UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

Tecniche di riduzione, soppressione ed eliminazione del sapore amaro dagli alimenti

Relatore: Prof. Saverio Santi

Laureando: Tommaso Cazzaro

Matricola 1195083

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE **4**

2. IL SAPORE AMARO **5**

2.1. I recettori del gusto **5**

2.2. Tecniche di valutazione e rilevamento dell'amaro in alimenti e bevande **6**

2.3. Principali sostanze amare negli alimenti **7**

3. TECNICHE DI ELIMINAZIONE DEL SAPORE AMARO **10**

3.1. Tecniche fisiche **10**

3.2. Tecniche di mascheramento **11**

3.3. Tecniche biochimiche ed enzimatiche **14**

3.4. Approccio multi-tecnico **17**

4. CONCLUSIONI **19**

5. BIBLIOGRAFIA **20**

1. INTRODUZIONE

Lo sviluppo del sapore amaro può essere compreso dal punto di vista evolutivo: gli animali hanno sviluppato la percezione dell'amaro per evitare di inghiottire sostanze potenzialmente nocive mentre le piante hanno sviluppato tale sapore per evitare di essere consumate, di conseguenza l'amaro viene associato a cibi avariati o sostanze tossiche risultando estremamente sgradevole al palato.

L'amaro è uno dei cinque sapori fondamentali, generalmente considerato indesiderabile dato che può influire negativamente sulla gradevolezza degli alimenti nei quali viene comunemente mascherato attraverso l'utilizzo di sale, grassi e dolcificanti.
In tempi recenti, l'aumento della coscienza collettiva riguardante una più sana alimentazione ha portato alla luce la necessità di nuovi approcci alla deamarizzazione di cibi e bevande dal momento che, un basso contenuto di sodio, zuccheri, grassi e l'eventuale aggiunta di integratori alimentari quali proteine, vitamine, peptidi e polifenoli può aumentare l'intensità della percezione dell'amaro risultando poco appetibile al consumatore finale.

In questo elaborato di tesi, ben lungi dall'essere un'analisi esaustiva, verranno prese in considerazione nuove tecniche e metodi per modificare, mascherare ed eliminare le molecole responsabili dell'amaro nei cibi e bevande.

2. IL SAPORE AMARO

2.1. I recettori del gusto

Con la parola aroma si intende quell'insieme di percezioni olfattive, gustative e dei recettori tattili della cavità orale, provocato da molecole dette stimolanti. L'aroma, oltre i gusti fondamentali ossia dolce, amaro, salato, acido e umami, comprende anche l'odore e alcune percezioni chemestetiche quali piccante, astringente e rinfrescante.[1] Secondo studi più recenti l'insieme completo dei sapori può andare oltre i cinque fondamentali introducendone di nuovi ossia quello degli acidi grassi, metallico, carbonatazione e kokumi (pienezza del palato).[2]

Il senso del gusto si basa sull'interazione tra molecole e ioni idrosolubili con i bottoni gustativi di lingua, palato molle, faringe, epiglottide e della mucosa interna della guancia.[1] All'interno del cavo orale sono presenti più di 10.000 papille gustative contenenti circa 50-100 calici gustativi.[3]

Per essere percepito, un composto non volatile deve prima disciogliersi nella saliva per poi diffondersi all'interno del cavo orale e raggiungere i recettori del gusto (TRC) all'interno delle papille gustative.[4]

Si possono distinguere due diverse tipologie di meccanismo a seconda dei gusti considerati: il sapore dolce, amaro e umami interagisce con recettori accoppiati con proteine G, mentre le molecole responsabili del sapore acido e salato interagiscono con canali ionici.[5]

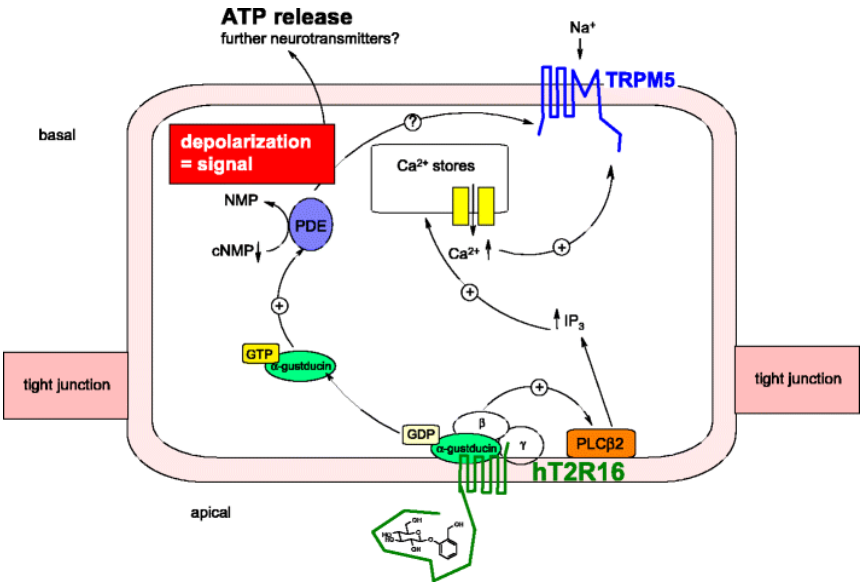

Fig. 1 Meccanismo di trasduzione del sapore amaro

Il meccanismo di trasduzione dell'amaro (**Fig. 1**) ha inizio quando una molecola si deposita sulla superficie extracellulare del recettore specifico (TAS2Rs) che a sua volta attiva una proteina G

responsabile della fosfolipasi che converte il fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP_2) in inositolo-1,4,5-trifosfato (IP_3). La formazione del composto IP_3 attiva dei recettori che promuovono l'apertura dei canali del calcio favorendo la fuoriuscita dello ione Ca^{2+} nel citoplasma. Questo comporta la depolarizzazione della membrana rilasciando ATP che funge da neurotrasmettitore per attivare le afferenze gustative.[6]

Negli esseri umani i recettori del sapore amaro sono codificati da 25 geni diversi, in forte contrasto se paragonati ad un solo tipo: uno per il dolce e uno per il salato. Pertanto se si considera che i recettori per l'amaro (T2R) sono altamente specifici se paragonati alla bassa specificità delle interazioni dei recettori del gusto dolce (T1R), si chiarisce il motivo per il quale non è possibile determinare a priori la natura amara di una molecola.[4]

2.2. Tecniche di valutazione e rilevamento dell'amaro in alimenti e bevande

Il grande numero e varietà di sostanze amare pone un freno allo sviluppo di metodologie analitico - strumentali, per questo motivo la tecnica più utilizzata risulta essere il pannel test.

Un pannel test è formato da un gruppo eterogeneo di circa 10 di persone rigorosamente selezionate ed addestrate con il compito di valutare le diverse proprietà organolettiche di molteplici alimenti sulla base di vari aspetti quali durata, persistenza, intensità dell'amaro.
Molto spesso il pannel test viene fatto in maniera comparativa tra varie sostanze incognite ed uno standard di riferimento, che nel caso dell'amaro principalmente sono soluzioni di caffeina, catechina, chinino solfato e dicloroidrato.
Nonostante la vasta diffusione, il pannel test incorre in diverse problematiche quali lunghe attese per ottenere il risultato finale, costi elevati dovuti al rigoroso processo di selezione dei candidati e potenziali problemi di sicurezza per i partecipanti dato che è possibile testare solamente sostanze non nocive all'organismo umano. Per questi motivi nel corso degli anni sono stati sviluppati metodi alternativi quali l'utilizzo di "lingue elettroniche" e analisi tramite spettrometria di massa.[6,7]

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS) negli ultimi anni ha assunto un ruolo sempre più importante a causa dell'elevata selettività, sensibilità, precisione ed accuratezza della misura effettuata.
La scelta del metodo di ionizzazione ha un effetto significativo sul risultato finale dal momento che diverse sostanze amare richiedono diverse modalità di ionizzazione o polarità; il metodo più utilizzato risulta essere l'electrospray che permette di ottenere spettri sia in modalità positiva che negativa.[6]

Un ulteriore metodo di analisi molto utilizzata negli ultimi anni è la cosiddetta “lingua elettronica” il cui scopo è quello di analizzare diversi composti in soluzione tramite una serie di sensori chimici a bassa selettività e aspecifici abbinati ad uno strumento chemiometrico per l’analisi dei dati. Questi sistemi sono in grado di sfruttare diversi sensori di tipo voltammetrico, potenziometrico, ottico e impedenziometrico.[6]

I due metodi analitici appena citati hanno il vantaggio di poter testare un numero maggiore di molecole, anche nocive per l’essere umano, cosa proibita nei pannel test, ma hanno entrambe il problema dei costi elevati di acquisizione dei macchinari che richiedono personale specializzato per poter essere utilizzati.

2.3. Principali sostanze amare negli alimenti

Negli alimenti la maggior parte dei composti amari deriva da piante e funghi, mentre altri si formano attraverso reazioni chimiche durante la lavorazione o conservazione come, ad esempio, la reazione di Maillard nel pane.

Oltre a essere numerosi, i composti amari presentano anche un’ampia gamma di variazioni chimico - strutturali e includono terpenoidi (iso-α-acidi, amarogentina), alcaloidi (nicotina, chinina, caffeina), flavonoidi (naringina, limonina), fenoli, peptidi, amminoacidi, glucosinolati (GSL) e isotiocianati (ITC) ma non si limitano solo agli elementi succitati (**Fig. 2**) (**Fig. 3**).[8]

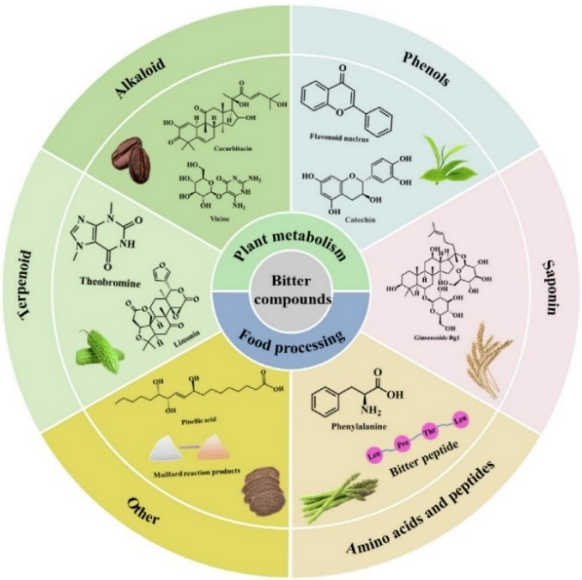

Fig. 2 Fonti principali del sapore amaro negli alimenti

Amminoacidi, peptidi e i loro derivati conferiscono sapore umami agli alimenti, aumentandone la gradevolezza. Alcuni tipi però, presentano un sapore amaro poco gradevole al palato.
I peptidi sono generalmente prodotti dall'idrolisi delle proteine dove diversi gradi di idrolisi possono comportare, in alimenti quali formaggio, latte, carne, soia, cacao, l'insorgere di sapori fortemente amari. Sebbene la scomposizione delle proteine in brevi catene peptidiche ne favorisca l'assorbimento nel tratto gastrointestinale, il loro grado elevato di amarezza li rendono indesiderabili al gusto.[8]
È stato dimostrato che l'amarezza dei peptidi è direttamente correlata alla loro idrofobicità per tanto viene definito un parametro chiamato idrofobicità media $Q = \Delta G/n$ dove ΔG e n sono rispettivamente l'energia libera di trasferimento e il numero di residui di amminoacidi. Quando il valore Q di un peptide raggiunge 1400 cal mol^{-1}, è considerato amaro, la regola non sussiste più se vengono considerati peptidi con pesi molecolari superiori a 6 kDa.[9]

I composti fenolici invece, sono i principali responsabili dell'amarezza e dell'astringenza in molti frutti e bevande come agrumi e derivati.
Negli agrumi la naringina e la limonina sono i due componenti principali responsabili del sapore amaro: la naringina si trova principalmente nella polpa, buccia e semi di arance e, in maniera più massiccia nel pompelmo, mentre la limonina viene sintetizzata da un enzima a partire da un precursore insapore e rilasciata in maniera graduale quando le cellule vengono danneggiate dai procedimenti meccanici tipici della spremitura.[10,11]

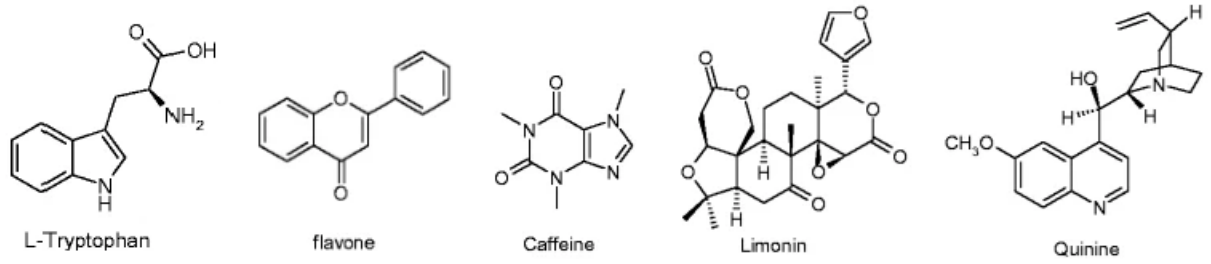

Fig. 3 Esempi di molecole amare

Nella birra il caratteristico sapore amaro è dato dagli acidi amari del luppolo e sono classificati in α e β acidi che, a seguito di reazioni di isomerizzazione durante il processo produttivo della birra, vengono convertiti in iso-α e iso-β acidi responsabili dell'amaro persistente e duraturo nel prodotto finale.[8]

Un'altra classe importante di sostanze amare sono gli alcaloidi, i due più importanti sono rappresentati da caffeina e chinina.

La caffeina, contenuta naturalmente in te e caffè, conferisce un sapore amaro unico a cibi e bevande, molto gradito dai consumatori. Il consumo ha effetti fisiologici quali aumento della pressione sanguigna e stimolazione del sistema nervoso centrale.

Anche la chinina risulta essere amara, più della caffeina, ed è impiegata per dare sapore amaro a bevande alcoliche e non. In passato veniva somministrata come farmaco con proprietà antimalariche e antipiretiche mentre ora viene utilizzata, talvolta assieme alla caffeina, come sostanza amara di riferimento e comparativa nei pannel test.[12]

3. TECNICHE DI ELIMINAZIONE DEL SAPORE AMARO

3.1. Tecniche fisiche

Le tecniche fisiche consistono in una serie di trattamenti di varia natura che permettono di eliminare e/o degradare fisicamente i componenti responsabili dell'amaro dagli alimenti.
Nei succhi di frutta, in particolare per gli agrumi, le principali tecniche fisiche di rimozione dei composti amari comportano l'uso di resine adsorbenti o a scambio ionico, micro/ultrafiltrazione.

La facilità di utilizzo combinata ad un'elevata vita utile sono le cause principali della cospicua diffusione di resine adsorbenti e a scambio ionico. Copolimeri di stirene-divinilbenzene sono comunemente usati per deamarizzare grazie alla loro efficienza, stabilità, facilità di rigenerazione ed economicità; essi sono in grado di adsorbire i principali responsabili del sapore amaro nel succo d'arancia ossia naringina e limonina, mantenendo pressoché inalterato il valore biologico del prodotto finale.[11]

Resine macroporose con elevata idrofobicità (PAD550 e PAD600) sono state impiegate per adsorbire la naringina dal succo d'uva, dimostrando un'elevata capacità di adsorbimento abbinata ad una cinetica veloce.
L'uso di membrane nanofibrose di nylon-6 elettrofilate (NFM) per ultrafiltrazione si sono rivelate ottimali per l'eliminazione di composti amari (naringina), eventuali impurezze e sostanze indesiderate dal succo di agrumi.[13]

Gli idrolizzati proteici, per rimuovere i peptidi responsabili del sapore amaro, possono subire trattamenti di varia natura quali: trattamento con carbone attivo, tramite precipitazione al punto isoelettrico oppure l'estrazione con alcool.
Il carbone attivo, grazie all'elevata area superficiale e alla struttura microporosa, risulta essere un buon materiale adsorbente in grado di ridurre e rimuovere l'amaro. Tuttavia elimina anche nutrienti benefici quali amminoacidi essenziali ed altre proteine abbassando il valore biologico dell'idrolizzato. In generale il carbone attivo è un metodo economico e relativamente non selettivo in grado di assorbire i peptidi sia amari che non, è considerato sicuro per la salute umana anche se può avere dei rischi potenziali perché può contenere impurità in tracce come idrocarburi policiclici aromatici dannosi per l'organismo umano.
Un'altra tecnica molto utilizzata sfrutta la diversa solubilità al punto isoelettrico dei peptidi, i quali vengono fatti precipitare in maniera selettiva modificando il loro pH.

Infine, diverse tipologie di alcoli quali etanolo, isopropanolo e il 2 - butanolo possono essere utilizzati come solventi per estrarre in maniera selettiva peptidi amari da miscele complesse. Questa tipologia di trattamento è risultata molto efficace nel rimuovere il sapore amaro da idrolizzati proteici di salmone.[9]

Attualmente tecnologie innovative come il campo elettrico pulsato (PEF) e l'utilizzo di ultrasuoni (US) sono ampiamente utilizzate per migliorare i processi tradizionali nell'industria alimentare. Queste tecniche hanno il potenziale di fornire un nuovo approccio per la rimozione di sostanze amare dagli alimenti e, al contempo, massimizzare la ritenzione di nutrienti e componenti funzionali degli alimenti.

Il campo elettrico pulsato (PEF) è stato utilizzato come pretrattamento per migliorare il processo di deamarizzazione del nocciolo di ciliegia e promuovere la degradazione dei precursori del cianuro naturalmente presenti. I risultati hanno rivelato che la disintegrazione cellulare indotta dal PEF ha promosso il trasferimento di massa e il contatto tra cianuro e β-glucosidasi, con una significativa riduzione del contenuto di amigdalina e HCN responsabili del sapore amaro.[14]

Gli ultrasuoni (US) sono stati utilizzati per ottimizzare la deamarizzazione delle olive. Gli effetti meccanici, chimici e di cavitazione prodotti dagli US hanno accelerato e aumentato l'efficienza del processo di assorbimento di vari solventi da parte dell'oliva, riducendo al minimo l'uso di sostanze chimiche. Rispetto ai metodi convenzionali, questa tecnica è in grado di fornire una qualità nutrizionale e organolettica superiore, vantando tempi di lavorazione più brevi e la capacità di ridurre i rischi chimici legati all'utilizzo di solventi come l'idrossido di sodio.[15]

3.2. Tecniche di mascheramento

Le tecniche di mascheramento si possono dividere in due categorie principali: la prima, è l'incapsulamento, che limita il contatto tra la molecola amara e i recettori mediante l'utilizzo di ciclodestrine oppure formando una barriera tramite emulsioni, liposomi e l'utilizzo di metodi spray-drying; la seconda categoria, invece, consiste nell'utilizzo di sapori forti e congruenti per coprire l'amaro. I materiali utilizzati in questi procedimenti possono essere prodotti a partire da ingredienti ad uso alimentare come polisaccaridi, proteine e lipidi.

Le sostanze incapsulante con più applicazioni in ambito alimentare e farmaceutico risultano essere le ciclodestrine (CD) (**Fig. 4**) cioè oligosaccaridi ciclici formati da monomeri di glucopiranosio uniti da legami α-(1,4) glicosidici e chiusi ad anello. Esse formano una struttura troncoconica cava con un diametro interno variabile di 5-10 Å e si possono distinguere in α, β, γ-CD se l'anello è costituito da

6, 7 o 8 unità monomeriche. Le CD hanno la cavità idrofobica e la superficie della stessa, risulta idrofila, questa peculiarità è spiegata dal fatto che, all'interno, sono presenti solamente atomi di idrogeno e ponti ossigeno, mentre all'esterno sono disposti gruppi ossidrilici. In soluzione le molecole d'acqua nella cavità interna possono essere sostituite da gruppi funzionali o molecole idrofobiche. Considerando che la maggior parte dei composti amari sono in parte o del tutto idrofobici, essi possono entrare nella cavità della CD, sostituirsi alle molecole di H_2O e formare un complesso di inclusione supramolecolare che non viene interpretato come amaro dai recettori. Le CD hanno però lo svantaggio di poter legare solamente una molecola alla volta di conseguenza, per ottenere l'effetto di mascheramento desiderato, devono essere presenti in concentrazione simile alla sostanza amara presente.[4,16]

Le CD si sono rivelate molto efficaci e vantaggiose in cibi e bevande: la β-CD è stata usata per deamarizzare i succhi di frutta riducendo dell'81% il contenuto di naringina e limonina e del 30-50% di flavonoidi e limonoidi amari dal succo d'arancia, mentre, negli idrolizzati proteici, queste sostanze sono in grado di ridurre sensibilmente l'amaro e mantenere un valore biologico più elevato nel prodotto finale rispetto a metodi fisici come l'estrazione con alcool.[9,11]

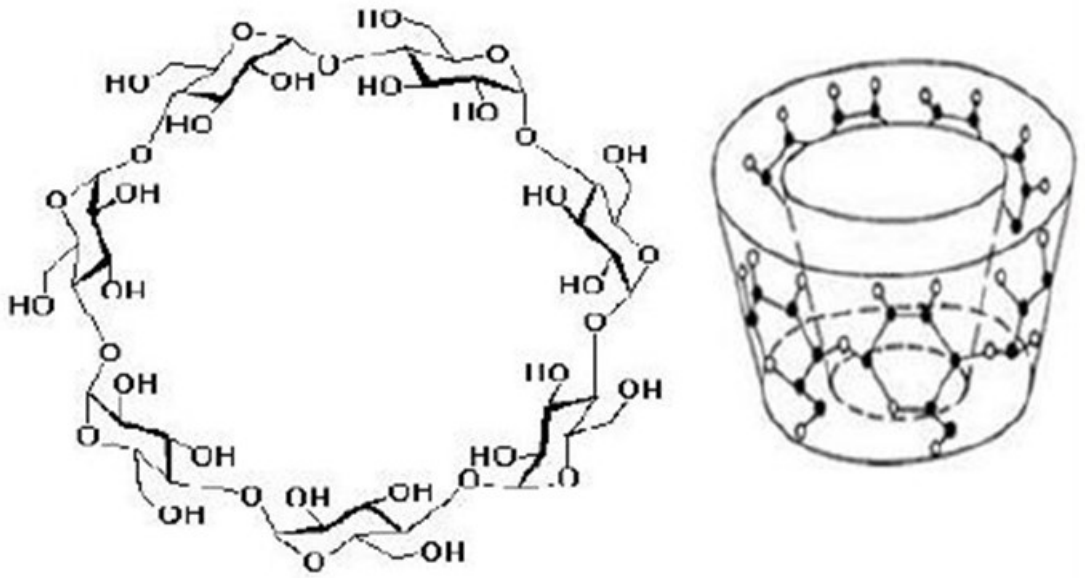

Fig. 4 Struttura tridimensionale di una β-ciclodestrina

Nel trattamento di peptidi e di idrolizzati proteici le tecniche di incapsulamento si basano sull'utilizzo di emulsioni, di liposomi e di metodi spray-drying.

Le prime sono utilizzate per incapsulare i peptidi idrofobici che vengono infatti dispersi nella fase oleosa con successiva omogenizzazione e formazione un'emulsione di olio e acqua (O/W). Questo tipo di emulsioni però, non sono termodinamicamente stabili a causa dell'eccesso di energia libera superficiale che, nel tempo, porta alla separazione tra le fasi tramite flocculazione e coalescenza.

Inoltre, eventuali bitter idrofili andrebbero a disperdersi nella fase acquosa aumentando considerevolmente la percezione dell'amaro in bocca. Per ovviare a queste problematiche si sono studiate emulsioni multiple di tipo acqua in olio in acqua ($W_1/O/W_2$) dove una fase acquosa è stata rivestita da una fase oleosa e il tutto nuovamente rivestito da una fase acquosa differente (**Fig. 5**). Pertanto, le gelificazioni della fase acquosa interna ed esterna hanno permesso di ridurre le dimensioni delle particelle della doppia emulsione migliorandone la stabilità fisica, aumentando non solo l'efficienza di incapsulamento, ma anche abbattendo il sapore amaro percepito in maniera maggiore rispetto ad una semplice emulsione O/W.[9,13]

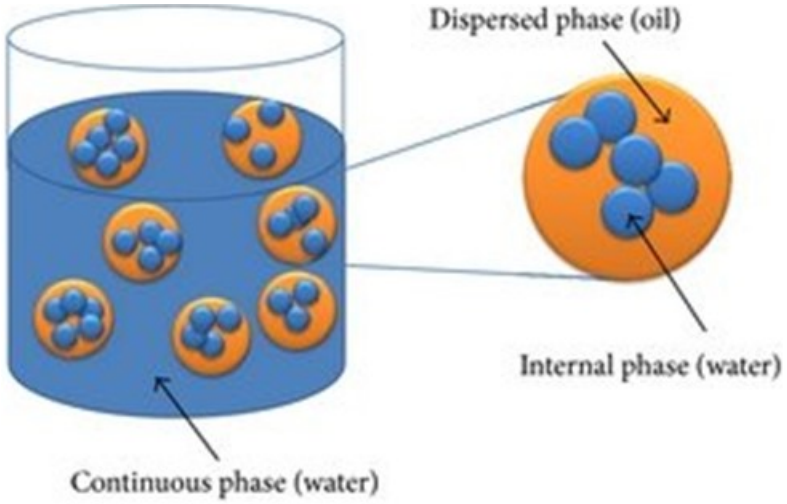

Fig. 5 Emulsione acqua in olio in acqua

Un'altra tecnica molto studiata consiste nell'utilizzo dei liposomi per il mascheramento (**Fig. 6**).
I liposomi sono delle vescicole artificiali di forma sferica formate da un doppio strato fosfolipidico in grado di incapsulare composti bioattivi idrofobici, idrofili ed anfifilici. I fosfolipidi sono una classe di lipidi formati da una testa polare idrofila costituita da un gruppo fosfato e una coda apolare idrofoba costituita da due acidi grassi. L'efficienza di mascheramento dei liposomi dipende dal peso molecolare, dalla polarità e dalla carica dei peptidi. Nonostante la loro efficacia, l'uso di questa tecnologia risulta non propriamente adatta ad applicazioni industriali a causa dell'alto costo e dell'instabilità dei liposomi che ne rende difficoltosa la conservazione per lunghi periodi di tempo.[9,13]

Attualmente il metodo di spray-drying risulta essere quello più utilizzato in ambito industriale grazie alla sua facilità d'impiego, al basso costo e alla scalabilità. Questo metodo prevede lo spruzzamento (spraying), attraverso un ugello in una camera ad alta temperatura, di una soluzione polimerica fluida oppure una dispersione colloidale contenente peptidi. L'acqua presente evapora rapidamente (drying) inducendo la formazione di microparticelle solide al cui interno vi sono i peptidi intrappolati di una matrice polimerica o colloidale di composizione definita dal materiale di partenza.

Proteine e carboidrati come oligo e polisaccaridi sono spesso utilizzati come materiali per la creazione della capsula.[9]

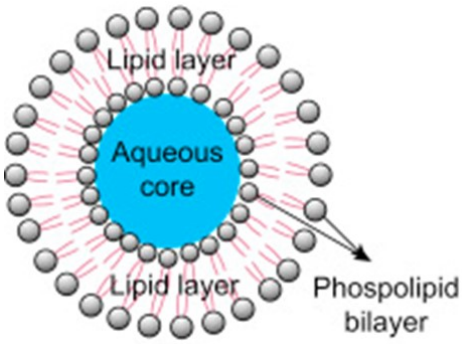

Fig. 6 Liposoma

L'utilizzo di sapori forti ha lo scopo di rendere l'amaro parte di una miscela complessa dove altre caratteristiche di tipo sensoriale (dolce, salato, acido e umami) risultano dominanti.
Dolcificanti e aromatizzanti sono comunemente usati, ad esempio, nei soft drink simil cola per sopprimere l'amaro della caffeina mentre varie tipologie di sale come glutammato, acetato e cloruro di sodio mascherano l'amaro e, al contempo, fungono da esaltatori del sapore dolce. L'uso di sodio però, ha controindicazioni sulla salute, per questo motivo è impiegato in basse concentrazioni.
Una combinazione di aromi e dolcificanti può offrire vantaggi dato che aromi e dolcificanti diversi possono agire su diverse popolazioni di recettori del gusto, attivando così più proteine G, più segnali di "secondo messaggero", più canali ionici e più segnali nervosi.[3,5]

3.3. Tecniche biochimiche ed enzimatiche

Le tecniche di modifica biochimica ed enzimatica sono largamente utilizzate per il trattamento di peptidi, idrolizzati proteici e in succhi di frutta.
Nelle proteine il sapore amaro è dato dalla presenza di amminoacidi idrofobici all'interno della catena e, per eliminarlo, si può agire addizionando dei residui alla catena proteica tramite la reazione delle plasteine impedendo così, il contatto con il recettore, oppure attraverso la rimozione di tali amminoacidi tramite idrolisi promossa da enzimi proteasi e peptidasi. Nei succhi di frutta invece, gli enzimi vengono utilizzati per degradare le molecole amare.

La reazione delle plasteine (**Fig. 7**) è un processo catalizzato da proteasi che induce i frammenti peptidici a combinarsi per formare aggregati proteici. Il prodotto ottenuto alla fine del processo prende il nome di plasteina, un gel formato da aggregati di proteine idrolizzate con peptidi in presenza di proteasi. Il meccanismo di aggregazione però, non risulta ancora del tutto chiaro, ma le ultime

ricerche a riguardo hanno evidenziato come reazioni di condensazione e transpeptidazione possano essere alla base del processo.[17]

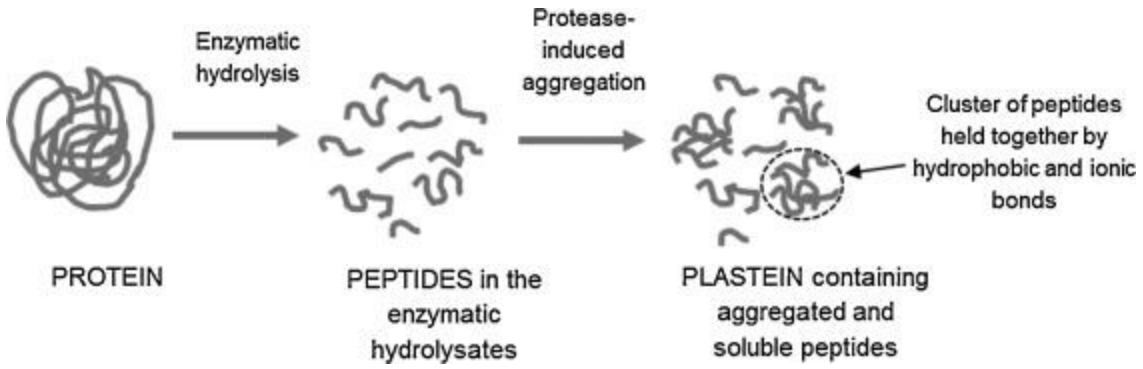

Fig. 7 Reazione delle plasteine

La reazione delle plasteine viene suddivisa in tre passaggi distinti: il primo consiste nell'idrolisi della proteina a carico di un enzima detto proteolitico, il secondo prevede la concentrazione dell'idrolizzato proteico attraverso evaporazione o liofilizzazione, mentre il terzo comporta la formazione della plasteina per incubazione, con stessa o diversa proteasi, di alte concentrazioni di idrolizzato. Le proteasi più utilizzate sono: papaina, pepsina, tripsina e α-chimotripsina.
Grazie a questa reazione i residui idrofobici degli amminoacidi sono concentrati nel nucleo proteico diventando così inaccessibili al recettore del sapore amaro.[17]
Un'ulteriore applicazione della reazione delle plasteine in ambito alimentare è legata alla possibilità di aumentare il valore biologico (VB) di proteine alimentari oppure di impiegare fonti proteiche non convenzionali quali alghe, sottoprodotti di carne e vegetali attraverso l'incorporazione di amminoacidi essenziali. Nonostante questa prospettiva, esiste un limitato interesse nell'utilizzo commerciale della reazione delle plasteine per aumentare il VB di proteine a causa degli elevati costi dei processi enzimatici, alla bassa resa del prodotto e, soprattutto, per l'ampia disponibilità di proteine alternative con la qualità nutrizionale e le proprietà funzionali desiderate.[17]

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli sforzi per utilizzare enzimi di peptidasi e proteasi allo scopo di ridurre il sapore amaro degli idrolizzati proteici; si è visto che l'incubazione sequenziale o simultanea di idrolizzati con vari enzimi è in grado di rilasciare i residui idrofobici dai peptidi amari. Gli enzimi più comunemente utilizzati a tale scopo sono quelli di proteasi, esopeptidasi ed endopeptidasi. Poiché il sapore amaro dei peptidi deriva dalla presenza di residui ramificati o idrofobici localizzati nelle estremità N- o C-terminali, è possibile eseguire un ulteriore idrolisi utilizzando rispettivamente un'amminopeptidasi o una carbossipeptidasi.[9]
L'efficacia della deamarizzazione dipende dal tipo di enzima utilizzato: è stato dimostrato che diverse amminopeptidasi sono specifiche per idrolizzare amminoacidi idrofobici e aromatici adiacenti

all'estremità N-terminale dei peptidi. Ad esempio amminopeptidasi provenienti dall'*Aspergillus niger* e *Thermomyces lanuginous* sono state impiegate con successo per deamarizzare idrolizzati proteici di soia, caseina, latte e formaggio; idrolizzati di soia amari trattati con amminopeptidasi estratta dalla *Grifola frondosa* hanno rilasciato amminoacidi idrofobici come valina, leucina, fenilalanina, tirosina e isoleucina riducendo complessivamente il sapore amaro.

Esistono anche miscele enzimatiche commerciali come Corolase che contiene aminopeptidasi, elastasi, chimotripsina, triptica e dipeptidasi utilizzate per il trattamento di varie proteine sia animali che vegetali, in quanto fornisce un alto grado di idrolisi senza produrre peptidi amari.[9]

Le carbossipeptidasi sono specifiche per la rimozione di amminoacidi dall'estremità C-terminale dai peptidi, ad esempio, idrolizzati proteici di soia sono stati fermentati utilizzando *Lactobacillus perolens, Rhizopus oryzae* e *Actinomucor elegans* riducendo l'amarezza ad un livello minimo (0,7) rispetto agli idrolizzati non fermentati (2,8–8,0) e all'isolato proteico di soia non trattato (2,8), dove la scala di amarezza utilizzata varia da nessuna percezione (0) a forte percezione (10).[9]

Oltre alle peptidasi, anche proteasi alcaline/neutre sono state utilizzate per deamarizzare gli idrolizzati proteici. Studi recenti hanno dimostrato che le proteasi isolate da piantine di soia possono rimuovere completamente il sapore amaro da idrolizzati proteici di soia ottenuti tramite alcalasi 2,4 L senza ridurre l'attività antiossidante del prodotto finale. Inoltre, l'idrolisi delle proteine della soia mediante tripeptidasi e proteasi alcalina non solo ha ridotto il sapore amaro, ma ha anche migliorato le proprietà funzionali degli idrolizzati.[9]

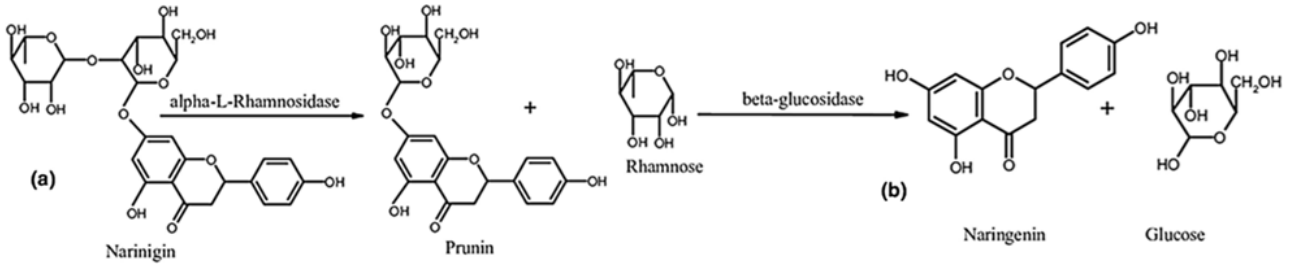

Fig. 8 Idrolisi della naringina

La deamarizzazione enzimatica è utilizzata non solo negli idrolizzati proteici, ma è largamente impiegata per il trattamento di succhi di agrumi allo scopo di rimuovere la naringina e limonina, i principali responsabili del sapore amaro.

La naringina viene idrolizzata dall'α-L-ramnosidasi in ramnosio e prunina, quest'ultima, più amara della naringina, viene ulteriormente idrolizzata dall'enzima β-glucosidasi in glucosio e naringenina, un composto senza sapore, producendo così un succo di agrumi più gradevole al palato (**Fig. 8**).[18]

La limonina invece, non è presente come sostanza pura negli agrumi, ma è il prodotto biosintetico da precursore non amaro. Essa viene degradata da enzimi idrolasi e deidrogenasi in composti non

amaricanti attraverso percorsi molteplici, sia individuali che cumulativi, al fine di rendere il succo più attraente per i consumatori (**Fig. 9**).[18]

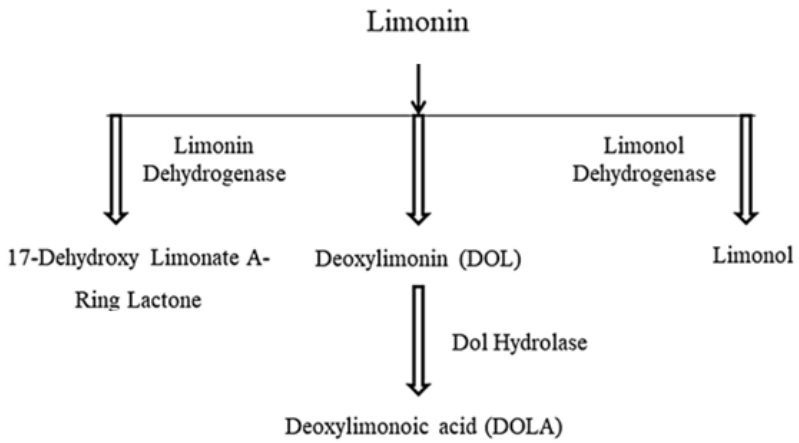

Fig. 9 Percorsi catabolici per la trasformazione della limonina in limonina non amara

3.4. Approccio multi-tecnico

L'utilizzo di una singola tecnica per la rimozione dell'amaro potrebbe non sempre dare i risultati sperati. Negli ultimi anni i ricercatori stanno esplorando l'applicazione pratica di più tecniche di natura diversa allo scopo di ottenere un risultato finale migliore, in tempi più brevi, riducendo anche l'impatto ambientale. Ad esempio, per deamarizzare il succo di cordifolia, è stato impiegato un metodo ad ultrasuoni in combinazione con l'utilizzo di β-CD: gli ultrasuoni sono in grado di generare radicali idrossilici utili a degradare i composti amari lipofili mentre le β-CD incapsulano i composti meno polari all'interno della loro cavità, riducendo il contatto con le papille gustative e ottenendo così, l'effetto deamarizzante in dieci minuti.[9]

L'utilizzo di ultrasuoni accoppiati con resine adsorbenti e trattamento enzimatico sono state applicate per la deamarizzazione del pomelo.
I risultati ottenuti hanno dimostrato come l'accoppiamento US-resina e US-enzima si sia rivelato molto più efficace nella rimozione dei composti amari rispetto al trattamento tramite singola tecnica. Nel primo caso si è osservata una diminuzione significativa della naringina dovuta all'interazione tra US e la resina che ha facilitato il processo di adsorbimento delle molecole target nel substrato.
Gli effetti meccanici, chimici e di cavitazione delle onde ultrasoniche hanno migliorato l'idrolisi e hanno aumentato la velocità delle reazioni enzimatiche mantenendo pressoché inalterato il valore biologico del prodotto finale.[19]

Per naringina e limonina nel succo di pompelmo, è stata valutata la riduzione di entrambi i componenti amari simultaneamente utilizzando un approccio combinato biochimico e fisico. La

strategia proposta si basa sull'uso di supporti eterofunzionali con gruppi gliossilici che consentono l'immobilizzazione covalente dell'enzima naringinasi, che idrolizza la naringina, e i gruppi alchilici che consentono l'adsorbimento della limonina. I supporti utilizzati sono butil-gliossili agarosio (BGA) e ottil-gliossil agarosio (OGA). La deamarizzazione è stata valutata utilizzando enzimi solubili, supporti privi di enzimi e catalizzatori immobilizzati. L'enzima immobilizzato in BGA ha ridotto le concentrazioni di naringina e limonina rispettivamente del 54 e del 100%, mentre l'uso del catalizzatore immobilizzato in OGA ha consentito una riduzione rispettivamente del 74 e del 76%, ottenendo una concentrazione finale di entrambi i componenti amari al di sotto della loro soglia di rilevamento.[20]

4. CONCLUSIONI

La riduzione del sapore amaro in alimenti e bevande rimane tutt'oggi una sfida enorme. La maggior parte delle tecnologie di soppressione utilizzate sono state scoperte attraverso svariati tentativi ed errori. Inoltre, la presenza di un elevato numero recettori T2R e la loro elevata diversità rende il meccanismo di trasduzione del sapore amaro non ancora del tutto chiaro, rendendo difficoltosa la formulazione di nuovi approcci alla deamarizzazione.

Per l'eliminazione selettiva delle molecole amare non esiste un procedimento univoco ma, a seconda dei casi e delle necessità, è possibile applicare la tecnica più adatta. È inoltre possibile procedere con metodo multi-tecnico che permette di combinare tecniche fisiche, biochimiche e di mascheramento per ottenere risultati ottimali.

È comunque auspicabile che, in un prossimo futuro, l'evoluzione delle teorie fisiologiche riguardanti la biologia del gusto, nonché i progressi nella tecnologia di lavorazione degli alimenti, possano promuovere la scoperta di nuovi metodi e tecnologie per limitare l'amarezza degli alimenti, aumentando così l'accettabilità da parte dei consumatori.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Cabras, Paolo. *Chimica degli alimenti*. Piccin, 2004.
2. Di Pizio A; Ben Shoshan-Galeczki Y; Hayes JE; Niv MY. *Bitter and sweet tasting molecules: It's complicated*. Neurosci Lett. 2019, 700, 56-63.
3. Sun-Waterhouse D; Wadhwa, S.S. *Industry-Relevant Approaches for Minimising the Bitterness of Bioactive Compounds in Functional Foods: A Review*. Food Bioprocess Technol. 2013, 607–627.
4. Coupland JN; Hayes JE. *Physical approaches to masking bitter taste: lessons from food and pharmaceuticals.* Pharm Res. 2014, 31, 2921-2939.
5. Ley J.P. *Masking Bitter Taste by Molecules. Chem. Percept.* 58–77 2008.
6. Aliani M; Neason Akivah M. *Bitterness Perception, Chemistry and Food Processing*. Wiley-Blackwell, 2017.
7. Ryan S; Lin F; Wei MG; Wei-Guang S; Ann K. *Food Funct*. 2023.
8. Yan; Jingna; Huarong T. *An Overview of Bitter Compounds in Foodstuffs: Classifications, Evaluation Methods for Sensory Contribution, Separation and Identification Techniques, and Mechanism of Bitter Taste Transduction*. Comp. Rev. Food Sci. Food Saf. 2023, 187–232.
9. Mirzapour-Kouhdasht A; McClements D.J; Taghizadeh M.S. *et al. Strategies for oral delivery of bioactive peptides with focus on debittering and masking*. npj Sci. Food 2023, 7, 22.
10. Drewnowski A; Gomez-Carneros C. *Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review*. Am. J. Clin. Nutr. 2000, 72, 1424-35.
11. Arun KG; Subhamoy D; Pratiksha VK; Bindu N; Lembe SM; Khayelihle N; Umezuruike LO; McClements DJ; Poonam M. *Current and emerging applications in detection and removal of bitter compounds in citrus fruit juice: A critical review*, Food Biosci. 2023, 55, 102995.
12. Fattorusso E; Taglialatela-Scafati O. *Alkaloids and the Bitter Taste. Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*. Wiley-VCH, 2007.
13. Xinyu C; Wangsheng Z; Xue L; Erzheng S; Jiahong W. *Bitter flavors and bitter compounds in foods: identification, perception, and reduction techniques,* Food Res. Int. 2024. 183, 114234.
14. Giancaterino M; Fauster T; Krottenthaler A; Jäger H. *Effect of pulsed electric field pre-treatment on the debittering process of cherry kernels*, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 3, 2023, 103234.
15. Habibi M; Golmakani MT; Mesbahi G; Majzoobi M; Farahnaky A. *Ultrasound-accelerated debittering of olive fruits*, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 31, 2015, Pages 105-115.

16. Szejtli J; Szente L. *Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 61, 2005, 115-125.
17. Gong M; Aishwarya M; Gibson A; Udenigwe CC. *Mechanisms of plastein formation, and prospective food and nutraceutical applications of the peptide aggregates,* Biotechnol. Rep. 5, 2015, 63-69.
18. Rahman, N; Ahmed T; Alam MKU; Nayik G.A; Sarwar N. *Bitterness in Citrus Fruits: Approaches to Quantify and Reduce the Bitterness*. 2024.
19. Gupta AK; Sahu PP; Mishra P. *Ultrasound aided debittering of bitter variety of citrus fruit juice: Effect on chemical, volatile profile and antioxidative potential*, Ultrason. Sonochem. 81, 2021, 105839.
20. Muñoz, M.; Holtheuer, J.; Wilson, L.; Urrutia, P. *Grapefruit Debittering by Simultaneous Naringin Hydrolysis and Limonin Adsorption Using Naringinase Immobilized in Agarose Supports.* Molecules 2022, 27, 2867.