

Università degli Studi di Napoli Federico II

Facoltà di Agraria

Dipartimento di Scienza degli Alimenti



**Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie delle
Produzioni Agro-Alimentari
XX ciclo**

Tesi sperimentale

Nuovi marcatori per stabilire *ex-post* l'intensità del
trattamento termico nel latte del commercio

Tutore:
Ch.mo Prof. Francesco Addeo

Dottorando:
Dr. Paolo Vangone

Coordinatore:
Ch.mo Prof. Salvatore Spagna Musso

Triennio accademico 2004-2007

INDICE

1. Introduzione	3
1.1 Il latte.....	3
1.2 Composizione glucidica.....	3
1.3 Composizione lipidica.....	4
1.4 Composizione minerale.....	5
1.5 Composizione proteica.....	5
1.5.1 Micelle caseiniche.....	5
1.5.2 Proteine del siero.....	9
1.6 Trattamenti termici del latte.....	13
1.7 I lattini alimentari a ridotto tenore in acqua.....	14
1.7.1 Tipi e finalità.....	14
1.8 Produzione industriale di caseina e caseinati.....	16
1.9 I co-precipitati.....	18
1.10 Reazioni indotte dal calore durante i trattamenti termici di latte e derivati.....	18
1.10.1 Modifiche delle catene laterali degli amminoacidi.....	19
- Reazione di Maillard e formazione di furosina.....	21
1.10.2 Denaturazione delle proteine.....	26
- Cinetica della denaturazione.....	26
- Degradazione termica delle siero-proteine.....	27
2. Scopo del lavoro sperimentale e risultati da conseguire	33
3. Materiali e Metodi	36
3.1 Preparazione dei campioni.....	36
3.2 Elettroforesi.....	37
3.2.1 Preparazione dei campioni per l'analisi elettroforetica.....	38
3.2.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato....	39
3.3 Immunoblotting.....	40
3.4 Spettrometria di massa MALDI-TOF.....	40
3.4.1 Spettri MALDI-TOF dei campioni.....	41
3.5 Idrolisi enzimatiche.....	42
3.5.1 Digestione con tripsina.....	43
3.5.2 Digestione con pepsina.....	43

3.6	Analisi effettuate mediante RP-HPLC.....	43
3.6.1	Purificazione del peptide sintetico.....	44
3.7	Ricerca di un marcatore molecolare e retta di taratura.....	44
4.	Risultati e Discussione.....	46
4.1	Elettroforesi SDS-PAGE.....	46
4.1.1	Piastra A.....	47
4.1.2	Piastra B.....	48
4.2	Immunoelettroblotting.....	51
4.3	Analisi mediante RP-HPLC.....	52
4.4	Analisi mediante MALDI-TOF-MS.....	53
4.4.1	Analisi sulle frazioni di insolubile e solubile in citrato.....	53
4.4.2	Analisi sulle frazioni di insolubile e solubile in citrato dopo idrolisi con tripsina	55
4.4.3	Analisi quantitativa delle sieroproteine denaturate in termini di β Lg.....	57
4.5	Analisi del caseinato di calcio e delle proteine totali.....	60
5.	Conclusioni.....	61
	Bibliografia.....	64
	Appendice: Schemi, Tabelle e Figure.....	72
	Ringraziamenti	93

CAPITOLO1. INTRODUZIONE

1.1 Il latte

Il latte è il prodotto ottenuto dalla mungitura regolare, ininterrotta e completa della mammella di animali in buono stato di salute e di nutrizione (RD 9/5/29 n. 994 e successive modifiche).

Esso ed i suoi derivati sono consumati in tutto il mondo da tempi storici. Il latte di vacca principalmente, quello di bufala, pecora e capra sono utilizzati a scopo nutrizionale. Il suo utilizzo, oltre quello alimentare, si estende alla produzione di latti fermentati (yogurt, kefir), latti modificati (maternizzati, dietetici), panna, burro, formaggi, prodotti alimentari e prodotti del siero (nell'industria dolciaria, nei prodotti da forno ecc.). In questo lavoro di tesi focalizzeremo l'attenzione sul latte vaccino.

Il latte è una sospensione colloidale bianca opaca costituita, per il latte bovino, dall'87.3% d'acqua, dal 4.72% di glucidi, dal 3.64% di lipidi, dal 3.18% di proteine, dallo 0.56% di sostanze minerali e dalla restante parte costituita da acidi organici, sostanze azotate non proteiche (NPN), vitamine, gas e microelementi (Cappelli *et al.*).

1.2 Composizione glucidica

La componente glucidica del latte è costituita principalmente dal (+)-lattosio (98% degli zuccheri totali) che si trova nel latte vaccino in quantità variabili da 48 a 50 g/l. Esso è un disaccaride riducente, destrogiro e solubile formato da una molecola di D-(+)-galattosio e da una molecola di D-(+)-glucosio

legate tra loro da un legame β -(1-4') (Figura 1.1). Le proprietà riducenti dipendono dalla presenza di un gruppo aldeidico libero presente sull'unità D(+)-glucosio.

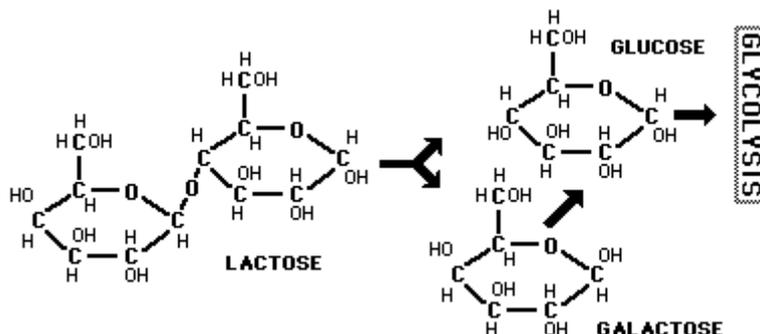


Figura 1.1. Molecola del lattosio e suoi prodotti di idrolisi

L'altra percentuale glucidica è costituita da poliosidi contenenti lattosio e fucosio, da glucidi azotati N-acetil-glucosammina e N-acetil-galattosammina, e da glucidi acidi: acidi sialici legati a glucidi neutri o azotati. Questa frazione è spesso coniugata alle proteine (Alais, Scienza del latte, 3° ed.).

1.3 Composizione lipidica

La componente lipidica del latte, presente in composizione di 35 g/l, è costituita principalmente dalla “sostanza grassa propriamente detta” (34 g/l) cioè gliceridi (mono- di- e tri-gliceridi) formanti un'emulsione di globuli di grasso della dimensione di 3-5 micron rivestiti da una membrana lipo-proteica dello spessore di circa 0.02 micron che ha origine dalle cellule del tessuto mammario. Altri lipidi sono costituiti da lecitine (fosfolipidi 0,5 g/l) e da una frazione insaponificabile costituita da steroli, caroteni e tocoferoli (0,5 g/l) (Vannucchi e Cappelli, Chimica degli Alimenti, 3° ed.).

1.4 Composizione minerale

La componente minerale è costituita principalmente (9 g/l) da sali dell'acido citrico, dell'acido fosforico in forma solubile e colloidale, e dell'acido cloridrico (Cappelli *et al*, 2005).

1.5 Composizione proteica

La componente proteica del latte (34 g/l) è costituita dalla frazione caseinica (27 g/l) sotto forma di sospensione micellare di fosfocaseinato di calcio delle dimensioni di 0.08-0.12 micron. La frazione solubile (proteine del siero) è costituita da globuline ed albumine (5.5 g/l) in forma colloidale e da altri polipeptidi solubili. Esiste una frazione di sostanze azotate non proteiche (1.5 g/l) costituita da amminoacidi liberi e nucleotidi che sono solubili nel plasma latteo. La maggior parte delle proteine del latte (caseina, lattoglobulina e lattealbumina) è sintetizzata nelle cellule della ghiandola mammaria. La sintesi, che avviene sui ribosomi, è seguita da modifiche post-traduzionali come la fosforilazione e la glicosilazione.

1.5.1 Micelle caseiniche

Le micelle caseiniche (80% circa della frazione proteica) sono associazioni colloidali aventi un diametro medio di 200 nm costituite da quattro famiglie proteiche: α_1 -caseina (α_1 -CN), α_2 -caseina (α_2 -CN), β -caseina (β -CN) e κ -caseina (κ -CN). Esse sono proteine ad alto contenuto di proline e ciò determina assenza di struttura secondaria e terziaria poiché la prolina è un amminoacido destabilizzante la struttura secondaria. Le caseine infatti hanno una struttura tridimensionale prevalentemente *random coil* (Ennis, M. P., *et*

al, 2000).

Queste strutture micellari inglobano sali minerali (fosfato di Ca^{2+} , Mg^{2+} , citrati). Il calcio micellare rappresenta circa un terzo del totale. Le micelle disperdono la luce e conferiscono il colore bianco, mentre le sospensioni colloidali danno l'opalescenza.

Le quattro caseine hanno differenti sequenze amminoacidiche e differiscono nella distribuzione delle cariche elettriche, date sia dagli amminoacidi carichi sia dai differenti gradi di fosforilazione su residui di serina (Ser) e treonina (Thr), oltre che alla sensibilità al Ca^{2+} (Rollema, H. S., *et al*), (Walstra, P. *et al*, 1984). Le α_{S1} -, α_{S2} - e β -caseine sono sensibili allo ione Ca^{2+} e precipitano alla concentrazione presente nel latte (de Kruif, C. G. *et al*, 2002). Al contrario la κ -CN è insensibile al Ca^{2+} e se presente in sufficiente quantità essa stabilizza le altre caseine impedendone la precipitazione (de Kruif, C. G. *et al*, 2002).

La maggior parte delle caseine sensibili al calcio è localizzata all'interno della struttura micellare, mentre la κ -CN è localizzata all'esterno. La parte C-terminale della κ -CN ha un alto contenuto di residui amminoacidici idrofilici ed un numero elevato di cariche negative e di residui glicosilati che sporgono verso l'esterno della struttura micellare come filamenti flessibili circondati dal mezzo acquoso. Questo modello di micella prende il nome da Walstra (Walstra, P. *et al*, 1984) (Figura 1.2) il quale ipotizzò un modello basato su una struttura submicellare tenuta insieme dalle fosfoserine localizzate all'esterno delle submicelle mediante il fosfato di calcio

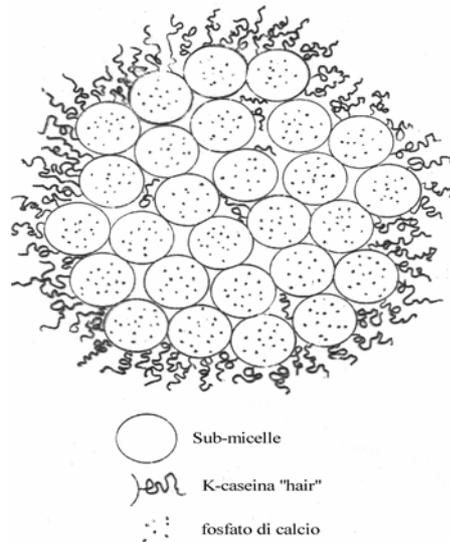


Figura 1.2. Modello di Walstra della micella caseinica

colloidale avente funzione “cementante” (Figura 1.2). La struttura esterna della micella poi, essendo ad alto contenuto di κ -CN, formerebbe un vero e proprio guscio idrofilico permettendo alla struttura il mantenimento in soluzione. Il Ca^{2+} solubile (nel siero) è in equilibrio con quello colloidale (fosfato tricalcico nelle micelle) al pH del latte che è 6.7 (Alais, C. Scienza del latte, 3° ed.).

Una diminuzione del pH fino a 4.6 determina la totale precipitazione della caseina (precipitazione isoelettrica) (de Kruif, C. G., *et al*, **2002**) dovuta alla perdita della carica minerale cioè alla diminuzione progressiva del calcio colloidale che passa in soluzione a pH acido come calcio ionico con conseguente perdita della stabilità della micella caseinica.

Nessun effetto della temperatura è stato osservato sulla stabilità delle micelle in un *range* che va da 4 °C a 30 °C (Dalglish, D. G., *et al*, **1988**).

Tuttavia parte della caseina è presente anche nel siero (“sierocaseine”) che per definizione è quella frazione rimanente in soluzione dopo precipitazione delle

micelle per ultracentrifugazione.

Le caseine sono quindi in equilibrio tra una fase colloidale (micellare) ed una acquosa (siero) che è dipendente dal pH e dalla temperatura. L'abbassamento della temperatura o del pH aumenta la quantità delle "sierocaseine". Il pH al quale si osserva la massima dissociazione si sposta a valori più alti all'aumentare della temperatura (Horne, D. S., *et al*, **1993**), (Lucey, J. A., *et al*, **1997**).

Esiste anche un'altra frazione di caseina nota come γ -caseina (γ -CN) presente al 5% circa della frazione totale che proviene da segmenti C-terminali più o meno lunghi di β -CN dalla quale si forma per azione proteolitica della plasmina presente naturalmente nel latte.

La κ -CN si distingue dalle altre caseine perché è l'unica glicosilata (contiene due catene oligosaccaridiche su residui di Thr, costituite da N-acetilgalattosamina, galattosio e acido N-acetilneuroaminico). Ciò costituisce una "protezione colloidale" perché rende la parte esterna delle micelle più solubile nel mezzo acquoso. La κ -CN costituisce il substrato della prima fase della coagulazione presamica, cioè dovuta all'azione enzimatica del caglio (chimosina). Essa è infatti formata da due porzioni:

- la C-terminale, idrofilica, ricca di amminoacidi ossidrilati, glicosilata a cui si deve l'azione colloidal-protettrice (caseino glicopeptide solubile);
- l'N-terminale, detta paracaseina κ , idrofobica, che gioca un ruolo fondamentale nella coagulazione presamica, provocando, una volta

staccata dalla prima per azione del caglio, interazioni idrofobiche fra le molecole caseiniche determinando l'aggregazione micellare. Il caglio idrolizza il legame ammidico tra i residui Phe 105-Met 106 (Figura 1.3), le due porzioni si separano e le micelle si aggregano formando il coagulo.



Figura 1.3. Attacco della Chimosina sulla κ -CN

La tabella 1.1 illustra le principali caratteristiche fisico-chimico delle quattro frazioni caseiniche.

Proteina	Numero di residui	pH isoionico	Massa molecolare (KDa)	Numero di proline	Numero di cisteine
α_1 -CN	199	4.94	23.6	17	0
α_2 -CN	207	5.45-5.23	25.2-25.4	10	2
β -CN	209	5.14	24	35	0
κ -CN	169	5.61	19	20	2

Tabella 1.1. Alcune caratteristiche chimico-fisiche delle quattro frazioni caseiniche

1.5.2 Proteine del siero

Allorquando il latte sgrassato a temperatura ambiente è portato a pH 4.6 la caseina precipita (precipitazione isoelettrica) (de Kruif, C. G., *et al*, 2002). Il

supernatante contiene molte proteine solubili chiamate siero-proteine (SP). La maggior parte delle SP è globulare. Esse includono la β -lattoglobulina (β Lg), l' α -lattalbumina (α La), la sieralbumina (BSA), le immunoglobuline (Ig) ed altre proteine solubili in minore quantità ed enzimi. Le loro concentrazioni in g/l sono rispettivamente: 3.2, 1.2, 0.4, 0.75 e 0.6.

β -lattoglobulina

La β Lg è la più rappresentata tra le SP. Essa ha una catena polipeptidica di 162 amminoacidi (aa) ed un peso molecolare di 18.3 KDa. A temperatura ambiente e a pH 6.7 del latte essa esiste principalmente come dimero che si dissocia alle alte temperature. Questo dimero è formato da due strutture globulari tenute insieme da legami non covalenti. Il monomero di β Lg contiene due ponti disolfurici (S-S) (Cys106-Cys119 e Cys66-Cys160) ed una cisteina libera (Cys121) che espone un gruppo tiolico SH libero. Quest ultimo, insieme al ponte Cys106-Cys119 è più interno alla superficie della proteina, mentre il ponte Cys66-Cys160 è esposto all'esterno vicino alla regione C-terminale.

La funzione biologica della β Lg è quella di legare il retinolo (vitamina A) e di trasferirlo dal latte materno al neonato attraverso specifici recettori nell'intestino.

Nel latte vaccino esistono otto varianti genetiche delle quali la A e la B sono le più abbondanti e le più comuni (Vasbinder, A. J. 2002).

α -lattalbumina

L' α La è la seconda SP di forma globulare più abbondante. Essa è formata da

una catena polipeptidica di 123 amminoacidi ed una massa molecolare di 14.2 KDa. Essa contiene quattro ponti disolfurici (Cys6–Cys 120, Cys28– Cys111, Cys61–Cys77, Cys73–Cys91). L'attività biologica della α La, impegnata nella sintesi del lattosio, è di promuovere il legame del glucosio alla galattosiltransferasi, che favorisce il trasferimento del galattosio dall'UDP-galattosio al glucosio. Questo è uno *step* fondamentale nella formazione del lattosio. L' α La è una metalloproteina Ca^{2+} dipendente capace di legare anche lo Zn^{2+} ed altri metalli. L' α La presenta il fenomeno del polimorfismo genetico con tre varianti genetiche note come A, B e C (Vasbinder, A. J. **2002**).

Sieroalbumina

La BSA ha proprietà identiche all'albumina del siero del sangue e le sue funzioni principali sono di trasporto e mantenimento dell'equilibrio osmotico. Ha una catena polipeptidica formata da 542 amminoacidi ed una massa molecolare di 69 KDa. Essa contiene 35 residui di cisteina che danno luogo a 17 ponti disolfurici ed una Cys libera in posizione 34 (Alais C. Scienze del latte, 3° ed.).

Immunoglobuline

Le immunoglobuline provengono direttamente dal sangue e sono presenti in quattro frazioni differenti: IgG1 e IgG2, IgA e IgM. Esse sono proteine ad elevato peso molecolare (dai 162 KDa a 900 KDa). La loro concentrazione è massima nei primi giorni della lattazione (colostro) per trasferire in modo passivo l'immunità dalla madre al neonato e cala durante il corso della

lattazione mantenendo mediamente valori intorno ai 0.5 g/l.

Altre proteine solubili

Le proteine presenti in minori quantità sono:

- Proteso peptoni. Essi sono dei glico-polipeptidi di diversa lunghezza che provengono dalla proteolisi della β -CN ad opera della plasmina su diversi siti di taglio.
- Lattoferrina. Essa è una glico-metalloproteina che lega il ferro lo trasferisce dal sangue al latte.
- Transferrina. E' simile alla precedente e lega il ferro e partecipa al metabolismo di questo metallo.
- Ceruloplasmina. Essa è una proteina che fissa specificamente il rame ed ha origine nel sangue.
- Enzimi. Sono presenti in grande varietà: ossidasi, catalasi, perossidasi transaminasi, fosfatasi, proteasi, ribonucleasi, lisozima ecc.

La tabella 1.2 illustra alcune delle proprietà fisico-chimiche delle maggiori SP.

Proteina	Numero di residui	Punto isoionico	Massa molecolare (KDa)	Numero di proline	Numero di cisteine
β -Lg	162	5.2	18	8	5
α -La	123	4.2-4.5	14	2	8
BSA	582	5.3	66	28	35
Ig	Variabile	-	150-900		
Proteso-peptoni	Variabile	-	4.1-40.8		

Tabella 1.2. Alcune proprietà chimico-fisiche delle sieroproteine

1.6 Trattamenti termici del latte

I trattamenti termici del latte hanno un doppio scopo: distruggere i microrganismi patogeni per l'uomo e ridurre la microflora endogena ad un livello più basso possibile, al fine di aumentarne la durata della conservazione (*shelf life*).

I metodi di "risanamento" utilizzati sono principalmente due, basati su un diverso binomio "tempo-temperatura": la pastorizzazione e il trattamento UHT (Ultra High Temperature).

La pastorizzazione (dal nome di Pasteur) è eseguita attraverso tre metodologie:

- trattamento a 60-65° C per 30 minuti (pastorizzazione bassa)
- trattamento a 72-85° C per 2-3 minuti (pastorizzazione alta)
- trattamento HTST (High Temperature Short Time) a 75-85° C per 15-20 secondi (pastorizzazione rapida).

Mediante la pastorizzazione non si raggiungono temperature tali a devitalizzare i microrganismi termofili, né tantomeno le spore. La pastorizzazione di solito è seguita da un rapido raffreddamento del prodotto.

Il trattamento UHT, a differenza della pastorizzazione, consente la distruzione totale dei microrganismi comprese le spore. Secondo la normativa (DPR 54/97) esso è un processo di sterilizzazione del latte in flusso continuo seguito da confezionamento asettico. Esso impiega temperature comprese tra 140-150° C per un tempo di 1-5 secondi.

Un terzo trattamento termico è quello della sterilizzazione che porta il latte ad una temperatura di 118°-120° C per 15-20 minuti.

Nella tabella 1.3 sono riassunti i principali tipi di trattamenti termici sul latte.

Tipo di trattamento termico	Temperatura	Durata	Osservazioni
Pastorizzazione bassa	60-65° C	30 min	Usata per latte destinato alla caseificazione
Pastorizzazione alta	75-85° C	2-3 min	Un tempo usato per il latte oggi sostituito dall'HTST
Pastorizzazione rapida o HTST	75-85° C	15-20 sec	Condotta sul latte che scorre in strato sottile tra due pareti metalliche riscaldate
Sterilizzazione classica	100-120° C	≥ 20 min	Effettuata in autoclave
UHT indiretto	140-150° C	Pochi secondi	Effettuata sull'alimento sfuso in scambiatori di calore
UHT diretto o superizzazione	140-150° C	Pochi secondi	Effettuata con iniezione di vapore surriscaldato nel prodotto sfuso

Tabella 1.3. Principali trattamenti termici dei latti. Da “Cappelli, Vannucchi. 3°ed. Zanichelli”

1.7 I latti alimentari a ridotto tenore in acqua

1.7.1 Tipi e finalità

La necessità di conservare il latte quando la produzione è eccedente, quella di ridurre peso e, conseguentemente, spese di trasporto, pur conservandone tutte le sue peculiari caratteristiche compositive e nutrizionali, hanno determinato l'adozione di tecniche di concentrazione e di essiccazione con le quali, sottraendo acqua in misura maggiore o minore, si migliora, appunto, la *shelf life* e si ha, a parità di peso, una materia più ricca. D'altra parte, le tecniche di concentrazione e di essiccamento adottate devono avere come requisito la

possibilità di permettere una facile “ricostituzione” in forma liquida con accorgimenti idonei a conservare, nel limite del possibile, le proprietà funzionali delle proteine e a mantenere in limiti accettabili le alterazioni della fase grassa e lo sviluppo delle reazioni di Maillard. Queste caratteristiche devono contraddistinguere tutti i latti concentrati o essiccati destinati all'alimentazione umana, che pure devono soddisfare i normali parametri di genuinità e salubrità. I latti concentrati oggi disponibili sono essenzialmente di due tipi: latte concentrato sterilizzato e latte concentrato zuccherato. L'essiccamento è uno dei metodi più efficaci per conservare una sostanza alimentare e la tecnica di preparazione del latte in polvere è utilizzata con scopi diversi. Uno è certamente quello di ottenere latte in polvere poco denaturato e facilmente reidratabile, ma anche quello di sottrarre rapidamente dal mercato un prodotto facilmente deperibile (com'è il latte liquido), salvaguardandone i principali componenti per destinarlo all'alimentazione degli animali o ad altri impieghi industriali. I metodi di produzione del latte in polvere, oggi utilizzati, sono essenzialmente due: essiccazione su cilindri rotanti ed essiccazione *spray*. In entrambi questi processi l'essiccazione del latte è preceduta da un trattamento termico di sanificazione (pastorizzazione o anche, prima dei processi *spray*, blando trattamento UHT) e da concentrazione fino a un residuo secco del 20-40%. Nella tabella 1.4 sono riportate le composizioni medie dei vari tipi di latte concentrati e in polvere, ottenuti sia da latte intero sia da latte scremato (medie per 100g, da Alais C., *Scienze del latte*, 3° ed.).

	Latte liquido	Latte concentrato zuccherato	Latte concentrato intero	Latte concentrato magro	Polvere di latte intera	Polvere di latte magra
Acqua	87,5	26,0	66,0	68,5	4,0	5,0
Grasso	3,5	9,0	10,0	0,5	26,0	1,5
Sostanze azotate	3,3	9,0	9,0	12,0	27,0	34,0
Lattosio	4,9	12,0	13,0	16,0	37,0	50,0
Sostanze minerali	0,8	2,0	2,0	3,0	6,0	8,0
Saccarosio		41,0				
Residuo magro	9,0	23,0(1)	24,0	31,0	70,0	93,5

Tabella 1.4. Residuo magro del latte

1.8 Produzione industriale di caseina e caseinati

La caseina acida viene preparata industrialmente per acidificazione a pH 4.6 del latte scremato, per la precipitazione viene più spesso usato l'acido cloridrico (Schema 1 in Appendice). Il precipitato viene lavato più volte con acqua per allontanare il lattosio e i sali minerali; la caseina viene poi essiccata con aria calda o utilizzata in forma umida per la preparazione del caseinato. La caseina lattica è ottenuta per acidificazione del latte scremato inoculando quest'ultimo con fermenti lattici che producono acido lattico dal lattosio presente nel latte, il che porta il pH a 4.6 in circa 30 minuti. La caseina presamica (Schema 2 in Appendice) viene precipitata per azione del caglio sul latte scremato, come per la lavorazione dei formaggi. Il trattamento del latte a temperature elevate rende bassa la solubilità della caseina

determinando la coprecipitazione delle sieroproteine. Siero e lattosio vengono rimossi dalla cagliata (acida o presamica) per riscaldamento e lavaggio con acqua calda. Il prodotto ottenuto è costituito da caseina grezza; questa è essiccata fino ad un contenuto di umidità dell'8-12% in modo che il prodotto finale contenga almeno il 90% di caseina, non più del 2% di grasso e dal 2 al 4% di ceneri. Per prevenire l'imbrunimento, imputabile alla reazione di Maillard, il contenuto di lattosio deve essere il più basso possibile. Quando si fabbrica caseina acido-lattica, il coagulo viene tagliato in cubetti di circa 1 cm e riscaldato a 60 °C sotto agitazione. La cagliata ed il siero vengono separati e la cagliata, dopo essere stata lavata ripetutamente con acqua a 30 °C, viene pressata e filtrata o separata per centrifugazione e finalmente essiccata in aria calda a 50 °C fino ad una umidità del 12%. La cagliata essiccata viene macinata, soffiata in ciclone e confezionata. La caseina acida può essere prodotta in continuo. Acido e vapore vengono aggiunti ad un flusso continuo di latte scremato, preriscaldato a 30-40 °C. Il latte viaggia per 1-2 minuti in un tubo di sosta dotato di alette "rallenta-flusso" e la caseina floccula nel tubo. Nella fase di separazione che segue, il siero viene rimosso tramite la rete vibrante di un tamburo conico perforato ruotante attraverso un asse orizzontale, o per mezzo di una centrifuga di decantazione. Il siero è allontanato per essere a sua volta trasformato ed il precipitato di caseina è lavato in controcorrente fino a liberarlo completamente da siero e lattosio. Segue una seconda separazione in centrifuga di decantazione (fino ad un contenuto di umidità pari al 60%) ed un'asciugatura in essiccatore a letto

fluido a temperatura di 45-60 °C, fino ad un contenuto di umidità pari al 6-12%.

I caseinati (Schema 3 in Appendice) si ottengono dalla caseina acida o presamica, per risolubilizzazione della caseina e trattamento a caldo con alcali (NaOH), aggiustamento del pH e riessiccazione. I prodotti ottenuti vengono denominati caseinati di sodio, o calcio, che sono molto più facilmente dispersibili e solubili della caseina naturale e trovano impiego negli stessi settori della caseina (Salvatori del Prato O., Trattato di tecnologia casearia, 1995)

1.9 I co-precipitati

Un co-precipitato è un prodotto risultante dalla precipitazione simultanea della caseina e delle proteine del siero (Schema 4 in Appendice). Questa produzione permette di estrarre al massimo le proteine dal latte scremato, circa 96%. Il procedimento di preparazione dei co-precipitati utilizza le possibilità che hanno le proteine del latte di formare complessi tra loro sotto l'azione del calore, in presenza di calcio, o combinando questi due criteri. Il co-precipitato può venir essiccato sottoforma di precipitato o solubilizzato per dispersione in una soluzione di tripolifosfato, ed essiccato con il procedimento *spray*. Questo prodotto contiene in media l'83% di proteine e il 10% di sali, compreso il calcio, per un prodotto contenente 4% di acqua; non resta che da 1 a 1,5% di lattosio ed altrettanto di grasso.

1.10 Reazioni indotte dal calore durante i trattamenti termici

I trattamenti termici agiscono alterando delle proprietà nutrizionali ed

organolettiche perché apportano modificazioni di sostanze labili, denaturazione, decomposizione, spostamento di equilibri chimico-fisici. Gli effetti del riscaldamento sono il risultato di processi biochimici ancora non perfettamente conosciuti. Gli effetti più studiati riguardano le modifiche degli amminoacidi e delle proteine.

1.10.1 Modifiche delle catene laterali degli amminoacidi

Il calore è in grado di provocare alterazioni chimiche sulle catene laterali degli amminoacidi. Le principali modifiche consistono in:

- desulfidazione dei residui di cisteina e cistina con liberazione di solfuro di idrogeno;
- deamidazione e deaminazione della glutammina e della asparagina con risultante aumento dei gruppi carichi COO^- e NH_4^+ ;
- decarbossilazione dei residui di acido glutammico ed aspartico;
- desolforazione e defosforilazione: il fenomeno della β -eliminazione, con formazione della deidro-alanina (DHA) si produce a spese della fosfoserina e della cisteina (con liberazione di H_2S). La presenza di alcali favorisce la degradazione. La molecola di DHA è labile e permette la formazione di ponti covalenti. La reazione spontanea con un residuo di lisina determina la formazione della lisinoalanina (LAL) (Figura 1.4). Tra i fattori che influenzano la formazione di LAL i più comuni sono: pH, temperatura, durata del trattamento termico e contenuto d'acqua delle proteine. Questo legame costituisce un blocco

della lisina che è un amminoacido essenziale. Oltre l'effetto d'indisponibilità della lisina e della cisteina, che sono fattori limitanti sul piano nutrizionale, è stato osservato, su cavie di laboratorio, che la LAL ha un effetto tossico sui reni (Koning, P. J., *et al.* 1982).

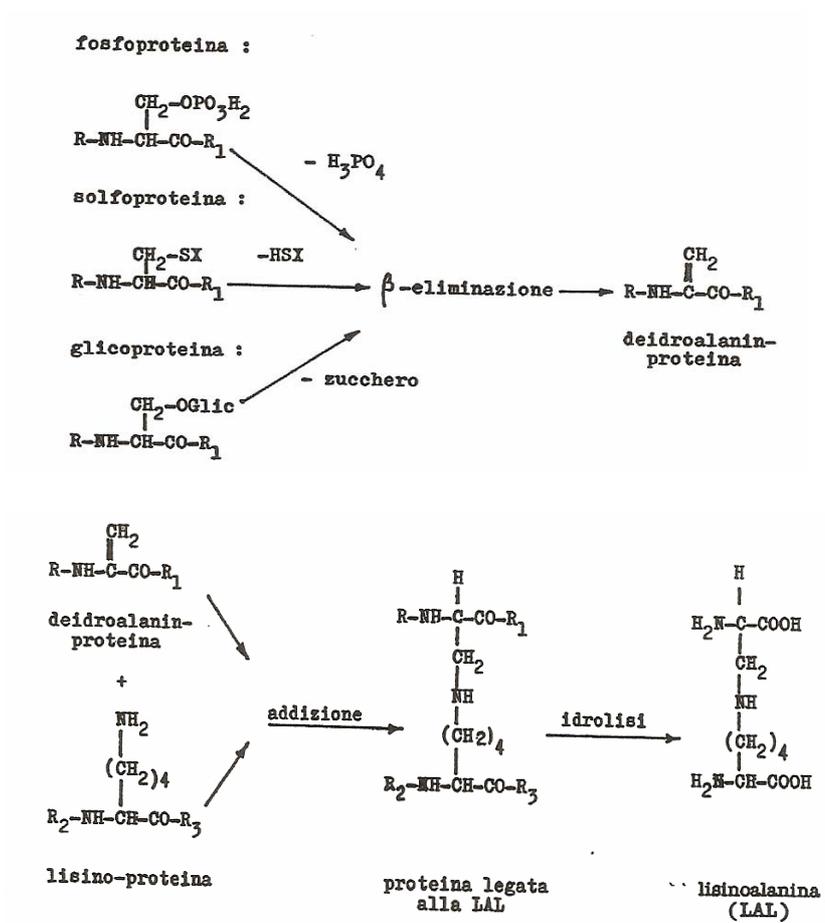


Figura 1.4. Formazione di lisinoalanina (LAL) in proteine trattate termicamente o con alcali. Da de Koning e van Rooijen, 1975

- Legami isopeptidici tra il gruppo amminico laterale della lisina e i gruppi ammidici della glutammina e dell'asparagina. Ciò determina una

resistenza agli enzimi proteolitici e riduzione della lisina biodisponibile.

Reazione di Maillard e formazione di furosina

La reazione di Maillard (da Louis Camille Maillard) interessa gli alimenti che contengono proteine (catene laterali NH_2 terminali) e zuccheri (principalmente aldosi come il glucosio). Questo processo, ancora oggi studiato, consiste in una serie di reazioni parallele e consecutive che si possono suddividere in tre fasi:

1. Formazione di una base di Schiff tramite reazione del carbonio carbonilico dello zucchero con un gruppo amminico di un amminoacido, con la conseguente formazione di una glicosilammina. Questa successivamente subisce un riarrangiamento dei doppi legami che porta alla formazione di un composto di Amadori o di Heyns a seconda che lo zucchero sia rispettivamente un aldoso o un chetoso. Il riarrangiamento di Amadori-Heyns è catalizzato dagli acidi. Data la stabilità di questi intermedi, in alcuni prodotti fra cui il latte sterilizzato, essi possono rappresentare i prodotti terminali della reazione di Maillard. Dal punto di vista delle caratteristiche organolettiche, in questa fase non si ha la formazione di composti colorati o profumati. Tuttavia la disponibilità di amminoacidi essenziali come la lisina risulta già compromessa (Figura 1.5);

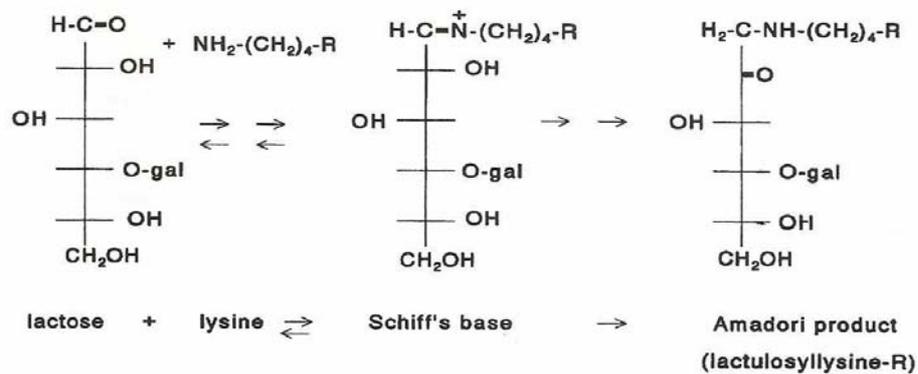


Figura 1.5. Formazione del prodotto di Amadori dal lattosio e da un residuo di lisina passando per l'intermedio della base di Schiff (da Van Boekel, M. A. J. S. 1998)

2. In questa fase i composti di Amadori-Heyns precedentemente formati subiscono una degradazione. I composti eterociclici che si formano sono responsabili dell'aroma che si sprigiona dagli alimenti trattati. Tipici indicatori di questa fase sono composti come l'idrossimetilfurfurale (HMF) e la pirralina (Figura 1.6);

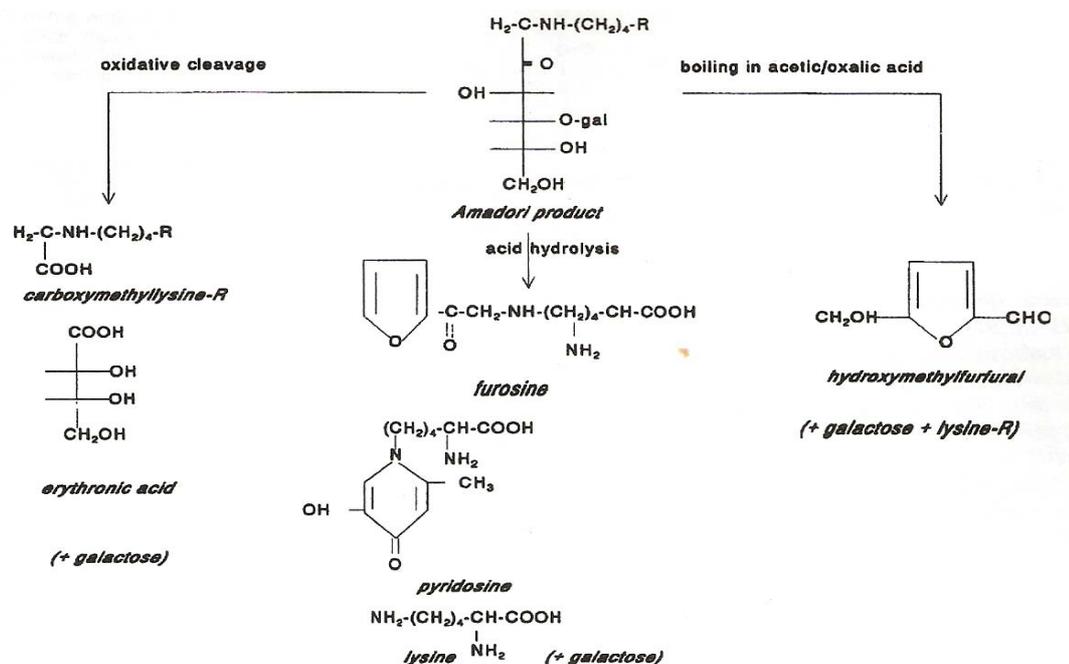


Figura 1.6. Degradazione dei composti di Amadori (da Van Boekel, M. A. J. S. 1998)

3. Si ha la formazione di composti bruni e ad alto peso molecolare noti come melanoidine. Il chimismo di questa fase ad oggi non è ancora conosciuto a fondo, anche se appare probabile la polimerizzazione, tramite condensazione aldolica, dei prodotti carbonici insaturi intermedi e dell'idrossimetilfurfurale. Le melanoidine, che si generano in questo stadio della reazione, sono responsabili delle variazioni di colore. La degradazione dei composti di Amadori può procedere verso tre vie differenti, dipendenti dalle condizioni acide, neutre o basiche del mezzo. L'ambiente acido porta alla deidratazione con formazione dei furfurali e della pirralina. L'ambiente neutro porta a composti chetonici (β -piranone, 3-furanone, ciclopentenone ecc.). L'ambiente alcalino determina la formazione del 4-deossiamminoreduttone e del 5,6-diidro-3-idrossipiridone (Van Boekel, M. A. J. S. **1998**) (Figura 1.7).

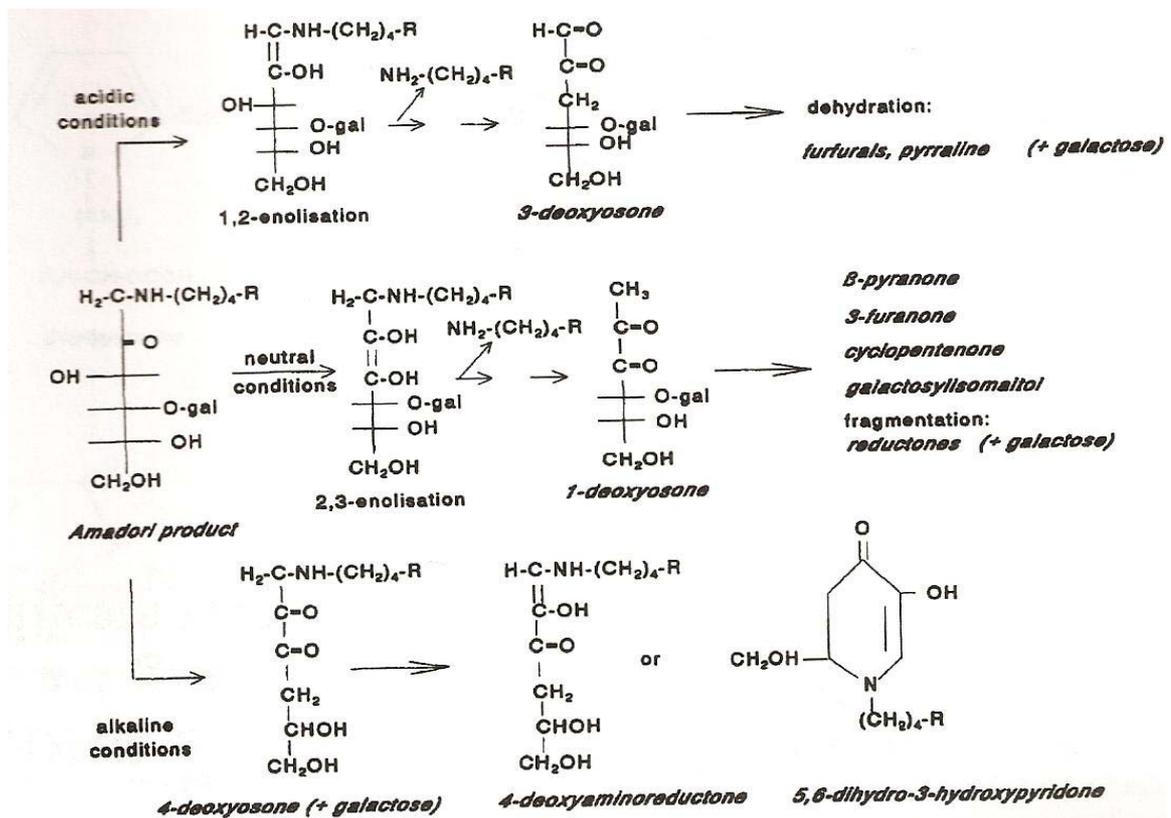


Figura 1.7. Riarrangiamento dei prodotti di Amadori nello stadio avanzato della reazione di Maillard (da Van Boekel, M. A. J. S. 1998)

Gli effetti della reazione di Maillard sono molteplici:

- effetto sui caratteri organolettici: i prodotti della seconda fase sono responsabili del *flavour*, mentre quelli della terza fase (melanoidine) del colore;
- effetti antinutrizionali: ridotta disponibilità degli aminoacidi essenziali (lisina) e di vitamina C, ridotto assorbimento di alcuni oligoelementi, ridotta digeribilità delle proteine;
- effetti antiossidanti: i prodotti della seconda e terza fase esplicano proprietà antiossidanti. Le proprietà antiossidanti delle

melanoidine possono essere attribuite alla presenza di strutture polifenoliche.

La **furosina** (*ϵ -furoilmetil-lisina*) è una molecola non presente all'origine nel latte (non essendo un componente di sintesi mammaria) anche se è normalmente riscontrabile nel latte di massa, (2-6 mg/100g proteine). Si forma quale derivato dagli amminoacidi, in particolare da **ϵ -fruttosio-lisina**, mediante idrolisi acida, quale composto di formazione della reazione di Maillard. In particolare, il prodotto di Amadori si forma nella fase iniziale, ovvero dall'interazione tra il gruppo carbonilico del lattosio e il gruppo amminico della lisina si forma la lattulosillisina (LL) (Figura 1.5).

Il livello del composto di Amadori viene in genere valutato indirettamente attraverso la determinazione della furosina (FUR) che è originata dall'idrolisi acida della LL in rapporti stechiometrici conosciuti (D.P.R. n. 54 del 14 gennaio 1997 pubblicato sulla G. U. n. 59 del 12/03/1997). La FUR è usata come marcatore per i primi stadi della reazione di Maillard e quindi come marcatore di trattamento termico. La quantificazione dei livelli della FUR trova applicazione analitica per la caratterizzazione dei trattamenti termici non solo nei latti ma anche in tutti gli altri prodotti alimentari che contengono zuccheri e proteine. Per loro sono stati definiti valori di soglia sulla base dei quali evidenziare l'applicazione di impropri parametri di processo (D. M. 15/12/2000 del Ministero delle politiche Agricole e Forestali pubblicato sulla G. U. n. 31 del 7/2/2001).

1.10.2 Denaturazione delle proteine

La denaturazione delle proteine avviene allorché delle condizioni drastiche chimico-fisiche determinano la perdita della struttura secondaria e terziaria (*unfolding*) senza rottura dei legami peptidici. Nel latte le sieroproteine sono quelle suscettibili di perturbazioni da parte del calore, mentre la caseina non subisce modificazioni visibili fino ai 100° C. Esistono diversi metodi per misurare l'entità delle denaturazione:

- misura della percentuale di azoto proteico che resta in soluzione a pH 4.6
- metodi elettroforetici o immunochimici
- calorimetria differenziale

Cinetica della denaturazione

Le proteine suscettibili di denaturazione termica sono β Lg e α La. Tuttavia la denaturazione irreversibile è preceduta da “transconformazioni” reversibili del primo ordine messe in evidenza da studi di calorimetria differenziale (Bernal. V. *et al* **1985**). Lavori recenti hanno illustrato in dettaglio la cinetica della denaturazione delle maggiori SP (Oldfield, D. J., *et al*, **1998**; Schokker, E., P., *et al* **2000**; Law, A. J., *et al* **2000**; Hong, Y. H., *et al* **2002**; Guyomarc'h, F., *et al* **2003**; O' Kennedy, B. T., *et al* **2006**). La β Lg segue una cinetica del secondo ordine e sono state riscontrate differenze tra le varianti genetiche A e B: la “A” è più termostabile della “B” a temperature inferiori a

95° C, mentre succede l'inverso al di sopra dei 100° C.

La α La si denatura secondo una cinetica di pseudo primo ordine (Schokker, E., P., *et al*, 2000). La denaturazione termica irreversibile delle SP β Lg e α La implica l'esposizione dei ponti disolfurici compreso il residuo libero di Cys121 della β Lg e scambi intramolecolari ed intermolecolari tra i ponti disolfurici. Questo comporta, a seguito della denaturazione irreversibile, un'interazione covalente tra α La e β Lg e tra le SP e le caseine (con la κ -CN) con formazione di complessi ad alto peso molecolare.

Nel latte trattato termicamente le proteine solubili iniziano a precipitare con la caseina e precipitano con la para-caseina dopo l'azione del caglio.

Degradazione termica delle siero proteine

Il contenuto in sieroproteine rappresenta un indice significativo della valutazione dei trattamenti termici sul latte insieme ad altri parametri chimici, fisici e biologici come i *tests* sulla fosfatasi alcalina e lattoperossidasi, oppure la determinazione quantitativa di furosina e lattulosio oppure la misura della carica batterica totale. Temperature al di sopra di 65 °C causano la denaturazione delle proteine del siero. Essa è stata descritta come un processo che avviene in due stadi di cui il primo è la perdita di struttura secondaria e terziaria e la seconda è l'aggregazione (Mulvihill, D. M., *et al*, 1987; de Wit, J. N., *et al*, 1990; Roefs, S. P. F. M., *et al*, 1994). Se il trattamento termico è più drastico (temperature più alte e tempi più lunghi) allora le SP, dopo la denaturazione, si associano tra loro o con le micelle caseiniche. Studi differenti hanno dimostrato che il processo di denaturazione ed aggregazione

sono tra loro distinti e dipendono dal pH, dalla concentrazione e dalla forza ionica del mezzo (Anema, S. G. *et al*, **2001**; Corredig, M., *et al*, **1996**; Dalgleish, D. G., *et al*, **1997**).

L'entità della denaturazione della β Lg e della α La aumenta all'aumentare della temperatura e del tempo di durata del trattamento ed il grado di formazione di aggregati con le micelle caseiniche è inferiore a quello della denaturazione stessa. Durante la fase iniziale del trattamento termico, in un intervallo che va da 80 a 130 °C, diversi studi hanno dimostrato che la β Lg sembra associarsi alle micelle e che all'aumentare del tempo anche la α La vi si leghi. Tuttavia, al disotto degli 80 °C, sia la α La che la β Lg si associano simultaneamente alle micelle caseiniche. Il massimo grado di associazione della α La varia con la temperatura: circa il 40% del totale in un intervallo tra 95° e 130° C e circa il 55% al di sotto dei 90° C. Per la β Lg il massimo grado di associazione è del 55% del totale indipendentemente dalla durata o dall'intervallo della temperatura (Oldfield, D. J., *et al* **1998**).

Il pH gioca un ruolo fondamentale nella denaturazione termica delle proteine del siero. Studi hanno dimostrato che il grado della denaturazione è complesso e dipende dal grado di *unfolding* delle proteine e dal loro stato di aggregazione.

L' α La e la β Lg aumentano il loro grado di denaturazione all'aumentare del pH al contrario delle altre proteine del siero (Ig, BSA e lattoferrina) il cui grado di denaturazione tende a diminuire all'aumentare del pH (Law, A. J. R., *et al* **2000**).

Studi condotti su sistemi modello, in cui si preparavano soluzioni di β Lg A (variante genetica A) e B (variante genetica B) con e senza α La (Schokker., E. P. *et al* **2000**) hanno dimostrato che l'aggiunta della α La alla β Lg A e alla β Lg B, prima dell'inizio del trattamento termico, influenzava il decorso della aggregazione, favorendo maggiormente la formazione degli aggregati covalenti, mediante ponti disolfurici, che quelli non covalenti per mezzo di interazioni idrofobiche. Ciò non alterava tuttavia il grado iniziale di denaturazione della β Lg nativa nella miscela a riprova del fatto che le modificazioni sul decorso dell'aggregazione, dovute all'introduzione della α La, erano successive alla iniziale "riorganizzazione" intramolecolare delle coppie dei ponti disolfurici della β Lg.

I ponti disolfurici inaccessibili della α La reagiscono con i gruppi tiolici delle cisteine libere della β Lg denaturata, dopodichè essi possono catalizzare il loro interscambio. È noto quindi che tra α La e β Lg si formano aggregati più o meno grandi di etero-dimeri o addirittura etero-oligomeri. In figura 1.8 è schematizzato un possibile meccanismo dell'aggregazione di α La e β Lg con formazione di omo-polimeri ed etero-polimeri dopo denaturazione termica proposta da Schokker.

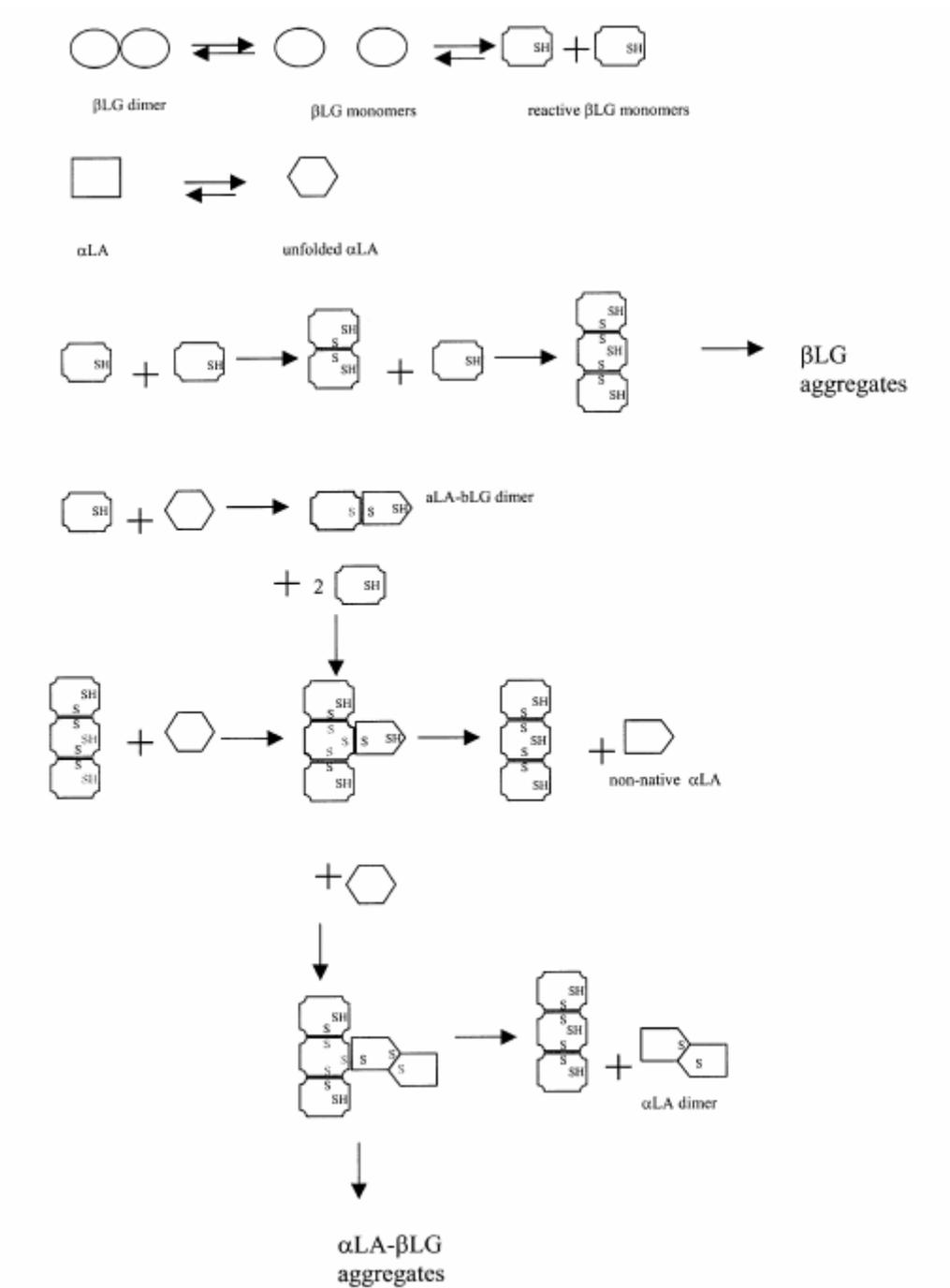


Figura 1.8. Meccanismo di formazione di aggregati di SP (Schokker *et al*, 2000)

Studi successivi, condotti sempre su sistemi modello di miscele di βLg e αLa hanno dimostrato che la presenza di βLg accelera la perdita della struttura nativa della αLa. Sebbene l'αLa reagisca con la βLg nativa, sembra che essa non reagisca con la struttura denaturata; ciò indica che non è necessaria la

presenza di un residuo di cisteina esposta bensì la sola presenza di una cisteina in un microambiente idrofobico quindi su una struttura ancora nativa e non denaturata (Hong., L. K., *et al* **2002**).

A temperatura di circa 65 °C, la β Lg e l' α La si denaturano ed interagiscono, oltre che tra loro, anche con le micelle caseiniche per mezzo della κ -CN, formando degli aggregati proteici legati covalentemente (Smiths., P. *et al* **1980**; Jang., H. D., *et al* **1990**). Non si è ancora stabilito un rapporto quantitativo sulla composizione proteica, dimensione e proprietà chimico-fisiche di tali aggregati sebbene queste caratteristiche influenzino le proprietà della coagulazione (Vasbinder, A. J., **2002**). La micella caseinica, come descritta nel modello di Walstra, espone nel mezzo acquoso la porzione C-terminale idrofilica e contenente cisteine ossidate. Questa porzione, a temperature elevate, interagisce covalentemente con le SP ed il rapporto tra le SP e la κ -CN è determinato dalla composizione iniziale del mezzo.

Successivi studi hanno dimostrato che, a seguito del trattamento termico, si formano degli aggregati solubili di sieroproteine (α La/ α La, α La/ β Lg e β Lg/ β Lg) e di sieroproteine e κ -caseine. Queste ultime “coprono” le micelle e sono ricche di β Lg. La κ -CN è presente in strutture polimeriche e l'associazione con le SP determina la formazione di aggregati multimerici di grandi dimensioni (4×10^6 Da) (Guyomarc'h., F., *et al*, **2003**).

Riassumendo, nella recente letteratura, le teorie sul meccanismo di formazione di co-aggregati sono due. La prima (Corredig *et al*, **1996**) è costituita da due stadi di cui il primo rappresenta la l'aggregazione delle

proteine denaturate in un rapporto dipendente dalla loro concentrazione iniziale. Nel secondo stadio questi complessi si associano con le micelle caseine durante il riscaldamento. L'associazione più probabile risulta essere quella associata all'interscambio tra i ponti disolfurici tra la β Lg e la κ -CN sulla superficie delle micelle. La seconda teoria (Mottar *et al*, 1989) suggerisce che ad alte temperature la β Lg sia la prima a denaturarsi ed a interagire con le caseine. A temperature più elevate e per tempi più lunghi la α La si denaturerebbe e legherebbe aggregati omo-polimerici della β Lg.

CAPITOLO 2. SCOPO DEL LAVORO SPERIMENTALE E RISULTATI DA CONSEGUIRE

I trattamenti termici del latte (pastorizzazione e sterilizzazione UHT) causano la denaturazione delle sieroproteine in proporzione diretta all'intensità del riscaldamento. La denaturazione termica comporta modificazioni di struttura secondaria e terziaria con formazione di aggregati proteici. Da molti anni sono stati messi in evidenza aggregati tra sieroproteine denaturate e κ -caseina con legami disolfurici. Con l'ausilio di varie tecniche analitiche (elettroforesi su gel, immunoblotting e cromatografia seguita da analisi turbidimetriche) (O' Kennedy, B. T., *et al* **2006**) sono stati discriminati addotti tra proteine classificati con legame "debole" (legami idrogeno) o "forte" (di tipo covalente). E' stato possibile stabilire anche la taglia molecolare degli aggregati proteici e stimare la composizione in proteine costitutive.

Recentemente gli studi si sono concentrati sulla determinazione quantitativa di proteine del siero che si denaturano in seguito a trattamenti termici di varia intensità e sulla natura degli aggregati proteici. Si sono usate le ormai note tecniche immunochimiche del tipo ELISA o l'elettroforesi seguita da densitometria (Jovanovic, S., *et al* **2007**).

Il presente lavoro di tesi parte da queste acquisizioni per spingersi più lontano nell'identificare la natura degli aggregati proteici formati nel latte alimentare. Un altro obiettivo è quello di quantificare le sieroproteine

denaturate separatamente dalle proteine solubili del latte.

Per raggiungere tale obiettivo è necessario estrarre selettivamente le proteine del siero denaturate libere od impegnate in aggregati proteici e procedere alla loro identificazione.

Nel presente lavoro di tesi le proteine del siero denaturate sono state identificate mediante SDS-PAGE seguita da *immunoblotting* con anticorpi policlonali specifici per le singole proteine. Identificazioni complementari sono state effettuate mediante cromatografia RP-HPLC in cui l'identità di ciascuna proteina è stata confermata mediante tecniche varie tra cui la spettrometria di massa MALDI-TOF.

Lo studio preliminare è stato effettuato su latte alimentare sottoposto a pastorizzazione, UHT e sterilizzazione in bottiglia. Data la complessità delle situazioni, diverse da tipo di latte a tipo di latte, è stato scelto di focalizzare l'attenzione sul latte UHT per il profilo di temperatura del trattamento termico del latte, preriscaldamento a circa 80 °C/15sec., equivalente a pastorizzazione "alta" e sterilizzazione vera e propria a 145 °C/1,5sec. Data l'enorme varietà di modificazioni a cui vanno soggette le proteine denaturate, l'obiettivo minimo da raggiungere nella tesi è stato fissato nell'identificare un marcatore molecolare per almeno una significativa proteina del siero del latte che sia incorsa in sensibili modificazioni strutturali.

Disponendo di tale indicatore diviene semplice stimare in termini quantitativi le proteine denaturate dal calore indipendentemente dalla natura e dal tipo di aggregato in cui esse si trovano impegnate.

L'indagine è stata estesa alle polveri di latte (caseinato di calcio) ed ad un preparato di proteine totali del latte. E' stata verificata una difficoltà di frazionamento delle sieroproteine denaturate dalle caseine nelle polveri di latte a causa delle temperature elevate occorse per l'essiccazione dei prodotti. Per tale ragione è stato necessario modificare la procedura analitica valida per il latte liquido facendo ricorso alla pepsina invece che alla tripsina per la digestione enzimatica delle proteine.

Lo studio è estendibile in linea teorica a tutti i derivati del latte come i formaggi ed i latti fermentati e questo costituisce al momento una delle linee di ricerca attualmente partite presso i nostri laboratori, nei quali si è iniziato a studiare la genuinità dei formaggi DOP e dei formaggi fusi per i quali è previsto l'utilizzo di latti non trattati termicamente.

CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione dei campioni

Sono stati utilizzati per le analisi latti scremati commerciali UHT a lunga conservazione (BERNA, GRANAROLO, MATESE, DiPerDi); un preparato a base di proteine del latte (proteine totali del latte NZMP 4861, prodotto da NZMP); un preparato a base di caseinato di calcio (ALANATE 385, prodotto da NZMP).

I latti UHT commerciali utilizzati per le analisi (in buste da 500 ml), sono stati miscelati nel rapporto di 1:1 con tampone 0,2M di citrato trisodio diidrato (Fluka, min. 99%) a pH 8.0 (Di Luccia *et al*, **1994**). I campioni sono stati lasciati in agitazione per una notte (tempo necessario alle proteine non denaturate di solubilizzarsi in tale tampone). È stato effettuato un controllo del pH della miscela prima e dopo l'agitazione, per verificare che quest'ultimo fosse intorno a pH 7. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 9000 rpm (rivoluzioni per minuto) per 30 minuti (Alc PK 131 Multispeed centrifuge). La centrifugazione permette di separare la frazione solubile in citrato, costituita da sieroproteine native, sieroproteine denaturate legate alle caseine e caseine da quella insolubile in citrato. La frazione insolubile è composta da sieroproteine denaturate: β -lattoglobulina, α -lattalbumina e loro aggregati omo ed eteropolimerici.

Si sono ottenute due frazioni:

- La insolubile in citrato, lavata con acetone (Riedel-de Haën® , min. 99.5%) per allontanare gli eventuali sali e l'acqua residua e con etere etilico (J.T. Baker , min. 98.0%) per rimuovere il grasso.
- La solubile in citrato, alla quale è stata aggiunto come agente riducente in lieve eccesso DTT (1,4-Dithio-DL-threitol, min. 99.%, FLUKA). Il campione è stato lasciato in agitazione per una notte controllandone il pH prima e dopo l'agitazione ed avendo cura che rimanesse sempre intorno a 7. In seguito è stato centrifugato a 9000 rpm per 30 minuti ottenendo un precipitato. Quest ultimo è stato poi lavato con acetone ed etere etilico per allontanare il grasso, i sali in eccesso e il DTT.

I campioni di solubile ed insolubile in citrato sono stati sciolti, dopo molte prove di solubilità condotte su diversi tamponi, in una miscela costituita da: acetonitrile (ACN)_{29%} /Ammonio bicarbonato (AMBIC)_{54%} /UREA 2M_{17%}. I reattivi utilizzati sono stati: ACN (CARLO ERBA, min. 99.8%), AMBIC (SIGMA-ALDRICH), UREA (SIGMA-ALDRICH).

I campioni così preparati sono stati analizzati secondo la strategia analitica riportata nello schema 5.

3.2 Elettroforesi

Questa tecnica si basa sulla migrazione delle proteine sottoposte ad un campo elettrico.

La separazione può avvenire in funzione di :

- i. carica netta, negativa o positiva in dipendenza del pH utilizzato, nella PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis);

- ii. punto isoelettrico, nella PAGIF (Polyacrilamide Gel Isoelectric Focusing).
- iii. peso molecolare, nella SDS-PAGE (Sodio Dodecil Solfato Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

Durante la corsa elettroforetica le proteine migrano in zone distinte del gel e le bande elettroforetiche, relative alle frazioni proteiche vengono rilevate, con un'opportuna colorazione, al termine della corsa.

I gel di poliacrilammide vengono ottenuti facendo co-polimerizzare acrilammide e bis-acrilammide (tra cui si stabiliscono legami crociati), in presenza di un iniziatore di catena (TEMED) e di un catalizzatore (Persolfato d'ammonio). La rete tridimensionale che si forma è il supporto entro cui si muovono le molecole da separare nell'opportuno tampone. I parametri che definiscono la composizione del gel sono: T, somma di acrilammide e bis-acrilammide, espresso in g/100 ml di soluzione; C, rapporto percentuale della bis-acrilammide rispetto a T. La taglia dei pori è determinata da T, mentre il grado di reticolazione del gel è espresso da C. Ad un aumento di T corrisponde una riduzione della taglia dei pori e la separazione è influenzata dalle dimensioni delle molecole. Quando $T < 5\%$ e $C = 3\%$ la separazione avviene principalmente per carica.

3.2.1 Preparazione dei campioni per l'analisi elettroforetica

Sono stati analizzati mediante SDS-PAGE lattini scremati commerciali: pastorizzato BERNA, UHT GRANAROLO, sterilizzato in bottiglia STELLA

ed un latte di massa crudo preventivamente scremato. In oltre sono stati analizzati campioni di polveri di caseinato di calcio e proteine totali.

Per l'analisi elettroforetica su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE), i campioni sono stati sciolti in urea 9 M ad una concentrazione finale del 2%; a questi sono stati aggiunti 1% di β -mercaptoetanololo (10 mg di campione in 500 μ l di urea 9M addizionati di 5 μ di β -mercaptoetanololo) ; 100 μ l di questa soluzione sono stati addizionati di un ugual volume di Fullington (0,75 g di TRIS, 2g di SDS e 5 ml di β -mercaptoetanololo per 100 ml di soluzione) a pH 6.8, una punta di spatola di saccarosio per appesantire il campione e 10 μ l di blu di bromofenolo come tracciante della corsa elettroforetica. I campioni sono stati sottoposti a denaturazione mediante bollitura a 100°C per 5 minuti.

3.2.2 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS-PAGE)

Le analisi elettroforetiche PAGE-SDS sono state eseguite secondo la procedura descritta da Chianese *et al*, **1996**. È stato utilizzato un gel di poliacrilammide costituito da una porzione a pori larghi, gel di avvio o stacking gel, a pH 6,8 avente T=3% e C=3% e da una porzione a pori più stretti, gel di migrazione o running gel, a pH 8,8 avente T=16,9% e C=1%. La corsa elettroforetica è stata condotta a 110 Volts per i primi 10 minuti e a 220 Volts fino a fine corsa. L'analisi è stata realizzata con un sistema per elettroforesi verticale. Dopo la corsa elettroforetica i gel sono stati colorati con Comassie Brilliant Blue (saggio di Bradford).

3.3 Immunoblotting

Questa tecnica permette di identificare univocamente le singole frazioni caseiniche e sieroproteiche in funzione della specificità mostrata da anticorpi policlonali prodotti contro tali frazioni in seguito ad immunizzazione di conigli con le singole frazioni proteiche.

La procedura dell'immunoblotting è stata realizzata seguendo la metodica di Chianese *et al*, 1996, che prevede il trasferimento delle proteine separate mediante elettroforesi, su membrana di nitrocellulosa (porosità 0,45 µm, Protean Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA 03431), e il loro riconoscimento tramite reazione immunospecifica. Le proteine separate mediante SDS-PAGE sono state trasferite per trasferimento elettrico (Immuno-elettroforesi). Sono stati utilizzati anticorpi policlonali contro β-lattoglobulina (βLg), α-lattalbumina (α-La) e κ-caseina (κ-CN).

3.4 Spettrometria di massa MALDI-TOF

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica analitica di delucidazione strutturale basata sulla **ionizzazione** di una molecola e sua successiva **frammentazione** in ioni di diverso rapporto massa/carica (m/z).

In particolare la MS MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) è una tecnica in cui il campione viene assorbito su una matrice solida, da cui viene desorbito attraverso un raggio laser. Essa è una tecnica selettiva in quanto cambiando l'energia del laser cambia la selettività verso i substrati poichè vengono eccitati differenti legami. La matrice solida assorbe energia

alla lunghezza d'onda del raggio laser (337 nm), e si riscalda intensamente portando al desorbimento e contemporanea ionizzazione del campione. L'analizzatore TOF (Time of Flight) fa in modo che ioni di differente valore massa/carica abbiano uguale energia, ma differente velocità dopo l'accelerazione subita nella camera di ionizzazione. Ne deriva che il tempo che ciascuno ione impiega per attraversare l'analizzatore è differente. La relazione che lega il tempo di volo alla massa della molecola analizzata è:

$$t = a \times (m/z)^{1/2} + b$$

dove t è il tempo di volo, m è la massa molecolare, z è la carica dello ione molecolare ed a e b sono costanti dipendenti dai parametri strumentali; quindi dal tempo di volo si ricava la massa dello ione.

3.4.1 Spettri MALDI-TOF dei campioni

Gli spettri MALDI sono stati acquisiti su uno spettrometro MALDI-TOF Voyager DE-Pro^R Applied Biosystems dotato di laser ad azoto ($\lambda = 337$ nm). I campioni sono stati preventivamente desalificati e concentrati con resina a fase inversa (Millipore zip tip C4 e C18). Gli spettri dei peptidi derivanti dagli idrolizzati triptici sono stati acquisiti in modalità *reflector* ed in polarità positiva, utilizzando i seguenti parametri strumentali:

Accelerating voltage:	20000 V
Grid voltage:	75%
Guide wire:	0.002%
Extraction delay time:	100 nsec
Acquisition mass range:	500 - 1500 Da

Number of laser shots: 150/spectrum
Laser intensity: 2833
Calibration matrix: a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid.

Gli spettri dei campioni proteici sono stati acquisiti in modalità *linear* ed in polarità positiva utilizzando i seguenti parametri strumentali:

Accelerating voltage: 25000 V
Grid voltage: 93%
Guide wire: 0.3%
Extraction delay time: 1200 nsec
Acquisition mass range: 4500 - 50000 Da
Number of laser shots: 200/spectrum
Laser intensity: 3602
Calibration matrix: Sinapinic acid.

3.5 Idrolisi enzimatiche

3.4.1 Digestione con tripsina

I campioni di solubile ed insolubile in tampone citrato trisodio pH 8.0 0.2 M (3.1), dopo estrazione ed essiccazione, sono stati sciolti in tampone ACN_{29%} /AMBIC_{54%}/ UREA 2 M_{17%} alla concentrazione di 1mg/ml e idrolizzati con tripsina (SIGMA) per una notte a 37 °C in un rapporto enzima substrato di 1:50 in peso. La reazione è stata bloccata bollendo i campioni per 5 minuti. Aliquote da 1mg/ml di α La e di β Lg pure (SIGMA) sono state idrolizzate enzimaticamente con tripsina incubando per circa 12 ore in tampone AMBIC a pH 8.5 e concentrazione dello 0.4% a 37 °C in un

rapporto enzima substrato di 1:50 (p/p). Dopo incubazione la reazione è stata arrestata bollendo i campioni per 5 minuti.

3.4.2 Digestione con pepsina

I campioni di Caseinato di calcio e Proteine totali del latte sono stati sciolti in HCl 0,02 M pH 2.5 alla concentrazione di 1mg/ml e idrolizzati con Pepsina a 37 °C per una notte in un rapporto enzima substrato pari a 1:100 (p/p). Dopo incubazione la reazione è stata arrestata bollendo i campioni per 5 minuti.

3.6 Analisi effettuate mediante RP-HPLC

Per l'analisi cromatografia è stato utilizzato un sistema HPLC KONTRON, collegato ad un personal computer dotato di apposito programma DATA SYSTEM MT2, per la gestione della cromatografia e per l'integrazione dei picchi cromatografici. È stata utilizzata una colonna RP-HPLC VYDAC C₁₈. I solventi HPLC grade sono stati acquistati dalla J.T. Baker. 100µl di idrolizzato triptico di βLg pura sciolta in AMBIC allo 0.4% sono stati iniettati in colonna per identificare i tempi di ritenzione del peptide βLg (142-148). Successivamente 100µl delle frazioni di solubile ed insolubile in tampone citrato trisodio a pH 8.0, 0.2 M, idrolizzati con tripsina (SIGMA), sono stati iniettati in colonna ad un flusso di 1ml/min. È stato utilizzato un gradiente lineare dal 10% al 60% di tampone ACN/TFA in 60 minuti . La lettura, mediante rivelatore UV, è stata effettuata alla lunghezza d'onda di 220 nm. I picchi HPLC dei campioni analizzati sono stati raccolti, liofilizzati ed identificati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF, al fine di ottenere una analisi comparativa e quantitativa.

3.6.1 Purificazione del peptide sintetico

Il peptide sintetico β Lg (142-148)* che presenta la sostituzione della prolina in posizione 144 con l'acido isonipecotico (Figura 1 in Appendice), sintetizzato presso l'ISA (Istituto di Scienze degli Alimenti) del CNR di Avellino (dott.ssa Olga Fierro), è stato purificato mediante RP-HPLC utilizzando una colonna analitica VYDAC C₁₈ a fase inversa. È stato utilizzato un gradiente lineare dal 10% al 60% di ACN (0.1 % di TFA acido trifluoroacetico) in un tempo di 60 minuti, con un flusso di 1 ml/min. I picchi HPLC raccolti sono stati liofilizzati ed in seguito si è preparata una soluzione 1mg/ml di peptide sintetico in acqua mQ (TFA 0,1%).

3.7 Ricerca di un marcatore molecolare e retta di taratura

Per quantificare il contenuto di sieroproteine denaturate e legate alle caseine è stato necessario trovare un marcatore molecolare che fosse riproducibile e monitorabile in tutti gli spettri acquisiti. Gli spettri degli idrolizzati triptici dei campioni analizzati presentano tutti un segnale distinguibile ed intenso ad 837.6 m/z. Mediante ricerca in banca dati e frammentazione mediante MALDI-TOF in modalità PSD (Post Source Decay) si è identificato come il frammento triptico (142-148) della β Lg la cui sequenza corrisponde a: (K)HOOC-Ala¹⁴² Leu¹⁴³ Pro¹⁴⁴ Met¹⁴⁵ His¹⁴⁶ Ile¹⁴⁷ Arg¹⁴⁸-NH₃ (L).

La scelta di tale peptide triptico come marcatore e quindi come standard è stata fatta per la sua riproducibilità negli spettri triptici acquisiti, per l'assenza di residui di cisteine, per la taglia relativamente piccola e soprattutto per i costi contenuti di sintesi di un peptide omologo avente le medesime

caratteristiche di sequenza, ma avente una differenza di massa tale da poter essere usato come standard interno. Il peptide è stato sintetizzato dal CNR di Avellino (dott.ssa Olga Fierro) ed è un mutante puntiforme del β Lg (142-148) in cui al posto della prolina è stata sostituita una molecola di acido isonipecotico (Figura 1 in Appendice) tale che la differenza di massa sia di 14 Da e che indichiamo con un asterisco (β Lg (142-148)*). Dall'analisi della struttura del peptide β Lg (142-148) si è quindi verificato che la sua quantità rilasciata dall'idrolisi è in quantità stechiometrica con la proteina (1:1), tale che dalla sua quantificazione si potesse risalire a quella della proteina idrolizzata.

La retta di taratura si è costruita mediante l'utilizzo dello standard corrispondente al peptide da quantificare ed ottenuto dalla idrolisi di 1 mg/ml della β Lg pura (Bublitz, *et al*, 2006). Di esso sono state fatte diluizioni 1:100, 1:200 ed 1:500 alle quali è stato aggiunta una quantità costante di standard interno β Lg (142-148)*. Spettri MALDI sono stati acquisiti in triplo per ogni diluizione e le intensità relative dello standard sono state messe in relazione lineare con le diverse concentrazioni ottenendo una curva lineare di taratura di cui si è calcolati l'equazione ed il coefficiente di correlazione. Mediante la retta di taratura si è potuti risalire alle concentrazioni incognite attraverso misure delle intensità del segnale a 837.6 m/z dei campioni (vedi figura 2 e tabelle 1, 2 e 3 in Appendice). Calcolando le moli del peptide si è risaliti alle moli di proteina β Lg e quindi alla stima di quest'ultima in g/l di latte trattato termicamente.

CAPITOLO 4. RISULTATI E DISCUSSIONI

I lattini scremati UHT del commercio utilizzati nel lavoro di tesi sono stati BERNA, MATESE, GRANAROLO e DiPerDi.

Le polveri di caseinato di calcio e proteine totali del latte sono state rispettivamente *ALANATE 385*, prodotto da NZMP e *proteine totali del latte NZMP 4861*, prodotto da NZMP.

La scelta del protocollo di estrazione delle sieroproteine denaturate è stata fatta in base al lavoro di **Di Luccia et al**, 1994 apportando alcune modifiche per cercare di aumentarne la resa quantitativa. Un aumento, infatti, di circa il 30% in peso rispetto al trattamento del riferimento bibliografico è stato rilevato utilizzando queste modifiche sulla metodologia di estrazione (dati non mostrati).

4.1 Elettroforesi SDS-PAGE

I campioni caricati sul gel SDS-PAGE, per ogni tipo di latte trattato termicamente, sono in sequenza rispettivamente: la caseina isoelettrica precipitata a pH 4.6, il solubile a pH 4.6 (sieroproteine), il solubile in citrato, l'insolubile in citrato, il solubile in citrato dopo riducente (DTT), l'insolubile in citrato dopo riducente. Su ogni piastra è stato caricato un *kit* di marcatori di peso molecolare che vanno da 14 a 97 KDa. Le *lanes* da 1 a 6 della piastra A (vedi Appendice) sono campioni di latte crudo di massa (usato come controllo per lattini non trattati termicamente) mentre quelle da 7 a 12 sono di latte pastorizzato BERNA. Le *lanes* 1 a 6 della piastra B (vedi Appendice) sono

campioni di latte UHT GRANAROLO mentre quelle da 7 a 12 sono di latte sterile in bottiglia STELLA. La scelta del latte sterile in bottiglia è stata fatta per mettere in evidenza il comportamento elettroforetico delle proteine al limite di un trattamento termico molto spinto, poiché dal punto di vista commerciale esso non ha un buon riscontro ed è addirittura di difficile reperibilità.

4.1.1 Piastra A

Le *lanes* 1 e 2 mostrano rispettivamente le caseine in un intervallo che va da 20 a 25 KDa circa, dove si può osservare anche una banda netta intorno a 19 KDa corrispondente alla κ -CN, e le sieroproteine α La e β Lg in un intervallo compreso tra circa 18 e 14 KDa. Questi profili elettroforetici possono essere usati come riferimento verso i latti che hanno subito un trattamento termico perché mostrano semplicemente la migrazione elettroforetica delle proteine del latte (caseine e proteine del siero) discriminate in base al loro peso molecolare. La *lane* 3 corrisponde al solubile in citrato (precipitato con TCA al 12%) che, come atteso, corrisponde alle caseine dato che il latte non ha subito trattamenti termici e quindi non ha sieroproteine denaturate né tantomeno sieroproteine legate alle caseine, come mostrato anche nella *lane* 4 dove troviamo ancora delle caseine che precipitano dopo centrifugazione a 9000 rpm ed altre proteine del siero ad elevato peso molecolare, come la banda a 66 KDa (forse BSA) e quella al di sopra di 97 KDa che probabilmente immunoglobuline. Le *lanes* 5 e 6 sono rispettivamente solubile ed insolubile in citrato con riducente. I profili sono praticamente gli

stessi delle due *lanes* precedenti a riprova del fatto che trattandosi di latte crudo non ci sarebbero proteine del siero denaturate.

La *lanes* 7 e 8 rappresentano rispettivamente la caseina isoelettrica e il solubile a pH 4.6 del latte pastorizzato e le posizioni delle bande corrispondono a quelle trovate nel latte crudo cioè caseine e siero proteine α La e β Lg. Le *lanes* 9 e 10 sono quelle del solubile e dell'insolubile in citrato; la prima corrisponde alla banda delle caseine in cui è evidente la banda ben risolta della κ -CN a circa 19 KDa. La *lane* 10 contiene ancora delle bande di bassa intensità intorno a 25 KDa corrispondente alle caseine e bande ad alto peso molecolare comprese tra 45 e 97 KDa corrispondenti probabilmente a proteine solubili delle quali si farà in futuro un'identificazione mediante digestione *in situ* con tripsina seguita da identificazione mediante spettrometria di massa e ricerca in banca dati. L'aspetto interessante su questa *lane* è la presenza di due bande di debole intensità rispettivamente a 14 e 18 KDa che probabilmente rappresentano le maggiori sieroproteine α La e β Lg. Le *lanes* 11 e 12 corrispondono a quelle del solubile e dell'insolubile in citrato con riducente. I profili sono praticamente identici a quelli delle due *lanes* precedenti e ciò è praticamente comprensibile a causa del trattamento dei campioni prima del caricamento sul gel SDS-PAGE con beta-mercaptoetanololo che è un agente riducente. Tuttavia è sempre interessante notare nella *lane* 12 le bande presenti ad alte masse da 45 a 97 KDa ed le due bande poco intense tra 14 e 18 KDa corrispondenti al profilo dell' α La e β Lg.

4.1.2 Piastra B

Le *lanes* 1 e 2 rappresentano i profili elettroforetici della caseina isoelettrica e del solubile a pH 4.6 del latte UHT, in cui si possono vedere le bande intorno a 25 KDa corrispondenti alle frazioni caseiniche e poi tra 14 e 18 KDa corrispondenti alle sieroproteine più abbondanti α La e β Lg .

La *lane* 3 contiene il solubile in citrato e si vedono le bande corrispondenti al peso molecolare della caseine e bande intense all'altezza della β Lg a riprova del fatto che il trattamento termico ha portato alla formazione di aggregati tra caseine e sieroproteine mediante ponti disolfurici che successivamente sono stati ridotti con β -mercaptoetanolo durante il trattamento dei campioni da caricare sul gel. La *lane* 4, corrispondente all'insolubile in citrato, presenta, oltre le bande ad alto peso molecolare fino a 97 KDa, una prima banda posizionata tra lo *stacking gel* ed il *running gel*, il che vuol dire la presenza di un aggregato molecolare che addirittura non è riuscito a penetrare nel *running* e poi una banda molto intensa intorno a 18 KDa e cioè in corrispondenza della β Lg ed una meno intensa intorno a 14 KDa in corrispondenza dell' α La. Ciò significa che il trattamento termico spinto di un processo UHT ha portato sia alla formazione di polimeri di grossa taglia corrispondenti alle sieroproteine denaturate sia ad aggregati tra micelle e sieroproteine. Le *lanes* 5 e 6 sono rispettivamente i campioni di solubile ed insolubile in citrato trattati con riducente. I loro profili sono uguali a quelli trattati senza riducente. Il motivo è nella preparazione dei campioni per la corsa in cui si aggiunge il β -mercaptoetanolo e quindi riduce i ponti disolfurici tra gli addotti di caseine e sieroproteine.

È interessante studiare l'andamento dei profili delle corse elettroforetiche del latte sterilizzato STELLA per il quale il trattamento termico è assai drastico (120 °C per 20 minuti).

La *lane 7* presenta una banda poco intensa in corrispondenza della frazione caseinica dell'insolubile a pH 4.6 ed una banda tra lo *stacking* ed il *running* che significa la presenza di aggregati di alte masse che non riescono ad entrare nel gel. La *lane 8* è il solubile a pH 4.6 ma non si distinguono nettamente le bande corrispondenti ad α La e β Lg, probabilmente perché denaturate e legate alle micelle caseiniche. Le *lanes 9* e *10* sono quelle dell'insolubile e del solubile in citrato e le bande in corrispondenza della caseina sono poco intense rispetto agli altri latti che hanno subito un trattamento termico meno spinto e altrettante bande poco intense in corrispondenza delle masse di β Lg ed α La. La spiegazione è quella attribuibile alla formazione di aggregati tra micelle caseiniche e sieroproteine di elevato peso molecolare che rimangono bloccati tra *running* e *stacking gel*. Le *lanes 11* e *12* sono gli stessi campioni delle *lanes 9* e *10* ma dopo riducente. La differenza è nella intensità maggiore della banda in corrispondenza della caseina visto che la riduzione ha staccato le sieroproteine dalle micelle permettendo a queste ultime di migrare in corrispondenza delle masse delle frazioni caseiniche. È interessante notare la presenza di bande intense che non sono riuscite a migrare nel *running* rimanendo intrappolate nello *stacking*. Ciò conferma finalmente la presenza di aggregati di alto peso molecolare.

4.2 Immunoellettroblotting

L'immunoblotting per trasferimento elettrico è stato condotto su un gel SDS-PAGE di un campione di latte UHT GRANAROLO per riconoscere la presenza di α La, β Lg e κ -CN.

Sono stati utilizzati anticorpi policlonali prodotti contro tali proteine in seguito ad immunizzazione di conigli con le stesse.

La piastra C in Appendice mostra solamente le *lanes* di interesse rispettivamente per l'insolubile ed il solubile in citrato per il latte UHT, e per gli anticorpi anti α La, anti β Lg ed anti κ -CN.

Le lanes 1 e 2 corrispondenti al solubile ed insolubile del latte UHT mostrano i classici profili discussi sopra (§ 4.1.2) con la presenza di una banda in corrispondenza della frazione caseinica e bande a più basso peso molecolare in corrispondenza di α La e β Lg. Le *lanes* 3 e 4 sono quelle corrispondenti allo sviluppo anti α La del foglio di nitrocellulosa ed è interessante notare che all'altezza di circa 14 KDa ci sono, sia per l'insolubile che il solubile, bande molto intense corrispondenti alla presenza dell' α La. Le *lanes* 5 e 6 sono quelle corrispondenti allo sviluppo contro la β Lg. Si osserva sia sull'insolubile che sul solubile, lungo tutta la corsa e a varie altezze di migrazione, tra cui quelle delle caseine, la presenza della proteina. Ciò indica che il trattamento termico ha portato ad un legame di tipo covalente tra le caseine e le sieroproteine e che il trattamento con riducente per la corsa elettroforetica ne ha causato la rottura.

Le ultime *lanes* 7 ed 8 sono quelle sviluppate con anticorpi contro la κ -CN.

Quest'ultima si vede sia ad alte masse, il che conferma la presenza di aggregati mediante ponti disolfurici tra micelle e sieroproteine, che in corrispondenza della banda di migrazione della κ -CN dopo azione del riducente durante la preparazione del campione per l'elettroforesi.

In conclusione i profili elettroforetici SDS del solubile e dell'insolubile in citrato del latte UHT mettono in evidenza la formazione di aggregati covalenti di grossa taglia poiché lo sviluppo con anticorpi contro l' α La, β Lg e κ -CN hanno rilevato la presenza di tutte e tre le frazioni e quindi il legame per mezzo di ponti disolfurici tra micelle caseiniche, mediante la κ -CN, e sieroproteine.

4.3 Analisi mediante RP-HPLC

Le analisi RP-HPLC sono state condotte sugli idrolizzati triptici della β Lg pura per avere un riferimento dei tempi di eluizione dei singoli componenti peptidici, identificati successivamente mediante MALDI-TOF, e sugli idrolizzati triptici degli insolubili e dei solubili in citrato dai latti UHT esaminati.

I risultati ottenuti sugli idrolizzati di β Lg pura ci hanno permesso di stabilire che il peptide β Lg (142-148) ha un tempo di ritenzione di 20.44 minuti (vedi Figura 3 in Appendice). Ciò è utile perché, in linea teorica, permetterebbe di identificare e quantificare lo stesso negli idrolizzati di insolubile e solubile in citrato.

Le analisi RP-HPLC condotte tuttavia sui digeriti triptici sia dei solubili che degli insolubili non ha rilevato alcunché di significativo.

In corrispondenza dei tempi di eluizione del peptide β Lg (142-148) non si osserva alcun segnale, probabilmente dovuto al limite di rilevabilità del *detector* UV che non riesce a discriminare, tra una moltitudine di molecole, la bassa concentrazione dell'analita di interesse (vedi Figura 4 in Appendice). Per questo motivo e per dare conferma della validità nel metodo delle analisi quantitative si è passati alla spettrometria di massa MALDI-TOF.

4.4 Analisi mediante MALDI-TOF-MS

Gli spettri MALDI-TOF sono stati acquisiti sia sulle frazioni di solubile ed insolubile in citrato dei latti UHT sia sugli idrolizzati triptici degli stessi.

4.4.1 Analisi sulle frazioni di insolubile e solubile in citrato

Le analisi mediante MS MALDI-TOF sulle frazioni estratte mediante la strategia analitica utilizzata (Figura 5 in Appendice) sono state effettuate in modalità *linear*, utilizzando acido sinapinico come matrice di desorbimento.

La modalità di estrazione delle sieroproteine denaturate prevede la separazione delle proteine native e solubili in tampone citrato trisodico dalla frazione denaturata e cioè insolubile. La frazione insolubile in citrato costituirebbe, secondo la strategia analitica riportata, la quota di sieroproteine denaturate dal trattamento termico. La denaturazione porta alla perdita di struttura secondaria e quindi alla esposizione di tratti ad alto contenuto di residui idrofobici i quali, in mezzo acquoso, difficilmente rimangono in soluzione. Il tampone citrato a pH 8 aumenta la solubilità della frazione solubile costituita dalle caseine, dalle sieroproteine non denaturate dal trattamento termico e dagli aggregati caseina/sieroproteine.

Ci si aspetta che nella frazione insolubile, dopo centrifugazione a 9000 rpm, vi siano quindi solo sieroproteine denaturate sotto forma di monomeri e polimeri ad alto peso molecolare.

Gli spettri MALDI acquisiti sui campioni di insolubile presentano i segnali tipici delle masse corrispondenti alla α La con i suoi diversi gradi di glicosilazione a 14600 m/z e 14900 m/z e alla β Lg con i suoi gradi di glicosilazione (**Spettro 1** in appendice). La maggior parte degli spettri acquisiti sui campioni di insolubile presenta segnali a valori di m/z riconducibili alle masse delle γ caseine (m/z 11500 e 11700 a meno di errore di calibrazione). Una possibile spiegazione dell'esistenza delle γ caseine, che sono frammenti C-terminali di β -CN ad alto contenuto idrofobico derivanti dall'idrolisi della plasmina, nella frazione insolubile è legata all'utilizzo di latti di seconda scelta nella produzione di latte UHT. Le alte temperature alle quali tali prodotti sono sottoposti permettono una maggiore stabilizzazione e conservazione nonostante la modesta qualità iniziale.

La spettrometria di massa ha quindi confermato che nella frazione insolubile in citrato, fossero presenti effettivamente le proteine del siero denaturate, corroborando quindi la validità del metodo di estrazione secondo la strategia analitica adottata.

La frazione solubile in tampone citrato, dopo riduzione con DTT e successiva centrifugazione a 9000 rpm, è stata ugualmente sottoposta ad analisi MS MALDI-TOF. Gli spettri corrispondenti a tali frazioni sui diversi latti esaminati presentano molteplici segnali corrispondenti rispettivamente ad α La

intorno a valori di 14200 m/z e β Lg intorno a 18400 m/z di debole intensità.

In questi spettri è interessante notare la presenza di segnali a valori di m/z corrispondenti a γ -CN e κ -CN (**Spettro 2** in appendice). La presenza delle γ caseine è giustificata per quanto detto sopra. La presenza della κ -CN è un dato importante perché è noto che i trattamenti termici inducono la formazione di ponti disolfurici tra le cisteine delle sieroproteine e della κ -CN che si trova sulla superficie micellare.

Perciò la riduzione con DTT, rompendo tali legami, determina la precipitazione delle sieroproteine denaturate e la sedimentazione di una quota parziale di κ -CN legate alle sieroproteine. Tutto questo conferma ancora una volta la validità del metodo analitico di estrazione messo a punto nel nostro laboratorio a partire dal protocollo originale di **Di Luccia et al (1994)**.

4.4.2 Analisi sulle frazioni di insolubile e solubile in citrato dopo idrolisi con tripsina

Le analisi mediante MS MALDI-TOF sulle frazioni estratte mediante la strategia analitica utilizzata (**Figura 5** in Appendice) e sottoposte ad idrolisi con tripsina sono state effettuate in modalità *reflector*, utilizzando acido α -Ciano-4-idrossi-cinnammico come matrice di desorbimento.

La quantificazione del contenuto in sieroproteine denaturate e legate alle caseine necessita della presenza di un marcatore molecolare che sia riproducibile in tutti gli spettri; infatti gli spettri degli idrolizzati “triptici” dei campioni analizzati presentano un segnale intorno a 837.6 m/z. La frammentazione in modalità PSD (Post Source Decay) del peptide di massa

corrispondente ad 837.6 m/z lo ha identificato come il frammento triptico (142-148) della β Lg la cui sequenza corrisponde a: (K) $HOOC-A^{142} L^{143} P^{144} M^{145} H^{146} I^{147} R^{148}-NH_3$ (L).

La scelta di tale peptide triptico come marcatore e quindi come standard è stata fatta per la sua riproducibilità negli spettri triptici, per l'assenza di residui di cisteine, per la taglia relativamente piccola e soprattutto per i costi contenuti di sintesi di un peptide omologo avente le medesime caratteristiche di sequenza, ma avente una differenza di massa tale da poter essere usato come standard interno. Lo studio della struttura del peptide β Lg (142-148) ci ha permesso di ipotizzare prima e verificare poi che il rilascio idrolitico è in quantità stechiometrica con la proteina (rapporto 1:1) tale che dalla sua quantificazione si potesse risalire direttamente a quella della proteina idrolizzata.

Ad ogni singolo campione di digerito triptico è stato miscelato una quantità fissa di standard interno (peptide sintetico modificato β Lg (142-148)*). Dividendo infatti l'intensità del picco standard per quella dello standard interno si normalizza la somma delle intensità dei picchi acquisiti in modo da azzerare tutti gli effetti indesiderati dovuti ad esempio ad una scarsa ionizzazione del campione, ad una disomogenea cristallizzazione della matrice ed altri effetti strumentali che porterebbero ad una non riproducibilità dei risultati. Moltiplicando per cento il rapporto si ottiene l'intensità relativa del segnale esente a questo punto da errori sistematici.

L'analisi degli spettri triptici di tutti i campioni, sia di insolubile che solubile

in citrato, evidenziano la presenza costante di un segnale a 837.6 m/z. La scelta di tale segnale come marcatore molecolare della presenza della proteina ha permesso di monitorare l'intensità della denaturazione termica.

Il segnale in tutti gli spettri analizzati (vedere spettri MALDI delle frazioni insolubili e solubili da latti UHT idrolizzati con tripsina in Appendice) conferma che in entrambe le frazioni vi è la β Lg denaturata e denaturata/legata alla caseina.

Una controprova è stata effettuata con un latte commerciale scremato pastorizzato sottoposto alla medesima strategia analitica di estrazione (**Schema 5** in Appendice) delle sieroproteine denaturate e ad analisi MS MALDI-TOF degli idrolizzati "triptici" dell'insolubile e del solubile in citrato.

L'analisi degli spettri MALDI (**Spettro 14** in Appendice) ha rivelato l'assenza del segnale ad 837.6 m/z e quindi del peptide β Lg (142-148).

Ciò indica sicuramente un trattamento termico meno drastico e quindi, anche se presente, una denaturazione non rilevabile mediante questa tecnica.

4.4.3 Analisi quantitativa delle sieroproteine denaturate in termini di β -Lg

La costruzione della retta di taratura mediante calcolo della relazione lineare tra diluizioni scalari di standard in funzione delle concentrazioni (**Figura 2** in Appendice) ha permesso di stimare quantitativamente il contenuto di peptide β Lg (142-148) nelle due frazioni dei latti analizzati (**Tabella 3** in Appendice).

L'analisi della struttura di β Lg (142-148) ci ha permesso di affermare che il rapporto stechiometrico tra la proteina ed il peptide derivante dall'idrolisi

triptica della stessa sia di 1:1. Stabilita questa relazione è stato semplice calcolare il contenuto in g/l della sieroproteine denaturata, i cui valori sono riportati per ogni latte UHT e per entrambe le frazioni in **Tabella 4** in Appendice. È noto dalla letteratura (Oldfield, D. J. *et al*, **1998**. Oldfield, D. J., *et al*, **2000**. Guyomarc'h, F. *et al* **2003**. O' Kennedy, B. T., *et al* **2006**) che trattamenti termici molto spinti determinano una maggiore quota di sieroproteine denaturate mentre trattamenti più blandi incrementano la quota di quelle legate covalentemente alle micelle caseiniche per mezzo di ponti disolfurici.

Da tali valori ottenuti si possono ricavare le seguenti considerazioni:

- Il latte UHT GRANAROLO presenta un quantitativo maggiore di β Lg denaturata nella frazione insolubile rispetto alla solubile. Questo risultato evidenzia che il trattamento termico è molto spinto perché promuove la denaturazione rispetto alla aggregazione alle caseine.
- Il latte UHT BERNA al contrario presenta un maggior contenuto di β Lg nella frazione solubile. Questo risultato indica che il trattamento UHT è meno spinto o comunque tale da limitare la denaturazione poiché la quantità di sieroproteine appunto denaturate è inferiore a quella delle sieroproteine legate alle caseine.
- Il latte UHT MATESE presenta delle quantità molto vicine tra loro per la frazione di β Lg denaturata e per quella legata. Si può ipotizzare che

il trattamento termico è a valori intermedi tra quelli utilizzati per i due latti discussi sopra.

- Il latte UHT DiPerDi ha un quantitativo maggiore di sieroproteine denaturata. Questo latte ha dimostrato tuttavia di essere quello che ha subito un trattamento meno spinto degli altri poiché presenta quantitativi di β Lg denaturata e legata molto bassi rispetto ai precedenti risultati.

La tabella 4 in Appendice riporta i risultati quantitativi espressi in grammi/litro di β Lg denaturata e legata alle micelle.

Da questi risultati è possibile fare un'analisi comparata della qualità dei latti analizzati sulla base della quantità di sieroproteine biodisponibili. Le sieroproteine infatti sono ad alto contenuto di amminoacidi essenziali e quindi ad alto valore biologico.

Allorquando il trattamento termico UHT è molto spinto e determina una denaturazione delle proteine del siero o addirittura un legame covalente tra le cisteine di queste ultime con quelle delle micelle a livello della κ -CN ciò non rende più disponibile l'assorbimento degli amminoacidi essenziali.

Si può affermare quindi che il trattamento UHT impoverisce la qualità del latte non solo per le reazioni collaterali dei trattamenti termici (formazione di lattulosio, reazione di Maillard con formazione di furosina, reazioni delle catene laterali degli amminoacidi con formazione di LAL) ma specialmente per l'impoverimento del contenuto in proteine ad alto valore biologico come

appunto le sieroproteine.

4.5 Analisi del caseinato di calcio e delle proteine totali

Le polveri di proteine totali del latte e del caseinato di calcio sono state preventivamente analizzate mediante SDS-PAGE per controllarne effettivamente la natura proteica (**Figura 5** in Appendice).

Come atteso il profilo elettroforetico delle proteine totali mostra sia l'intero *pattern* di caseine in un *range* compreso tra 26 KDa circa e 19 KDa che quello delle siero proteine tra 20 KDa e 14 KDa, mentre quello del caseinato di calcio mostra effettivamente solo il *pattern* di caseine.

La difficoltà di solubilizzazione delle polveri è un dato fondamentale nell'intera procedura di estrazione ed analisi delle sieroproteine denaturate applicata invece ai latti, per questo motivo si è passati direttamente alla digestione con pepsina sciogliendo le polveri direttamente in HCl a concentrazione di 0.01 M a pH 2.

L'indagine effettuata mediante MS MALDI-TOF delle due polveri di caseinato di calcio e di proteine totali del latte idrolizzate con pepsina non ha ancora consentito di individuare qualche segnale peptico né di α La né di β Lg tale da poter essere scelto come marcatore molecolare. Allo stato attuale del lavoro sperimentale dall'analisi degli spettri MS MALDI-TOF dei digeriti peptici non si può ancora stimare la presenza di peptidi di sieroproteine, probabilmente a causa di fenomeni di soppressione di segnali dovuti alla elevata concentrazione di peptidi appartenenti alle caseine.

CAPITOLO 5. CONCLUSIONI

Il trattamento termico è sicuramente il più antico ed usato sistema di bonifica degli alimenti; l'attenzione crescente alla sicurezza ed alla qualità dei prodotti a media e lunga conservazione ha stimolato la diversificazione e l'ottimizzazione del trattamento, per ottenere alimenti con il valore nutrizionale ed il sapore dei prodotti non trattati. È noto che i processi di trattamento termico determinano comunque reazioni indesiderate, descritte come danno termico, di tipologie e intensità diverse in funzione della tecnologia e dei parametri termici utilizzati. Tali reazioni possono influire sulle proprietà organolettiche e sui fattori nutrizionali. Si pone il problema di quantificare gli effetti dei parametri termici applicati (Gandolfi, I., *et al*, Indice di trattamento termico nel latte. *Alimentari*, 2000).

Le proteine del siero sono quindi uno degli indici più significativi di valutazione del danno termico.

Questo lavoro di tesi ha raggiunto l'obiettivo di trovare un marcatore molecolare indiretto che confermasse la presenza di β Lg nell'insolubile e nel solubile in citrato, a conferma della bontà della metodologia di estrazione delle sieroproteine denaturate. La natura del marcatore corrispondente al peptide triptico β Lg (142-148) ha permesso non solo di dare una stima qualitativa della frazione estratta ma addirittura di determinarne una stima quantitativa.

L'analisi quantitativa è stata realizzata mediante una metodologia innovativa

che è quella della spettrometria di massa MALDI-TOF. La spettrometria MALDI non è utilizzata solitamente come tecnica ufficiale nei metodi di analisi quantitativa. Tuttavia partendo dai lavori di Bublitz, R., *et al* del **2006** sulla strategia di analisi di proteine e peptidi mediante MALDI-TOF, si è potuto realizzare l'obiettivo di effettuare una stima quantitativa del marcatore individuato. Quindi sebbene allo stato attuale i costi delle strumentazioni per spettrometria di massa siano ancora elevati per la maggior parte dei laboratori di analisi, tuttavia questa tecnica potrebbe rappresentare in futuro una veloce, accurata e sensibile alternativa agli attuali metodi di indagine.

Dai risultati ottenuti analizzando latti commerciali UHT si è potuto confrontare la qualità proteica in base al contenuto di sieroproteine biodisponibili. Le proteine del siero, essendo ad alto contenuto di amminoacidi essenziali, hanno un elevato valore biologico e la loro denaturazione o aggregazione alle micelle caseiniche ne impedisce di svolgere l'importante ruolo nutritivo che hanno nell'alimentazione.

I latti UHT analizzati dunque sono stati rispettivamente Granarolo, Berna, Matese e DiPerDi. I latti Granarolo e Matese sono quelli che hanno avuto un trattamento termico più drastico con un quantitativo di β Lg denaturata rispettivamente di 0.027 g/l e 0.060 g/l. Il Berna ed il DiPerDi invece hanno un quantitativo inferiore con 0.0027 g/l e 0.0029 g/l che indica un trattamento termico più blando. Tuttavia se per ogni latte si è osservato comunque un quantitativo di β Lg legata inferiore a quella denaturata, il latte Berna è l'unico

di β Lg legata contro i 0.0027 g/l della denaturata. Ciò può significare solo che questo è un latte di elevata qualità rispetto agli altri analizzati poiché il trattamento UHT è stato tale da non danneggiare eccessivamente le sieroproteine che quindi si trovano più nella frazione solubile legata alle caseine che in quella insolubile denaturata.

BIBLIOGRAFIA

- Alais Charles. Scienze del latte, 3° edizione a cura di Ivano De Noni. *Tecniche Nuove*.
- Ames, J. M. Application of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chemistry*. **1998**, 62, 4, 431-439.
- Anema, S. G. Effect of milk concentration on the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 4168.
- Anema, S. G. Kinetics of the irreversible thermal denaturation and disulfide aggregation of α -lactalbumin in milk sample of various concentration. *J. Food Sci.*, **2001**, 66, 1-2.
- Anese, M., Fogliano, V. La reazione di Maillard nei prodotti alimentari - aspetti chimici, tecnologici e nutrizionali. *Industrie Alimentari*. **XL-2001**, 385-399.
- Bernal, V., Jelen., P. Thermal stability of whey proteins – a calorimetric study. *J. Dairy Sci.*, **1985**, 68, 2847-2852.
- Bublitz, R., Kreuzsch, S., Ditzel, G., Schulze, M., Cumme, G. A., Fischer, C., Winter, A., Hoppe, H., Rhode, H. Robust protein quantitation in chromatographic fractions using MALDI_MS of tryptic peptides. *Proteomics*, **2006**, 6, 3909-3917.
- Cappelli, Vannucchi. Chimica degli Alimenti, 3° edizione. *Zanichelli*.

- Chianese, L., Laezza, P., Nicolai, M. A., Garro, G., D'Auria, R., Iametti, S., Bonomi, F., Orban, E., Quaglia, G. B. Chemical composition and functional properties of ovine rennet whey and deproteinized whey. *Milchwissenschaft* , **1996**, 51, 569-573.
- Chianese, L., Nicolai, M. A., Addeo, F. La composizione delle sieroproteine denaturate nei sieri di caseificio. *Sieroproteine*. 189-193.
- Corradini, C. Chimica e tecnologia del latte. *Tecniche nuove*. **1995**.
- Corredig, M., Dalgleish, D. G. The mechanism of the heat induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. *International Dairy Journal.*, **1999**, 9, 233-236.
- Corredig, M., Dalgleish, D.G. Effect of temperature and pH on the interaction of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Res. Int.*, **1996**, 29, 1-49.
- Dalgleish, D. G., Law, A. J. R. pH induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *J. Dairy Res.* **1988**, 55, 529.
- Dalgleish, D. G., van Mourik, L., Corredig, M. Heat induced interactions of whey proteins and casein micelles with different concentrations of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 4806.

- de Kruif, C. G., Holt, C. Casein micelle structure, functions and interaction. *Advanced Dairy Chemistry chapt. 3*, **2002**. ed P. F. Fox and P. L. H. McSweeney.
- De Jong, P., Van Der Linden, H. J. L. J. Polymerisation model for prediction of heat induced protein denaturation and viscosity changes in milk. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 2136-2142.
- De Noni, I. Il significato analitico delle modificazioni proteiche nel latte e derivati. *Latte*, **2001**, *26*(10), 102-107.
- de Wit, J. N. Thermal stability and functionality of whey proteins. *J. Dairy Sci.* **1990**, *73*, 3602-3612.
- Di Luccia, A., Ledda, L., Moio, L., Chianese, L., Nicolai, M. A., Spagnamusso, S., Del Giovine, L., Bocca, A., Addeo, F. Qualità control of ricotta cheese based on protein composition. *Italian Journal of Food Science*, **1994**, *2*, 167-183.
- Elfagm, A. A., Wheelock, J. V. Heat interaction between α -lactalbumin, β -lactoglobulin, β -lactoglobulin and casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, **1978**, *61*, 159-163.
- Ennis, M. P., Mulvihill, D. M. Milk Proteins. University College, Cork. *Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC*, **2000**.
- Euber, J. R., Brunner, J. R. Interaction of κ -casein with immobilized β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.*, **1982**, *65*, 2384-2387.

- Gandolfi, I., Manghi, P., Bassi, E., Salvatori, C., Cagnasso, P. Indice di trattamento termico nel latte. *Alimentari*, **2000**, 90-94.
- Guyomarc'h, F., Law, A. J. R., Dalgleish, D. G. formation of soluble and micelle-bound protein aggregates in heated milk. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4652-4660.
- Hattan, S., J., Parker, K. C. Methodology utilizing MS signal intensity and LC retention time for quantitative analysis and precursor ion selection in proteomic LC-MALDI analyses. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7986-7996.
- Hong, Y. H., Creamer, L. K. Changed protein structures of β -lactoglobulin B and α -lactalbumin as a consequence of heat treatment. *International Dairy Journal*, **2002**, *12*, 345-359.
- Horne, D. S., Davidson, C. M. Influence of heat treatment on gel formation in acidified milks. Protein and fat globule modification, in Proceedings of IDF Seminar. **1993**, 267.
- Jang, H. D., Swaisgood, H. E. Disulfide bond formation between thermally denaturated β -lactoglobulin and κ -casein in casein micelles. *J. Dairy Sci.*, **1990**, *73*, 900-904.
- Jeanson, S., Dupont, D., Grattard, N., Rolet-Répécaud, O. Characterization of the heat treatment by milk using two inhibition ELISAs for quantification of native and heat denaturated α -Lactalbumin. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2249-2254.

- Jovanovic, S., Barac, M., Macej, O., Vucic, T., Lacnjevac, C. SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. *Sensors*, **2007**, 7, 371-383.
- Koning, P. J., Rooijen, P. J. Aspects of the formation of lysinoalanine in milk and milk products. *J. Dairy Res.* **1982**, 49, 725.
- Law, A. J., Leaver, J. Effect of pH on the thermal denaturation of whey proteins in milk. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 672-679.
- Li, G., Hu, R., Nakajima, T., Aoyama, T., Inoue, T., Node, K., Kannagi, R., Kyogashima, M., Hara, A. Establishment of quantitative, qualitative, and high throughput analysis of sulfatides from small amounts of sera by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **2007**, 362, 1-7.
- Lucey, J. A., Teo, C. T., Munro, P. A., Singh, H. Rheological properties at small dynamics and large yield deformations of acid gels made from heated milk. *J. Dairy Res.*, **1997**, 64, 591.
- Mulvihill, D. M., Donovan, M. Whey proteins and their thermal denaturation – a review. *Irish Journal of Food Science and Technology*. **1987**, 11, 43-75.

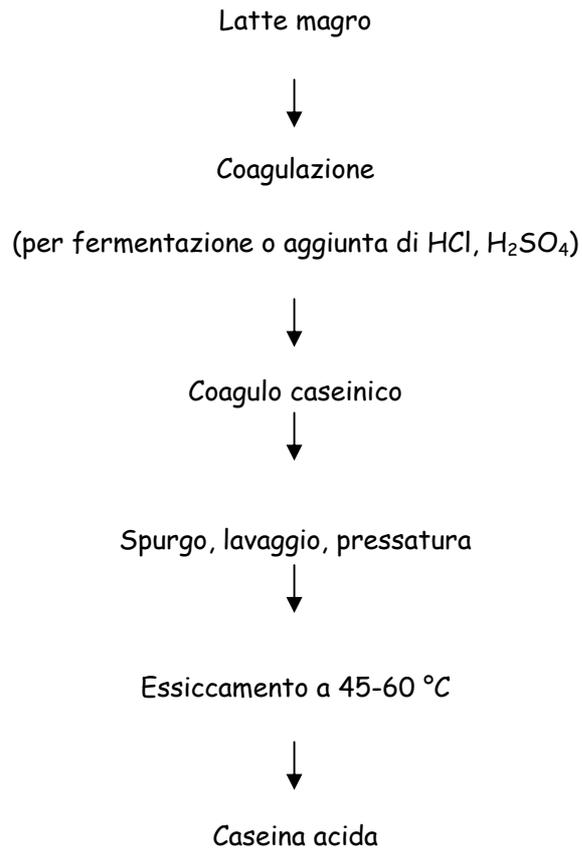
- O' Kennedy, B. T., Mounsey, J. S. Control of heat induced aggregation of whey protein using casein. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5637-5642.
- Oldfield, D. J., Singh, H., Taylor, M. W. Association of β -lactoglobulin and α -Lactalbumin with the casein micelles in skim milk heated in an Ultra High Temperature plant. *International Dairy Journal*, **1998**, *8*, 765-770.
- Oldfield, D. J., Singh, H., Taylor, M. W., Pearce, K. N. Heat induced interaction of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with the casein micelle in pH- adjusted skim milk. *International Dairy Journal*, **2000**, *10*, 509.
- Oldfield, D. J., Taylor, M. W., Singh, H. Effect of pre-heating and other process parameters on whey protein reactions during skim milk powder manufacture. *International Dairy Journal*, **2005**, *15*, 501-511.
- Resmini, P., Uberti, A., Pellegrino, L. Composti azotati che si formano durante il trattamento termico del latte non conseguiti alla reazione di Maillard. *Istituto di industrie Agrarie – Università degli studi di Milano*. 61-85.
- Roefs, S. P. F. M., de Kruif, K. G. A model for denaturation and aggregation of β -lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry*. **1994**, *226*, 883-889.

- Rollema, H. S. Casein association and micelle formation, in advanced dairy chemistry, vol. 1. Proteins, edited by P. F. Fox, Elsevier Science Publishers, England. 111.
- Schokker, E., P., Singh, H., Creamer, L., K. Heat induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, **2000**, *10*, 843-853.
- Silva, J. C., Gorenstein, M. V., Li, Guo-Zhong, Vissers, J. P. C., Geromanos, S. J. Absolute Quantification of Proteins by LC-MS. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006, *5*: 144–156.
- Singh, H., Creamer, L. K. Aggregation and dissociation of milk protein complexes in heated reconstituted concentrated skim milk. *J. Food Sci.*, **1991**, *56*, 238-246.
- Singh, H., Roberts, M. S., Munro, P. A., Teo, C. T. Acid induced dissociation of casein micelles in milk: effect of heat treatments. *J. Dairy Sci.*, **1996**, *79*, 1340.
- Smits, P., Van Brouwershaven, J. V. Heat induced association of β -lactoglobulin and casein micelles. *J. Dairy Res.*, **1980**, *47*, 313-325.
- Sugiyama, E., Hara, A., Uemura, K. A quantitative analysis of serum sulfatide by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry with delayed ion extraction. *Analytical Biochemistry*, **1999**, *274*, 90-97.

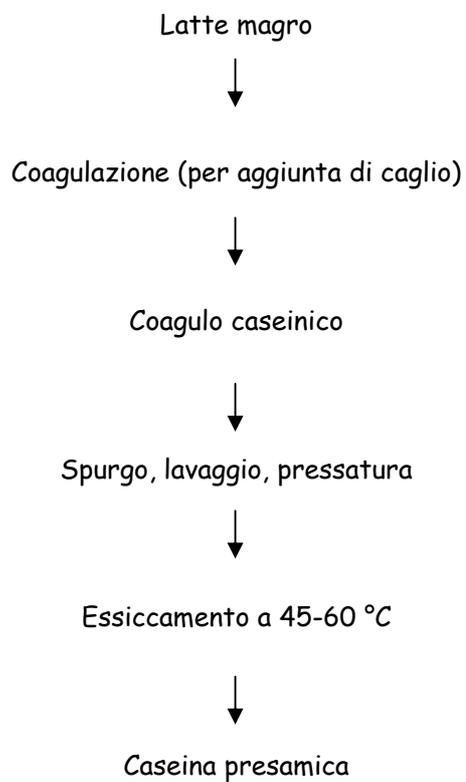
- Van Boekel, M. A. J. S. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*. **1998**, 62, 4, 403-414.
- Vasbinder, A. J. Casein - whey protein interactions in heated milk. **2002**. University of Utrecht, Holland. ISBN 90-393-3194-4.
- Wa, C., Cerny, R. L., Hage, D. S. Identification and quantitative studies of protein immobilization sites by stable isotope labelling and mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7967-7977.
- Walstra, P., Jenness, R., **1984**. Dairy Chemistry and Physics, John Wiley and sons, Inc, USA.
- Wang, J., Sporns, P., Low, N. H. Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: quantification of fructooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1549-1557.

APPENDICE

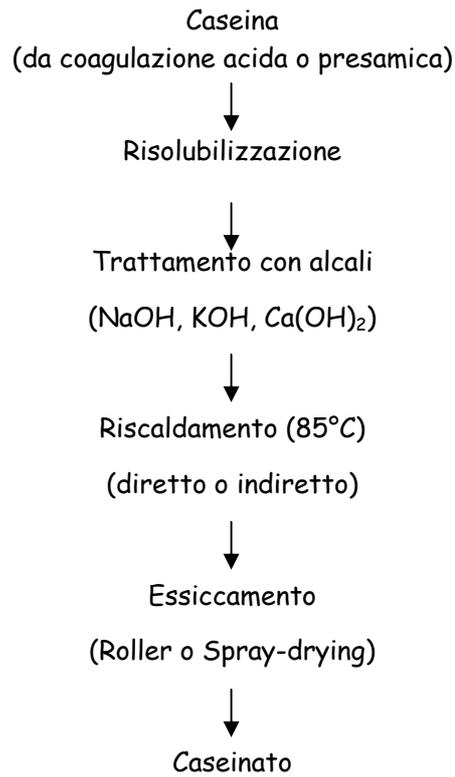
SCHEMI, TABELLE E FIGURE



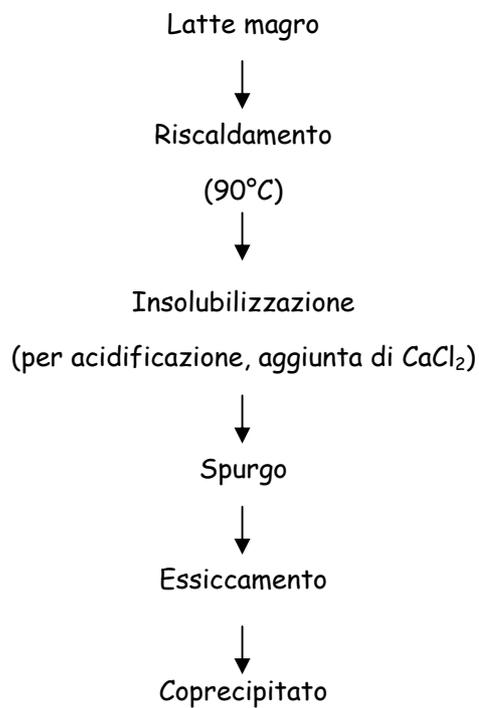
Schema 1: Produzione della caseina acida



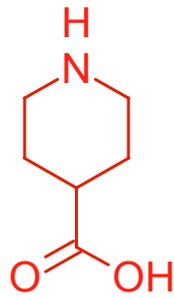
Schema 2: Produzione della caseina presamica



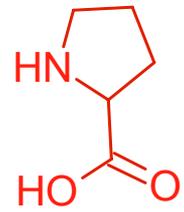
Schema 3: Produzione di caseinati



Schema 4: Produzione dei coprecipitati



PM= 129,157 g/mol



PM= 115,13 g/mol

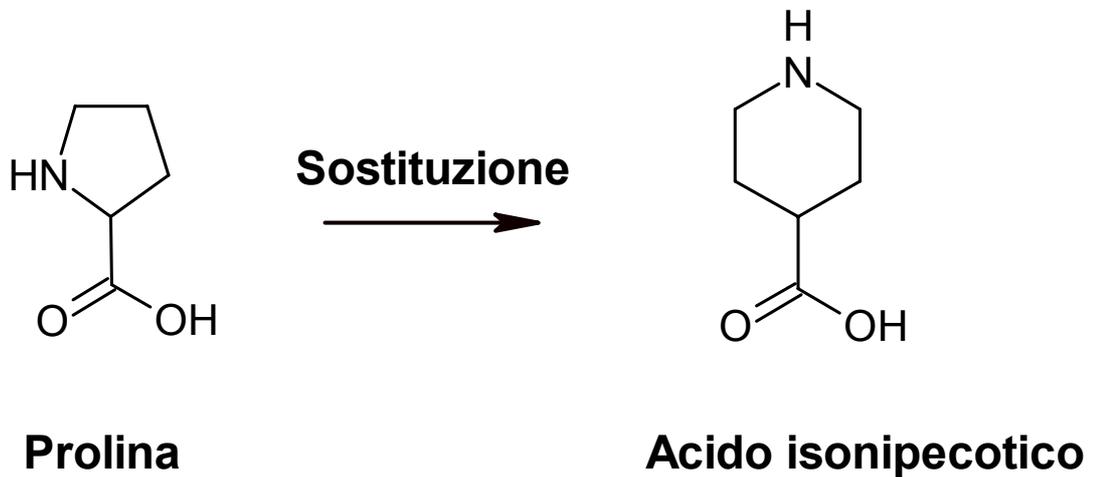


Figura 1. Sostituzione della Prolina con Acido Isonipecotico nel peptide sintetico β Lg (142-148). Le due strutture si differenziano sia per un CH_2 ($\Delta m = 14$ Da), per cui in un caso abbiamo un anello a 6 termini e nell'altro un anello a 5, sia per la posizione dell'azoto nell'anello.

Misure MALDI-TOF delle intensità dello standard (837.6 m/z) e dello standard interno (851.6 m/z) per la costruzione della retta di taratura

Tabella delle intensità relative, delle concentrazioni e delle deviazioni standard

Diluizioni standard interno	Diluizioni dello standard		Intensità relativa	Media	σ	Concentrazione
1:100	1:100	1°misura	17,97			
"	"	2°misura	15,20	16,86	1,463	4,5x10e-4 mg/ml
"	"	3°misura	17,40			
"	1:200	1°misura	5,94			
"	"	2°misura	6,54	7,2	1,69	2,25x10e-4 mg/ml
"	"	3°misura	9,12			
"	1:500	1°misura	4,04			
"	"	2°misura	4,73	4,57	0,475	0,9x10e-4 mg/ml
"	"	3°misura	4,95			

LEGENDA

Concentrazione stand int = 1 mg/ml

Concentrazione stnd = 1 mg/ml

Int rel = 100 x (Int st/Int st int)

Media = $\Sigma Xi/N$

$\sigma = \sqrt{\Sigma(Xm-Xi)/N-1}$

Tabella 1. Valori delle misure delle intensità dei picchi da spettri MALDI fatte sullo standard a diverse diluizioni e standard interno diluito cento volte e relative concentrazioni in mg/ml per la costruzione della retta di taratura

Costruzione della retta di taratura

⟨Intensità relativa⟩ ± σ	Concentrazione dello standard (mg ml ⁻¹)
16,86 ± 1,46	4,55 × 10 ⁻⁴
7,20 ± 1,69	2,27 × 10 ⁻⁴
4,57 ± 0,47	0,91 × 10 ⁻⁴

- Le intensità relative sono la media ottenuta da misure in triplo.
- Equazione della retta: $Y = 36503 \cdot X$ con intercetta passante per zero. Coefficiente di correlazione: $R^2 = 0,9684$.

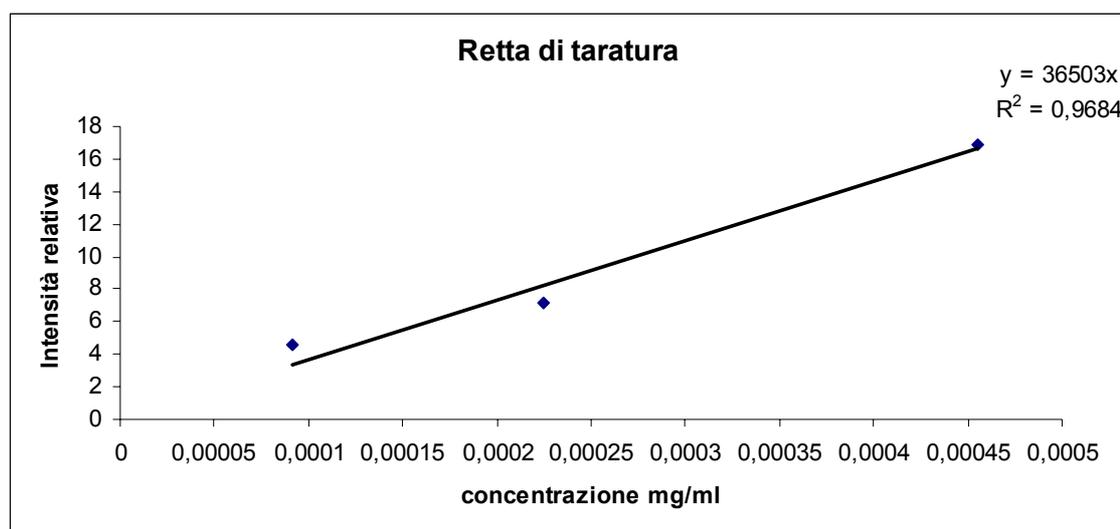


Figura 2. Costruzione della retta di taratura: i valori misurati delle intensità relative dei segnali del peptide standard (837,6 m/z) sono stati messi in grafico in funzione delle concentrazioni mediante una relazione lineare, di cui è stata calcolata l'equazione ed il coefficiente di correlazione.

Misure MALDI-TOF delle intensità relative ed assolute dei segnali del marcatore (837,6 m/z) e dello standard interno (851,6 m/z) nei campioni di latte UHT

Latte	Precipitato	Intensità standard interno β Lg(142-148)*	Intensità marcatore β Lg(142-148)	Intensità relativa del marcatore
Granarolo	Insolubile in citrato	3797,3	1712,8	45,11
	Solubile in citrato	$9,5 * 10^3$	2230,2	23,46
Berna	Insolubile in citrato	$2,3 * 10^4$	1026,7	4,46
	Solubile in citrato	1996,7	524,0	26,25
Matese	Insolubile in citrato	459,3	801,3	100
	Solubile in citrato	2042,6	1842,0	90,18
DiPerDi	Insolubile in citrato	$1,3 * 10^4$	619,3	4,78
	Solubile in citrato	$1,5 * 10^4$	246	1,76

Tabella 2

- $I_{rel} = (I_{std} / I_{std. int.}) \times 100$
- Si sostituiscono nella equazione della retta di taratura i valori delle intensità relative per ottenere le concentrazioni

Risultati analisi quantitativa:

Latte	Marcatore nell'insolubile in citrato ($mg\ ml^{-1}$)	Marcatore nel solubile in citrato ($mg\ ml^{-1}$)
Granarolo	$0,124 \times 10^{-4}$	$6,43 \times 10^{-4}$
Berna	$1,22 \times 10^{-4}$	$7,19 \times 10^{-4}$
Matese	$0,274 \times 10^{-4}$	$0,247 \times 10^{-4}$
DiPerDi	$1,31 \times 10^{-4}$	$48,2 \times 10^{-4}$

Tabella 3

Tabelle 2 e 3. Misure delle intensità dei picchi degli spettri MALDI TOF e calcoli sulle concentrazioni mediante retta di taratura per i latti UHT.

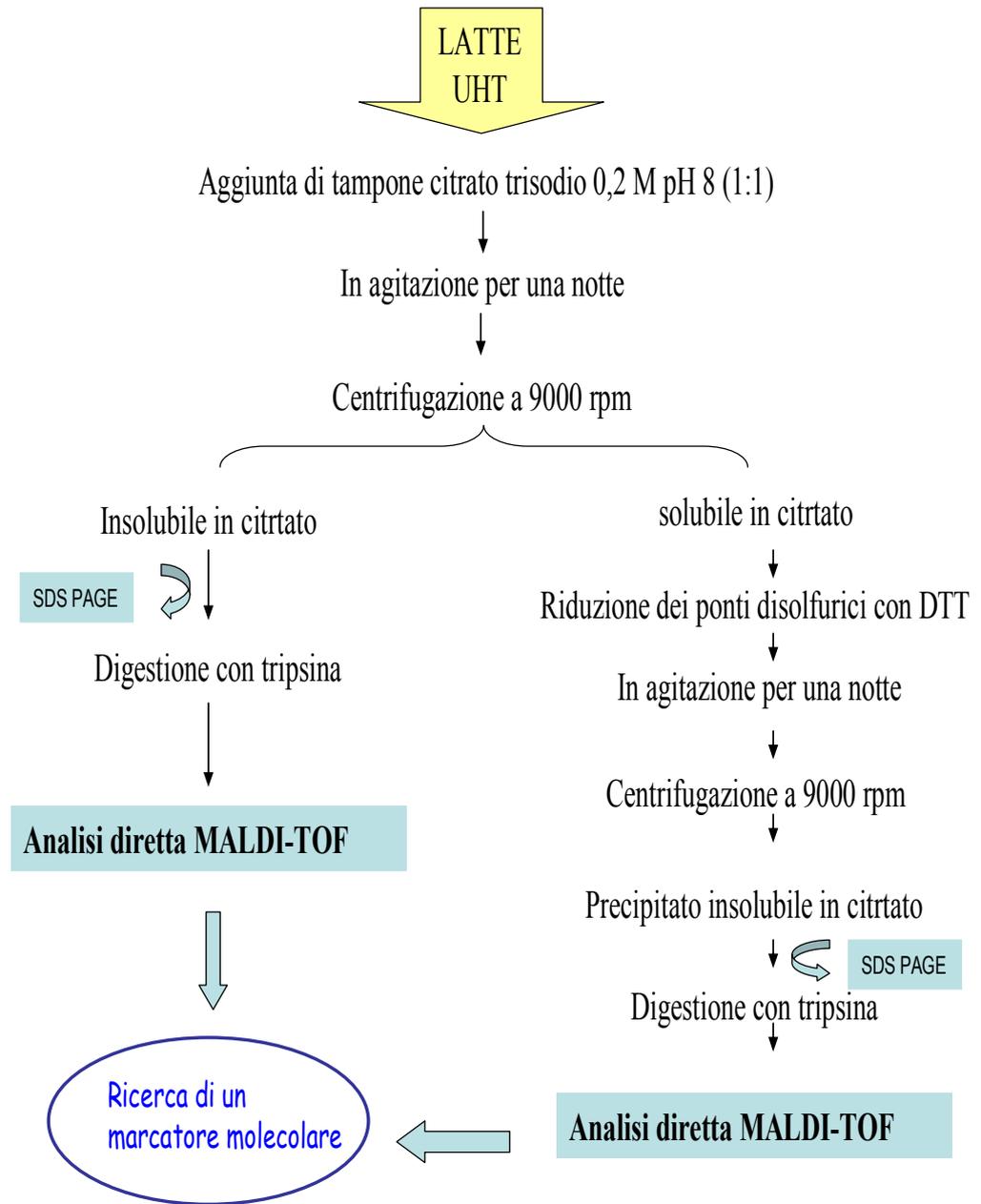
Analisi quantitativa, in termini di β Lg (g/l), di sieroproteine denaturate e legate alle micelle caseiniche

Latte	β Lg denaturata	β Lg legata alle micelle caseiniche
Granarolo	0,027	0,014
Berna	0,0027	0,016
Matese	0,060	0,054
DiPerDi	0,0029	0,0011

Tabella 4.

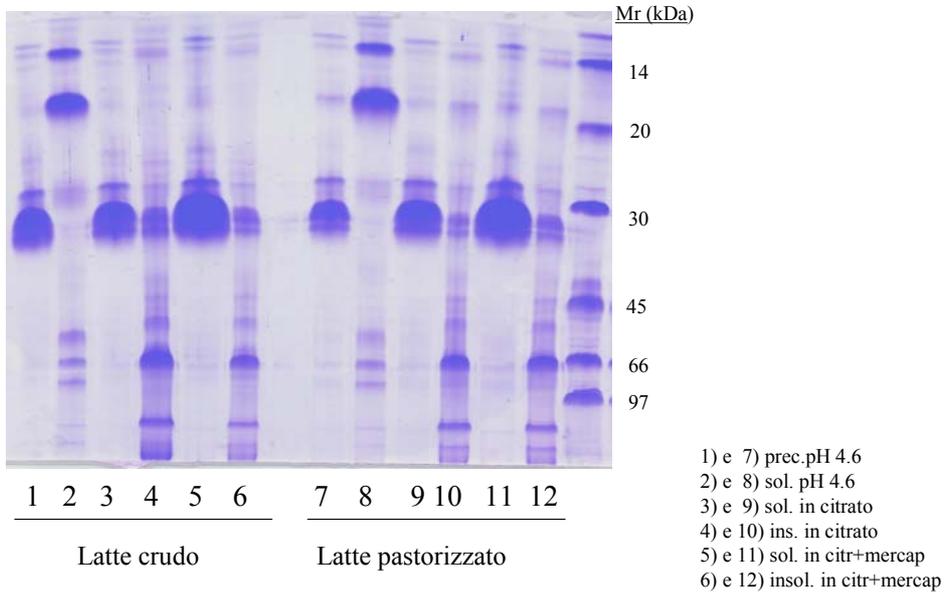
Tabella 4. Calcoli per la concentrazione della β Lg denaturata e legata alle micelle caseiniche.

STRATEGIA ANALITICA

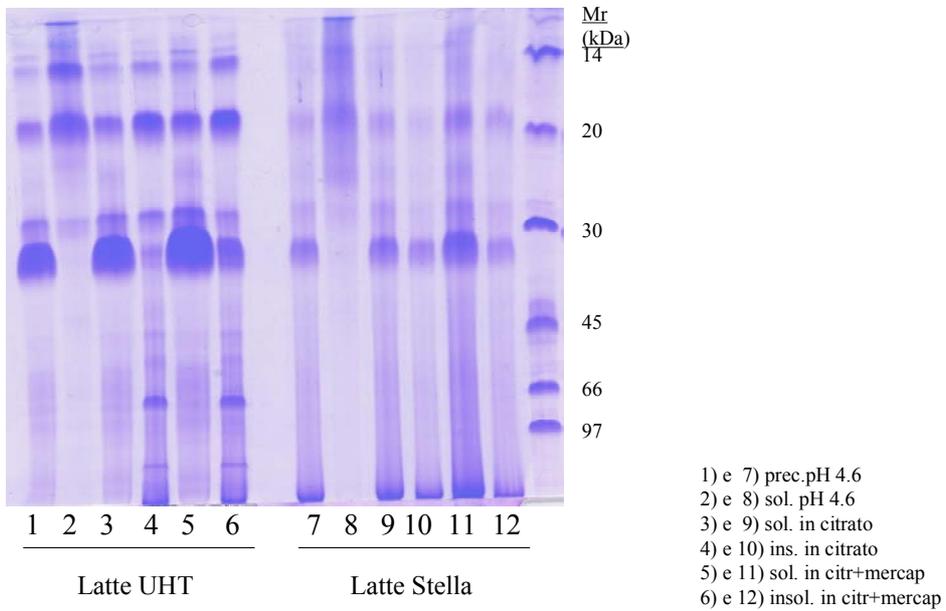


Schema 5: strategia analitica

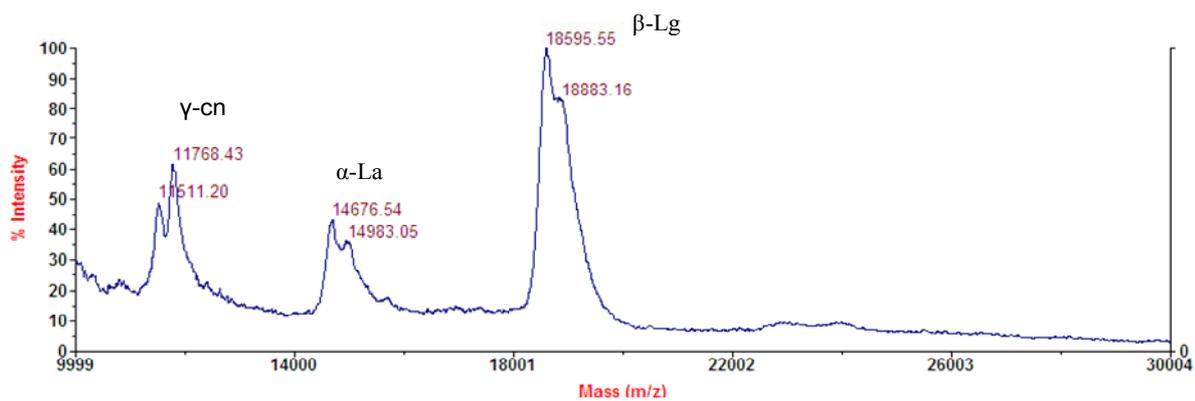
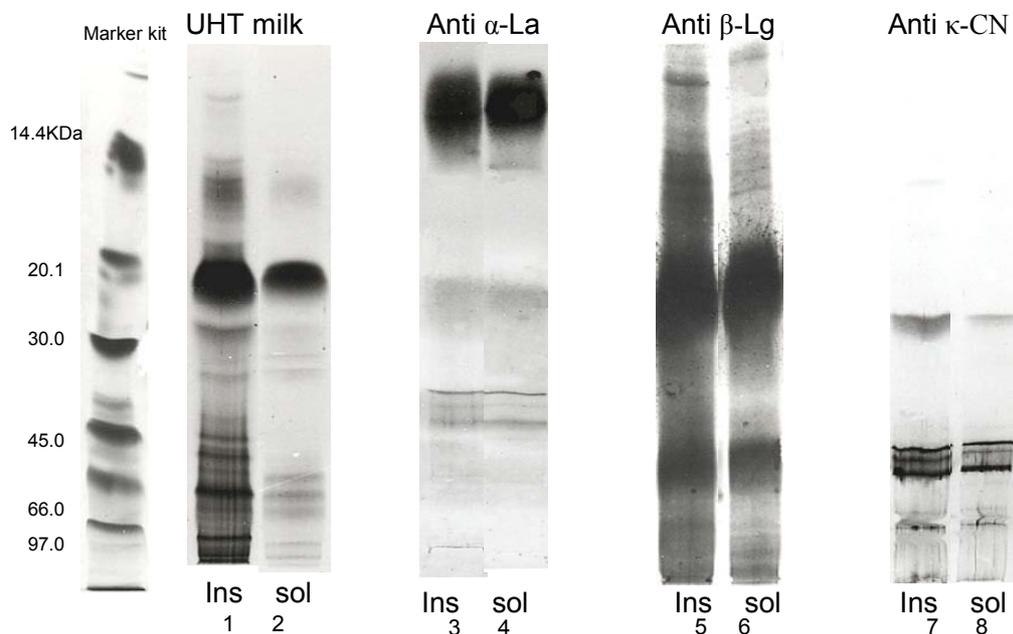
Piastra A: profili SDS-PAGE degli estratti di insolubile e solubile in citrato dal latte crudo e pastorizzato



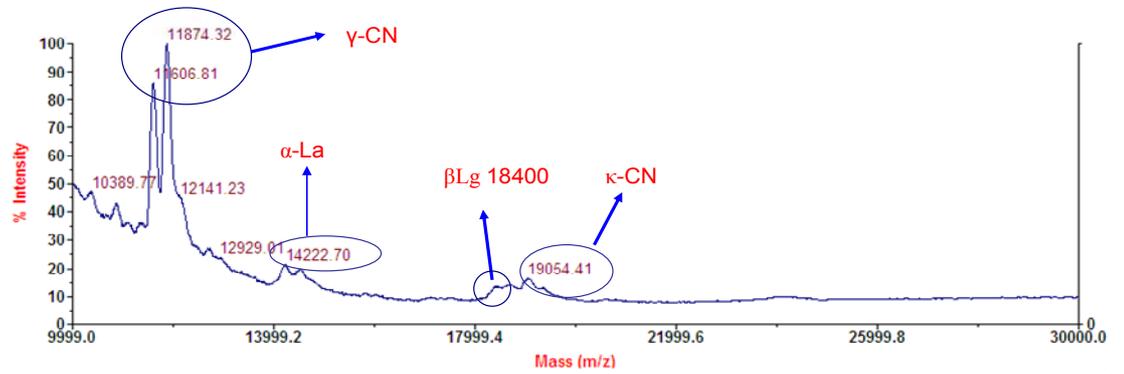
Piastra B: profili SDS-PAGE degli estratti di insolubile e solubile in citrato dal latte UHT e sterilizzato



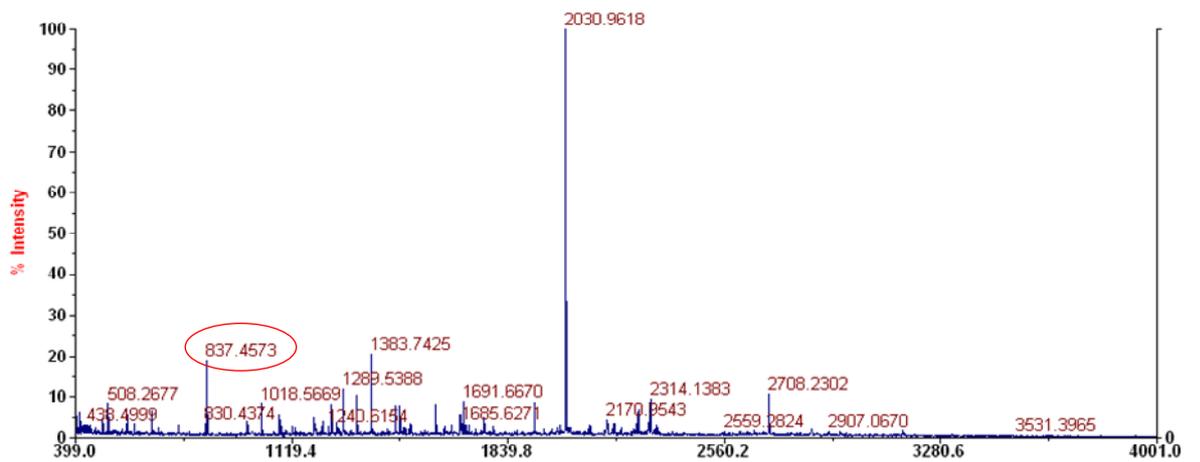
Piastra C: Immunoblotting anti β -Lg ,anti α -La ed anti κ -CN da latte UHT



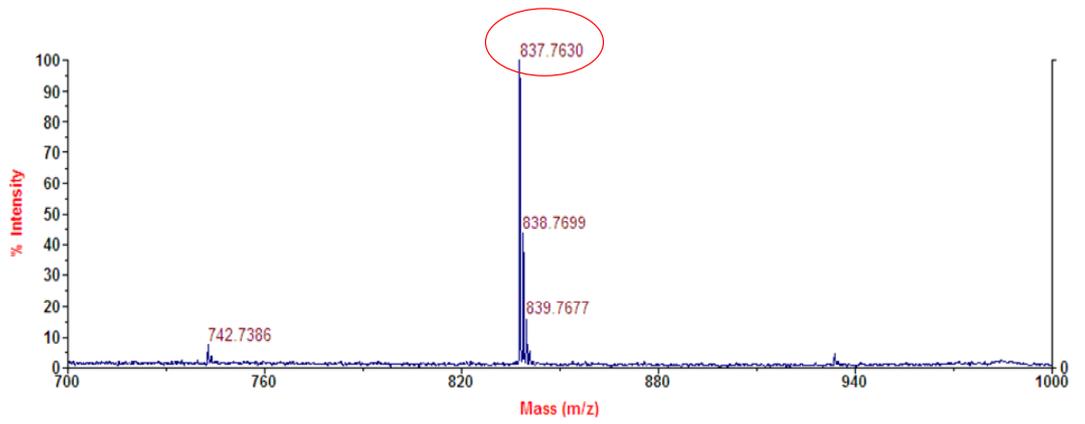
Spettro 1: frazione non idrolizzata con tripsinina dell'insolubile in citrato da latte DiPerDi UHT



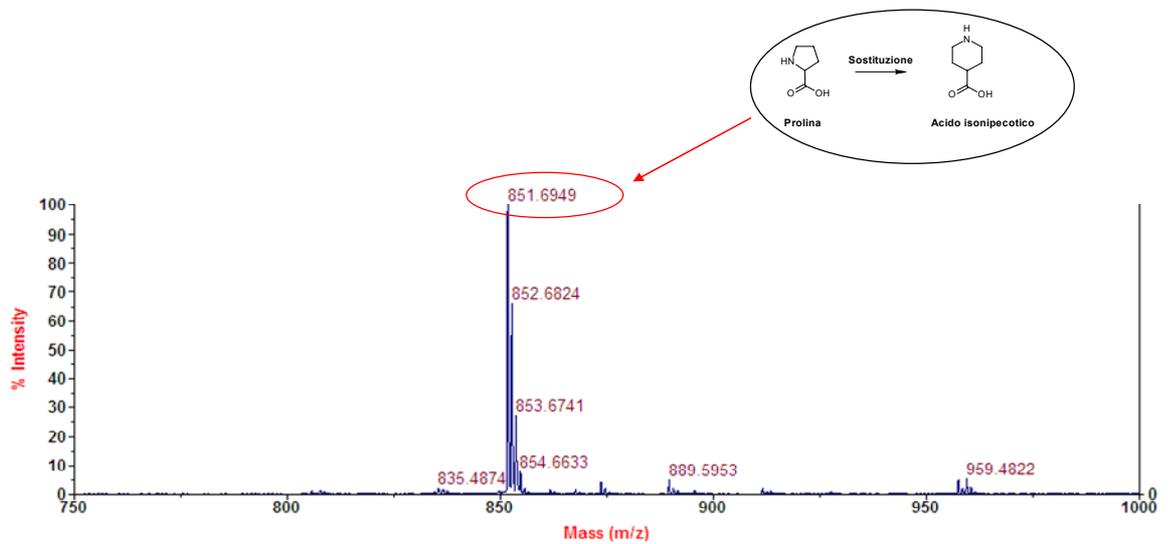
Spettro 2: frazione non idrolizzata con tripsina del solubile in citrato da latte DiPerDi UHT



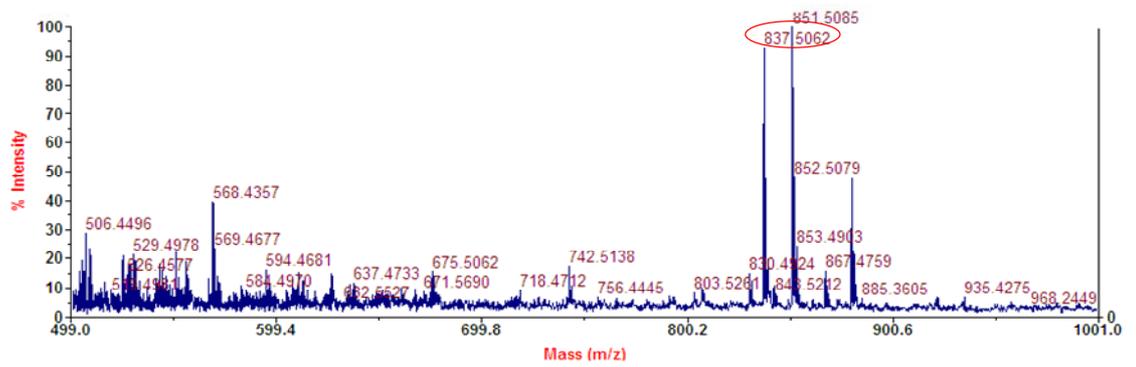
Spettro 3: idrolizzato triptico di un insolubile in citrato da latte UHT



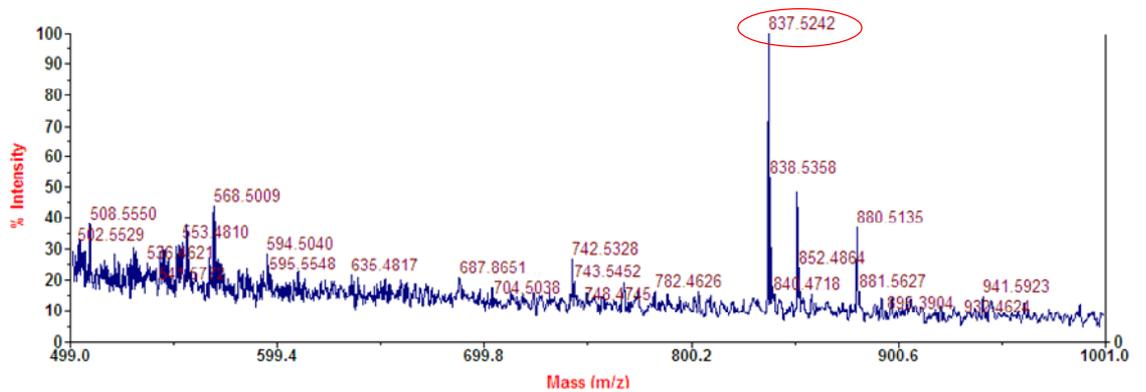
Spettro 4: Standard marcatore molecolare β -Lg (142-148)



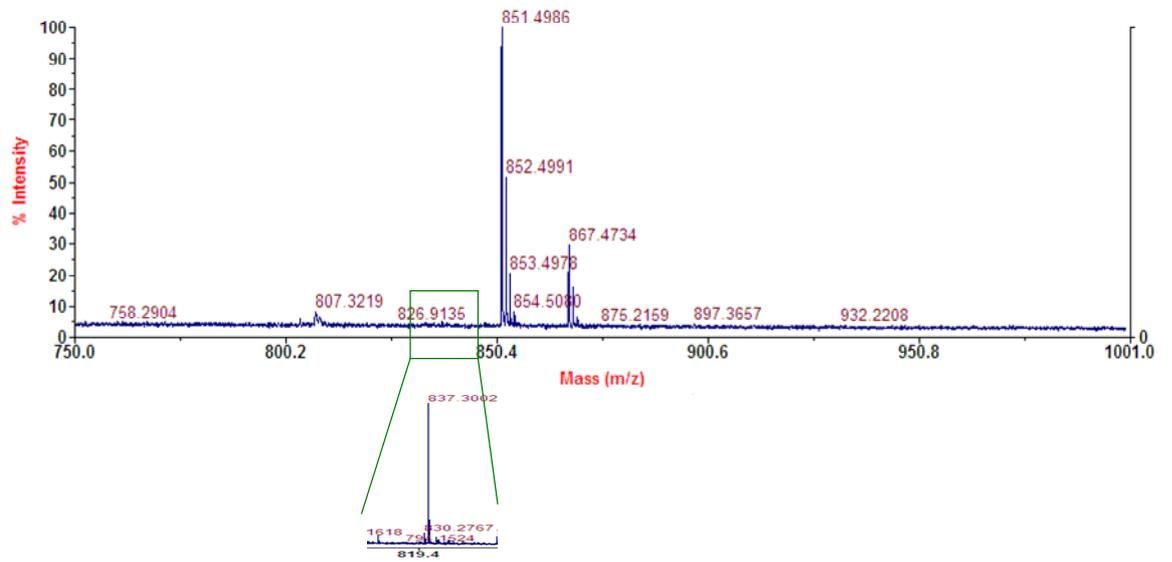
Spettro 5: standard interno β -Lg(142-148)*



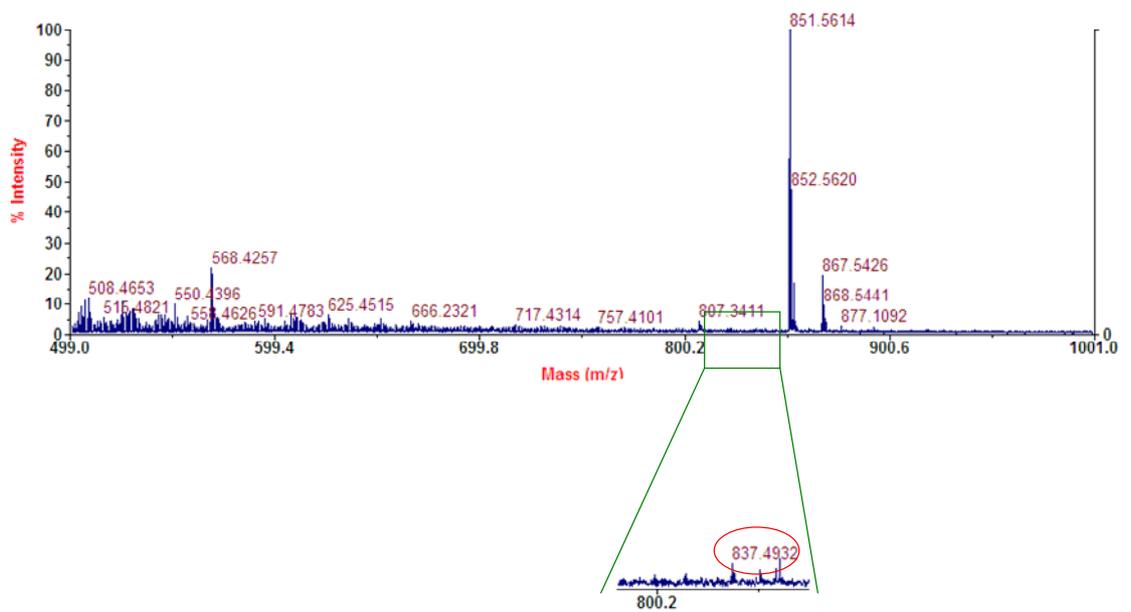
Spettro 6: Frazione solubile Latte Matese UHT idrolizzata con tripsina



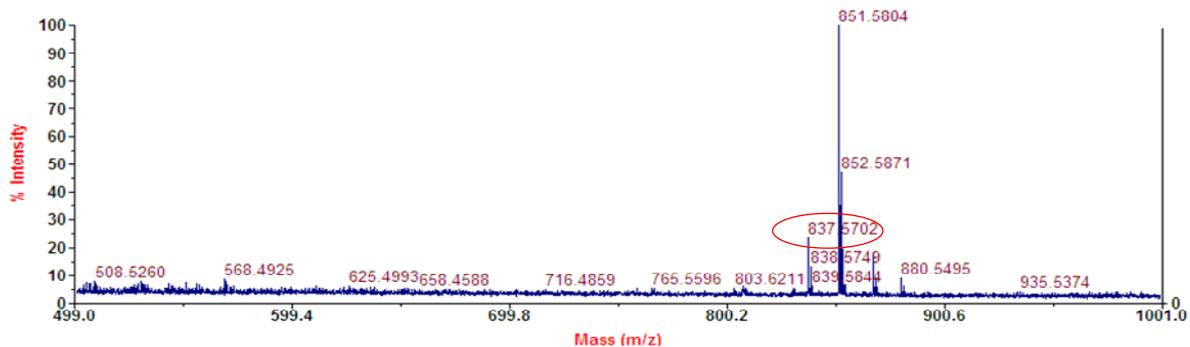
Spettro 7: Frazione insolubile Latte Matese UHT idrolizzata con tripsina



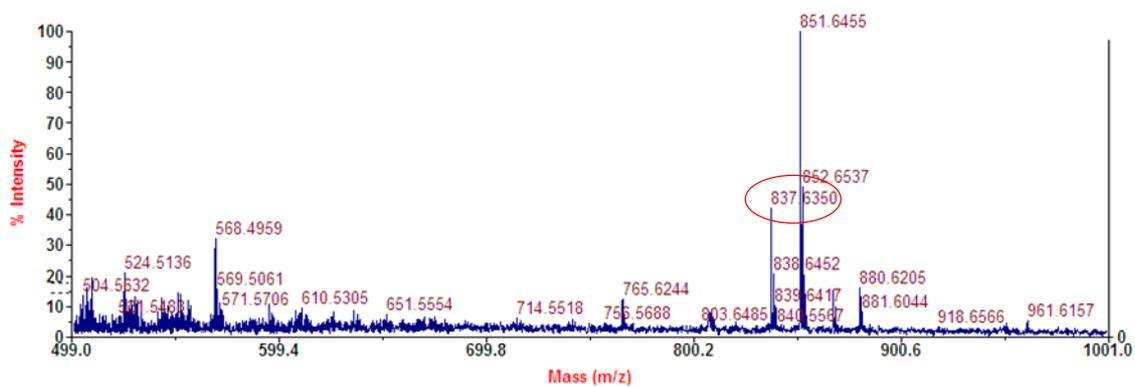
Spettro 9: Frazione insolubile latte DiPerDi UHT idrolizzata con tripsina



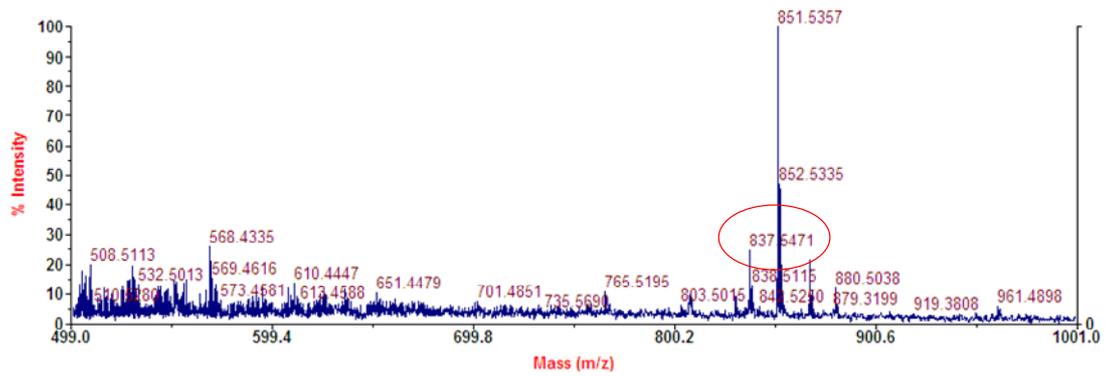
Spettro 8: Frazione solubile latte DiPerDi UHT idrolizzata con tripsina



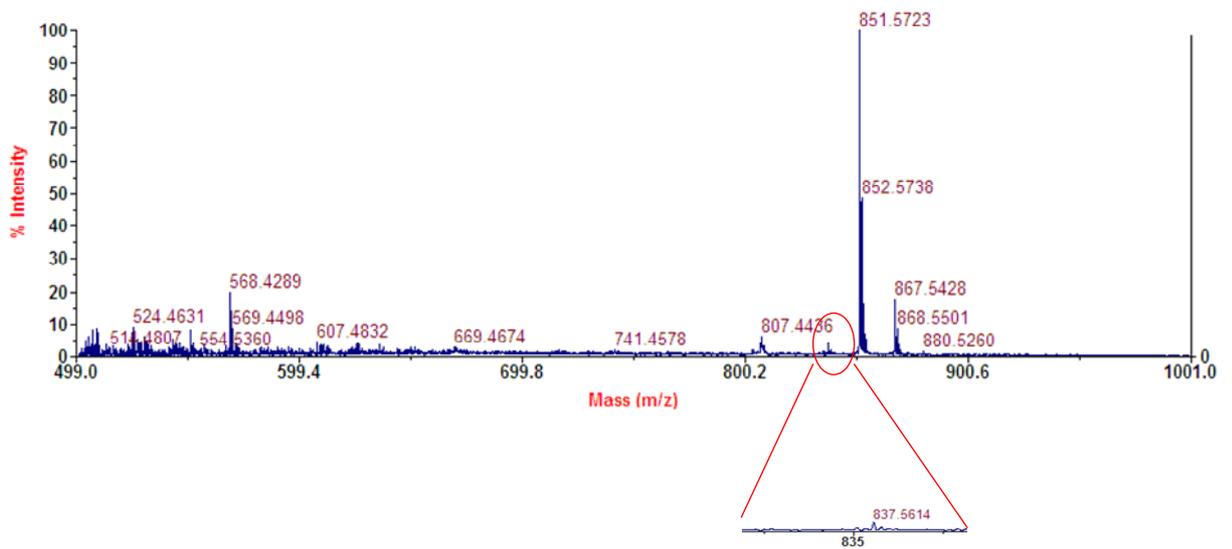
Spettro 10: Frazione solubile latte GRANAROLO UHT idrolizzata con tripsina



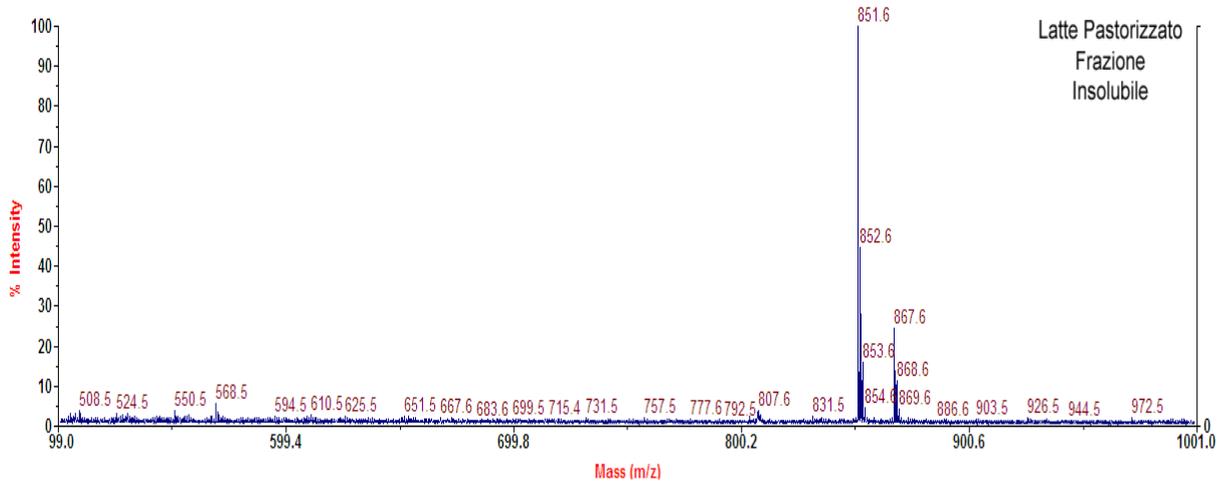
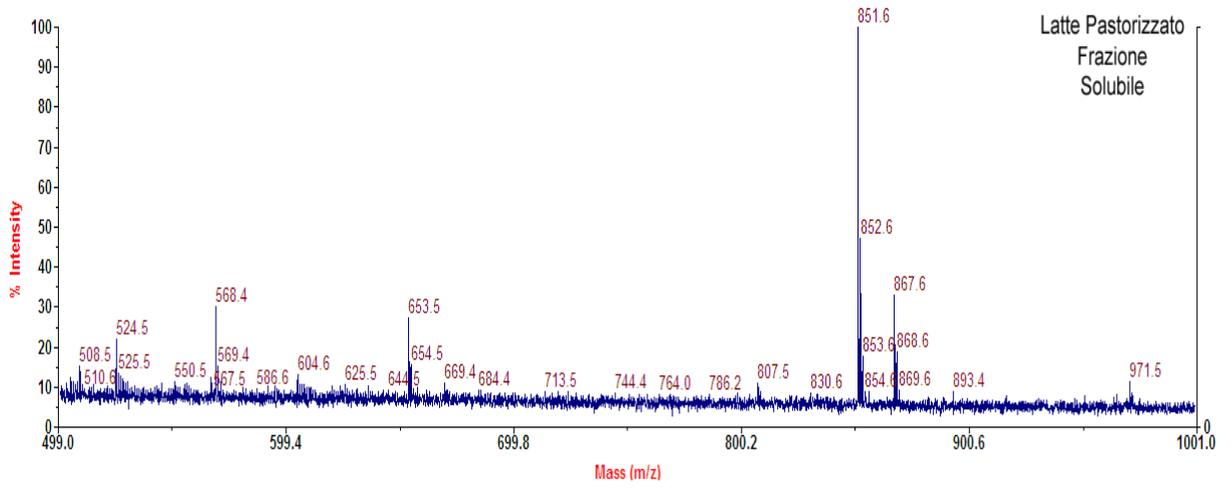
Spettro 11: Frazione insolubile latte GRANAROLO UHT idrolizzata con tripsina



Spettro 12: Frazione solubile latte BERNA UHT idrolizzata con tripsina

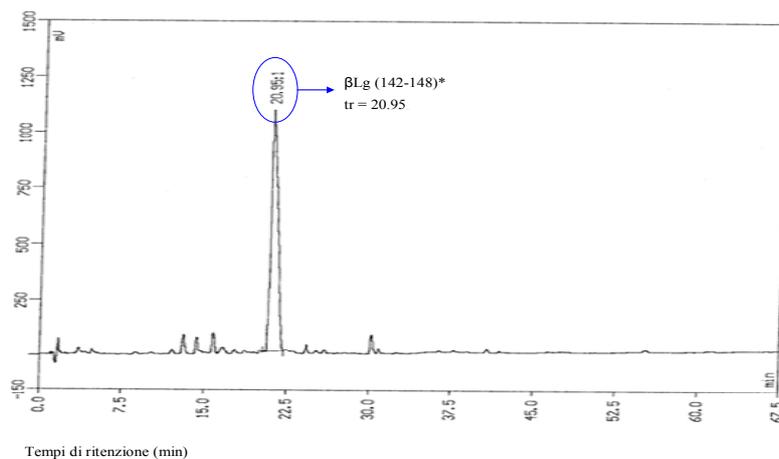


Spettro 13: Frazione insolubile latte BERNA UHT idrolizzata con tripsina

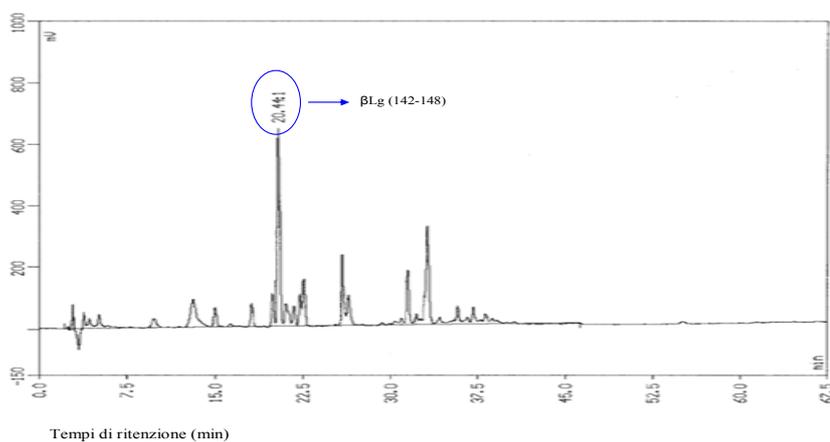


Spettro 14: Frazione solubile ed insolubile in citrato da latte pastorizzato

Profilo HPLC del peptide sintetico β Lg (142-148)*



Profilo HPLC di un idrolizzato triptico della β -Lg



Profili HPLC di una miscela di β Lg (142-148)* e β Lg (142-148) (1:1)

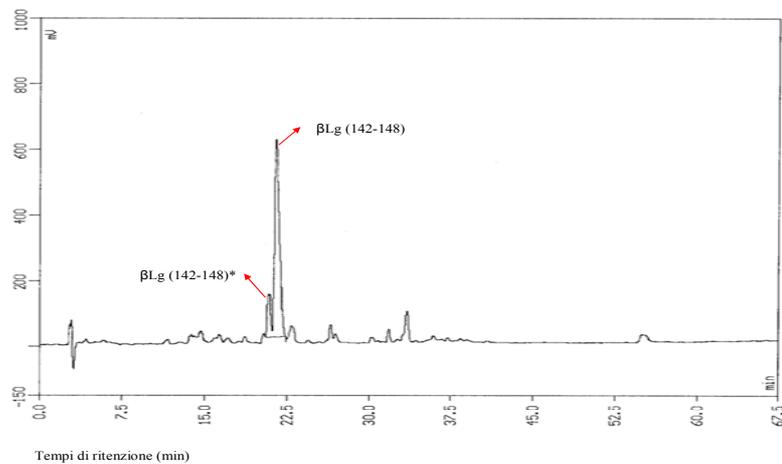
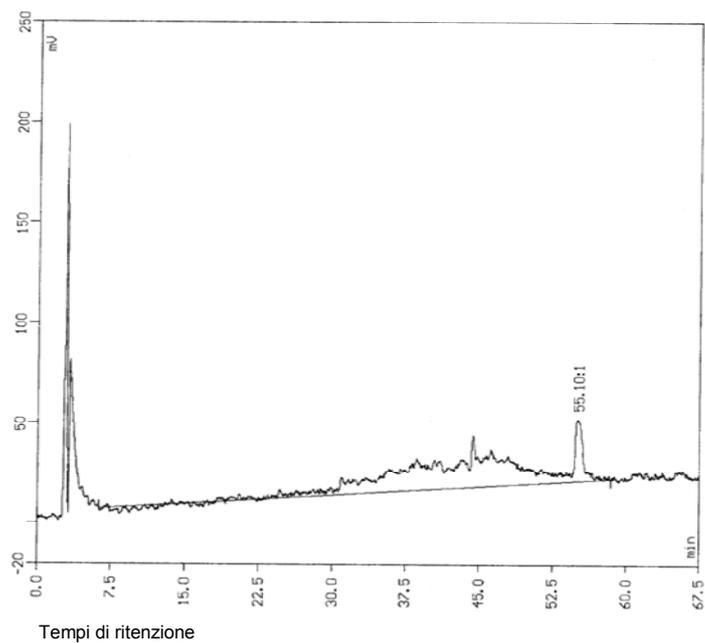


Figura 3: Profili RP-HPLC del peptide sintetico, dell'idrolizzato triptico di β Lg, e di una loro miscela

Profilo RP-HPLC di un insolubile in citrato da latte UHT



Profilo RP-HPLC di un solubile in citrato da latte UHT

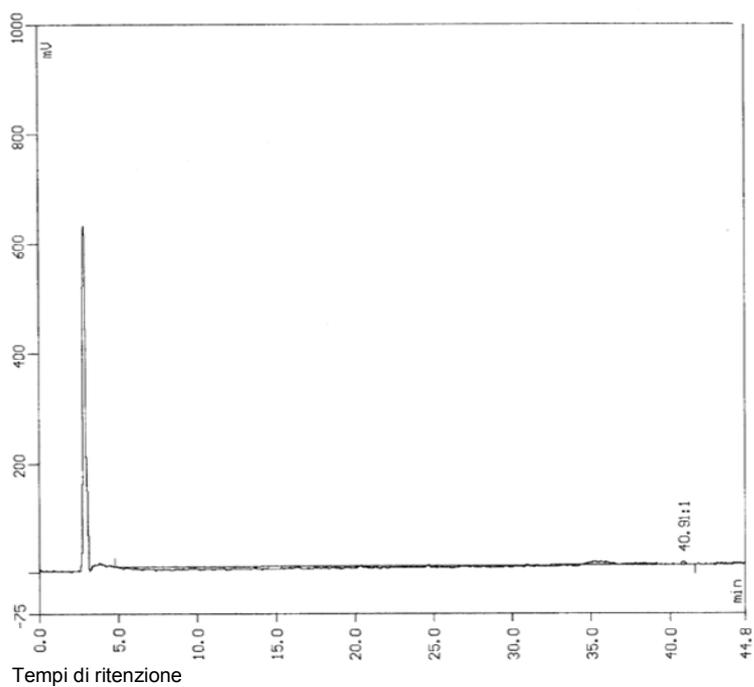


Figura 4: Profili RP-HPLC di un insolubile ed un solubile in citrato da latte UHT

Controllo SDS-PAGE sulle polveri di latte

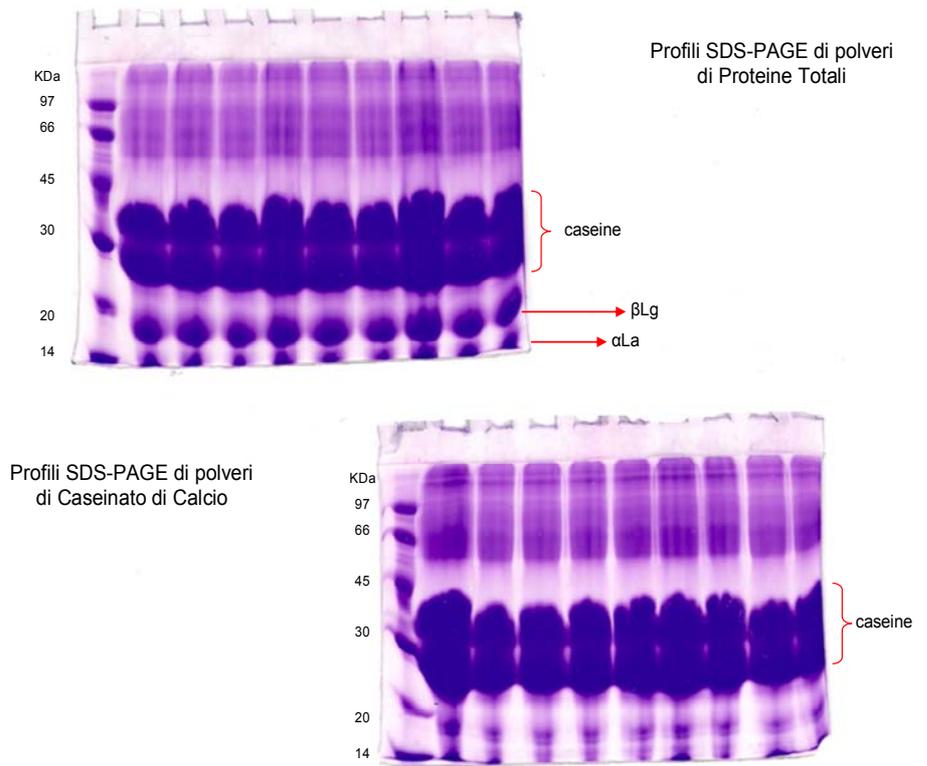


Figura 5: Profili SDS-PAGE delle polveri di proteine totali e di caseinato di calcio

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano:

- Il prof. Francesco Addeo per la disponibilità in qualità di *tutor* per questo lavoro di tesi.
- I proff. Lina Chianese e Salvatore Spagna Musso per i preziosi consigli didattici e sperimentali.
- L'intero *staff* dei laboratori CHIANESE-ADDEO per il supporto sperimentale e didattico ed in particolare i dottori: M. Adalgisa Nicolai (tecniche elettroforetiche), Rosalba Mauriello, Giuseppina Garro, Simonetta Caira, Sergio Lilla (spettrometria di massa), Maria Quarto, Maria Grazia Calabrese, Sabrina De Pascale.
- Le Dott.sse Letizia Petrucci e Frewoni Tesfai Debesay per i consigli sperimentali.
- La Dott.ssa Olga Fierro dell'ISA (CNR Avellino) per la disponibilità scientifica ed il supporto dato nella sintesi del peptide β Lg (142-148)*.
- I Dottori G. Mamone e G. Picariello dell'ISA (CNR di Avellino) per il supporto nelle tecniche immunochimiche e di spettrometria di massa.