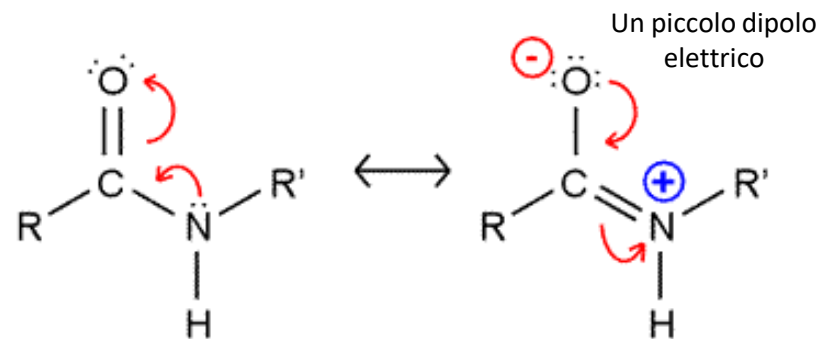
L'ossigeno carbonilico possiede una parziale carica negativa e l'azoto ammidico una parziale carica positiva, generando un piccolo dipolo elettrico. Praticamente tutti i legami peptidici delle proteine hanno la configurazione *trans*;



La conformazione del peptidi è definita da tre angoli di torsione (*phi* ϕ , *psi* ψ e *omega* ω) che riflettono la rotazione intorno a ciascuno dei legami che si ripetono nello scheletro del peptide.



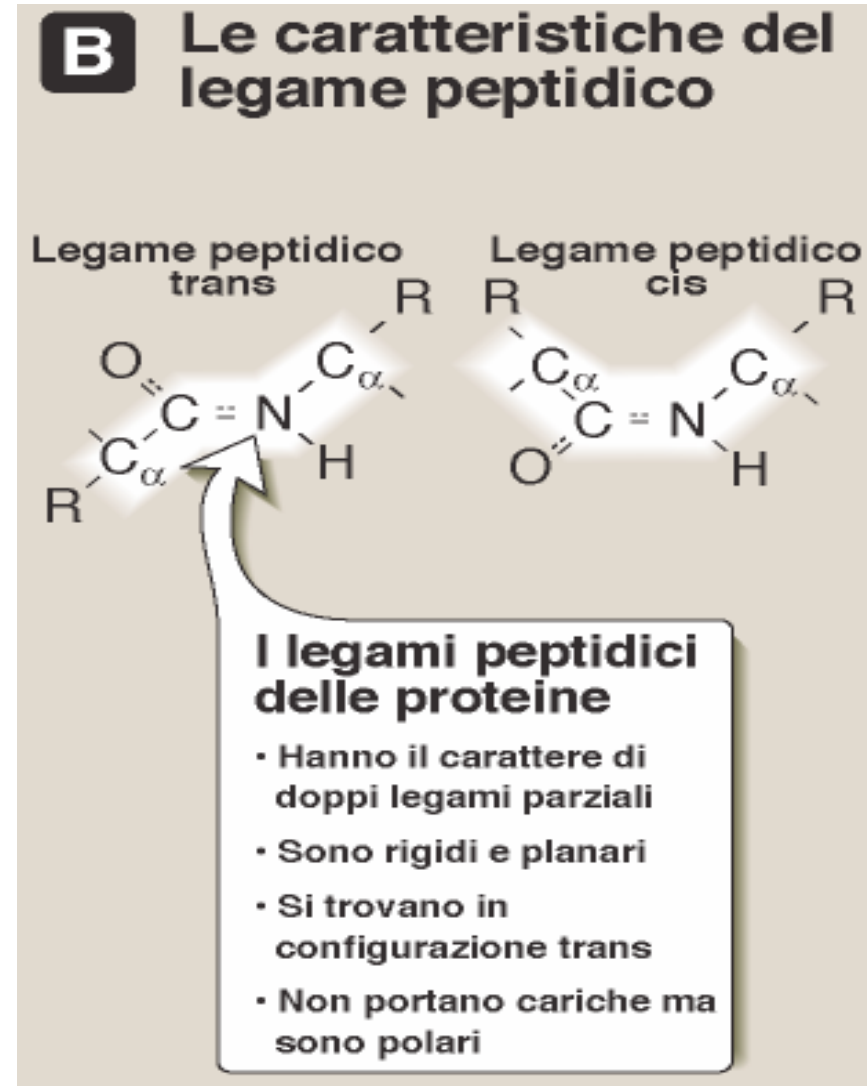
phi e *psi* possono avere qualsiasi valore compreso tra -180° e $+180^\circ$



Struttura rigida planare per le interazioni di risonanza che forniscono al legame peptidico circa il 40% di carattere di doppio legame. La sua lunghezza è di **1,32 Å**, intermedia fra quella di un singolo legame C-N 1,49 Å e di un doppio legame C=N 1,27 Å.

Caratteristiche del legame peptidico

- Ha il carattere di un parziale doppio legame;
- L'ossigeno del gruppo carbonilico e l'idrogeno del gruppo amminico sono disposti, generalmente, in conformazione trans. La conformazione non è casuale, dipende dall'ingombro sterico delle catene laterali;
- È rigido e planare, la rotazione è possibile solo intorno ai legami N-C α (*angolo phi φ*) e C α -C (*angolo psi ψ*). I legami peptidici non si rompono per riscaldamento o concentrazioni elevate di urea. Per idrolizzare questi legami occorrono esposizioni ad acidi o basi forti con temperature elevate;
- I gruppi -C=O e -NH del legame peptidico sono polari ma privi di carica. Partecipano alla formazione di legami a idrogeno nella struttura secondaria della proteina.



Nomenclatura dei polimeri amminoacidici

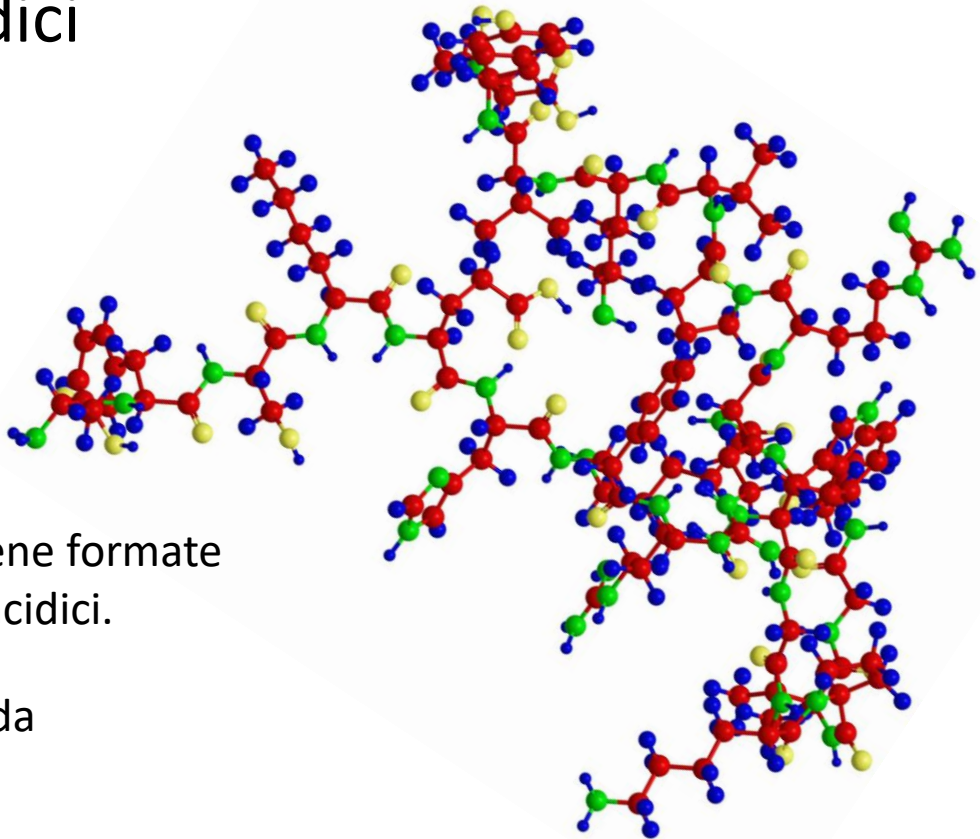
- 2 amminoacidi: **dipeptide**
- 3 amminoacidi: **tripeptide**
- 4 amminoacidi: **tetrapeptide**

Sono chiamati **oligopeptidi** le catene formate da pochi (10-20) residui amminoacidici.

Un **polipeptide** è formato invece da 20-100 residui amminoacidici.

Una catena formata dall'unione di molti amminoacidi (più di 100) prende il nome di **proteina**

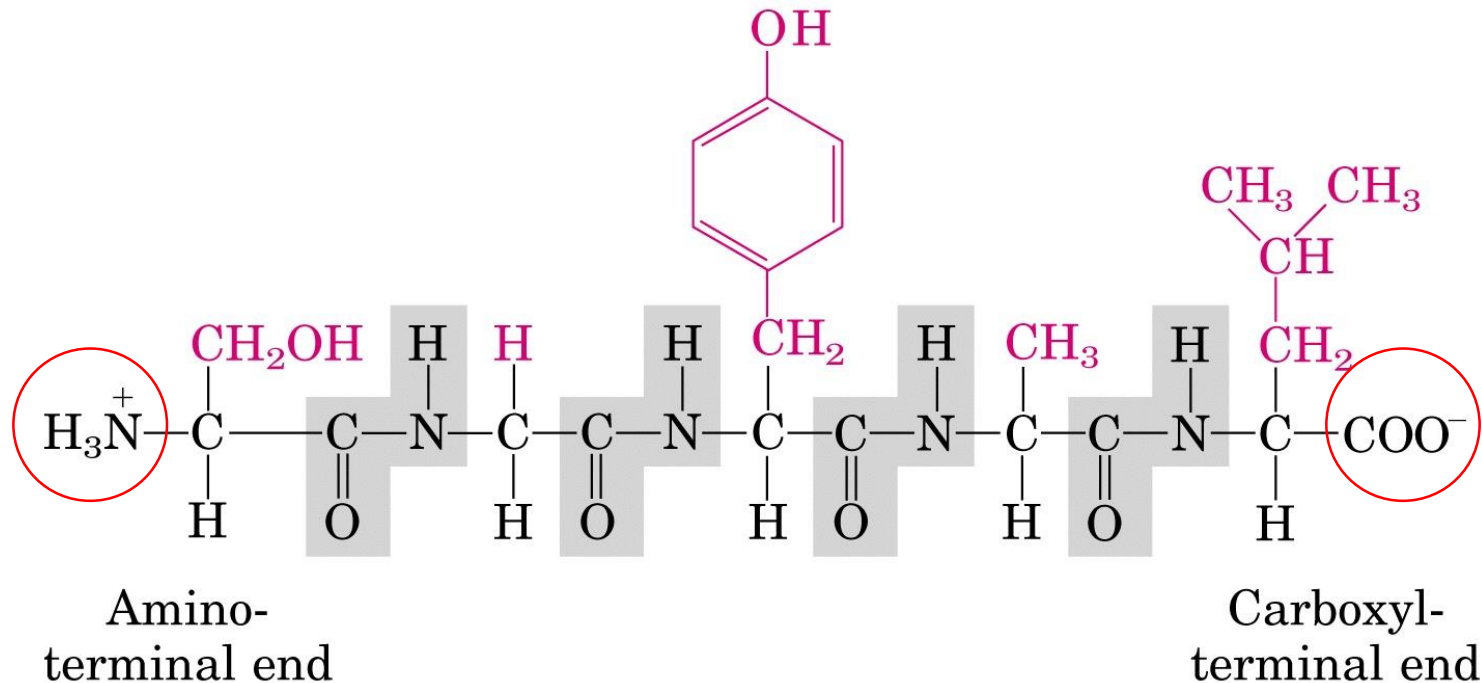
La massa media degli amminoacidi è di 110 Dalton (Da)



Proprietà degli amminoacidi

	pK _a α-COOH	pK _a α-NH ₃ ⁺	pK _a catena lat.	massa (dalton)
Alanina	2.3	9.7	-	71
Arginina	2.2	9.0	12.5	156
Asparagina	2.0	8.8	-	114
Acido aspartico	2.1	9.8	3.9	115
Cisteina	1.8	10.8	8.3	103
Glutamina	2.2	9.1	-	128
Acido glutammico	2.2	9.7	4.2	129
Glicina	2.3	9.6	-	57
Istidina	1.8	9.2	6.0	137
Isoleucina	2.4	9.7	-	113
Leucina	2.4	9.6	-	113
Lisina	2.2	9.0	10.0	128
Metionina	2.3	9.2	-	131
Fenilalanina	1.8	9.1	-	147
Prolina	2.0	10.6	-	97
Serina	2.2	9.2	-	87
Treonina	2.6	10.4	-	101
Triptofano	2.4	9.4	-	186
Tirosina	2.2	9.1	10.1	163
Valina	2.3	9.6	-	99

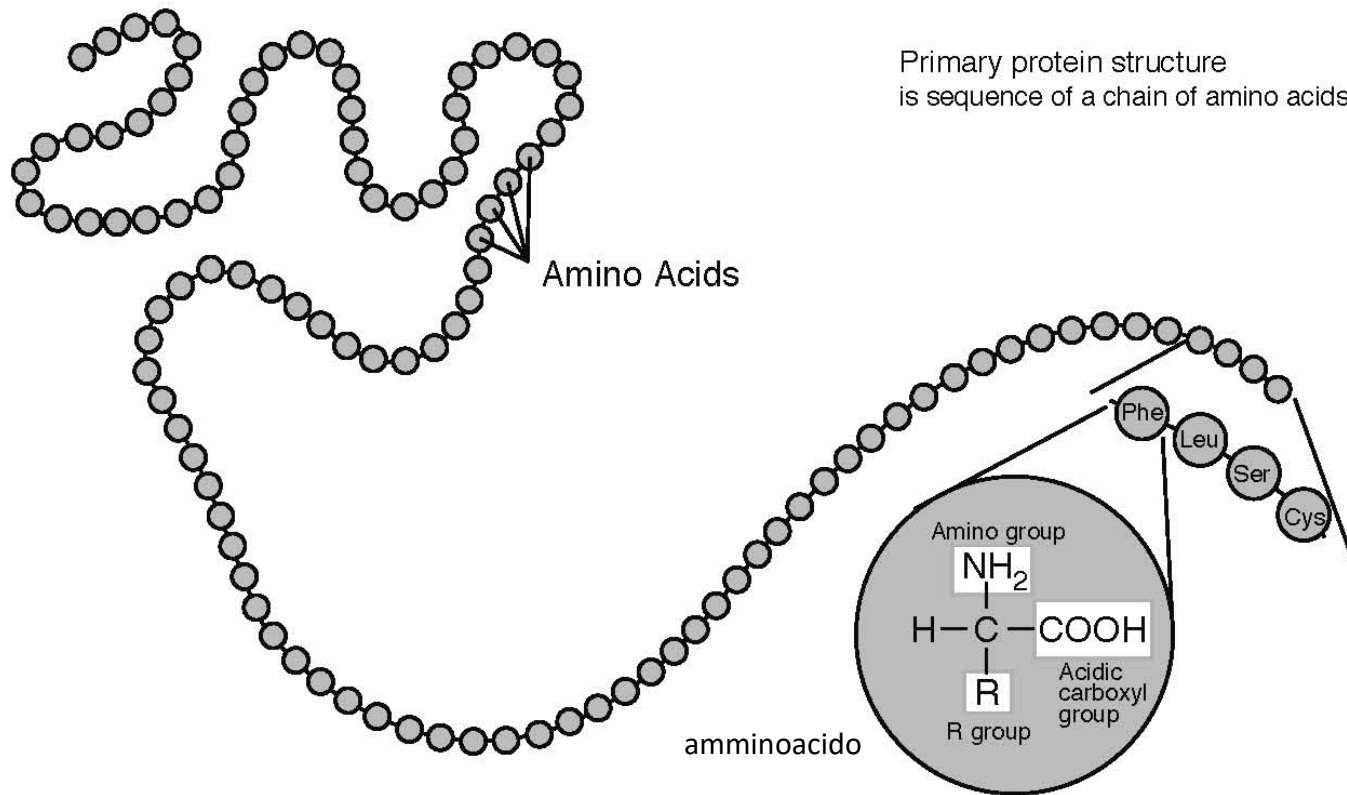
Nel peptide, il residuo amminoacidico con cui termina la catena polipeptidica, viene chiamato residuo AMMINO-TERMINALE (n-terminale), ha il gruppo amminico libero; il residuo all'altra estremità ha un gruppo α -carbossilico libero e viene chiamato residuo CARBOSSI-TERMINALE (C-terminale).



Quando si riporta il grafico di un polipeptide l'estremità ammino-terminale viene posta a sinistra quella carbossi-terminale a destra

LA STRUTTURA DELLE PROTEINE

La struttura primaria è la sequenza amminoacidica di una catena polipeptidica determinata dai legami covalenti ammidici tra gli amminoacidi



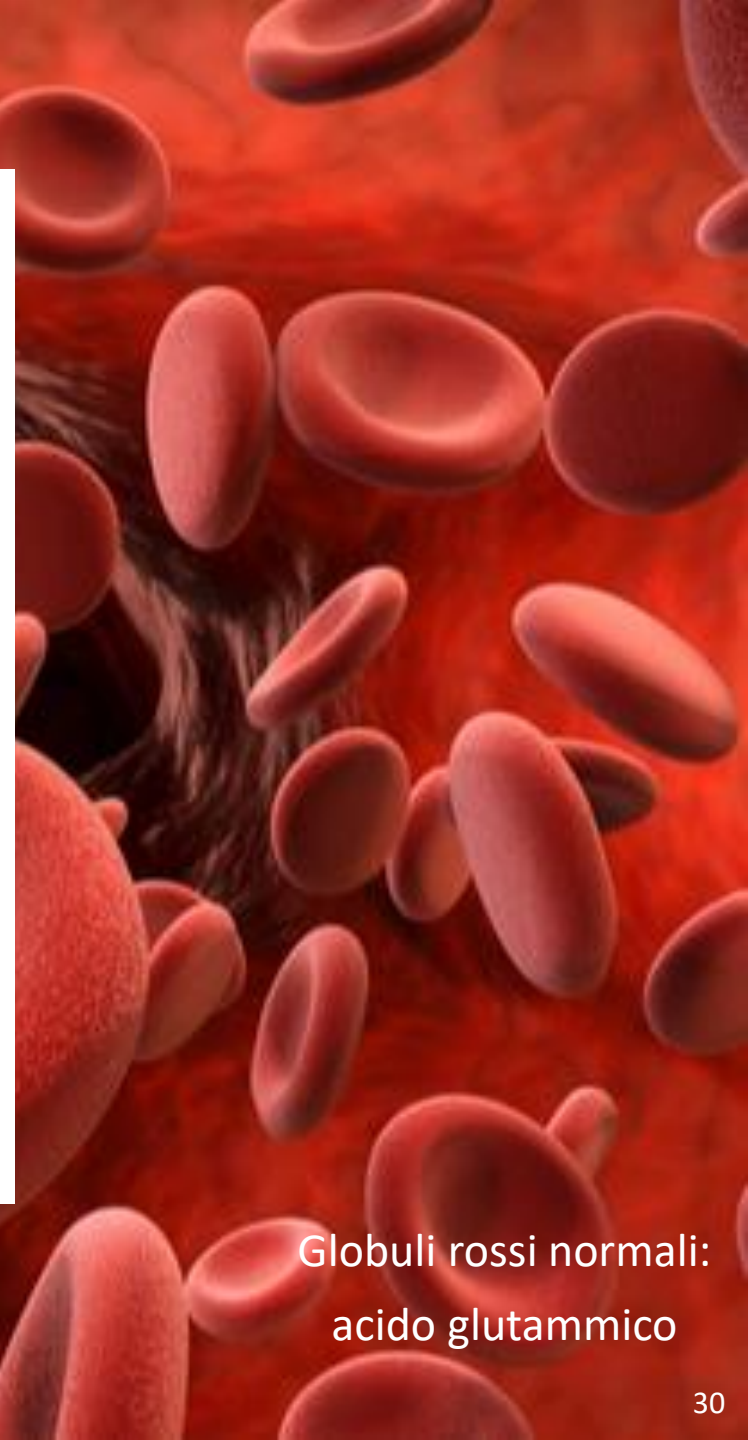
Con le 20 differenti scelte a disposizione si possono costruire un numero elevatissimo di proteine differenti.

Una proteina composta da n residui le possibili sequenze sono 20^n

Proteina di 100 a.a. $\longrightarrow 20^{100} \approx 1,27 \times 10^{130}$



Globuli rossi nella
anemia a cellule
falciforme: valina



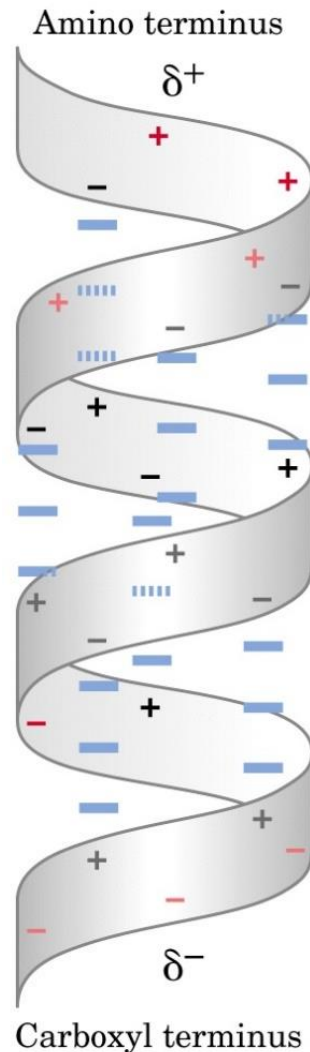
Globuli rossi normali:
acido glutammico

La disposizione spaziale degli atomi di una proteina è detta CONFORMAZIONE, ovvero tutte le strutture che la proteina può assumere senza rottura di legami covalenti

STRUTTURA SECONDARIA

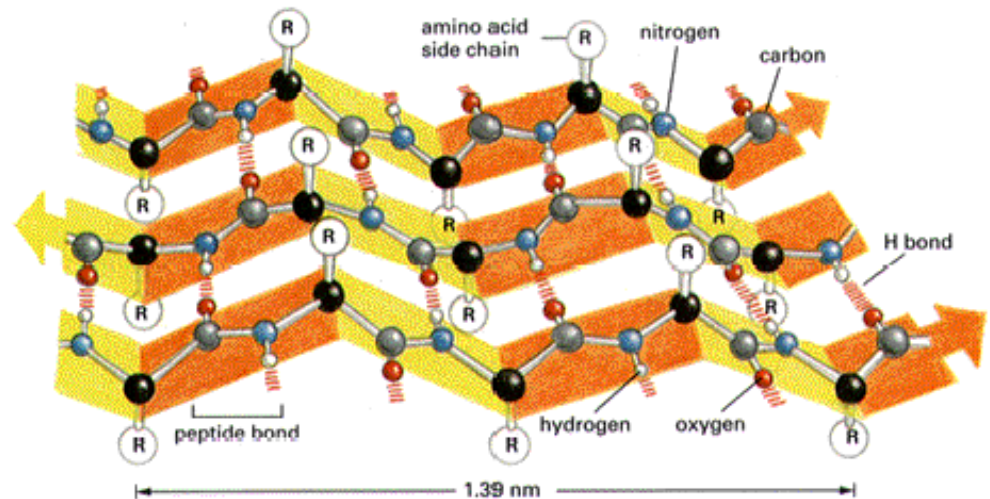
α -elica

La più semplice disposizione che una catena polipeptidica può assumere con i legami peptidici rigidi è una struttura elicoidale (avvolgimento a spirale)



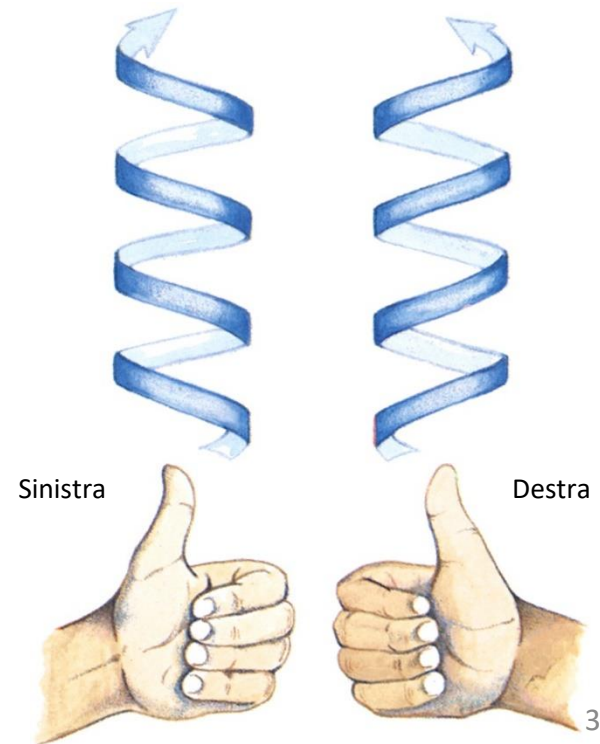
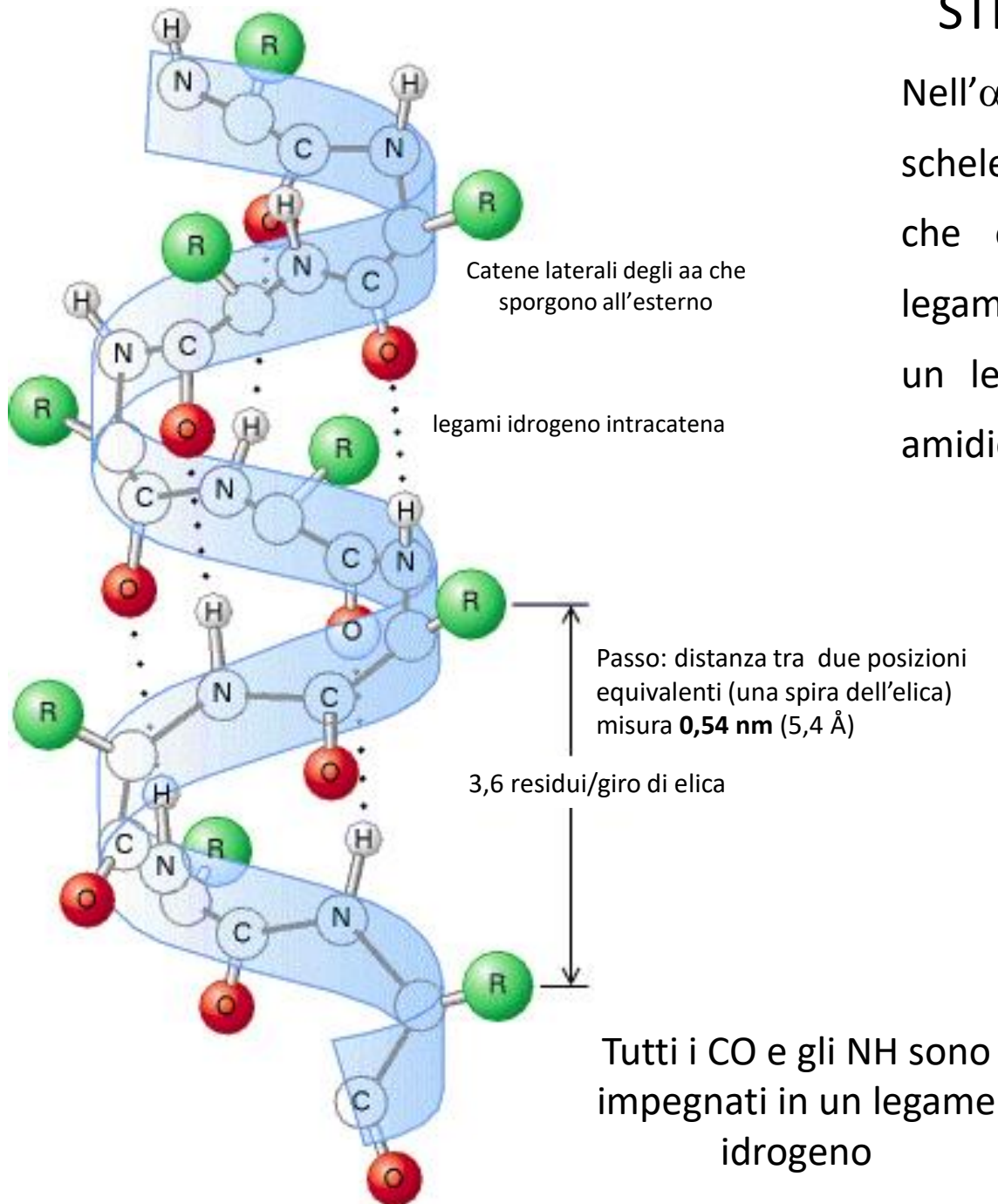
β -foglietto

Legami idrogeno fra aminoacidi di catene diverse

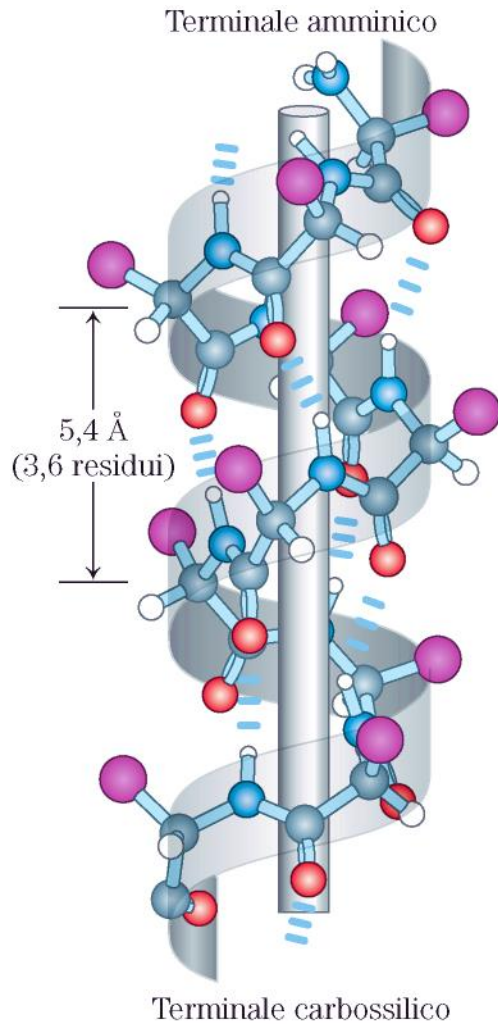


STRUTTURA SECONDARIA

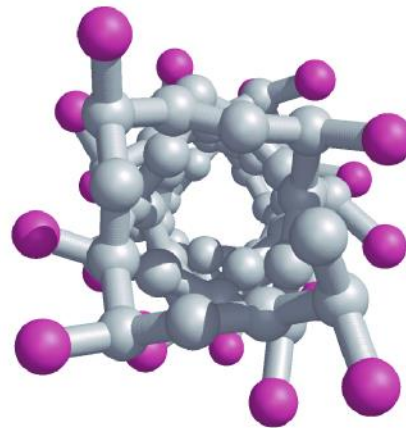
Nell' α -elica gli atomi di idrogeno dello scheletro sono disposti in modo tale che ogni ossigeno carbonilico del legame C=O di un dato residuo forma un legame idrogeno con l'idrogeno amidico N-H di 4 residui più avanti.



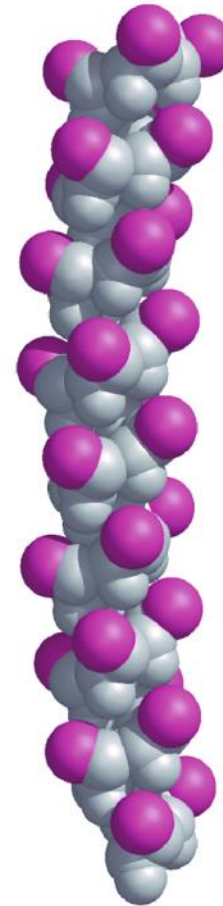
Quattro modelli dell' α elica, che mostrano aspetti diversi della struttura



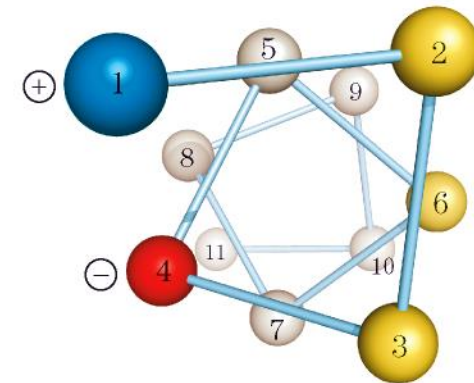
(a) Modello a palle e bastoncini che mette in evidenza i legami idrogeno intracatena



(b) L'elica vista dall'alto i gruppi R tutti esterni



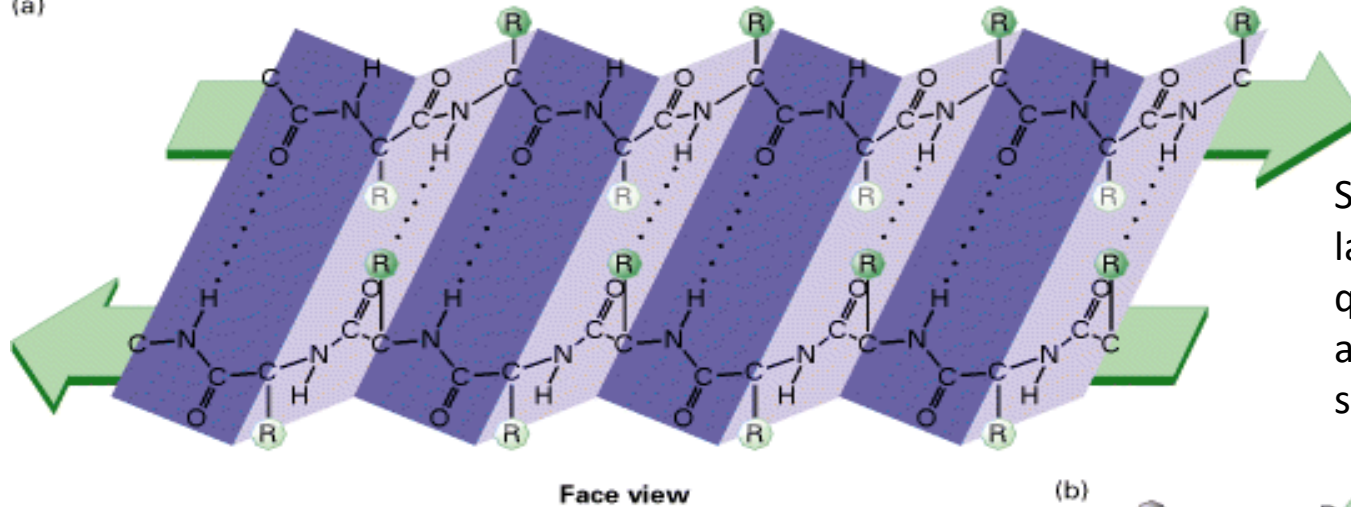
(c) Modello a spazio pieno che mostra gli atomi al centro dell' α elica in stretto contatto tra loro



(d) Proiezione a ruota dell' α elica che illustra la potenziale interazione tra i gruppi carichi distanziati di due residui. In giallo i residui idrofobici, in rosso i negativi e in blu i positivi.

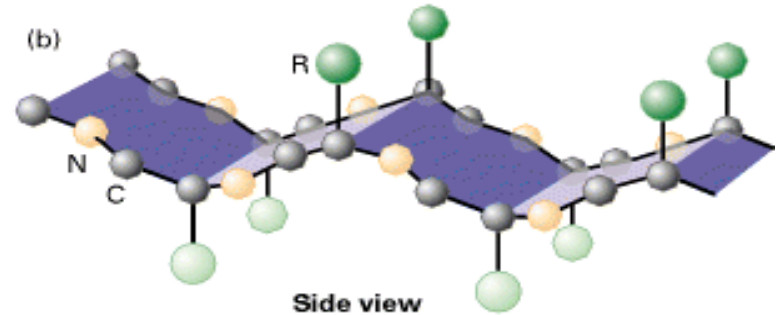
Struttura β foglietto pieghettato

(a)



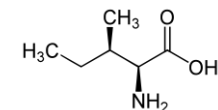
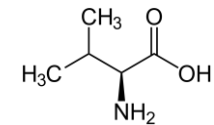
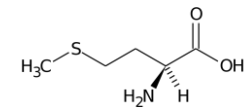
Stessi legami che caratterizzano la struttura ad α elica ma questa volta tra amminoacidi anche molto lontani nella sequenza amminoacidica

Face view



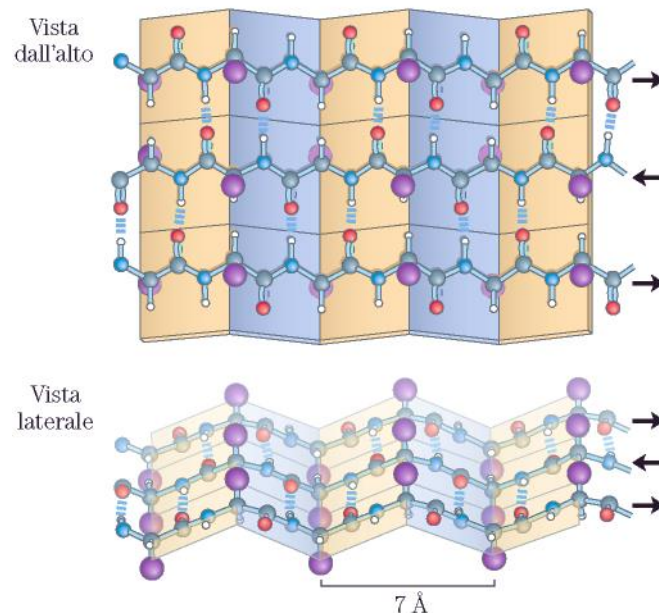
Side view

- Predominano piccoli residui non polari (metionina, valina e isoleucina)
- sono meno frequenti gli aa con catene laterali polari o ingombranti
- la prolina è talvolta presente ma tende a interrompere l'andamento regolare della struttura producendo gomiti e inversioni di direzione.



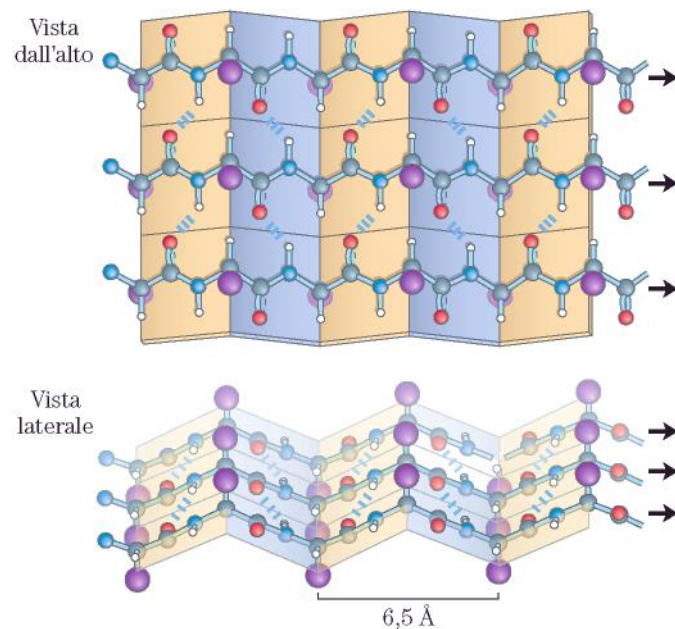
Foglietto anti-parallelo

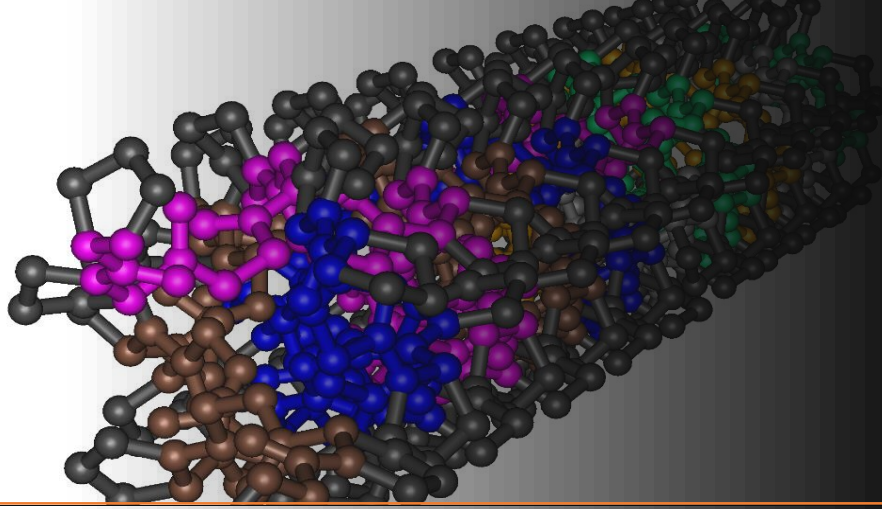
- Nel foglietto β anti-parallelo i legami idrogeno sono planari ed essenzialmente rettilinei, questo rende l'energia di legame più elevata e la struttura più stabile.



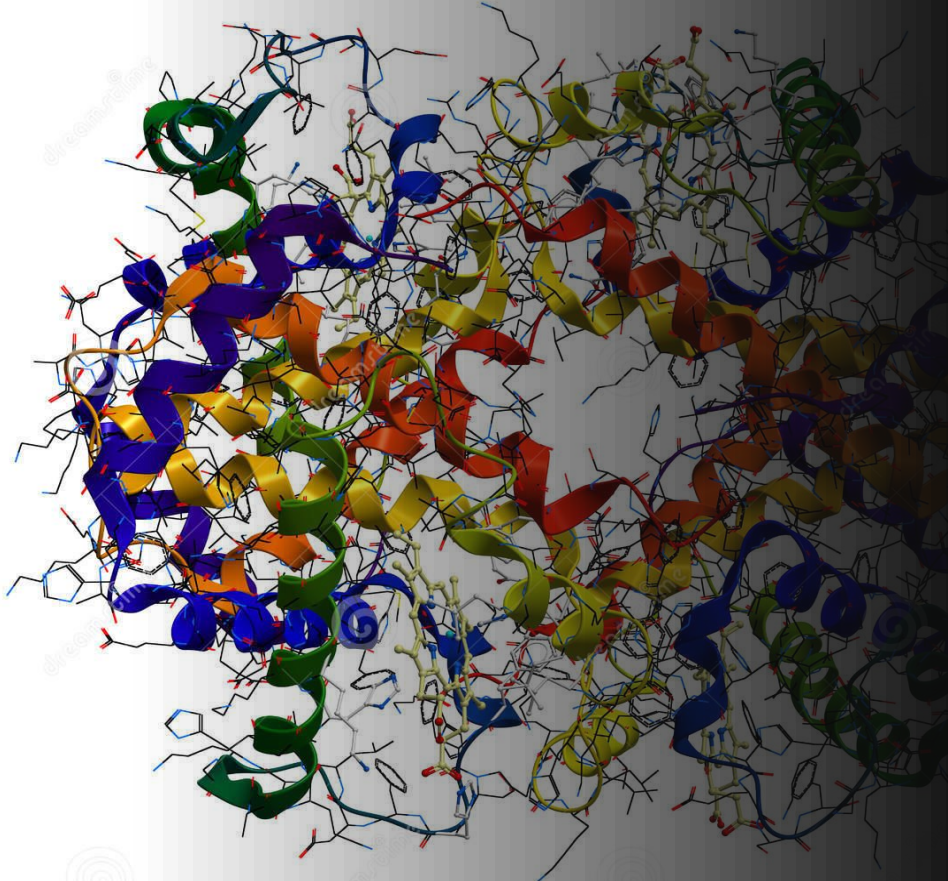
Foglietto parallelo

- Nel foglietto β parallelo i legami idrogeno sono meno forti e distorti, la struttura che ne risulta è meno stabile.
- Le due strutture sono simili, anche se il periodo che si ripete è più corto per la conformazione parallela (6,5 Å anziché 7 Å per la antiparallela)



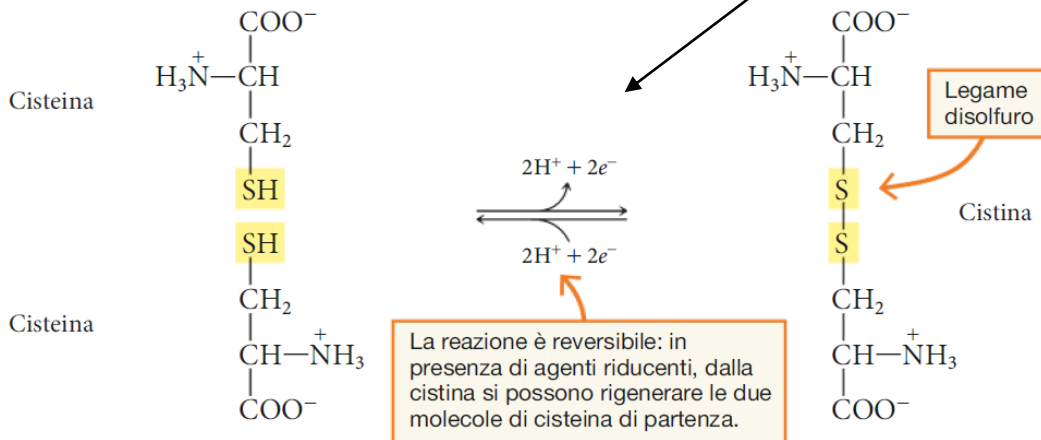
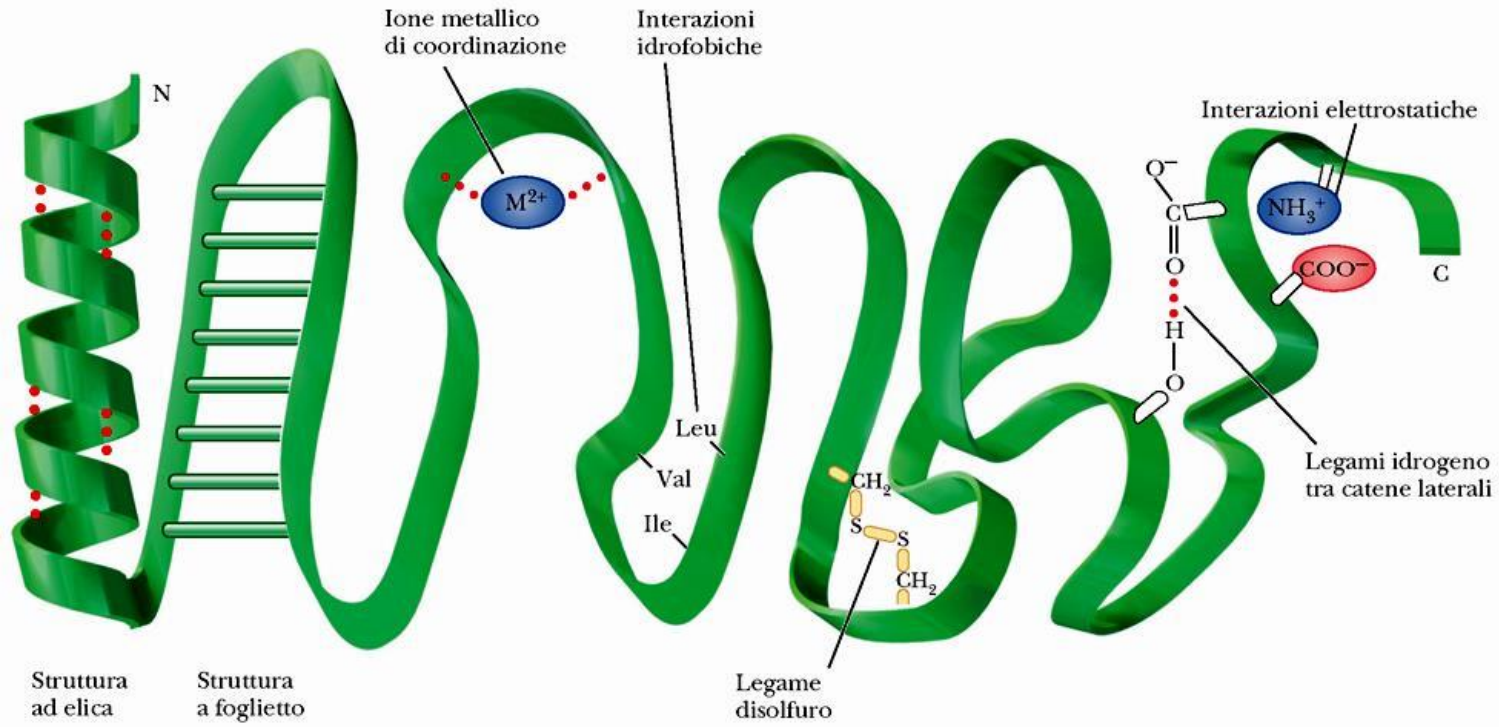


Struttura terziaria



La disposizione nello spazio di tutti gli atomi di una proteina.

Struttura terziaria: legami fra residui amminoacidici di una catena polipeptidica che stabilizzano la struttura



Il ripiegamento ha una stretta correlazione con la funzione biologica

Struttura terziaria

Forze che stabilizzano la struttura terziaria delle proteine

La struttura terziaria è stabilizzata da legami tra catene laterali di residui aa che si trovano spazialmente vicini

LEGAME IONICO: tra gruppi che portano una carica netta positiva (residui di lisina, arginina, istidina e gruppo NH_2 terminale) e gruppi che portano una carica netta negativa (residui di a. glutammico, a. aspartico, e gruppo COOH terminale)

LEGAME IDROGENO: tra gruppi donatori di H e gruppi accettori di H presenti nelle catene laterali.

LEGAME IDROFOBICO: tendenza delle catene laterali non polari ad unirsi tra loro in modo da offrire la minore superficie al solvente acquoso. Es.: catene laterali di alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina

PONTE DISOLFURO (S-S): legame covalente. Importante nella stabilizzazione della struttura terziaria. Si forma quando, due gruppi $-\text{SH}$ vengono a trovarsi spazialmente vicini e si ossidano.

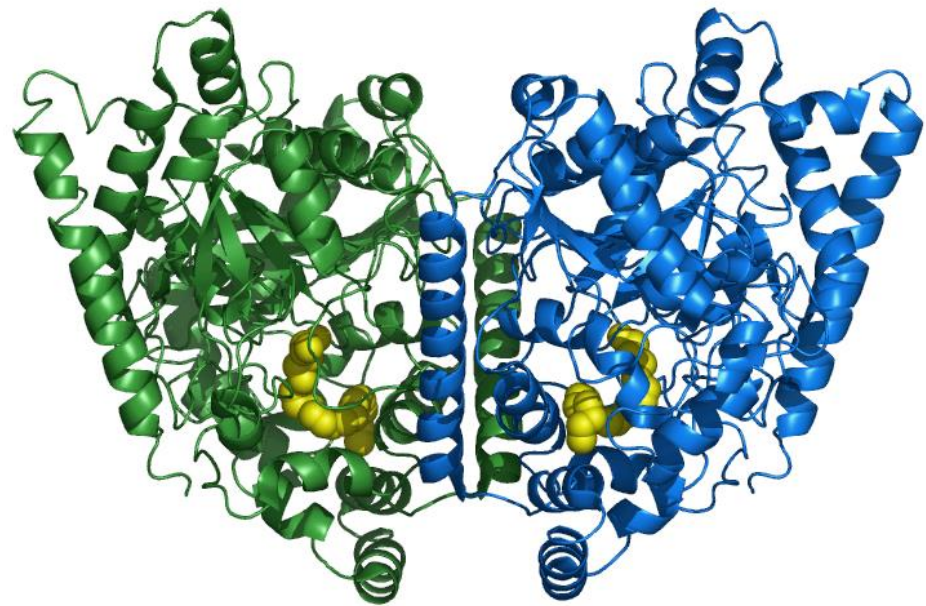
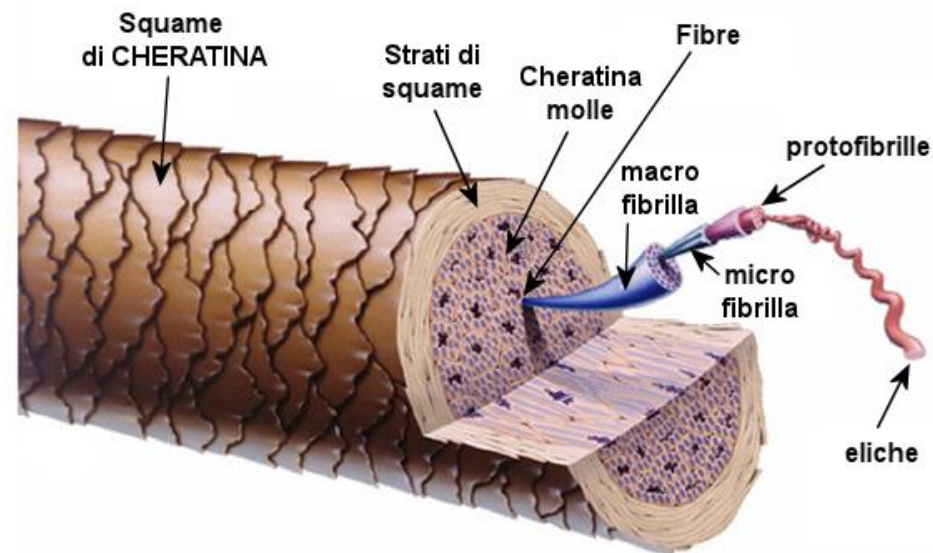
LEGAMI CON IONI METALLICI: in alcune proteine contenenti ioni metallici come Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , i legami coordinativi che questi ioni formano con catene laterali di aa possono avere un ruolo importante nel mantenimento della struttura terziaria

Due tipi di conformazione delle proteine

Proteine fibrose e globulari

Proteine fibrose: sono proteine che svolgono funzioni strutturali e sono prevalentemente insolubili. Hanno funzione di protezione e sostegno: Pelle, Piume, Capelli, Corna, Citoscheletro, Unghie, Squame, Cartilagine, Tendini, Ossa

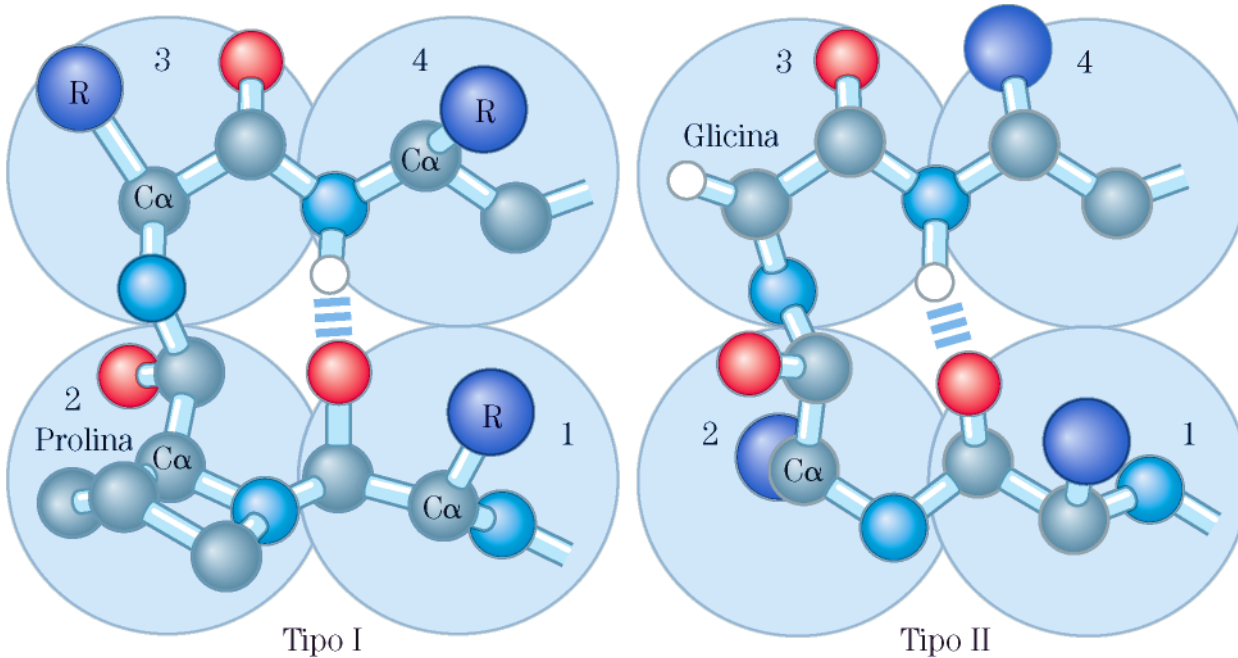
Proteine globulari: sono proteine che svolgono la propria funzione in soluzione. Hanno funzione di trasporto, catalisi, recettori di membrana, anticorpi (tutte le proteine che intervengono nella regolazione delle attività della cellula)



L' α -cheratina è formata da due eliche destrorse che si avvolgono tra loro formando una super-elica sinistrorsa detta *avvolgimento α*

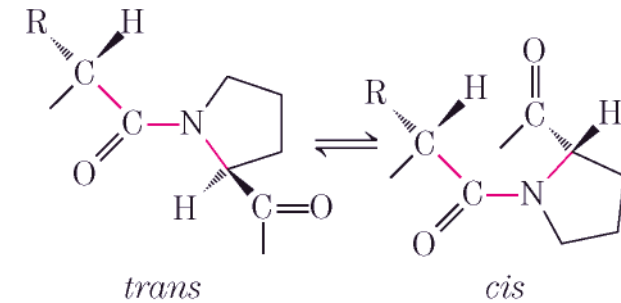
La FAAH è costituita da un core formato da due foglietti- β , ciascuno con 11 filamenti misti, circondati da diverse α -eliche

Struttura di un ripiegamento β nelle proteine globulari



(a) Ripiegamenti β

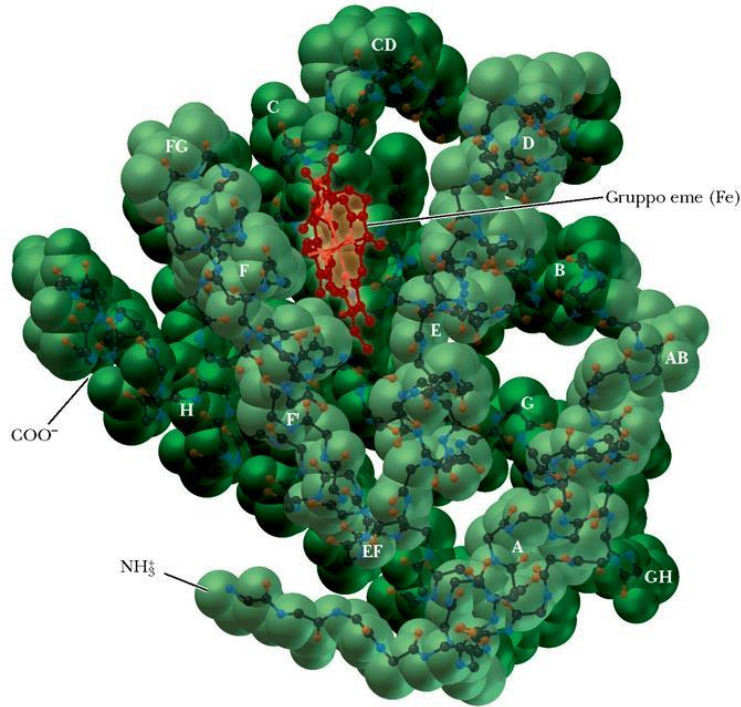
La struttura è costituita da un ripiegamento di 180 gradi di una sequenza di 4 residui, dove il gruppo carbonilico del primo residuo forma un legame idrogeno con l'idrogeno legato all'azoto del quarto residuo ($n+3$)



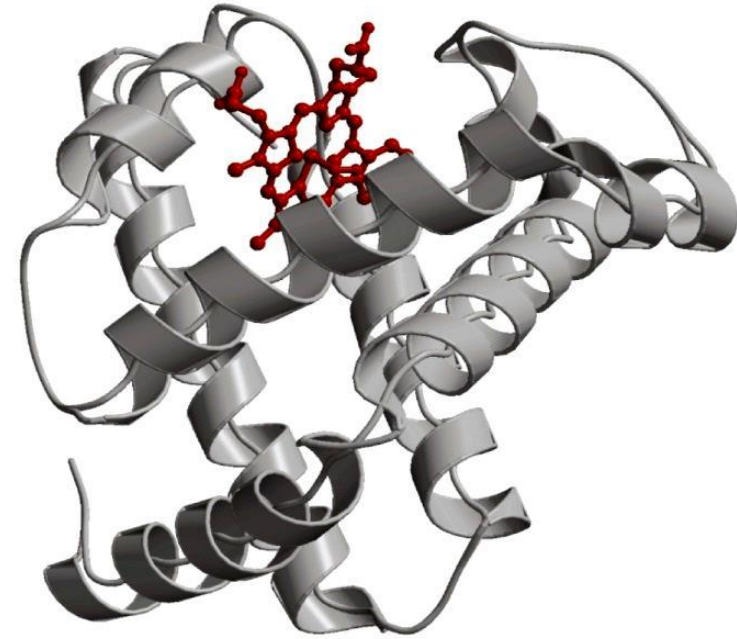
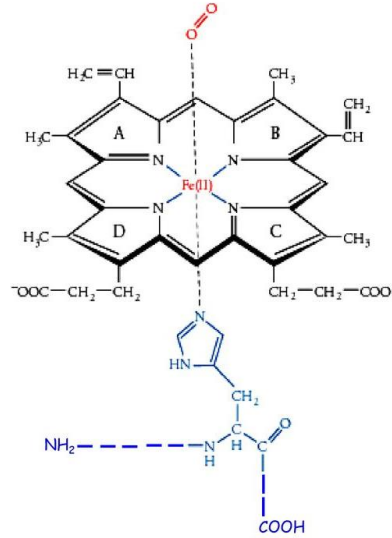
(b) Isomeri di prolina

Sono ripiegamenti che collegano tratti successivi alle α eliche o nella conformazione β

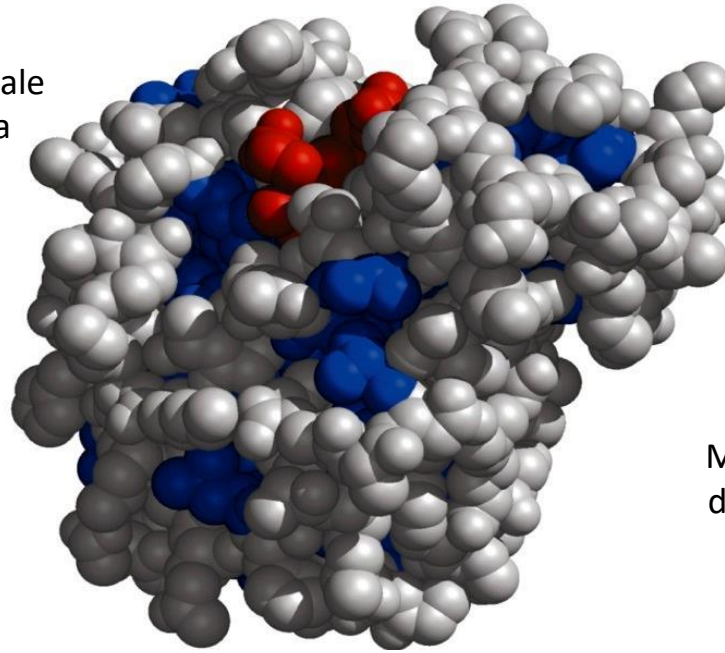
Proteine globulari



Ripiegamento tridimensionale della proteina mioglobina

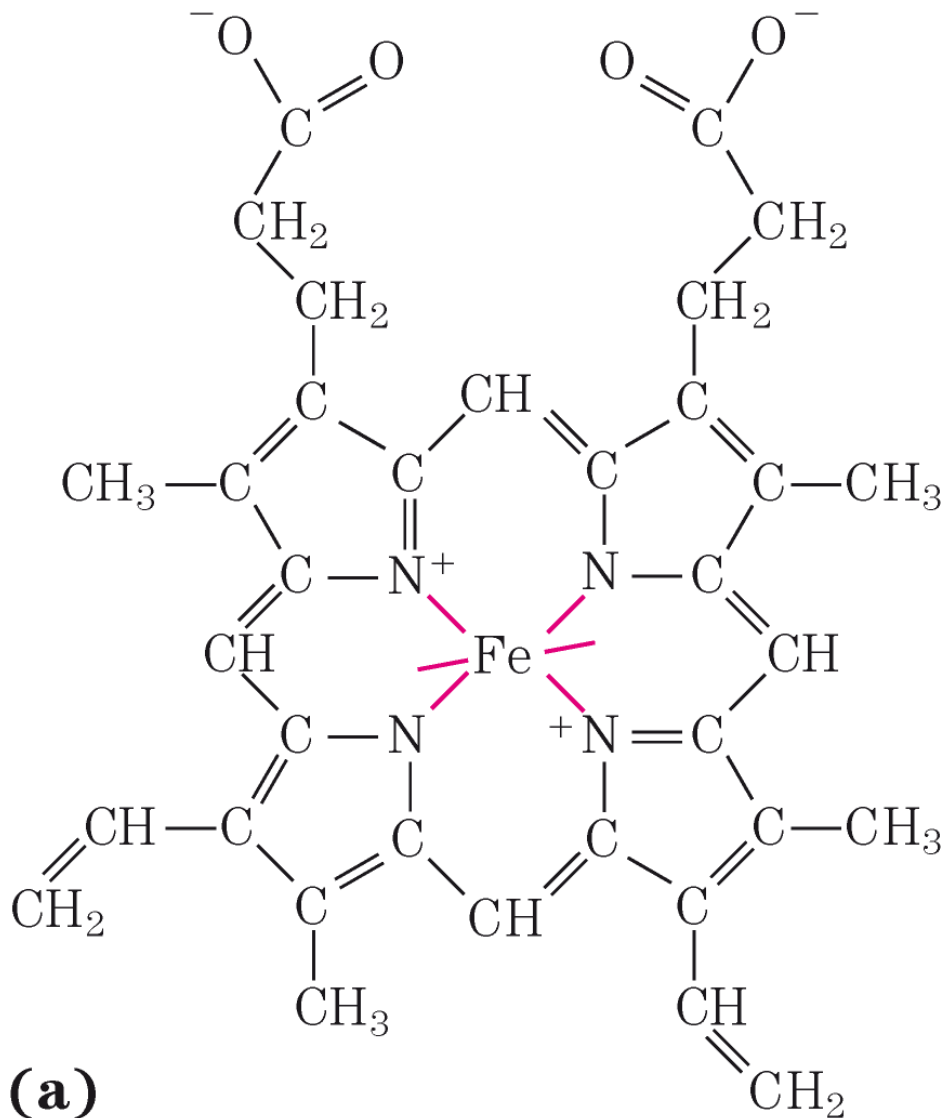


Scheletro della mioglobina in forma di nastro costituito da 153 amminoacidi



Modello spaziale della mioglobina

Il gruppo eme



L'atomo di Fe posto al centro del gruppo eme ha due legami di coordinazione perpendicolari al piano dell'eme

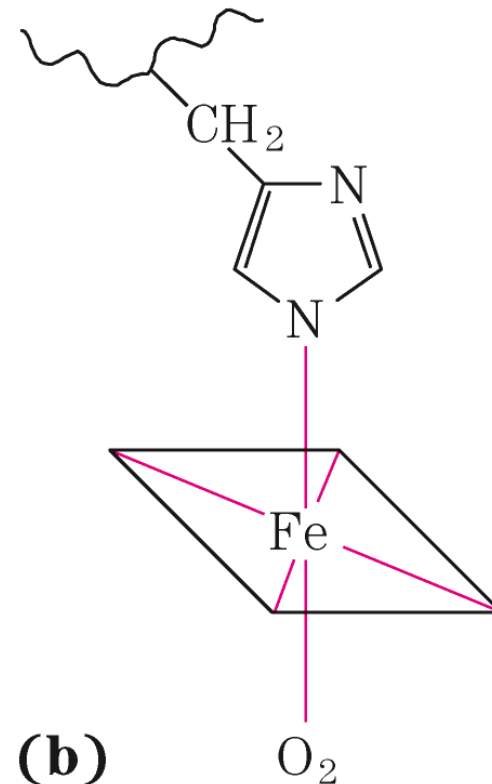


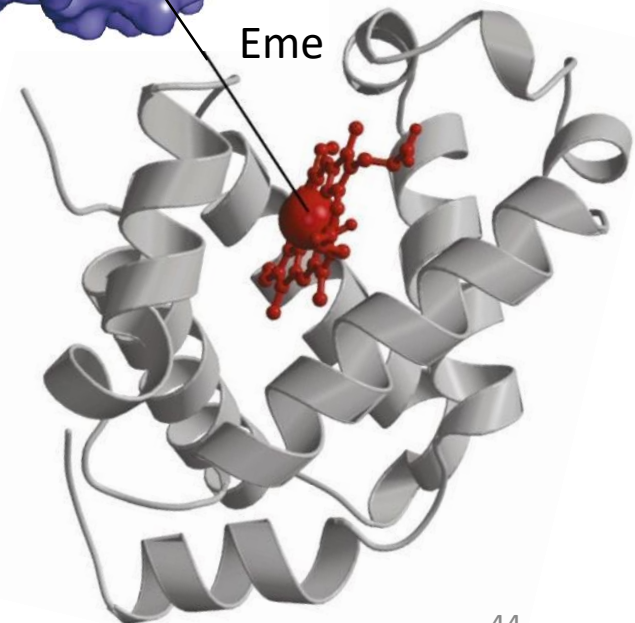
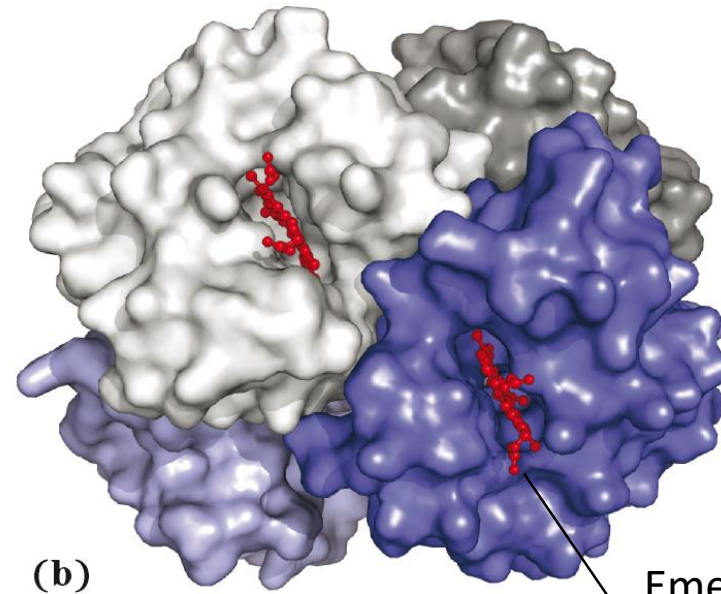
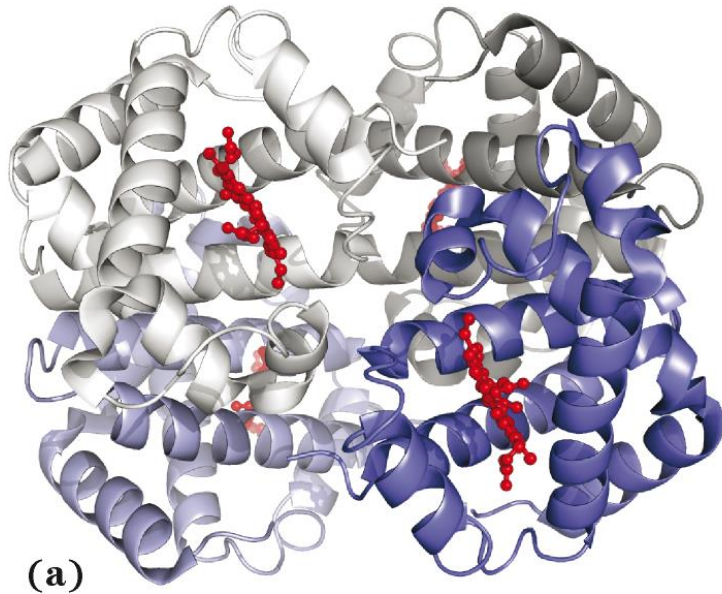
TABLE 4-2 Approximate Amounts of α Helix and β Conformation in Some Single-Chain Proteins

<i>Protein (total residues)</i>	<i>Residues (%)*</i>	
	<i>α Helix</i>	<i>β Conformation</i>
Chymotrypsin (247)	14	45
Ribonuclease (124)	26	35
Carboxypeptidase (307)	38	17
Cytochrome c (104)	39	0
Lysozyme (129)	40	12
Myoglobin (153)	78	0

Source: Data from Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part I: The Conformation of Biological Macromolecules*, p. 100, W. H. Freeman and Company, New York.

*Portions of the polypeptide chains that are not accounted for by α helix or β conformation consist of bends and irregularly coiled or extended stretches. Segments of α helix and β conformation sometimes deviate slightly from their normal dimensions and geometry.

Struttura quaternaria della deossiemoglobina



Con subunità ci si riferisce alle catene polipeptidiche che costituiscono la proteina e la struttura quaternaria definisce la disposizione spaziale delle subunità.

Le catene polipeptidiche si associano tramite interazioni non covalenti (interazioni elettrostatiche, legami idrogeno e interazioni idrofobiche)

L'emoglobina è costituita da 4 subunità (2 catene α e 2 catene β); ognuna di esse presenta una parte non proteica, l'eme, che è in grado di legare l' O_2

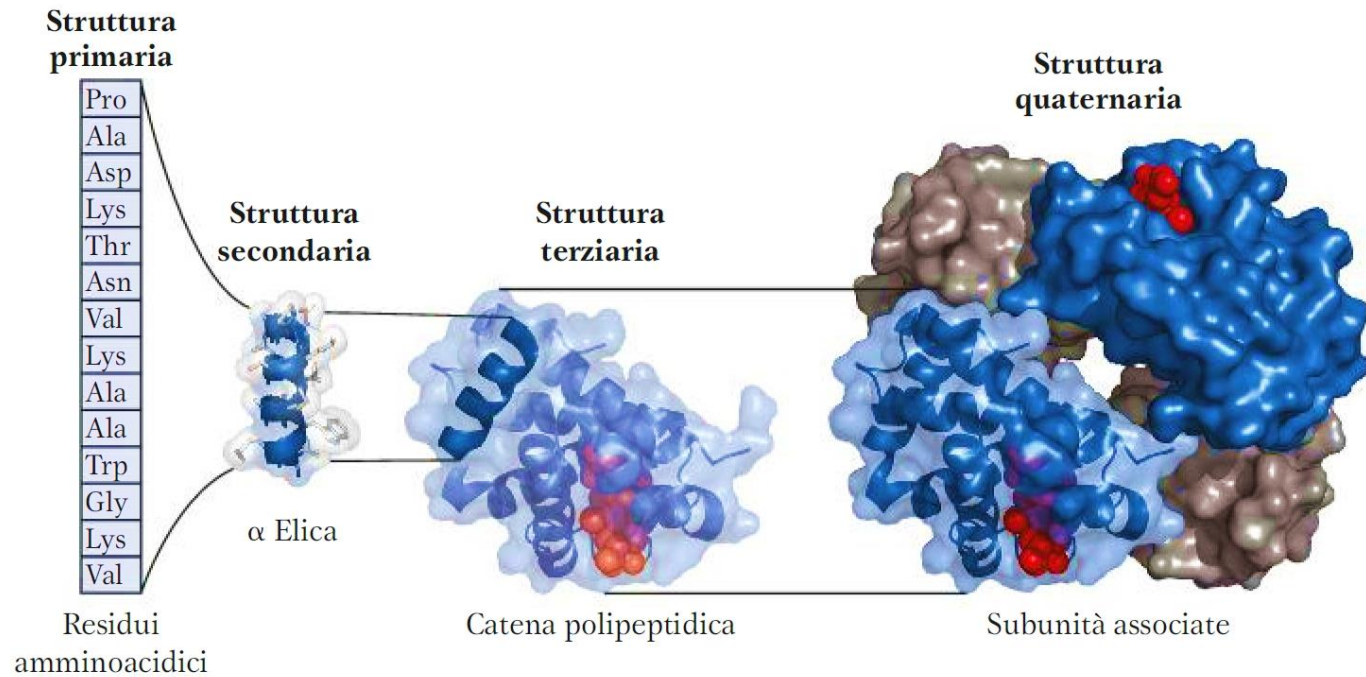
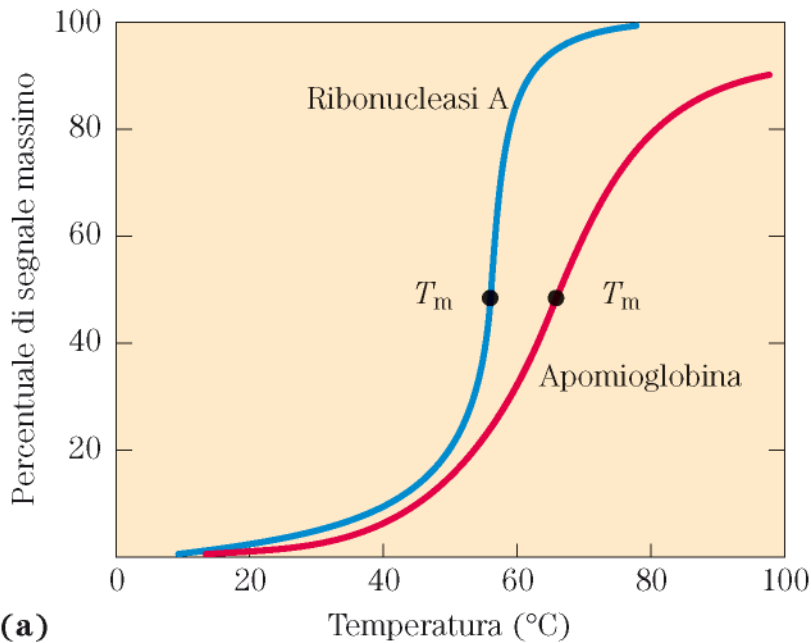


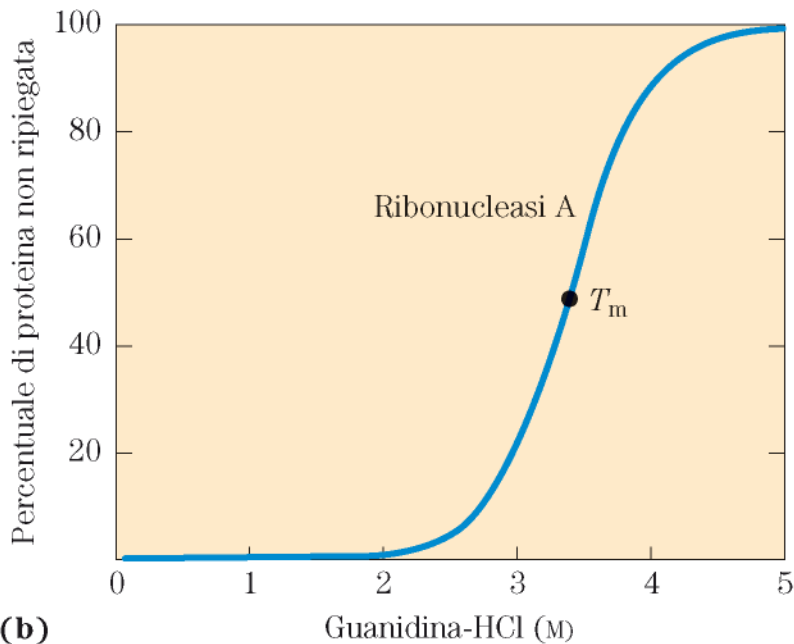
Figura 3.13 Livelli di struttura delle proteine. La *struttura primaria* è costituita da una sequenza di amminoacidi uniti da legami peptidici; comprende anche i ponti disolfuro. I polipeptidi risultanti possono disporsi tridimensionalmente secondo una struttura regolare ricorrente, che viene definita *struttura secondaria*, come per esempio l' α elica.

L' α elica costituisce una parte della *struttura terziaria* del polipeptide avvolto, che può essere a sua volta una delle subunità che costituiscono la *struttura quaternaria* di proteine formate da più unità costitutive, come l'emoglobina. [Fonte: PDB ID 1HGA, R. Liddington et al., *J. Mol. Biol.* 228:551, 1992.]

Denaturazione delle proteine



(a)



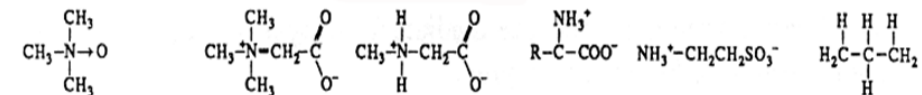
(b)

LA SERIE DI HOFMEISTER

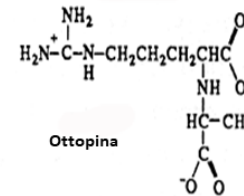
cosmotropici	stabilizzanti (salting out)				destabilizzanti (salting in)				caotropici
Anioni:	F ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	CH ₃ COO ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻	CNS ⁻	
Cationi:	(CH ₃) ₄ N ⁺	(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Cs ⁺	Li ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺ Ba ²⁺

SOLUTI INTRACELLULARI CHE HANNO EFFETTO SULLA STRUTTURA

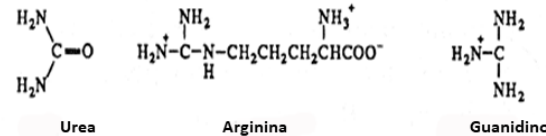
STABILIZZANTI



N-ossido-trimetilamina (TMAO) Betaina Sarcosina Aminoacidi Taurina Glicerolo



DESTABILIZZANTI

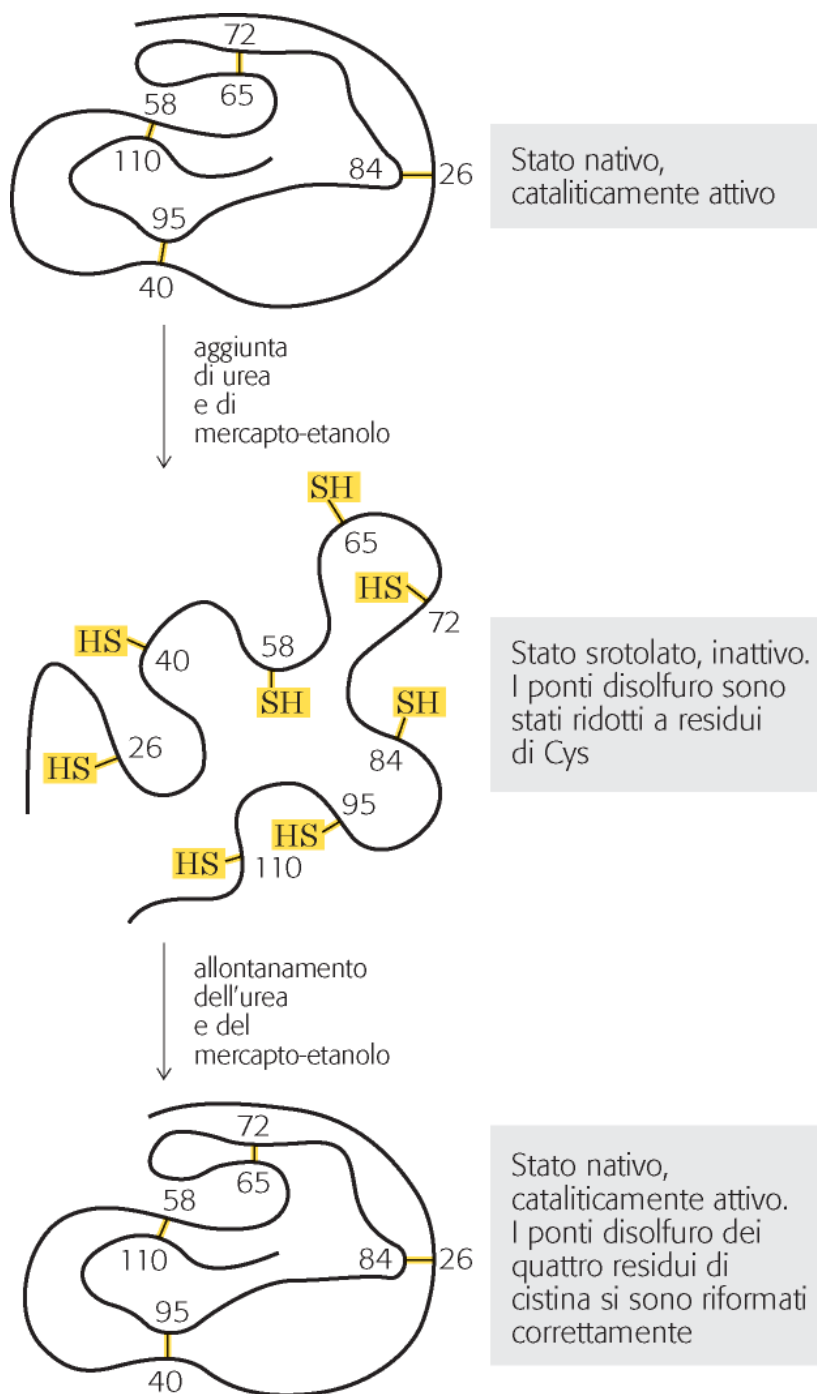


il punto di mezzo dell'intervallo di temperatura in cui avviene la denaturazione viene detto temperatura di fusione T_m ($m = melting$)

La denaturazione è un processo reversibile

Le proteine globulari, una volta denaturate, possono riacquistare la loro struttura nativa e la loro attività biologica se vengono riportate nelle condizioni in cui la conformazione attiva è stabile

la ribonucleasi A si denatura completamente in una soluzione concentrata di agenti riducenti come il β mercaptoetanolo o il ditiotreitolo.



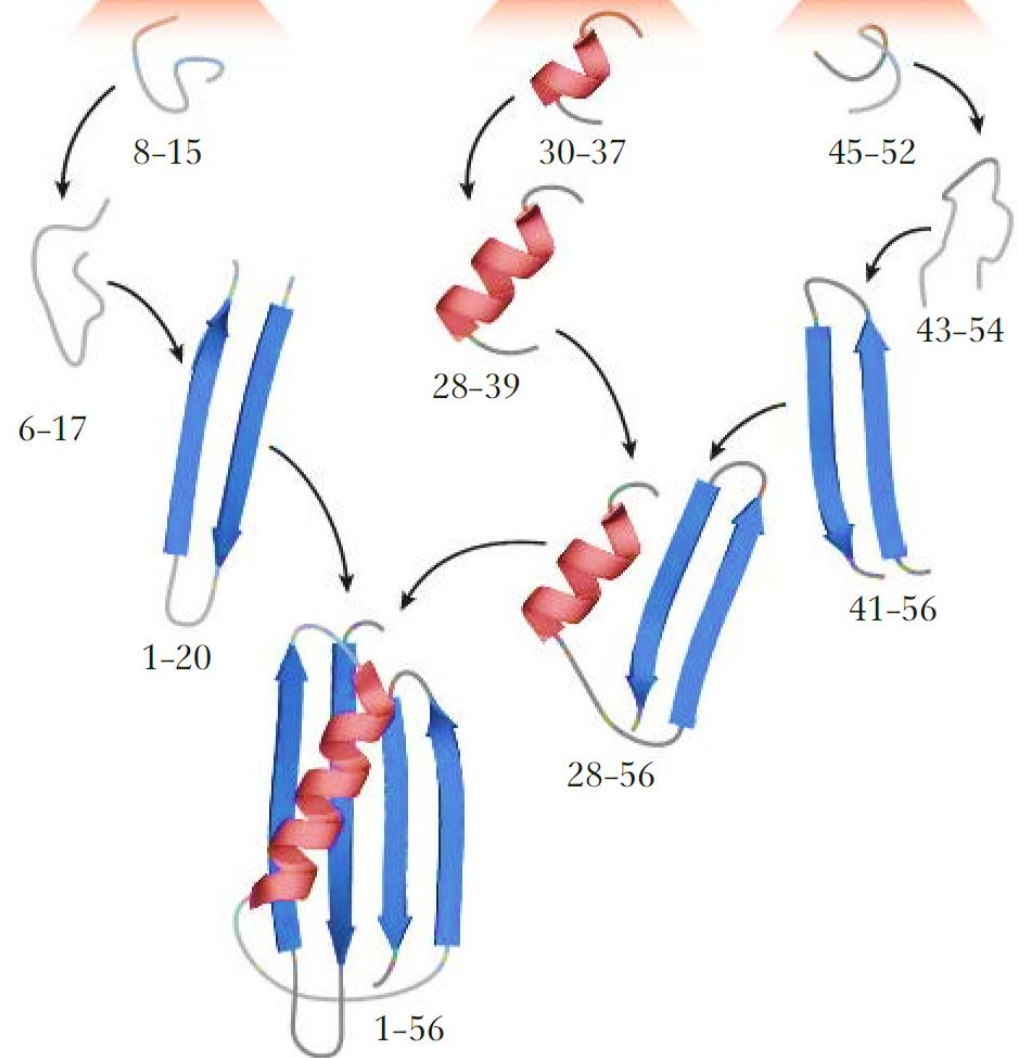
Processo di ripiegamento di una proteina piccola

Ha carattere gerarchico:

- 1) Si formano le strutture secondarie. Alcune sequenze amminoacidiche si ripiegano spontaneamente in α eliche o foglietto β .
- 2) L'organizzazione è seguita da interazioni ad ampio raggio per esempio due elementi di una struttura secondaria che si avvicinano per formare strutture supersecondarie stabili.
- 3) Questo processo continua fino a che non si formano domini completi e l'intero peptide assume la sua forma nativa.

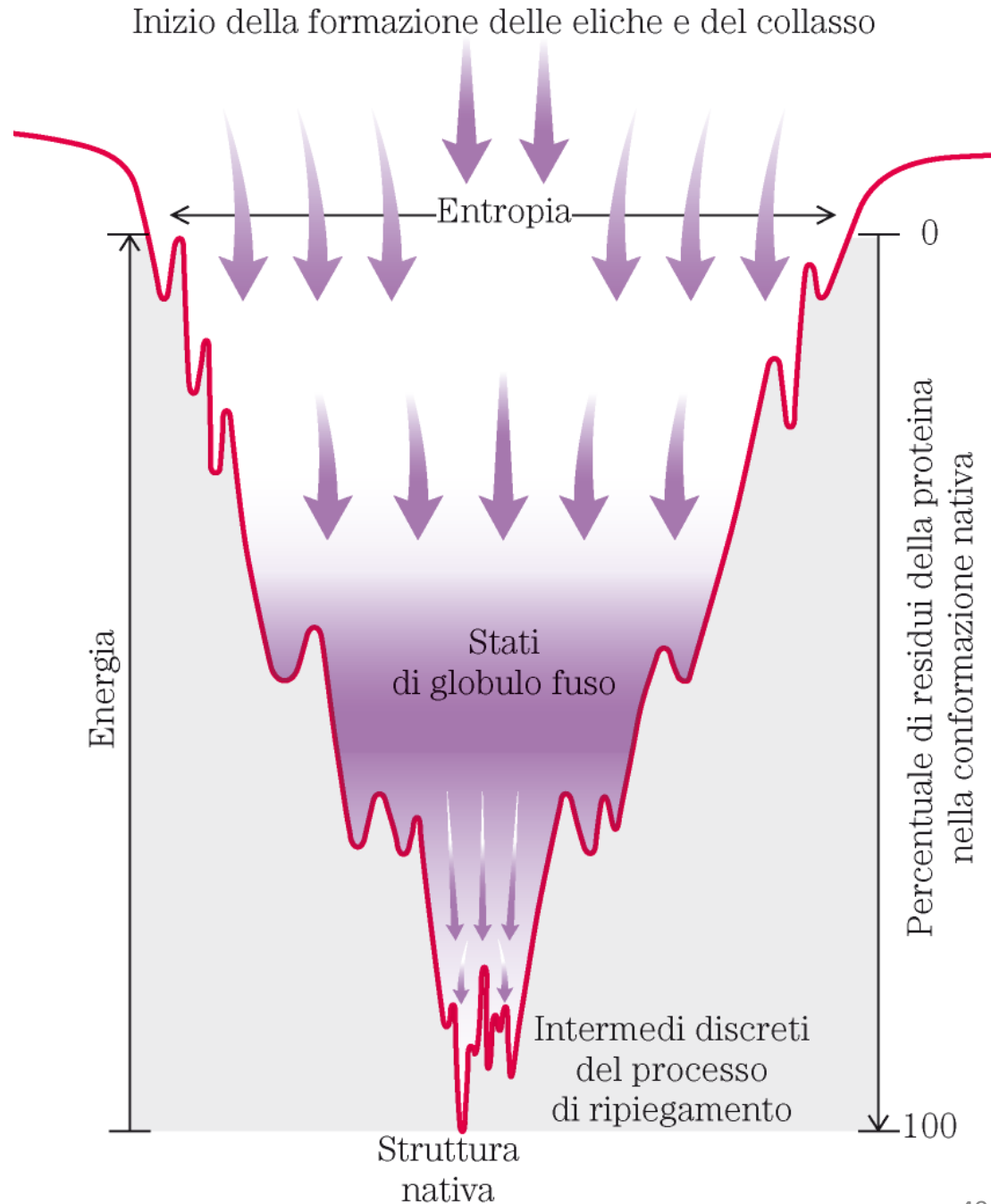
Sequenza amminoacidica di un peptide di 56 residui

MTYKLLILNGKTLKGETTTEAVDAATAAEKVFKQYANDNGVDGEWTYDDATKTFVTTE



Termodinamica del ripiegamento delle proteine visto come un imbuto di energia libera.

Gli stadi non ripiegati hanno un elevato grado di energia, man mano che il processo di ripiegamento procede, e la proteina si avvicina al suo stato nativo, si formano intermedi sempre più stabili.



Protein
Synthesis



Aggregate

Removal
for use

Il ripiegamento per alcune
proteine è un processo assistito

Ruolo dei Chaperoni nel
ripiegamento delle proteine

Quando le cellule vengono
sottoposte a shock termico, in
E. coli il sistema è chiamato
GroEl/GroEs.
Negli eucarioti il sistema è
l'HSP60



Unfolded



(slow)



Folded



Chaperone

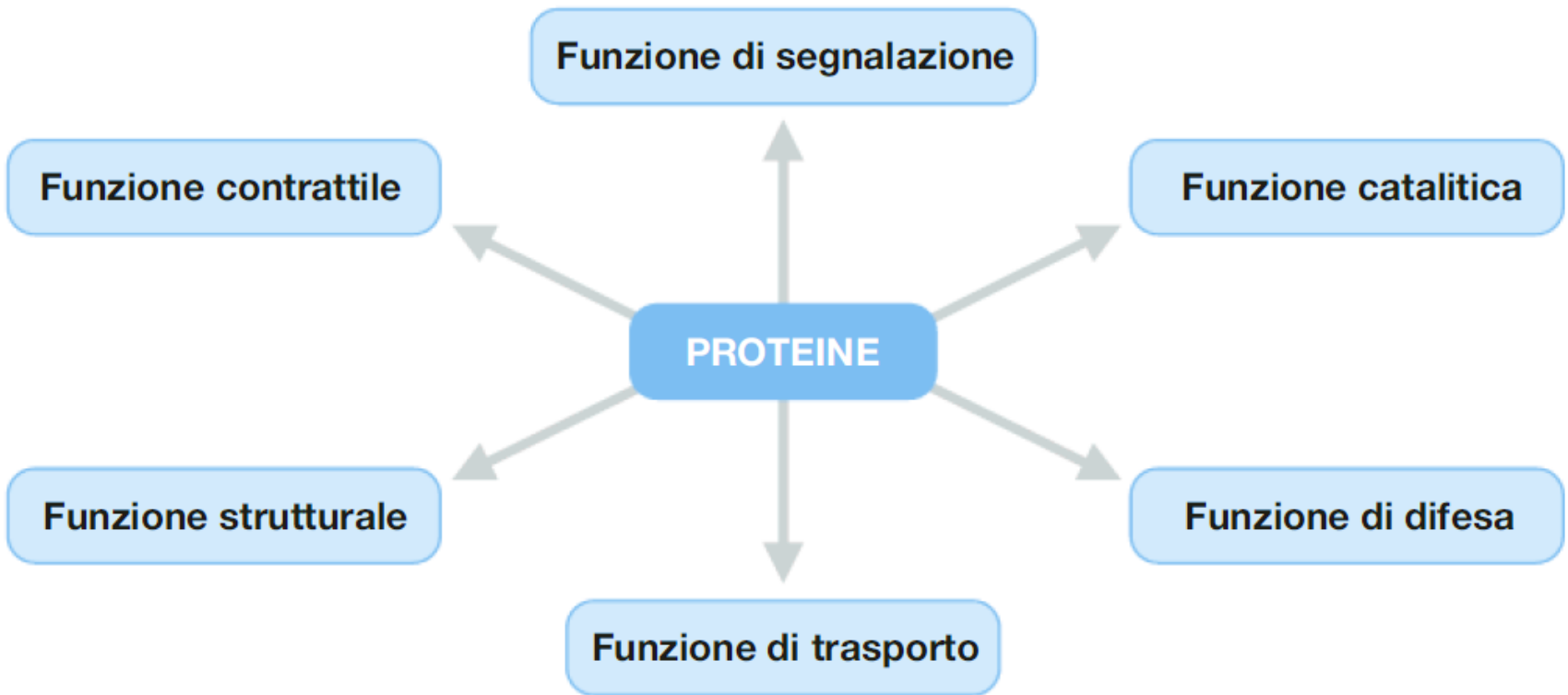


(Fast)



Chaperone

Funzioni delle proteine



Da dove provengono le proteine del vino che successivamente danno luogo a intorbidimenti e precipitati?

Derivano dall'uva o dal lievito?

I ricercatori degli anni '50 hanno cercato di dare una risposta

**taumatina e chitinasi
24-kDa e 32-kDa**

Le proteine del vino derivano principalmente dall'uva, il cui patrimonio proteico varia in funzione di numerosi fattori: vitigno, tecniche colturali, annata, stress idrico, infezione fungina e dal contatto con la pelle durante le tecniche di vinificazione.

Nel vino troviamo anche altre proteine che derivano dai lieviti, eventuali batteri o additivi utilizzati in vinificazione.

Varia da 20—260 mg/L

le più importanti sono le proteine simili alla taumatina (TLP) e chitinasi.

massa molecolare: da 21 a 26 kDa, hanno pI tra 4.1–5.8 e sono relativamente stabili agli enzimi proteolitici.



Profilo elettroforetico del succo d'uva

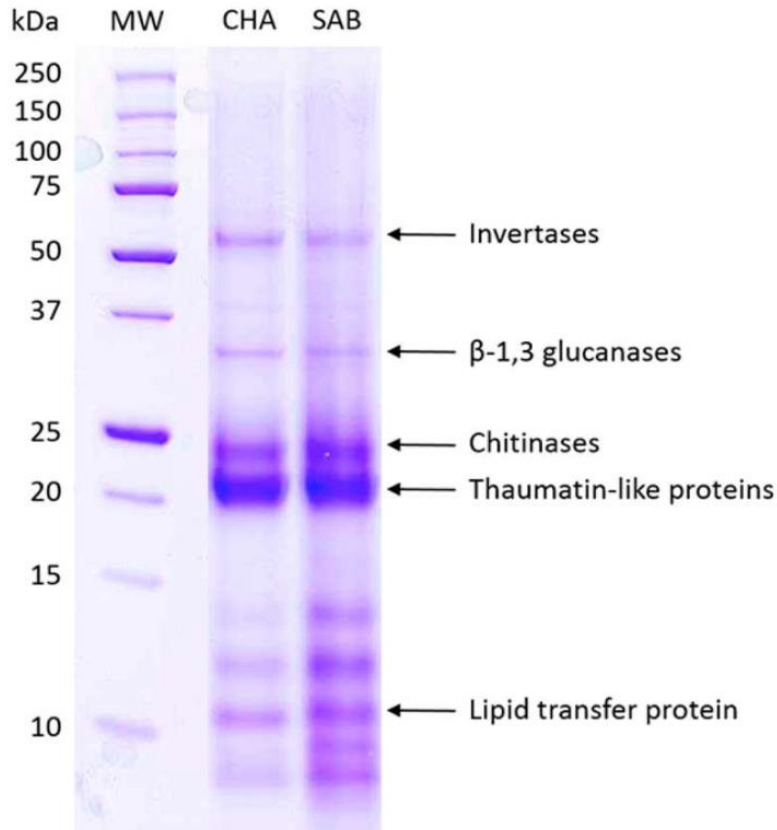


Figure 3. Typical electrophoretic profiles of two unfinned grape juices (CHA, Chardonnay; SAB, Sauvignon blanc), with protein band identities assigned by proteomic analysis.⁸⁵

Le chitinasi e TLP sono proteine globulari stabili con un elevato numero di ponti disolfuro. Sono presenti nel succo d'uva e nel vino bianco, anche le mannoproteine dei lieviti, l'invertasi e glicoproteine della parete cellulare dell'uva, proteoglicani ricchi di arabinosio e galattosio. Le chitinasi sono generalmente meno stabile rispetto alle TLP e possono denaturare in pochi minuti a temperature $>40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Table 1. Predicted Half-Lives of Chitinases and TLPs in Artificial Wine (Based on Falconer et al.⁵⁷)

temperature ($^{\circ}\text{C}$)	predicted half-lives for chitinases	predicted half-lives for TLPs
50	3 min	20 days
45	17 min	11 weeks
40	1.3 h	13 years
35	14 h	180 years
30	4.7 days	>1000 years
25	1.3 months	>1000 years
20	1 year	>1000 years
15	9 years	>1000 years
10	100 years	>1000 years

Van Sluyter *et al.*, (2015) Wine Protein Haze: Mechanisms of Formation and Advances in Prevention. *J. Agric. Food Chem.* 63,16, 4020-4030

Table 2. Summary of General Properties of Chitinases and TLPs

property	chitinases	stable TLPs	unstable TLPs
unfolding temperature	55 °C ⁵⁷	61–62 °C ⁵⁷	56 °C ⁵⁷
aggregate characteristics	visible aggregates (≥1 μm) ⁵⁴	microaggregates (<150 nm) ^{53,54}	visible aggregates (≥1 μm) ^{30,57}
aggregation tendency	self-aggregate ^{28,54}	cross-linked with other wine components ^{53,54}	self-aggregate ³⁰

La tecnica di cristallografia è stata utilizzata per chiarire la struttura a 3D delle due isoforme di TLP nell'uva

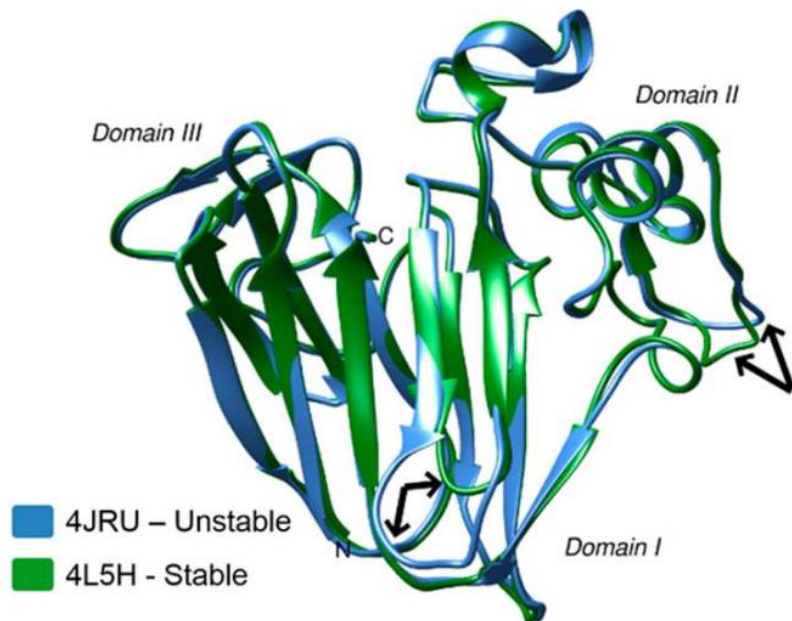


Figure 5. Superposition of the backbone representation of thaumatin-like proteins 4JRU (heat unstable) and 4L5H (heat stable).³⁰ Arrows indicate differing loops between the two protein isoforms.

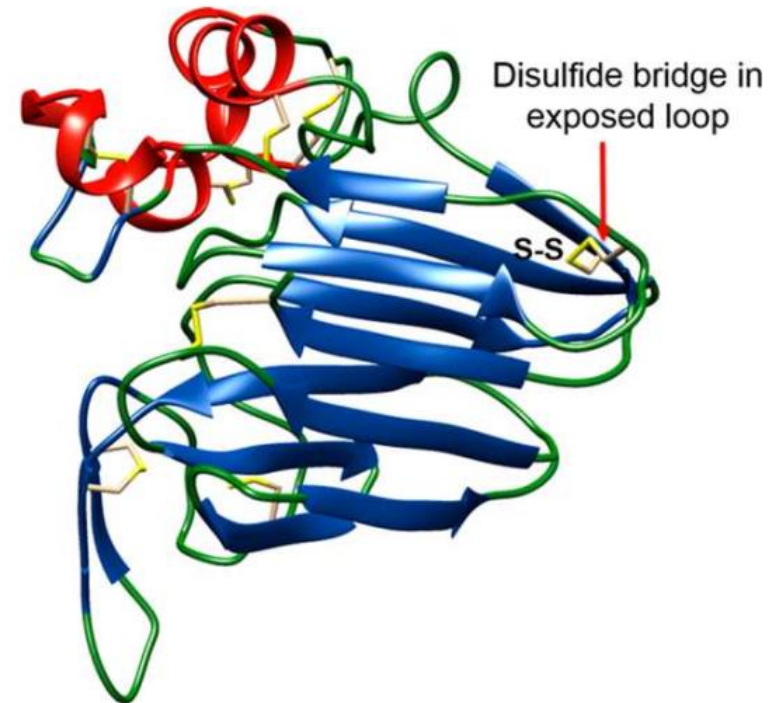


Figure 7. Backbone representation of the heat-unstable thaumatin-like protein 4JRU.³⁰ Disulfide bonds are yellow. The arrow indicates an exposed disulfide bond that could be susceptible to reduction by heat and sulfites.

Meccanismo di formazione della foschia nel vino: ipotesi

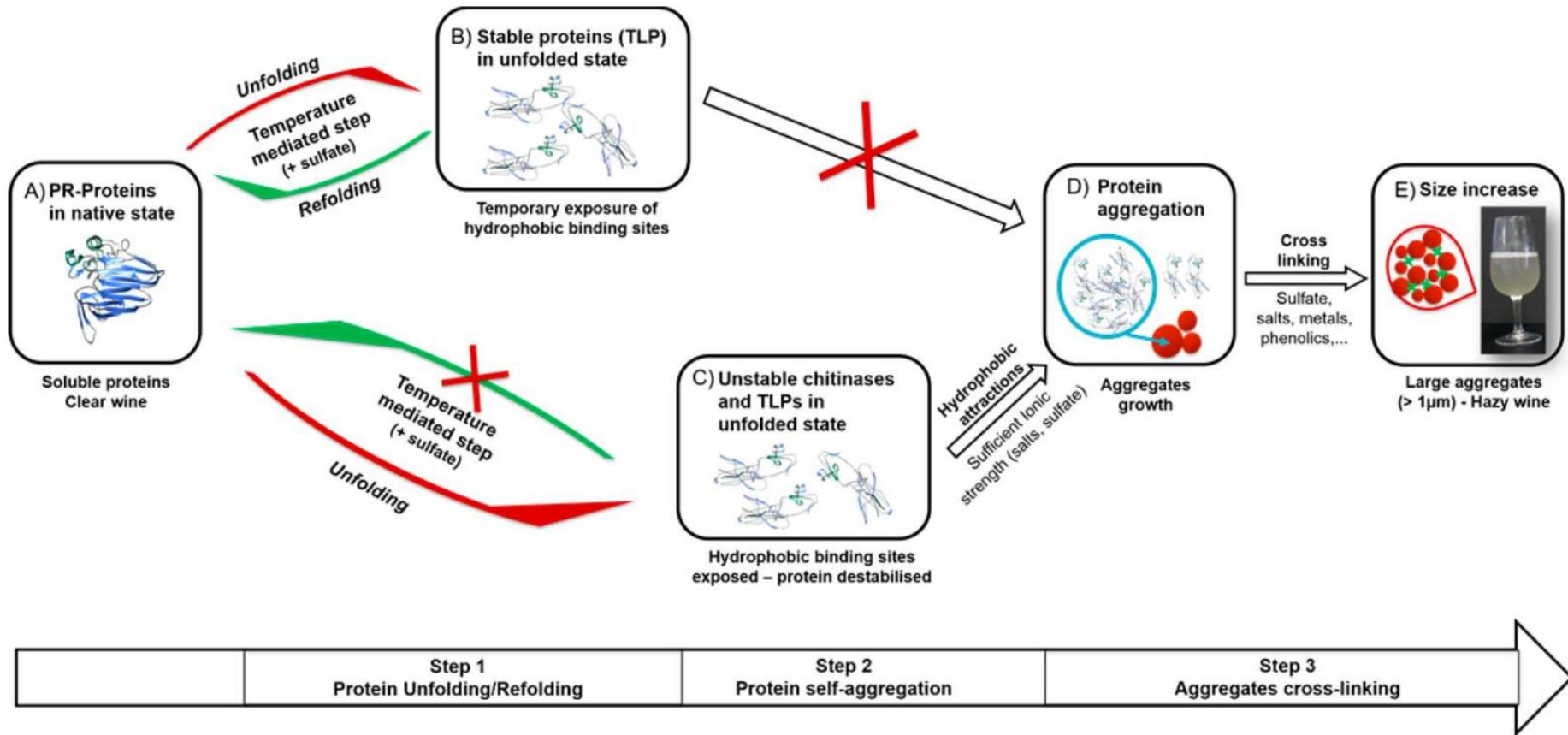


Figure 6. Revised unfolding and aggregation mechanisms of heat-unstable proteins in wine.

In enologia non tutte le proteine sono problematiche alcune di origine vegetale, come quelle del luppolo, prevengono l'imbrunimento dovuto ai processi ossidativi, specie nei vini bianchi.

L'effetto chiarificante delle proteine del glutine e di altre d'origine vegetale si sono già dimostrate efficaci nei processi di chiarifica dei vini rossi.

Le proteine non sono i componenti maggiormente presenti nel vino, ma svolgono ruoli determinanti che influiscono sulla qualità del prodotto finale.

Le proteine nel vino prendono parte a diversi processi: interagiscono con i tannini, partecipano alla formazione del perlage nella presa di spuma e sono causa di instabilità soprattutto nei vini bianchi.

Le proteine vegetali sono efficaci nel processo di vinificazione mantenendo inalterata la qualità del vino. I collaggi proteici hanno la funzione di illimpidire il vino, aumentarne la filtrabilità, diminuire l'astringenza data da tannini giovani, ma anche ridurre l'ossidabilità nei vini bianchi.

