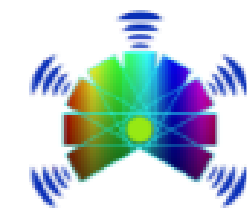




Società Chimica Italiana
Divisione di Didattica
Chimica

**VI SCUOLA NAZIONALE DI DIDATTICA DELLA CHIMICA
"GIUSEPPE DEL RE"
XIII SCUOLA DI RICERCA EDUCATIVA E DIDATTICA CHIMICA
"ULDERICO SEGRE"
17 – 30 novembre 2021**



Piano Nazionale
Lauree Scientifiche

La complessità chimica del mondo biologico

Esempi di esperimenti con particolare interesse didattico e con
risvolti inter- e trans-disciplinari

29 novembre 2021

Estrazione di Ficocianina da *Spirulina*

Studio correlazione legami intermolecolari, struttura 3D e funzione biologica

Anna Maria Madaio

IIS «Focaccia» Salerno

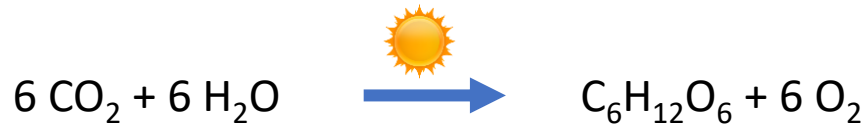
L'attività proposta

- **Obiettivi didattici:** estrazione e purificazione di una proteina, studio delle modifiche conformazionali in funzione dell'ambiente, analisi della correlazione tra struttura e funzione della proteina con analisi spettroscopica correlata.
- **Prerequisiti:** struttura della cellula procariotica, fotosintesi e pigmenti fotosintetici, proprietà e strutture delle proteine, concetti fondamentali della spettroscopia UV-Visibile.
- **Discipline coinvolte:** Chimica Organica e Biochimica, Analisi Chimica Strumentale, Tecnologie Chimiche Industriali.
- **Docenti coinvolti:** Prof. Salvatore Ruggiero, laboratorio di Chimica Organica e Biochimica

L'attività è stata svolta in una quinta classe di un istituto tecnico per chimici, ma si può adattare anche ad altri contesti scolastici (es. biennio tecnici e licei)

Cianobatteri

- Organismi fotoautotrofi in quanto sfruttano reazioni di fotosintesi per produrre sostanze organiche.



- Possiedono un complesso multiproteico di captazione della luce, ficobilisoma, situato sulle membrane fotosintetiche interne (tilacoidi), formato da pile di ficobiliproteine.
- Le ficobiliproteine sono una famiglia di proteine pigmentate che catturano l'energia luminosa e la trasferiscono alla clorofilla a del fotosistema II; sono solubili in acqua, molto stabili a temperatura ambiente e sono molto abbondanti nelle cellule dei cianobatteri.

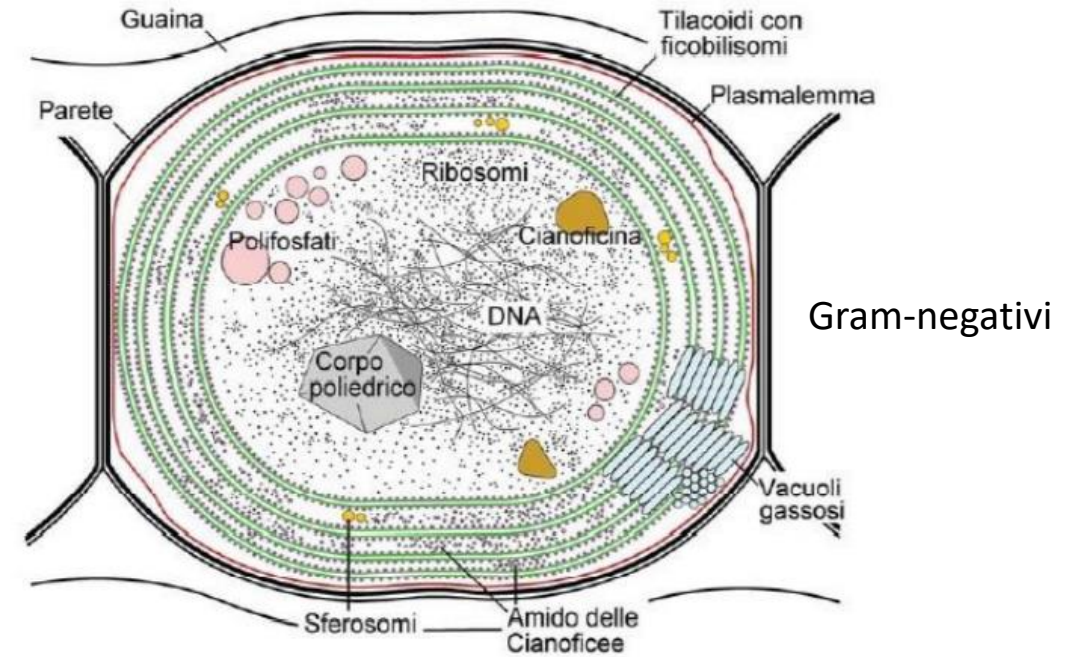


Figura 1. Organizzazione di una tipica cellula di un cianobatterio (disegno G.P.Felicini).

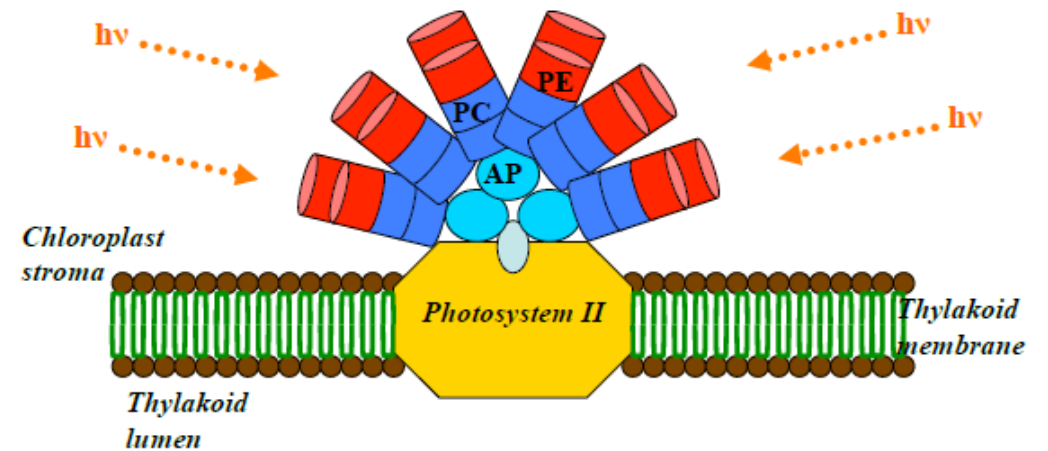


Fig. (2). Phycobilisome organization in *Arthrospira platensis* [16].

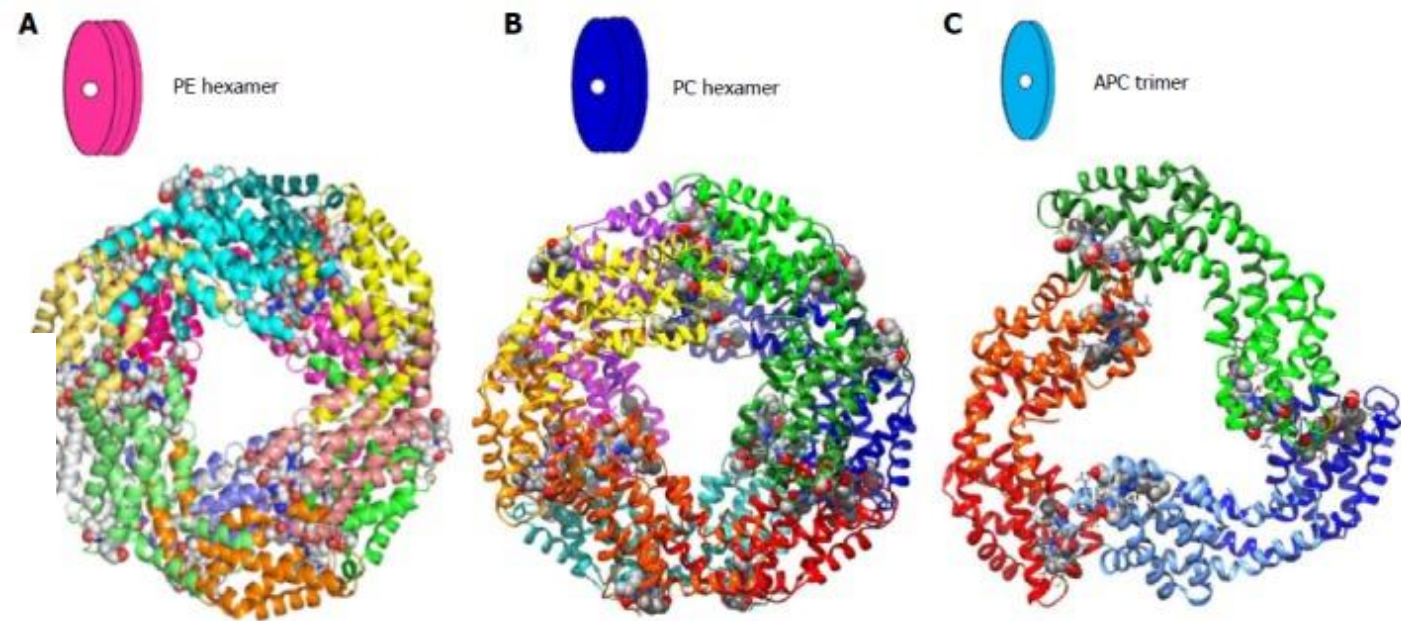
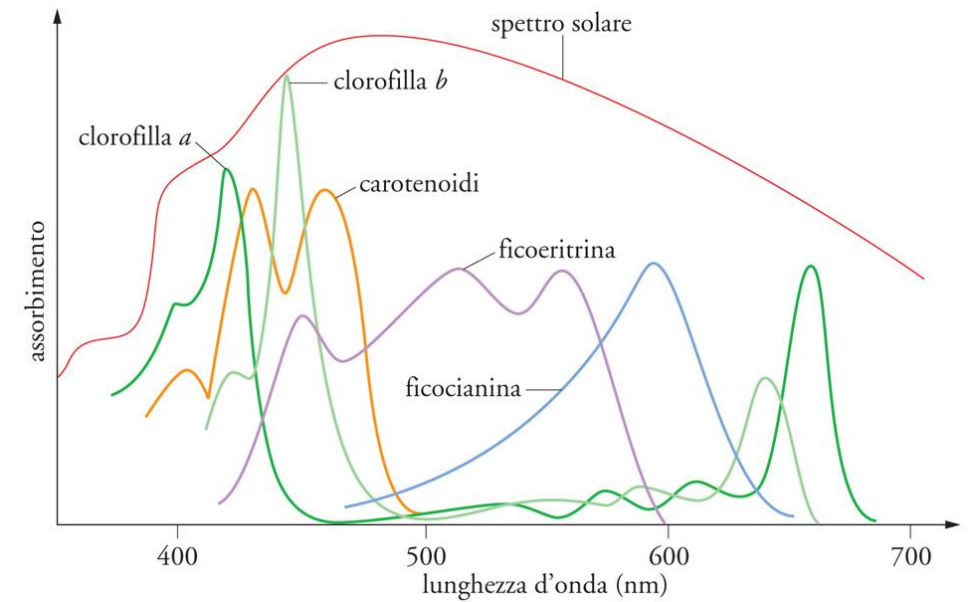
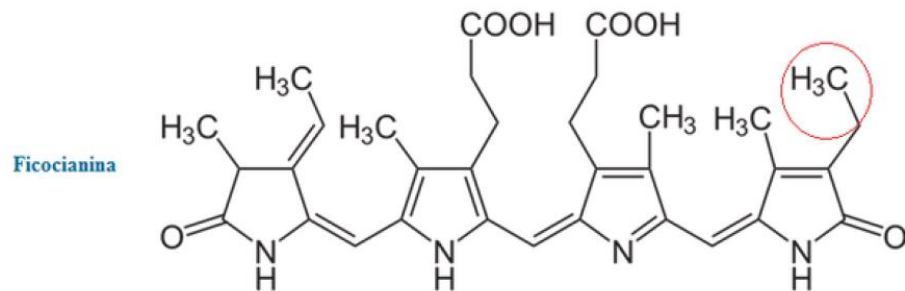
Cianobatteri: ficobiliproteine

- Le ficobiliproteine sono proteine coniugate, legate covalentemente a cromofori tetrapirrolici, **ficobiline**, che emettono **fluorescenza** e **assorbono nel visibile**, nell'intervallo **450-655 nm**, in una regione dove le clorofille non assorbono.
- Le ficobiliproteine sono solubili in acqua, hanno colori brillanti e sono formate da più catene polipeptidiche:

FICOERITRINA-esamerica

FICOCIANINA-esamerica

ALLOFICOCIANINA-trimerica



Ficobiliproteine: caratteristiche spettrali

Ficoeritrina PE, $\lambda A_{max} = 540-570 \text{ nm}$;

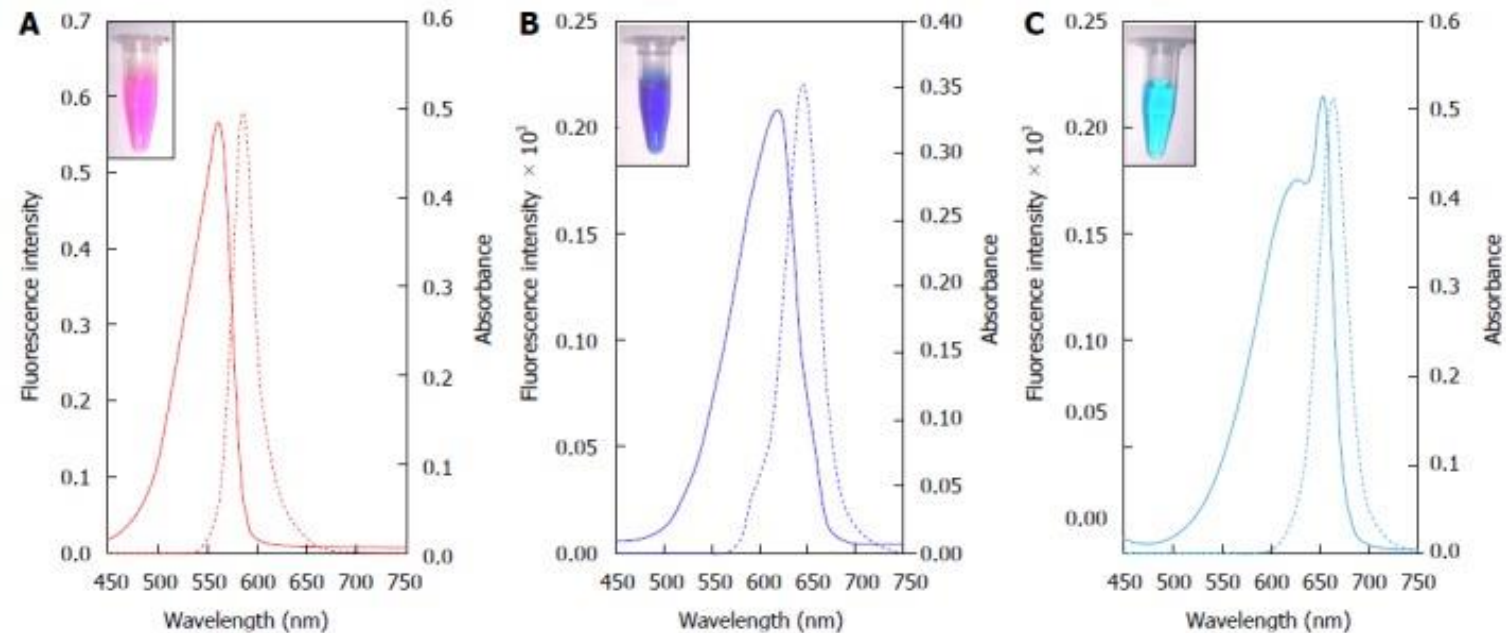
$\lambda F_{max} = 575-590 \text{ nm}$

Ficocianina PC, $\lambda A_{max} = 610-620 \text{ nm}$;

$\lambda F_{max} : 645-653 \text{ nm}$

Alloficocianina APC, $\lambda A_{max} = 650-655 \text{ nm}$;

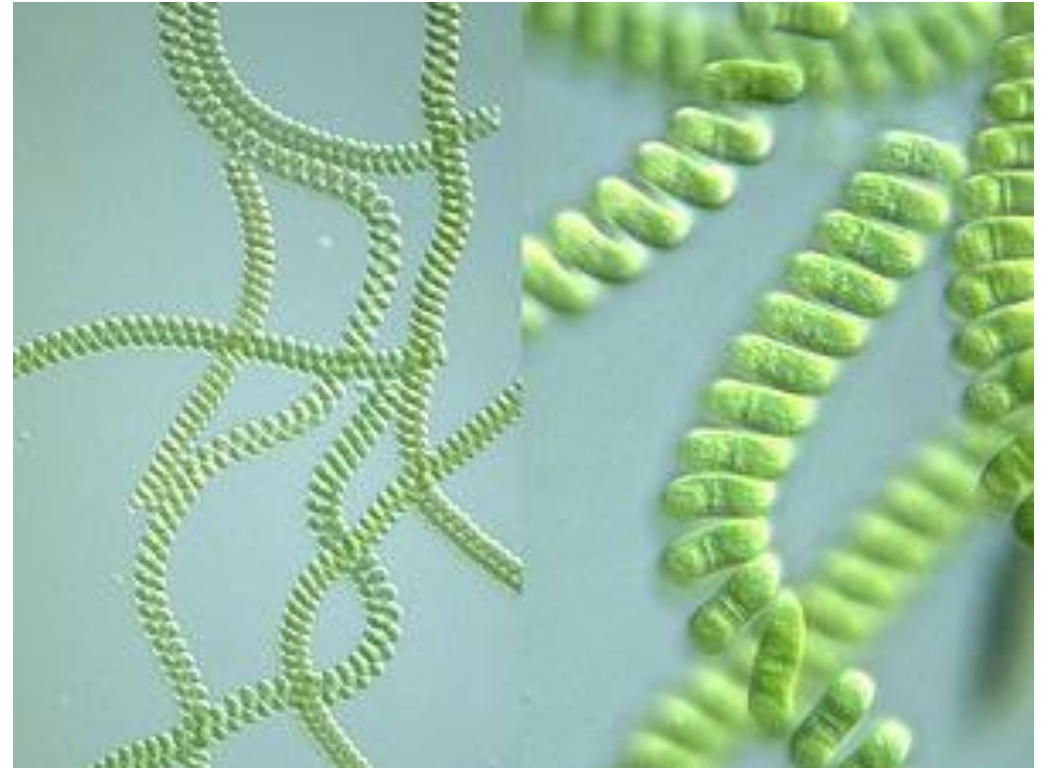
$\lambda F_{max} = 657-660 \text{ nm}$



Spettri di assorbanza UV-visibile (linea continua) ed emissione di fluorescenza (linea tratteggiata) e aspetto (riquadro) di A: ficoeritrina, B: ficocianina e C: alloficocianina.

Spirulina (*Arthrospira platensis*)

- E' un **cianobatterio** composto da singole cellule di forma cilindrica (3-12µm di diametro), impilate l'una sull'altra a formare lunghi filamenti (detti tricomi).
- Microrganismo estremofilo:
 - vive in laghi ipersalini , conc. di sale > 30 g/l,
 - pH 8.5 – 11
 - temperatura ottimale > 35 °C.
- Presente sulla Terra da oltre 3,5 miliardi di anni
- Grazie alla sua straordinaria capacità di fotosintesi e di vivere in condizioni estreme, la *Spirulina* ha avuto un ruolo decisivo nell'evoluzione della Terra e nella colonizzazione del pianeta con nuove forme di vita.



Spirulina (Arthrospira platensis)

- Utilizzata fin dai tempi preistorici come cibo dalle popolazioni africane e messicane (oro verde degli Aztechi)
- **Composizione:**
 - 55 -70% di proteine
 - 6 -10% di lipidi
 - 20% di carboidrati
 - minerali (K, Ca, Fe, Mg, Zn...)
 - vitamine (B1, B12, E...)
 - Fibre
 - Acidi poliinsaturi (acido γ -linolenico -omega-6)
 - Pigmenti fotosintetici (ficobiline, betacarotene, xantofille)

ELEVATO POTERE NUTRACEUTICO: Attualmente è uno degli integratori alimentari più comunemente usati, con elevata attività antiradicali liberi e antiossidante.

Viene impiegata anche come cibo iper-proteico per nutrire gli astronauti impegnati nelle missioni spaziali.



"I pescatori e altri vendevano dolcetti fatti di qualcosa di simile alla melma, che raccolgono da quella grande laguna. Questi si addensano e si trasformano in torte che hanno un sapore un po' come il formaggio".

The Discovery and Conquest of Mexico - Bernal Díaz del Castillo, esploratore spagnolo

Spirulina: produzione della biomassa

Arthrospira platensis viene coltivata in stagni poco profondi, vasche aperte o fotobioreattori tubolari chiusi. Il terreno di coltura contiene sali inorganici ad alta concentrazione di bicarbonato, a pH tra 9 e 10 e $T > 35^{\circ}\text{C}$.

Composizione del terreno di coltura, concentrazioni ottimali di:

- Bicarbonato di sodio
- Solfato di magnesio
- Nitrato di potassio
- Acido citrico
- Sale
- Urea
- Cloruro di calcio
- Solfato di ferro
- Solfato di ammonio



La produzione annua totale di biomassa raggiunge circa 4500t, di cui il 50% in Cina.

Lavorazione della biomassa di *Spirulina*:

Raccolta e pressatura

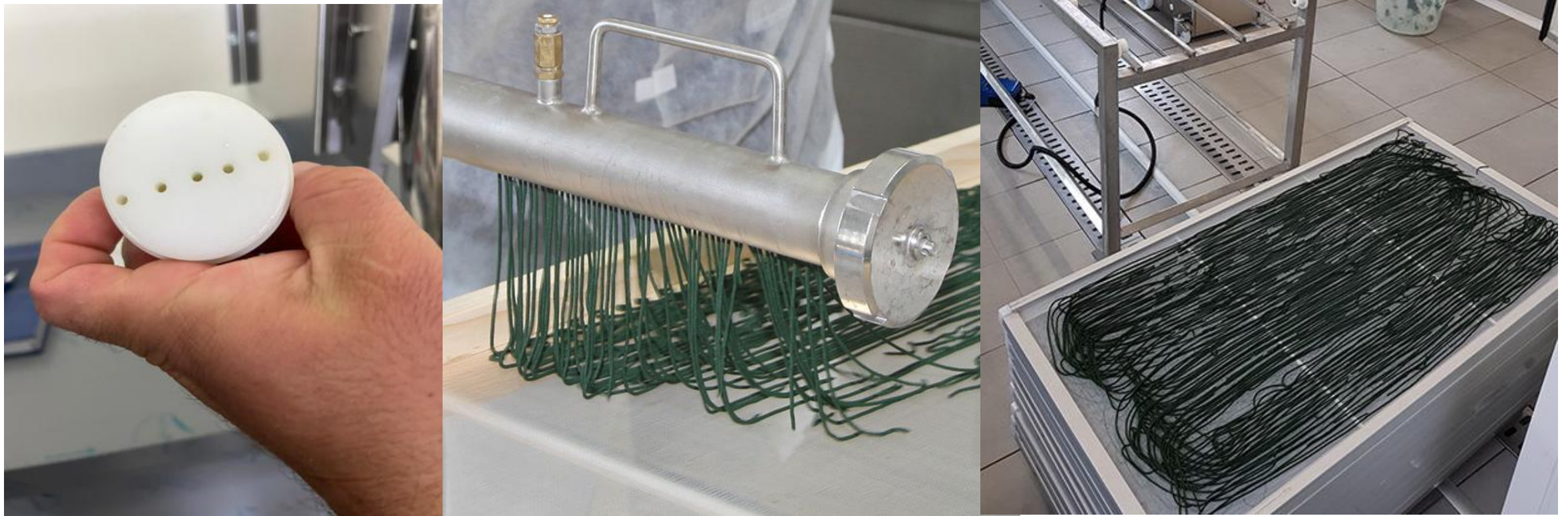
Raggiunti i sufficienti livelli di crescita e quindi di concentrazioni ottimali della Spirulina nelle vasche di coltura, la **biomassa viene raccolta e filtrata** attraverso filtri di 0,5 micron di diametro per allontanare quanta più acqua possibile, ottenendo una **pasta liquida**. Successivamente, per rimuovere l'acqua di coltura in eccesso, la pasta liquida viene **pressata** utilizzando sistemi meccanici come: sistemi di depressione, presse pneumatiche o idrauliche.



Lavorazione della biomassa di *Spirulina*:

Trafilatura ed essiccamento

La pasta d'alga viene inserita in una macchina trafiletrice che permette di ottenere spaghettoni di piccolo diametro (circa mm 1,5 a spaghetto umido) che successivamente vengono posti nella cella di essiccazione per una disidratazione a basse temperature



Lavorazione della biomassa di *Spirulina*:

Confezionamento

Gli spaghetti ottenuti vengono essiccati, sminuzzati e confezionati per la vendita.

La biomassa può essere anche prodotta in polvere e utilizzata in campo farmaceutico, alimentare e cosmetico.



Garantire modelli sostenibili di produzione e di consumo



Porre fine alla fame, raggiungere la sicurezza alimentare, migliorare la nutrizione e promuovere un'agricoltura sostenibile



Spirulina Stick

Antiossidante naturale

Senza glutine e dall'elevato potere nutritivo, la nostra Spirulina Stick è adatta ad una vita sportiva e vegana. Perfetta per chi ama lo sport, mantenersi in forma e in salute!!!

Ricca di proteine, vitamine, antiossidanti, betacarotene ed Omega 6.

50 gr

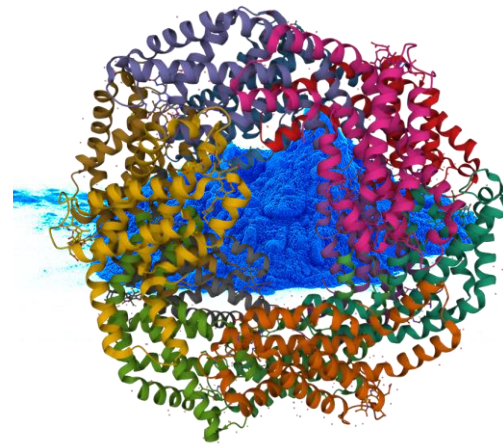
Spirulina: Ficocianina

Pigmenti fotosintetici di *Arthrospira platensis*:

Ficobiliproteine: **Ficocianina** e **Alloficocianina**

Carotenoidi: β -carotene, criptoxantina

Clorofilla a



Ficocianina (PC)

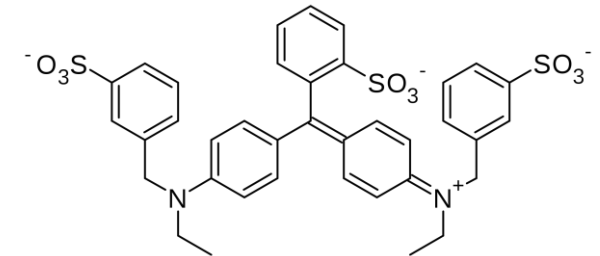
λA_{max} = 610-620 nm; **colore blu brillante**

λF_{max} : 645-653 nm; **fluorescenza rossa**

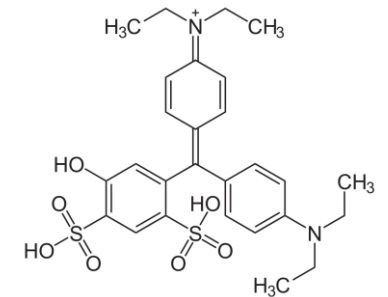
La **ficocianina** (PC) è il principale pigmento ficobiliproteico della Spirulina e rappresenta più del 20% del suo peso secco

È usata come **colorante alimentare naturale blu** nell'industria nutraceutica, alimentare e cosmetica, in alternativa ai coloranti artificiali **Blu brillante FCF (E133)** e **Patent Blue V (E131)** vietati in alcuni paesi.

Ha spiccate proprietà antiossidanti e antinfiammatorie (40 volte più potente delle vitamine C ed E contro i radicali perossidi e ossigeno-reattivi)



Blu brillante FCF (E133)



Patent Blue V (E131)

Ficocianina: struttura

<https://www.rcsb.org/3d-view/1GH0>

RCSB **PDB**
PROTEIN DATA BANK

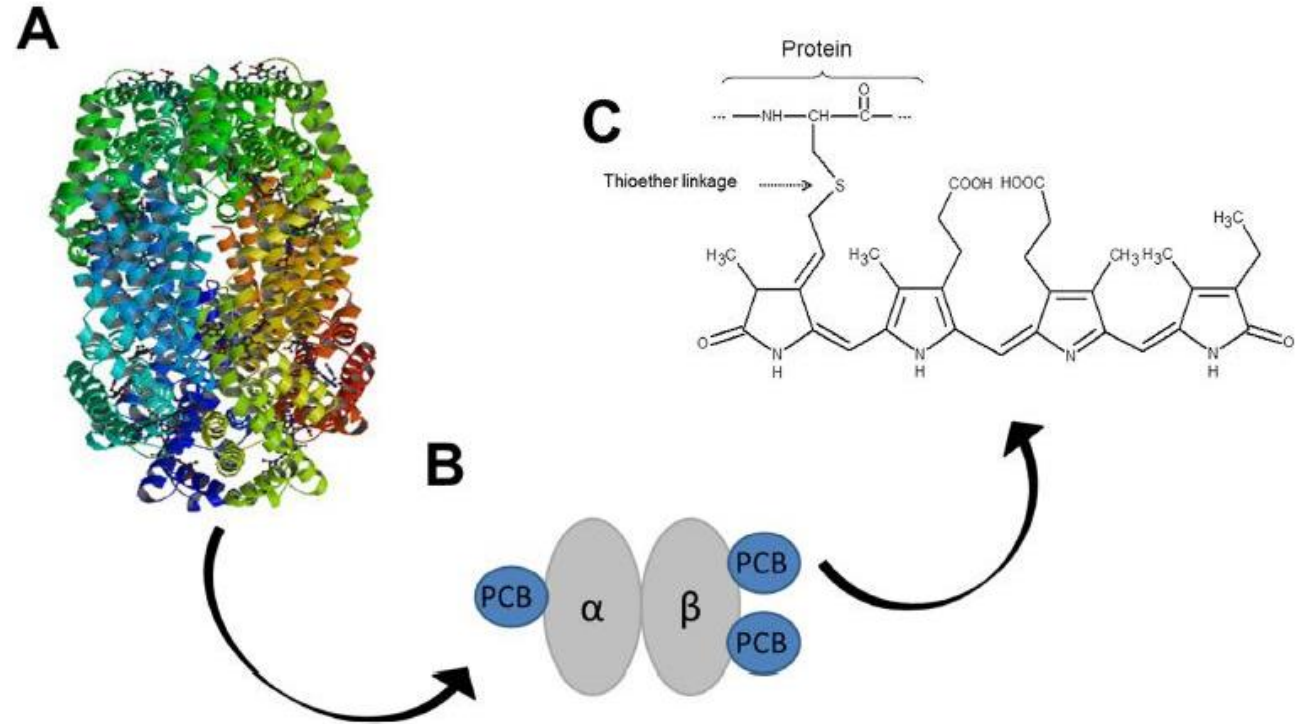
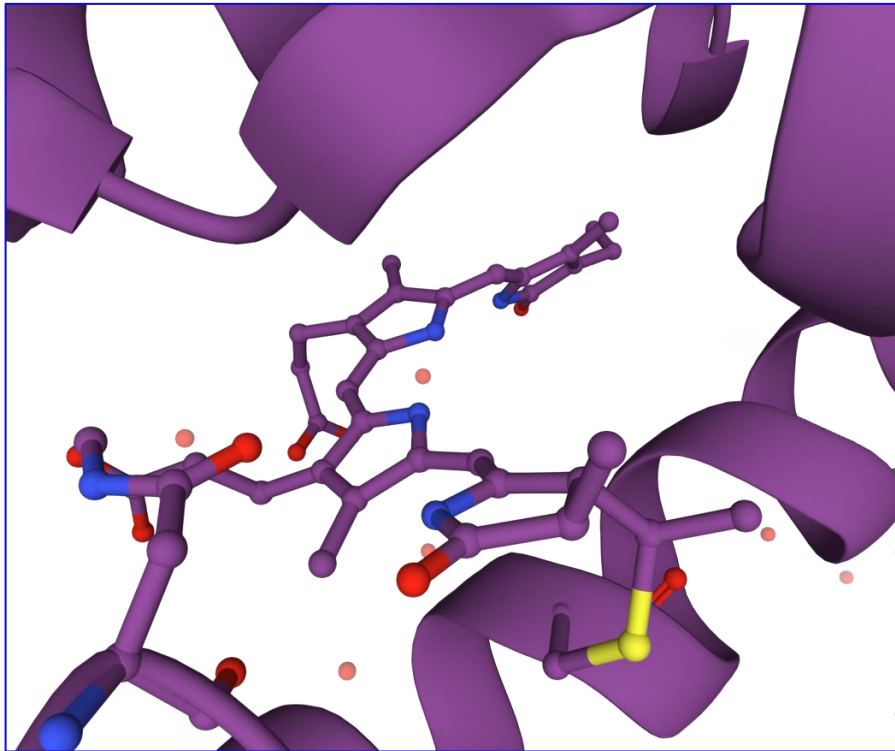


Fig. 3 – Phycocyanin (PC) structure. (A) Crystal structure of PC from cyanobacterium *S. platensis* in form of hexamer, image from PDB (<http://www.rcsb.org>) of PDB ID 1GH0 (2011). (B) Schematic representation of PC assembly. It is composed of two protein subunits, α and β chains, one phycocyanobilin (PCB) is bound to the α subunit and two PCBs are bound to the β subunit. (C) Chemical structure of PCB, the chromogen responsible of blue color of PC.

<http://nutraceutical-properties-of-phycoyanin-23313945.html>

Ficocianina e denaturazione

La denaturazione comporta la modifica dei legami intermolecolari della proteina, la perdita della struttura 3D e della funzione biologica

Lo spettro di assorbimento del cromoforo dipende dalla conformazione della proteina.

- Assorbimento nel visibile:

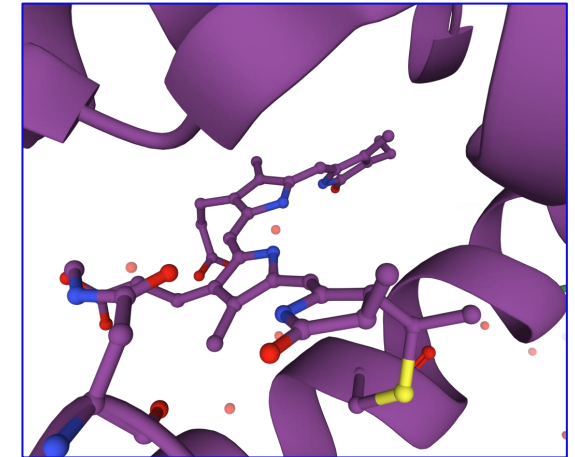
Proteina nativa: cromoforo lineare, assorbe a circa 625 nm, colore blu

Proteina denaturata: cromoforo ciclico assorbe a 370 nm, incolore

- Fluorescenza:

Proteina nativa: fluorescenza rossa a 650 nm

Proteina denaturata: nessuna fluorescenza



Evidenza sperimentale della denaturazione:

cambiamento del colore del campione, modifica della fluorescenza, variazione assorbanza a 625 nm (diminuisce) e 370 nm (aumenta)

L'attività sperimentale

In questa esperienza di laboratorio gli studenti si sono avvicinati alle tecniche di estrazione e purificazione della ficocianina da *Spirulina platensis* e allo studio della variazione delle proprietà della proteina (colore, fluorescenza, solubilità) indotta dall'azione di agenti chimico-fisici che, intervenendo sui legami intermolecolari, ne causano la denaturazione o la precipitazione.

Organizzazione didattica dell'attività

- Ricerca sul web notizie su *Spirulina* e ficocianina (studenti)
- Studio autonomo articolo *J. Chem. Educ.* **2000**, *77*, 1456 (studenti)
- Discussione in classe e pianificazione attività sperimentale
- Creazione gruppi di lavoro su attività diverse
- Realizzazione attività sperimentale (3 giorni diversi)
- Report giornaliero dei dati acquisiti e analisi critica dei risultati ottenuti

Gli studenti non hanno applicato una metodica già definita ma hanno costruito una metodica attraverso una serie di prove pianificate insieme, sperimentate e poi verificate. Hanno affrontato problemi e hanno trovato delle soluzioni ad essi.

Durata attività didattica: 9 ore

6 ore di laboratorio (tre lezioni di due ore ciascuna), 3 ore di teoria (tre lezioni di un'ora ciascuna)

Strumentazioni disponibili: Spettrofotometro UV-vis e sonicatore (laboratorio di analisi chimica); Colorimetro e Centrifuga (laboratorio di Chimica Organica)

Laboratorio

FASI

- **Estrazione della proteina**
- **Saggi di denaturazione** con Urea, etanolo e calore su Ficocianina commerciale e Ficocianina estratta in laboratorio
- **Precipitazione isoelettrica** con acido acetico di Ficocianina commerciale e Ficocianina estratta in laboratorio
- **Analisi spettroscopica** dei vari saggi effettuati e confronto dei dati ottenuti sui diversi campioni

Estrazione della proteina

Lisi cellulare

Centrifugazione dell'estratto acquoso grezzo

Precipitazione della proteina

Lisi cellulare: congelamento-scongelamento

2,5 g di spirulina in polvere in 30 mL di H₂O distillata .

Cicli di congelamento/scongelamento di 24-48 ore a -18°C



Lisi cellulare: estrazione meccanica

2,5 g di Spirulina essiccata e 2,5 g di silice sono pestate in un mortaio, successivamente trasferite in una beuta contenente 100 mL di H₂O distillata e lasciate in frigo per una settimana, in attesa della successiva lezione di laboratorio.



Lisi cellulare: estrazione con ultrasuoni

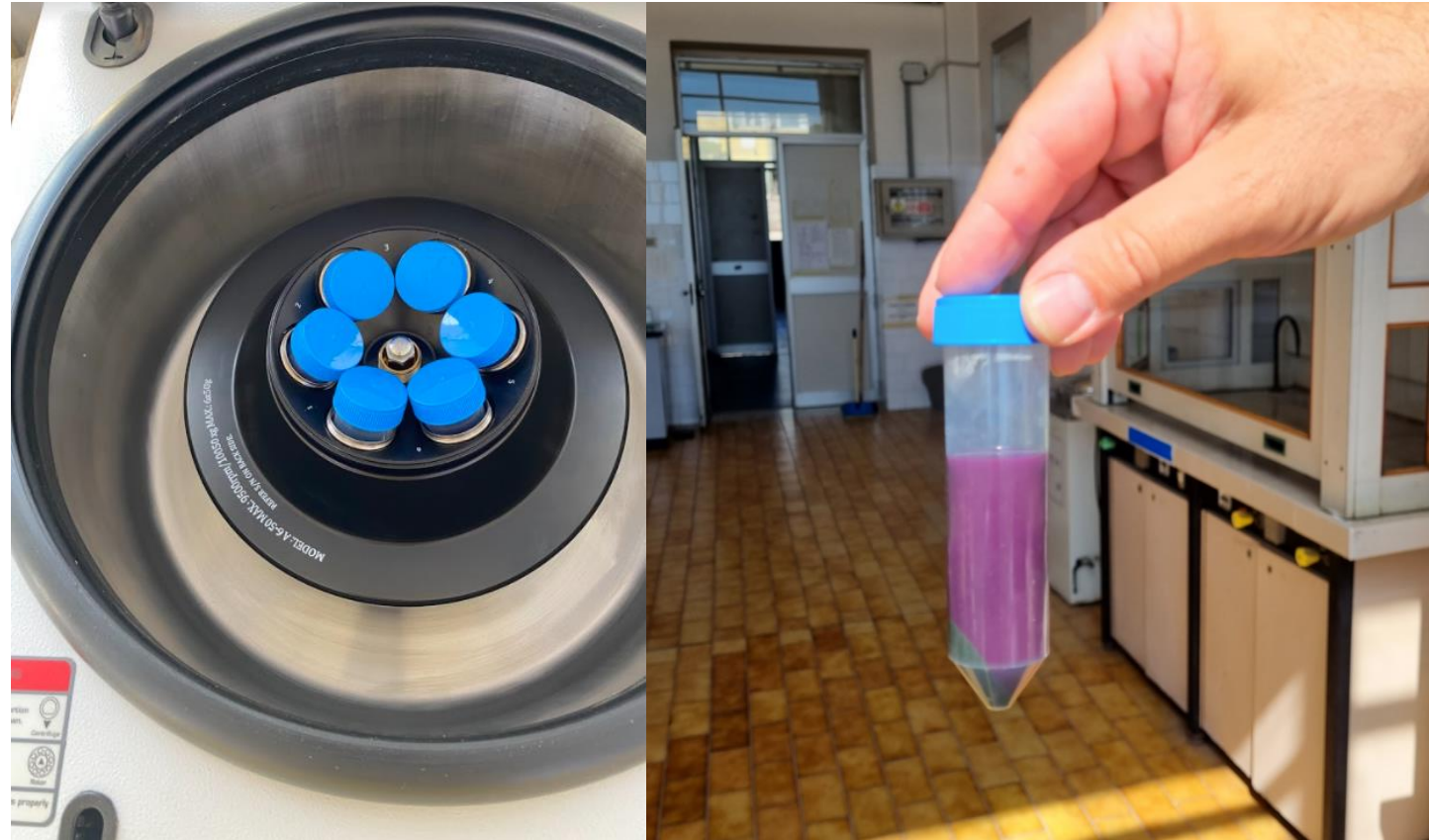
2,5 g di Spirulina essiccata e 2,5 g di silice, in 100 mL di H₂O distillata sono poste in un bagnetto a ultrasuoni per 40 minuti . La miscela ottenuta viene lasciata in frigo per una settimana...



Centrifugazione estratto acquoso grezzo di ficocianina

Gli **estratti acquosi grezzi di colore verde scuro** sono stati centrifugati a 4000 giri per 20 min per ottenere un **supernatante blu brillante**, che alla luce del sole manifesta una **fluorescenza viola** .

L'estratto acquoso grezzo di PC contiene molti altri componenti idrosolubili, come il polisaccaride, vitamine idrosolubili e altre proteine



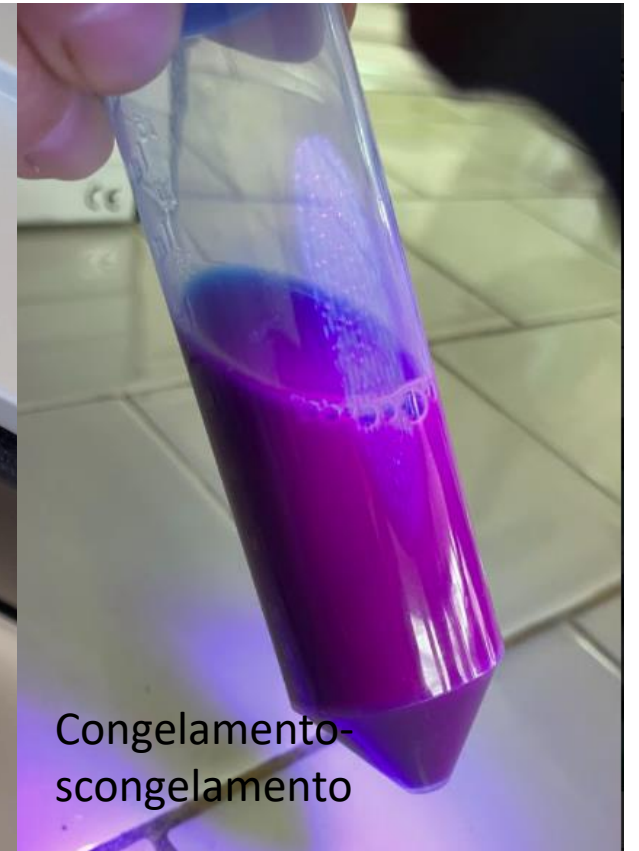
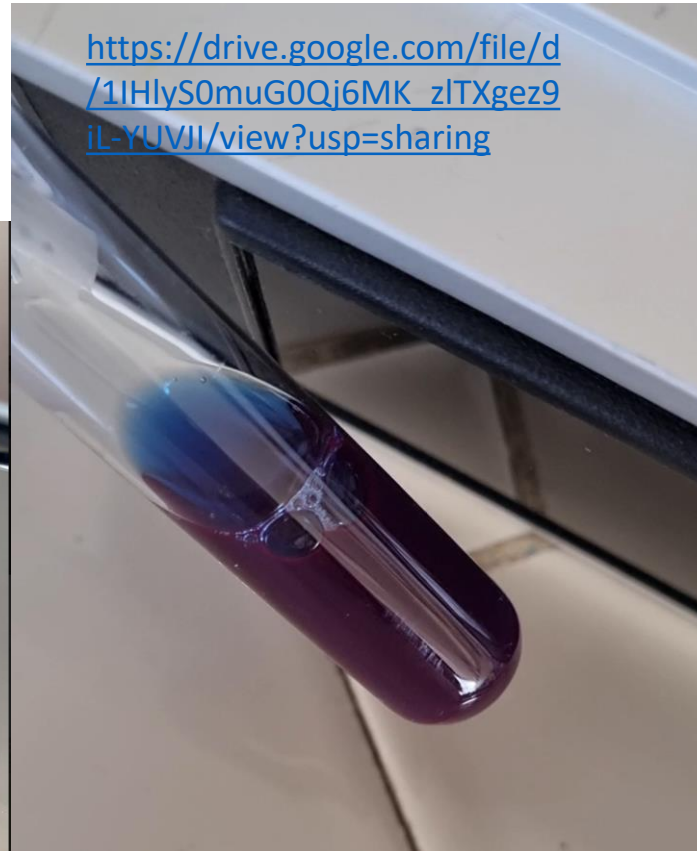
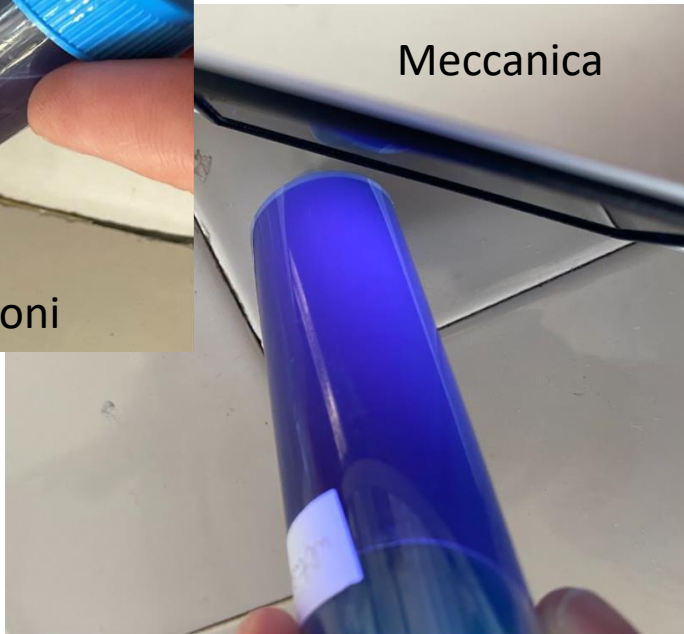
Centrifugazione dell'estratto acquoso grezzo

Il surnatante contenente la ficocianina è stato prelevato, separandolo dal precipitato verde scuro nello strato inferiore, formato dai residui cellulari e clorofilla.



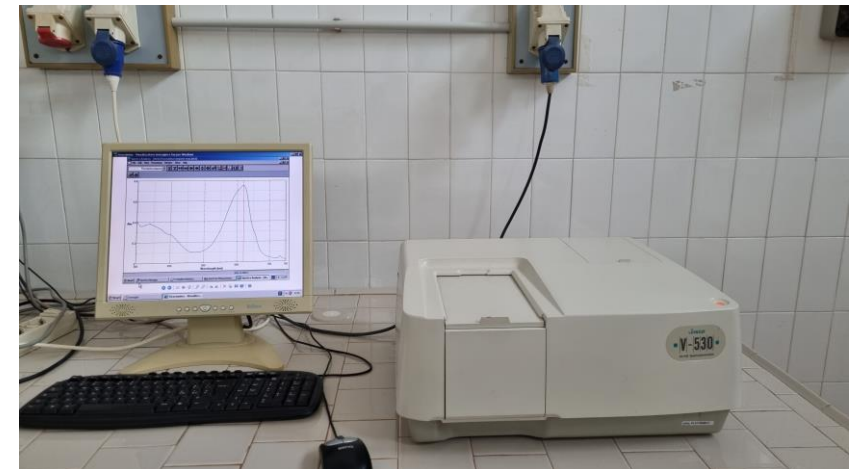
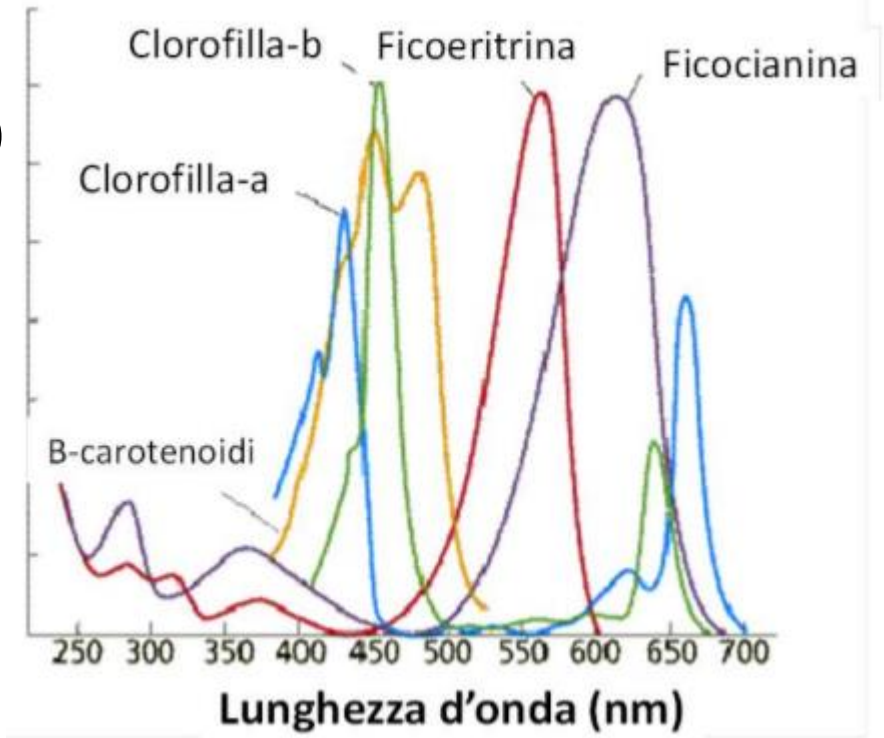
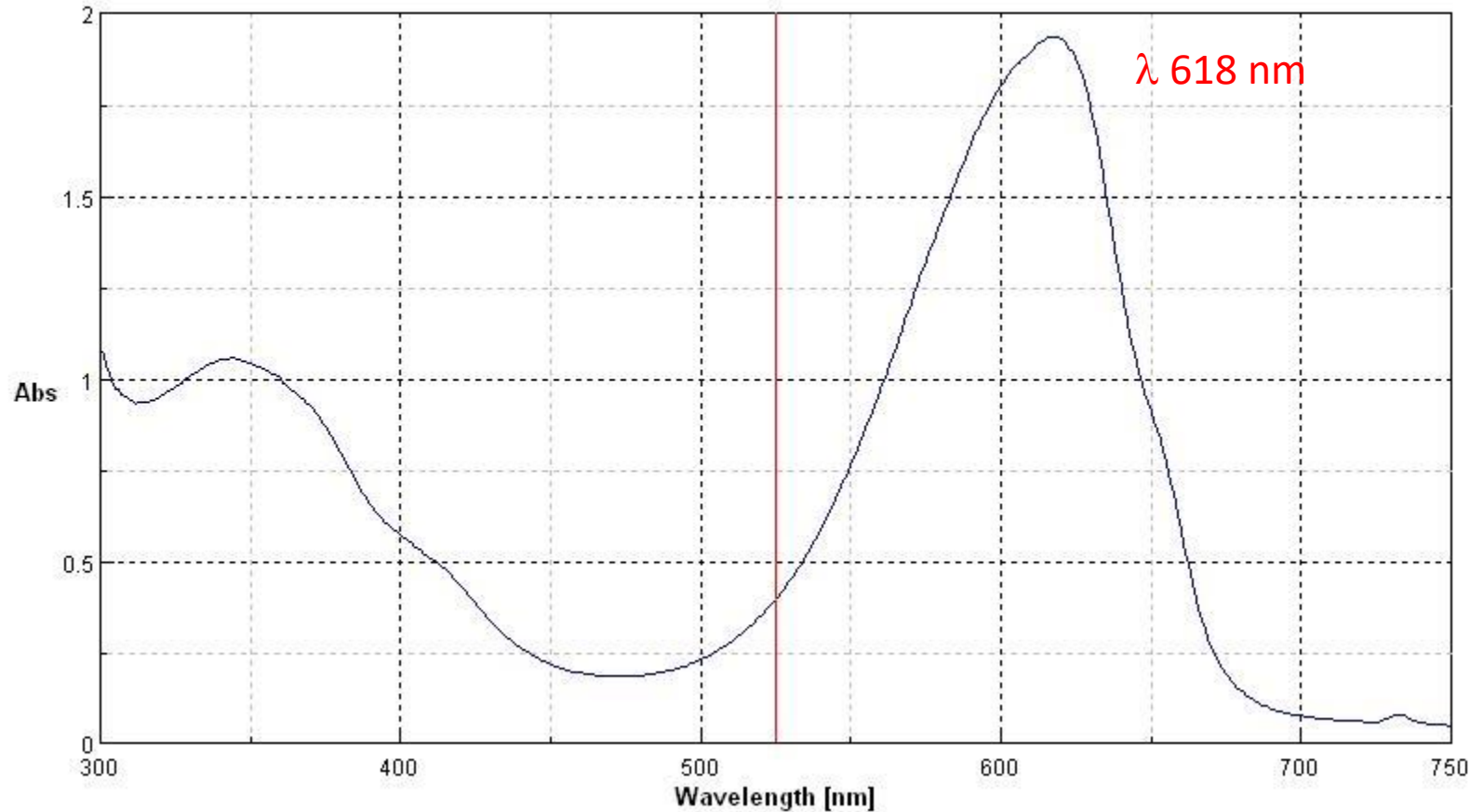
Fluorescenza dell'estratto acquoso

L'osservazione alla lampada di Wood degli estratti acquosi di colore blu confermano la presenza di una **fluorescenza viola**, visibile anche alla luce solare nelle soluzioni più concentrate, e una **fluorescenza azzurra** in quelle più diluite.

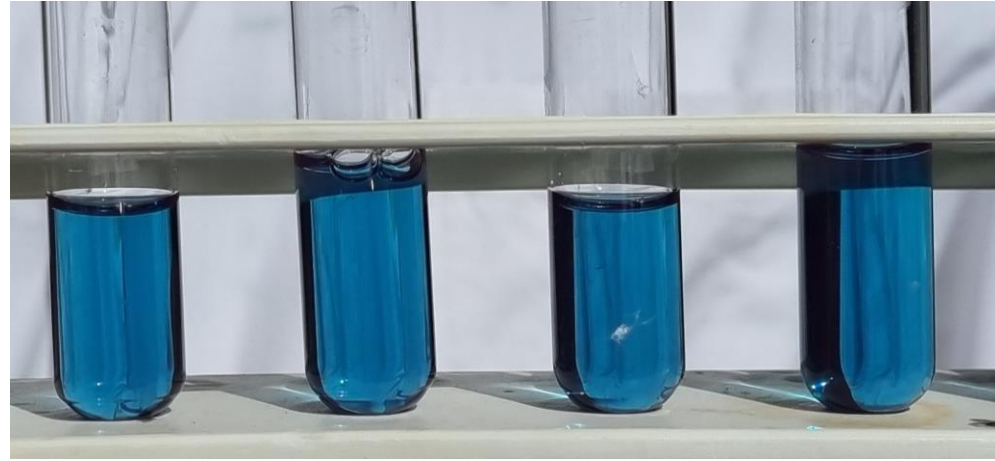


Spettro visibile estratto acquoso

Lo spettro visibile dell'estratto acquoso presenta un massimo di assorbimento a una lunghezza d'onda attribuibile alla ficocianina



Spettrofotometro a doppio raggio



Saggi di denaturazione su estratto acquoso di FC

Denaturazione con **etanolo**

Denaturazione con **urea**

Agenti denaturanti

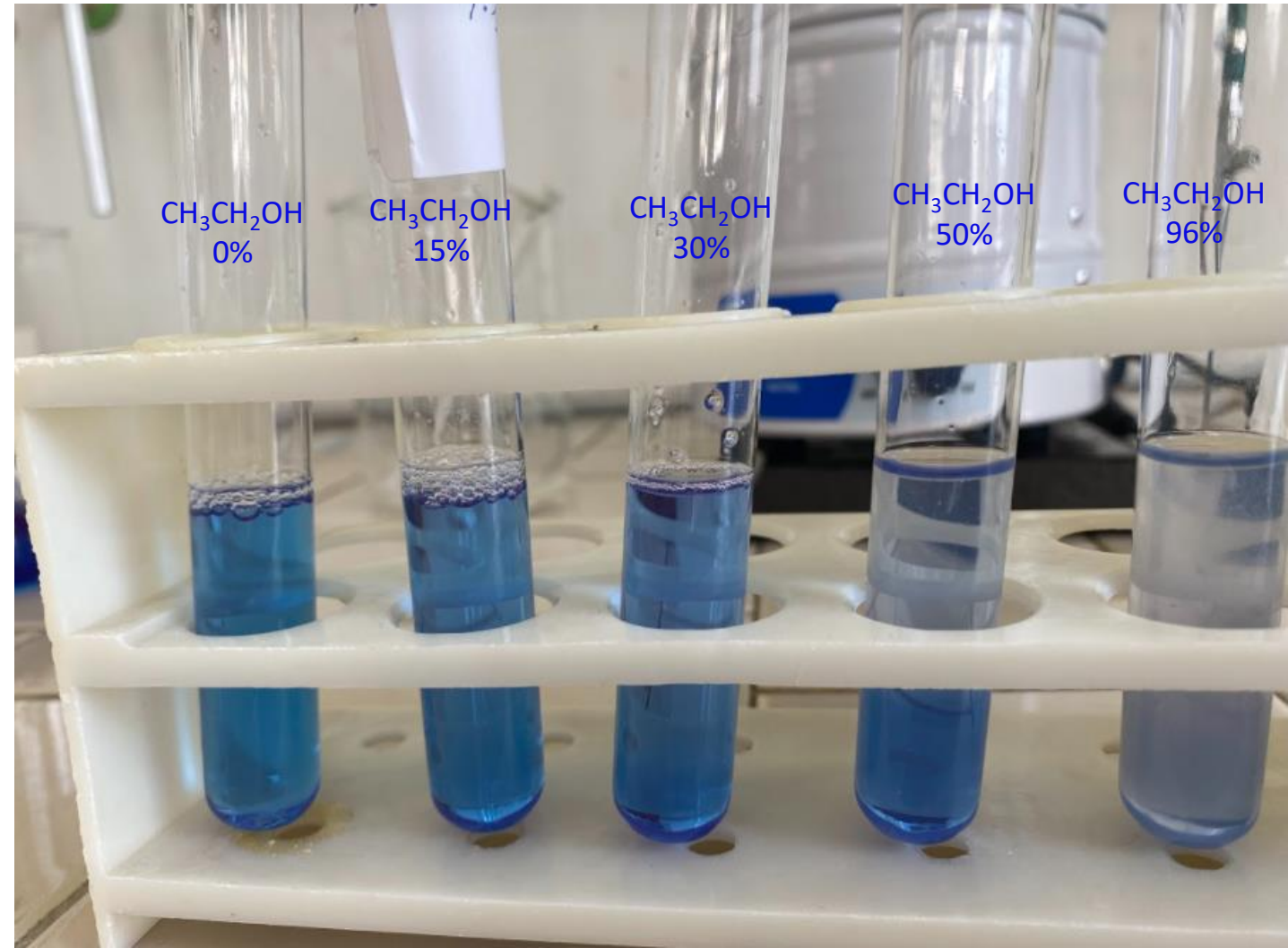
DENATURAZIONE	EFFETTO
Denaturazione con etanolo	L'etanolo diminuisce la polarità del mezzo in cui si trova la proteina. Compete con l'acqua per le interazioni idrofile con i gruppi R polari degli aminoacidi i quali si spostano verso l'interno della proteina, modificando la conformazione della proteina.
Denaturazione con urea	Interazione indiretta: l'urea si sostituisce alle molecole di acqua nell'interazione coi gruppi R degli aa Interazione diretta: l'urea forma legami a H con i legami peptidici Questa influenza reciproca indebolisce i legami e le interazioni intermolecolari, indebolendo la struttura secondaria e terziaria delle proteine

Denaturazione estratto acquoso FC con etanolo

Dai report degli studenti:

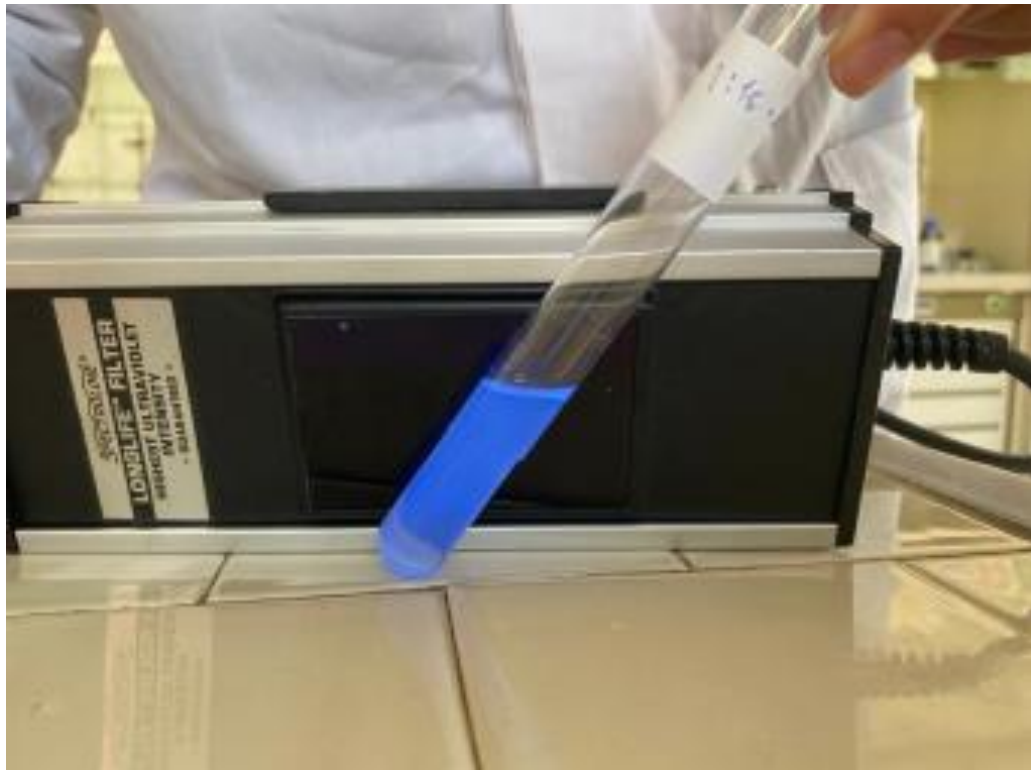
«Abbiamo denaturato la ficocianina, estratta col metodo a ultrasuoni, con **etanolo** a varie concentrazioni (**15%,30%, 50%, 96%**) e abbiamo verificato che, **diluendo l'estratto acquoso** di partenza a **1:10, 1:25 e 1:50**, e prelevando 2,5 mL di quest'ultimo e aggiungendo 2,5 mL di etanolo a varie concentrazioni, si nota un **cambiamento visivo di colore**, poiché la proteina è stata denaturata».

campioni di **ficocianina 1:10** denaturati con alcol

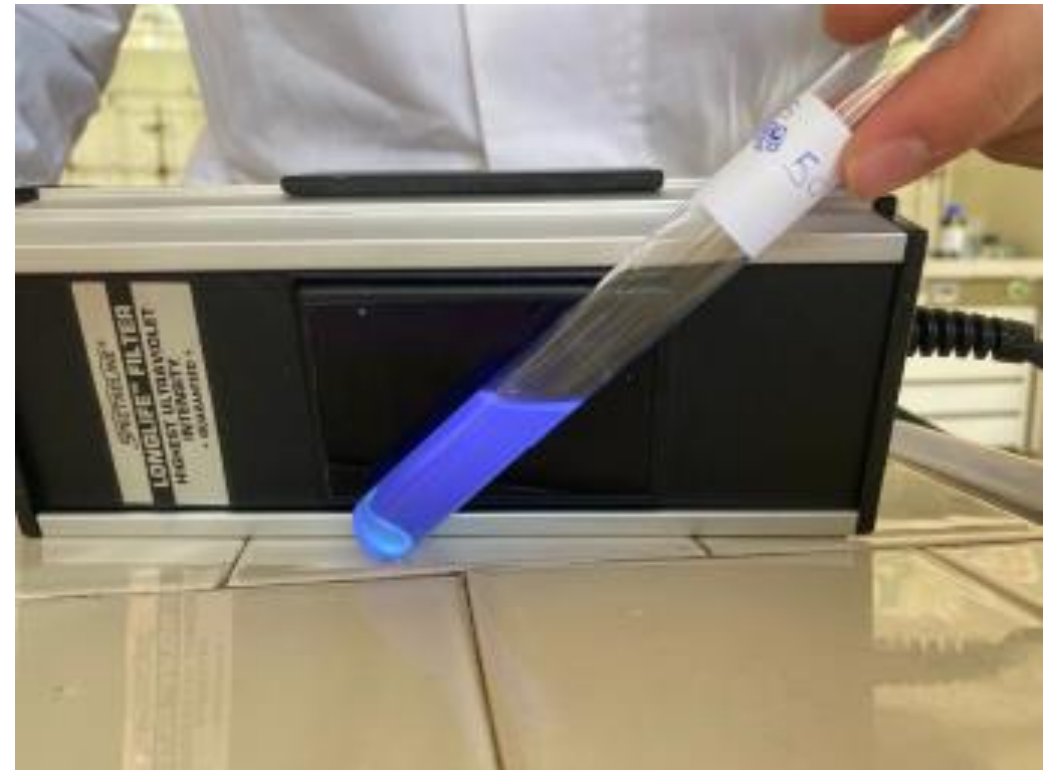


Denaturazione estratto acquoso FC con etanolo

Osservazione: nonostante il cambiamento di colore, indice di denaturazione avvenuta, il campione mantiene una **fluorescenza azzurra**.



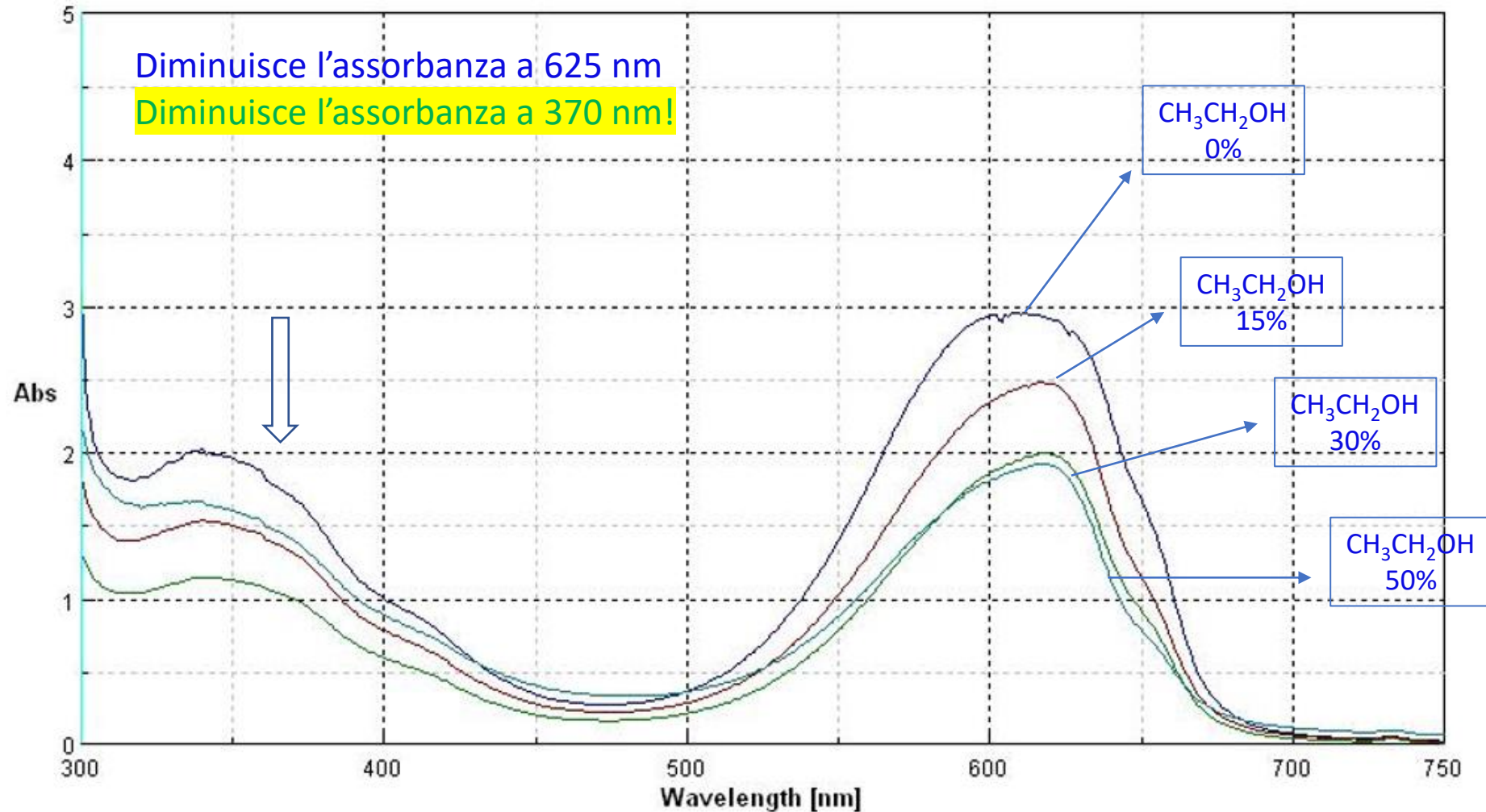
Fluorescenza **ficocianina 1:10** denaturata con alcol 50%



Fluorescenza **ficocianina 1:10** denaturata con alcol 96%

Denaturazione estratto acquoso con etanolo

Spettro visibile campione estratto acquoso diluito 1-5



Deduzione: il campione è molto concentrato, bisogna diluire.

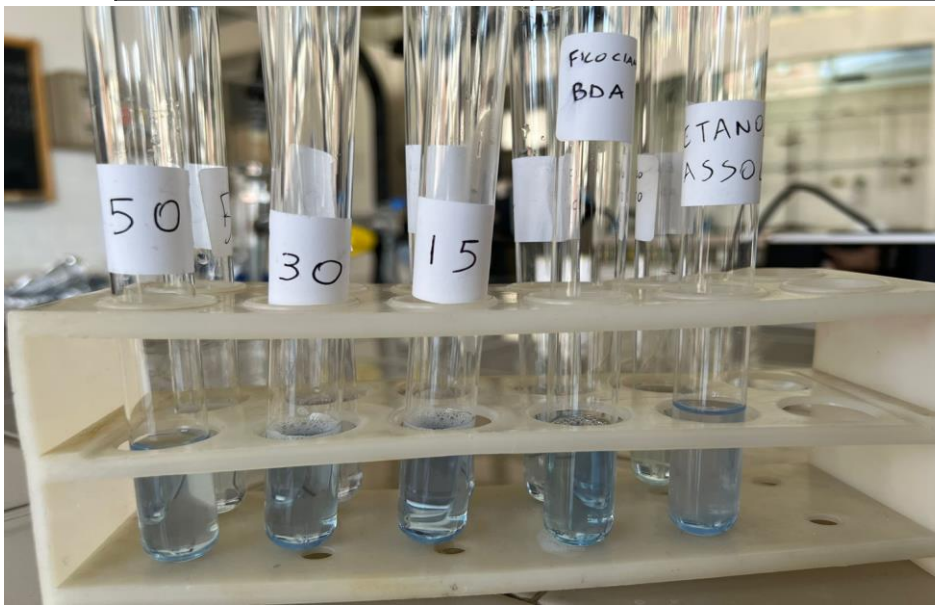
Denaturazione estratto acquoso più diluito, con etanolo

Dai report degli studenti:

«Abbiamo diluito l'estratto acquoso di partenza 1-20 e a 2,5 mL di estratto abbiamo aggiunto 2,5 mL di etanolo a differente concentrazione»

Concentrazione di etanolo	625 nm	370 nm
0%	0,259	0,200
15%	0,231	0,196
30%	0,219	0,206
50%	0,210	0,321

«Osserviamo che i risultati non sono quelli attesi. Nonostante la denaturazione sia visibile a occhio nudo come cambiamento di colore, i valori delle assorbanze alla lunghezza d'onda di 625 e 370 nm variano di poco. Tutti i campioni conservano una inspiegabile fluorescenza azzurra».



Spettrofotometro a singolo raggio



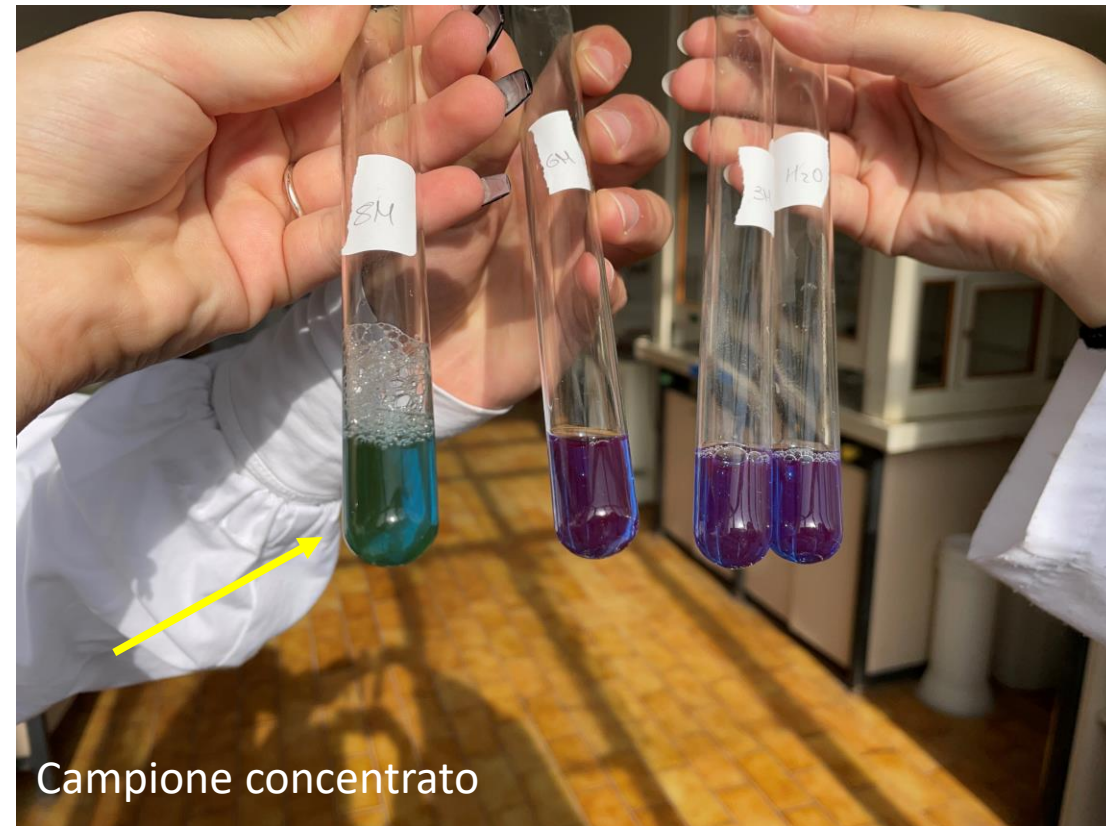
Denaturazione estratto acquoso con urea

Dai report degli studenti:

«A partire dall'estratto acquoso, senza diluire, abbiamo preparato 4 provette con:

- 1) 2,5mL ficocianina + 2,5mL acqua
- 2) 2,5mL ficocianina + 2,5mL urea 3M
- 3) 2,5mL ficocianina + 2,5mL urea 6M
- 4) 2,5mL ficocianina + 2,5mL urea 8M

«Abbiamo osservato il cambiamento del colore e della fluorescenza delle soluzioni di ficocianina con differente concentrazione di Urea e abbiamo notato che solo nella 4^a provetta la soluzione cambiava colore, diventando verde-azzurro, e che, **alla luce del sole**, nelle prime 3 provette c'era ancora **fluorescenza viola**, mentre nella 4^a una debole **fluorescenza azzurrognola**»



Denaturazione estratto acquoso con urea

Dai report degli studenti:

«Abbiamo preparato **altre 4 provette** con 2,5mL di estratto acquoso di ficocianina e 5,0 mL di acqua, in modo da **diluire** la ficocianina di 2 volte, e abbiamo aggiunto le soluzioni a diversa Molarità di Urea»:

1. (2,5mL ficocianina + 5mL acqua) + 2,5mL acqua
2. (2,5mL ficocianina + 5mL acqua) + 2,5mL urea 3M
3. (2,5mL ficocianina + 5mL acqua) + 2,5mL urea 6M
4. (2,5mL ficocianina + 5mL acqua) + 2,5mL urea 8M

«Anche in questo caso non abbiamo ottenuto i risultati che ci saremmo aspettati, poiché **le soluzioni non si decolorano** e, alla luce del sole, **la fluorescenza persiste in tutte**»



campione più diluito

Osservazioni su denaturazione estratto acquoso con urea

Il dubbio principale degli studenti era sui 2 diversi risultati nella provetta con **urea 8M**:

1. con la ficocianina concentrata + 2,5 mL di urea 8 M il colore della soluzione cambia
2. con la ficocianina diluita 2 volte + 2,5 mL di urea 8 M il colore della soluzione non cambia.

Gli studenti hanno dedotto che sussiste un **problema di concentrazione**:

1. **Concentrazione di ficocianina troppo elevata** per la concentrazione di urea utilizzata, nel primo caso
2. **Concentrazione di ficocianina troppo diluita** per la concentrazione di Urea utilizzata, nel secondo caso.



Errore commesso: diluendo un certo volume di urea 8 M nello stesso volume di soluzione, o un volume quadruplo, di fatto la concentrazione di Urea nel campione diventa $\frac{1}{2}$ (4 M) o $\frac{1}{4}$ (2 M) di quella iniziale!

Problemi da risolvere

1. Trovare le concentrazioni ottimali di estratto acquoso e di denaturanti da usare per avere risultati consistenti e saggi riproducibili
2. Capire come mai la fluorescenza persiste nonostante la denaturazione



Necessità di acquistare la ficocianina commerciale come riferimento e utilizzarla per verificare la fluorescenza originaria e per la messa a punto dei saggi.

Ficocianina commerciale: fluorescenza rossa!

Dai report degli studenti:

«Abbiamo preparato una soluzione di ficocianina commerciale e l'abbiamo analizzata alla lampada di Wood: la soluzione non presenta una **fluorescenza viola**, come il nostro estratto acquoso, **ma rossa!**»



«Abbiamo dedotto che la ficocianina da noi estratta non è pura e che la fluorescenza viola è dovuta alla sovrapposizione della fluorescenza rossa della ficocianina alla fluorescenza di altre sostanze presenti nell'estratto acquoso; infatti, una fluorescenza residua azzurra permane anche dopo la denaturazione della ficocianina.»



COSA FARE?

- 1) Testare i saggi di denaturazione prima sulla ficocianina commerciale
- 2) Purificare la proteina contenuta nell'estratto acquoso, precipitandola con solfato di ammonio
- 3) Confrontare la fluorescenza della ficocianina commerciale con quella della proteina purificata in laboratorio.

Saggi di denaturazione su FC commerciale

Denaturazione con **etanolo**

Denaturazione con **urea**

Obiettivo: Ricercare le concentrazioni ottimali di Ficocianina commerciale e di denaturanti da usare per avere risultati consistenti e saggi riproducibili

Ficocianina commerciale: denaturazione con etanolo

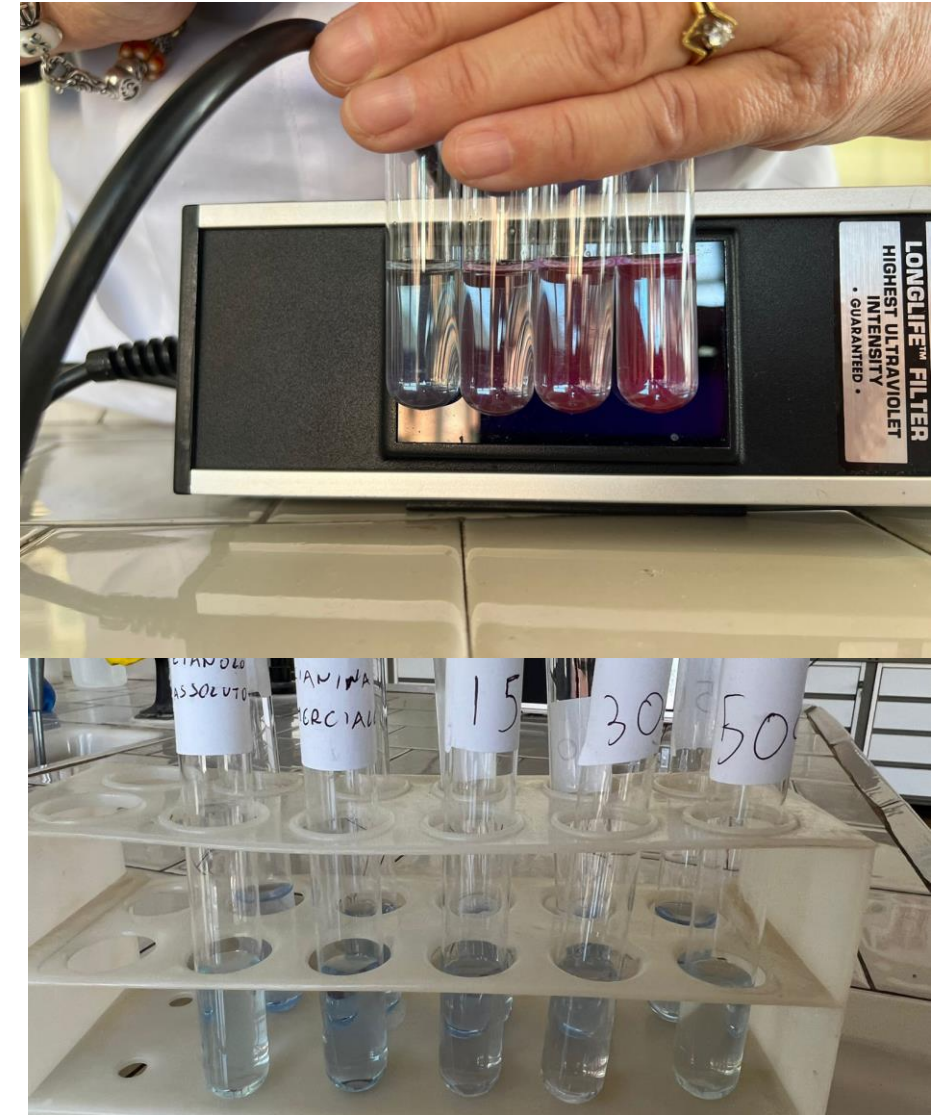
2,5 ml di soluzione di **ficocianina commerciale 0,2 g/L** + 2,5 ml di etanolo a varie concentrazioni.

Risultato:

- Le soluzioni si decolorano gradualmente
- I valori di assorbanza a 625 e 370 nm variano con coerenza
- Non è presente una fluorescenza azzurra
- La fluorescenza rossa scompare gradualmente con la denaturazione!

Problema: soluzioni troppo diluite e valori di assorbanza molto bassi

2,5 mL Campione +	625 nm	370 nm
2,5 mL H ₂ O	0,185	0,061
2,5 mL etanolo 15%	0,142	0,066
2,5 mL etanolo 30%	0,104	0,075
2,5 mL etanolo 50%	0,083	0,138



Denaturazione Ficocianina commerciale con urea

A partire da **Ficocianina commerciale 0,2 g/L**, 5 provette con:

- 1) 2,5mL ficocianina + 0 g urea
- 2) 2,5mL ficocianina + 0.25 g urea
- 3) 2,5mL ficocianina + 0,50 g urea
- 4) 2,5mL ficocianina + 0,75 g urea
- 5) 2,5mL ficocianina + 1,00 g urea

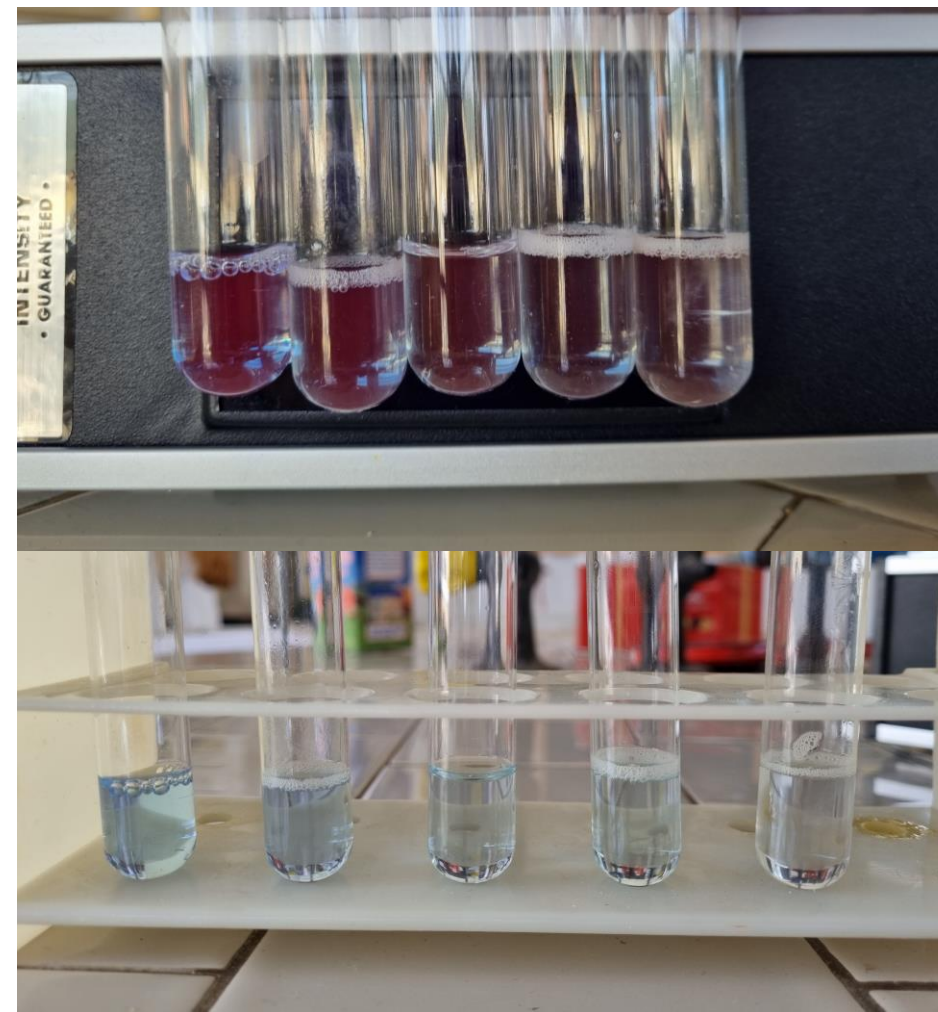
Risultato:

- Le soluzioni si decolorano gradualmente
- I valori di assorbanza a 625 e 370 nm variano con coerenza
- Non è presente una fluorescenza azzurra
- La fluorescenza rossa scompare gradualmente con la denaturazione!

Problema: soluzioni troppo diluite e valori di assorbanza molto bassi

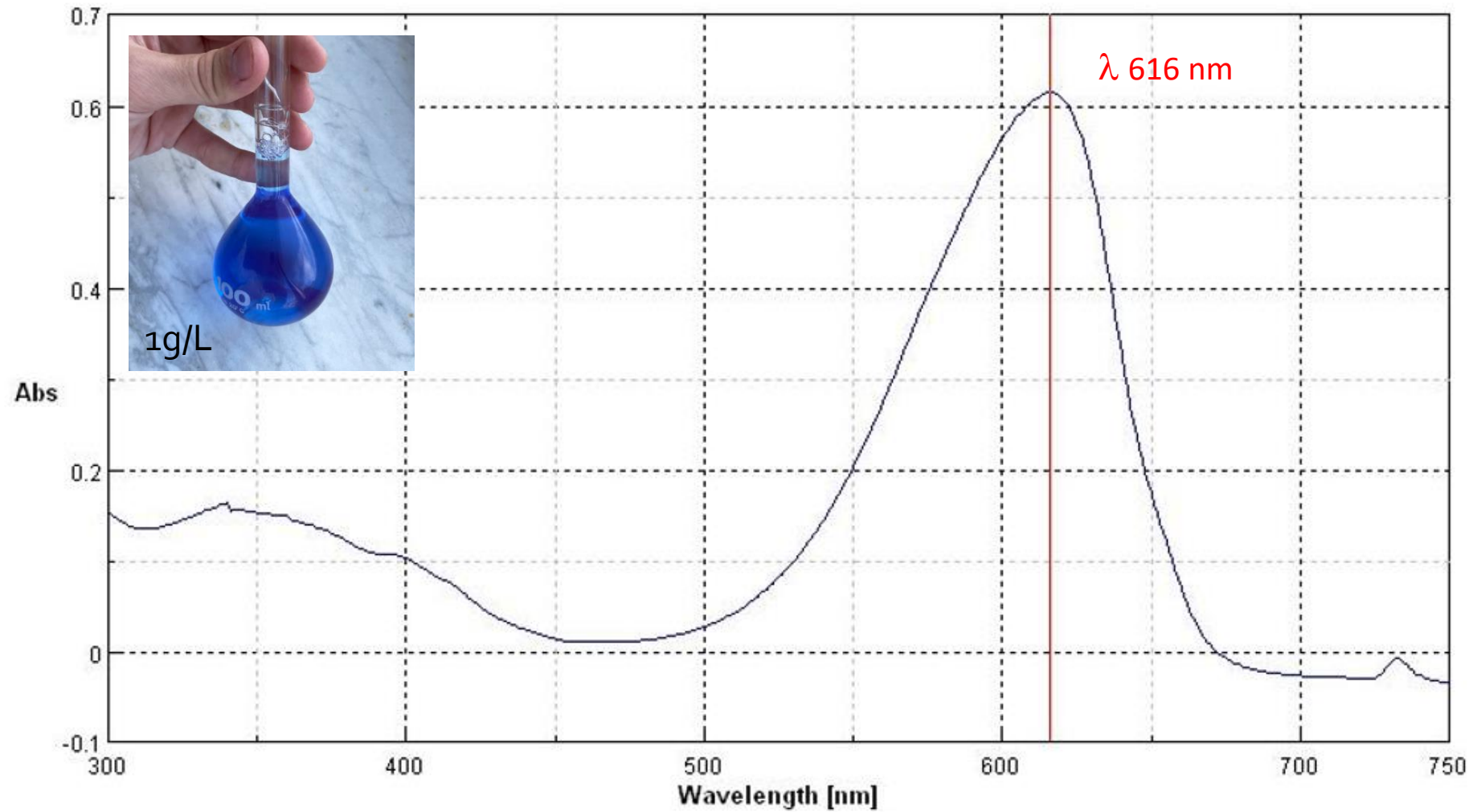
Campione + UREA	625 nm	370 nm
0 g	0,185	0,061
0.25 g/2,5 mL (ca 1,7 M)	0,166	0,113
0,50 g/2,5 mL (ca 3,3 M)	0,123	0,123
0,75 g/2,5 mL (ca 5,0 M)	0,087	0,127
1,00 g/2,5 mL (ca 6,7 M)	0,088	0,182

Aggiunte di **quantità pesate di urea solida**, nello stesso volume di soluzione di FC commerciale e calcolo della Molarità.



Spettro visibile di Ficocianina commerciale

Soluzione di **Ficocianina commerciale** più concentrata: **1g/L**: concentrazione di riferimento



Problemi da risolvere

Dai report degli studenti:

«Riflettendo sulle reali concentrazioni di denaturante nelle soluzioni, abbiamo deciso di denaturare i nostri campioni in una **concentrazione finale di denaturante** pari a Urea 2 M, 4 M, 6 M, 8 M e 25% etanolo, 30% etanolo, 35% etanolo, 40% etanolo e 48% etanolo)»



Per fare questo, gli studenti hanno aggiunto nelle provette contenenti la soluzione di ficocianina commerciale 1g/L:

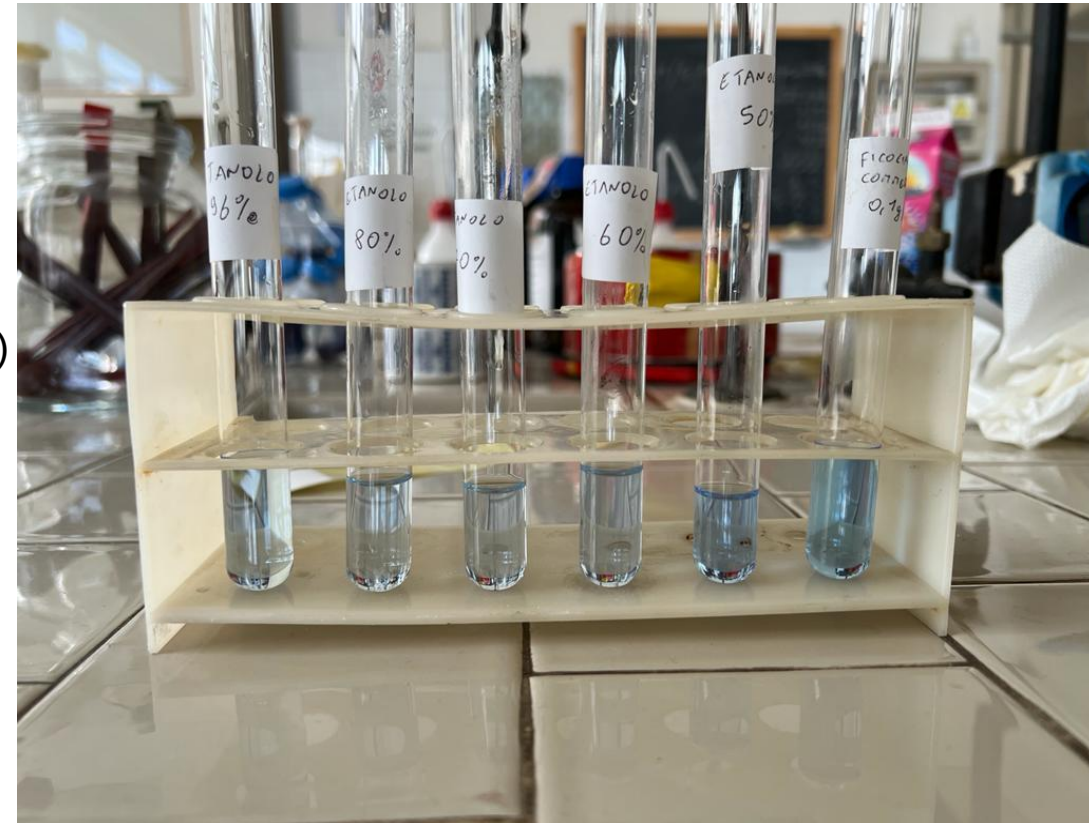
- una quantità pesata di Urea tale da raggiungere le concentrazioni molari desiderate
- soluzioni di etanolo a concentrazione doppia rispetto a quella finale del saggio di denaturazione

Denaturazione Ficocianina commerciale 1g/L in etanolo a varie concentrazioni

Dai report degli studenti:

«Per verificare la denaturazione in etanolo, abbiamo preparato 4 soluzioni di etanolo al 50%, 60%, 70%, 80% e per registrare gli spettri abbiamo preparato 6 provette in cui abbiamo aggiunto:

- 1) 2.5mL di **ficocianina 1g/L** + 2.5mL di acqua distillata (0% etanolo)
- 2) 2.5mL di ficocianina 1g/L + 2.5mL di etanolo 50% (25% etanolo)
- 3) 2.5mL di ficocianina 1g/L + 2.5mL di etanolo 60% (30% etanolo)
- 4) 2.5mL di ficocianina 1g/L + 2.5mL di etanolo 70% (35% etanolo)
- 5) 2.5mL di ficocianina 1g/L + 2.5mL di etanolo 80% (40% etanolo)
- 6) 2.5mL di ficocianina 1g/L + 2.5mL di etanolo 96% (48% etanolo)



Risultato: le soluzioni si decolorano progressivamente

Denaturazione Ficocianina commerciale 1g/L in etanolo

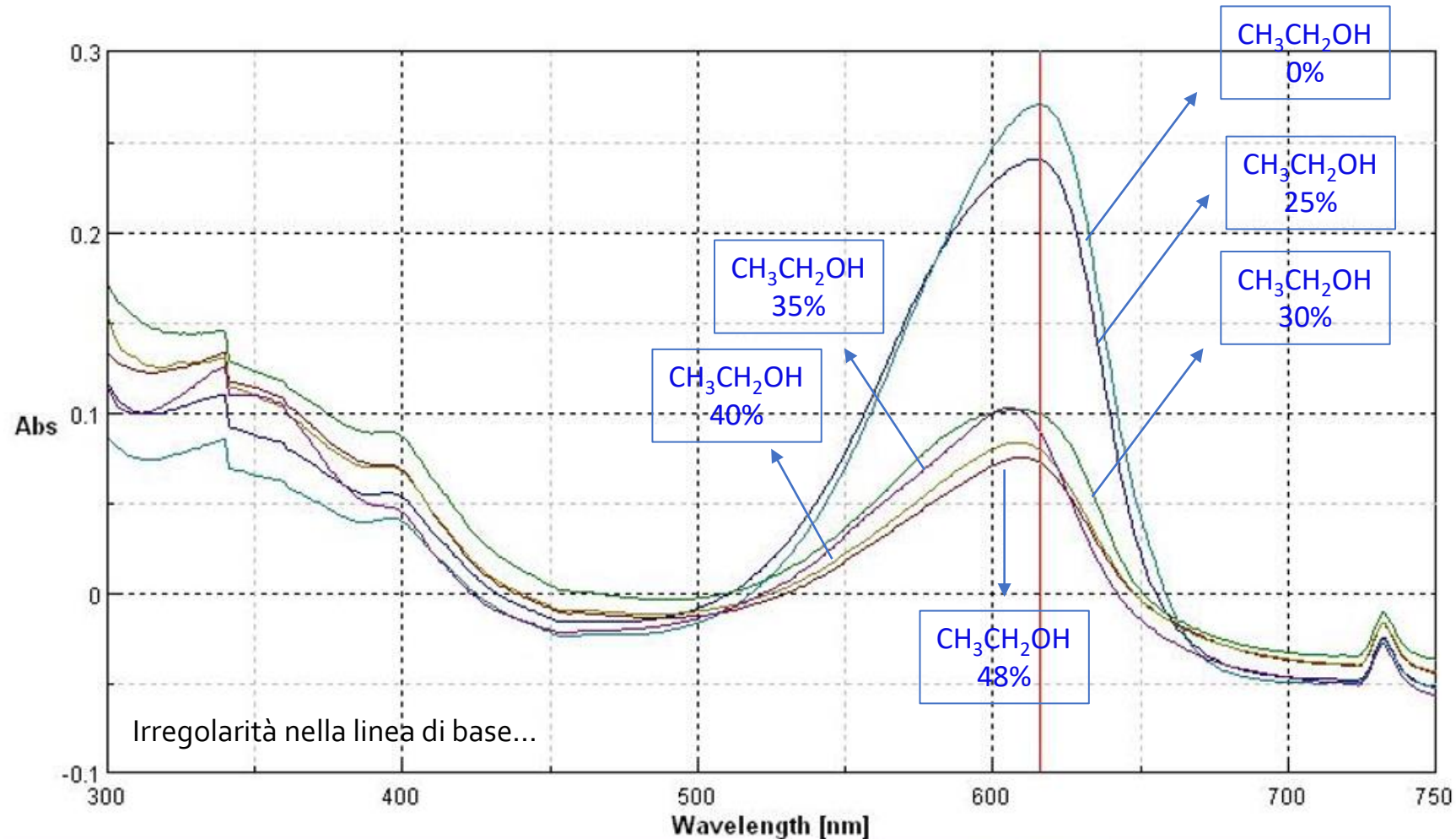
«Abbiamo anche verificato l'avvenuta denaturazione con la lampada UV, notando una diminuzione di fluorescenza graduale con l'aumentare della concentrazione di etanolo».



Risultato: la fluorescenza rossa scompare gradualmente con la denaturazione!

Overlay spettri visibili di Ficocianina commerciale 1g/L in etanolo a varie concentrazioni

Osservazione: diminuzione dell'assorbanza a 625 nm e l'aumento dell'assorbanza a 370 nm

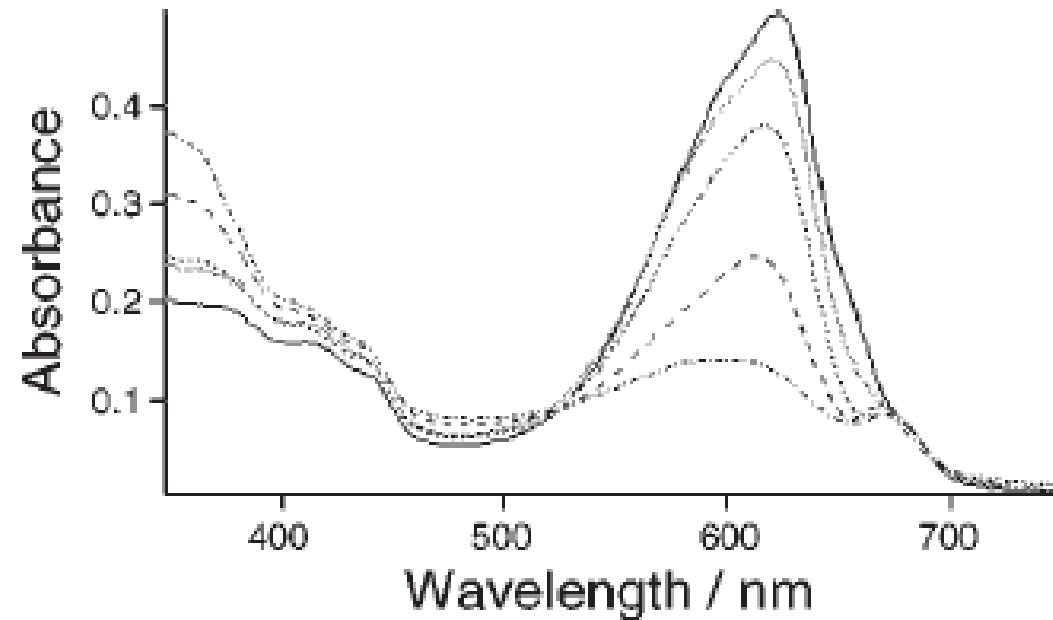


A Biochemical Study of Noncovalent Forces in Proteins Using Phycocyanin from *Spirulina*



Barbara A. Heller* and Yvonne M. Gindt

Department of Chemistry, University of Nebraska at Kearney, Kearney NE 68849-1150; *hellerb@unk.edu



Risultati sovrapponibili a quelli riportati nell'articolo studiato dagli studenti nella fase preliminare.

Figure 1. Visible absorption spectra of the denaturation of phycocyanin. As the ethanol concentration increases, the absorbance at 625 nm decreases and the absorbance at 370 nm increases. Spectra were taken at ethanol concentrations of 0, 13, 26, 39, and 48% v/v.

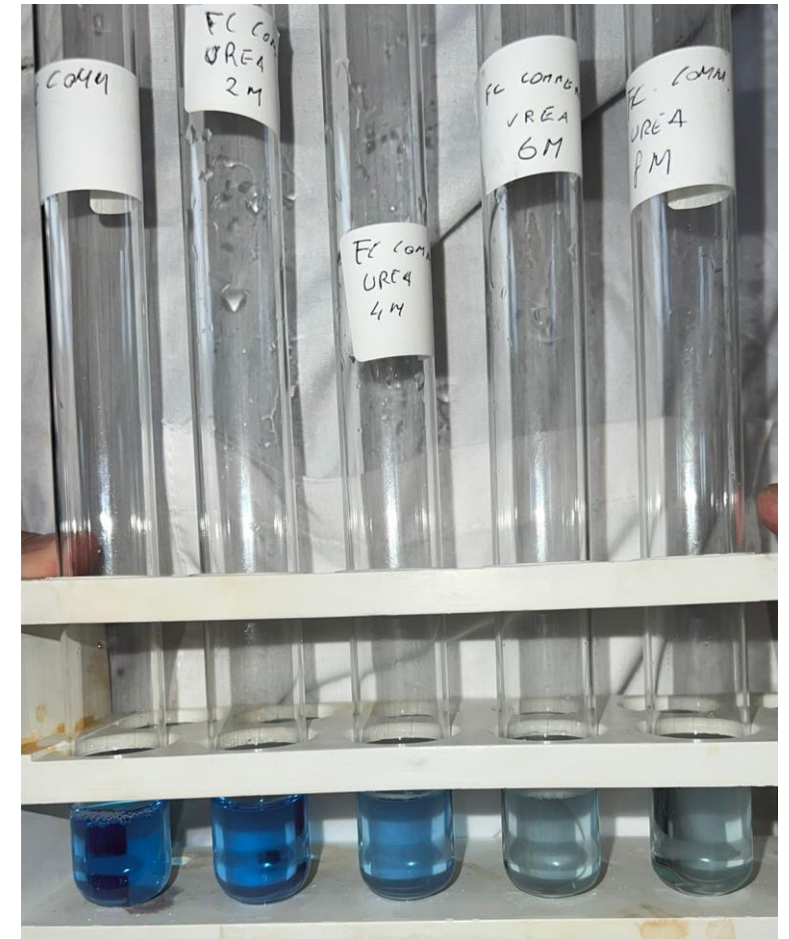
Denaturazione Ficocianina commerciale 1g/L in urea a diversa concentrazione

Dai Report degli studenti:

In quest'ultima fase abbiamo ripetuto l'esperienza con l'urea; anche questa volta abbiamo aggiunto **urea solida alle soluzioni di Ficocianina commerciale 1g/L** in modo da ottenere le seguenti molarità:

- 1) 2M di urea= 0.60 g di urea in 5,0 mL di ficocianina commerciale
- 2) 4M di urea= 1.20 g di urea in 5,0 mL di ficocianina commerciale
- 3) 6M di urea= 1.80 g di urea in 5,0 mL di ficocianina commerciale
- 4) 8M di urea= 2.40 g di urea in 5,0 mL di ficocianina commerciale

Risultato: le soluzioni si decolorano progressivamente



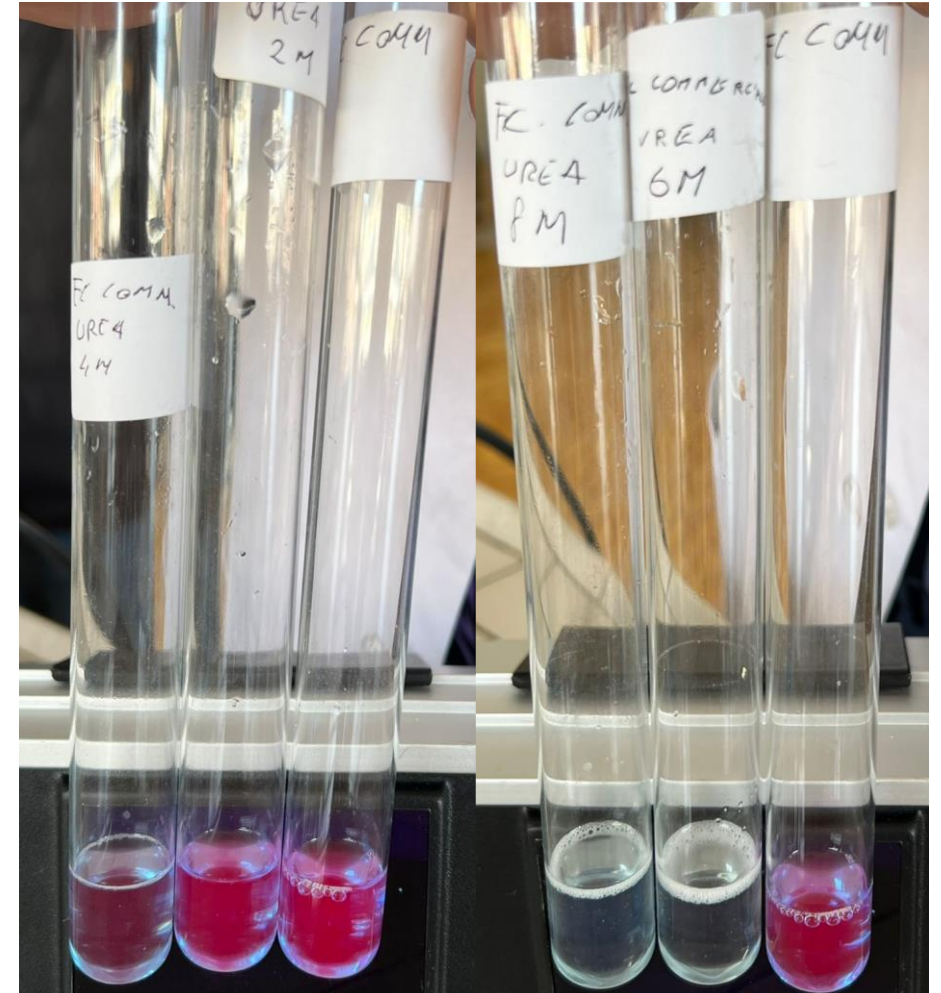
Denaturazione Ficocianina commerciale 1g/L in urea a diversa concentrazione

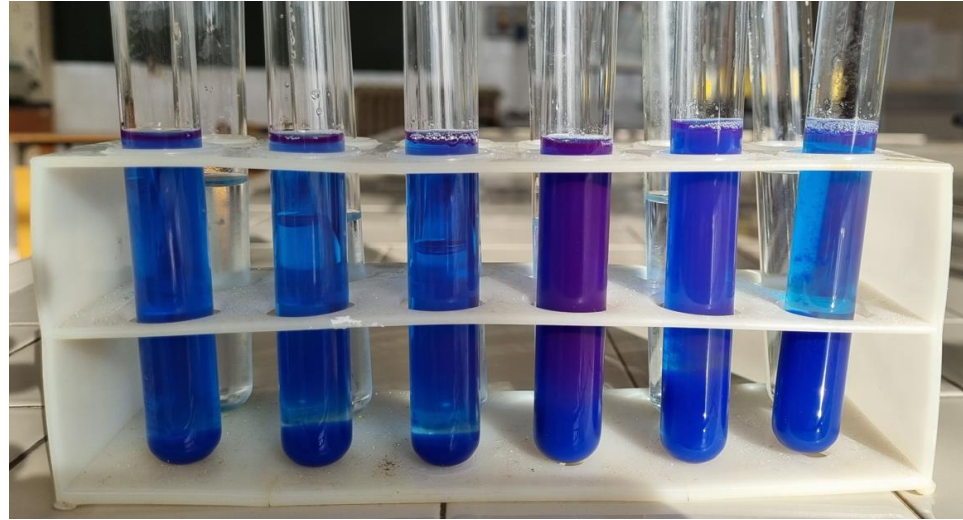
Dai Report degli studenti:

«Abbiamo verificato l'azione denaturante dell'urea con il [colorimetro](#), notando che anche in questo caso:

- i valori di assorbimento a 625 nm diminuiscono e a 370 nm aumentano, per effetto della denaturazione;
- la fluorescenza rossa scompare gradualmente con la denaturazione»

Concentrazioni di urea	625 nm	370 nm
Solo FC commerciale	0.585	0.119
2M	0.431	0.130
4M	0.237	0.174
6M	0.106	0.188
8M	0.102	0.201





Precipitazione frazionata delle proteine

SALTING OUT con Solfato di Ammonio

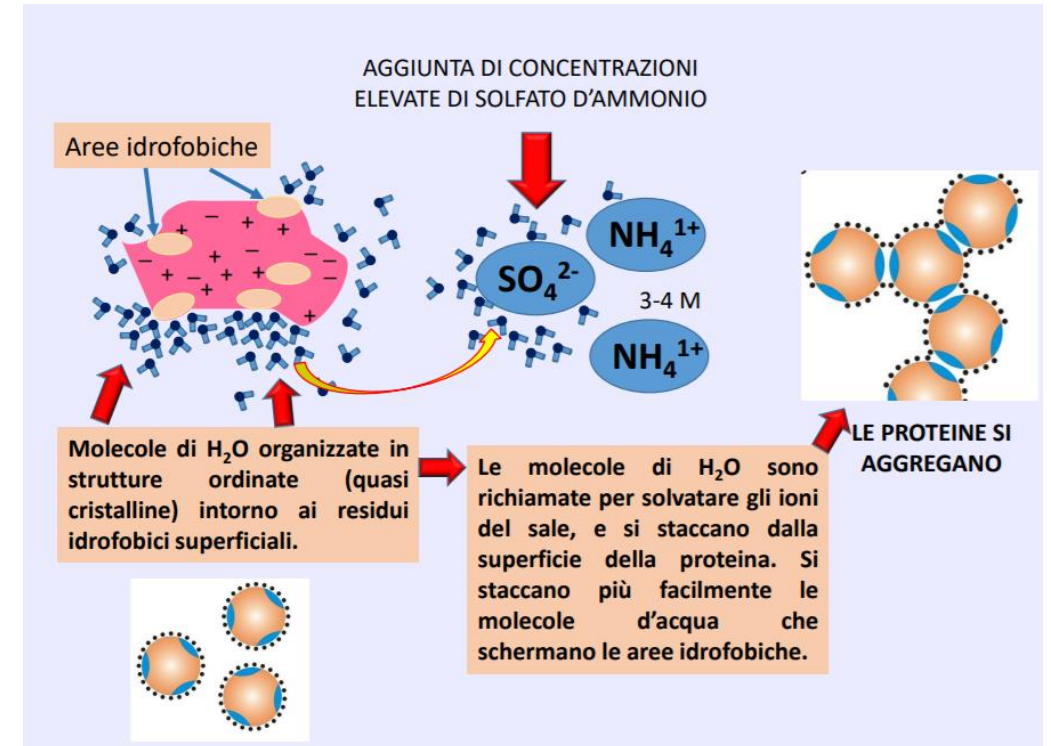
Precipitazione delle proteine e forza ionica

La solubilità di una proteina varia in funzione della forza ionica.

SALTING IN: a basse concentrazioni saline, la solubilità aumenta perché gli ioni del sale interagiscono con la superficie polare delle molecole di una proteina incrementandone la solvatazione

SALTING OUT: aumentando notevolmente la concentrazione di sale (anche di 10-100 volte), gli ioni del sale vengono solvatati dalle molecole di acqua, sottraendole alle molecole di proteina le quali tendono ad aggregarsi formando dei **complessi colloidali insolubili che precipitano**.

Si usa **solfo di ammonio** perché è molto solubile in acqua, raggiunge forze ioniche molto elevate. Fa precipitare le proteine senza denaturarle.



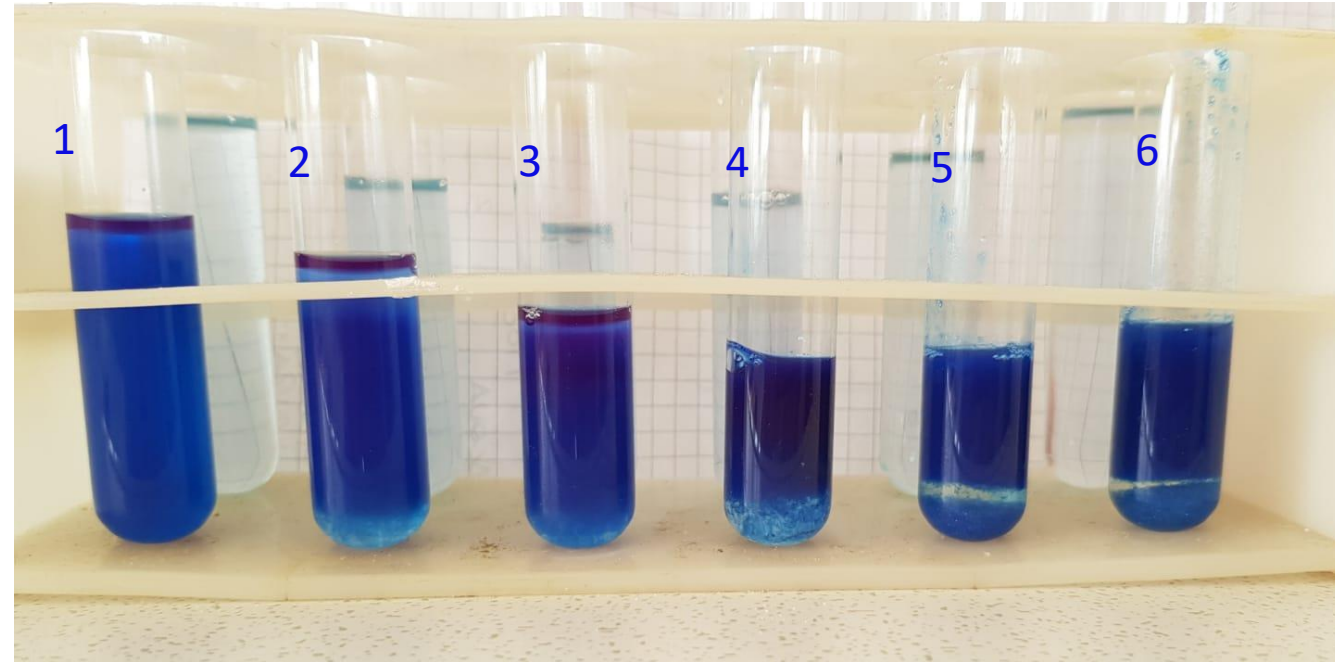
Questa tecnica viene usata per la purificazione e per la precipitazione frazionata delle proteine.

Precipitazione frazionata estratto FC con soluzione satura di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

«Per purificare la proteina abbiamo pensato di precipitarla con il metodo del Salting out, utilizzando sia una soluzione satura di Solfato di ammonio che il sale in polvere»

- Per la soluzione satura: ca 75 g di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ disciolti in 100 mL di acqua distillata
- Sono state preparate 6 provette contenenti determinati volumi di estratto acquoso di ficocianina non diluito e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ secondo lo schema seguente:

	1	2	3	4	5	6
Fiocianina estratto	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Acqua distillata	3 mL	2 mL	1 mL	/	/	/
Soluzione $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solido	/	/	/	/	0.5 g	1.5 g

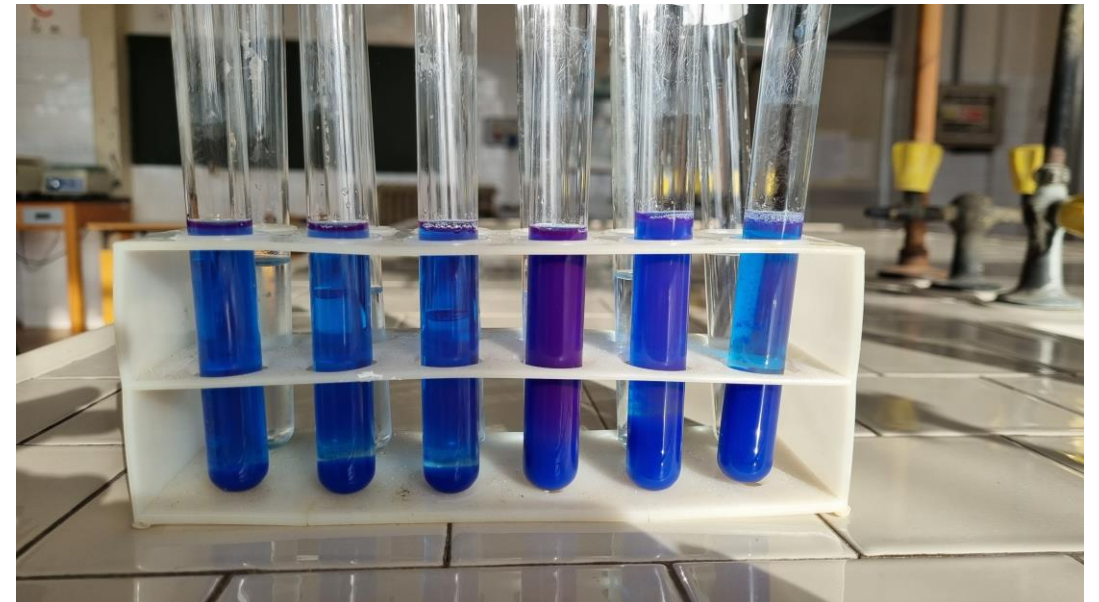
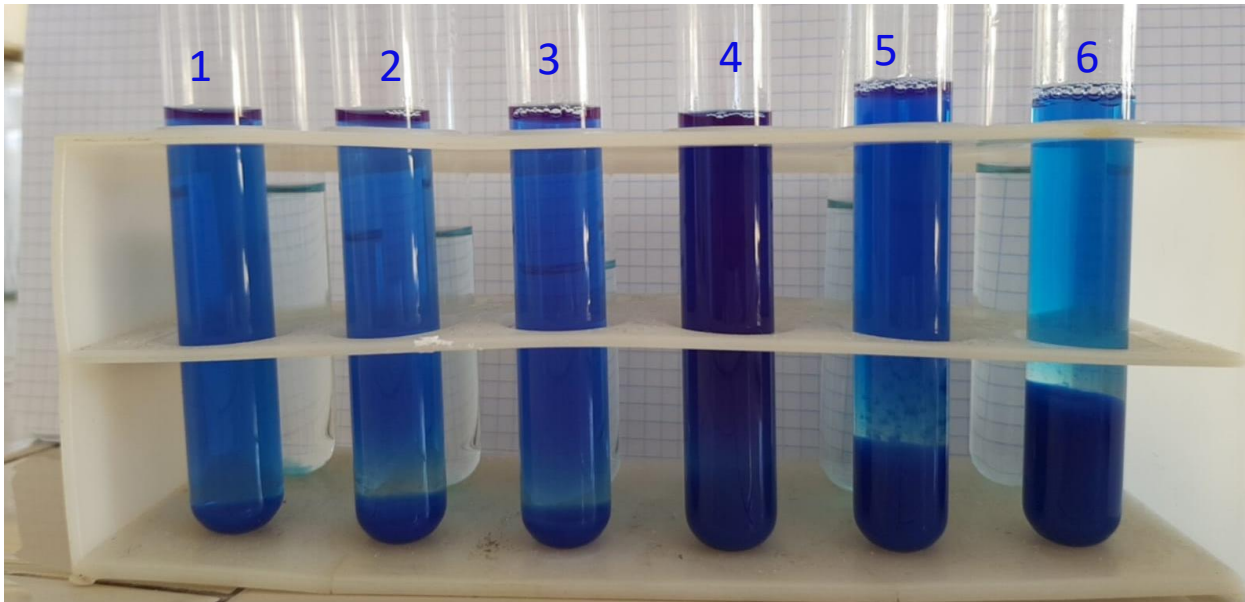


«Dopo mezz'ora nel frigorifero notiamo la formazione di un precipitato, in particolare nelle provette 5 e 6 nelle quali è stato aggiunto il sale solido. Affinché tutta la proteina precipiti, le provette devono stare in frigo per tutta la notte».

«Abbiamo osservato che nelle provette, l'elevata concentrazione di solfato di ammonio ha creato un gradiente di densità che porta la proteina a essere sospesa nella parte superiore della provetta e non a precipitare. Sul fondo della provetta si osserva il sale indissolto e non la proteina precipitata!»

Precipitazione con soluzione satura di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

«Abbiamo diluito con acqua, portando le provette ad un volume pari fra loro, per solubilizzare di nuovo il sale e precipitare la proteina sul fondo della provetta».



(foto scattata dopo 72 h in frigorifero)

Precipitazione con soluzione satura di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Dal Report degli studenti:

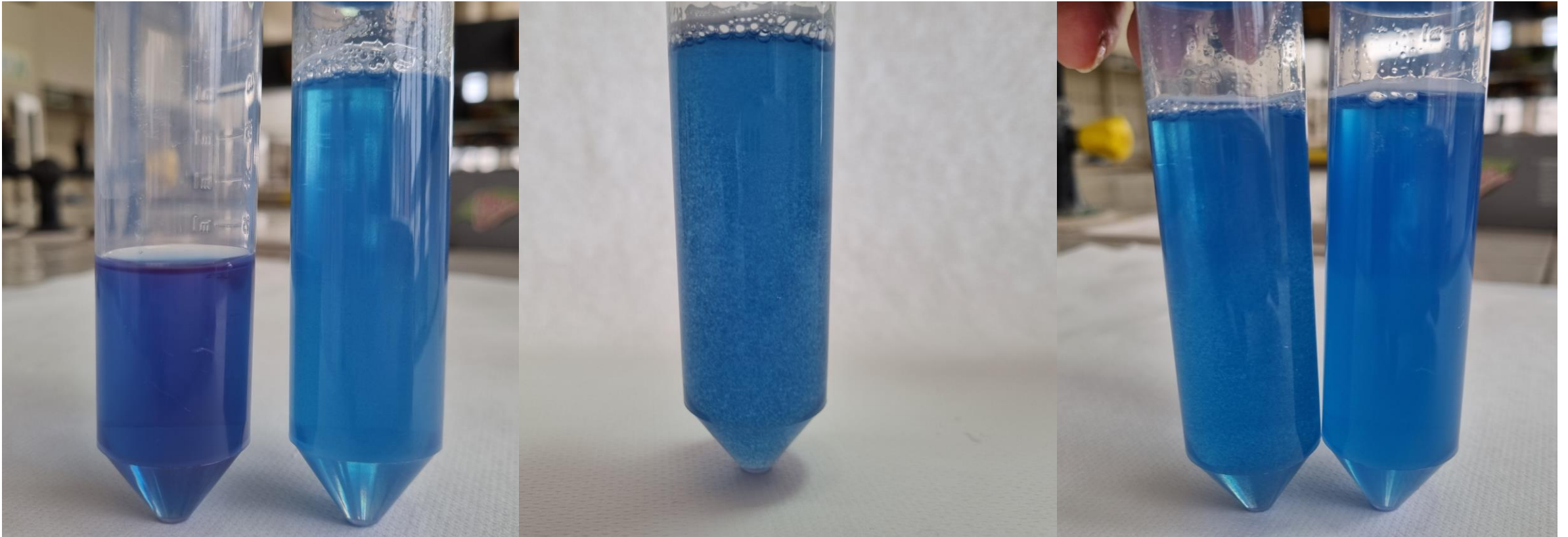
«Dall'immagine si osserva il precipitato di ficocianina sul fondo della provetta e in quantità diverse:

- Provetta 1: Pochissima quantità di precipitato: ricordiamo che in questa provetta, inizialmente, erano stati aggiunti 3 mL di acqua distillata, e probabilmente la soluzione di solfato d'ammonio formatasi all'interno della provetta era troppo diluita;
- Provetta 2: Maggiore quantità di precipitato rispetto alle provette 1 e 3, le quali erano state trattate allo stesso modo (ovvero con un'aggiunta di acqua distillata, rispettivamente, di 3 mL e 1 mL): si suppone che in questa provetta si sia raggiunta una concentrazione ottimale di soluzione salina affinché la proteina potesse precipitare;
- Provetta 3: Meno precipitato della 2, di più rispetto alla 1: la soluzione formatasi all'interno di questa provetta era probabilmente troppo concentrata e infatti si osserva un surnatante leggermente più scuro rispetto alla 1 e alla 2;
- Provetta 4: Nessuna aggiunta di acqua distillata, difficile intravedere il precipitato in quanto il surnatante presenta un colore molto scuro: la soluzione di ficocianina era troppo concentrata per la quantità di solfato aggiunta;
- Provetta 5: Piccola aggiunta di sale solido: il surnatante è più chiaro rispetto alle provette precedenti e l'aggiunta del sale solido nella soluzione di ficocianina ne ha facilitato la precipitazione;
- Provetta 6: Stesso discorso della provetta 5, in particolare si osserva una maggiore quantità di precipitato correlata a una maggiore aggiunta di sale, e un surnatante ancora più chiaro».

Purificazione: Precipitazione estratto acquoso di FC con soluzione satura di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

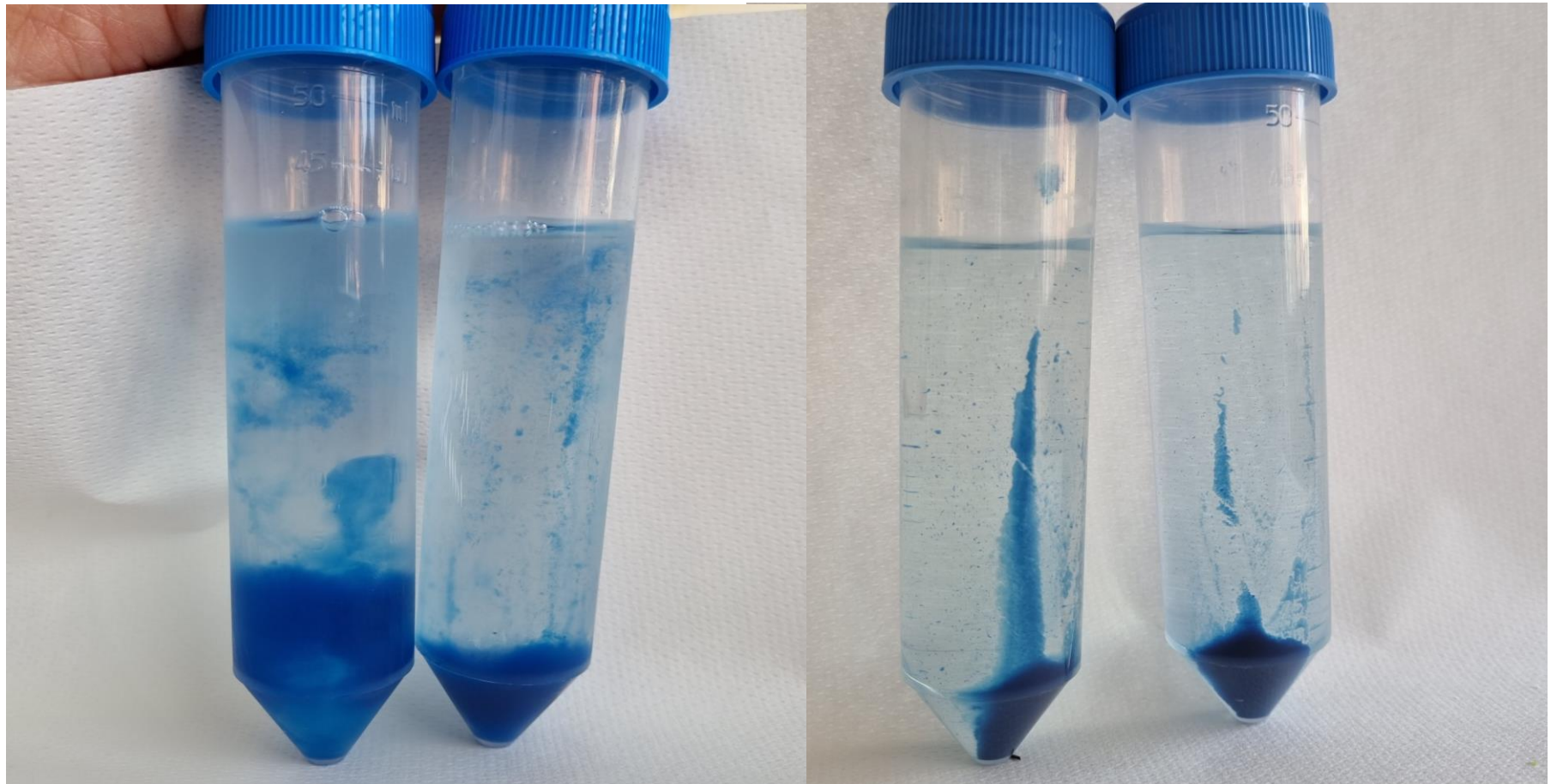
Il campione è stato sottoposto a un singolo step di precipitazione, usando una soluzione satura di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e lasciando in frigo a 4°C per una notte.

Si aggiungono 20 mL di una soluzione satura di solfato di ammonio a 20 mL di estratto acquoso di ficocianina: si nota quasi immediatamente la **flocculazione della proteina**



Purificazione: Precipitazione estratto acquoso di FC con soluzione satura di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Dopo una notte in frigo la sospensione è stata centrifugata a 5000 giri per 20 minuti, ottenendo un residuo proteico azzurro



Purificazione: risospensione del precipitato in tampone fosfato pH 6.8

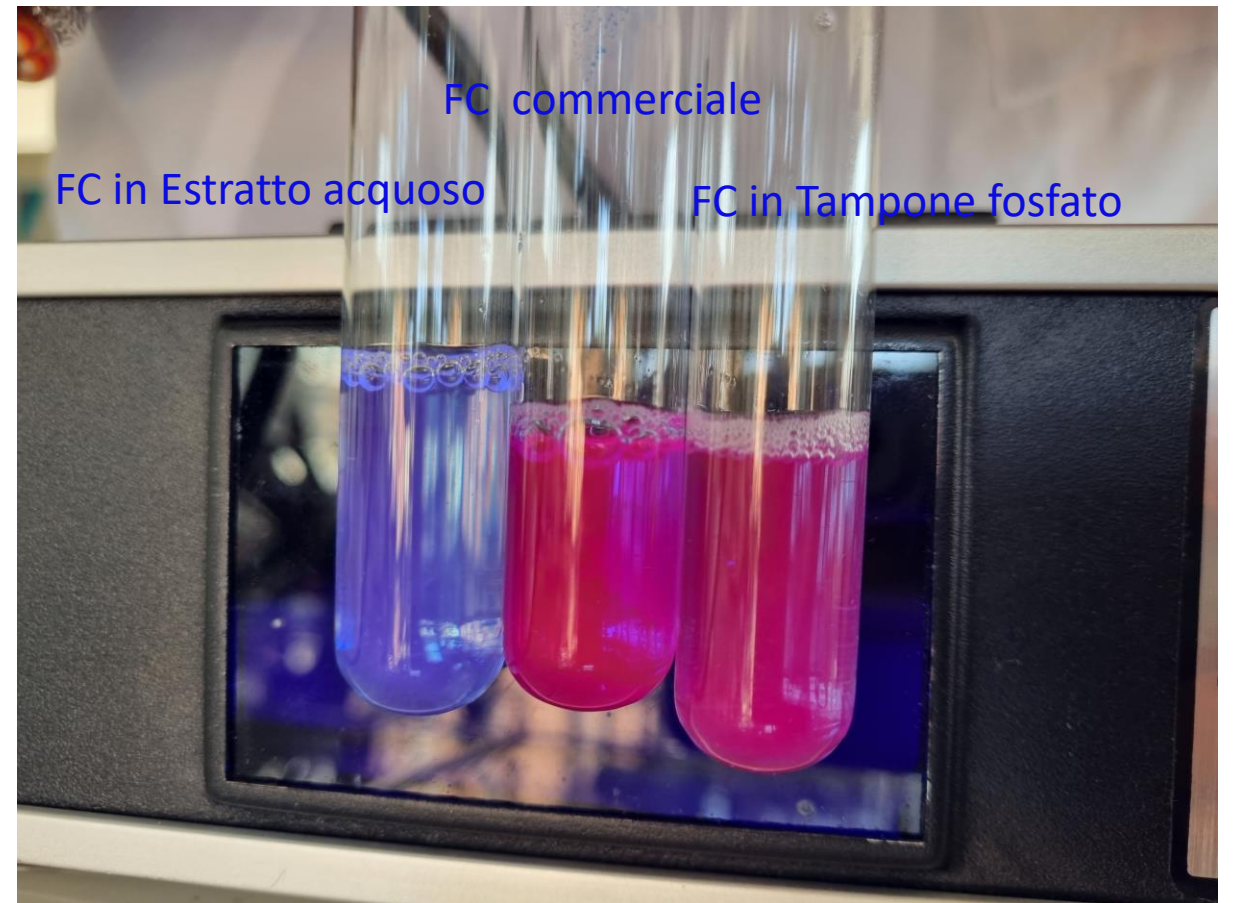
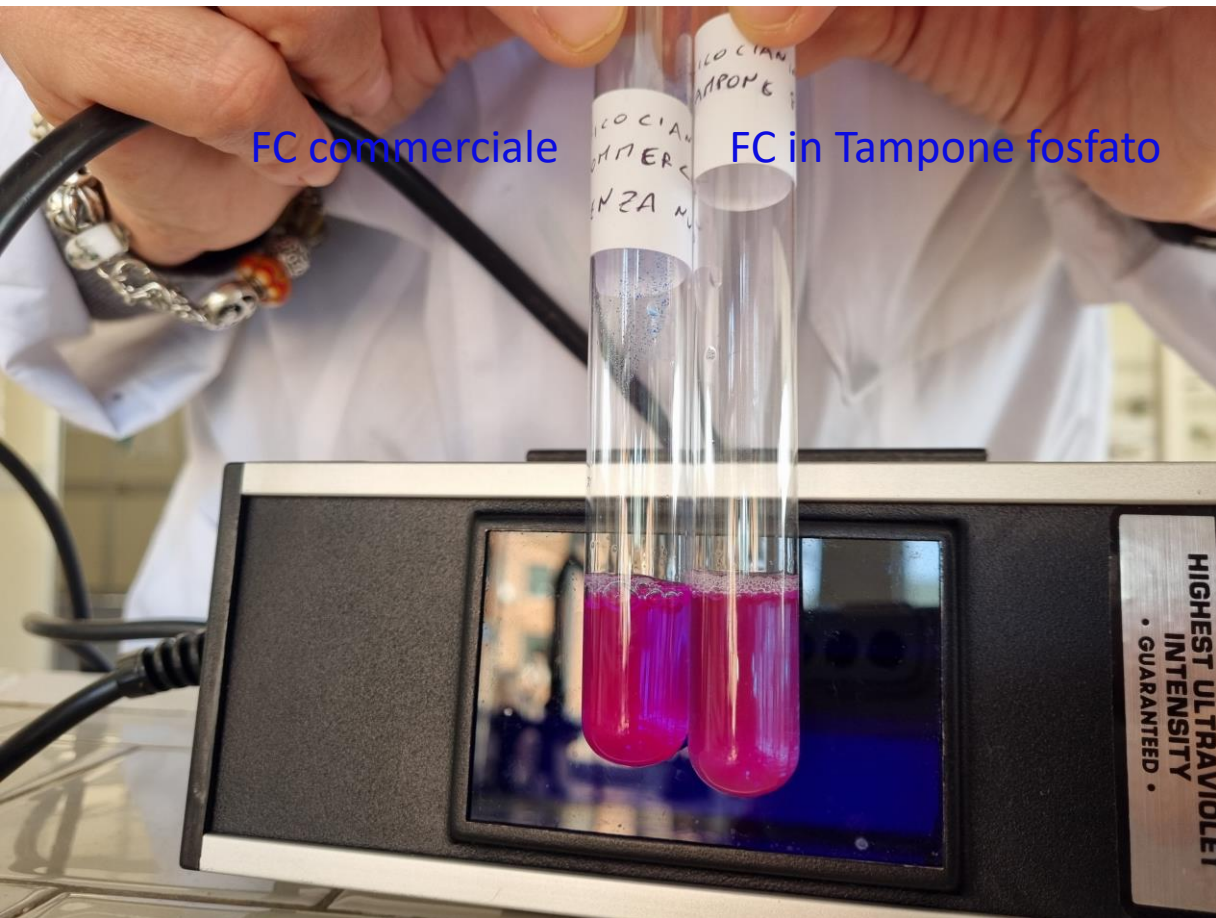
Il surnatante è stato allontanato e il precipitato proteico è stato risospeso in una soluzione tampone di fosfato potassico a pH 6.8



Risultato: Fluorescenza rossa
come la ficocianina commerciale!



Confronto fluorescenza di FC commerciale, estratto acquoso di FC e FC risospesa in tampone

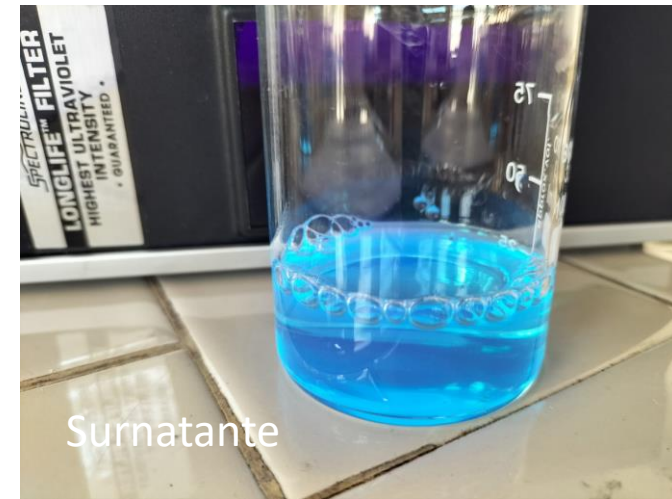


Confronto fluorescenza surnatante, FC commerciale 1g/L, estratto acquoso di FC e FC risospesa in tampone

«Abbiamo dimostrato che la fluorescenza blu rimane nel surnatante, quindi è dovuta ad altri agenti contenuti nella soluzione. Nella ficocianina da noi purificata e in quella commerciale è presente solo la fluorescenza rossa».

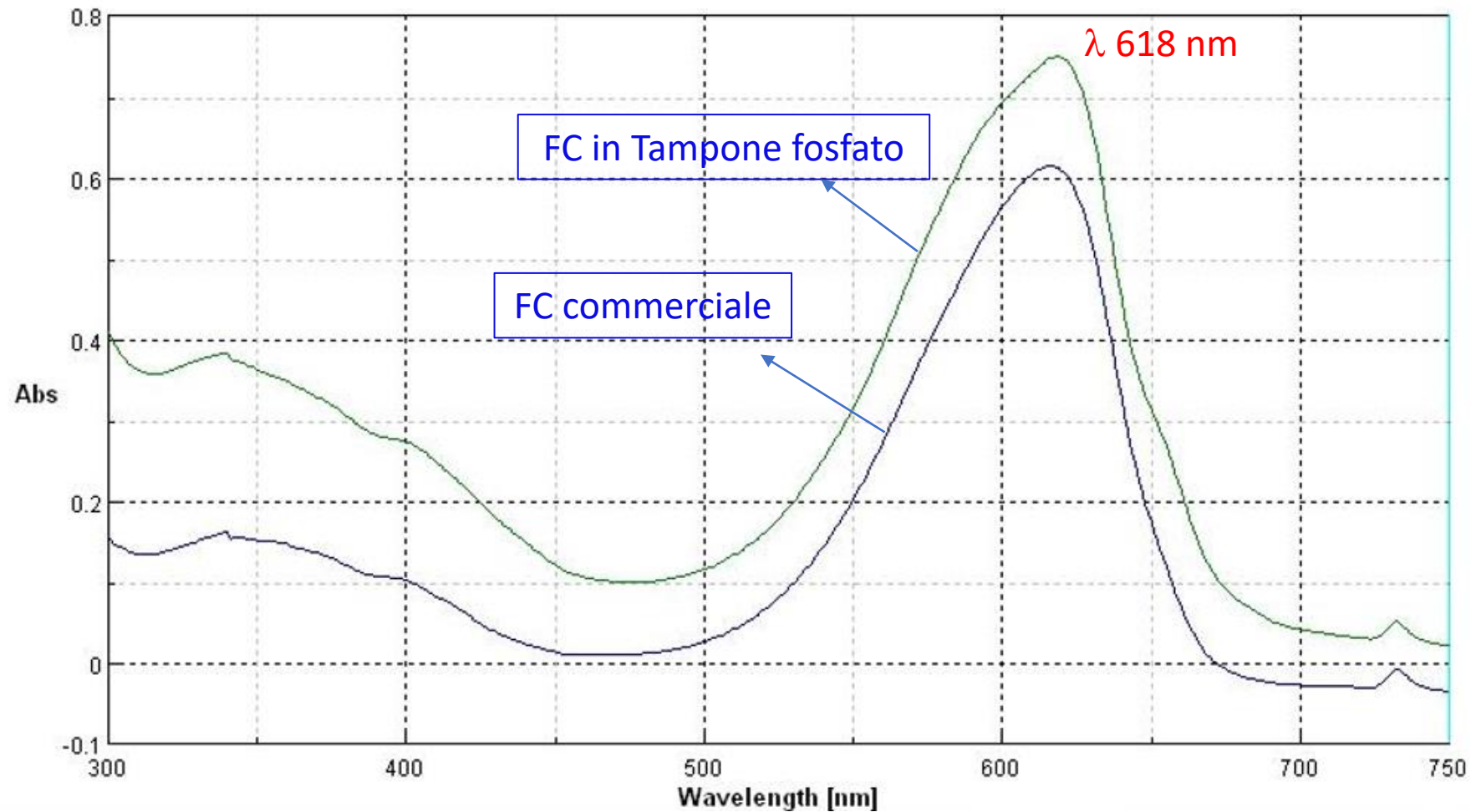


Confronto fluorescenza FC commerciale 1g/L, estratto acquoso di FC e FC risospesa in tampone



Overlay spettro visibile Ficocianina commerciale e Ficocianina risospesa nel tampone fosfato

Soluzione di FC risospesa in tampone fosfato dello stesso colore (concentrazione simile) della soluzione 1g/L di FC commerciale



Saggi di denaturazione su FC risospesa in tampone fosfato

Denaturazione con **etanolo**

Denaturazione con **urea**

Confronto tra i vari campioni

Riferimento: ficocianina commerciale 1g/L;

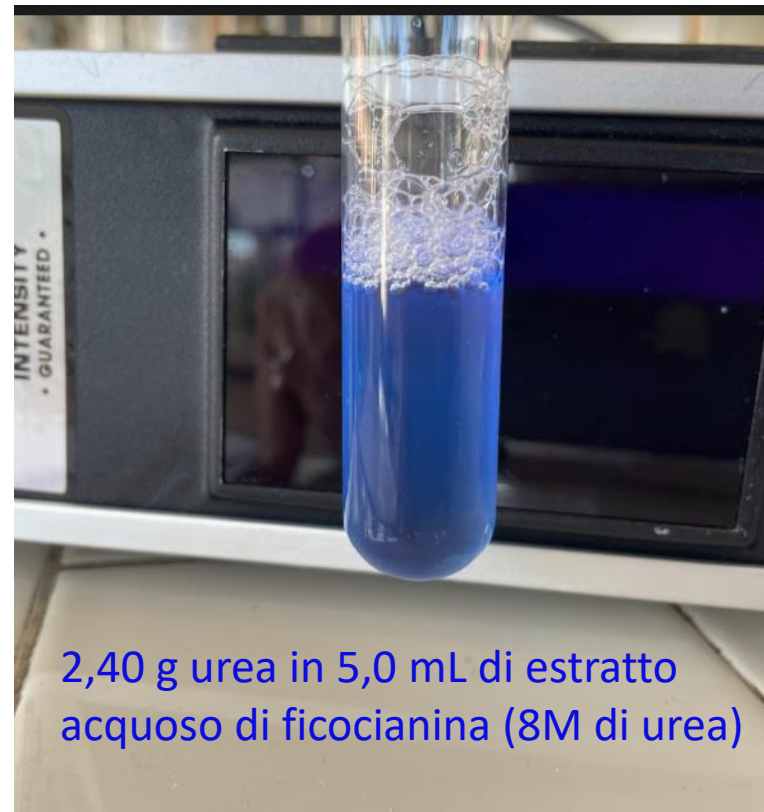
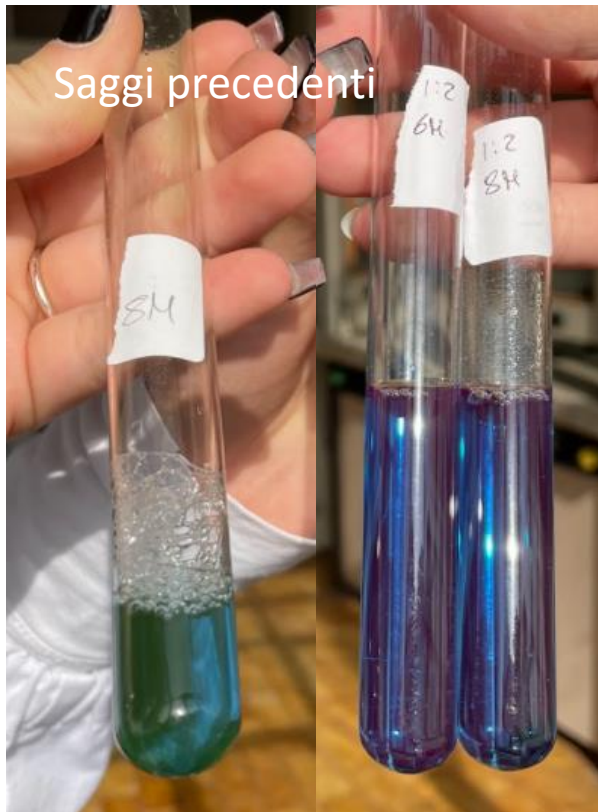
Saggi effettuati su campioni aventi una concentrazione di colore simile a
quella di FC commerciale 1g/L

Denaturazione con Urea di estratto acquoso di FC: nuove condizioni sperimentali di concentrazione denaturante

Confronto tra denaturazione in **urea 8 M** di **estratto acquoso di ficocianina** e ficocianina commerciale

Risultato:

la soluzione si decolora per effetto della denaturazione, ma permane una fluorescenza azzurra



Da dx: FC commerciale, FC commerciale + urea, FC estratto acquoso + urea

Denaturazione con urea FC risospesa in tampone: nuove condizioni sperimentali di concentrazione denaturante

Confronto tra denaturazione in **urea 8 M** di **ficocianina risospesa nel tampone** e ficocianina commerciale
2,40 g urea in 5,0 mL di entrambi i campioni (8M di urea)

Risultato:

le soluzioni si decolorano per effetto della denaturazione e scompare la fluorescenza azzurra in entrambe



Da dx: Surnatante, ficocianina sospesa,
ficocianina sospesa + urea



Da dx: Ficocianina commerciale, ficocianina
commerciale + urea

Denaturazione con urea FC risospesa in tampone: nuove condizioni sperimentali di concentrazione denaturante

Confronto tra denaturazione in **urea 8 M** di **ficocianina risospesa nel tampone** e ficocianina commerciale
2,40 g urea in 5,0 mL di entrambi i campioni (8M di urea)

Risultato:

le soluzioni si decolorano per effetto della denaturazione e scompare la fluorescenza azzurra in entrambe



Da dx: FC commerciale, FC commerciale + urea, FC risospesa in tampone, FC risospesa in tampone + urea



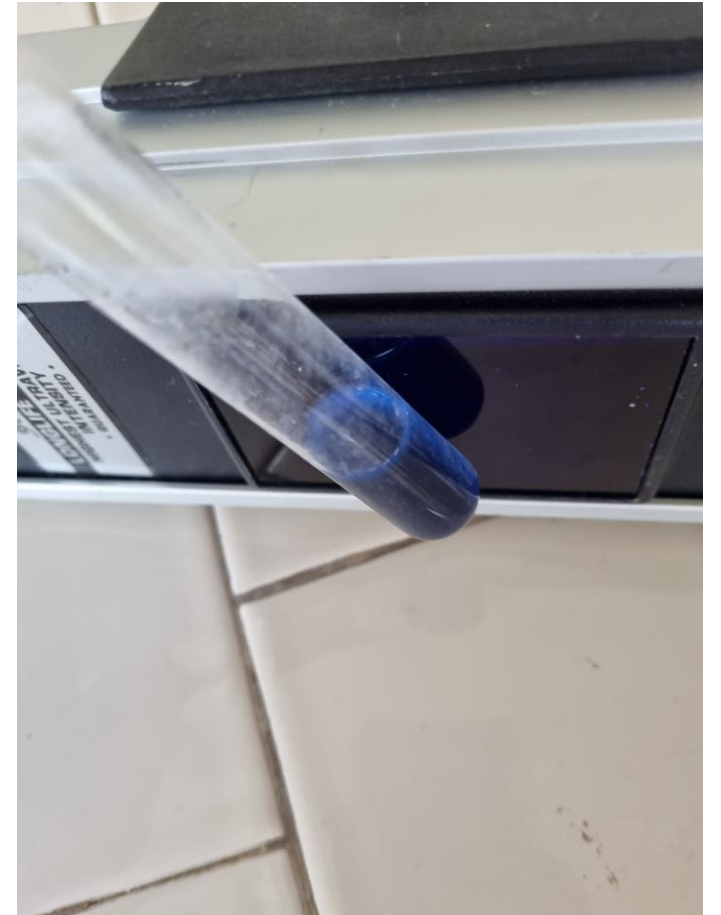
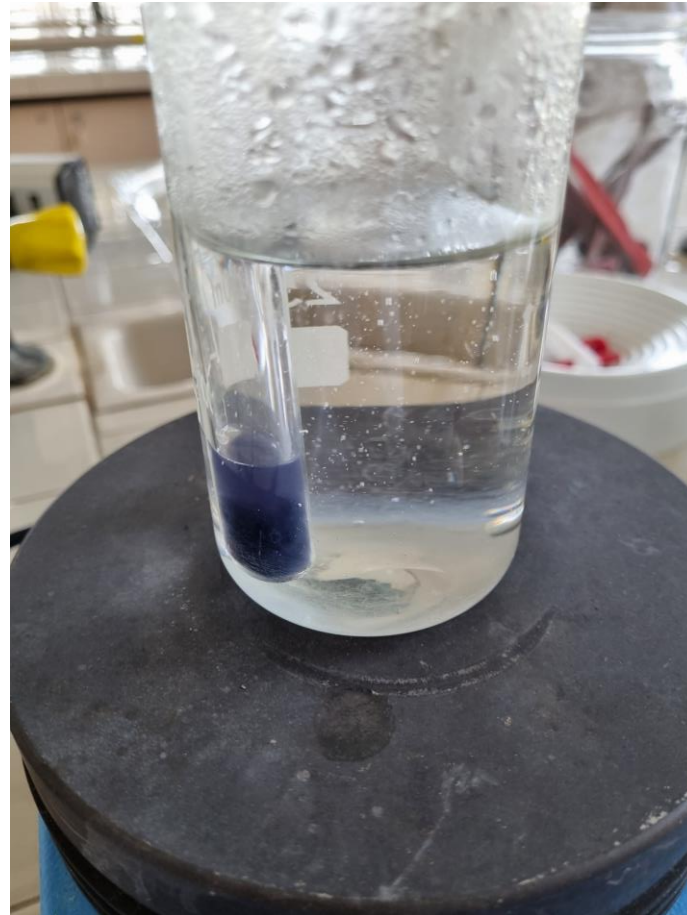
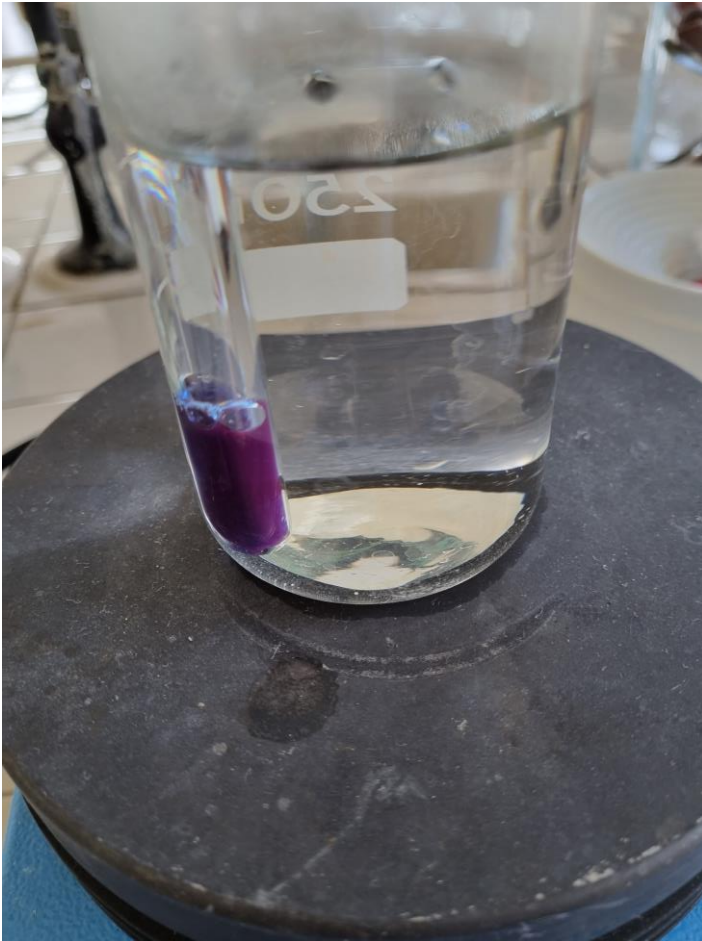
Saggi di denaturazione campioni vari di FC con calore

Il calore rompe i legami intermolecolari e denatura le proteine che perdono la loro struttura terziaria, esponendo i residui idrofobici sepolti nello stato nativo nel core proteico e causando la formazione di aggregati.

Denaturazione estratto acquoso di FC con calore

Denaturazione estratto acquoso di FC (soluzione concentrata) a temperatura prossima ai 100°C

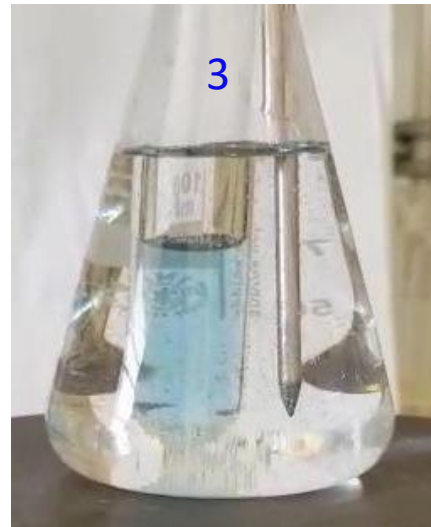
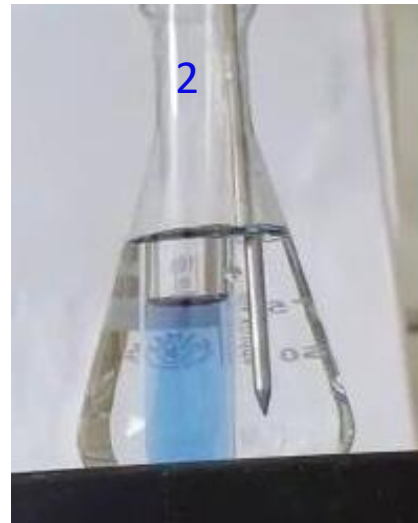
Risultato: perdita di fluorescenza e formazione di precipitato



Denaturazione FC commerciale 1g/L con calore

Dai Report degli studenti:

«Si riscaldano 5,0 mL di soluzione di ficocianina commerciale 1g/L a bagnomaria fino a raggiungere una temperatura costante di 96°C per circa 3 minuti».



Risultato: A freddo (1) – 30°C (2) – 45°C (3): inizio decolorazione. Tra 60°C (4) - 96°C (5), con temperatura mantenuta costante per 3 minuti: non si osservano ulteriori cambiamenti di colore.

Denaturazione col calore di FC commerciale, estratto acquoso di FC e FC risospesa in tampone

Riferimento concentrazione: colore della soluzione di Ficocianina commerciale 1g/L

Confronto colore e fluorescenza di estratto acquoso di FC, FC commerciale e FC risospesa in soluzione tampone, prima e dopo la denaturazione con riscaldamento.

Risultato: perdita di colore e fluorescenza in tutti i campioni e persistenza di fluorescenza nell'estratto acquoso di FC



Precipitazione della ficocianina mediante aggiunta di acido acetico

Precipitazione al punto isoelettrico

Al pH del punto isoelettrico la molecola non ha carica netta e quindi non si ha repulsione elettrostatica tra le molecole vicine per cui esse tenderanno ad attrarsi e a precipitare formando agglomerati colloidali.

Precipitazione soluzioni di ficocianina mediante aggiunta di acido acetico

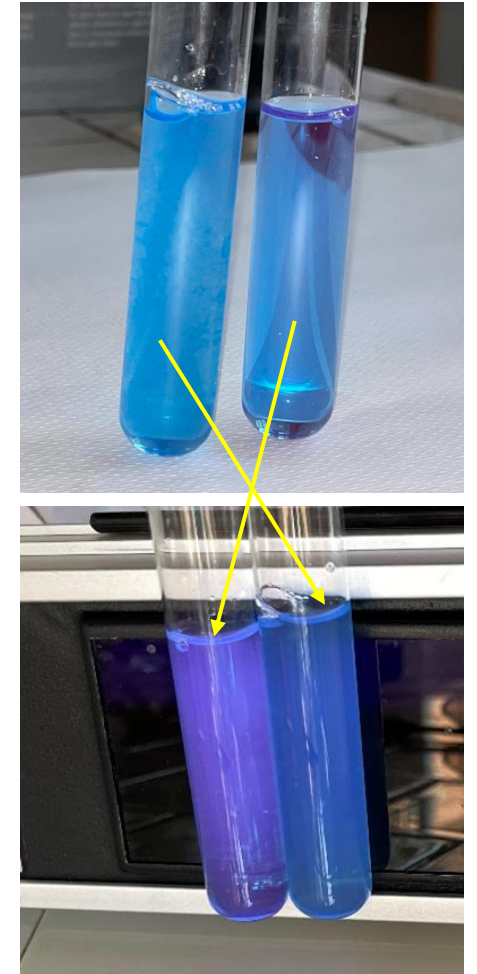
Soluzioni testate (5,0 mL):

1. soluzione concentrata di estratto acquoso di ficocianina estratta mediante congelamento-scongelamento = ficocianina c-s
2. soluzione diluita 1:1 di estratto acquoso di ficocianina c-s
3. soluzione diluita 1:50 di estratto acquoso di ficocianina c-s
4. soluzione concentrata di estratto acquoso di ficocianina mediante estrazione meccanica = ficocianina e-m

Alle soluzioni si aggiungono circa **4 gocce** di acido acetico glaciale, con un pH finale di 3,4:

Risultato:

- intorbidimento delle soluzioni e creazione di flocculi.
- Perdita di fluorescenza



Precipitazione soluzioni di estratto acquoso di FC mediante aggiunta di acido acetico 4 gocce

Risultato dopo una notte in frigo: si nota la formazione del precipitato in tutte le soluzioni, in quantità dipendente dalla concentrazione della soluzione di partenza



SOLUZIONE CONCENTRATA
FICOCIANINA C-S



SOLUZIONE diluita 1:1 FICOCIANINA C-S



SOLUZIONE diluita 1:50 FICOCIANINA
C-S



SOLUZIONE CONCENTRATA
FICOCIANINA ESTRAZIONE
MECCANICA EM

Precipitazione soluzioni di ficocianina mediante aggiunta di acido acetico 2 gocce

Soluzioni testate (5,0 mL):

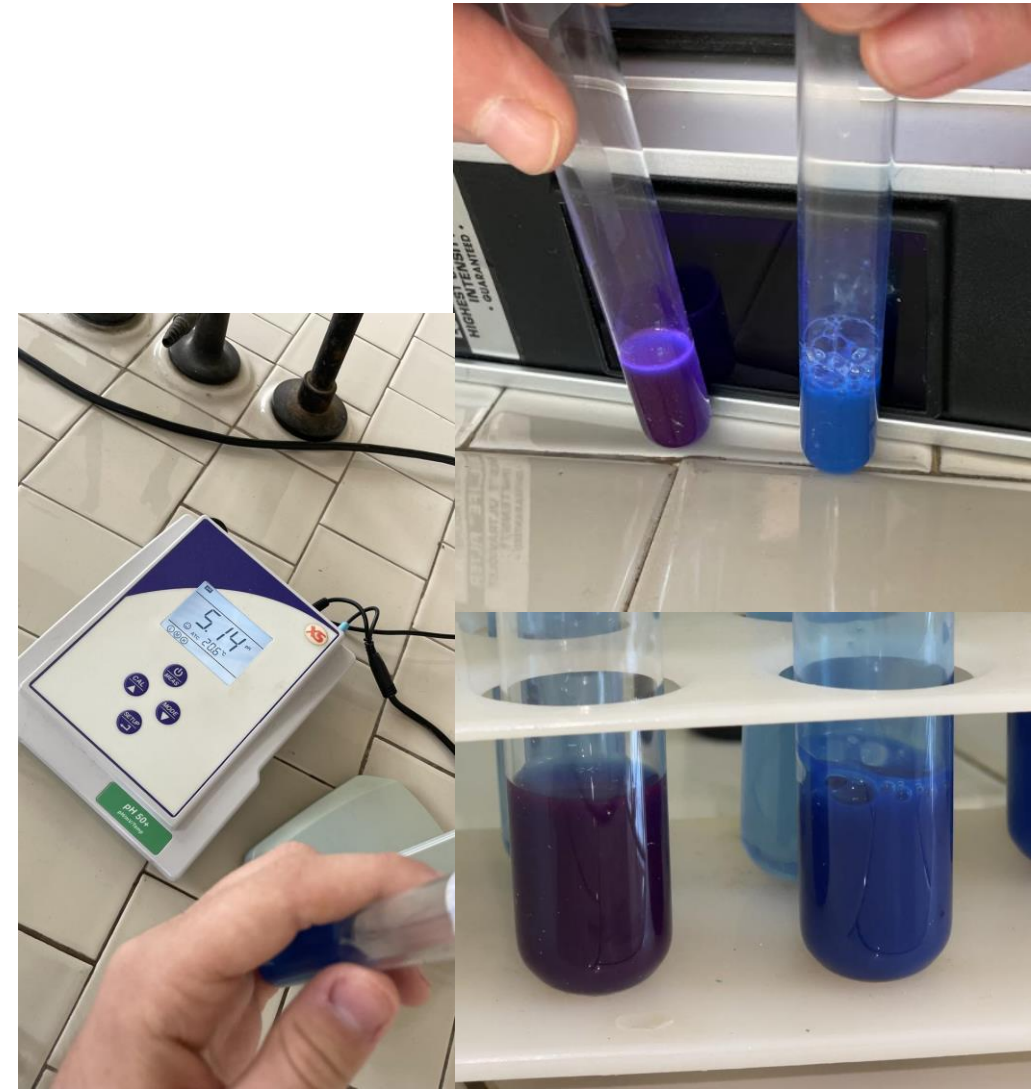
1. soluzione concentrata di estratto acquoso di ficocianina estratta mediante congelamento-scongelamento = ficocianina c-s
2. soluzione diluita 1:1 di estratto acquoso di ficocianina c-s
3. soluzione diluita 1:50 di estratto acquoso di ficocianina c-s
4. soluzione concentrata di estratto acquoso di ficocianina mediante estrazione meccanica = ficocianina e-m
5. ficocianina c-s risospesa in tampone fosfato
6. Ficocianina commerciale 1g/L

Alle soluzioni sopra riportate sono state aggiunte circa 2 gocce di acido acetico glaciale, pH 5,1:

Risultato:

- Intorbidimento delle soluzioni e creazione di flocculi.
- Perdita di fluorescenza

(punto isoelettrico di PC varia tra 4.1 e 6.4)

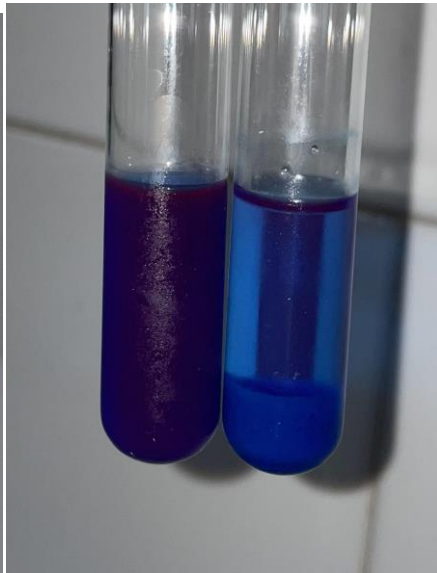


Precipitazione soluzioni di ficocianina mediante aggiunta di acido acetico 2 gocce

Risultato dopo una notte in frigo



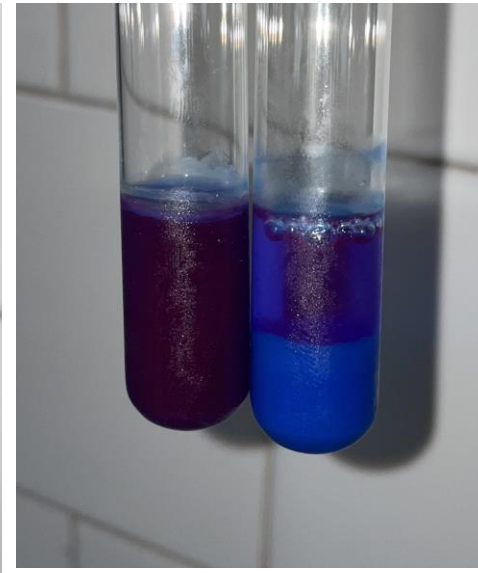
FICOCIANINA C-5



SOLUZIONE diluita 1:1 FICOCIANINA C-5



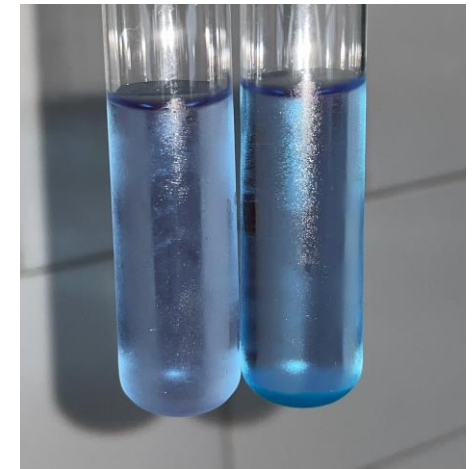
SOLUZIONE diluita 1:50 FICOCIANINA



FICOCIANINA ESTRAZIONE
MECCANICA

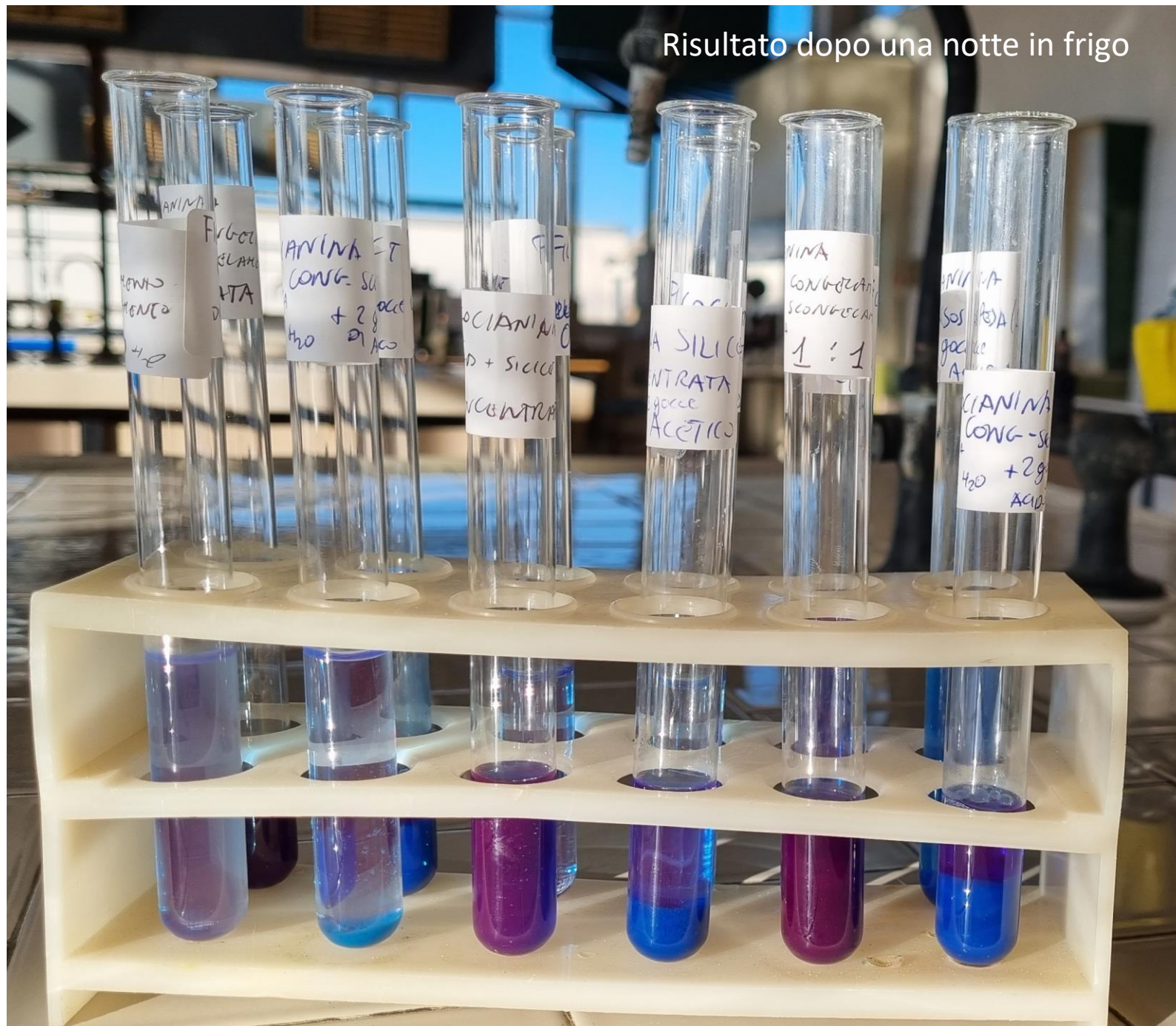


FC commerciale 1g/L

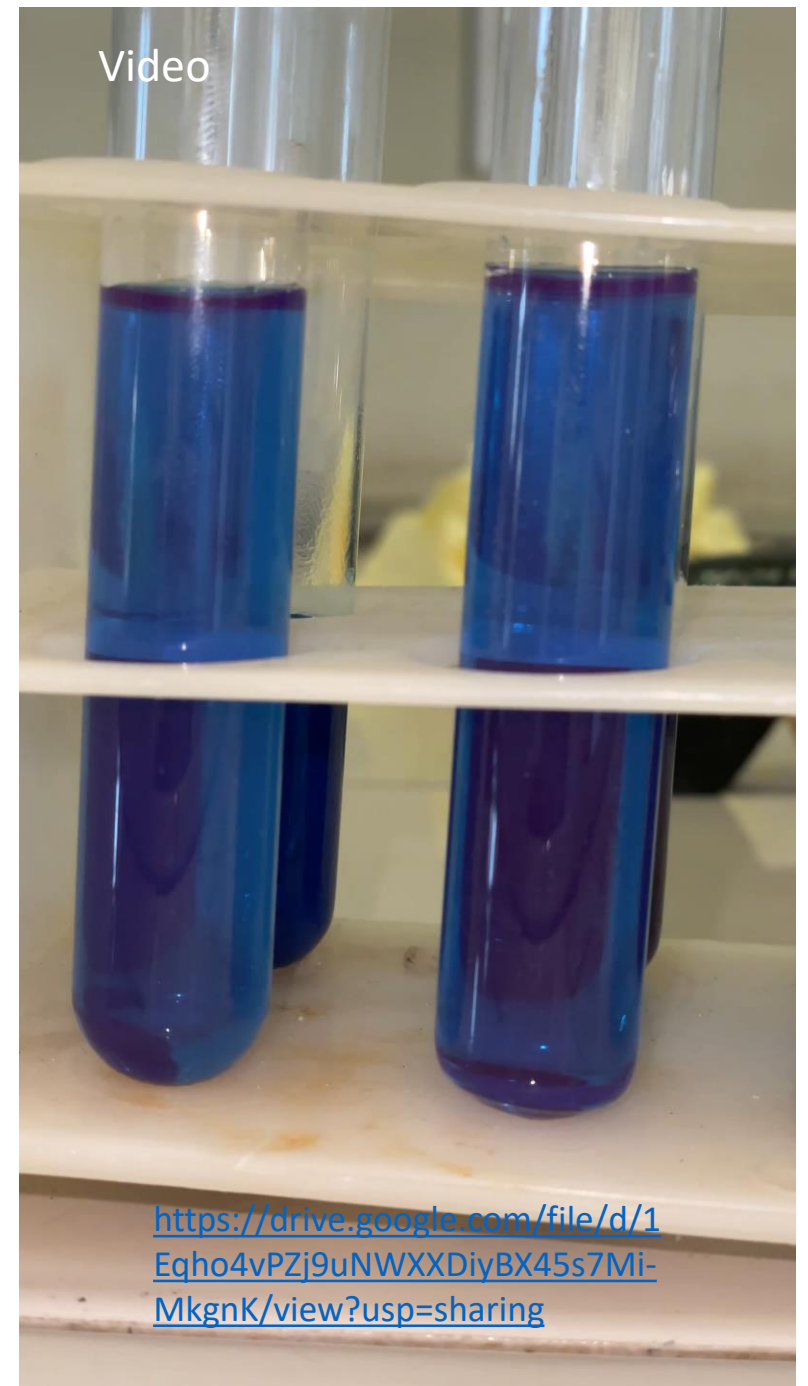


FC risospesa

Risultato dopo una notte in frigo



Video



<https://drive.google.com/file/d/1Eqho4vPZj9uNWXDiyBX45s7Mi-MkgnK/view?usp=sharing>

Riepilogo risultati

https://drive.google.com/file/d/1oyB4j9dMZu_bqE6ftM1QQ4RjUa_91BRpf/view?usp=sharing



**soluzione di ficocianina commerciale (1 g/L)
e soluzione di ficocianina denaturata
con etanolo al 50% (nella provetta)**

Conclusione

Gli studenti hanno:

- Sperimentato e applicato le tecniche di estrazione e purificazione delle proteine
- Sperimentato gli effetti degli agenti denaturanti sulle proprietà delle proteine
- Applicato l'analisi spettroscopica per valutare le modifiche conformazionali delle proteine in funzione dell'ambiente circostante
- Elaborato un protocollo dell'attività svolta attraverso una vera e propria ricerca di condizioni sperimentali ottimali, comprendendo come in un laboratorio di ricerca si giunga a determinati risultati dopo aver affrontato problemi e trovato delle soluzioni ad essi.

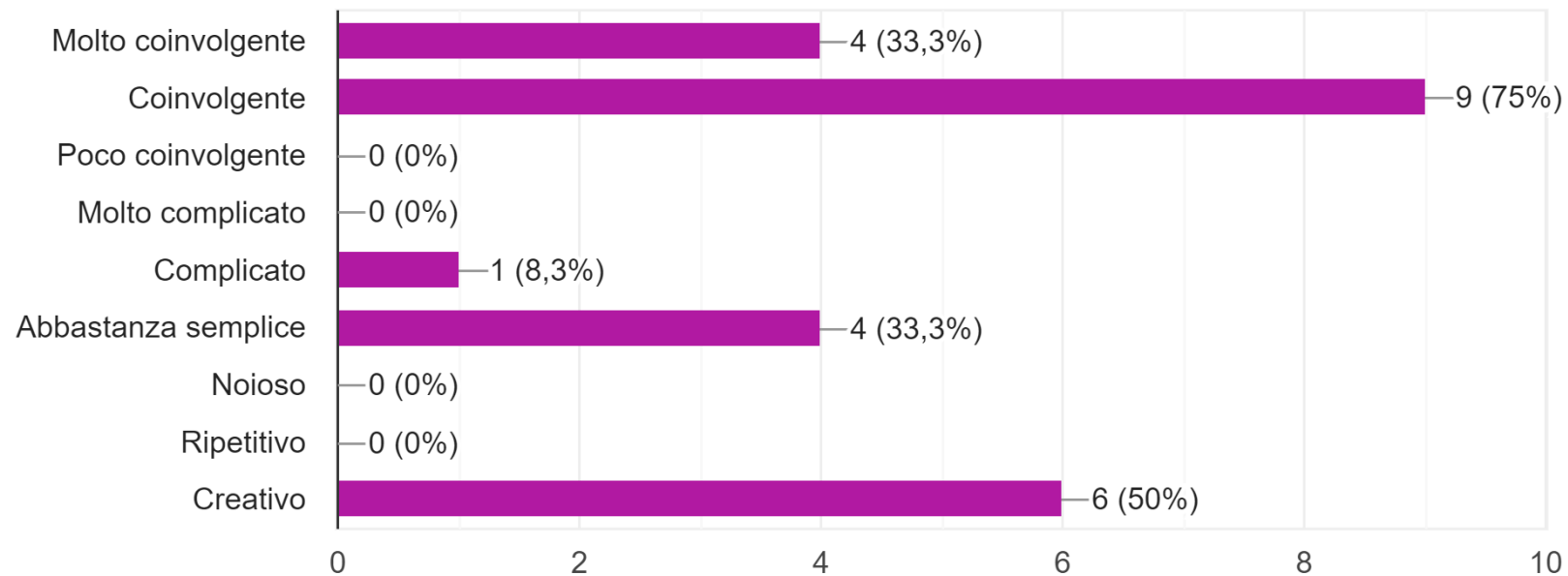
L'attività presentata può essere riprodotta in tutti i contesti scolastici, adattandosi alle circostanze e alla disponibilità di strumentazioni:

- In mancanza di uno spettrofotometro, si può valutare visivamente il cambiamento di colore della ficocianina
- In mancanza di una lampada di Wood si può analizzare la fluorescenza alla luce del sole o con una torcia UV acquistabile in rete
- In mancanza di una centrifuga, si può provare a fare una filtrazione dell'estratto acquoso grezzo di ficocianina
- In mancanza di mezzi per l'estrazione della ficocianina dalla Spirulina, si possono fare i test direttamente sulla ficocianina commerciale.
- Urea e Solfato di ammonio sono acquistabili facilmente nei negozi di giardinaggio

Questionario di autovalutazione 12/15 risposte

Come descrivi il percorso generale dell'attività

12 risposte



Questionario di autovalutazione

Cosa ti è piaciuto di più dell'attività?

- La continua "ricerca" della metodica da utilizzare per cercare e trovare quella più adatta
- Questo esperimento è stato molto accattivante, soprattutto perché si tratta di un'attività sperimentale, quindi avevamo più manualità in laboratorio poiché eravamo più 'liberi'.
- Mi è piaciuto il fatto di aver sperimentato quest'attività e anche il fatto di aver messo in pratica argomenti di teoria già studiati, come la denaturazione di una proteina.
- Il modo in cui è stata affrontata, la sperimentazione di ogni metodica laboratoriale
- Il fatto di aver messo in pratica una cosa che abbiamo studiato
- Mi è piaciuto molto il "non seguire una metodica" e ragionare sui fenomeni che si sono presentati.
- L'aspetto sperimentale dell'esperienza
- Mi è piaciuto molto il fatto che siamo stati noi a determinare una metodica sperimentando e non seguendo passo passo una metodica già esistente.
- Dover sperimentare per arrivare ad una conclusione accettabile
- L'essermi messa in gioco in prima persona per sperimentare l'attività
- La sperimentazione dell'attività
- Sperimentazioni e prove fatte sui campioni

Questionario di autovalutazione

Che cosa hai imparato da questa attività?

- Ho sviluppato “praticamente” le cose studiate riguardanti le proteine
- Da questa attività ho imparato ad essere un po' più 'autonoma' in laboratorio; inoltre, cosa che io ritengo molto importante, ho imparato soprattutto a mettere in pratica ciò che studiamo teoricamente in classe
- Da questa attività ho imparato come precipitare un campione di ficocianina diluito con una soluzione satura di solfato di ammonio e anche i vari saggi di denaturazione della ficocianina.
- Acquisito nuove competenze laboratoriali e migliore sicurezza sull'argomentazione “proteine” e loro caratteristiche chimico-fisiche
- Ho imparato come fare, dal punto di vista pratico, la denaturazione di una proteina
- Quest'attività mi è stata utile per approfondire le conoscenze teoriche, portando il lavoro svolto in classe (teoria) in laboratorio. Gli esperimenti mi hanno aiutato a risolvere dei dubbi sulla teoria e mi hanno portato a soffermarmi di più e ragionare sugli argomenti teorici per svolgere una buona attività in laboratorio.
- Ho messo in pratica in laboratorio le conoscenze teoriche precedentemente acquisite in classe
- Come applicare in laboratorio i metodi di estrazione della Ficocianina
- attraverso quest'attività sono riuscita ad entrare un po' di più nel mondo della biochimica e ho toccato con mano cosa significa lavorare in un laboratorio senza una metodica da seguire.
- A ragionare su come trattare la proteina per ottenere i risultati che vogliamo (es: precipitazione, denaturazione) anche in base ai giusti quantitativi di reagente.

Questionario di autovalutazione

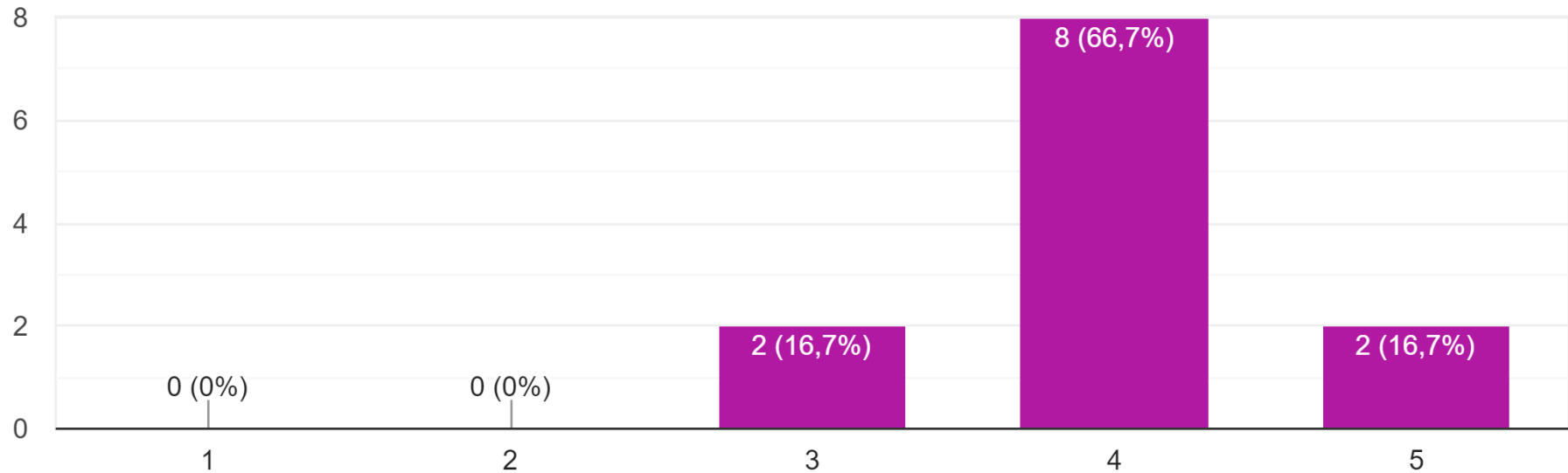
Cosa vorresti approfondire?

- Vorrei approfondire le altre tecniche di isolamento della proteina.
- Vorrei approfondire l'estrazione meccanica della ficocianina e la sua precipitazione con acido acetico.
- Vorrei approfondire qualcosa in più riguardo lo spettro di assorbimento della ficocianina.
- Mi piacerebbe approfondire come si determina la struttura primaria di una proteina in laboratorio. Abbiamo trattato questo argomento solo teoricamente e mi ha incuriosito.
- Le altre tecniche per estrarre la ficocianina.
- Tutto ciò che riguarda la ficocianina anche nel campo alimentare.
- Come purificare le proteine

Questionario di autovalutazione 12/15 risposte

Come valuti il lavoro da te svolto

12 risposte



Ulteriori sviluppi

- Coltivazione *Spirulina* ed estrazione ficocianina da biomassa umida
- Dosaggio della proteina estratta
- Auspicabile: purificazione della ficocianina tramite dialisi (collaborazione con laboratori di ricerca)
- Realizzazione di un elaborato multimediale sull'attività svolta
- Disseminazione dell'attività svolta

GRAZIE PER L'ATTENZIONE...

...e un applauso agli studenti della 5 A Chimica e Materiali
dell'IIS «Focaccia» di Salerno!

Anna Maria Madaio
IIS «Focaccia» di Salerno