

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**“FEDERICO II”**

**FACOLTA' DI FARMACIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO**

**XVIII CICLO**

**DETERMINAZIONE DI PEPTIDI NEGLI  
ALIMENTI MEDIANTE HPLC-ESI-MS:  
CORRELAZIONE CON I TRATTAMENTI  
TECNOLOGICI E ATTIVITA' BIOLOGICA**

**Tutor:**

**Prof. ETTORE NOVELLINO**

**Prof.ssa ROSANGELA MARCHELLI**

**Dottorando:**

**Dott. GIANCARLO AQUINO**

**Coordinatore:**

**Prof. ENRICO ABIGNENTE**

*Ai miei genitori*

<b>INTRODUZIONE GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>1. I peptidi negli alimenti .....</b>	<b>2</b>
1.1 Proprietà dei peptidi .....	2
1.1.1 Proprietà chimico-fisiche .....	2
1.1.2 Proprietà sensoriali .....	3
1.1.3 Proprietà funzionali .....	4
1.1.4 Proprietà fisiologiche e nutrizionali .....	5
1.2 Preparazione del campione e cleanup dei peptidi negli alimenti .....	6
1.2.1 Estrazione dei peptidi .....	6
1.2.2 Frazionamento dei peptidi mediante ultrafiltrazione.....	7
1.2.3 Isolamento e frazionamento dei peptidi usando la cromatografia liquida a bassa pressione.....	7
1.2.4 Isolamento e frazionamento dei peptidi mediante estrazione in fase solida (SPE)	9
1.3 Separazione analitica dei peptidi.....	9
1.3.1 Separazione dei peptidi mediante HPLC.....	10
1.3.1.1 HPLC a fase inversa (RP-HPLC).....	10
1.3.1.2 HPLC a scambio ionico (IE-HPLC).....	12
1.3.1.3 HPLC ad esclusione molecolare (SE-HPLC).....	13
1.3.1.4 Applicazioni dell'HPLC all'analisi dei peptidi negli alimenti.....	14
1.3.2 Separazione dei peptidi mediante tecniche elettroforetiche.....	14
1.3.2.1 Elettroforesi su gel.....	14
1.3.2.2 Elettroforesi capillare .....	15
1.4 Metodi di rivelazione dei peptidi.....	17
1.4.1 Metodi di rivelazione dei peptidi mediante UV-VIS .....	17
1.4.2 Metodi di rivelazione dei peptidi mediante fluorescenza.....	18
1.4.3 Metodi di rivelazione dei peptidi mediante spettrometria di massa.....	19
<b>2. Attività biologica di peptidi derivati dalle caseine .....</b>	<b>22</b>
2.1 Effetti sul sistema cardiovascolare .....	22
2.1.1 Attività ACE-inibitrice .....	22
2.1.2 Attività antitrombotica .....	23
2.2 Attività oppioide.....	23
2.3 Effetti sul sistema immunitario .....	25
2.3.1 Attività immunomodulante.....	26

2.3.2	Attività oppioide e sistema immunitario .....	26
2.3.3	Attività antimicrobica .....	27
2.4	Effetti sulla nutrizione .....	28
2.4.1	Trasporto degli oligoelementi .....	28
2.4.2	Glicomacropeptide .....	29
<b>3.</b>	<b>Fenomeni proteolitici nei prodotti lattiero-caseari e composizione della frazione peptidica .....</b>	<b>30</b>
3.1	La proteolisi.....	30
3.2	Enzimi responsabili della proteolisi .....	32
3.2.1	Proteasi del caglio .....	33
3.2.2	Proteasi endogene del latte .....	34
3.2.3	Proteasi e peptidasi dei batteri lattici starter e non starter (LAB-NSLAB).....	35
3.2.4	Proteasi e peptidasi di starter secondari .....	37
3.2.5	Sostituti del caglio .....	38
3.3	Confronto tra il profilo di proteolisi di diverse varietà di formaggio .....	39
<b>4.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>41</b>
	<b>SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>Scopo della tesi.....</b>	<b>48</b>
	<b>A: METODI LC/MS APPLICATI ALLO STUDIO DELLA PROTEOLISI NEI FORMAGGI .....</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>Correlazione del profilo peptidico con la tecnologia di produzione in formaggi modello tipo “pecorino” .....</b>	<b>50</b>
6.1	Tecnologia produttiva del pecorino.....	50
6.2	Metodi di sanitizzazione del latte preposto a caseificazione.....	52
6.2.1	Pastorizzazione .....	53
6.2.2	Omogeneizzazione ad alte pressioni .....	55
6.3	RISULTATI E DISCUSSIONE .....	59
6.3.1	Preparazione dei formaggi modello tipo “pecorino” .....	59
6.3.2	Estrazione ed analisi della frazione oligopeptidica in HPLC-ESI-MS .....	61
6.3.2.1	Preparazione dell’estratto .....	61
6.3.2.2	Analisi dei peptidi mediante HPLC-ESI-MS .....	61
6.3.2.3	Identificazione delle sequenze oligopeptidiche.....	64
6.3.2.4	Semiquantificazione dei peptidi .....	68

6.3.3	Risultati della semiquantificazione dei peptidi .....	70
6.3.4	Analisi statistica dei risultati della semiquantificazione dei peptidi .....	72
6.3.4.1	Analisi delle componenti principali (PCA) .....	72
6.3.4.2	Analisi della varianza ad una via (ANOVA).....	82
6.4	PARTE SPERIMENTALE .....	83
6.4.1	Reagenti.....	83
6.4.2	Strumentazione.....	83
6.4.3	Campionamento.....	84
6.4.4	Estrazione della frazione peptidica.....	84
6.4.5	Frazionamento mediante tagli molecolari .....	85
6.4.6	Analisi HPLC-ESI-MS dei peptidi.....	88
6.4.7	Semiquantificazione dei peptidi .....	89
6.5	CONCLUSIONI.....	91
6.6	BIBLIOGRAFIA.....	92
<b>7.</b>	<b>Studio dei processi degradativi a carico della sequenza <math>\alpha_{S1}</math>-CN(f1-23), originata dalla chimosina, in formaggi modello tipo “caciotta” a diversa tecnologia produttiva e diversa stagionatura.....</b>	<b>93</b>
7.1	Tecnologia produttiva della caciotta .....	93
7.2	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	95
7.2.1	Preparazione dei formaggi modello tipo caciotta.....	95
7.2.2	Estrazione ed analisi della frazione oligopeptidica in HPLC-MS.....	96
7.2.3	Analisi statistica dei risultati della semiquantificazione dei peptidi .....	99
7.2.3.1	Analisi delle componenti principali (PCA) .....	99
7.2.3.2	Analisi della varianza ad una via (ANOVA).....	108
7.3	PARTE SPERIMENTALE .....	109
7.4	CONCLUSIONI.....	116
7.5	BIBLIOGRAFIA.....	116
<b>8.</b>	<b>Peptidi come marker di origine del latte destinato alla caseificazione.....</b>	<b>118</b>
8.1	Metodi per la determinazione dell'autenticità dei prodotti lattiero-caseari .....	118
8.2	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	119
8.2.1	Preparazione dei formaggi modello da latte ovino e da latte misto .....	119
8.2.2	Peptidi come marker di origine del latte .....	120
8.3	PARTE SPERIMENTALE .....	129

8.4	CONCLUSIONI.....	130
8.5	BIBLIOGRAFIA.....	130
<b>B: STUDIO DELLA BIOATTIVITA' DI PEPTIDI NEGLI ALIMENTI.....</b>		<b>131</b>
<b>9.</b>	<b>Valutazione dell'attività di ACE-inibizione di peptidi naturalmente presenti nei formaggi .....</b>	<b>132</b>
9.1	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	132
9.1.1	Controllo della validità del test spettrofotometrico per la determinazione dell'attività ACE-inibitrice.....	132
9.1.2	Valutazione dell'attività ACE-inibitrice .....	136
9.1.2.1	$\gamma$ -glutamyl dipeptidi .....	136
9.1.2.2	Peptide $\beta$ -CN (f193-209) vaccino .....	139
9.1.2.3	Frazioni oligopeptiche di Parmigiano Reggiano .....	141
9.2	PARTE SPERIMENTALE .....	146
9.2.1	Reagenti.....	146
9.2.2	Strumentazione.....	147
9.2.3	Sintesi dei $\gamma$ -glutamyl dipeptidi.....	147
9.2.4	Sintesi del peptide $\beta$ -CS (f193-209) vaccino .....	148
9.2.5	Preparazione dell'estratto di Parmigiano Reggiano .....	149
9.2.6	Frazionamento dell'estratto di Parmigiano .....	150
9.2.7	Valutazione dell'attività di ACE-inibizione mediante test spettrofotometrico ..	151
9.3	CONCLUSIONI.....	151
9.4	BIBLIOGRAFIA.....	152
<b>10.</b>	<b>Valutazione dell'attività immunomodulante di peptidi naturalmente presenti nei formaggi .....</b>	<b>154</b>
10.1	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	154
10.1.1	Determinazione dell'attività immunomodulante in micropiastra.....	154
10.1.2	Valutazione dell'attività immunomodulante .....	156
10.1.2.1	Estratto oligopeptidico di Parmigiano Reggiano.....	156
10.1.2.2	Frazionamento dell'estratto di Parmigiano Reggiano .....	158
10.1.2.3	$\gamma$ -glutamyl dipeptidi .....	161
10.1.3	Attività immunomodulante mediata da recettori oppioidi .....	163
10.2	PARTE SPERIMENTALE .....	165
10.2.1	Reagenti.....	165

10.2.2	Strumentazione .....	166
10.2.3	Sintesi dei $\gamma$ -glutamildipeptidi.....	167
10.2.4	Preparazione dell'estratto di Parmigiano Reggiano .....	167
10.2.5	Frazionamento dell'estratto di Parmigiano .....	167
10.2.6	Valutazione dell'attività immunomodulante in micropiastra.....	167
10.3	CONCLUSIONI.....	169
10.4	BIBLIOGRAFIA.....	169
<b>C: METODI LC/MS PER LA DETERMINAZIONE DELLA SEQUENZA DI UNA PROTEINA ALLERGENICA .....</b>		<b>170</b>
<b>11.</b>	<b>Utilizzo della digestione triptica congiunta ad analisi HPLC-ESI-MS nella delucidazione della sequenza di una proteina allergica: il caso della LTP di pesca (Pru p 3) .....</b>	<b>171</b>
11.1	Le LTP di origine vegetale: una nuova famiglia di allergeni alimentari.....	171
11.2	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	174
11.2.1	Determinazione del peso molecolare della LTP di pesca per infusione in massa.....	174
11.2.2	Digestione triptica della LTP nativa.....	176
11.2.3	Riduzione dei ponti disolfuro ed alchilazione delle cisteine libere post-digestione.....	181
11.2.4	Simulazione di digestione gastrointestinale della LTP .....	186
11.3	PARTE SPERIMENTALE .....	190
11.3.1	Reagenti.....	190
11.3.2	Strumentazione.....	191
11.3.3	Determinazione del peso molecolare della LTP di pesca per infusione in massa.....	191
11.3.4	Digestione triptica della LTP nativa.....	191
11.3.5	Riduzione dei ponti disolfuro ed alchilazione delle cisteine libere post-digestione.....	193
11.3.6	Simulazione di digestione gastrointestinale della LTP .....	193
11.4	CONCLUSIONI.....	194
11.5	BIBLIOGRAFIA.....	194
<b>CONCLUSIONI FINALI .....</b>		<b>197</b>
<b>12.</b>	<b>Conclusioni finali.....</b>	<b>198</b>

<b>13.</b>	<b>Ringraziamenti .....</b>	<b>203</b>
------------	-----------------------------	------------

# **INTRODUZIONE GENERALE**

# 1. I peptidi negli alimenti

I peptidi derivano principalmente dalla degradazione delle proteine, e sono naturalmente presenti negli alimenti, cui conferiscono proprietà funzionali, sensoriali e nutrizionali. Altri possono avere anche un'origine non proteica, come i dipeptidi anserina, carnosina e balenina nei muscoli dei vertebrati, o il glutatione nei frutti, o possono essere aggiunti agli alimenti come additivi (dolcificanti, esaltatori dell'aroma, etc.).

L'attenzione sempre crescente che l'industria alimentare mostra verso i peptidi che si formano in seguito all'idrolisi enzimatica delle proteine negli alimenti ha reso necessario lo sviluppo di opportune tecniche analitiche atte alla separazione, caratterizzazione e quantificazione di tali composti.

## 1.1 Proprietà dei peptidi

### 1.1.1 Proprietà chimico-fisiche

I peptidi rappresentano una classe di composti molto eterogenea, accomunati dall'essere costituiti da catene più o meno lunghe di ammino acidi, legati tra di loro mediante la formazione di legami ammidici (legame peptidico), per cui le caratteristiche di un dato peptide dipendono fortemente dalla composizione ammino acidica e dalla lunghezza della catena.

Il comportamento acido-base dei peptidi è determinato dal gruppo  $\alpha$ -amminico libero del residuo N-terminale (pKa leggermente inferiore a quello del corrispondente ammino acido libero), dal gruppo  $\alpha$ -carbossilico libero del residuo C-terminale (pKa leggermente superiore a quello del corrispondente ammino acido libero), e dai gruppi ionizzabili delle catene laterali dei residui in catena. La reattività dei gruppi amminici e carbossilici terminali in un peptide è sostanzialmente simile a quella degli ammino acidi liberi (acilazione, esterificazione, etc.), in particolare quella del gruppo amminico con alcuni reagenti, quali la ninidrina e l'*o*-ftaldialdeide, viene sfruttata a scopo di rivelazione e quantificazione.

In presenza di composti carbonilici quali gli zuccheri, per riscaldamento alcuni peptidi prendono parte alla reazione di Maillard, con formazione di una serie di pigmenti melanoidinici che contribuiscono allo sviluppo di sapori, aromi e colorazioni desiderate o indesiderate dei cibi<sup>1</sup>.

I peptidi, infine, giocano un ruolo molto importante nel determinare le proprietà reologiche degli alimenti, a seguito dell'idrolisi delle proteine durante la lavorazione degli alimenti stessi (fermentazione, stagionatura, cottura, etc.).

### **1.1.2 Proprietà sensoriali**

I peptidi sono generalmente senza sapore o amari, con l'eccezione di alcuni dipeptidi contenenti acido glutammico o acido aspartico che presentano un caratteristico sapore dolce; questi ultimi rivestono una grande importanza nell'industria alimentare, in quanto, a differenza del saccarosio, non causano carie dentale e non contribuiscono all'obesità ed a patologie quali il diabete mellito, per cui è sempre più frequente lo sviluppo di dolcificanti di natura peptidica da usare come additivi in alimenti ipocalorici. A questo proposito il dipeptide Aspartame (L-aspartil-L-fenilalanina metil estere) rappresenta una comune alternativa al saccarosio, sebbene presenti alcuni inconvenienti, quali bassa stabilità a temperature elevate ed a pH neutro, bassa solubilità, sensibilità all'idrolisi enzimatica, e possibili effetti collaterali quali fenilchetonuria ed accumulo di metanolo; per risolvere tali problemi sono stati sviluppati tutta una serie di analoghi dipeptidici che hanno dimostrato come ci sia una forte correlazione tra struttura e sapore<sup>2</sup>. Dolcificanti peptidici appartenenti alla serie delle L-aspartil-D-alanina ammidi sembrano essere dei buoni sostituti dello zucchero, primo fra tutti l'Alitame che è circa 2000 volte più dolce del saccarosio, e per ora è risultato privo degli effetti collaterali visti prima.

Altri peptidi si sono rilevati esaltatori di sapidità negli alimenti: da studi di analisi sensoriale condotti in Giappone si è riscontrato che il sapore di peptidi contenenti acido aspartico e glutammico è simile a quello del glutammato monosodico (umami taste<sup>3</sup>).

Gli alimenti possono anche contenere peptidi amari, che si formano in seguito all'attività proteolitica a carico delle proteine; peptidi amari sono stati identificati nei semi di soia<sup>4</sup>, negli idrolizzati caseinici<sup>5</sup>, nei formaggi<sup>6</sup>, ed in tutti quegli alimenti che subiscono processi di fermentazione o stagionatura, caratterizzati da una forte attività proteolitica. Il sapore amaro è stato correlato principalmente al contenuto in ammino acidi idrofobici<sup>7</sup> ed alla lunghezza della catena: in genere il sapore amaro aumenta all'aumentare del numero di residui idrofobici, sebbene oltre una certa lunghezza della catena peptidica esso non sia più percettibile (le proteine sono insapori); inoltre è stato dimostrato<sup>8</sup> che la presenza di un ammino acido idrofobico dal lato C-terminale, e di un residuo basico dal lato N-terminale comporta un aumento del gusto amaro di di- e tripeptidi. In genere anche le

dichetopiperazine, dipeptidi ciclici, rivelate in alcuni alimenti come il formaggio, ed in diversi idrolizzati proteici, presentano uno spiccato sapore amaro<sup>9</sup>.

I peptidi di basso peso molecolare giocano un ruolo importante anche nel sapore dei prodotti carnei<sup>10</sup>, in particolare è stato visto come alcuni di loro conferiscano desiderabili proprietà sensoriali, e siano fortemente responsabili del caratteristico flavour di alcuni insaccati<sup>11</sup>.

### **1.1.3 Proprietà funzionali**

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse nei confronti delle possibili proprietà funzionali dei peptidi negli alimenti<sup>12</sup>. E' ormai assodato che le proprietà funzionali delle proteine, intese come proprietà chimico-fisiche, vengono notevolmente modificate durante l'idrolisi enzimatica, tanto che i loro idrolizzati vengono spesso usati come additivi alimentari al fine di migliorare la qualità dell'alimento, per via della loro maggiore solubilità, della minore viscosità, e di maggiori proprietà schiumogene ed emulsionanti rispetto alle proteine native. Un'idrolisi estensiva delle proteine alimentari può tuttavia comportare la formazione di peptidi con uno spiccato gusto amaro, per cui è importante che il grado di idrolisi non sia eccessivo, ed è molto importante anche la scelta delle proteasi con cui si intende effettuare tale processo<sup>13</sup>.

Alcuni idrolizzati proteici vengono utilizzati per le loro proprietà antiossidanti: un tipico caso è rappresentato dall'idrolizzato dell'albumine d'uovo, la cui aggiunta ad alimenti con un elevato contenuto lipidico è in grado di rallentare i fenomeni ossidativi che possono avvenire a loro carico; analogamente si è visto che alcuni dipeptidi sono capaci di rallentare l'auto-ossidazione dell'acido linolenico<sup>14</sup>.

Un altro aspetto molto importante degli idrolizzati proteici è quello di possedere spiccate proprietà schiumogene, che potrebbero essere sfruttate nella manifattura di bevande quali la birra e gli spumanti<sup>15</sup>; inoltre, le proprietà emulsionanti di molte proteine aumentano decisamente in seguito ad idrolisi enzimatica, effetto questo strettamente correlato alla liberazione di peptidi di alto peso molecolare (>20 residui amminoacidici) ed a elevato carattere idrofobico; per ottenere peptidi di alto peso molecolare è quindi importante limitare il grado di idrolisi, così come è importante la scelta dell'enzima, in quanto peptidi derivanti da digestione triptica possiedono migliori proprietà emulsionanti di quelli derivanti dall'idrolisi con  $\alpha$ -chimotripsina<sup>16</sup>. Infine, le proprietà emulsionanti dei peptidi dipendono fortemente dal pH del mezzo (in genere un pH leggermente acido incrementa

tali proprietà), ed è stato dimostrato che spesso si verificano, all'interno di idrolizzati proteici, effetti di sinergismo di difficile comprensione, per i quali peptidi isolati possiedono una capacità emulsionante inferiore rispetto a quando sono in miscela con piccole quantità di altri peptidi<sup>17</sup>.

#### **1.1.4 Proprietà fisiologiche e nutrizionali**

Molti degli oligopeptidi originati dalla degradazione delle proteine alimentari sono stati caratterizzati come biologicamente attivi; in quest'ottica, il criterio generalmente usato per valutare la qualità delle proteine alimentari, basato unicamente sulle proprietà nutrizionali della proteina, andrebbe rivisto sulla base della capacità della proteina di rilasciare, in seguito a digestione gastrointestinale, o a lavorazione del prodotto, peptidi dotati di attività biologica. Si tratta di molecole che risultano inattive quando sono presenti nella sequenza della proteina nativa, ma che assumono attività farmacologica nel momento in cui vengono rilasciati. Da questo punto di vista le proteine del latte<sup>18</sup>, caseine in particolare<sup>19</sup>, rappresentano una fonte molto importante di peptidi bioattivi; per una trattazione più esaustiva dei peptidi ad attività farmacologica derivanti dalle caseine si rimanda al capitolo 2.

Numerose sono le proteine di origine alimentare che, sottoposte ad idrolisi enzimatica, liberano peptidi dotati di attività ACE-inibitrice<sup>20</sup>, soprattutto proteine del grano<sup>21</sup>, di pesce<sup>22</sup>, delle uova<sup>23</sup>, e del latte<sup>24</sup>. Sebbene molti dei peptidi responsabili per l'attività antiipertensiva dei suddetti idrolizzati siano stati identificati, non sono ancora del tutto chiare le proprietà strutturali necessarie per un'attività di questo tipo: in quasi tutti i casi, si tratta di peptidi a basso peso molecolare (fino a 9 residui), ricchi di amminoacidi idrofobici, e caratterizzati dalla presenza di una prolina, una lisina, o un'arginina come amminoacido C-terminale.

Le proteine del latte<sup>25</sup> e del grano<sup>26</sup> rappresentano una fonte importante anche di peptidi ad attività oppioide, mentre peptidi ad attività antimicrobica, in grado di interagire con la membrana cellulare dei microrganismi, sono stati isolati a partire da idrolizzati di diverse proteine di muscolo di pesce<sup>27</sup>; una caratteristica strutturale comune ai peptidi ad attività antimicrobica è la presenza di una testa cationica, necessaria per l'interazione con le cariche negative dei fosfolipidi di membrana.

Un altro aspetto importante è la minore antigenicità che i peptidi a basso peso molecolare presentano rispetto alle proteine native: gli idrolizzati delle proteine del latte sono

caratterizzati da una scarsa allergenicità, e come tale possono essere utilizzati per formulare alimenti ipoallergenici destinati all'infanzia<sup>28</sup>.

Da un punto di vista nutrizionale, i peptidi rappresentano una forma più biodisponibile di amminoacidi essenziali rispetto alle proteine; infatti idrolizzati proteici trovano largo impiego in applicazioni cliniche quali la nutrizione parenterale, e preparazioni di peptidi con elevato contenuto di amminoacidi a catena ramificata e basso contenuto di amminoacidi aromatici potrebbero essere destinati a pazienti affetti da patologie epatiche<sup>29</sup>.

## **1.2 Preparazione del campione e cleanup dei peptidi negli alimenti**

La determinazione dei peptidi negli alimenti richiede, data l'elevata complessità della matrice alimentare, una prima fase estrattiva, seguita da un'opportuna fase di purificazione per separare la frazione peptidica dagli altri componenti della matrice alimentare eventualmente coestratti, al fine di avere un campione privo di interferenti per la successiva fase di separazione e rivelazione con tecniche analitiche ad alta risoluzione; una precedente fase di concentrazione del campione può essere richiesta a seconda della matrice.

### **1.2.1 Estrazione dei peptidi**

In generale, per analizzare la componente peptidica di un determinato alimento, soprattutto nel caso che esso sia solido, si rende necessaria una prima fase di estrazione seguita da deproteinizzazione; a questo proposito l'omogeneizzazione è sicuramente una delle tecniche più efficaci, utilizzando acqua, soluzioni di acido acetico o cloruro di sodio, o anche miscele di acqua con metanolo e etanolo. Nel caso in cui si sia interessati a peptidi particolarmente idrofobici, possono essere usate anche miscele di cloroformio e metanolo. L'acqua è stata usata per l'estrazione della frazione peptidica di alimenti quali formaggi<sup>30</sup> e legumi<sup>31</sup>, soluzioni saline sono state usate per l'estrazione dei peptidi dalla carne<sup>32</sup> e dalla farina<sup>33</sup>, mentre esistono lavori in cui si sono usate miscele di cloroformio e metanolo (2:1) per estrarre in modo selettivo i peptidi idrofobici dai formaggi<sup>34</sup>.

La fase di deproteinizzazione viene generalmente effettuata mediante l'utilizzo di opportuni agenti precipitanti; a questo proposito un agente precipitante molto usato è l'acido tricloroacetico (TCA)<sup>35</sup>. Il TCA svolge il suo meccanismo d'azione a 3 livelli: con i suoi atomi di cloro genera interazioni idrofobiche con la proteina causandone l'unfolding, in

questo modo l'acqua può penetrare all'interno della struttura terziaria della proteina provocando interazioni destabilizzanti che ne causano l'insolubilizzazione; essendo un acido forte, il TCA modifica la ionizzazione dei gruppi acidi e basici dei residui amminoacidici, quindi variano le interazioni elettrostatiche intramolecolari che contribuiscono a tenere ripiegate le proteine; infine, in soluzione acquosa il TCA è quasi completamente dissociato, modificando, in questo modo, la forza ionica del solvente.

Nel 1991 Bican e Spahn hanno introdotto l'uso dell'acido trifluoroacetico (TFA) come agente per separare i peptidi, con azione simile al TCA, ma con risultati migliori<sup>36</sup>.

Risultati interessanti si sono ottenuti anche con acido fosfotungstico (PTA), con acido solfosalicilico (SSA), con acido picrico e con EDTA<sup>37</sup>.

Dopo la precipitazione, si rende necessario un passaggio di centrifugazione e filtrazione per allontanare il precipitato proteico, e, nel caso di utilizzo di soluzioni saline, si deve ricorrere anche ad un passaggio di dialisi.

### **1.2.2 Frazionamento dei peptidi mediante ultrafiltrazione**

Oltre ai metodi chimici, esistono metodi fisici in grado di allontanare le proteine senza far uso di alcuna sostanza aggiunta; a questo proposito l'ultrafiltrazione rappresenta sicuramente un metodo molto efficace che, mediante l'uso di filtri a cut-off variabile, fraziona i peptidi in base al loro peso molecolare, sebbene la possibilità che un peptide si trovi nel filtrato, piuttosto che nel ritentato, dipenda più dalla sua forma e dimensione che dal peso molecolare.

Per il frazionamento dei peptidi sono disponibili in commercio un gran numero di membrane filtranti di diversi materiali, ed a diverse misure di cut-off (i più comuni sono 30 KDa, 10 KDa, 5KDa e 3 KDa).

Kaiser et al. hanno usato l'ultrafiltrazione per frazionare i peptidi solubili a pH 4,6 del Cheddar in quattro range di pesi molecolari<sup>38</sup>, e sono noti lavori in cui tale metodica è stata usata nella separazione di peptidi bioattivi<sup>39</sup>.

### **1.2.3 Isolamento e frazionamento dei peptidi usando la cromatografia liquida a bassa pressione**

La purificazione dei peptidi dalle altre componenti della matrice alimentare, quali zuccheri, acidi organici, amminoacidi, polifenoli, sali etc. può essere ottenuta anche utilizzando

diverse tecniche di cromatografia preparativa classica, come cromatografia ad esclusione molecolare, a scambio ionico, di affinità, ed a scambio di legante.

La cromatografia ad esclusione molecolare a bassa pressione consente di frazionare i peptidi in base alle loro dimensioni molecolari, cosa che può essere molto utile come step iniziale di frazionamento di miscele molto complesse; per questo scopo, due sono le fasi stazionarie principalmente utilizzate, destrani cross-linked (Sephadex), e la poliacrilammide (BioGel P).

La scelta delle dimensioni dei pori viene fatta sulla base del range di dimensioni dei peptidi che si intende frazionare, in questo modo è possibile separare peptidi di piccole dimensioni da proteine o da peptidi a più alto peso molecolare, che eluiscono prima, e contemporaneamente da molecole più piccole quali acidi organici, zuccheri ed amminoacidi, maggiormente trattenuti. Gli eluenti comunemente utilizzati per questo tipo di cromatografia sono acqua, o soluzioni acquose diluite di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , di ammoniacca, di acido formico (5%), e di acido acetico (30%).

La separazione dei peptidi da altre specie cariche o neutre può essere realizzata anche utilizzando la cromatografia a scambio ionico, su colonne caricate con resine a scambio anionico o cationico, a seconda dei casi. Fasi stazionarie basate su materiale idrofilo opportunamente funzionalizzato con gruppi acidi o basici (carbossimetil- o dietilamminoetil-cellulosa, destrani cross-linked), sono attualmente in commercio, e sono molto utili per la separazione di peptidi di grosso peso molecolare utilizzando opportuni gradienti lineari di eluizione, ma altrettanto usate sono anche fasi stazionarie di tipo idrofobico, a base di polimeri polistirenici cross-linked (resine Dowex), stavolta nel caso di peptidi di più piccole dimensioni; per queste resine è opportuno utilizzare per l'eluizione tamponi contenenti piridina, in modo da eliminare interazioni idrofobiche con la resina.

La cromatografia di affinità consente la purificazione di peptidi contenenti gruppi funzionali specifici nell'interazione con recettori covalentemente legati ad una matrice di agarosio (Sephrose); in letteratura sono riportati pochi lavori che utilizzano questa tecnica nel campo alimentare: un tipico esempio è rappresentato dall'isolamento dei glicopetidi dal colostro bovino, usando lectine immobilizzate su agarosio<sup>40</sup>.

Una problematica che si pone nel momento in cui si vuole procedere all'analisi dei peptidi di interesse alimentare è quella di eliminare gli amminoacidi che potrebbero interferire con tale analisi; questo può essere ottenuto ricorrendo, oltre alle tecniche cromatografiche sopra citate, alla cromatografia a scambio di legante su fasi stazionarie tipo Sephadex addizionate

di sali di  $\text{Cu}^{2+}$ . Tale tecnica si basa sulla differente stabilità dei complessi rame-fase stazionaria, rame-peptidi, e rame-ammino acidi; i peptidi hanno la tendenza ad eluire per primi, mentre gli ammino acidi sono maggiormente trattenuti ed eluiscono in frazioni successive<sup>41</sup>.

#### **1.2.4 Isolamento e frazionamento dei peptidi mediante estrazione in fase solida (SPE)**

Una delle tecniche che è stata maggiormente sviluppata negli ultimi anni per la preparazione dei campioni nell'analisi della frazione oligopeptidica di origine alimentare è sicuramente l'estrazione in fase solida; tale tecnica presenta diversi vantaggi, primo fra tutti l'estrema versatilità, motivo per cui sono attualmente in commercio cartucce e colonnine preimpaccate con le più svariate fasi stazionarie.

I peptidi possono essere separati principalmente mediante tre tecniche: interazione polare con una fase diretta, interazione idrofobica con una fase inversa, e scambio ionico.

Le cartucce a fase stazionaria octadecilica sono estremamente utili nella purificazione e concentrazione dei peptidi, e sono spesso usate per semplificare una successiva analisi con tecniche ad alta risoluzione<sup>42</sup>, sebbene le condizioni sperimentali di ritenzione ed eluizione debbano essere ottimizzate a seconda del tipo di peptidi che si intende analizzare; la SPE a fase inversa è stata usata in diversi casi, per la purificazione di peptidi estratti dal latte<sup>43</sup>, da formaggi<sup>44</sup>, e da prodotti carnei<sup>45</sup>, e tutte le volte si è rivelata molto utile nell'eliminare composti che potevano interferire con le analisi successive.

Visto il grande sviluppo di questa tecnica, non è difficile prevedere, in futuro, il suo principale utilizzo nell'automatizzazione per la preparazione dei campioni.

### **1.3 Separazione analitica dei peptidi**

Spesso la frazione peptidica estratta da una matrice alimentare, per quanto purificata e concentrata con i metodi fin qui visti, è comunque una miscela molto complessa, che richiede tecniche analitiche ad elevata risoluzione per poter essere risolta nelle singole componenti; le tecniche che vengono comunemente utilizzate per tale fine sono la cromatografia liquida ad alte pressioni (HPLC), soprattutto nelle tipologie a fase inversa, a scambio ionico, ed a esclusione dimensionale, e le tecniche elettroforetiche, sia su gel che capillare.

### **1.3.1 Separazione dei peptidi mediante HPLC**

La cromatografia liquida ad alte pressioni è caratterizzata dall'utilizzo di colonne di diametro interno variabile ( $\leq 5\text{mm}$  per scopi analitici,  $\geq 10\text{mm}$  per scopi preparativi o semipreparativi) e lunghezza inferiore a 30cm, impaccate con microparticelle uniformi di fase stazionaria di diametro estremamente piccolo ( $5\text{-}10\mu\text{m}$ ) tali da richiedere l'applicazione a monte di pressioni elevate per permettere il flusso della fase mobile; un impaccamento di questo tipo garantisce una elevata estensione della superficie della fase stazionaria, con conseguente incremento della risoluzione e dell'accuratezza rispetto a tecniche cromatografiche a basse pressioni.

#### **1.3.1.1 HPLC a fase inversa (RP-HPLC)**

L'HPLC a fase inversa rappresenta la tecnica di gran lunga d'elezione, quando si ha a che fare con miscele di peptidi anche molto complesse. Le fasi stazionarie che vengono comunemente impiegate per tale tipo di analisi sono costituite da catene alchiliche di tipo octadecile, octile, o butile (C18, C8 e C4 rispettivamente) legate in modo covalente ai gruppi silanolici della fase silicea che funge da supporto; alternativamente sono disponibili in commercio anche fasi stazionarie basate su materiali organici di tipo polimerico (polistirene, con divinilbenzene come agente reticolante) che presentano il vantaggio, rispetto alle precedenti a base di silice, di essere stabili ad alti valori di pH e di permettere la separazione dei peptidi su un ampio range di pH (da 1 a 13).

Il meccanismo di separazione in RP-HPLC è basato sull'instaurarsi di interazioni idrofobiche tra i peptidi e la fase stazionaria apolare; l'eluizione dei peptidi, da quelli a minore idrofobicità a quelli più idrofobici, viene garantita dal flusso della fase mobile, costituita di solito da due eluenti miscelati in proporzioni che variano nel tempo secondo un particolare gradiente: il primo eluente, molto polare, è normalmente costituito dall'acqua, il secondo, con un maggiore carattere idrofobico, al fine di permettere l'eluizione dei peptidi via via più apolari, è rappresentato da solventi organici come acetonitrile, metanolo, etanolo, propanolo o isopropanolo.

Il grande vantaggio dell'HPLC a fase inversa nella risoluzione di miscele complesse, quali possono essere i peptidi estratti da matrici alimentari, consiste nel gran numero di parametri su cui è possibile operare per avere una più efficace separazione, tra cui tipo di fase mobile e stazionaria, pH della fase mobile, contro-ione della fase mobile, e temperatura.

La natura della fase stazionaria, nonché la dimensione dei pori e delle particelle, sono tutti fattori di fondamentale importanza di cui bisogna tenere conto nella separazione di una miscela di peptidi. I peptidi ad elevato peso molecolare ( $>$  di 4000 Da) sono meglio analizzati con colonne RP contenenti particelle con granulometria 300 Å, in modo che le molecole possano liberamente attraversare i pori ed entrare a contatto con le catene alchiliche. Per i peptidi di piccole dimensioni è preferibile utilizzare pori di dimensioni convenzionali da 60 a 100 Å. La fase stazionaria C4 è raccomandata per i peptidi grandi e idrofobici, mentre le fasi stazionarie C18 e C8 sono consigliate per peptidi piccoli, idrofilici o non molto idrofobici. Le colonne con fase stazionaria cianopropilica, infine, sono più polari di quelle citate e possono essere utilizzate per la separazione di peptidi altamente idrofobici.

Per quanto riguarda la fase mobile, la scelta del modificante organico è altrettanto importante; tra i tanti visti prima, l'acetonitrile occupa un posto di rilievo per una serie di vantaggi: assorbimento modesto nella regione UV di rivelazione (tra 200 e 220 nm), bassa viscosità, alta volatilità. Anche l'isopropanolo e il n-propanolo, da soli o in miscela con l'acetonitrile, trovano largo impiego, soprattutto quando si ha a che fare con peptidi idrofobici di grandi dimensioni.

La ritenzione e la separazione dei peptidi in HPLC migliora aggiungendo all'eluente acidi forti, i quali sono in grado al tempo stesso di mantenere i peptidi in una forma ionica ben definita, e di tenere protonati i gruppi silanolicci liberi della silice, evitando così interazioni ioniche tra gli analiti e la fase stazionaria; per tale motivo molte separazioni analitiche sono condotte a  $\text{pH} < 3$ . L'acido aggiunto alla fase mobile, inoltre, forma con i peptidi coppie ioniche strette, con conseguente incremento della risoluzione cromatografica: a pH acido, infatti, i gruppi amminici N-terminali e quelli presenti nelle catene laterali di residui basici (istidina, lisina e arginina) sono protonati, e la base coniugata dell'acido è in grado di formare coppie ioniche strette con tali gruppi carichi positivamente.

Comunemente si usa acido trifluoroacetico (TFA) alla concentrazione 0,1%. Esso presenta diversi vantaggi: non assorbe all'UV, è un eccellente solvente per i polipeptidi, è un potente generatore di coppie ioniche, ed è miscibile con la maggior parte dei solventi organici utilizzati per l'eluizione. Uno svantaggio non trascurabile è rappresentato dal fatto che tale acido provoca problemi di scarsa ionizzazione nel caso di rivelazione tramite spettrometria di massa; l'acido trifluoroacetico può, allora, essere sostituito con altri generatori di coppie

ioniche altrettanto valide, quali acido eptafluorobutirrico (HFBA), acido fosforico, acido cloridrico, acido formico, ed acido acetico.

Come generatori di coppie ioniche possono essere usati anche sali di alchilammonio quaternario, in particolare il trietilammonio fosfato, che consentono un fine controllo del tempo di ritenzione; tuttavia essi presentano il grosso inconveniente che l'eluizione viene condotta ad un pH più elevato (>4), ed usando fasi mobili con una minore volatilità, per cui sono scarsamente utilizzati.

### **1.3.1.2 HPLC a scambio ionico (IE-HPLC)**

La cromatografia a scambio ionico ha giocato un ruolo importante nella separazione di miscele di peptidi, ma attualmente trova un impiego assai minore rispetto a quella a fase inversa. Questa tecnica utilizza colonne di lunghezza compresa tra i 5 ed i 30cm, con un diametro interno di 3-5mm, ed impaccate con fasi stazionarie scambiatrici di cationi o di anioni; la fase stazionaria contiene gruppi a carica opposta rispetto ai peptidi che si intende separare, legati ad un supporto di silice o di materiale polimerico (polistirene-divinilbenzene). Le colonne a base polistirenica devono contenere solo una piccola percentuale di divinilbenzene come agente reticolante, e sono particolarmente adatte nel caso di peptidi di piccole dimensioni, e quando si deve operare a pH fortemente basico.

Il meccanismo di separazione dei peptidi in scambio ionico è basato sulle differenze di carica netta che esistono tra i singoli analiti; in generale il tempo di ritenzione è direttamente proporzionale alla carica, ed i fenomeni di ritenzione e di eluizione coinvolgono la sostituzione di certe specie ioniche sulla fase stazionaria da parte di altre.

In cromatografia a scambio ionico una miscela di peptidi può essere separata sia utilizzando scambiatori di anioni, che scambiatori di cationi, a seconda del pH del campione e della fase mobile; tuttavia peptidi acidi sono separati meglio utilizzando scambiatori di anioni, mentre gli scambiatori cationici si prestano meglio alla separazione di miscele di peptidi neutri o basici.

Per quanto riguarda la fase mobile, essa è in grado di controllare la ritenzione dei peptidi sulla base della sua forza ionica, del pH, e della presenza eventuale di modificanti organici. In particolare la forza ionica gioca un ruolo fondamentale nel garantire una eluizione completa degli analiti; la forza ionica viene normalmente variata utilizzando un gradiente di cloruro di sodio o di potassio in tamponi quali fosfato, Tris o citrato. Anche il pH della fase mobile è molto importante, in quanto va ad influenzare notevolmente la carica dei peptidi e

degli scambiatori deboli; meno marcato risulta, invece, il suo effetto nel caso di scambiatori forti, o di analiti fortemente ionizzati.

Sebbene l'impiego dell'HPLC a scambio ionico sia molto minore rispetto alle tecniche a fase inversa, il primo presenta il non trascurabile vantaggio che la separazione può essere effettuata agevolmente ad un pH basico, e con quantità di campione maggiore; queste due tecniche vengono spesso usate in modo complementare, soprattutto quando si vogliono risolvere con efficacia miscele peptidiche ad elevata complessità.

### **1.3.1.3 HPLC ad esclusione molecolare (SE-HPLC)**

L'HPLC ad esclusione molecolare (SE-HPLC) permette la separazione dei peptidi sulla base delle loro dimensioni molecolari; la fase stazionaria è caratterizzata dalla presenza di pori di dimensione controllata, in grado di filtrare le componenti della miscela da separare: gli analiti di piccole dimensioni, capaci di passare attraverso tali pori, hanno accesso ad un più grande volume della fase stazionaria, e risultano trattenuti più a lungo rispetto alle molecole di dimensioni maggiori. Attualmente sono disponibili in commercio colonne impaccate con le più svariate fasi stazionarie organiche ed inorganiche, caratterizzate da un vasto range di dimensioni dei pori; le fasi stazionarie inorganiche, quali silice ed allumina, hanno l'inconveniente di adsorbire molecole cariche, e quindi devono essere inattivate prima dell'utilizzo, generalmente mediante organosilani.

La fase mobile nella cromatografia ad esclusione molecolare deve assolvere esclusivamente al ruolo di trasporto, visto che la separazione degli analiti avviene solo in base alle dimensioni molecolari, motivo per cui non ci deve essere nessun tipo di interazione con il campione o con la fase stazionaria; da questo punto si presta molto bene l'utilizzo di solventi acquosi e di tamponi con concentrazioni di sali comprese tra 100 e 400mM. Eventuali interazioni di tipo aspecifico possono essere limitate anche aggiungendo alla fase mobile piccole quantità di un modificante organico.

La SE-HPLC risulta poco utilizzata nell'analisi di miscele peptidiche, rispetto alla cromatografia a fase inversa, perché le colonne sono spesso molto costose, e vanno incontro a logorio più velocemente; inoltre il meccanismo piuttosto complesso che è alla base della separazione (esclusione molecolare, adsorbimento idrofobico, interazioni elettrostatiche, etc.) consente di fare scarse predizioni sul comportamento degli analiti. Tutti questi inconvenienti limitano il suo impiego per usi preliminari ad un'analisi di tipo RP-HPLC,

quando, ad esempio, si vogliono eliminare peptidi altamente idrofobici che darebbero problemi nella successiva analisi a fase inversa.

#### **1.3.1.4 Applicazioni dell'HPLC all'analisi dei peptidi negli alimenti**

Al giorno d'oggi, l'HPLC è la tecnica di gran lunga più impiegata per l'analisi e la caratterizzazione dei peptidi in matrici alimentari, ed in particolare l'HPLC a fase inversa, che consente la separazione di miscele anche molto complesse, per via, come detto, del gran numero di parametri su cui è possibile operare.

La RP-HPLC è stata estensivamente utilizzata per lo studio dei fenomeni proteolitici che avvengono nei formaggi a carico della frazione caseinica durante la fase di stagionatura<sup>44</sup>, per l'analisi di peptidi bioattivi<sup>46</sup> ed amari<sup>47</sup> derivanti dalle proteine del latte, per la caratterizzazione di peptidi in prodotti carnei<sup>48</sup> ed in bevande alcoliche<sup>49</sup>.

Sono presenti in letteratura un gran numero di articoli che utilizzano le diverse tecniche di HPLC per la caratterizzazione di proteine di interesse alimentare, attraverso l'analisi delle miscele peptidiche derivanti dalla loro digestione enzimatica; a tale proposito, le proteine del latte sono state molto studiate<sup>50</sup>.

L'analisi dei peptidi mediante tecniche cromatografiche è stata inoltre usata per la caratterizzazione di alcuni alimenti, ad esempio per identificare l'origine di prodotti carnei<sup>51</sup>, o per studi di shelf life<sup>52</sup>.

### **1.3.2 Separazione dei peptidi mediante tecniche elettroforetiche**

#### **1.3.2.1 Elettroforesi su gel**

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (PAGE) è ormai impiegata da molti anni nello studio di proteine di origine alimentare, nonché di polipeptidi di elevato peso molecolare altrimenti di difficile analisi con tecniche cromatografiche; la separazione può avvenire sulla base sia della carica che della massa delle molecole, come nel caso della semplice PAGE, sulla base del solo peso molecolare (SDS-PAGE), o sulla base del punto isoelettrico, nel caso dell'isoelectric focusing (IEF). Tali tecniche presentano il vantaggio di avere una buona risoluzione e riproducibilità, costi relativamente bassi, e facilità di impiego; inoltre l'accoppiamento di due di queste tecniche nella separazione bidimensionale degli analiti (2D-EF) consente un notevole incremento della risoluzione. Uno svantaggio comune dell'elettroforesi è rappresentato dai tempi piuttosto lunghi di

analisi, e dai limiti di rivelazione, che tuttavia sono stati notevolmente ridotti in seguito all'introduzione di minigels ultrasottili già pronti e di sistemi di automazione.

Nel campo dei peptidi, l'elettroforesi su gel trova largo impiego quando si tratta di analizzare miscele di peptidi ad elevato peso molecolare ed idrofobici che richiedono, per la solubilizzazione, l'utilizzo di detergenti incompatibili con l'HPLC a fase inversa.

Nel caso in cui l'analisi venga condotta in condizioni non denaturanti (PAGE), i peptidi risultano carichi positivamente o negativamente a seconda del pH del buffer, e migrano con una mobilità che dipende dal loro rapporto massa/carica; con gel ad elevata percentuale di poliacrilammide (40-50%), tale tecnica è stata utilizzata anche per la separazione di peptidi di minore dimensione.

Nel caso della SDS-PAGE, la separazione delle proteine avviene solo sulla base del loro peso molecolare, in quanto l'aggiunta del sodio dodecilsolfato (SDS) comporta una totale denaturazione delle proteine, che acquistano tutte una carica negativa derivante dalle molecole del tensioattivo; tale tecnica viene comunemente impiegata nell'analisi di proteine di interesse alimentare, tuttavia è di scarsa efficacia per i peptidi con massa inferiore ai 15000 Da. Per aumentare l'efficienza in questo senso risulta necessario diminuire le dimensioni effettive dei pori del gel, cosa che è stata effettuata usando gel al 12,5% di poliacrilammide preparati con un'elevata percentuale di bisacrilammide come agente reticolante, accoppiata all'utilizzo di buffer con elevato contenuto di urea (8M)<sup>53</sup>. Nonostante questi tentativi, i principali limiti, quali scarsa efficacia nella risoluzione di miscele complesse di oligopeptidi, e difficoltà nella quantificazione per problemi connessi allo staining, continuano a rimanere.

Da questo punto di vista, la tecnica di elezione nell'analisi di miscele complesse di peptidi a basso peso molecolare rimane sempre l'HPLC a fase inversa.

### **1.3.2.2 Elettroforesi capillare**

Negli ultimi anni, l'elettroforesi capillare sta prendendo sempre più piede come tecnica complementare all'HPLC per la separazione e la quantificazione dei peptidi, per via della elevata efficienza, semplicità e velocità di analisi, a cui si aggiunge il vantaggio di richiedere piccole quantità di campione.

Esistono diverse tecniche di elettroforesi capillare, molte delle quali trovano largo impiego nell'analisi di peptidi di interesse alimentare: l'elettroforesi capillare a zona (CZE),

l'isoelectric focusing capillare (CIEF), l'elettroforesi capillare su gel (CGE), la cromatografia micellare elettrocinetica (MEKC), e l'isotacoforesi capillare (CITP).

Nella CZE, che rappresenta la più semplice forma di elettroforesi capillare, la separazione degli analiti è dovuta esclusivamente alla loro differente mobilità elettroforetica, dipendente dalle dimensioni molecolari e dalla carica ad un determinato pH; per questo motivo si pone come valida alternativa all'elettroforesi su gel per l'analisi dei peptidi, e, mostrando nella separazione delle molecole una selettività diversa rispetto all'HPLC, fornisce informazioni che sono complementari a quelle fornite dalle tecniche cromatografiche.

In quest'ottica, sono numerosi gli articoli presenti in letteratura che utilizzano la CZE in campo alimentare, ad esempio per l'analisi di peptidi nei formaggi e nei derivati del latte<sup>54</sup>, per valutare la proteolisi delle proteine del muscolo durante la lavorazione di insaccati<sup>55</sup>, o per accertare la freschezza di prodotti ittici<sup>56</sup>.

Nella isoelectric focusing capillare la separazione degli analiti avviene sulla base dei loro diversi punti isoelettrici, ponendosi come valida e più rapida alternativa alla corrispondente tecnica su gel. La miscela da separare viene aggiunta ad una soluzione di anfotiti che deve fornire il range di pH di interesse; durante la separazione, viene applicato un campo elettrico in grado di generare un gradiente di pH in cui il più basso valore è all'anodo, ed il più elevato al catodo. Nel caso di una miscela, ogni molecola migrerà fino a raggiungere la regione del capillare dove il valore di pH è equivalente al suo punto isoelettrico; tuttavia l'applicazione di tale tecnica all'analisi dei peptidi risulta ancora piuttosto limitata.

Per quanto riguarda l'elettroforesi capillare su gel, la separazione delle molecole avviene con un meccanismo di esclusione molecolare, motivo per cui la distribuzione degli analiti può essere controllata variando la percentuale di reagente utilizzato per i cross-links; nel caso di miscele di peptidi, in genere il campione viene trattato con SDS, in modo che la separazione avvenga esclusivamente sulla base del peso molecolare.

Nella cromatografia micellare elettrocinetica, alla miscela elettrolitica usata per la corsa elettroforetica viene aggiunta una opportuna quantità di surfattante: in questo modo si favorisce la formazione di micelle che, interagendo in modo diverso con gli analiti, permettono la separazione di molecole prive di carica o con carica netta molto simile, non separabili attraverso la comune elettroforesi capillare. Recentemente è stata valutata l'applicazione di tale tecnica anche all'analisi di peptidi presenti in estratti di formaggio<sup>57</sup>.

Infine, l'isotacoforesi capillare è stata la prima tecnica di elettroforesi capillare, ed è estremamente utile come pre-concentrazione on-line nella CZE, il cui inconveniente principale consiste proprio nel piccolo volume di campione che è possibile caricare.

## **1.4 Metodi di rivelazione dei peptidi**

Le tecniche di rivelazione usate nell'analisi dei peptidi possono essere distinte principalmente in due categorie, in quanto alcune si basano sulla rivelazione diretta delle molecole di natura peptidica, altre richiedono, invece, una reazione pre- o post-colonna con un opportuno reagente di derivatizzazione, al fine di renderli più sensibilmente rivelabili all'UV o in fluorescenza. La reazione di derivatizzazione deve essere in grado di dare un forte segnale al rivelatore, e non deve rilasciare prodotti secondari che possano interferire con la successiva analisi; inoltre deve essere molto rapida, e dare una resa quantitativa.

### **1.4.1 Metodi di rivelazione dei peptidi mediante UV-VIS**

Il metodo di gran lunga più diffuso di rivelazione dei peptidi in un'analisi HPLC è rappresentato dall'assorbimento all'UV. La lunghezza d'onda che si sceglie è in genere un compromesso tra il massimo d'assorbimento del legame peptidico (<210nm), e la necessità di ridurre il più possibile l'interferenza dovuta all'assorbimento del solvente e delle sue impurità, che a lunghezze d'onda così basse è generalmente elevata; per questo motivo si opera, generalmente, a lunghezze d'onda comprese tra i 210 ed i 220nm, in particolare 214nm è quella più utilizzata, che consente di arrivare a rivelare fino a concentrazioni comprese tra il nanomolare ed il picomolare. Residui aromatici di fenilalanina, tirosina, e triptofano contribuiscono all'assorbimento della molecola, motivo per cui la risposta al rivelatore non può essere considerata proporzionale al numero di legami peptidici.

Spesso l'analisi viene condotta contemporaneamente a più lunghezze d'onda: la presenza nella sequenza peptidica di residui aromatici consente la rivelazione a lunghezze d'onda superiori, intorno ai 254nm, e quindi la distinzione tra questi peptidi e quelli privi di amminoacidi aromatici; inoltre, sfruttando i diversi minimi di assorbimento caratteristici per fenilalanina e tirosina è possibile, entro certi limiti, distinguere tra i peptidi particolarmente ricchi in questi residui.

I problemi connessi alla rivelazione condotta a 214nm possono essere superati utilizzando degli opportuni reagenti di derivatizzazione che consentano una rivelazione a lunghezze

d'onda superiori: tra questi, la ninidrina, il cloruro di dansile, ed il fenilisotiocianato (PITC) sono quelli di gran lunga più utilizzati.

La ninidrina reagisce con il gruppo amminico primario dei peptidi per formare un composto di colore blu (570nm), fatta eccezione dei peptidi con una prolina N-terminale, che danno luogo ad una colorazione gialla (420nm); tale reazione viene generalmente sfruttata per una derivatizzazione post-colonna, o come metodo di rivelazione in TLC, ed è stata largamente applicata nell'analisi di miscele peptidiche di origine alimentare<sup>58</sup>.

Il cloruro di dansile reagisce con il gruppo amminico primario dei peptidi, in ambiente basico, per formare derivati sulfonammidici molto stabili all'idrolisi; per questo motivo può essere agevolmente usata come metodo di derivatizzazione pre-colonna, consentendo una rivelazione all'UV a lunghezza d'onda superiore a 214nm (254nm), o anche in fluorescenza (eccitazione 320-360nm, emissione 430-470nm). Il metodo è molto sensibile, consente di arrivare agevolmente nel picomolare, anche se presenta l'inconveniente di dare prodotti secondari dovuti a reazione con gruppi ossidrilici, tiolici, ed imidazolici.

Il fenilisotiocianato reagisce con i gruppi amminici primari e secondari dei peptidi per formare feniltiocarbamil derivati (PTC); la reazione è quantitativa e riproducibile, ed i prodotti, molto stabili, consentono la rivelazione in un ampio range di lunghezze d'onda, con un massimo di assorbanza a 254nm. Per questi motivi, la derivatizzazione con PITC è stata ampiamente usata come metodo pre-colonna nell'analisi di miscele peptidiche; inoltre, il fenilisotiocianato trova impiego nel sequenziamento dei peptidi mediante degradazione di Edman.

#### **1.4.2 Metodi di rivelazione dei peptidi mediante fluorescenza**

I peptidi possono essere rivelati sfruttando la naturale fluorescenza dei residui di tirosina e triptofano; la più alta emissione si ottiene a 320-360nm, quando i peptidi sono eccitati a 220-280nm, ottenendo una rivelazione decisamente più sensibile rispetto all'assorbimento a 254nm.

Tuttavia anche in questo caso si preferisce aumentare la sensibilità di rivelazione mediante un'opportuna reazione di derivatizzazione: i reagenti comunemente utilizzati a tale scopo sono la fluorescamina e la *o*-ftalaldeide (OPA), che consentono di incrementare la sensibilità fino a tre volte di più rispetto alla rivelazione all'UV.

La fluorescamina reagisce istantaneamente con i gruppi amminici primari dei peptidi (ma non con quelli secondari) per dare derivati fluorescenti ( $\lambda_{ex}=390nm$ ,  $\lambda_{em}=475nm$ ); tale

reazione presenta l'inconveniente di dover essere condotta in acetone, per via della scarsa solubilità del reagente in acqua, ma ha il grande vantaggio che la fluorescamina ed i suoi prodotti di degradazione sono solo debolmente fluorescenti, e quindi non interferiscono con l'analisi successiva. La rivelazione dei peptidi con fluorescamina viene generalmente usata come metodo post-colonna, vista l'elevata instabilità dei derivati che si formano.

Anche l'OPA reagisce con i gruppi amminici primari dei peptidi: la reazione viene condotta ad un pH basico, in presenza di tioli quali il 2-mercaptoetanololo, portando alla formazione di derivati isoindolici fluorescenti ( $\lambda_{ex}=340\text{nm}$ ,  $\lambda_{em}=455\text{nm}$ ), relativamente stabili in ambiente acido; inoltre, in modo analogo a quanto visto per la fluorescamina, esiste il grande vantaggio che sia il reagente che i prodotti di degradazione non sono fluorescenti. La reazione avviene molto velocemente, motivo per cui si presta bene sia ad una derivatizzazione pre-colonna, che post-colonna, on line. Un inconveniente è rappresentato dal fatto che l'OPA non è in grado di reagire con i gruppi amminici secondari, rendendo impossibile la rivelazione di peptidi con un residuo di prolina N-terminale; in questo caso si può ovviare utilizzando il 9-fluorenilcloroformiato (Fmoc-Cl) come reagente di derivatizzazione.

### **1.4.3 Metodi di rivelazione dei peptidi mediante spettrometria di massa**

La spettrometria di massa, interfacciata con l'HPLC, costituisce un potente metodo di rivelazione per l'analisi di miscele peptidiche complesse, in quanto l'abbinamento delle due tecniche consente di identificare gli analiti non solo in base al loro tempo di ritenzione cromatografico, ma anche in base al loro peso molecolare, desumibile dal corrispondente spettro di massa.

Un aspetto fondamentale dell'accoppiamento tra HPLC e spettrometria di massa è rappresentato dall'interfacciamento, che comporta in genere una serie di limiti alle condizioni cromatografiche, quale flussi non troppo elevati (si ricorre solitamente ad uno splittaggio del flusso in uscita) e l'impossibilità di utilizzare tamponi come fase mobile; gli interfacciamenti di gran lunga più usati sono il fast atom bombardment (FAB), e la ionizzazione elettrospray (ESI).

Il FAB è una tecnica di ionizzazione soft, che produce ioni pseudomolecolari del tipo  $M+H^+$ , ed è molto utilizzato nell'analisi di miscele peptidiche anche molto complesse, in quanto consente di risalire in modo molto accurato al peso dei singoli peptidi, con un errore di circa  $\pm 0,2$  a.m.u.; inoltre, nel corso degli anni tale tecnica è stata ottimizzata, in modo da

aumentare la frammentazione in sorgente, che può essere molto utile per risalire alla sequenza degli analiti. Il principale inconveniente dell'interfacciamento FAB è rappresentato dal fatto che esso si presta molto bene quando si ha a che fare con peptidi di basso peso molecolare (<3000Da), consentendo di rivelare quantità nell'ordine delle picomoli, ma mostra un deciso calo di sensibilità all'aumentare del peso molecolare degli analiti.

Da questo punto di vista la tecnica di elezione è sicuramente la ionizzazione elettrospray. In tale tipo di interfacciamento l'eluato cromatografico, proveniente dalla colonna, fuoriesce da un ago sotto forma di finissime goccioline in una regione caratterizzata da un intenso campo elettrico. La d.d.p. di 3000- 4000 V che si viene a creare tra la punta dell'ago e una particolare piastra, produce la ionizzazione delle goccioline, mentre l'applicazione di gas secco, calore, o di entrambi, induce l'evaporazione del solvente, prima che il nebulizzato entri nello spettrometro. Con l'evaporazione del solvente le goccioline diminuiscono in dimensione, la densità del campo elettrico aumenta e gli ioni si portano in superficie. Raggiunto un valore di campo elettrico critico, la mutua repulsione di tipo coulombiano tra le cariche opposte raggiunge livelli tali da eccedere le forze di tensione superficiale; di conseguenza, le molecole di analita ionizzate cominciano ad abbandonare la goccia attraverso quello che è conosciuto come il "cono di Taylor". Gli ioni allo stato gassoso, così formati, sono accelerati all'interno di un orifizio, al quale è applicata una d.d.p. di 20-200 V; le particelle cariche sono quindi collimate mediante lenti collimatrici a potenziale decrescente e inviate ad un analizzatore di massa (solitamente un quadrupolo). Il quadrupolo è costituito da quattro barre accoppiate due a due, a cui viene applicata una d.d.p. alternata e una d.d.p. continua; gli ioni vengono separati in base al rapporto massa /carica ( $m/z$ ). Questo è molto importante, in quanto, tendendo la ionizzazione elettrospray a formare molecole multicarica, rende possibile l'osservazione di molecole ad elevato peso molecolare con uno strumento avente un relativamente piccolo range di massa/carica (in genere fino a 2000 $m/z$ ). Tali caratteristiche rendono la ionizzazione electropray particolarmente indicata per l'analisi di peptidi e proteine, che tendono a generare dei pattern multicarica caratteristici e di semplice riconoscimento, e trova largo impiego nell'analisi di tipo alimentare, in cui molto spesso si ha a che fare con miscele estremamente complesse; inoltre, rappresenta l'interfaccia di elezione per strumenti di tipo massa/massa, in cui è possibile indurre la frammentazione delle molecole attraverso

fenomeni collisionali, costituendo, così, un mezzo molto potente per il sequenziamento dei peptidi.

Un'altra tecnica di spettrometria di massa che negli ultimi anni ha trovato un forte impiego nell'analisi dei peptidi, sebbene non si presti ad un interfacciamento con l'HPLC (metodo off-line), è la matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI), in genere associata ad un rivelatore a tempo di volo (time of flight - TOF); si tratta di una tecnica di ionizzazione soft molto utilizzata in proteomica, ad esempio per la caratterizzazione delle proteine dopo separazione per elettroforesi bidimensionale e digestione triptica in gel.

Al giorno d'oggi la spettrometria di massa, in particolare ESI-MS e MALDI-TOF, riveste un ruolo fondamentale nell'analisi e caratterizzazione di peptidi di interesse alimentare<sup>59</sup>: numerosi sono i lavori presenti in letteratura che hanno utilizzato tali tecniche in campo alimentare, ad esempio per caratterizzare i peptidi nei prodotti caseari<sup>60</sup>, per analizzare idrolizzati delle proteine del latte<sup>61</sup>, per valutare la stabilità del latte al calore<sup>62</sup>, per studiare la proteolisi nei prodotti carnei<sup>63</sup>, per accertare la freschezza di prodotti ittici<sup>64</sup>, o per distinguere diverse varietà di vini<sup>65</sup>.

## 2. Attività biologica di peptidi derivati dalle caseine

Un campo molto promettente che si sta sviluppando negli ultimi anni, e che riveste un grande interesse nella chimica degli alimenti, è l'identificazione, in matrici alimentari, di peptidi che mostrino un'attività biologica. Questi peptidi risultano nascosti ed inattivi all'interno della sequenza primaria delle proteine, ma acquistano biotività nel momento in cui vengono rilasciati *in vivo* durante la digestione gastrointestinale, o come conseguenza dei processi proteolitici enzima-mediati che hanno luogo durante la lavorazione degli alimenti o, nel caso di formaggi ed insaccati, durante la stagionatura. Da questo punto di vista le proteine del latte<sup>18</sup>, in particolare le caseine<sup>19</sup>, rappresentano una fonte importante di sequenze funzionali con attività antitrombotica<sup>66</sup>, antiipertensiva<sup>24</sup>, oppioide<sup>25</sup>, immunomodulante<sup>67</sup>, e di trasporto degli oligoelementi<sup>68</sup>.

### 2.1 Effetti sul sistema cardiovascolare

#### 2.1.1 Attività ACE-inibitrice

Tra i peptidi bioattivi derivanti da proteine di origine alimentare molto studiati sono quelli con attività antiipertensiva, che si esplica principalmente attraverso l'inibizione dell'enzima convertitore dell'angiotensina (ACE). Quest'ultimo è una zinco metallopeptidasi presente nei polmoni, nel plasma ed in numerosi altri tessuti, e coinvolta nella regolazione della pressione sanguigna attraverso la formazione dell'octapeptide angiotensina II, un potente vasocostrittore, a partire dall'angiotensina I per rimozione del dipeptide C-terminale; parallelamente l'enzima è coinvolto nella degradazione della bradichinina, che è invece un potente vasodilatatore, per cui il risultato finale di tale attività enzimatica è un deciso innalzamento della pressione sanguigna.

Le caseine rappresentano una fonte molto importante di peptidi dotati di attività ACE-inibitrice; in particolare sono noti peptidi ad attività anti-ipertensiva, detti caso-chinine, che derivano dall' $\alpha_{S1}$ -caseina bovina (frammenti 23-24, 23-27 e 194-199), e dalla  $\beta$ -caseina bovina (frammenti 177-183 e 193-202) per idrolisi triptica<sup>69</sup>.

Sono ancora pochi gli studi concernenti la  $\alpha_{S2}$ -caseina bovina, rappresentante circa il 10% w/w delle caseine bovine totali, sebbene si sia riscontrata la presenza nell'idrolizzato triptico di questa proteina di almeno due peptidi con valori di IC50 molto bassi, i frammenti 174-179 e 174-181<sup>70</sup>.

Diversi peptidi con attività ACE-inibitrice sono stati riscontrati anche nei formaggi, nei quali si formano in seguito ai fenomeni proteolitici a cui è sottoposta la frazione caseinica durante la produzione e la fase di stagionatura<sup>71</sup>; tali molecole non possono sicuramente competere come potenza con i farmaci attualmente in commercio per il trattamento dell'ipertensione, tuttavia il fatto che prodotti caseari possano contenere peptidi con una discreta bioattività è sicuramente molto interessante nell'ottica dei cibi funzionali.

### **2.1.2 Attività antitrombotica**

Un altro aspetto importante è rappresentato dall'attività antitrombotica: è stato dimostrato che esiste una notevole somiglianza tra il processo di coagulazione del latte, inteso come interazione della  $\kappa$ -caseina con gli enzimi del caglio, e la coagulazione del sangue, intesa come interazione del fibrinogeno con la trombina<sup>72</sup>. Inoltre sono state messe in evidenza delle omologie strutturali tra il dodecapeptide dal lato C-terminale della catena  $\gamma$  del fibrinogeno umano e l'undecapeptide 106-116 della  $\kappa$ -caseina bovina<sup>73</sup>; quest'ultimo, noto con il nome di casoplatelina, è in grado di inibire sia l'aggregazione delle piastrine attivate dall'ADP, sia il legame della catena  $\gamma$  del fibrinogeno umano con un recettore specifico sulla superficie delle piastrine. Anche il frammento 103-111 della  $\kappa$ -caseina bovina è in grado di prevenire la coagulazione del sangue mediante inibizione dell'aggregazione piastrinica, sebbene non sia in grado di interferire con il legame del fibrinogeno alle piastrine attivate dall'ADP<sup>74</sup>.

## **2.2 Attività oppioide**

I recettori oppiodi sono proteine di membrana formate da un'unica catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica: in questo modo il recettore presenta sette domini transmembrana, legati tra di loro mediante tre loops intracellulari e tre loops extracellulari, con l'estremità N-terminale extracellulare e quella C-terminale intracellulare. Esistono principalmente tre tipi di recettori oppioidi, che sono localizzati principalmente a livello del sistema nervoso centrale (SNC), ma anche a livello periferico (sistema nervoso periferico, SNP), del sistema endocrino e di quello immunitario:

- recettori  $\mu$ , che regolano il comportamento emozionale e la motilità intestinale;
- recettori  $\delta$ , che coinvolgono il comportamento emozionale;
- recettori  $\kappa$ , coinvolti nella calma e nell'appetito.

Numerosi peptidi sono in grado di interagire con questi recettori causandone l'attivazione, e possono essere distinti essenzialmente in ligandi endogeni ed esogeni: i primi (encefaline, endorfine e dinorfine) rappresentano i ligandi fisiologici che vengono normalmente sintetizzati dall'organismo, e sono accomunati dal possedere la sequenza N-terminale Tyr-Gly-Gly-Phe; con il termine esorfine sono stati chiamati, invece, i peptidi di origine alimentare ad attività oppiacea che generano sintomi simili ai primi. Una caratteristica strutturale comune ai peptidi oppioidi sia endogeni che esogeni (eccetto per alcune sequenze derivanti dall' $\alpha_{S1}$ -caseina) è la presenza di un residuo di tirosina dal lato N-terminale, cui si accompagna, in generale in posizione 3 o 4, un altro residuo aromatico (Tyr o Phe); tale motivo strutturale risulta importante ai fini dell'interazione del ligando con il recettore, in quanto si è visto che l'eliminazione del residuo di tirosina N-terminale comporta perdita dell'attività oppioide<sup>75</sup>.

I primi peptidi oppioidi da proteine alimentari ad essere stati individuati sono le  $\beta$ -casomorfine<sup>76</sup>, frammenti della  $\beta$ -caseina bovina compresi tra i residui 60 e 70, principalmente f60-63, f60-64, f60-65, f60-70, e soprattutto f60-66 ( $\beta$ -casomorfina 7, Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile)<sup>77</sup>; tali molecole sono state caratterizzate soprattutto come ligandi dei recettori oppioidi di tipo  $\mu$ . È stata dimostrata nell'uomo la presenza delle  $\beta$ -casomorfine a livello intestinale in seguito ad assunzione di latte vaccino<sup>78</sup>, il che vuol dire che la digestione gastrica e pancreatica delle caseine è in grado di liberare tali sequenze; tuttavia non è stato dimostrato il loro assorbimento attraverso l'epitelio intestinale, motivo per cui la loro attività oppioide è in grado di esplicarsi solo a livello periferico, dove vanno a modulare il transito intestinale, l'uptake degli amminoacidi, e l'equilibrio idrico. Inoltre, se anche una minima quantità di questi peptidi venisse assorbita, verrebbe rapidamente degradata ad opera delle esterasi e peptidasi presenti nel torrente circolatorio<sup>79</sup>; la situazione potrebbe essere, invece, alquanto differente nel caso dei neonati, per i quali la maggiore permeabilità intestinale potrebbe consentire un più elevato assorbimento delle  $\beta$ -casomorfine, con conseguente effetto a livello sistemico<sup>80</sup>.

Altri peptidi ad attività oppioide derivanti dalle caseine bovine sono stati individuati nella sequenza primaria della  $\alpha_{S1}$ -caseina e corrispondono ai tre frammenti 90-95, 90-96, e 91-95: la peculiarità di queste molecole è che sembrano comportarsi da ligandi selettivi per i recettori oppioidi di tipo  $\delta$ <sup>81</sup>.

Le esorfine mostrano proprietà farmacologiche simili a quelle della morfina, potente agonista esogeno dei recettori oppioidi, e come quest'ultima la loro azione viene annullata dal Naloxone, che si comporta da antagonista per i recettori oppioidi<sup>82</sup>; essi, inoltre causano apnea e respiro irregolare, modulano il sonno, stimolano la secrezione pancreatica di insulina ed il rilascio di somatostatina, stimolano l'assorbimento intestinale di acqua ed elettroliti, ed hanno effetto di aumentare il food-intake modificando l'attività endocrina del pancreas<sup>83</sup>.

Analogamente a quanto visto fino ad adesso, le sequenze caseiniche contengono anche alcuni frammenti che si comportano da antagonisti dei recettori oppioidi, in quanto sono in grado di legarsi al recettore senza comportarne, però, l'attivazione; tali frammenti vengono denominati generalmente casoxine, e sono stati individuati soprattutto all'interno della  $\kappa$ -caseina<sup>84</sup>. In particolare sono state caratterizzate le casoxine A, B, e C, corrispondenti rispettivamente ai frammenti f35-41, f58-61, e f25-34 della  $\kappa$ -caseina bovina: di queste, la casoxina C (Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg), derivante dalla digestione triptica della  $\kappa$ -caseina, è quella che ha mostrato in vitro l'attività antagonista più potente<sup>83</sup>.

### **2.3 Effetti sul sistema immunitario**

Il sistema immunitario è una rete molto complessa costituita da organi, cellule specializzate ed un sistema circolatorio distinto da quello sanguigno, ed ha la funzione molto importante di proteggere l'organismo contro gli attacchi esterni da parte di batteri, virus e corpi estranei.

Gli organi del sistema immunitario sono diffusi in tutto il nostro corpo e sono chiamati "organi linfoidi"; i vasi e i gangli linfatici permettono la circolazione della linfa, avente funzione di trasporto delle cellule del sistema immunitario, che quindi agiscono, passando attraverso il sangue, in tutto l'organismo. Le cellule effettrici di tale sistema sono estremamente specializzate, e derivano dalla stessa linea cellulare pluripotente localizzata a livello del midollo osseo, dalla quale si differenziano, allo stadio iniziale, due linee precursori, una mieloide ed una linfoide: dalla prima derivano i granulociti (neutrofili, basofili ed eosinofili) che, attraverso chemotassi, attirano gli antigeni, li inglobano e li distruggono a mezzo di enzimi litici, di perossido d'idrogeno e di altre sostanze chimiche; dalla seconda derivano, invece, linfociti e macrofagi.

E' ormai noto che la dieta gioca un ruolo molto importante nella regolazione del sistema immunitario, e sebbene gli studi riguardanti il possibile effetto dei peptidi presenti negli

alimenti sulla sua funzionalità siano ancora pochi, la ricerca in questo senso sembra molto promettente. A tale proposito possiamo distinguere due tipi principali di attività: quella immunomodulante propriamente detta, e quella antimicrobica, derivante da un'inibizione dei microrganismi patogeni.

### **2.3.1 Attività immunomodulante**

E' ormai noto che durante la digestione gastrointestinale, le caseine vaccine ed umane (si pensi al latte materno per i neonati) rilasciano una serie di peptidi con attività immunostimolante. Jollès et al.<sup>85</sup> sono stati i primi a dimostrare che il latte materno sottoposto ad idrolisi triptica possiede una spiccata attività di questo tipo; in particolare il peptide Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr, corrispondente alla sequenza 54-59 della  $\beta$ -caseina umana, ed isolata dall'idrolizzato triptico sopra citato<sup>86</sup>, si è mostrato molto efficace nello stimolare *in vitro* l'attività di fagocitosi dei macrofagi sia umani che murini, e nell'aumentare la resistenza all'infezione da *Klebsiella pneumoniae* nei topi<sup>87</sup>. Stessa attività immunostimolante è stata messa in evidenza anche per i frammenti f63-68 e f191-193 della  $\beta$ -caseina bovina, e f194-199 della  $\alpha_{S1}$ -caseina bovina<sup>88</sup>.

Recenti studi hanno dimostrato una buona attività immunostimolante in vivo anche per due peptidi molto abbondanti nei formaggi, derivanti dall'azione diretta della chimosina sulle caseine vaccine: il frammento 1-23 della  $\alpha_{S1}$ -caseina, e 193-209 della  $\beta$ -caseina<sup>89</sup>; anche in questo caso l'aspetto importante da sottolineare è che si tratta di peptidi naturalmente presenti nell'alimento, frutto dell'estensiva proteolisi a cui esso è sottoposto nel corso della produzione e del periodo di stagionatura.

Ancora adesso il meccanismo con cui peptidi derivanti dalle proteine del latte esplicano la loro attività immunomodulante non è del tutto chiarito, ed ancora non è stata definita una ben evidente relazione struttura-attività: sembrerebbe che la presenza di un residuo di arginina dal lato N- o C- terminale sia un elemento strutturale comune, che potrebbe essere in qualche modo coinvolto nell'interazione con specifici recettori presenti sulle membrane delle cellule effettrici.

### **2.3.2 Attività oppioide e sistema immunitario**

Numerose ricerche hanno dimostrato la presenza dei recettori oppioidi sulla superficie delle cellule immunitarie<sup>90</sup>, e che alcaloidi e peptidi attivi a livello dei recettori oppioidi agiscono anche sulle loro funzioni<sup>91</sup>.

Si è visto che la capacità di fagocitosi di macrofagi e di neutrofilii risulta inibita in seguito a somministrazione in vivo di morfina, e tale effetto è bloccato in seguito a somministrazione del Naltrexone, un potente antagonista dei recettori oppioidi<sup>92</sup>. La stessa morfina, ma anche oppioidi endogeni, inducono invece un aumento della chemotassi dei monociti e dei neutrofilii umani<sup>93</sup>, sebbene il pre-trattamento con oppioidi comporti per tali cellule un decremento della chemotassi mediata dai fattori chemotattici<sup>94</sup>.

Sono stati evidenziati anche effetti di oppioidi sulla liberazione di citochine<sup>95</sup>, mediatori della risposta immunitaria ed infiammatoria, e sulla proliferazione di linfociti T<sup>96</sup>.

Capire quale sia il meccanismo con cui gli oppioidi deprimano o stimolino è complicato dal fatto che queste risposte sono il risultato di interazioni con diverse popolazioni cellulari.

Numerosi altri lavori di ricerca mostrano come sia innegabile che i peptidi oppioidi endogeni modulino la risposta immunitaria<sup>97</sup>: la leu-enkefalina, derivante dalla pro-enkefalina, stimola la proliferazione dei linfociti T citotossici e dei linfociti T helper<sup>98</sup>. Anche dalla POMC si originano peptidi che stimolano *in vitro* la migrazione di monociti, neutrofilii e linfociti<sup>99</sup>.

### 2.3.3 Attività antimicrobica

Un altro aspetto molto importante è rappresentato dalla possibilità che peptidi derivanti dall'idrolisi delle caseine possano esplicare un'azione diretta di inibizione nei confronti di microrganismi patogeni; a questo proposito si è visto che la caseicidina, ottenuta dalla digestione delle caseine bovine ad opera della chimosina, presenta una spiccata attività protettiva nei confronti di un gran numero di microrganismi, quali *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae*, e *Streptococcus pyogenes*<sup>100</sup>. Analogamente la casocidina-I, un frammento cationico corrispondente alla sequenza 165-203 della  $\alpha$ S2-caseina ha mostrato un'attività di inibizione nei confronti della crescita di *Escherichia coli* e di *S. carnosus*<sup>101</sup>. Gli stessi peptidi 1-23 della  $\alpha$ S1-caseina, e 193-209 della  $\beta$ -caseina, che abbiamo visto presentare una discreta attività immunomodulante, e che sono presenti in elevate quantità nei formaggi in quanto derivanti dall'azione enzimatica della chimosina, hanno mostrato un'attività di tipo antibiotico: in particolare il primo, noto con il nome di isracidina, è in grado di inibire in vivo la proliferazione di *Streptomyces aureus* e di *Candida albicans*, e mostra una capacità protettiva nei confronti della mastite<sup>100</sup>; il secondo ha mostrato, invece, la capacità di incrementare l'attività antimicrobica dei macrofagi murini<sup>102</sup>.

## 2.4 Effetti sulla nutrizione

### 2.4.1 Trasporto degli oligoelementi

Il latte ed i suoi derivati sono considerati, per l'uomo, tra le risorse principali di calcio. L'assorbimento di questo importante minerale è stato per lungo tempo attribuito soltanto all'azione del lattosio, ma le conoscenze conseguite negli ultimi decenni hanno mostrato l'esistenza di un altro meccanismo di assorbimento del calcio, ad opera dei caseinofosfopeptidi (CPPs). Questi sono particolari sequenze di caseina fosforilate che, liberate in seguito alla digestione gastrointestinale<sup>103</sup>, sono in grado di sequestrare ioni calcio ed altri minerali, comportandosi così da biocarriers, e svolgendo un ruolo importante nella regolazione dell'equilibrio minerale, soprattutto per quanto riguarda il processo di calcificazione delle ossa. Sono attualmente note un gran numero di caseinofosfopeptidi che derivano da digestione *in vitro* o *in vivo* delle caseine vaccine<sup>104</sup>:  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ , e  $\beta$ : f43-58, f45-55, f59-79, f66-74, e f106-119 dalla  $\alpha_{S1}$ , f2-21, f46-70, f55-75, f126-136, e f138-149 dalla  $\alpha_{S2}$ , e f1-25, f1-28, e f2-28 dalla  $\beta$ <sup>77</sup>.

I caseinofosfopeptidi, in cui i gruppi fosfato sono presenti come monoesteri di residui di serina, sono accomunati dal presentare una sequenza di 3 residui fosfoserinici, seguiti da due residui di acido glutammico (SerP-SerP-SerP-Glu-Glu)<sup>79</sup>; tale elemento strutturale comune, essendo dotato di un elevato numero di cariche negative, conferisce un'elevata resistenza ai fenomeni proteolitici che ne comporterebbero la degradazione<sup>105</sup>, e rappresenta il sito di legame per i minerali<sup>75</sup>. E' stata dimostrata la capacità dei caseinofosfopeptidi di legare un gran numero di elementi, sia quelli più abbondanti (Ca, Mg e Fe), sia oligoelementi quali Zn, Ba, Cr, Ni, Co e Se; tuttavia tale capacità varia notevolmente da un peptide all'altra, in dipendenza dei residui amminoacidici di contorno all'elemento strutturale comune<sup>75</sup>.

Il legame del ferro ai fosfopeptidi determina un aumento dell'assorbimento di questo minerale, in quanto previene la formazione di idrossidi di ferro ad elevato peso molecolare, scarsamente assorbiti<sup>106</sup>, e questo effetto può essere sfruttato nel trattamento dell'anemia e dell'iposideremia; in modo analogo i CPPs incrementano l'assorbimento di zinco,  $\beta$ -CS f(1-25) primo fra tutti<sup>107</sup>, per cui si potrebbe pensare ad una loro aggiunta ad alimenti destinati a persone affette da patologie legate all'insufficienza di questo minerale.

Ma è soprattutto sugli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  del latte e dei prodotti caseari che si esplica l'azione sequestrante dei CPPs, con formazione di complessi solubili che vengono facilmente assorbiti, evitando la precipitazione, e quindi la perdita di calcio in forma di fosfato<sup>108</sup>; nel legame di questi ioni sono coinvolti sia i residui di serina fosforilati, sia i gruppi carbossilici liberi dei residui di glutammato<sup>79</sup>.

I trattamenti al calore possono comportare una minore biodisponibilità dei fosfopeptidi, in quanto si possono verificare fenomeni più o meno spinti di defosforilazione, con conseguente formazione di deidroalanina<sup>109</sup>.

### **2.4.2 Glicomacropptide**

Il glicomacropptide (GMP) si forma durante la produzione del formaggio ad opera del principale enzima proteasico del caglio, la chimosina, che idrolizza il legame peptidico tra la Phe 105 e la Met 106 della  $\kappa$ -caseina; questo taglio è alla base del processo di coagulazione, in quanto destabilizza le micelle caseiniche per rimozione della sequenza fortemente idrofila 106-169, nota con il nome di glicomacropptide, che rimane solubile nel siero. Si tratta di una sequenza peculiare nell'ambito della frazione caseinica, caratterizzata dalla presenza di catene zuccherine legate mediante legame O-glicosidico ai residui di serina e treonina sul lato C-terminale, e dalla totale assenza di ammino acidi aromatici, il che spiega la sua spiccata idrofilia; inoltre è notevolmente ricca di ammino acidi a catena laterale ramificata, cosa che assume una notevole importanza dal punto di vista nutrizionale, nel caso della dieta di persone affette da alcune patologie epatiche<sup>110</sup>. Inoltre è stato dimostrato che il GMP incrementa l'assorbimento di calcio, ferro e zinco<sup>111</sup>.

### **3. Fenomeni proteolitici nei prodotti lattiero-caseari e composizione della frazione peptidica**

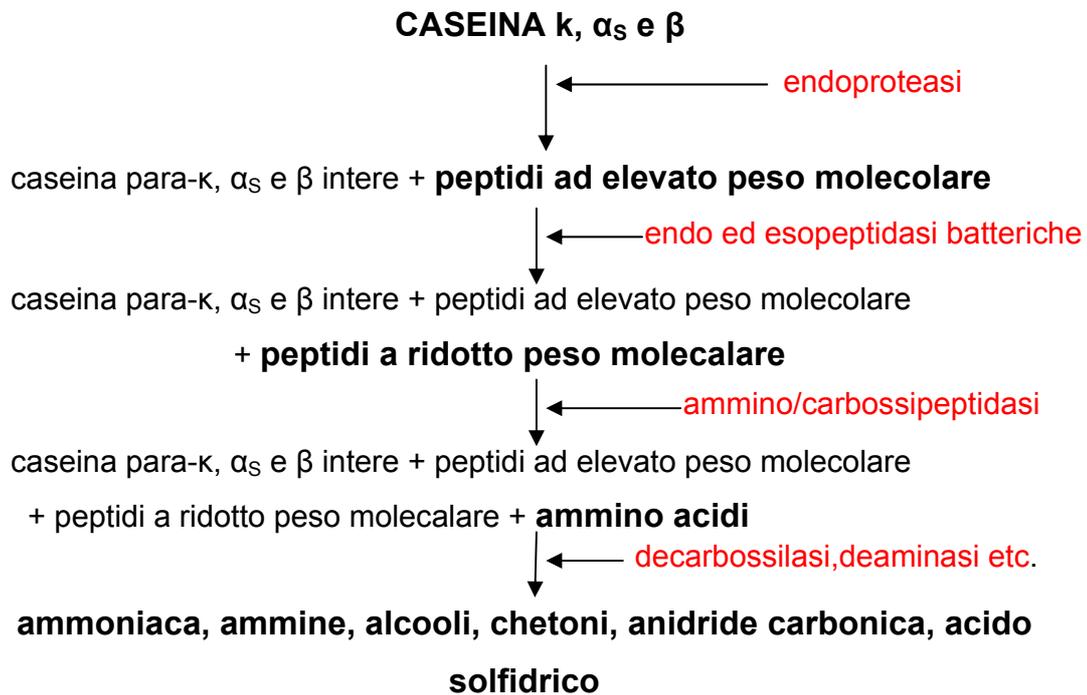
La maturazione rappresenta un insieme di fenomeni biochimici e fisici che trasformano la cagliata nel formaggio pronto al consumo. Tali fenomeni sono dovuti all'attività degli enzimi del latte, del caglio e dei microrganismi, e sono gestiti e regolati dalle condizioni applicate di temperatura, umidità relativa e ventilazione delle celle nonché dal processo di diffusione del sale all'interno della forma che contribuisce a regolare il quantitativo di acqua disponibile.

Le caratteristiche strutturali e organolettiche che un formaggio acquisisce durante il periodo di maturazione sono riconducibili sia alla proteolisi della caseina, sia alla lipolisi della sostanza grassa, nonché alla neutralizzazione della pasta dovuta al parziale utilizzo dell'acido lattico da parte dei lieviti e alla produzione di ammoniaca come prodotto finale del catabolismo degli amminoacidi. I cambiamenti biochimici che hanno luogo all'interno di un formaggio durante la maturazione possono essere raggruppati in diversi eventi primari che includono, tra quelli che più determinano le caratteristiche organolettiche e di consistenza del prodotto finale, il metabolismo del lattosio residuo, il metabolismo del lattato, il metabolismo del citrato, la lipolisi, e la proteolisi; a tali eventi primari seguono una serie di eventi biochimici secondari, quali il catabolismo degli acidi grassi e degli amminoacidi liberati in seguito alla lipolisi e proteolisi rispettivamente, che sono importanti ai fini della produzione di composti volatili responsabili dell'aroma del formaggio<sup>112</sup>.

#### **3.1 La proteolisi**

La proteolisi rappresenta il più complesso e, in molti casi, il più importante tra i fenomeni biochimici che hanno luogo nei formaggi durante la fase di maturazione, in quanto contribuisce ad una serie di cambiamenti molto importanti ai fini dello sviluppo delle caratteristiche di consistenza ed organolettiche del formaggio stesso<sup>113</sup>.

La proteolisi deriva dall'azione enzimatica che si esplica sulle caseine del latte ad opera di una serie di enzimi che, come vedremo, possono derivare da diverse fonti; dalle caseine si originano prodotti a minore peso molecolare, a loro volta degradati a peptidi, oligopeptidi ed infine amminoacidi liberi secondo una sequenza riportata in figura 3.1.



**Figura 3.1. Schema generale della proteolisi**

La degradazione delle caseine comporta una serie di effetti molto importanti: contribuisce al “softening” della consistenza del formaggio, e, determinando la formazione di peptidi via via a più basso peso molecolare, porta ad un consistente aumento nel numero di funzioni carbossiliche ed amminiche libere, con conseguente decremento dell’attività dell’acqua ( $a_w$ ); il processo proteolitico gioca un ruolo molto importante anche nello sviluppo delle caratteristiche di sapore del formaggio stesso, in quanto molti peptidi a basso peso molecolare (di- e tripeptidi), nonché molti ammino acidi, che rappresentano il prodotto ultimo della proteolisi, possiedono un particolare sapore (spesso amaro, soprattutto nel caso di composti con spiccata idrofobicità), e quindi la loro concentrazione nel prodotto finale sarà determinante ai fini del “flavour”; infine gli stessi amminoacidi liberati dal processo proteolitico sono a loro volta substrato di reazioni cataboliche che portano alla formazione di prodotti volatili responsabili dello sviluppo aromatico del formaggio.

La proteolisi è valutabile quantitativamente dal rapporto tra le varie forme d’azoto presenti nel formaggio pronto per il consumo, ed in particolare da descrittori quali NCN (azoto non caseinico), NPN (azoto non proteico), ed N (azoto ammino acidico) (tabella 3.1).

**Tabella 3.1. Rapporto delle componenti azotate in diversi formaggi**

	NCN/Ntot	NPN/Ntot	N AA/Ntot	Stagionatura gg
Parmigiano Reggiano	34	31	22	400
Provolone	23	20	13	120
Pecorino Toscano	25	21	6	120
Pecorino Toscano fresco	17	12	2	20
Gorgonzola	30	22	18	70

Il raggiungimento di tali valori, ovvero la curva che descrive l'evoluzione di questi parametri in funzione del tempo di maturazione, è specifica e caratteristica di ogni formaggio. Mentre le curve di evoluzione di NCN per il Parmigiano Reggiano, Provolone e Pecorino Toscano entro certi limiti possono essere considerate confrontabili, non altrettanto si può dire per il Gorgonzola, ove valore analoghi di NCN sono raggiunti dopo poco più di 60 giorni di stagionatura, rivelando una proteolisi accentuata e precoce.

In termini di schematizzazione grossolana la formazione di NCN potrebbe essere imputata maggiormente all'attività del caglio, plasmina ed endoproteasi microbiche, mentre la formazione di NPN sarebbe correlabile con l'attività di endo ed esopeptidasi microbiche. Gli ammino acidi derivano invece dall'azione di ammino e carbossipeptidasi.

### **3.2 Enzimi responsabili della proteolisi**

Le proteasi e peptidasi che catalizzano la proteolisi nei formaggi durante la stagionatura derivano essenzialmente da sei fonti principali:

- proteasi del caglio (chimosina);
- proteasi endogene del latte (plasmina e catepsina D);
- proteasi e peptidasi liberate dalle cellule delle colture starter (essenzialmente batteri lattici, LAB);
- proteasi provenienti dai microrganismi lattici non starter (NSLAB);
- proteasi e peptidasi di starter secondari (*Pr. freudenreichii*, nei formaggi tipo svizzero, *P. roqueforti* nei formaggi erborinati, *P. camemberti* nei formaggi tipo Brie e Camembert, etc.);

- proteasi e peptidasi esogene aggiunte al latte o al caglio per accelerare la stagionatura (proteasi derivanti dal carciofo, *Cynara cardunculus*, etc.).

### 3.2.1 Proteasi del caglio

In molte varietà di formaggio la maggiore fonte di attività proteolitica è rappresentata dall'attività coagulante residua, in particolare della chimosina, che rimane intrappolata nel coagulo durante la fase di spurgo del siero; tale attività residua, che dipende in generale da una serie di fattori quali temperatura di cottura e pH durante la spurgatura, è spesso superiore al 30% dell'attività del caglio aggiunta al latte<sup>114</sup>.

I siti di taglio attraverso i quali la chimosina esplica la sua attività proteolitica sulle caseine sono ormai ampiamente noti in letteratura: esperimenti condotti in soluzione hanno dimostrato la presenza di ben 7 siti di taglio sulla  $\beta$ -caseina<sup>115</sup>, molti dei quali sono localizzati in prossimità della sequenza idrofobica C-terminale; in particolare il taglio tra la Leu 192 e la Tyr 193 può portare alla formazione di una serie di oligopeptidi idrofobici dotati di uno spiccato sapore amaro. Anche l' $\alpha_{S1}$ -caseina possiede diversi siti di taglio, dei quali quello più noto, Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub><sup>116</sup>, determina il rilascio della sequenza  $\alpha_{S1}$ -CN f1-23, un peptide con un elevato contenuto di residui basici, che viene rapidamente degradato dalle peptidasi dei microrganismi starter. L' $\alpha_{S2}$ -caseina risulta molto più resistente all'azione di tale enzima, analogamente anche la *para*- $\kappa$ -caseina non sembrerebbe essere idrolizzata<sup>117</sup>, per quanto comunque contenga una serie di potenziali siti di taglio; ciò potrebbe essere dovuto al fatto che la *para*- $\kappa$ -caseina risulta in una struttura secondaria molto meno accessibile all'azione della chimosina<sup>118</sup>. In tabella 3.2 sono riportati i siti di taglio caratterizzati per la chimosina sulle caseine vaccine, molti dei quali coincidenti con le caseine ovine.

**Tabella 3.2. Siti di taglio della chimosina sulle caseine vaccine**

$\alpha$ S1 caseina	$\alpha$ S1 caseina	$\beta$ caseina
phe23-phe24	tyr159-pro160	leu192-tyr193
phe28-pro29	leu11-pro12	ala189-phe190
leu40-ser41	phe32-gly33	leu165-ser166
Leu149-phe150	leu101-lys102	gln167-ser168
Phe153-tyr154	leu142-ala143	leu139-leu140
Leu156-asp157	phe179-ser180	leu127-thr128

Altra proteasi molto importante del caglio bovino è la pepsina, che ha un'attività proteolitica addirittura superiore alla chimosina, con analogo specificità d'attacco; tuttavia, avendo un optimum di pH intorno a 2, la sua azione risulta fortemente limitata dal pH del mezzo, decisamente maggiore nei formaggi.

### 3.2.2 Proteasi endogene del latte

Il latte rappresenta una fonte molto importante di enzimi proteolitici, prima fra tutti la plasmina, una serina proteasi simile alla tripsina, proveniente dal sangue e con un optimum di attività a 37°C ed a pH 7,5.

Il ruolo fisiologico della plasmina consiste nella degradazione dei coaguli di fibrina durante il processo di coagulazione sanguigna, che come noto è finemente regolato: la plasmina, infatti, viene rilasciata a partire da una forma inattiva, il plasminogeno, ad opera degli attivatori del plasminogeno (PAs); l'attività della plasmina è a sua volta contrastata dagli inibitori della plasmina e dei PAs, che, insieme ai succitati componenti, fanno parte di un sistema di regolazione molto complesso, interamente riscontrato nel latte. In particolare la plasmina, il plasminogeno e i PAs sono principalmente associate alle micelle caseiniche, mentre gli inibitori sono dispersi nel siero, e quindi vengono persi durante la fase di drenaggio, garantendo così un prolungamento dell'attività proteolitica della plasmina durante la stagionatura.

Tale attività si esplica principalmente (di qui la somiglianza con la tripsina) a livello dei residui basici, in particolare a livello dei legami peptidici del tipo Lys-X e Arg-X, ed interessa soprattutto la  $\beta$ - e l' $\alpha$ S2-caseina, in misura minore l' $\alpha$ S1-caseina, mentre la  $\kappa$ -caseina risulta ancora una volta resistente alla sua azione proteolitica<sup>119</sup>. I principali siti di taglio della plasmina sulla  $\beta$ -caseina sono i tre legami Lys<sub>28</sub>-Lys<sub>29</sub>, Lys<sub>105</sub>-His<sub>106</sub> e Lys<sub>107</sub>-

Glu<sub>108</sub>, che generano, dal lato amminico, le tre  $\gamma$ -caseine,  $\gamma$ 1 ( $\beta$ -CN f29-209),  $\gamma$ 2 ( $\beta$ -CN f106-209),  $\gamma$ 3 ( $\beta$ -CN f108-209), e, dal lato carbossilico, i proteoso-peptoni PP8 fast ( $\beta$ -CN f1-28), PP8 slow ( $\beta$ -CN f29-105 e f29-107), e PP5 ( $\beta$ -CN f1-105 e f1-107). L'attività proteolitica della plasmina gioca un ruolo molto importante soprattutto nelle varietà di formaggio che sono cotte ad alta temperatura (Swiss-type), in quanto tale enzima, relativamente stabile alle temperature di cottura (circa 55°C), preserva la sua azione, a differenza della chimosina, che viene quasi totalmente inattivata dal calore; inoltre lo stesso calore inattiva molti degli inibitori dei PAs e della plasmina, risultando in un certo incremento dell'azione proteolitica<sup>120</sup>.

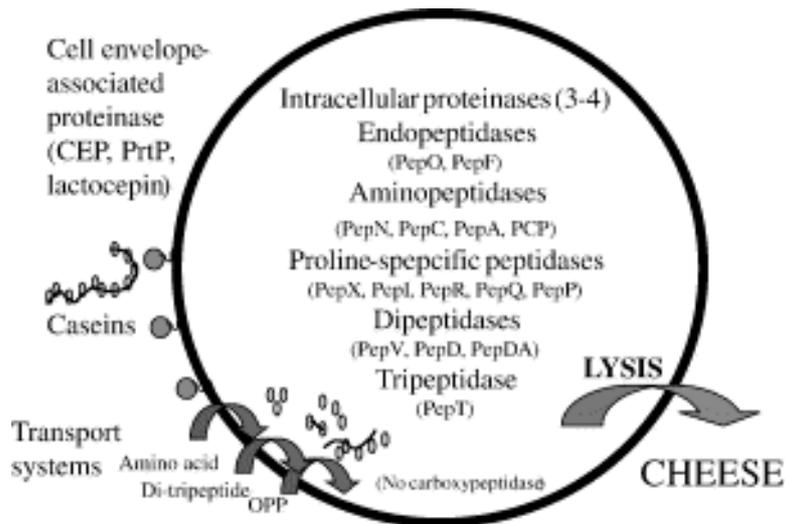
Il latte contiene anche altre proteasi indigene, provenienti in principal modo dalle cellule somatiche; queste ultime possiedono un corredo proteasico molto ricco (catepsine B, D, G, H, L, ed elastasi)<sup>121</sup>, ma solo la presenza delle catepsine B e D è stata confermata all'interno del latte. Mentre del ruolo giocato dalla catepsina B nel processo proteolitico si sa ancora molto poco<sup>122</sup>, risulta ben nota l'azione della catepsina D, un'aspartil proteasi con un optimum di attività a 37°C ed a pH 4<sup>123</sup>; essa deriva da un precursore inattivo, la procatepsina D, da cui viene rilasciata, mediante attività autocatalitica, in forma di pseudocatepsina, a sua volta convertita in forma attiva da una tiolo proteasi. La specificità della catepsina D, soprattutto a livello della  $\alpha$ <sub>S1</sub>-caseina, è molto simile a quella della chimosina, motivo per cui risulta difficile conoscere il suo ruolo effettivo nell'ambito del processo proteolitico; tuttavia si tratta di un ruolo marginale, in quanto l'enzima si trova soprattutto nella fase serica del latte, e come tale viene perso in modo consistente durante la manifattura del formaggio, senza contare che la sua resistenza ai trattamenti termici risulta alquanto limitata<sup>124</sup>.

### **3.2.3 Proteasi e peptidasi dei batteri lattici starter e non starter (LAB-NSLAB)**

Gli starter microbici comunemente usati nella produzione dei formaggi includono batteri lattici mesofili, per lo più *Lactococcus* e *Leuconostoc* spp., e batteri lattici termofili, ascrivibili ai *Lactobacillus* spp. e agli *Streptococcus thermophilus*; il ruolo principale delle colture starter consiste nel determinare un abbassamento del pH attraverso la produzione di acido lattico.

L'azoto amminoacidico presente nel latte, spesso non supporta in modo sufficiente la crescita dei batteri lattici che devono attingere l'azoto necessario alla loro moltiplicazione

dai peptidi liberati dalle proteine del latte, motivo per cui, pur avendo una debole capacità proteasica, essi sono dotati di un complesso sistema proteinasico/peptidasico capace di idrolizzare peptidi di grosso peso molecolare ad oligopeptidi ed ammino acidi<sup>125</sup>; molto studiato è quello di *Lactococcus*, costituito principalmente da una proteinasi associata alla membrana cellulare [cell envelope-associated proteinase (CEP) o lattocepina] e da una serie di proteinasi e peptidasi intracellulari (figura 3.2).



**Figura 3.2. Sistema proteolitico di *Lactococcus***<sup>129</sup>

La lattocepina di *lactococcus* è una serina proteasi con un optimum di pH tra 5,5 e 6,5, ed è stata caratterizzata biochimicamente e geneticamente per un gran numero di ceppi di questo microrganismo; il suo ruolo primario consiste nel degradare le caseine allo scopo di fornire una serie di peptidi a corta catena che, una volta trasportati all'interno della cellula, diventano substrato per le peptidasi intracellulari, con formazione degli amminoacidi essenziali per il microrganismo. Ai fini del processo proteolitico nel formaggio, la lattocepina agisce principalmente degradando i peptidi a peso intermedio liberati dall'azione della chimosina, con una specificità nota per la proteasi di un gran numero di ceppi.

Per quanto riguarda il sistema proteolitico intracellulare, mentre si conosce poco degli effetti delle proteasi sul pattern proteolitico, un ruolo fondamentale è invece svolto dalle numerose peptidasi, che possono essere raggruppate, per comodità, in cinque gruppi principali: oligoendopeptidasi, tripeptidasi, dipeptidasi, aminopeptidasi, e peptidasi prolina-specifiche<sup>126</sup>.

Del primo gruppo ben caratterizzate sono soprattutto PepO e PepF, due metalloendopeptidasi monomeriche con una specificità di substrato molto variabile da ceppo a ceppo<sup>125</sup>, così come molto studiate sono state le aminopeptidasi (PepN, PepC, PepA, PepG e PepL), responsabili del rilascio ultimo di ammino acidi<sup>126</sup>; non sembra invece che *Lactococcus* sia in grado di sintetizzare delle carbossipeptidasi.

Le caseine sono proteine molto ricche di residui di prolina, ed i legami peptidici che li coinvolgono vengono difficilmente riconosciuti dalle normali peptidasi; per questo motivo i batteri lattici sintetizzano una serie di enzimi in grado di agire a livello dei legami contenenti la prolina: tra questi ben nota è la PepX, una serina dipeptidilamminopeptidasi dimerica in grado di liberare dipeptidi di tipo X-Pro dall'estremità N-terminale di oligopeptidi<sup>125</sup>.

Durante la maturazione di diversi tipi di formaggio, la popolazione dei batteri lattici utilizzati come starter comincia a decrescere, permettendo alla scarsa microflora lattica indigena del latte di prendere il sopravvento e diventare la popolazione batterica predominante entro già quattro settimane di stagionatura, mantenendosi per lungo tempo a livelli costanti<sup>127</sup>; tale microflora, un'eterogenea popolazione di specie mesofile e termofile, etero ed omofermentanti, la cui presenza è strettamente influenzata dall'igiene del caseificio e dall'ambiente circostante, possiede un corredo proteolitico del tutto simile a quello visto in precedenza, e garantisce il prosieguo della proteolisi durante le fasi più avanzate della stagionatura, con formazione di peptidi via via a più basso peso molecolare e di amminoacidi<sup>128</sup>, e conseguente sviluppo di un bouquet di aromi e sapori tipici che contraddistinguono le varietà di formaggio.

I microrganismi lattici non starter contribuiscono alla proteolisi del formaggio in modo proporzionale al carico microbico nel latte, sicuramente non trascurabile anche dopo eventuali pastorizzazioni, e determinante nei formaggi "pecorino", dove il latte ha cariche microbiche dopo mungitura anche 10 o 20 volte superiori rispetto al latte vaccino.

### **3.2.4 Proteasi e peptidasi di starter secondari**

Sebbene il sistema proteolitico dei batteri lattici contribuisca alla maturazione di quasi tutti i formaggi, ci sono alcune tipologie in cui colture secondarie vengono aggiunte intenzionalmente, e incoraggiate a crescere controllando le condizioni ambientali, con lo scopo diverso da quello di produrre un abbassamento di pH mediante la produzione di acido lattico<sup>129</sup>.

Tali colture secondarie possono svilupparsi sulla superficie, nel caso di formaggi “smear-ripened” (Tilsit, Gruyere, etc.) e “mould-ripened” (Camembert, Brie), portare alla produzione di CO<sub>2</sub>, propionato, ed acetato, nel caso delle tipologie svizzere (Emmental, Comtè), o comportare la formazione delle classiche erborinature dei cosiddetti “blue cheeses” (Gorgonzola, Roquefort, Danablu, etc.). I principali microrganismi delle colture starter secondarie sono *Penicillium roqueforti* (Blue cheeses), *Penicillium camemberti* (Camembert, Brie), e *Propionibacterium freundereichii* (Swiss-type cheeses), i quali vengono generalmente inoculati nel latte insieme ai batteri lattici usati come starter; questi stessi microrganismi sono a loro volta dotati di un sistema proteolitico caratteristico che può andare ad influenzare in modo più o meno marcato lo sviluppo proteolitico di quella determinata tipologia di formaggio.

*P. roqueforti* e *P. camemberti* producono una serie di aspartil e metalloproteasi che sono state ben caratterizzate, anche per quanto riguarda la loro specificità sulla caseina<sup>130</sup>, e che giocano un ruolo importante nella stagionatura dei formaggi a cui vengono aggiunti; analogamente, *Propionibacterium* spp., che presentano solo una debole attività proteasica, possiedono una serie di peptidasi particolarmente attive sui peptidi ricchi di residui di prolina<sup>131</sup>, e questo può contribuire al particolare sviluppo aromatico e di sapore delle tipologie svizzere.

### 3.2.5 Sostituti del caglio

Il caglio tradizionale deriva dalla macerazione in salamoia, per 10-20 ore a 20°C e pH 4, di frammenti essiccati di abomaso di vitello; il succo viene successivamente filtrato ed essiccato in ambiente tiepido. Alternativamente il caglio può essere prodotto anche in pasta, per triturazione dell'abomaso.

Tuttavia, negli ultimi tempi, si sta diffondendo sempre più la pratica di ottenere la coagulazione delle micelle caseiniche utilizzando dei sostituti del caglio; a tale proposito, molto studiate sono le pepsine bovine, porcine o di pollo, alcune proteasi di origine microbica<sup>132</sup>, quali quelle prodotte da *Rhizomucor mihei*, *R. pusillus*, o *Cryphonectria parasitica*, ma soprattutto le cosiddette “chimosine ricombinanti”, derivanti dall'espressione del gene della chimosina in vari tipi di microrganismi (*Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, etc.), tutte con una specificità di taglio molto simile a quella della chimosina. Le chimosine ricombinanti non possono essere usate in tutti i paesi, o comunque vanno incontro ad una serie di restrizioni (non possono essere usate nella produzione di

formaggi ad origine protetta), sebbene attualmente coprano il 35% del mercato degli enzimi coagulanti<sup>132</sup>.

Molto studiate come sostituti del caglio sono state anche una serie di proteasi aspartiche di origine vegetale, che tuttavia hanno mostrato una bassa attività coagulante, anche se dotate in molti casi di un'elevata capacità proteolitica; l'unica eccezione è rappresentata dalle proteasi estratte dai fiori del cardo selvatico (*Cynara cardunculus*).

Le proteasi di *Cynara cardunculus* possiedono un'elevata capacità coagulante, e vengono usate da molto tempo nella produzione di alcuni formaggi tipici della Penisola Iberica<sup>133</sup>; l'estratto dei fiori di questa pianta è caratterizzato principalmente dalla presenza di due proteinasi, cardosina A e cardosina B, la cui specificità di taglio è stata estensivamente studiata<sup>134</sup>: mentre la seconda mostra una specificità simile a quella della pepsina, la cardosina A presenta un'attività chimosino-simile, e come tale è principalmente coinvolta nel processo di coagulazione, svolgendo una successiva attività proteolitica a carico delle caseine del tutto simile a quella della chimosina.

### **3.3 Confronto tra il profilo di proteolisi di diverse varietà di formaggio**

Volendo stabilire un pattern di proteolisi valido in modo generale per molte tipologie di formaggio, si parte dalle caseine del latte che vengono inizialmente idrolizzate ad opera dell'attività coagulante residua ritenuta dal coagulo e delle proteasi indigene del latte, plasmina in primis, a formare una serie di peptidi a grosso e medio peso molecolare; questi ultimi diventano a loro volta substrato per le proteasi e le peptidasi dei microrganismi starter e non, che li degradano a peptidi a basso peso molecolare ed ammino acidi.

Tuttavia il profilo ed il grado di proteolisi variano molto da una varietà di formaggio ad un'altra, per via delle diverse metodologie di produzione, che possono variare per la temperatura di cottura, il pH durante la fase di drenaggio del siero, il tempo di stagionatura, le condizioni di umidità, l'attività coagulante residua, il possibile sviluppo di una microflora secondaria altamente proteolitica, etc.; tali differenze rendono il pattern di proteolisi sostanzialmente unico e caratteristico per ciascuna tipologia di formaggio.

In generale si può affermare che una più prolungata stagionatura corrisponde ad un arricchimento della frazione oligopeptidica ed amminoacidica (sebbene si debba tener

conto di tutta una serie di altri fattori), mentre formaggi poco stagionati presentano un basso indice di azoto solubile a pH4,6.

Le prime fasi della proteolisi sono abbastanza simili nelle diverse varietà di formaggio<sup>114</sup>: uno dei primi siti di taglio ad essere attaccato è il legame Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub> dell' $\alpha_{S1}$ -caseina ad opera della chimosina, ad eccezione di quei formaggi caratterizzati da elevate temperature di cottura (Swiss-cheeses), in cui la chimosina viene rapidamente inattivata dal calore, e la plasmina, più resistente, diventa l'agente proteolitico principale; in seguito a tale taglio viene liberato da un lato l'oligopeptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23), dall'altro il polipeptide  $\alpha_{S1}$ -CN f24-199, che a loro volta diventano substrato per l'azione di altri enzimi proteolitici.

Nei formaggi erborinati il corredo proteolitico del *P.Roqueforti* degrada rapidamente tali frammenti, insieme alla  $\beta$ -caseina, con la conseguenza che alla fine del processo di maturazione le caseine sono completamente idrolizzate<sup>130</sup>; nelle tipologie svizzere, invece, la  $\beta$ -caseina viene degradata più velocemente rispetto all' $\alpha_{S1}$ -caseina, con concomitante incremento nei livelli delle  $\gamma$ -caseine, ad indicare che, come detto prima, l'attività proteolitica della plasmina risulta particolarmente spiccata in questi formaggi. Un andamento comune ai Swiss-cheeses è riscontrabile anche in formaggi particolarmente freschi quali la mozzarella, le cui temperature di cottura abbastanza elevate comportano una parziale inattivazione della chimosina<sup>135</sup>, sebbene il breve periodo di maturazione fa sì che l'indice di proteolisi di questi formaggi sia molto basso; invece formaggi come il Parmigiano-Reggiano, anch'essi cotti ad elevata temperatura, risultano ampiamente proteolizzati ad opera della plasmina e dei batteri lattici a causa degli elevati periodi di stagionatura (dai 12 mesi in poi)<sup>136</sup>.

Fino ad oggi sono stati caratterizzati i peptidi principali di molte varietà di formaggio: tra queste quella maggiormente caratterizzata dal punto di vista del profilo oligopeptidico è il Cheddar<sup>137</sup>.

## 4. Bibliografia

---

- <sup>1</sup> Belitz, H.D.; Grosch, W. *Food Chemistry*, 2<sup>nd</sup> edn, pp 257-267. Eds. Berlin: Springer.
- <sup>2</sup> Kawaii, M.; Chorev, J.; Marin-Rose, J.; Goodman, J. (1980) *J Med Chem*, **23**, 420.
- <sup>3</sup> Ohyama, S., et all. (1998) *Agric Biol Chem*, **54**, 125.
- <sup>4</sup> Arai, S.; Yamashita, H.; Kato, H.; Fujimaki, M. (1970) *Agric Biol Chem*, **34**, 729.
- <sup>5</sup> Minagawa, E.; Kaminogawa, S.; Tsukasaki, F.; Yamauchi, K. (1989) *J Food Sci*, **54**, 1225.
- <sup>6</sup> Lee, K.D.; Warthesen, J.J. (1995) *J Dairy Sci*, **8**, 102.
- <sup>7</sup> Cliffe, A.B.; Law, A.J. (1990) *Food Chem*, **36**, 73.
- <sup>8</sup> Otagiri, K.; Noshio, Y.; Shinoda, I.; Fukui, H.; Okai, H. (1985) *Agric Biol Chem*, **49**, 1019.
- <sup>9</sup> Roudot-Algaron, F.; Le Bars, D.; Einhorn, J.; Adda, J.; Grippon, J.C. (1993) *J Food Sci*, **58**, 1005.
- <sup>10</sup> Cambero, M.I.; Seuss, I.; Honikel, K.O. (1992) *J Food Sci*, **57**, 1285.
- <sup>11</sup> Hansen-Moller, J.; Hinrichsen, L.; Jacobsen, T. (1997) *J Agric Food Chem*, **45**, 3123.
- <sup>12</sup> Shimizu, M.; Lee, S.W.; Kaminogawa, S.; Yamauchi, K. (1984) *J Food Sci*, **49**, 1117.
- <sup>13</sup> Vergarud, G.E.; Langsrud, T. (1989) *J Dairy Res*, **56**, 375.
- <sup>14</sup> Fujimaki, M. (1981) *Rev Agroquim Tecnol Aliment*, **21**, 299.
- <sup>15</sup> Sharpe, F.R.; Jacques, D.; Rowsell, A.G.; Whitear, A.L. Proceedings of the 18<sup>th</sup> EBC Congress. Copenhagen 1981, pp 607-614.
- <sup>16</sup> Turgeon, S.L.; Gauthier, S.F.; Paquin, P. (1991) *J Agric Food Chem*, **39**, 673.
- <sup>17</sup> Shimizu, M.; Lee, S.W.; Kaminogawa, S.; Yamauchi, K. (1984) *J Food Sci*, **51**, 1248.
- <sup>18</sup> Meisel, H.; Bockelmann, W. (1999) *Anton Leeuw Int J G*, **76**, 207-215.
- <sup>19</sup> Silva, S.V.; Malcata, F.X. (2005) *Int Dairy J*, **15**, 1-15.
- <sup>20</sup> Li, G.H.; Le, G.W.; Shi, Y.H.; Shrestha, S. (2004) *Nutr Res*, **24**, 469-486.
- <sup>21</sup> Mullally, M.M.; Meisel, H.; FitzGerald, R.J. (1997) *Int Dairy J*, **7**, 299.
- <sup>22</sup> Fujita, H.; Yoshikawa, M. (1999) *Immunopharmacology*, **44**, 123.
- <sup>23</sup> Yoshikawa, M.; Fujita, H.; Matoba, N.; Takenaka, Y. et al. (2000) *Biofactors*, **12**, 143.
- <sup>24</sup> FitzGerald, R.J.; Murray, B.A.; Walsh, D.J. (2004) *J Nutr*, **134**, 980S- 988S.
- <sup>25</sup> Teschemacher, H. (2003) *Curr Pharm Des*, **9**, 1331-1344.
- <sup>26</sup> Zioudru, C.; Streaty, R.A.; Klee, W.A. (1979) *J Biol Chem*, **254**, 2446.

- 
- <sup>27</sup> Park, C.B.; Lee, H.L.; Park, I.Y.; Kim, M.S.; Kim, S.C. (1997) *FEBS Lett*, **411**, 173.
- <sup>28</sup> Nakamura, T.; Sado, H.; Syukunobe, Y.; Hirota, T. (1993) *Milchwissenschaft*, **48**, 667.
- <sup>29</sup> Adachi, S.; Kimura, Y.; Murakami, K.; Matsuno, R.; Yokogoshi, H. (1991) *Agric Biol Chem*, **55**, 925.
- <sup>30</sup> Kuchroo, C.N.; Fox, P.F. (1982) *Milchwissenschaft*, **37**, 331.
- <sup>31</sup> Wu, S.H. (1982) *J Chromatogr*, **245**, 268.
- <sup>32</sup> Medina, A.B.; Phillips, J.G. (1982) *J Agric Food Chem*, **30**, 1250.
- <sup>33</sup> Collar, C.; Prieto, J.A.; Mascaros, A.F.; Benedito de Barber, C. (1989) *Rev Agroquim Tecnol Aliment*, **29**, 266.
- <sup>34</sup> Harwalkar, V.R.; Elliot, J.A. (1971) *J Dairy Sci*, **54**, 8.
- <sup>35</sup> Yvon, M.; Chabanet, C.; Pelissier, J.P. (1989), *Intl J Pept Protein Res*, **34**, 166.
- <sup>36</sup> Bican, P.; Spahni, A. (1991) *Lebensm-Wiss Technol*, **24**, 315.
- <sup>37</sup> Gonzales de Llano, D.; Ramos, M.; Polo, M.C. (1987) *Chromatographia*, **23**, 764.
- <sup>38</sup> Kaiser, K.P.; Belitz, H.D.; Fritsch, R.J. (1992) *Z Lebensm Unters Forsch*, **195**, 8.
- <sup>39</sup> Schluter, H.; Krivoy, N.; Hurster, A.; Ingendoh, A.; Karas, M.; Zidek, W. (1992) *J Chromatogr*, **625**, 3.
- <sup>40</sup> Saito, T.; Yoshida, T.; Itoh, T. (1993) *Intl Dairy J*, **3**, 129.
- <sup>41</sup> Rothenbuhler, E.; Waibel, R.; Solms, J. (1979) *Anal Biochem*, **97**, 367.
- <sup>42</sup> Bennett, H.P.J.; Hudson, A.M.; McMartin, C.; Purdon, G.E. (1977) *Biochem J*, **168**, 9.
- <sup>43</sup> Voirin, A.; Letavernier, J.F.; Sebille, B. (1991) *J Chromatogr*, **553**, 155.
- <sup>44</sup> Bican, P.; Spahni, A. (1993) *Intl Dairy*, **3**, 73.
- <sup>45</sup> Spanier, A.M.; Edwards, J.V. (1987) *J Liq Chromatogr*, **10**, 2745.
- <sup>46</sup> Pilhanto-Leppälä, A.; Antila, P.; Mäntsälä, P.; Hellman, J. (1994) *Intl Dairy J*, **4**, 291.
- <sup>47</sup> Bumberger, E.; Belitz, H.D. (1993) *Z Lebensm Unters Forsch*, **197**, 14.
- <sup>48</sup> Spanier, A.M.; Edwards, J.V.; Duphy, A.P. (1988) *Food Technol*, **42**, 112.
- <sup>49</sup> Moreno-Arribas, V.; Pueyo, E.; Polo, M.C. (1996) *J Agric Food Chem*, **44**, 3783.
- <sup>50</sup> Strange, E.D.; Malin, E.L.; Van Hekken, D.L.; Bash, J. (1992) *J Chromatogr*, **624**, 81.
- <sup>51</sup> Carnegie, P.R.; Ilic, M.Z.; Etheridge, M.O.; Collins, M.G. (1983) *J Chromatogr*, **261**, 153.
- <sup>52</sup> Olieman, C.; Van Riel, J.M.A. (1989) *Neth Milk Dairy J*, **43**, 171.
- <sup>53</sup> Swank, R.T.; Munkres, K.D. (1971) *Anal Biochem*, **39**, 462.
- <sup>54</sup> Strickland, M.; Johnson, M.E.; Broadbent, J.R. (2001) *Electrophoresis*, **22**, 1510.

- 
- <sup>55</sup> Flores, M.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F. (1999) *Z Lebensm Unters Forsch*, **208**, 264.
- <sup>56</sup> Medina, I.; Aubourg, S.; Gallardo, J.M. (2000) *Eur Food Res Technol*, **210**, 353.
- <sup>57</sup> Strickland, M.; Weimer, B.; Broadbent, J.R. (1996) *J Chromatogr A*, **731**, 305.
- <sup>58</sup> Friedman, M. (2004) *J Agr Food Chem*, **52**, 385-406.
- <sup>59</sup> Alomirah, H.F.; Alli, I.; Konishi, Y. (2000) *J Chromatogr A*, **893**, 1.
- <sup>60</sup> Sforza, S.; Ferroni, L.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R. (2003) *J Agr Food Chem*, **51**, 2130-2135.
- <sup>61</sup> Gagnaire, V.; Pierre, A.; Molle, D.; Leonil, J. (1996) *J. Dairy Res*, **63**, 405.
- <sup>62</sup> Henry, G.; Molle, D.; Morgan, F.; Fauquant, J.; Bouhallab, S. (2002) *J Agric Food Chem*, **50**, 185.
- <sup>63</sup> Sforza, S.; Pigazzani, A.; Motti, M.; Porta, C.; Virgili, R.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R. (2001) *Food Chem*, **75**, 267.
- <sup>64</sup> Alomirah, H.F.; Alli, I.; Konishi, Y. (1998) *J Chromatogr*, **893**, 1.
- <sup>65</sup> Weiss, K.C.; Tai-Yung, Y.; Hutchens, T.W.; Bisson, L.F. (1998) *American J Enol Viticult*, **49**, 231.
- <sup>66</sup> Jollès, P.; Levy-Toledano, S.; Fiat, A.M.; Soria, C.; Gillesen, D.; Thomaidis, A.; Dunn, F.W.; Caen, J. (1986) *Eur J Biochem*, **158**, 379-382.
- <sup>67</sup> Gill, H.S.; Doull, F.; Rutherford, K.J.; Cross, M.L. (2000) *Brit J Nutr*, **84**, S111-S117.
- <sup>68</sup> Meisel, H.; Fitzgerald, R.J. (2003) *Curr Pharm Des*, **9**, 1289-1295.
- <sup>69</sup> Maruyama, S.H.; Mitachi, H.; Tanaka, H.; Tomizuka, N.; Suzuki, H. (1987) *Agric Biol Chem*, **51**, 1581-1586.
- <sup>70</sup> Tauzin, J.; Miclo, L.; Gaillard, J.L. (2002) *FEBS Lett*, **531**, 369-374.
- <sup>71</sup> Gómez-Ruiz, J.A.; Ramos, M.; Recio, I. (2002) *Int Dairy J*, **12**, 697-706.
- <sup>72</sup> Jollès, P. (1975) *Mol Cell Biochem*, **7**, 73-85.
- <sup>73</sup> Jollès, P.; Loucheux-Lefèbvre, M.H.; Henschen, A. (1978) *J Mol Evol*, **11**, 271-277.
- <sup>74</sup> Fiat, A.M.; Migliore, D.; Jollès, P. (1993) *J Dairy Sci*, **76**, 301-310.
- <sup>75</sup> Meisel, H. (1998) *Int Dairy J*, **8**, 363-373.
- <sup>76</sup> Brantl, V.; Teschemacher, A.; Henschen, A.; Lottspeich, F. (1979) *Hoppe Seyler's Zeitschrift fur Physiologische Chemie*, **360**, 1211-1216.
- <sup>77</sup> Smacchi, E.; Gobetti, M. (2000) *Food Microb*, **17**, 129-141.
- <sup>78</sup> Svedberg, J.; de Haas, J.; Leimenstoll, G.; Paul, F.; Teschemacher, H. (1985) *Peptides*, **6**, 825-830.

- 
- <sup>79</sup> Meisel, H. (1997) *Biopolymers*, **43**, 119-128.
- <sup>80</sup> Sturner, R.A.; Chang, K.J. (1988) *Pediatric Research*, **23**, 4-10.
- <sup>81</sup> Loukas, S.; Varoucha, D.; Zioudrou, C.; Streaty, R.A.; Klee, W.A. (1983) *Biochemistry*, **22**, 4567-4573.
- <sup>82</sup> Meisel, H.; Schlimme, E. (1990) *Trends Food Sci Technol*, **1**, 41-43.
- <sup>83</sup> Xu, R.J. (1998) *Food Rev Int*, **14**, 1-16.
- <sup>84</sup> Chiba, H.; Tani, F.; Yoshikawa, M. (1989) *J Dairy Res*, **56**, 363-366.
- <sup>85</sup> Jollès, P. et al. (1981) *Journal of Immunopharmacology*, **3**, 363-369.
- <sup>86</sup> Parker, F. et al. (1984) *Eur J Biochem*, **145**, 677-682.
- <sup>87</sup> Migliore-Samour, D.; Floch, F.; Jollès, P. (1989) *J Dairy Res*, **56**, 357-362.
- <sup>88</sup> Migliore-Samour, D.; Jollès, P. (1988) *Experientia*, **44**, 188-193.
- <sup>89</sup> Minkiewicz, P.; Slangen, C.J.; Dziuba, J.; Visser, S.; Mioduszevska, H. (2000) *Milchwissenschaft*, **55**, 14-17.
- <sup>90</sup> Sharp, B.M. et al. (1998) *J Neuroimmunol*, **83**, 45-56.
- <sup>91</sup> McCarthy et al. (2001) *Drug and Alcohol Dependence*, **62**, 111-123.
- <sup>92</sup> Rojavin, M.; Szabo, I.; Bussiere, J. et al. (1993) *Life Sci*, **53**, 997-1006.
- <sup>93</sup> Van Epps, D.E.; Saland, L. (1984) *J Immunol*, **132**, 3046-3053.
- <sup>94</sup> Perez-Castrillon, J.P.; Perez-Arellano, J.; Garcia-Palomo, J. et al. (1992) *Immunopharmacology*, **23**, 57-61.
- <sup>95</sup> Brown, S.L.; Van Epps, D.E. (1986) *Cell Immunol*, **103**, 19-26.
- <sup>96</sup> Eisenstein, T.K.; Hilburger, M.E. (1998) *J Neuroimmunol*, **83**, 36-44.
- <sup>97</sup> Roda, L.G. et al. (1996) *International Journal of Immunopharmacology*, **18**, 1-16.
- <sup>98</sup> Faith, R.E. et al. (1984) *Clinical Immunology and Immunopathology*, **31**, 412-418.
- <sup>99</sup> Lefebvre, C. et al. (2000) *M/S Medicine/Science*, **16**, 235-42.
- <sup>100</sup> Lahov, E.; Regelson, W. (1996) *Food Chem Toxicol*, **34**, 131-145.
- <sup>101</sup> Zucht, H.D.; Raida, M.; Adermann, K.; Magert, H.J.; Forssman, W.G. (1995) *FEBS Lett*, **372**, 185-188.
- <sup>102</sup> Sandre, C.; Gleizes, A.; Forestier, F.; Gorges-Kergot, R.; Chilmonczyk, S.; Leonil, J.; Moreau, M.C.; Labarre, C. (2001) *J Nutr*, **131**, 2936-2942.
- <sup>103</sup> Chabance, B.; Marteau, P.; Rambaud, J.C.; Migloire-Samour, D.; Boynard, M.; Perrotin, P.; Guillet, R.; Jollès, P.; Fiat, A.M. (1998) *Biochimie*, **80**, 155-165.
- <sup>104</sup> Kitts, D. (1994) *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **72**, 423-434.

- 
- <sup>105</sup> Kasai, T.; Iwasaki, R.; Tanaka, M.; Kiriya, S. (1995) *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **59**, 26-30.
- <sup>106</sup> Ait-Oukhtar, N.; Bouhallab, S.; Arhan, P.; Maubois, J.L.; Drosowsky, M.; Bougle, D. (1999) *J Agric Food Chem*, **47**, 2786-2790.
- <sup>107</sup> Peres, J.M.; Bouhallab, S.; Petit, C.; Bureau, F.; Maubois, J.L.; Arhan, P.; Bougle, D. (1998) *Reproduction, Nutrition & Development*, **38**, 465-472.
- <sup>108</sup> Sato, R.; Naguchi, T.; Naito, H. (1986) *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **32**, 67-76.
- <sup>109</sup> Meisel, H.; Andersson, H.B.; Buhl, K.; Ebersdobler, H.F.; Schlimme, E. (1991) *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, **30**, 227-232.
- <sup>110</sup> El-Salam, A.; El-Shibiny, S.; Buchleim, W. (1996) *Int Dairy J*, **6**, 327-341.
- <sup>111</sup> Kelleher, S.L.; Chatterton, D.; Nielsen, K.; Lonnerdal, B. (2003) *The American Journal of Clinical Nutrition*, **77**, 1261-1268.
- <sup>112</sup> McSweeney, P.L.H. (2004) *Int J Dairy Technol*, **57**, 127-144.
- <sup>113</sup> Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. (1996) *Food Rev Int*, **12**, 457-509.
- <sup>114</sup> Upadhyay, V.K.; McSweeney, P.L.H.; Magboul, A.A.A.; Fox, P.F. (2004) Proteolysis in cheese during ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: *General Aspects*, 3<sup>rd</sup> edn, pp 391-434. Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H.; Cogan, T.M.; Guinee, T.P. Eds. London: Elsevier.
- <sup>115</sup> Visser, F.M.W.; Slangen, K.J. (1977) *Neth Milk Dairy J*, **31**, 16-30.
- <sup>116</sup> McSweeney, P.L.H.; Olson, N.F.; Fox, P.F.; Healy, A.; Højrup, P. (1993) *J Dairy Res*, **60**, 401-412.
- <sup>117</sup> Green, M.L.; Foster, P.D.M. (1974) *J Dairy Res*, **41**, 269-282.
- <sup>118</sup> Swaisgood, H.E. (1992) Chemistry of the caseins. In *Advanced Dairy Chemistry. I. Proteins*, 2nd edn, pp 63-110. Fox, P.F., Ed. London: Elsevier Applied Science.
- <sup>119</sup> Bastian, E.D.; Brown, R.J. (1996) *Int Dairy J*, **6**, 435-457.
- <sup>120</sup> Farkye, N.Y.; Fox, P.F. (1990) *J Dairy Res*, **57**, 412-418.
- <sup>121</sup> Kelly, A.L.; McSweeney, P.L.H. (2003) Indigenous proteolytic enzymes in milk. In *Advanced Dairy Chemistry. I. Proteins*, 3rd edn, pp 495-521. Fox, P.F.; McSweeney, P.L.H. Eds. New York: Kluwer.
- <sup>122</sup> Considine, T.; Healy, A.; Kelly, A.; McSweeney, P.L.H. (2004) *Int Dairy J*, **14**, 117-124.

- 
- <sup>123</sup> Hurley, M. J.; Larsen, L.B.; Kelly, A.L.; McSweeney, P.L.H. (2000) *Int Dairy J*, **10**, 673-681.
- <sup>124</sup> Hayes, M.G.; Hurley, M.J.; Larsen, L.B.; Heegaard, C.W.; Magboul, A.; Oliveira, J.C.; McSweeney, P.L.H.; Kelly, A.L. (2001) *J Dairy Res*, **68**, 267-276.
- <sup>125</sup> Kunji, E.R.S.; Mierau, I.; Hagting, A.; Poolman, B.; Konings, W.N. (1996) *Ant Van Leeuw*, **70**, 187-221.
- <sup>126</sup> Christensen, J.E.; Dudley, E.G.; Pederson, J.A.; Steele, J.L. (1999) *Ant Van Leeuw*, **76**, 217-246.
- <sup>127</sup> Martley, F.G.; Crow, V.L. (1993) *Int Dairy J*, **3**, 461-483.
- <sup>128</sup> Lynch, C.M.; McSweeney, P.L.H.; Fox, P.F.; Cogan, T.M.; Drinan, F.D. (1997) *Lait*, **77**, 441-459.
- <sup>129</sup> Sousa, M.J.; Ardö, Y.; McSweeney, P.L.H. (2001) *Int Dairy J*, **11**, 327-345.
- <sup>130</sup> Gripon, J.C. (1993) Mould-ripened cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 2: *Major Cheese Groups*, 2<sup>nd</sup> edn, pp 111-136. Fox, P.F. Eds. London: Chapman & Hall.
- <sup>131</sup> Gagnaire, V.; Mollé, D.; Sørhaug, T.; Léonil, J. (1999) *Lait*, **79**, 43-57.
- <sup>132</sup> Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M.; McSweeney, P.L.H. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- <sup>133</sup> Vioque, M.; Gómez, R.; Sánchez, E.; Mata, C.; Tejada, L.; Fernandez-Salguero, J. (2000) *J Agric Food Chem*, **48**, 451-456.
- <sup>134</sup> Verissimo, P.; Esteves, C.; Faro, C.; Pires, E. (1995) *Biotechnol Lett*, **17**, 621-626.
- <sup>135</sup> Kindstedt, P.S. (1993) Mozzarella and pizza cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 2: *Major Cheese Groups*, 2<sup>nd</sup> edn, pp 337-362. Fox, P.F. Eds. London: Chapman & Hall.
- <sup>136</sup> Battistotti, B.; Corradini, C. (1993) Italian cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 2: *Major Cheese Groups*, 2<sup>nd</sup> edn, pp 221-243. Fox, P.F. Eds. London: Chapman & Hall.
- <sup>137</sup> Fernández, M.; Singh, T.K.; Fox, P.F. (1998) *J Agr Food Chem*, **46**, 4512-4517.

## **SCOPO DELLA TESI**

## 5. Scopo della tesi

Lo scopo di questo lavoro di tesi di dottorato, che ho svolto presso il Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale dell'Università di Parma, è quello di applicare metodi innovativi LC/MS e spettrofotometrici per l'identificazione, la quantificazione, e lo studio delle proprietà biologiche di peptidi negli alimenti.

Il lavoro di tesi si articola in vari capitoli:

- studio, mediante HPLC-ESI-MS, della frazione oligopeptidica di formaggi da latte ovino (pecorino) e da latte vaccino (caciotta), ottenuti come sistema modello, al fine di seguirne le variazioni nel corso della stagionatura. Inoltre si vuole valutare come tale frazione possa essere modificata a seconda della diversa tecnologia di produzione, in particolare utilizzando latte crudo, pastorizzato, ed omogeneizzato con alte pressioni;
- identificazione di potenziali marker peptidici di adulterazione del latte utilizzato per la produzione casearia;
- valutazione della potenziale bioattività di peptidi naturalmente presenti nel Parmigiano Reggiano, focalizzando l'attenzione sull'attività ACE-inibitrice ed immunomodulante; a tale proposito, il frazionamento cromatografico, accoppiato ad una buona caratterizzazione delle frazioni mediante analisi HPLC-MS, rappresenta un mezzo potente per arrivare ad identificare molecole bioattive in miscele di una certa complessità;
- valutazione della potenzialità della digestione triptica, congiunta ad analisi HPLC-ESI-MS della miscela peptidica derivante, al fine di ricavare informazioni sulla sequenza di una proteina allergenica: si è focalizzata l'attenzione sulla lipid transfer protein (LTP) della pesca, Pru p 3, allergene noto in letteratura per la sua elevata resistenza ai trattamenti termici ed alla digestione enzimatica.

In particolare si possono individuare tre filoni in cui si raggruppano i capitoli:

- A: Metodi LC/MS applicati allo studio della proteolisi nei formaggi (cap. 6, 7 e 8);
- B: Determinazione dell'attività biologica di peptidi negli alimenti (cap. 9 e 10);
- C: Metodi LC/MS per la determinazione della sequenza di una proteina allergenica (cap. 11).

Ogni capitolo prevede una piccola introduzione specifica, i Risultati e Discussione, la Parte Sperimentale, le Conclusioni, e la Bibliografia.

**A: METODI LC/MS APPLICATI ALLO  
STUDIO DELLA PROTEOLISI NEI  
FORMAGGI**

## **6. Correlazione del profilo peptidico con la tecnologia di produzione in formaggi modello tipo “pecorino”**

In questa parte del lavoro di tesi si è inteso studiare, mediante HPLC-ESI-MS, il profilo peptidico in formaggi modello tipo pecorino; in particolare si vuole valutare come la frazione oligopeptidica varia nel corso della stagionatura, e come possa caratterizzare formaggi a diversa tecnologia di produzione (da latte crudo, da latte omogeneizzato con alte pressioni, e da latte pastorizzato).

Il lavoro si inserisce in un progetto più ampio, realizzato dall'Università di Parma in collaborazione con la Facoltà di Scienze Alimentari dell'Università di Bologna.

### **6.1 Tecnologia produttiva del pecorino**

Oltre il 40% dei formaggi italiani fa parte della grande famiglia del “pecorino”, a base cioè di solo latte ovino o misto; la tecnologia di caseificazione del pecorino è molto simile a quella generale dei formaggi, schematicamente rappresentata in figura 6.1.

Nei formaggi ovini il latte non viene quasi mai preventivamente scremato, come avviene per molti formaggi vaccini, e può essere utilizzato crudo, se soddisfa ad i requisiti di legge, oppure previa sanitizzazione, che nel caso più classico è una pastorizzazione, anche se sono ammessi trattamenti con effetto equivalente.

Si procede quindi all'inoculo di colture di microrganismi filocaseari, ritenuti favorevoli allo sviluppo di fermentazioni e trasformazioni che caratterizzano ciascun tipo di formaggio; si possono aggiungere al latte colture di batteri lattici (i più classici sono ceppi di *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*) con azione acidificante e aromatizzante, e batteri propionici con azione aromatizzante. L'inoculo del latte può avvenire con colture naturali, ottenute facendo sviluppare e moltiplicare in latte o siero (latto-innesto e siero-innesto) la flora microbica già presente, oppure utilizzando colture selezionate in laboratorio e successivamente liofilizzate (latto-fermento e siero-fermento). Le colture naturali sono ancora molto usate per lavori in caseifici aziendali e per le produzioni più tipiche, anche se a volte sono poco costanti, mentre i fermenti o starter sono molto diffusi nei caseifici industriali e si stanno estendendo anche nelle produzioni artigianali.



**Figura 6.1. Flow sheet della produzione del pecorino**

Il caglio contiene essenzialmente enzimi di origine animale (chimosina e pepsina bovina) ottenuti dall'abomaso di vitelli o agnelli, lavorato e stabilizzato su un supporto liquido o in pasta; grazie ad un'azione combinata di questi enzimi, ed in presenza di una sufficiente acidità e temperatura, si ha la precipitazione della caseina, che dà origine ad un coagulo (cagliata) che cede il siero trattenendo, oltre a varie proteine, anche elevate percentuali di grasso. Più in dettaglio la coagulazione avviene in due fasi, la fase enzimatica o primaria, e quella aggregativa o secondaria: durante la fase primaria l'azione della chimosina del caglio si esplica sulle micelle caseiniche, in particolare ha azione specifica sulla  $\kappa$ -caseina, proteina più esterna nella micella, idrolizzando il legame phe105 – met106; il taglio del suddetto legame genera da un lato la para-  $\kappa$ -caseina, e dall'altro il peptide 106-169, detto glicomacropptide (GMP), una glicoproteina contenente galattosio, galattosamina, ed acido N-acetilneuramico, perfettamente solubile nel siero. Il distacco del glicomacropptide comporta la perdita della funzione protettiva svolta dalla  $\kappa$ -caseina nei confronti delle micelle caseiniche, che, quindi, tendono ad avvicinarsi ed a formare il coagulo (fase aggregativa); quest'ultimo è fortemente stabilizzato da legami idrogeno e dai legami ionici che si formano tra gli ioni calcio ed i gruppi fosfato delle serine caseiniche. La progressiva separazione del siero dovuta a sineresi e spurgo determina inoltre un riavvicinamento delle micelle che rende più facili le interazioni tra esse.

La distinzione tra le due fasi della coagulazione non è netta: se infatti è vero che affinché si avvii l'aggregazione micellare è necessario che almeno il 75-85% del GMP sia idrolizzato, è altrettanto vero che durante la fase secondaria continua l'azione enzimatica e non solo sulla caseina  $\kappa$ , ma anche sulle altre frazioni.

Tipologia, consistenza e proprietà del coagulo saranno determinati da una serie di fattori legati alle proprietà del substrato (qualità delle caseine, pH, contenuto minerale, temperatura) e alle proprietà degli enzimi coagulanti (tipo, quantità, attività e stabilità in funzione di pH e temperatura).

## **6.2 Metodi di sanitizzazione del latte preposto a caseificazione**

I lattini sottoposti a caseificazione possono o meno essere sottoposti a tecniche di risanamento, in funzione del prodotto che si vuole ottenere, delle tecnologie a disposizione e soprattutto della qualità stessa del latte. Per partire da un prodotto crudo (così detto il latte che non ha subito alcun trattamento termico) infatti non si può prescindere dalla sua qualità, per ragioni di sicurezza e tecnologiche, per cui è necessario osservarne

rigorosamente i parametri chimico/fisici e, soprattutto, deve rispettare precisi requisiti microbiologici.

Per questo motivo a livello industriale per la produzione di formaggi si utilizzano latti sanitizzati: il trattamento termico risulta il metodo di sanitizzazione di gran lunga più usato, in particolare la pastorizzazione, mentre la sterilizzazione generalmente non viene mai utilizzata visto i suoi effetti indesiderati sui parametri di caseificazione (peggiora la consistenza ed il tempo di presa del coagulo, nonché la sineresi spontanea), sulle caratteristiche organolettiche del prodotto finito, e la sua inutilità come mezzo conservativo del prodotto finito (tale scopo è già ottenuto dalla caseificazione stessa).

Sono ammessi trattamenti di sanitizzazione con effetto equivalente alla pastorizzazione: a questo proposito molto studiato, seppure ancora in fase sperimentale, è l'omogeneizzazione ad alte pressioni.

### **6.2.1 Pastorizzazione**

Consiste nel riscaldamento del latte a temperatura inferiore al suo punto di ebollizione per tempi dipendenti dalla temperatura stessa, dalla carica microbica e dal risultato voluto; può essere infatti condotta utilizzando differenti combinazioni tempo temperatura: un trattamento a 63°C per 30 min è considerato equivalente ad uno di 72°C per 15 sec o ad uno a 88.3°C per 1 sec. Il primo trattamento è generalmente eseguito in batch o in discontinuo, utilizzando caldaie a doppio fondo, mentre gli altri sono realizzati in continuo con scambiatori di calore generalmente a piastre o, talvolta, tubolari. Il trattamento di gran lunga più utilizzato è quello che prevede temperature tra i 70-75 °C con tempi dai 15 ai 20 secondi, questo perché temperature inferiori sono applicabili solo a latti a bassa carica microbica e comportano possibili problemi d'inquinamento durante il trattamento stesso, mentre temperature superiori ai 75°C comportano il progressivo peggioramento di parametri di caseificazione, quali tempi di coagulazione troppo lunghi e consistenza del coagulo troppo fine o inesistente.

Funzione primaria del trattamento di pastorizzazione è quella di eliminare la microflora patogena non sporigena e parallelamente di abbattere, di almeno 2 o 3 riduzioni decimali, la microflora contaminante. Le forme sporigene e comunque non vegetative sono di norma poco influenzate dal trattamento termico, e gli enzimi lo sono a seconda della loro termoresistenza: ad esempio, la microflora psicofila non sporigena generalmente viene fortemente ridotta, se non azzerata, dai trattamenti classici di pastorizzazione, ma altrettanto

non accade agli enzimi da essa prodotti, che possono restare attivi nel latte e anche nei formaggi con conseguenze proporzionali al livello di contaminazione raggiunto dal latte prima della pastorizzazione.

Per contro, la pastorizzazione induce anche modifiche sulle caratteristiche aromatiche ed organolettiche del prodotto finito proprio per l'inattivazione di alcuni enzimi o microrganismi produttori di questi. Altro importante effetto della pastorizzazione sul latte preposto a caseificazione è la standardizzazione, e la riduzione dei difetti sul prodotto finito. Questi aspetti sono dovuti a molteplici modificazioni, talvolta positive, talvolta no, del comportamento del latte pastorizzato durante la caseificazione qui descritti.

Il trattamento termico modifica indubbiamente l'aroma sia del latte che del prodotto finito, poiché determina l'allontanamento di alcuni composti volatili e la formazione di composti non originariamente presenti nel latte, in entrambi i casi agendo sia direttamente sui composti, sia indirettamente sugli enzimi preposti alla loro formazione o distruzione. Studi condotti da Moio<sup>1</sup> mediante gas-cromatografia olfattiva (Charm test), e successiva identificazione dei picchi corrispondenti alle sostanze odorose, hanno portato al riconoscimento di profili utili per caratterizzare l'aroma del latte crudo rispetto a quello del latte pastorizzato. Le modificazioni indotte sul formaggio da latte pastorizzato sono comunque attenuate rispetto a quelle riportate sul latte commercializzabile, sia perché il trattamento termico pre-caseificazione è in genere condotto a temperature minori, sia perché i componenti odorosi passano nel prodotto finito in funzione di molteplici fattori modulati dalla pastorizzazione stessa. Nonostante ciò, si può sostenere che il prodotto derivante da latte crudo sia caratterizzato principalmente dalla presenza di esteri etilici (soprattutto etil butanoato ed etil esanoato) non identificabili nel prodotto derivante da latte pastorizzato, che al contrario mostra contenuti significativamente superiori in dimetilsolfone ed esanale rispetto al formaggio da latte crudo.

Gli effetti della pastorizzazione su alcuni enzimi costitutivi del latte dipendono da molteplici fattori come pH, forza ionica, e caratteristiche della matrice, ma soprattutto un fattore importante è rappresentato dalla termoresistenza dell'enzima; ci sono molti enzimi proteolitici e lipolitici che non sono influenzati dalla pastorizzazione, data la loro grande termoresistenza, altri invece (fosfatasi alcalina e perossidasi) sono addirittura utilizzati come test per verificare l'intensità del trattamento termico subito dal latte. Oltre a questi anche la catalasi, la lipasi costitutiva del latte, la xantina-ossidasi, ed altri enzimi, sono inattivati dal trattamento di pastorizzazione.

Per quanto riguarda gli effetti della pastorizzazione sull'equilibrio dei sali minerali, un trattamento termico compreso tra i 75 ed 85°C per 30 secondi comporta un'insolubilizzazione del calcio nel latte, valutata come diminuzione percentuale del calcio solubile rispetto al contenuto iniziale, dell'ordine del 10%. Questo dato risulta comunque attenuato, considerato che i trattamenti termici sono nella pratica casearia condotti a combinazioni tempo/temperatura meno drastiche, e che spesso il latte prima della pastorizzazione è refrigerato, pratica che induce l'effetto opposto sul calcio facendone aumentare la solubilità.

Le modifiche apportate dal trattamento termico alle proteine del latte sono diverse: la proteina più sensibile al calore è la  $\beta$ -lattoglobulina, che sopra i 70°C va incontro a denaturazione ed aggregazione, con conseguente insolubilizzazione; tale proteina, inoltre, alle temperature di pastorizzazione, può formare aggregati misti associandosi alle caseine  $\kappa$  ed  $\alpha_{S2}$ . Questi effetti, che in parte determinano una maggior resa di caseificazione, appaiono differenti a seconda dell'origine del latte, poiché varia la composizione e la termoresistenza delle sieroproteine, e si riflettono principalmente in un ritardo del tempo di presa del coagulo.

La pastorizzazione induce una sorta di standardizzazione sul formaggio finito: se per alcuni ciò è fondamentalmente un fattore negativo, comportando una sorta di “appiattimento” del gusto con la perdita di caratteristiche tipiche, la cosa può essere vista anche in chiave positiva, in quanto la standardizzazione comporta anche una riduzione dei difetti del prodotto finito, uniformandone la composizione e qualità finale.

## **6.2.2 Omogeneizzazione ad alte pressioni**

Gli utilizzi più comuni dei processi di omogeneizzazione a valori di pressione medi riguardano prodotti per i quali è necessaria un'ottimizzazione della microstruttura, come per i gelati, le creme, alcune salse ed emulsioni, e composizioni complesse come il latte. In questi casi le pressioni sono dell'ordine dei 350 bar, ed i cambiamenti del prodotto riguardano sostanzialmente solo la sua microstruttura, rendendola più stabile.

Le alte pressioni (dai 1000 ai 5000 bar) invece vengono applicate con scopi diversi:

- ✓ sanitizzazione e stabilizzazione dei prodotti onde aumentarne la sicurezza e shelf-life;

- ✓ alternativa alla pastorizzazione o sterilizzazione in prodotti sensibili alle alte temperature;
- ✓ trasformazioni fisiche e reologiche della materia prima anche per differenziare ed innovare il prodotto finito.

Le alte pressioni possono essere ottenute essenzialmente in due modi: applicazione di pressioni idrostatiche, o omogeneizzazione in continuo. Nel primo caso si utilizzano presse idrostatiche che lavorano a pressioni fino a 5000 bar su prodotti liquidi o solidi (questi ultimi devono essere confezionati sotto vuoto in pellicole plastiche ed immersi in acqua). Nonostante gli innalzamenti di temperatura siano modesti (dai 13 ai 15°C a 5000 bar), le alte pressioni applicate possono provocare danni irreversibili al prodotto, agendo sulla sua struttura macroscopica e microscopica, e modificandone i costituenti, in particolare alterando la funzionalità di proteine ed enzimi.

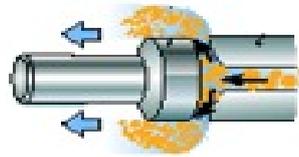
Per contro, l'uso di omogeneizzatori in continuo garantisce comunque buoni risultati con pressioni inferiori a 2000 bar, ma con l'inconveniente di essere applicabile solo a prodotti fluidi o comunque fluidificabili; in tal caso l'aumento di temperatura è molto più elevato, anche se non supera mai i 65-70°C e, soprattutto, essendo protratto per tempi dell'ordine di uno o due millisecondi, non è in grado di apportare modifiche sostanziali al prodotto. Ciò, unitamente alle non eccessive pressioni di esercizio, garantisce una maggiore preservazione delle caratteristiche sensoriali e nutrizionali del prodotto rispetto alle pressioni idrostatiche. Si può notare infatti dalla tabella 6.1 come gli effetti più depauperanti sui prodotti alimentari si hanno solo per pressioni superiori ai 2000 bar, valore non raggiunto nelle omogeneizzazioni in continuo, ma solo in quelle per pressione idrostatica.

**Tabella 6.1. Effetti dell'omogeneizzazione ad alta pressione**

<b>PRESSIONE</b>	<b>EFFETTO</b>
2000÷3000 bar	effetti sulla cinetica enzimatica, modifica delle membrane cellulari, alterazione di proprietà fisiche delle proteine
3000÷4000 bar	morte di cellule e microrganismi vegetativi, inattivazioni enzimatiche irreversibili
4000÷5000 bar	denaturazioni irreversibili delle proteine e gelificazione degli amidi
oltre i 5000 bar	morte di spore batteriche ed inattivazione di enzimi

La richiesta sempre crescente da parte dei consumatori di prodotti alimentari con ottime caratteristiche organolettiche e nutrizionali, unitamente alle esigenze di sicurezza igienico-sanitarie, ha portato ad un costante aumento di interesse da parte delle industrie nei confronti delle tecniche di omogeneizzazione ad alta pressione, che solo negli ultimi venti anni sono allo studio come tecniche di sanitizzazione e miglioramento tecnologico.

L' omogeneizzatore ad alte pressioni in continuo è rappresentato in figura 6.2:



**Figura 6.2. Sistema di omogeneizzazione ad alte pressioni**

Il fluido è spinto sotto pressione contro una valvola di spacco che si apre lasciandolo passare attraverso uno stretto orifizio; questo genera un forte aumento di pressione e di accelerazione del fluido che in conseguenza subirà anche l' azione di ingenti forze d'urto e di taglio. Dopo questo rapido passaggio (il tempo è dell'ordine di 1 o 2 millisecondi), si ha una forte caduta di pressione, che spesso arriva a livello di quella atmosferica, in grado di provocare nel prodotto fenomeni di cavitazione associati alla formazione di bolle di gas ed alla loro implosione. L'effetto di tutte queste forze provoca cambiamenti evidenti nei prodotti, che nel caso del latte sono :

- ✓ aumento della viscosità;
- ✓ aumento dell'opacità;
- ✓ riduzione del tempo di coagulazione;
- ✓ maggior sensibilità fotochimica;
- ✓ stabilizzazione ed emulsione della materia grassa;
- ✓ modificazione della struttura submicroscopica delle micelle caseiniche;
- ✓ aumento dell'azoto non caseinico.

Oltre ai cambiamenti già citati ve ne sono altri, che, pur essendo meno evidenti, sono i più ricercati e giustificano l'uso della tecnica in esame:

- Miglioramento della biosicurezza: effetto letale su microrganismi patogeni del latte come *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolica*, *Staphylococcus aureus* e molti sierotipi di *Salmonella*, e su microrganismi degradativi come *Bacillus subtilis* e lieviti, con riduzioni decimali comprese tra 3 e 5UFC/ml. Inoltre si ha una riduzione del rischio da contaminazione e proliferazione di microrganismi indesiderati. Questi effetti sono dovuti a due fenomeni: generazione di danni irreversibili alle membrane esterne dei Gram negativi ed alle pareti e membrane citoplasmatiche di Gram positivi e lieviti, ed inattivazione dei loro enzimi.
- Potenziamento dell'attività enzimatica: la pressione induce il danneggiamento delle membrane cellulari dei tessuti con conseguente dispersione degli enzimi che acquistano maggior mobilità e, quindi, attività. Questo è dimostrato per enzimi costitutivi del latte come lisozima, lattoferrina e lattoperossidasi, ma anche per enzimi proteolitici, dove l'effetto è amplificato dalla maggior esposizione della micella caseinica, data la sua parziale disgregazione operata dalle alte pressioni. L'aumentata attività enzimatica è dimostrata, però, con trattamenti non superiori ai 3000 bar, pressione limite dopo la quale si verifica il fenomeno opposto (inattivazione enzimatica).
- Differenziamento e caratterizzazione del prodotto: provoca la modifica di caratteri funzionali delle proteine come, ad esempio, l'aumento di ritenzione d'acqua e compattazione della loro organizzazione; questo è dovuto fondamentalmente alla

rottura delle interazioni idrofobiche tra le caseine nelle micelle, con conseguente formazione di caseine libere ed aggregati caseinici di più piccole dimensioni. La matrice proteica in questo modo diviene più compatta e regolare; inoltre si osserva una forte riduzione delle dimensioni dei globuli di grasso con conseguente miglior distribuzione ed omogeneità nella matrice proteica. La struttura dei formaggi prodotti a partire da latte omogeneizzato ad alte pressioni risulta più compatta ed uniforme rispetto a quelli derivanti da latte crudo e pastorizzato. Questi aspetti poi, in concomitanza con quelli già descritti, si ripercuotono sia sulla maturazione del formaggio che sulle sue caratteristiche organolettiche, dando vita a prodotti caratteristici ed apprezzabili.

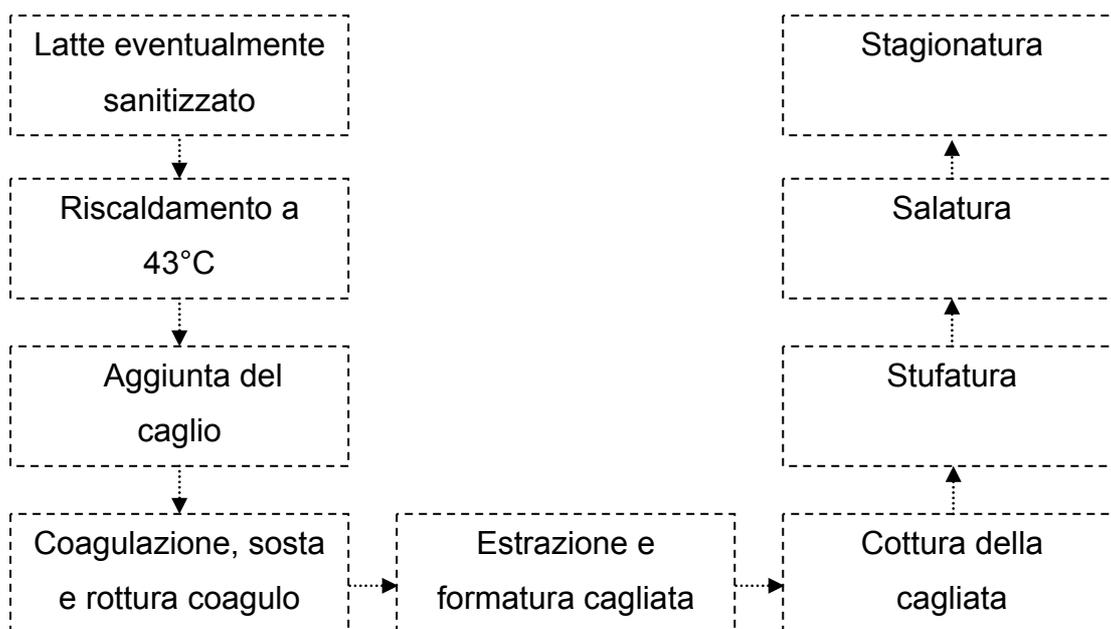
## **6.3 RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **6.3.1 Preparazione dei formaggi modello tipo “pecorino”**

I formaggi modello utilizzati per questo lavoro sono stati preparati presso i laboratori di Cesena della Facoltà di Scienze Alimentari dell'Università di Bologna. La materia prima utilizzata è stata latte ovino crudo fresco (35 litri), diviso in tre parti come segue :

- 13 litri sono stati utilizzati tal quali (senza subire alcun trattamento di sanitizzazione);
- 14 litri sono stati omogeneizzati a 1000 bar con un impianto di omogeneizzazione Panda (Niro Soavi, Parma);
- 6,5 litri sono stati pastorizzati a 72 °C per 30 secondi.

Il latte, dopo aver subito questi diversi trattamenti, è stato usato per la produzione di formaggio tipo pecorino, seguendo la procedura di caseificazione classica riportata schematicamente in figura 6.3; in tutti i casi la procedura è stata la medesima, indifferentemente dal trattamento a cui è stato sottoposto il latte.



**Figura 6.3. Schema di produzione del formaggio modello pecorino**

Le tre tipologie di formaggio pecorino modello precedentemente descritte sono state analizzate a diversi tempi della fase produttiva e di stagionatura, divisi a seconda del trattamento subito dal latte, come riportato in tabella 6.2.

**Tabella 6.2. Simbologia dei campioni analizzati**

	CRU	OMO	PAST
Latte	C -3	O -3	P -3
Cagliata	C -2	O -2	P -2
Cagliata dopo cottura	C -1	O -1	P -1
0 giorni	C T0	O T0	P T0
6 giorni	C T6	O T6	P T6
13 giorni	C T13	O T13	P T13
21 giorni	C T21	O T21	P T21

CRU=latte crudo; OMO=latte omogeneizzato; PAST=latte pastorizzato.

## **6.3.2 Estrazione ed analisi della frazione oligopeptidica in HPLC-ESI-MS**

### **6.3.2.1 Preparazione dell'estratto**

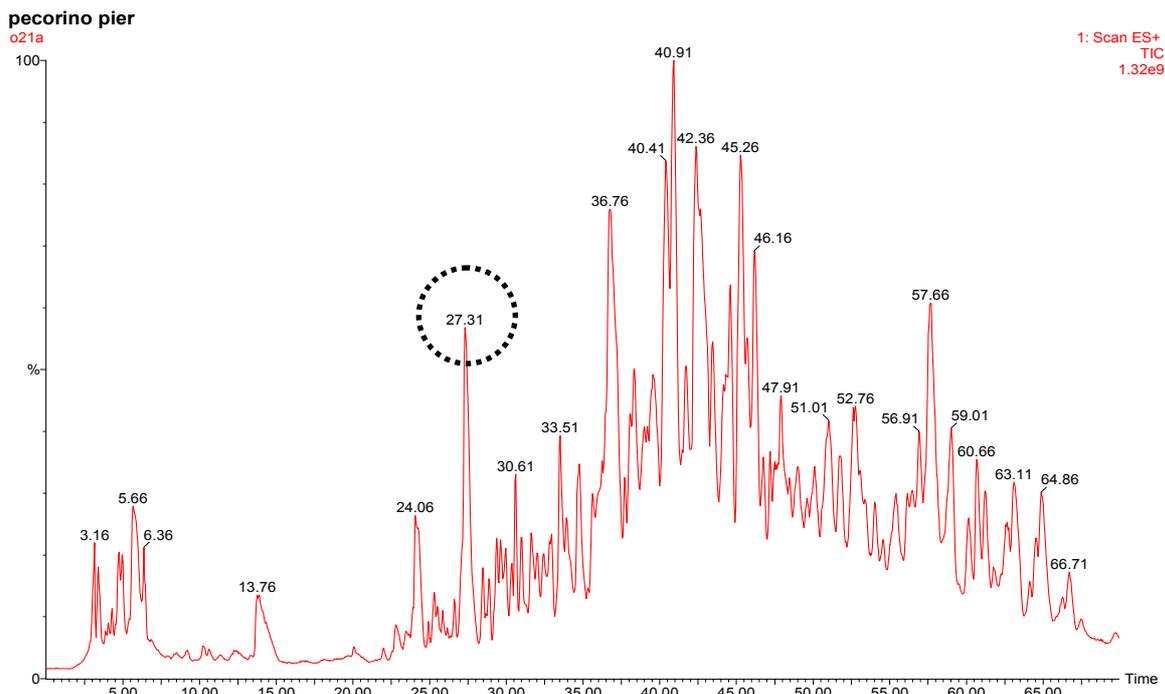
Per potere analizzare i peptidi è necessario separarli dalla frazione proteica a peso molecolare più elevato. Il passaggio chiave è la deproteinizzazione, che viene solitamente effettuata usando agenti precipitanti forti quali acido tricloroacetico o trifluoroacetico. In questo lavoro è stata utilizzata una procedura che predilige metodi fisici di separazione, basata su precipitazione con un agente precipitante blando (HCl 0,1N) e ultrafiltrazioni a cut-off progressivamente minore, messa a punto dal nostro gruppo di ricerca<sup>2</sup>. Questo metodo di deproteinizzazione consente un recupero più completo della frazione azotata a basso peso molecolare: l'impiego di forti agenti precipitanti, infatti, oltre a far precipitare le proteine, porta anche in genere alla precipitazione di peptidi di elevato e medio peso molecolare, causando un impoverimento della frazione estratta.

La metodica è descritta nella parte sperimentale.

Al termine della procedura di estrazione e dei tagli molecolari si è ottenuta la frazione peptidica con peso molecolare inferiore a 3000 Da (anche se è possibile trovare peptidi a peso molecolare superiore in quanto la separazione avviene principalmente sulla base della forma e delle dimensioni delle molecole), pronta per la successiva analisi in HPLC-MS (per le condizioni di analisi si veda la parte sperimentale).

### **6.3.2.2 Analisi dei peptidi mediante HPLC-ESI-MS**

L'interfacciamento dell'HPLC con lo spettrometro di massa mediante ionizzazione elettrospray ci consente di ottenere un cromatogramma in corrente ionica totale (TIC), in cui, ad ogni picco cromatografico è associato il corrispondente spettro di massa; in figura 6.4 è riportato il cromatogramma in corrente ionica totale tipico di un campione di pecorino.



**Figura 6.4. Cromatogramma in corrente ionica totale di un campione di pecorino da latte omogeneizzato a 21 giorni di stagionatura**

La spettrometria di massa ci permette una identificazione certa dei picchi nei diversi campioni in base al peso molecolare, o meglio in base al loro rapporto massa/carica (il range di acquisizione va da 150 a 1500 m/z), rendendo più agevoli le successive operazioni di riconoscimento ed integrazione.

Come si può notare, il cromatogramma risulta molto complesso e di difficile interpretazione, quindi occorre focalizzare l'attenzione su ogni singolo picco, sfruttando le potenzialità offerte dalla spettrometria di massa. Per esempio, se prendiamo in considerazione il picco cromatografico con tempo di ritenzione 27,31 minuti (cerchiato in figura), e valutiamo il suo spettro di massa, riportato in figura 6.5, possiamo notare un pattern multicarica tipico di una molecola di natura peptidica; da questo pattern, grazie ad un programma di deconvoluzione, è possibile ottenere lo spettro ricostruito (figura 6.6), mostrandone il peso molecolare reale del peptide (1623Da).

Nella ionizzazione elettrospray, una molecola genera segnali con rapporto  $m/z = (PM + nX)/n$ , dove  $n$  è il numero di cariche acquisite, generalmente per protonazione ( $X=H^+$ ), durante la fase di ionizzazione. Nello spettro di massa non è possibile vedere il segnale corrispondente al peptide monocaricato, poiché avrà un  $m/z = (1623 + 1)/1 = 1624$  (il nostro range di acquisizione va da  $m/z = 150$  fino a  $m/z = 1500$ ), ma risultano ben visibili i

segnali relativi al doppio ( $n = 2$ ) e triplo ( $n = 3$ ) caricato, aventi un valore  $m/z = 813$  e  $542,3$  rispettivamente. In questo modo è anche possibile evidenziare lo ione caratteristico dell'oligopeptide, cioè quello che più lo caratterizza per abbondanza e facilità di identificazione; nel caso considerato si tratta dello ione corrispondente al triplo caricato ( $m/z = 542,3$ ), il quale verrà sistematicamente utilizzato nella tecnica dello XIC per la ricerca dello stesso peptide nei diversi campioni. Per peptidi con peso molecolare superiore a quello dell'esempio, lo spettro di massa risulterà essere più complesso, in quanto aumentano i possibili siti di protonazione.

Il principio di identificazione dei pesi molecolari e degli ioni caratteristici resta sempre il medesimo ed è stato applicato ad ogni picco cromatografico rilevante.

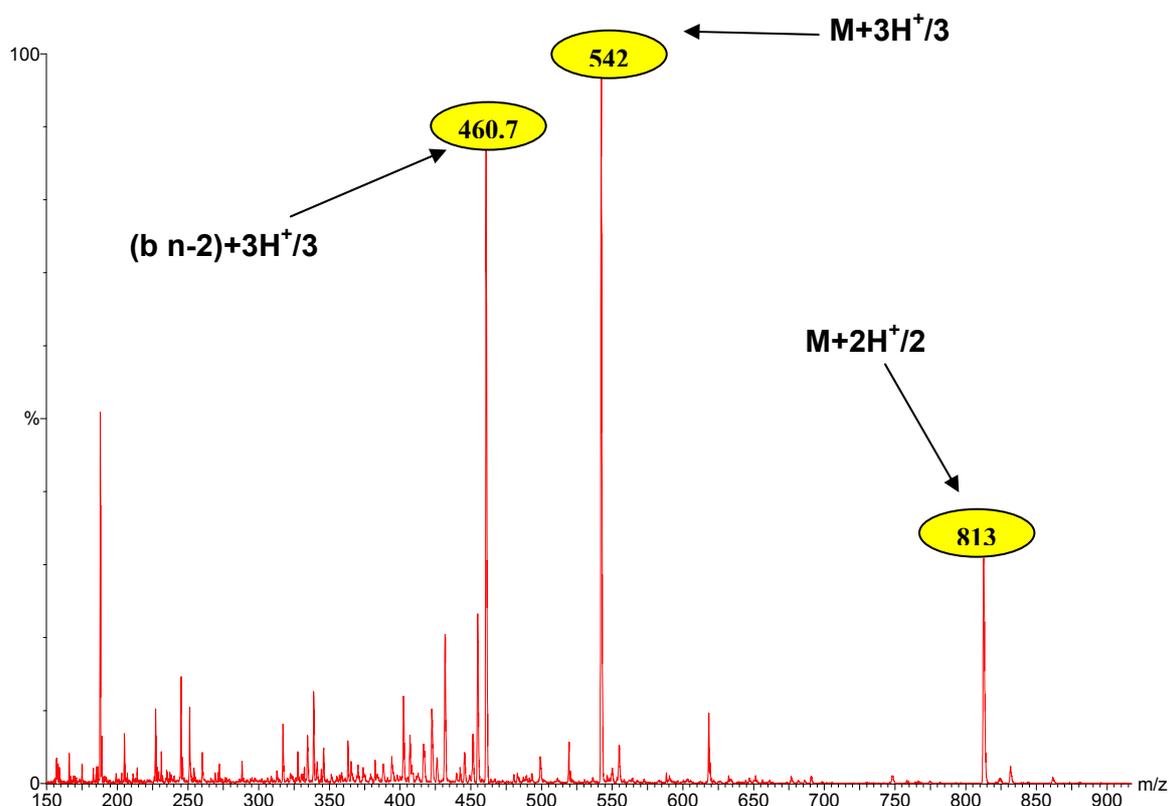
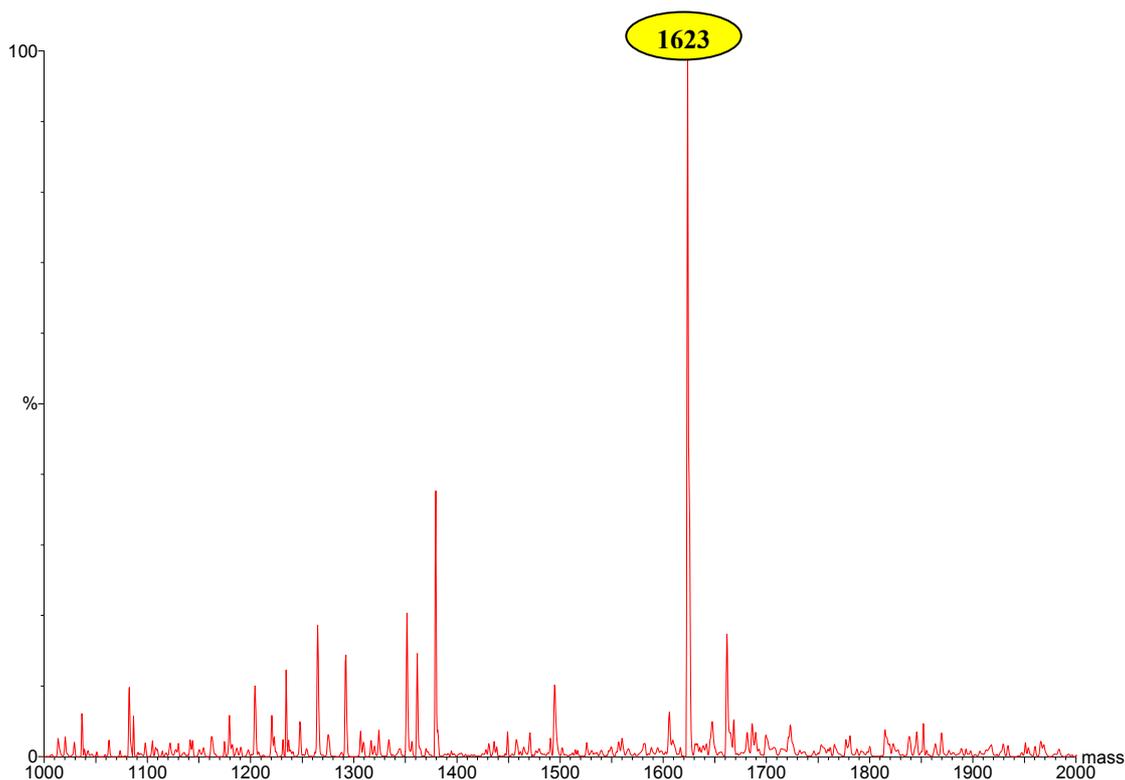


Figura 6.5. Spettro di massa del picco a 27,31 min

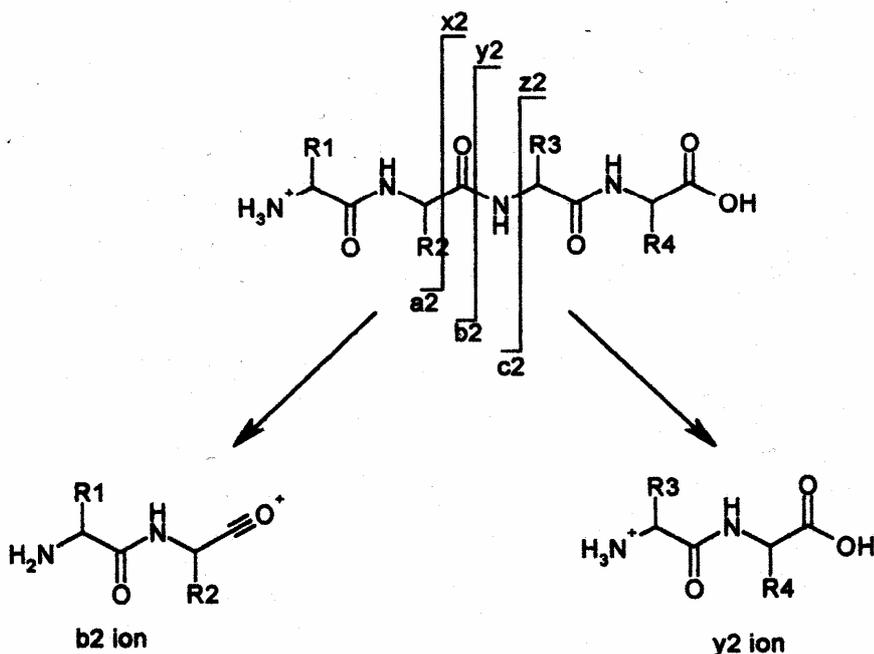


**Figura 6.6. Spettro di massa ricostruito del picco a 27,31 min**

### **6.3.2.3 Identificazione delle sequenze oligopeptidiche**

Una volta ottenuto il peso molecolare ed i picchi caratteristici di un peptide d'interesse, occorre identificarne la sequenza oligopeptidica; questa sarà quasi certamente parte della sequenza delle caseine ovine, e con buona probabilità, visto che ricerchiamo i peptidi più abbondanti, farà parte della  $\alpha_{S1}$ - o della  $\beta$ -caseina, poiché da sole costituiscono circa il 77% delle caseine totali. Le loro sequenze sono note in letteratura<sup>3</sup> e, conoscendo il peso molecolare del peptide ricercato, le possibili combinazioni di sequenze da esse derivanti che hanno quel peso molecolare sono un numero limitato calcolabile. Prendiamo come esempio il peptide con tempo di ritenzione di 27,31 min, di peso molecolare 1623Da: analizzando le sequenze della  $\alpha_{S1}$ - e della  $\beta$ -caseina ovina, esiste un numero limitato di frammenti aventi questo peso molecolare; tali frammenti, seppure isobari, differiscono nella loro composizione amminoacidica, generando, così, ioni diversi in seguito alla frammentazione che si verifica nella sorgente elettrospray durante il processo di evaporazione degli ioni in fase gas.

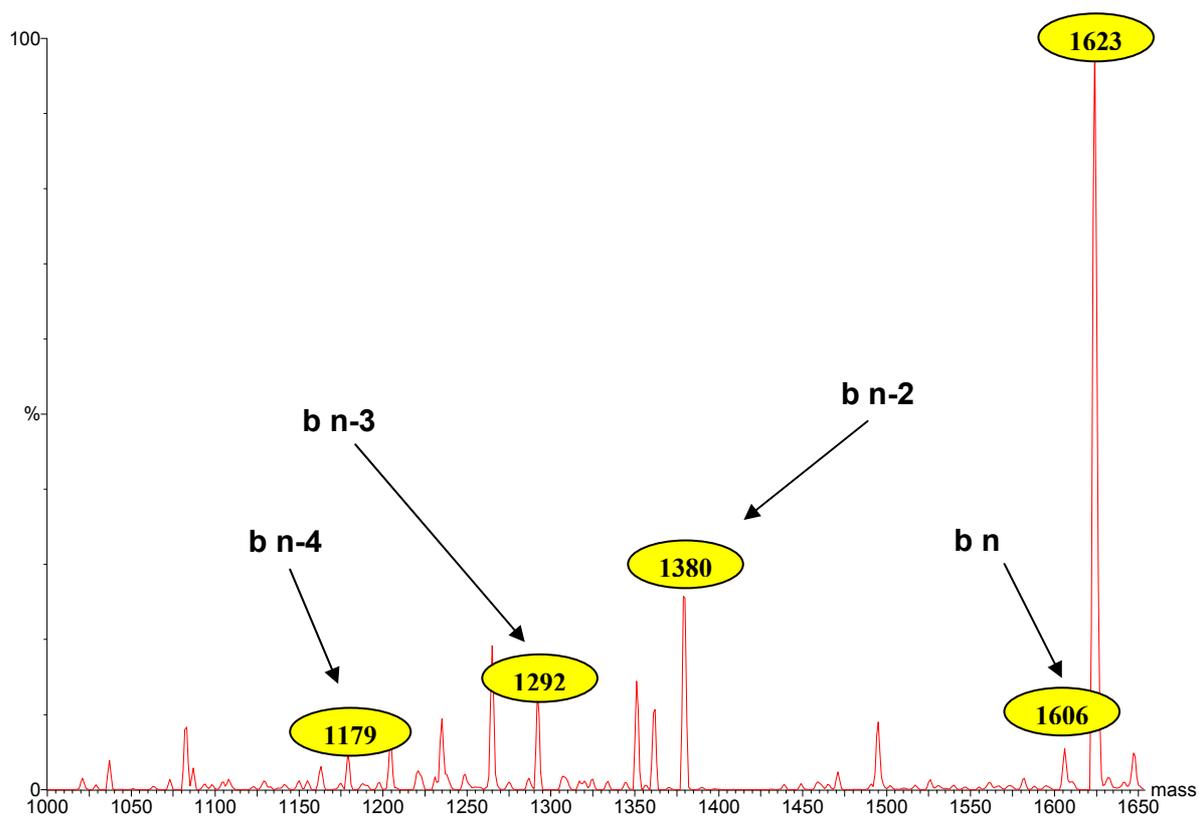
Un peptide che si frammenta in fase gas si può rompere in specifiche posizioni della molecola, generando frammenti che assumono precise denominazioni (figura 6.7).



**Figura 6.7. Possibili frammentazioni di un peptide in seguito a ionizzazione elettrospray**

Trattandosi di una tecnica di ionizzazione a bassa energia, l'elettrospray permette la frammentazione solo a livello del legame peptidico, ad energia minore, portando, così, alla formazione di due serie di frammenti, noti come frammenti *b* e frammenti *y*, a seconda che la carica rimanga sulla porzione N-terminale o C-terminale; per ogni peptide isobaro è possibile calcolare i diversi frammenti della serie *b* e *y*, che, confrontati con i frammenti realmente presenti nello spettro di massa ricostruito, permettono l'identificazione della sequenza peptidica.

Nell'ingrandimento dello spettro ricostruito corrispondente al picco a 27,31 min (figura 6.8) è possibile osservare la presenza di alcuni ioni di frammentazione, 1380, 1292 e 1179, corrispondenti, rispettivamente, alla perdita progressiva del dipeptide Pro-Glu, di un residuo di serina, e di uno di leucina, dal lato C-terminale (ioni di tipo *b*); tale caratteristico pattern di frammentazione, unito al peso molecolare (1623), ci ha permesso di risalire alla sequenza α<sub>S1</sub>-CN(f1-14), RPKHPIKHQGLSPE. Il fatto che in questo caso si vedano soprattutto gli ioni della serie *b* è dovuto alla presenza, dal lato N-terminale di tale frammento, di un gran numero di residui basici, per cui al momento della frammentazione la probabilità che la carica positiva rimanga sul frammento *b* risulta essere maggiore.



**Figura 6.8. Ingrandimento dello spettro ricostruito del composto eluito a 27,31 min mostrante il pattern di frammentazione**

L' identificazione di peptidi in alcuni casi è resa complessa dalla scarsa frammentazione che induce la sorgente electrospray, per questo alcuni oligopeptidi analizzati non sono stati identificati. Gli oligopeptidi studiati sono riportati in tabella 6.3.

**Tabella 6.3. Peptidi identificati nei formaggi “pecorino”**

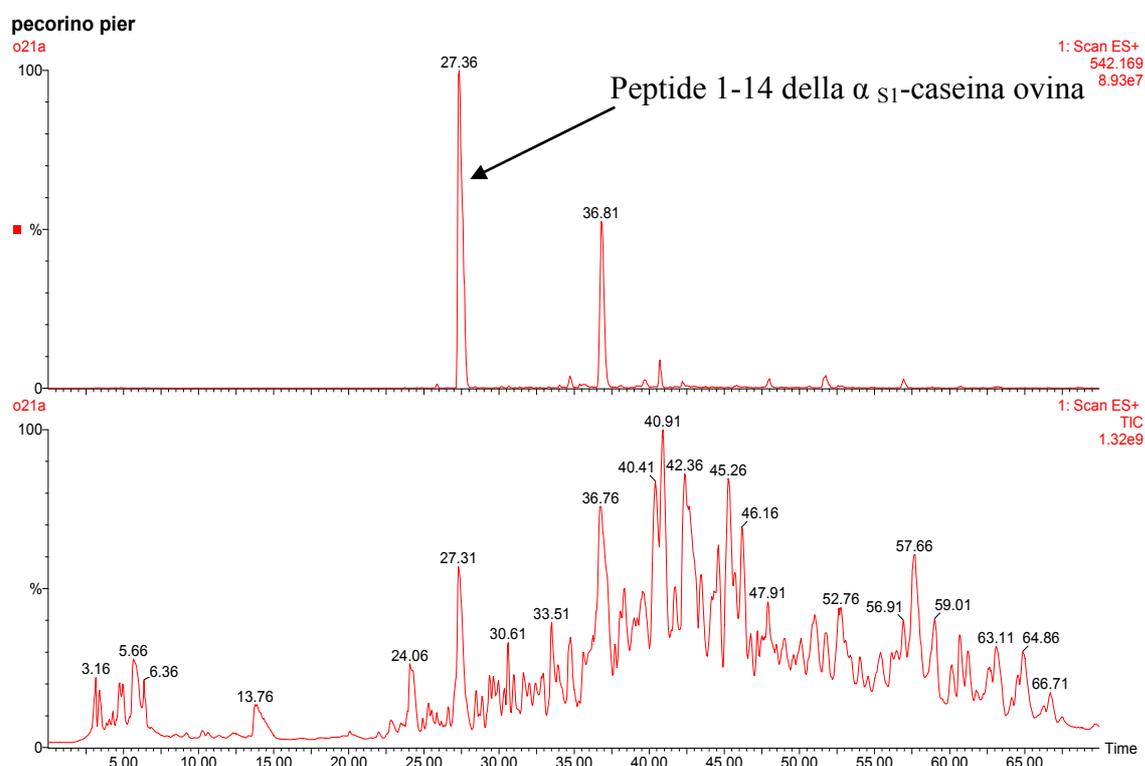
<b>Numero progressivo</b>	<b>Ione caratteristico</b>	<b>Tempo di ritenzione</b>	<b>Peso molecolare</b>	<b>Identificazione</b>
1	452	24,60	901	$\alpha_{S1}$ -CN(f33-39)
2	471	25,88	940	$\beta$ -CN(f22-29)
3	542	27,76	1624	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-14)
4	474	29	473	N.I.
5	489	30	488	$\alpha_{S1}$ -CN(f17-20)
6	525	30,5	1048	$\alpha_{S1}$ -CN(f143-150)
7	663	30,86	2650	$\beta$ -CN(f169-191)
8	591	32,6	804	$\beta$ -CN(f126-132)
9	647	33,9	646	N.I.
10	265	34,8	264	$\alpha_{S1}$ -CN(f31-32)
11	568	36,6	779	$\beta$ -CN(f170-176)
12	694	37,66	2079	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-18)
13	613	38,36	1836	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-16)
14	548	38,7	1093	$\beta$ -CN(f43-51)
15	533	40,57	1598	$\beta$ -CN(f103-115)
16	701	40,86	700	$\alpha_{S1}$ -CN(f105-110)
17	495	41,7	989	$\beta$ -CN(f42-49)
18	570	42	569	$\alpha_{S1}$ -CN(f105-109)
19	1137	42,3	1136	N.I.
20	770	43,2	2306	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-20)
21	606	43,5	1816	$\alpha_{S1}$ -CN(f136-150)
22	486	43,96	969	$\alpha_{S1}$ -CN(f15-20)
23	653	44,2	3264	N.I.
24	659	44,5	658	$\alpha_{S1}$ -CN(f25-30)
25	647	45	1292	N.I.
26	632	45,01	2525	N.I.
27	804	45,3	2409	N.I.
28	741	45,5	3703	N.I.
29	758	45,9	757	$\alpha_{S1}$ -CN(f24-30)
30	640	46	2556	$\beta$ -CN(f164-186)
31	1014	46,16	1013	$\alpha_{S1}$ -CN(f134-142)
32	658	46,6	2628	$\beta$ -CN(f164-187)
33	659	48,11	658d	$\alpha_{S1}$ -CN(f26-31)

Numero progressivo	Ione caratteristico	Tempo di ritenzione	Peso molecolare	Identificazione
34	583	48,5	1164	$\beta$ -CN(f164-174)
35	681	53	2722	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-23)
36	857	53,11	856	$\alpha_{S1}$ -CN(f24-31)
37	633	54,4	1263	N.I.
38	867	56,46	2598	$\beta$ -CN(f167-189)
39	806	57,1	805	$\alpha_{S1}$ -CN(f26-32)
40	905	59,6	904	$\alpha_{S1}$ -CN(f25-32)
41	751	60,46	3001	$\beta$ -CN(f164-190)
42	1004	60,9	1003	$\alpha_{S1}$ -CN(f24-32)
43	916	61,96	2748	$\beta$ -CN(f38-60)
44	746	62,9	1490	$\beta$ -CN(f125-137)
45	892	63,56	1782	$\beta$ -CN(f191-206)
46	1146	64,2	2290	N.I.
47	795	64,46	1588	$\beta$ -CN(f193-207)

#### 6.3.2.4 Semiquantificazione dei peptidi

L'HPLC-MS con interfacciamento ESI permette, come visto, una corretta identificazione dei picchi, ma i peptidi, anche se sono molecole simili, vengono ionizzati diversamente a seconda dei loro residui ammino acidici. Pertanto il diverso fattore di risposta non consente una quantificazione diretta del peptide per confronto con lo standard interno, preclusa anche dal fatto che non disponiamo degli standard per ognuno di essi. Per questo abbiamo optato per una semiquantificazione dei peptidi, in base ad un metodo sviluppato nel nostro gruppo di ricerca e riportato in letteratura<sup>2</sup>. Ogni picco cromatografico analizzato è stato integrato per ricavarne l'area, che successivamente è stata rapportata a quella del picco dello standard interno, anch'essa ricavata dal medesimo cromatogramma. La scelta come standard interno è caduta sul dipeptide Phe-Phe in quanto non è contenuto nei campioni, ed è eluito in una zona in cui sono poco presenti altri picchi cromatografici. Con la semiquantificazione si ottengono delle quantità relative, che non ci consentono di quantificare in maniera assoluta un dato peptide, ma ci consentono di seguire e valutare l'evoluzione dei peptidi nelle diverse fasi di produzione del formaggio, alla luce delle diverse tecnologie applicate. Al fine di valutare correttamente i peptidi d'interesse, e' necessario depurare il cromatogramma ottenuto dall' analisi HPLC-MS da tutti i picchi interferenti: per ogni

picco cromatografico, dall'analisi del corrispondente spettro di massa, è stato caratterizzato lo ione caratteristico, cioè quello che più lo caratterizza per abbondanza e facilità di identificazione; estraendo, mediante opportuno software, tale ione dal cromatogramma TIC, si ottiene il corrispondente XIC (extract ion chromatogram), che presenta un tracciato più pulito, permettendo una migliore valutazione del peptide nei diversi campioni, ed un preciso calcolo dell'area di integrazione. Questa tecnica si è rivelata particolarmente utile nel nostro caso, in quanto i cromatogrammi dei formaggi modello pecorino presentano un profilo peptidico molto ricco e complesso, già subito dopo la salatura. Come esempio è riportato il cromatogramma TIC in relazione a quello XIC del peptide 1-14 della  $\alpha_{S1}$ -caseina ovina (figura 6.9).



**Figura 6.9. Cromatogramma XIC del peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14)**

### 6.3.3 Risultati della semiquantificazione dei peptidi

L'analisi appena descritta è stata applicata a tutti i campioni. I risultati sono di seguito riportati graficamente.

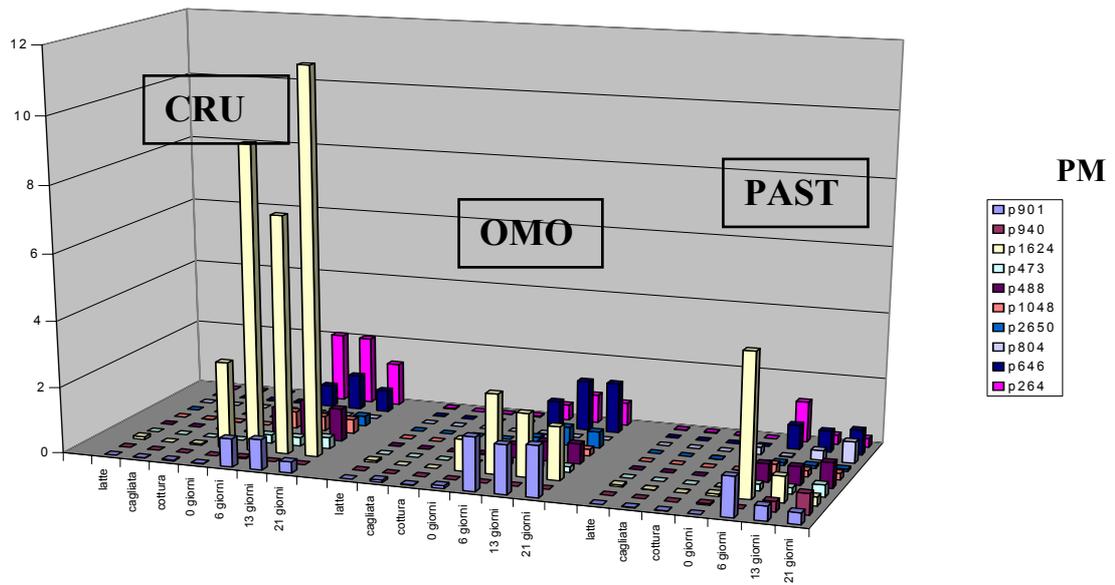


Figura 6.10. Evoluzione dei peptidi eluiti tra i 20 e 35 minuti

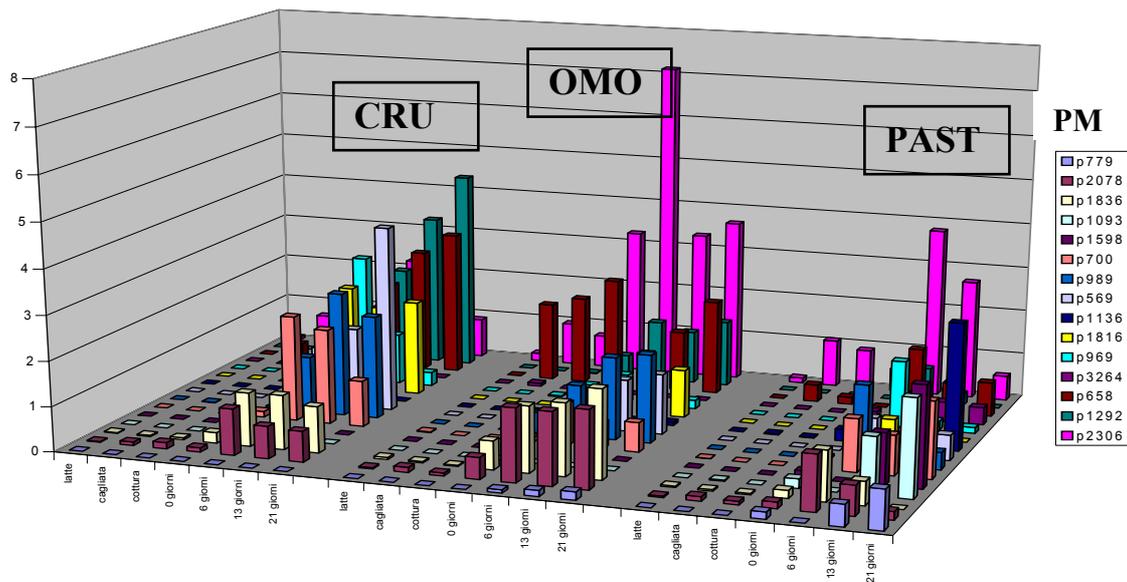
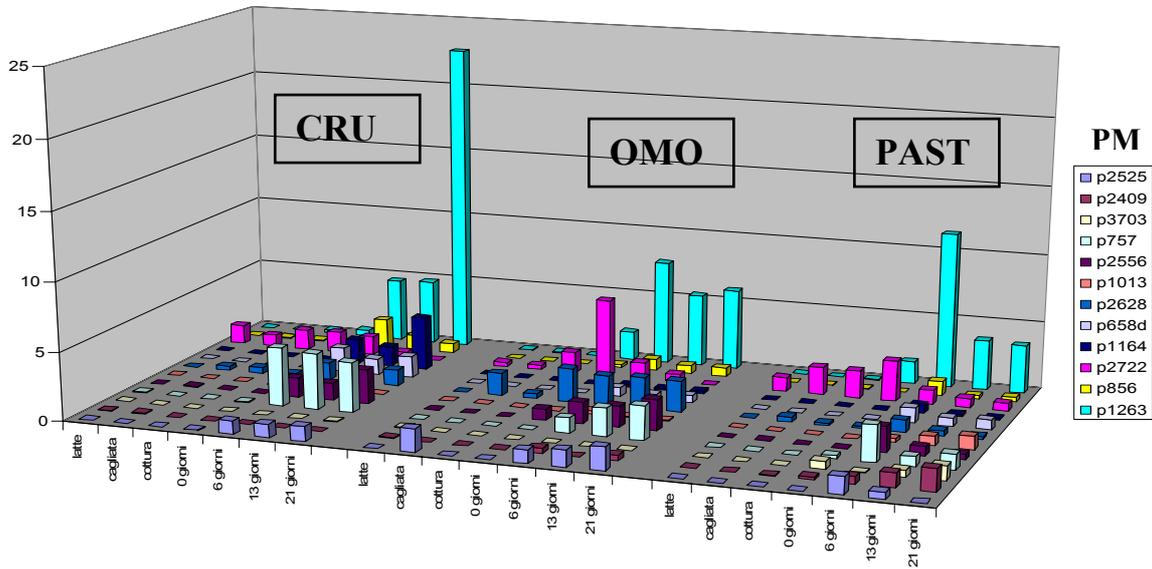
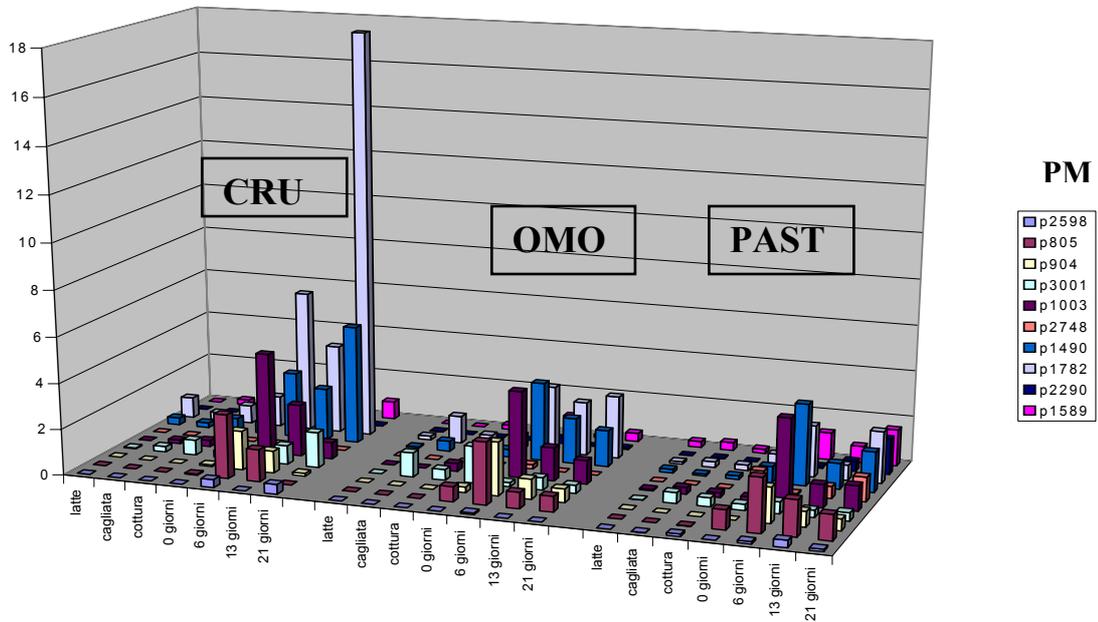


Figura 6.11. Evoluzione dei peptidi eluiti tra i 36 e 45 minuti



**Figura 6.12. Evoluzione dei peptidi eluiti tra i 46 e 55 minuti**



**Figura 6.13. Evoluzione dei peptidi eluiti tra i 56 e 70 minuti**

Questi grafici ci permettono un'ampia visione dell'andamento peptidico, ma la loro interpretazione e discussione sarà completa alla luce dei risultati delle analisi statistiche nel capitolo successivo. Per ora possiamo comunque ricavare alcune importanti osservazioni:

- Il latte ovino è povero di peptidi, e rimane tale anche per i primi giorni di caseificazione;
- il profilo peptidico mostra notevoli differenze a seconda dei trattamenti tecnologici subiti dal latte;
- esistono peptidi particolarmente abbondanti che contribuiscono maggiormente, rispetto ad altri, alla caratterizzazione del sistema:  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14),  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-20),  $\beta$ -CN(f191-206) ed il peptide con peso molecolare 1263 Da, non identificato.

### **6.3.4 Analisi statistica dei risultati della semiquantificazione dei peptidi**

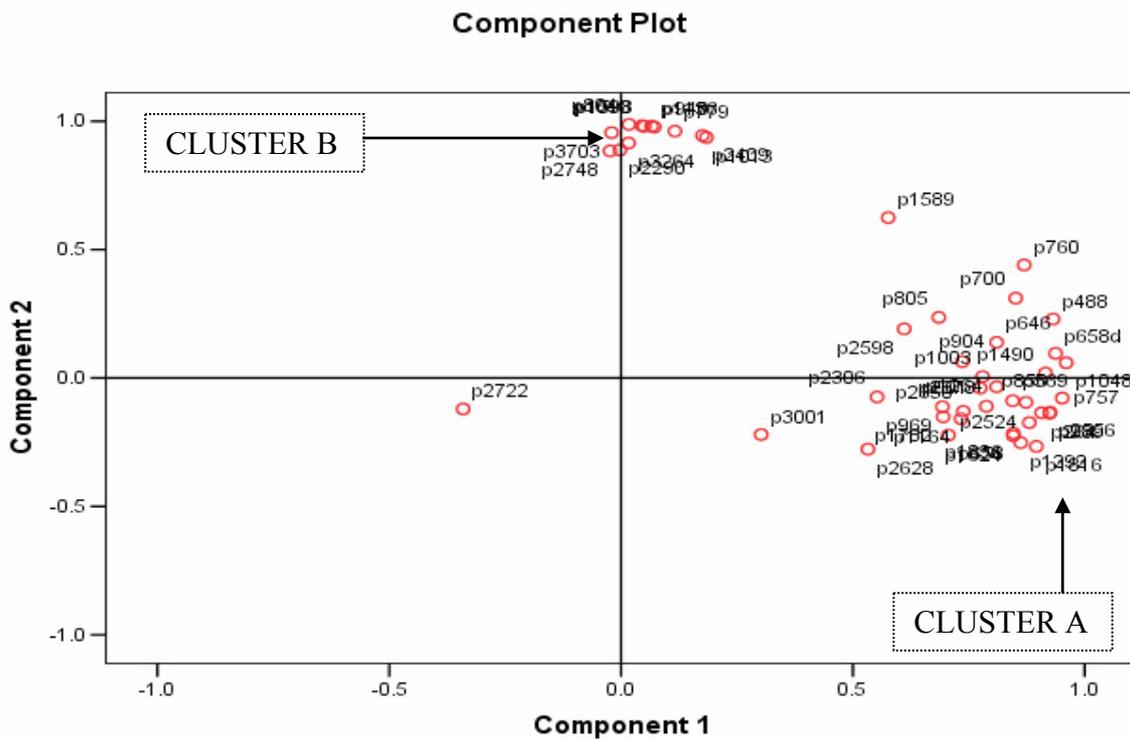
Per evidenziare le differenze tra i formaggi a diversi tempi di stagionatura e differenti trattamenti tecnologici, l'analisi statistica è stata applicata ai dati ricavati; in particolare sono state eseguite : l'analisi delle componenti principali (PCA) e l'analisi della varianza ad una via (ANOVA).

#### **6.3.4.1 Analisi delle componenti principali (PCA)**

Per l'analisi dei dati semiquantitativi si è utilizzata innanzitutto l'analisi delle componenti principali (PCA). La PCA permette di correlare tra di loro numerosi dati, riferiti a campioni diversi. Ogni dato è rappresentato da un asse nello spazio; a seconda del numero di variabili, si ottiene quindi un sistema definito in uno spazio n-dimensionale (con  $n$  = numero di variabili). Le variabili inserite vengono ricombinate portando all'ottenimento di nuove variabili (chiamate componenti), ognuna rappresentata da un nuovo asse ottenuto da una combinazione lineare delle  $n$  variabili iniziali; si viene così a determinare un nuovo spazio n-dimensionale. Il coefficiente che lega la vecchia variabile con la componente (nuova variabile) rappresenta il peso della variabile (loading) per quella componente e può assumere un valore compreso fra -1 e +1. La totale mancanza di relazione tra variabile e componente si verifica quando il peso della variabile in quella componente assume valore prossimo a zero. La trasformazione delle variabili nelle nuove componenti viene fatta in modo che la maggior parte della varianza del sistema sia spiegata solo da due o da tre componenti, dette appunto componenti principali. L'analisi delle componenti principali può

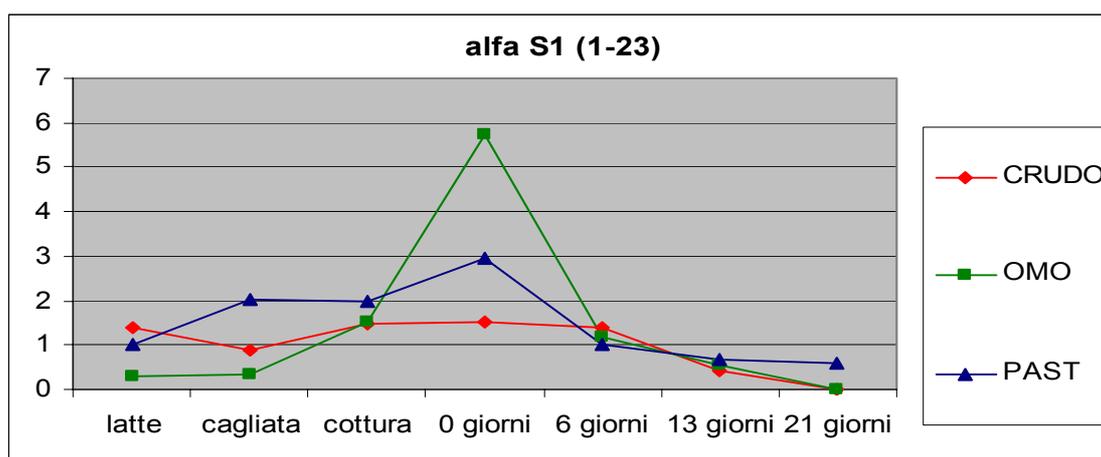
essere visualizzata proiettando il peso delle variabili nel piano delle due componenti principali, ottenendo un grafico detto diagramma dei pesi (loading plot). In questo diagramma le variabili che hanno un peso simile ed elevato lungo una delle componenti sono collegate fra loro e evidenziano quindi una correlazione.

Se consideriamo invece diversi campioni, si ha che questi sono caratterizzati da n coordinate (le variabili nello spazio). L'elaborazione degli assi ed il passaggio a n componenti portano i campioni ad avere n nuove coordinate. L'insieme delle n nuove coordinate del campione prende il nome di punteggio (score). In questo caso la proiezione del campione sul piano, identificato dalle due componenti principali, prende il nome di diagramma dei punteggi (score plot). Anche in questo diagramma, campioni che hanno punteggio simile lungo una delle componenti, sono campioni che evidenziano una somiglianza. In figura 6.14 è riportato il loading plot dei risultati della semiquantificazione dei peptidi.



**Figura 6.14. Loading plot della semiquantificazione dei peptidi (varianza spiegata PC1 = 46,7% , PC2 = 26,3% totale = 73%)**

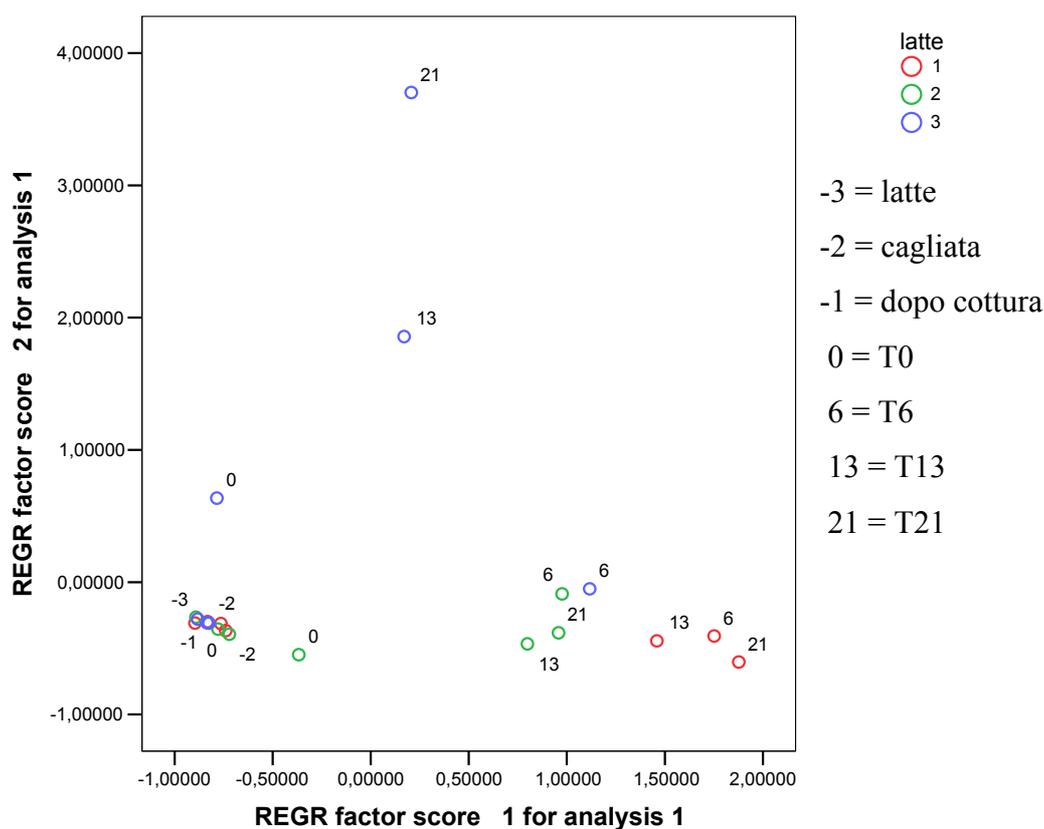
Si evidenzia la presenza di due cluster di peptidi nettamente separati tra loro. I peptidi all'interno di ogni cluster mostrano una correlazione tra loro più o meno stretta che può essere imputabile a diversi fattori e può essere indice di un destino metabolico comune o comunque di un andamento comune nel corso della stagionatura del formaggio. In particolare i peptidi all'interno del cluster A mostrano una forte correlazione lungo la componente 1, mentre hanno correlazione quasi nulla lungo la componente 2. I peptidi appartenenti al cluster B invece mostrano correlazioni opposte: hanno una stretta correlazione lungo la componente 2 e nessuna correlazione lungo la componente 1. Inoltre si evidenzia la presenza di un peptide che mostra un andamento significativamente diverso in quanto non correlato a nessun altro; si tratta di quello con peso molecolare 2722 Da, identificato come l' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23). In effetti il suo andamento (mostrato in figura 6.15) appare anomalo rispetto a quello della maggior parte degli altri peptidi.



**Figura 6.15. Andamento del peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23)**

Questa rappresentazione grafica mostra come l' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23) sia presente fin dalle prime fasi di lavorazione, ed abbia un massimo nei primissimi giorni di stagionatura, per poi decrescere progressivamente in quantità nel corso della maturazione del formaggio. Ciò, probabilmente, deriva dal fatto che questo peptide è generato per azione diretta della chimosina<sup>4</sup>, l'enzima principale del caglio; la chimosina appare attiva fin dai primi momenti della caseificazione, subito dopo l'aggiunta del caglio al latte, ma tende progressivamente a rallentare la sua attività nel corso della stagionatura a causa dell'innalzamento del pH del mezzo. Il peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23) tenderà a formarsi copiosamente fin dai primi momenti della produzione del formaggio, quando la chimosina trova le

condizioni necessarie affinché possa esplicare la sua azione; tuttavia, nel momento in cui si forma, esso diventa a sua volta substrato per endo ed esopeptidasi, con conseguente abbassamento dei livelli nel corso della stagionatura, fino a divenire quasi zero intorno ai 21 giorni. Il fatto che i profili del peptide nelle diverse tipologie di formaggio non siano sovrapponibili non stupisce, in quanto, anche se l'enzima è sempre presente nelle stesse concentrazioni, e trova comunque le condizioni necessarie al suo funzionamento, appare logico che la sua attività possa essere influenzata dalla accessibilità alle micelle caseiniche; nei campioni da latte omogeneizzato il peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23) appare molto più abbondante, probabilmente per via del fatto che questo trattamento tecnologico induce modifiche sulle micelle caseiniche, tali da diventare più accessibili all'attacco enzimatico. In figura 6.16 è riportato lo score plot relativo ai risultati della semiquantificazione dei peptidi; i campioni sono stati etichettati con i giorni di stagionatura, mentre i diversi colori evidenziano il tipo di trattamento a cui è stato sottoposto il latte.



**Figura 6.16. Score plot dei risultati della semiquantificazione dei peptidi (rosso-latte crudo; verde-latte omogeneizzato; blu-latte pastorizzato)**

Si nota come i peptidi non siano in grado di caratterizzare il tipo di lavorazione fino al periodo di inizio stagionatura; i segnali relativi al latte, cagliata, cagliata dopo cottura e tempo zero tendono, infatti, a sovrapporsi, senza mostrare alcuna distinzione tra le tre diverse tipologie di formaggio. Questo, alla luce dei grafici relativi alla semiquantificazione dei peptidi riportati nel paragrafo precedente, è probabilmente da ascrivere al fatto che tali campioni risultano ancora troppo poveri nella frazione oligopeptidica perché quest'ultima possa in qualche modo distinguere tra le tre tecnologie produttive. Sempre dallo score plot è possibile notare come, invece, i campioni al sesto giorno di stagionatura si differenziano notevolmente dai tempi precedenti, indice di un profilo peptidico che diviene più ricco e complesso, sebbene non ancora in grado di caratterizzare il processo tecnologico, essendo i segnali relativi ai diversi tipi di lavorazione piuttosto raggruppati. Le cose cambiano per tempi di stagionatura superiore al tredicesimo giorno, per i quali il profilo peptidico appare estremamente distintivo del trattamento tecnologico: i campioni risultano nettamente separati, in particolare modo quelli da latte pastorizzato mostrano un andamento molto diverso rispetto a quelli da latte crudo ed omogeneizzato, tra loro piuttosto simili. Meno spiccato è l'effetto che la frazione oligopeptidica mostra nel distinguere tra i diversi tempi di stagionatura, soprattutto per i campioni da latte crudo ed omogeneizzato. Il confronto tra il loading plot e lo score plot ci permette di evidenziare un'altra cosa molto interessante: dalle loro sovrapposizioni appare evidente come i due cluster peptidici caratterizzino in modo diverso i campioni a seconda che provengano da latte crudo, omogeneizzato o pastorizzato. In particolare il cluster B si posiziona bene nella zona dei campioni da latte pastorizzato, motivo per cui potrebbe essere formato da peptidi in qualche modo caratterizzanti per tale processo tecnologico. Situazione analoga si verifica anche per il cluster A che sembra essere caratterizzante per i campioni da latte crudo ed omogeneizzato. Inoltre, sempre dal confronto tra loading plot e score plot, appare evidente come il peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23) (2722 Da) si posizioni bene nella zona dei campioni subito successivi all'aggiunta della cagliata, a conferma del fatto che si tratta di un peptide che si accumula presto nel tempo, per poi diminuire rapidamente con la stagionatura.

A questo punto risulta interessante studiare nel dettaglio i peptidi che fanno parte di ogni singolo cluster.

### Component Plot

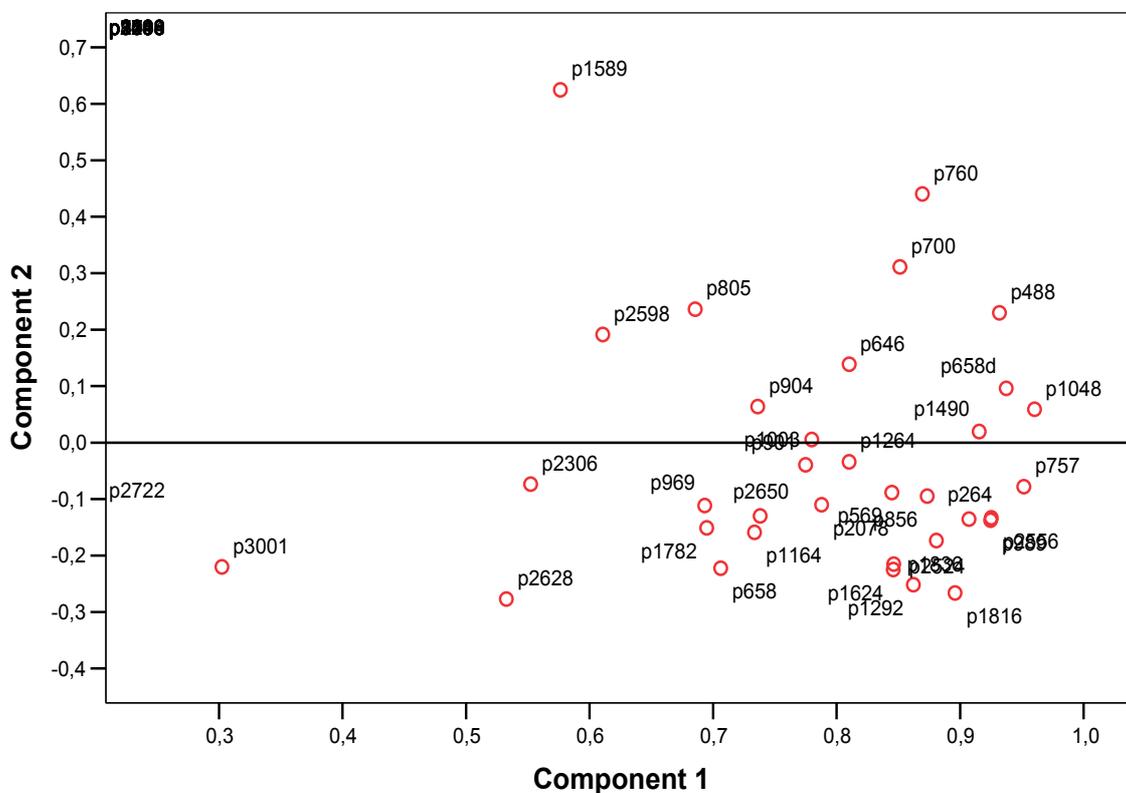


Figura 6.17. Ingrandimento del cluster A

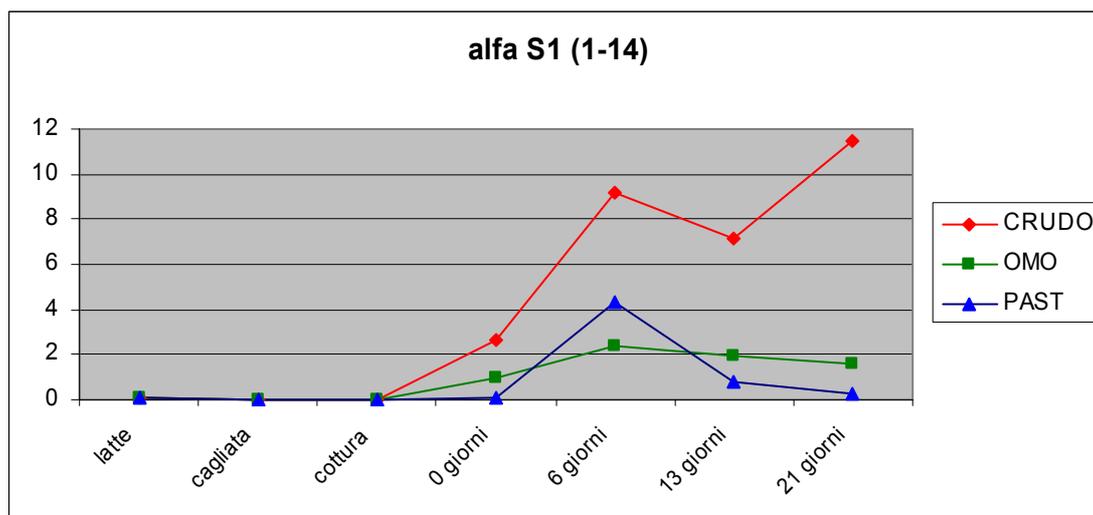
Tabella 6.4. Peptidi appartenenti al cluster A

Numero progressivo	Picco Caratteristico	Tempo di ritenzione	Peso molecolare	Identificazione
1	452	24,60	901	$\alpha_{S1}$ -CN(f33-39)
3	542	27,76	1624	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-14)
4	474	29	473	N.I.
5	489	30	488	$\alpha_{S1}$ -CN(f17-20)
6	525	30,5	1048	$\alpha_{S1}$ -CN(f143-150)
7	663	30,86	2650	$\beta$ -CN(f169-191)
9	647	33,9	646	N.I.
10	265	34,8	264	$\alpha_{S1}$ -CN(f31-32)
12	694	37,66	2079	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-18)

Numero progressivo	Picco Caratteristico	Tempo di ritenzione	Peso molecolare	Identificazione
13	613	38,36	1836	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-16)
16	701	40,86	700	$\alpha_{S1}$ -CN(f105-110)
17	495	41,7	989	$\beta$ -CN(f42-49)
18	570	42	569	$\alpha_{S1}$ -CN(f105-109)
20	770	43,2	2306	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-20)
21	606	43,5	1816	$\alpha_{S1}$ -CN(f136-150)
22	486	43,96	969	$\alpha_{S1}$ -CN(f15-22)
24	659	44,5	658	$\alpha_{S1}$ -CN(f25-30)
25	647	45	1292	N.I.
26	632	45,01	2525	N.I.
29	758	45,9	757	$\alpha_{S1}$ -CN(f24-30)
30	640	46	2556	$\beta$ -CN(f164-186)
32	658	46,6	2628	$\beta$ -CN(f164-187)
33	659	48,11	658d	$\alpha_{S1}$ -CN(f26-31)
34	583	48,5	1164	$\beta$ -CN(f164-174)
36	857	53,11	856	$\alpha_{S1}$ -CN(f24-31)
37	633	54,4	1263	N.I.
38	867	56,46	2598	$\beta$ -CN(f164-189)
39	806	57,1	805	$\alpha_{S1}$ -CN(f26-32)
40	905	59,6	904	$\alpha_{S1}$ -CN(f25-32)
41	751	60,46	3001	$\beta$ -CN(f164-190)
42	1004	60,9	1003	$\alpha_{S1}$ -CN(f24-32)
44	746	62,9	1490	$\beta$ -CN(f125-137)
45	892	63,56	1782	$\beta$ -CN(f191-206)
47	795	64,46	1588	$\beta$ -CN(f193-207)

Il cluster A mostra una serie di peptidi derivanti dalla degradazione della sequenza  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23):  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14),  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-16),  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-18); il fatto di ritrovarli tutti molto vicini è sicuramente indicativo della loro origine comune, anche se, ad una prima considerazione, sembra molto strano che non faccia parte dello stesso raggruppamento

anche lo stesso  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23). Tuttavia bisogna considerare che l'appartenenza ad un determinato cluster è da attribuire principalmente ad un comune andamento nel tempo; da questo punto di vista, i peptidi considerati si comportano sicuramente in modo molto diverso. Come detto, l' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23) deriva principalmente dall'azione enzimatica della chimosina, e come tale mostra, come visto, una massiccia produzione subito dopo l'aggiunta del caglio, raggiungendo un massimo intorno ai primi giorni di stagionatura; i prodotti della degradazione di tale sequenza, invece, derivano da un tipo diverso di attività enzimatica, probabilmente ascrivibile al sistema proteolitico dei batteri lattici, e mostrano un andamento opposto, cominciano a comparire in modo significativo solo intorno al sesto giorno, per poi raggiungere dei massimi intorno ai 20 o più giorni di stagionatura. Particolarmente significativo è il caso della sequenza  $\alpha_{S1}$  (1-14), che raggiunge livelli particolarmente elevati solo dopo un certo numero di giorni, soprattutto nel caso delle tipologie da latte crudo ed omogeneizzato (figura 6.18).



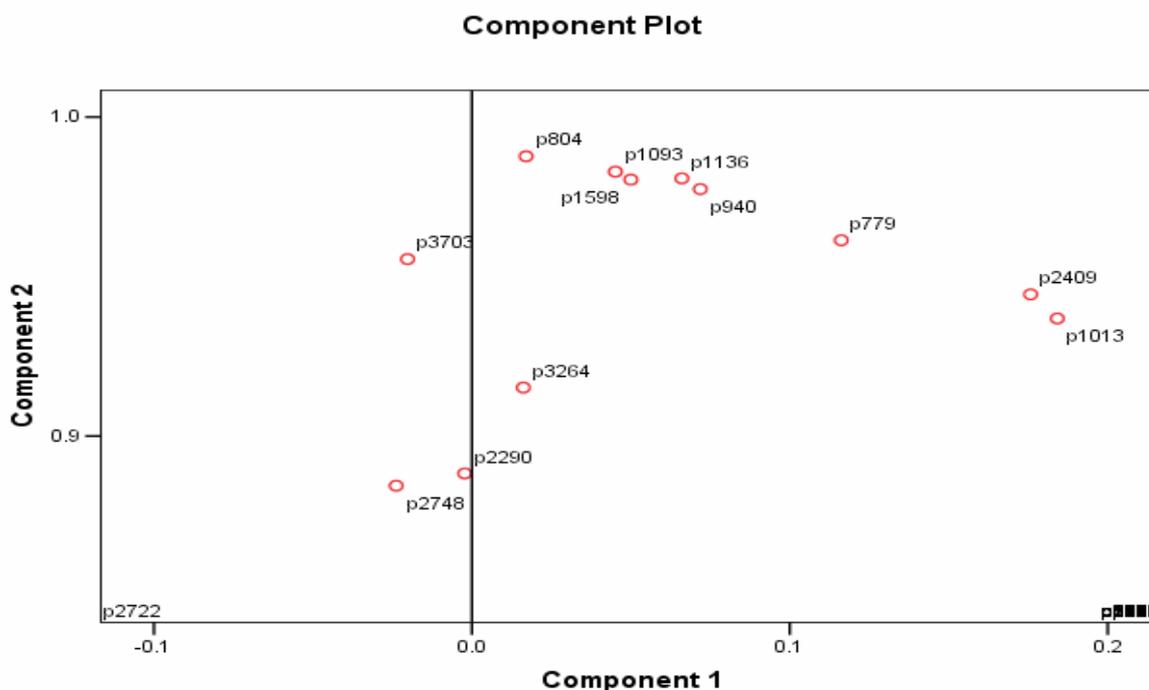
**Figura 6.18. Andamento del peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14)**

La sequenza  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) accumulandosi in modo significativo con la stagionatura, rappresenta una sorta di prodotto finale; in particolare sarebbe logico ipotizzare che essa derivi in modo quasi univoco dagli endopeptidasi della sequenza  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-16), data la loro totale sovrapposizione nel loading plot.

Sulla base dei peptidi identificati, nell'ambito del cluster A è possibile ipotizzare un altro possibile percorso degradativo, a partire dal peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f24-32), complementare alla sequenza  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23): è lecito pensare che, una volta rimossa tale sequenza ad opera

della chimosina, la nuova estremità N-terminale della  $\alpha_{S1}$ -caseina sia a sua volta esposta all'azione di altre peptidasi; in particolare, il taglio tra la Phe-32 e l'Arg-33, molto favorito, è riportato in letteratura essere opera della stessa chimosina<sup>5</sup>. Una volta liberato, il suddetto peptide può andare incontro ad un pattern degradativo in cui risultano essere coinvolti soprattutto ammino- e carbossipeptidasi, probabilmente facenti parte del sistema proteolitico dei batteri lattici: da un lato il peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f24-32) può perdere il residuo N-terminale, dando origine al frammento  $\alpha_{S1}$ -CN(f25-32), dall'altro può subire la perdita del residuo C-terminale, con conseguente formazione di  $\alpha_{S1}$ -CN(f24-31). Tali frammenti possono a loro volta generare una serie di peptidi a più basso peso molecolare, molti dei quali sono stati identificati nei nostri campioni:  $\alpha_{S1}$ -CN(f26-32),  $\alpha_{S1}$ -CN(f26-31),  $\alpha_{S1}$ -CN(f24-30) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f25-30); gli ultimi due sono particolarmente interessanti, sia perchè il sito di taglio che li genera (E-V) è uguale a quello che genera il peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14), e quindi molto favorito, sia perchè potrebbero derivare in modo diretto dalle sequenze  $\alpha_{S1}$ -CN(f24-32) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f25-32) rispettivamente, per rimozione endopeptidasica del dipeptide C-terminale V-F, effettivamente riscontrato nei nostri campioni (PM 264).

Vediamo ora il cluster B:



**Figura 6.19. Ingrandimento del cluster B**

**Tabella 6.5. Peptidi appartenenti al cluster B**

Numero progressivo	Picco Caratteristico	Tempo di ritenzione	Peso molecolare	Identificazione
2	471	25,88	940	$\beta$ CN(f22-29)
8	591	32,6	804	$\beta$ CN(f126-132)
11	568	36,6	779	$\beta$ CN(f170-176)
14	548	38,7	1093	$\beta$ CN(f43-51)
19	1137	42,3	1136	N.I.
23	653	44,2	3264	N.I.
27	804	45,3	2409	N.I.
28	741	45,5	3703	N.I.
31	1014	46,16	1013	$\alpha_{S1}$ CN(f134-142)
43	916	61,96	2748	$\beta$ CN(f38-60)
46	1146	64,2	2290	N.I.

Il cluster B risulta formato sia da peptidi che non sono stati identificati, perché mostranti una frammentazione scarsa e di difficile interpretazione, sia da peptidi che, seppure identificati, non sembrano appartenere ad uno stesso pattern degradativo; l'unica cosa che si può ipotizzare è che la loro forte correlazione possa essere dovuta all'azione di enzimi comuni, e che quindi presentino un andamento analogo. Inoltre, per il discorso fatto prima della sovrapposizione tra loading e score plot, sembra che siano peptidi caratterizzanti per la tipologia di pecorino da latte pastorizzato.

La notevole differenza di contenuto peptidico osservata nel formaggio pastorizzato, rispetto a quelli da latte crudo ed omogeneizzato, potrebbe essere dovuta allo stesso trattamento termico di pastorizzazione. Tale trattamento incide profondamente sulla popolazione microbica endogena del latte, che viene abbassata di almeno due o tre riduzioni decimali; lo sviluppo di una microflora più povera rispetto al latte crudo incide sicuramente sullo sviluppo proteolitico durante la fase di stagionatura. Un aspetto molto importante è rappresentato anche dall'influenza del processo di pastorizzazione sull'attività enzimatica del latte: la microflora psicofila non sporigena generalmente viene fortemente ridotta, se non azzerata, dai trattamenti classici di pastorizzazione, ma altrettanto non accade agli enzimi da essa prodotti, che possono restare attivi nel latte e anche nei formaggi, a seconda della loro maggiore o minore termoresistenza; un'attività enzimatica diversa rispetto a

quella osservata per il latte crudo o omogeneizzato può, a sua volta contribuire al diverso sviluppo proteolitico.

### 6.3.4.2 Analisi della varianza ad una via (ANOVA)

Questo tipo d'analisi permette di valutare l'effetto di diversi fattori sulla variabilità dei risultati sperimentali del sistema in osservazione, determinando quale variazione è imputabile ad effetti casuali e quale all'effetto dei fattori; in particolare l'analisi ANOVA ad una via consente di valutare l'effetto di un singolo fattore su di un sistema. I fattori da noi considerati sono due: stagionatura e trattamento tecnologico; il livello decisionale considerato corrisponde ad una probabilità nulla  $< 0,05$ . L'insieme dei campioni viene diviso in livelli o trattamenti in modo che sia possibile capire se la differenza dei risultati che otteniamo per ogni livello e per ogni componente sia effettivamente imputabile ai fattori considerati, oppure alla variabilità intrinseca del sistema.

Tramite tale analisi si sono valutati i peptidi significativamente diversi nei formaggi prodotti con diverse tecnologie. Poiché i campioni corrispondenti alle prime fasi di caseificazione si sono mostrati, dall'analisi della PCA, scarsamente significativi nel definire la frazione oligopeptidica, essi sono stati esclusi da tale analisi. I risultati sono riassunti nella tabella sottostante, dove sono stati riportati i peptidi che caratterizzano un trattamento tecnologico rispetto agli altri due.

**Tabella 6.6. Peptidi caratterizzanti i diversi trattamenti tecnologici (livello di significatività  $P < 0.05$ )**

Formaggi da latte crudo	Formaggi da latte omogeneizzato	Formaggi da latte pastorizzato
$\alpha$ S1 (1-14)	$\alpha$ S1 (1-20)	$\beta$ (126-132)
		3264 Da
		2409 Da
		3703 Da
		2748 Da
		2290 Da

Il formaggio da latte pastorizzato risulta essere quello con il maggior numero di peptidi caratterizzanti. Questo appare logico alla luce dei risultati della semiquantificazione dei peptidi, dove per i formaggi da latte pastorizzato è evidente un andamento peptidico decisamente caratteristico. Come si può notare, per molti di questi peptidi non è stata ancora possibile l'identificazione, ma è interessante notare che appartengono tutti al cluster B: questo conferma il cluster B come caratterizzante per il latte pastorizzato.

Molto interessanti appaiono anche i peptidi  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) ed  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-20), che possono essere considerati una sorta di marker per formaggi da latte crudo ed omogeneizzato, rispettivamente. Il fatto che solo due peptidi risultino caratterizzanti per queste due tecnologie produttive è una ulteriore conferma della loro estrema somiglianza, da un punto di vista del profilo oligopeptidico; tale somiglianza è molto probabilmente da ascrivere al fatto che l'omogeneizzazione ad alte pressioni, oltre a causare una maggiore disgregazione delle micelle caseiniche, rendendole più esposte all'attività proteolitica, non induce sostanziali modifiche alla flora microbica ed al profilo enzimatico endogeno del latte crudo.

## **6.4 PARTE SPERIMENTALE**

### **6.4.1 Reagenti**

- Acido cloridrico 0,1 N (ottenuto con fiala Normex; il contenuto viene portato al volume di 1L con H<sub>2</sub>O bidistillata)
- Fenilalanil fenilalanina (Sigma)
- Etere etilico (Riedel de Haën)
- Acetonitrile per HPLC (Carlo Erba)
- Acido formico puro 99% (Acros)
- Acqua bidistillata ottenuta con il sistema Millipore Alpha Q

### **6.4.2 Strumentazione**

- L'omogeneizzatore usato è l'ULTRATURRAX T25 basic IKA.
- I filtri per ultrafiltrazione sono AMICON ULTRAFILTERS YM10 (per il cut-off a 10000 Da) e AMICON ULTRAFILTERS YM3 (per il cut-off a 3000 Da). Questi filtri sono montati sugli appositi kit per ultrafiltrazione AMICON MICROPARTITION SYSTEM MPS-1.

- Le centrifughe utilizzate sono ALC CENTRIFUGETTE 4206 (utilizzata per i tagli molecolari) e ALC 4237R termostata (utilizzata per la sedimentazione del precipitato proteico).
- Per la filtrazione a 0,45 µm sono stati utilizzati filtri MILLIPORE tipo HVLP montati su un opportuno sistema per la filtrazione sotto vuoto (MILLIPORE 47 mm STERIL ASEPTIC SYSTEM).
- HPLC-MS: La colonna utilizzata per le analisi dei peptidi è una JUPITER 5 µm C18 300 Å (250 x 4,6 mm). Le analisi sono state condotte utilizzando un sistema costituito da una pompa a quattro vie modello ALLIANCE WATERS 2695 connessa ad uno spettrometro di massa MICROMASS ZMD a singolo quadrupolo dotato di interfaccia ESI.
- Acquisizione dei dati mediante il software MASSLYNX 3.5.
- Analisi statistica condotta mediante il software SPSS.

### **6.4.3 Campionamento**

La preparazione dei formaggi modello è stata eseguita come descritto nella parte “Risultati e discussione”.

Per ogni tipologia di formaggio (da latte crudo, pastorizzato, ed omogeneizzato mediante alte pressioni) sono stati prelevati ed analizzati campioni relativi alle seguenti fasi di produzione:

- latte
- cagliata
- cagliata dopo cottura
- 0 giorni
- 6 giorni
- 13 giorni
- 21 giorni

### **6.4.4 Estrazione della frazione peptidica**

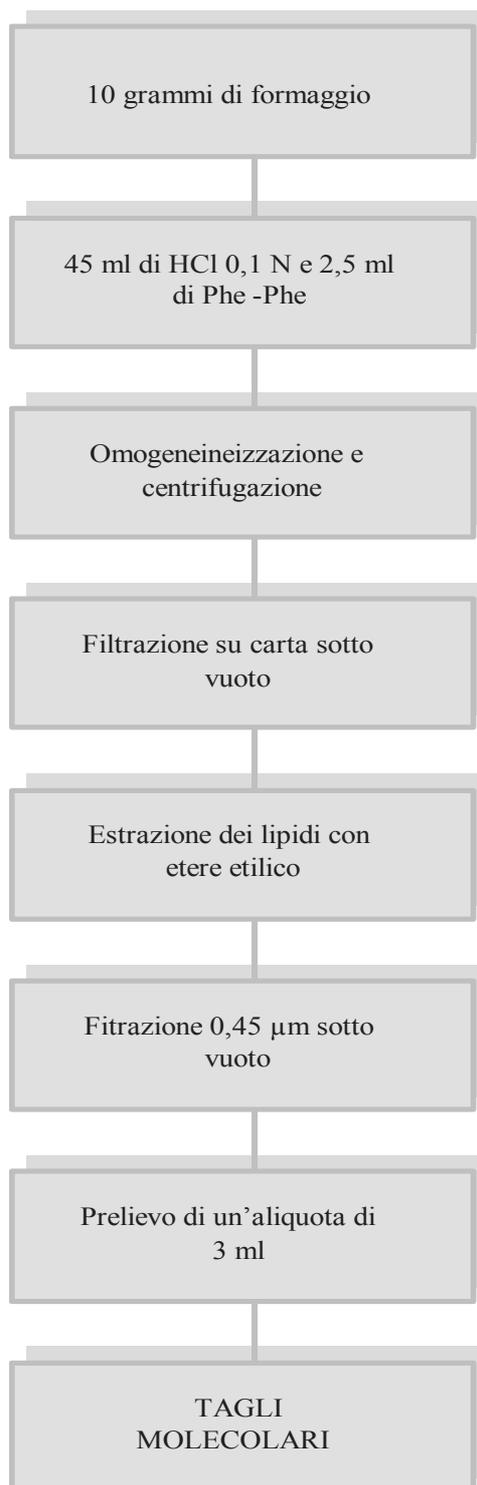
Si pesano 10 g di formaggio ai quali vengono aggiunti 45 ml di HCl 0,1 N e 2,5 ml di standard interno (Phe-Phe 1mM). Il campione ottenuto è omogeneizzato mediante Ultraturrax, quindi centrifugato a 5000 rpm per 30 minuti in una centrifuga termostata a +4°C, in modo da favorire la sedimentazione del precipitato proteico. La soluzione acquosa

viene filtrata su carta utilizzando un imbuto Buchner sotto vuoto. Per allontanare i grassi ancora presenti in soluzione si procede a 3 estrazioni successive con etere etilico. Dopo aver allontanato dal campione l'etere residuo mediante evaporatore rotante, si procede con una filtrazione utilizzando un apposito dispositivo per la filtrazione sotto vuoto (Millipore 46 mm steril aseptic system con filtri Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  tipo HVLP). Dal filtrato si prelevano due aliquote di 3 ml ciascuna, che vengono portate a secchezza mediante evaporatore rotante, riprese con 2 ml di soluzione di acido formico in acqua a pH 3 e sottoposte alla successiva procedura di ultrafiltrazione. La procedura di estrazione è schematizzata in figura 6.20.

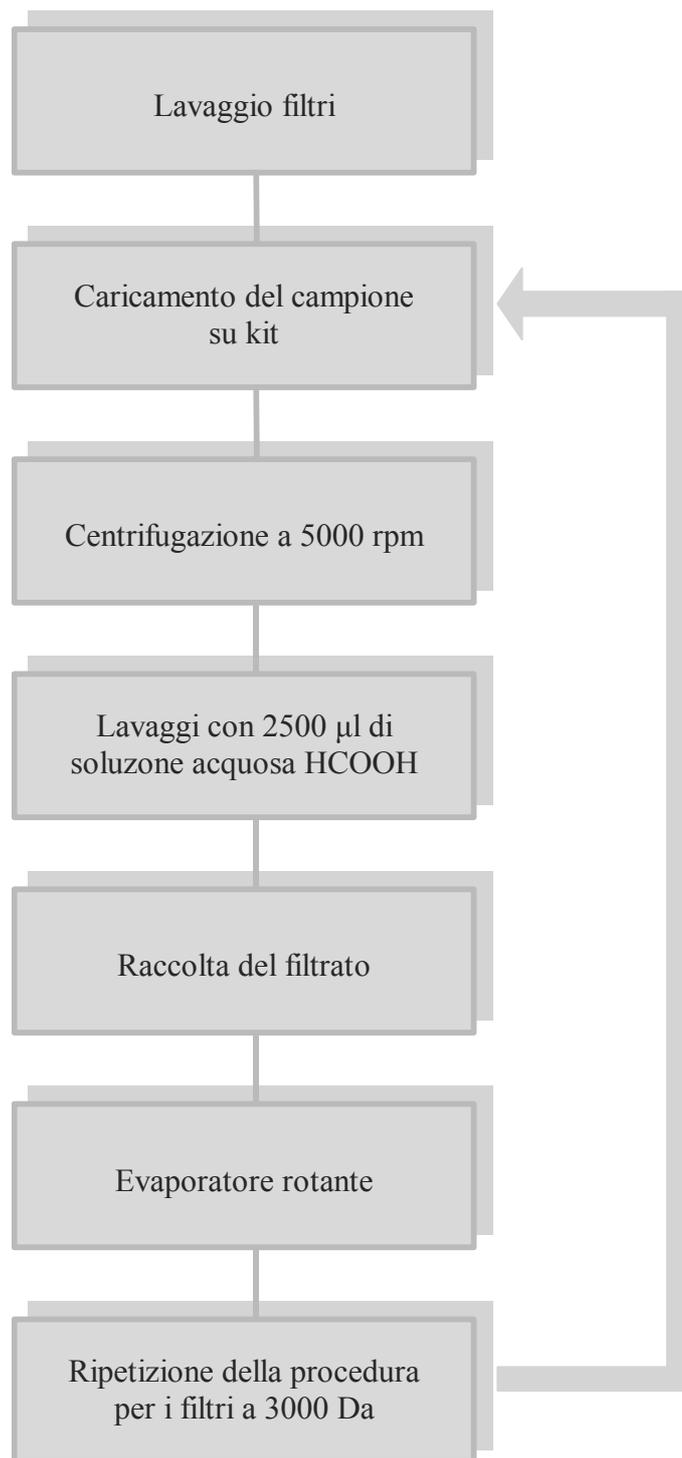
#### **6.4.5 Frazionamento mediante tagli molecolari**

Il frazionamento dei peptidi avviene con tagli effettuati sulla base del loro peso molecolare mediante ultrafiltrazione. Si utilizzano filtri Amicon YM3 per il cut-off a 3000 Da e Amicon YM10 per il cut-off a 10000 Da, montati su appositi kit per ultrafiltrazione (Amicon Micropartition System MPS-1). I tagli molecolari si effettuano in due passaggi: prima si isola la frazione con peso molecolare inferiore a 10000 Da e successivamente quella con peso molecolare inferiore a 3000 Da; così facendo si cerca di ridurre la quantità di componenti che le filtrazioni precedenti non sono state in grado di trattenere. Il procedimento per ultrafiltrazione è identico per entrambi i tagli: il campione viene caricato su due appositi kit per ultrafiltrazione e, una volta ultrafiltrato completamente, si effettuano per ogni kit 3 lavaggi con un volume totale di 2500  $\mu\text{l}$  di una soluzione acquosa di acido formico a pH 3, al fine di recuperare ammino acidi e piccoli peptidi eventualmente trattenuti. Il campione e i lavaggi sono raccolti in un pallone da 50 ml e portati a secco mediante evaporatore rotante. Il campione viene ripreso con 1,5 ml della soluzione di acido formico, trasferito in una vial, e portato a secco in corrente di azoto.

Al termine di questa procedura si è ottenuta la frazione peptidica con peso molecolare inferiore a 3000 Da (anche se è possibile trovare peptidi a peso molecolare superiore in quanto la separazione avviene sulla base della forma e delle dimensioni delle molecole). La procedura dei tagli molecolari è schematizzata in figura 6.21. Le vials al momento dell'iniezione in HLPC-MS sono ripresi con 500  $\mu\text{l}$  di eluente A (acqua, acetonitrile 0,2%, HCOOH 0,1%).



**Figura 6.20. Procedura di estrazione della frazione peptidica**



**Figura 6.21. Tagli molecolari**

#### 6.4.6 Analisi HPLC-ESI-MS dei peptidi

Le frazioni ottenute dai tagli molecolari a 3000 Da sono state iniettate in un sistema HPLC (Alliance Waters 2695) con colonna a fase inversa C-18 (Jupiter 5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$ , 250 x 4,6 mm Phenomenex) termostata a 30°C. Il rivelatore è uno spettrometro di massa Micromass ZMD con le seguenti caratteristiche:

- Ionizzazione: ioni positivi
- Voltaggio capillare: 3 kV
- Voltaggio cono: 30 V
- Temperatura sorgente: 100°C
- Temperatura di desolvatazione: 150°C
- Flusso dello spray ( $\text{N}_2$ ): 100 l/h
- Flusso di desolvatazione ( $\text{N}_2$ ): 400 l/h
- Acquisizione: full scan (150-1500 Da)
- Modalità: continua
- Tempo di scansione: 2.9 secondi
- Intervallo interscansione: 0.1 secondi

Gli eluenti utilizzati sono i seguenti:

- ELUENTE A:  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.2%  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0.1%  $\text{HCOOH}$
- ELUENTE B: 65%  $\text{H}_2\text{O}$  + 35%  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0.1%  $\text{HCOOH}$

Il gradiente utilizzato per l'analisi è riportato in tabella 6.7.

**Tabella 6.7. Gradiente utilizzato per l'analisi HPLC-MS**

Tempo (min.)	Eluente A (%)	Eluente B(%)
0	99	1
15	99	1
60	10	90
69	10	90
70	99	1
90	99	1

Il volume iniettato è di 40 µl; il flusso utilizzato è 1 ml/min ottenendo una efficiente separazione dei peptidi nella zona di interesse da 20 a 70 min. Tutti i campioni analizzati sono stati preparati in doppio e per ognuno è stata effettuata l'analisi in HPLC-MS.

### 6.4.7 Semiquantificazione dei peptidi

La semi-quantificazione dei peptidi si ottiene integrando le aree dei peptidi individuati e rapportandole all'area dello standard interno (Phe-Phe). I risultati sono quelli riportati in tabella. La tecnica utilizzata è quella dello XIC (extract ion chromatogram): a partire da un cromatogramma ottenuto in corrente ionica (TIC), si ottiene un cromatogramma estratto estremamente pulito che permette una perfetta identificazione della molecola considerata ed una perfetta possibilità di integrazione.

**Tabella 6.8. Risultati della semiquantificazione dei peptidi eluiti tra i 20 e 35 min**

Tipo di Latte	Tempo	PEPTIDI									
		p901	p940	p1624	p760	p488	p1048	p2650	p804	p646	p264
CRUDO	latte	0	0	0.0849	0	0	0	0	0	0	0
	cagliata	0.01201	0	0	0	0.002159	0.005975	0	0	0	0.011818
	cottura	0.031436	0	0.042997	0	0.007575	0.007752	0	0	0.007277	0.017208
	0 giorni	0.0154	0	2.619306	0	0.021993	0	0	0	0.032526	0.022575
	6 giorni	0.851412	0.038495	9.160565	0.249116	0.852778	0.505041	0.168486	0	0.656679	2.07762
	13 giorni	0.913313	0	7.146587	0.261633	1.149261	0.442454	0.303177	0	1.050011	2.043987
	21 giorni	0.332308	0	11.5	0.341785	0.985901	0.42522	0.304478	0	0.659245	1.29317
OMO	latte	0	0	0.061997	0	0	0	0	0	0	0.030763
	cagliata	0.064074	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	cottura	0.01116	0	0	0	0	0.001406	0	0	0	0.0132
	0 giorni	0.082809	0	0.960017	0	0.024625	0	0	0	0.038179	0.03651
	6 giorni	1.608984	0	2.404809	0.139289	0.406193	0.168892	0.158479	0.020316	0.799753	0.472803
	13 giorni	1.468286	0	1.908061	0.156756	0.588052	0.233008	0.554044	0	1.522849	0.863248
	21 giorni	1.538255	0	1.601485	0.163039	0.607637	0.200841	0.493892	0	1.529422	0.699351
PAST	latte	0.003588	0	0.055076	0	0	0	0	0	0	0.016822
	cagliata	0.009775	0	0.003096	0	0	0	0	0	0	0.021008
	cottura	0.011444	0	0.00341	0	0	0	0.003843	0	0	0.011713
	0 giorni	0	0.046025	0.06809	0.013733	0	0.006833	0	0.221174	0	0
	6 giorni	1.191665	0	4.282719	0.196073	0.550955	0.286211	0.082681	0.020056	0.741625	1.226846
	13 giorni	0.437549	0.306844	0.776849	0.188196	0.549886	0.183638	0.085126	0.294685	0.645207	0.292789
	21 giorni	0.341506	0.629643	0.273493	0.360401	0.764386	0.198098	0.069546	0.646938	0.761863	0.272089

**Tabella 6.9. Risultati della semiquantificazione dei peptidi eluiti tra i 36 e 45 min**

Tipo di Latte	Tempo	PEPTIDI									
		p779	p2078	p1836	p1093	p1598	p700	p989	p569	p1136	p2306
CRUDO	latte	0	0.015741	0.018858	0	0	0	0	0	0	0.064228
	cagliata	0	0.076219	0.027533	0	0	0	0.010292	0	0	0.661587
	cottura	0	0.136639	0.044018	0	0	0	0.025447	0	0	1.241624
	0 giorni	0	0.09709	0.233025	0	0	0.130755	0.039593	0	0	0.650697
	6 giorni	0	1.027626	1.186288	0	0	2.354363	1.25212	1.293014	0	2.195401
	13 giorni	0	0.714934	1.204966	0	0	2.11449	2.760609	1.788762	0	1.675438
	21 giorni	0	0.677398	1.023493	0	0	1.028012	2.301647	4.150669	0	0.883827
OMO	latte	0	0.031154	0.048238	0	0	0.015642	0	0	0	0.172483
	cagliata	0	0.110649	0.033483	0	0	0	0	0	0	0.959433
	cottura	0	0.065372	0.023227	0	0	0	0	0	0.043381	0.725058
	0 giorni	0	0.479597	0.631574	0	0	0.106951	0.460989	0	0	3.256354
	6 giorni	0.069765	1.61442	1.461628	0	0	0.936902	1.146029	0.844974	0.137166	7.140238
	13 giorni	0.131985	1.605821	1.600862	0	0	0.571131	1.836616	1.148606	0.045438	3.308045
	21 giorni	0.179864	1.720817	1.971008	0	0	0.653859	1.959023	1.339929	0.07298	3.652037
PAST	latte	0	0.029291	0.032159	0	0	0.005051	0	0	0.000949	0.108485
	cagliata	0	0.100515	0.033064	0.025314	0	0	0	0	0.020382	1.057293
	cottura	0	0.078554	0.028542	0	0	0	0	0	0.014508	0.890727
	0 giorni	0.150246	0.141029	0.173185	0.20517	0.155723	0.075748	0.05485	0	0.256509	0.512314
	6 giorni	0	1.224639	1.102117	0	0	1.170933	1.70093	0.789964	0.08249	3.798523
	13 giorni	0.474011	0.654618	0.520674	1.25885	1.134871	0.883369	0.67122	0.62551	1.216002	2.673874
	21 giorni	0.864173	0.180515	0	2.14083	2.223234	1.690019	0.38371	0.559763	2.816746	0.553233

**Tabella 6.10. Risultati della semiquantificazione dei peptidi eluiti tra i 46 e 55 min**

Tipo di Latte	Tempo	PEPTIDI									
		p1816	p969	p3264	p658	p1292	p2524	p2409	p3703	p757	p2556
CRUDO	latte	0	0	0	0	0	0	0.021981	0.024069	0.06574	0
	cagliata	0	0	0	0.321197	0	0	0.081812	0	0	0.053154
	cottura	0	0	0	0.40454	0	0.026485	0	0	0.02387	0.0499
	0 giorni	0.326463	0.236521	0	0	0.180324	0.048931	0	0	0.066091	0
	6 giorni	2.34115	2.882518	0	1.937655	2.118686	0.951063	0	0	4.302392	1.431657
	13 giorni	1.949156	1.13667	0	2.76381	3.411482	0.97691	0	0	4.095909	1.246731
	21 giorni	2.12419	0.30707	0	3.233337	4.464098	1.061609	0	0.044958	3.687648	2.491615
OMO	latte	0	0	0	0	0	0	0.072654	0.093918	0	0
	cagliata	0	0	0.065736	1.761301	0	0	0	0	0	0
	cottura	0	0.026418	0	1.959875	0.018808	0	0	0	0	0
	0 giorni	0.366492	0.340733	0	2.438511	0.49637	0	0	0	0	0.817817
	6 giorni	1.227078	0.649791	0	0.788561	1.354877	0.947933	0.371004	0	1.121271	1.56265
	13 giorni	0.898062	0.239095	0	1.34894	1.186302	1.221	0	0	2.082356	1.534443
	21 giorni	1.072554	0.19441	0	2.119824	1.481363	1.692528	0.376259	0	2.492738	2.238608
PAST	latte	0	0	0	0	0	0	0.00864	0.009744	0	0.010571
	cagliata	0	0	0	0.378885	0	0	0	0	0	0.040732
	cottura	0	0	0	0.159589	0	0	0.034234	0	0	0
	0 giorni	0	0.063772	0.087427	0	0	0	0.20888	0.573917	0.242335	0
	6 giorni	0.366874	1.487427	0	1.401193	0.779459	1.295959	0.512311	0.058711	2.64505	1.834083
	13 giorni	0.129818	0.208134	0.444803	0.682344	0.252129	0.46967	1.064801	0.486598	0.697473	0.669046
	21 giorni	0	0.131644	0.38942	0.766697	0	0	1.620798	1.069197	1.139234	0.388379

**Tabella 6.11. Risultati della semiquantificazione dei peptidi eluiti tra i 56 e 70 min**

Tipo di Latte	Tempo	PEPTIDI								
		p1013	p2628	p658d	p1164	p2722	p856	p1264	p2598	p805
CRUDO	latte	0	0	0	0	1.397536	0	0	0	0
	cagliata	0	0.314856	0	0	0.867884	0.054788	0.029072	0	0
	cottura	0	0.437499	0.006369	0	1.4572	0.082325	0.231212	0	0
	0 giorni	0	0.211674	0	0	1.519708	0.096672	0.44769	0	0.051666
	6 giorni	0	1.259822	1.762292	1.753956	1.392355	2.116505	4.617111	0.345907	2.781957
	13 giorni	0	0.730576	1.15529	1.43663	0.428819	1.085232	4.719132	0	1.399973
	21 giorni	0	1.174903	1.567898	3.900986	0	0.674437	21.6	0.418666	0
OMO	latte	0	0	0	0	0.301505	0	0.032478	0	0
	cagliata	0	1.647182	0	0	0.326762	0	0.055874	0	0
	cottura	0	0.329519	0	0	1.528314	0.040803	0.028531	0	0
	0 giorni	0	2.455806	0	0	5.717219	0.189632	2.091876	0	0.651212
	6 giorni	0.233279	2.181443	0.645853	0.176405	1.194058	0.83512	7.65447	0.075684	2.692233
	13 giorni	0.063789	2.280027	0.362017	0.120319	0.565166	0.593855	5.34	0	0.69931
	21 giorni	0.047417	2.265415	0.52676	0.188406	0	0.639195	5.92	0	0.677658
PAST	latte	0	0.03745	0	0	1.031234	0	0	0	0
	cagliata	0	0.362465	0	0	2.039567	0.041363	0.019179	0.007249	0
	cottura	0	0.167519	0	0	1.995574	0.032278	0.051897	0.100478	0.009957
	0 giorni	0	0.140804	0	0	2.964001	0	1.63586	0	0.852188
	6 giorni	0.261657	0.900308	1.087919	0.613531	1.020871	1.024749	11.38	0.097055	2.340161
	13 giorni	0.696724	0.367075	0.60779	0.178971	0.671425	0.218112	3.693006	0.309071	1.563762
	21 giorni	0.955048	0.228376	0.708123	0.157927	0.581785	0.323382	3.528651	0.095196	1.102345

## 6.5 CONCLUSIONI

In questo lavoro si è analizzata la frazione oligopeptidica di formaggi modello tipo pecorino, prodotti a partire da latte crudo, omogeneizzato ad alte pressioni, e pastorizzato.

Mediante interfacciamento di HPLC a fase inversa con spettrometria di massa electrospray è stato possibile identificare e semiquantificare una serie di oligopeptidi dei quali si è studiata, mediante analisi statistica, la correlazione con la stagionatura e con la tecnologia di produzione.

Tale analisi evidenzia che i peptidi non caratterizzano il tipo di lavorazione fino al periodo di inizio stagionatura, in quanto i campioni relativi a tali fasi risultano molto poveri dal punto di vista del profilo oligopeptidico.

Una certa distinzione si comincia a vedere per i campioni al sesto giorno di stagionatura, indice di un profilo peptidico che diviene più ricco e complesso, sebbene non ancora in grado di caratterizzare il processo tecnologico.

Le cose cambiano per i tempi di stagionatura superiori al tredicesimo giorno, per i quali il profilo peptidico appare estremamente distintivo del trattamento di sanitizzazione subito dal latte. In particolare i campioni da latte pastorizzato mostrano un andamento molto diverso

rispetto a quelli da latte crudo ed omogeneizzato, tra loro piuttosto simili; meno spiccato è l'effetto che la frazione oligopeptidica mostra nel distinguere tra i diversi tempi di stagionatura, soprattutto per i campioni da latte crudo ed omogeneizzato.

L'analisi statistica mostra che la maggior parte dei peptidi considerati si possono dividere in due gruppi ben differenziati, uno caratterizzante per il formaggio da latte pastorizzato ed uno caratterizzante per i formaggi da latte crudo ed omogeneizzato. All'interno di questi due gruppi è ipotizzabile che vi siano percorsi metabolici comuni.

## 6.6 BIBLIOGRAFIA

---

<sup>1</sup> Moio, L.; Etievant, P.; Langlois, D.; Dekimpe, J.; Addeo, F. (1994) *J Dairy Res*, **61**, 385-394.

<sup>2</sup> Sforza, S.; Ferroni, L.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R. (2003) *J Agr Food Chem*, **51**, 2130-2135.

<sup>3</sup> Ferrante, P.; Malorni, A.; Nitti, G.; Laezza, P.; Pizzano, R.; Chianese, L.; Addeo, F. (1995) *J Dairy Res*, **62**, 281-296.

Richardson, B.C.; Mercier, J.C. (1979) *Eur J Biochem*, **99**, 285-297.

<sup>4</sup> Sousa, M.J.; Malcata, F.X. (1998) *J Agric Food Chem*, **46**, 4034-4041.

<sup>5</sup> Sousa, M.J.; Ardö, Y.; McSweeney, P.L.H. (2001) *Int Dairy J*, **11**, 327-345.

## **7. Studio dei processi degradativi a carico della sequenza $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23), originata dalla chimosina, in formaggi modello tipo “caciotta” a diversa tecnologia produttiva e diversa stagionatura**

In questa parte del lavoro di tesi si è inteso studiare, mediante HPLC-ESI-MS, il profilo peptidico di formaggi vaccini modello tipo caciotta; in particolare verranno analizzati una serie di campioni a diversa tecnologia produttiva (da latte crudo, omogeneizzato ad alte pressioni, e pastorizzato), ed a diversa stagionatura, al fine di individuare un possibile percorso degradativo della sequenza  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23), peptide che, derivando dall'azione enzimatica diretta della chimosina<sup>1</sup>, si forma copiosamente fin dalle prime fasi produttive del formaggio.

### **7.1 Tecnologia produttiva della caciotta**

Caciotta o caciofiore è il nome generico dato a diversi tipi di formaggi molli, o stagionati, di latte vaccino, o misto, prodotti in tutto il paese con modi e tipologie diverse. La forma delle Caciotte è cilindrica appiattita, con diametri variabili da 8-10 fino a 16 cm e scalzo da 4 a 8 cm, mentre i pesi variano anch'essi da 800 grammi a 2 chili. Anche la consistenza della pasta è diversa: da molto soffice, bianca, friabile e dolce, a consistente, gessata, giallognola, di sapore piccante.

La tecnologia di caseificazione della caciotta è molto simile a quella generale dei formaggi, ed è schematicamente rappresentata in figura 7.1. Si tratta di formaggi a tecnologia abbastanza semplice, la cui riuscita è condizionata, oltre che dalla qualità del latte, da buoni coagulanti e da condizioni adatte. Tra il tipo dolce, a rapida maturazione, e il tipo saporito toscano le differenze tecnologiche sono minime, e riguardano più che altro gli ingredienti usati, la lavorazione e l'acidificazione del latte e della cagliata. Una differenza fondamentale tra i due tipi è data invece dal tipo di latte usato: per i tipi dolci è più confacente il latte vaccino, mentre per i tipi piccanti è meglio ricorrere a miscele di latte vaccino ed ovino (in proporzioni che variano dal 20 al 70% di latte di pecora), anche se oggi è possibile produrre ottime Caciotte saporite anche partendo dal latte puramente vaccino.



**Figura 7.1. Flow sheet della produzione della caciotta**

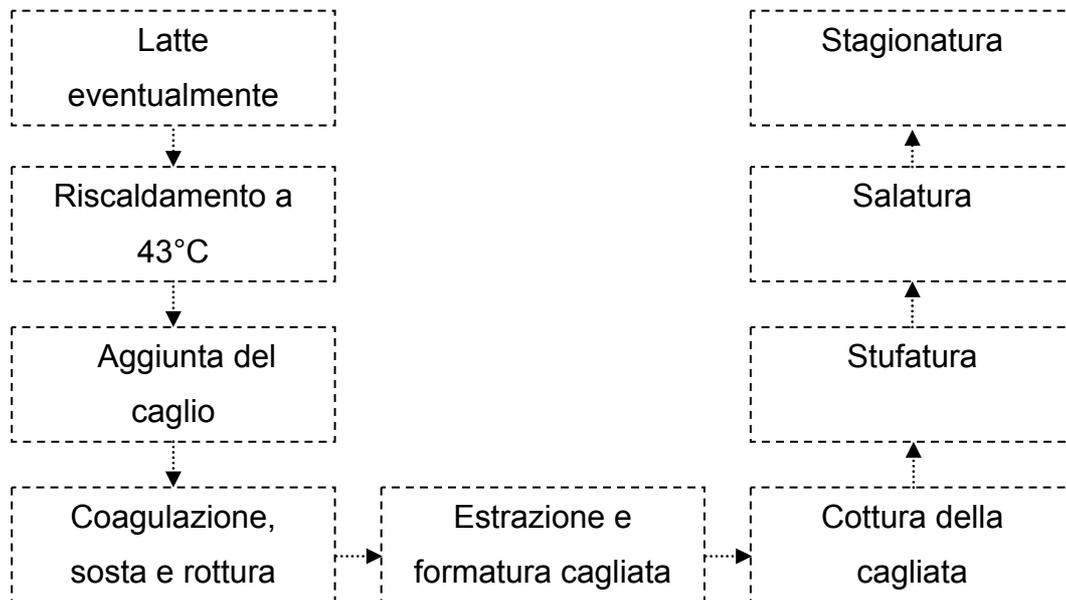
## 7.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 7.2.1 Preparazione dei formaggi modello tipo caciotta

I formaggi modello utilizzati per questo lavoro sono stati preparati presso i laboratori di Cesena della Facoltà di Scienze Alimentari dell'Università di Bologna. La materia prima utilizzata è stata latte ovino crudo fresco (48 litri), diviso in tre parti come segue :

- 16 litri sono stati utilizzati tal quali (senza subire alcun trattamento di sanitizzazione);
- 16 litri sono stati omogeneizzati a 1000 bar con un impianto di omogeneizzazione Panda (Niro Soavi, Parma);
- 16 litri sono stati pastorizzati a 72 °C per 30 secondi.

Il latte, dopo aver subito questi diversi trattamenti, è stato usato per la produzione di formaggio tipo caciotta, seguendo la procedura di caseificazione classica riportata schematicamente in figura 7.2; in tutti i casi la procedura è stata la medesima, indifferentemente dal trattamento a cui è stato sottoposto il latte.



**Figura 7.2. Schema di produzione del formaggio modello "caciotta"**

Le tre tipologie di caciotta precedentemente descritte, sono state analizzate a diversi tempi della fase produttiva e di stagionatura, divisi a seconda del trattamento subito dal latte, come riportato in Tabella 7.1.

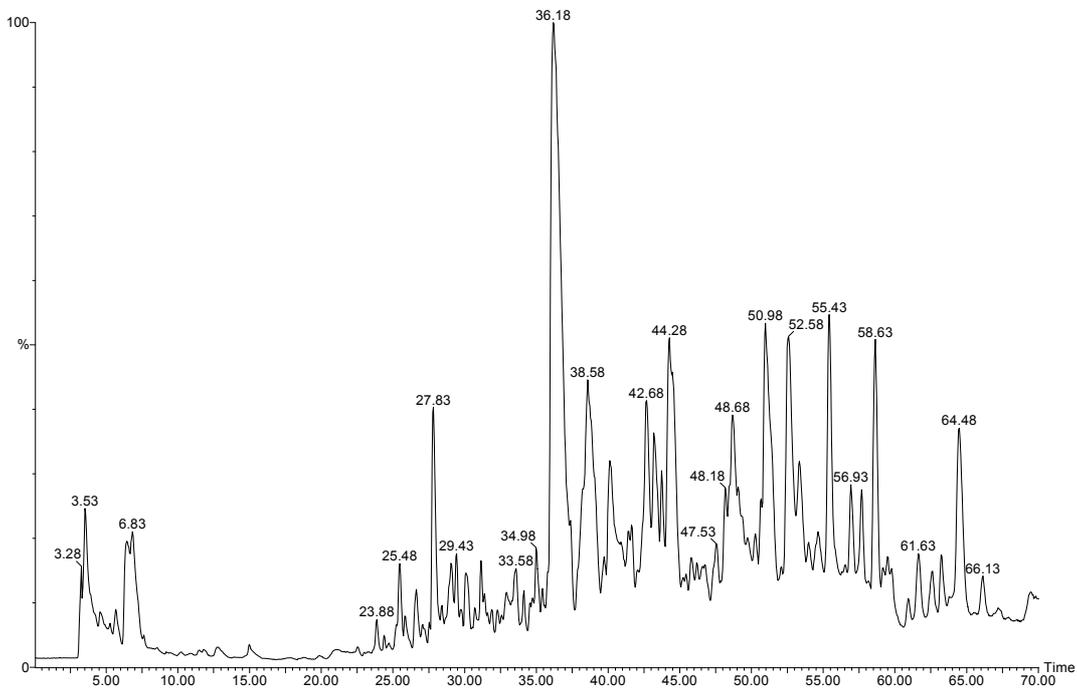
**Tabella 7.1. Simbologia dei campioni analizzati**

	CRU	OMO	PAST
0 giorni	C 0	O 0	P 0
1 giorni	C 1	O 1	P 1
3 giorni	C 3	O 3	P 3
6 giorni	C 6	O 6	P 6
13 giorni	C 13	O 13	P 13
21 giorni	C 21	O 21	P 21
27 giorni	C 27	O 27	P 27

CRU=latte crudo; OMO=latte omogeneizzato; PAST=latte pastorizzato.

### 7.2.2 Estrazione ed analisi della frazione oligopeptidica in HPLC-MS

Per tutte le fasi di estrazione della frazione oligopeptidica e di identificazione del peso molecolare, degli ioni caratteristici, e della sequenza dei peptidi di interesse, si rimanda al capitolo 6; in figura 7.3 è riportato il cromatogramma in corrente ionica totale di un campione da latte crudo, stagionato 13 giorni.



**Figura 7.3. Cromatogramma in corrente ionica totale di un campione di caciotta da latte crudo a 13 giorni di stagionatura**

In questo caso si è focalizzata principalmente l'attenzione sui possibili peptidi derivanti dalla degradazione dell' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23), al fine di studiarne l'eventuale percorso degradativo. La sequenza del peptide vaccino è di seguito riportata:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

R P K H P I K H Q G L P Q E V L N E N L L R F

I principali oligopeptidi identificati sono riportati in tabella 7.2. Sono stati cercati nei campioni tutte le ipotetiche sequenze derivanti da  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23); l'assenza di molte di esse, come si vedrà successivamente, ha un preciso significato per l'identificazione dei pattern proteolitici.

**Tabella 7.2. Oligopeptidi identificati nel formaggio modello tipo “caciotta”**

<b>Sequenza</b>	<b>tempo di ritenzione</b>	<b>picchi caratteristici</b>	<b>Peso Molecolare</b>
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-23)	52,6	692 + 922 + 1383	2764
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-22)	46,0	655 + 873 + 1309	2617
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-21)	49,1	616 + 821 + 1232	2461
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-20)	44,4	588 + 784 + 1175	2348
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-19)	38,1	560 + 746 + 1118	2235
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-18)	39,1	531 + 708 + 1061	2120
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-17)	36,5	499 + 665 + 997	1991
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-16)	38,9	470 + 627 + 939	1877
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-15)	33,3	442 + 589 + 883	1764
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-14)	28,9	417 + 556 + 833	1665
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-13)	27,8	385 + 513 + 769	1536
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-9)	6,4	286 + 381 + 571 + 1141	1140
$\alpha_{S1}$ -CN(f1-8)	6,3	338 + 507 + 1013	1013
$\alpha_{S1}$ -CN(f14-23)	57,1	416 + 624 + 1247	1246
$\alpha_{S1}$ -CN(f15-23)	55,8	560 + 1118	1117
$\alpha_{S1}$ -CN(f16-23)	52,6	510 + 1019	1018
$\alpha_{S1}$ -CN(f17-23)	51,0	454 + 906	905
$\alpha_{S1}$ -CN(f18-23)	51,1	396 + 792	791
$\alpha_{S1}$ -CN(f19-23)	50,3	332 + 662	662

$\alpha_{S1}$ -CN(f20-23)	47,2	275 + 549	548
$\alpha_{S1}$ -CN(f21-23)	40,4	435	435
$\alpha_{S1}$ -CN(f22-23)	21,6	322	321
$\alpha_{S1}$ -CN(f10-13)	30,9	414	413
$\alpha_{S1}$ -CN(f10-16)	48,8	378 + 756	755
$\alpha_{S1}$ -CN(f11-16)	46,1	334 + 699	698
$\alpha_{S1}$ -CN(f13-16)	43,3	245 + 488	488
$\alpha_{S1}$ -CN(f14-16)	35,6	360	359
$\alpha_{S1}$ -CN(f15-16)	29,9	231	230
$\alpha_{S1}$ -CN(f10-14)	33,0	544	543
$\alpha_{S1}$ -CN(f12-14)	26,6	373	372
$\alpha_{S1}$ -CN(f13-14)	18,3	276	275
$\alpha_{S1}$ -CN(f2-17)	38,1	460 + 613 + 919	1835
$\alpha_{S1}$ -CN(f3-17)	38,0	436 + 580 + 870	1738
$\alpha_{S1}$ -CN(f10-17)	44,8	435 + 870	869
$\alpha_{S1}$ -CN(f14-17)	29,4	475	474
$\alpha_{S1}$ -CN(f2-9)	6,8	329 + 493 + 985	984
$\alpha_{S1}$ -CN(f2-13)	28,9	461 + 691 + 1380	1380
$\alpha_{S1}$ -CN(f2-14)	30,1	380 + 504 + 755	1509
$\alpha_{S1}$ -CN(f18-20)	29,1	375	374
$\alpha_{S1}$ -CN(f17-20)	30,2	489	488
$\alpha_{S1}$ -CN(f24-30)	51,2	404 + 807	806
$\alpha_{S1}$ -CN(f24-34)	58,7	620 + 414 + 1238	1238
$\alpha_{S1}$ -CN(f24-35)	58,7	457 + 684 + 1367	1367
$\alpha_{S1}$ -CN(f24-40)	58,6	490 + 651 + 976	1950
$\beta$ -CN(f98-104)	26,6	373 + 745	744
$\beta$ -CN(f98-158)	56,4	589 + 643 + 707 + 785 + 883 + 1009 + 1177	7056
$\beta$ -CN(f97-158)	55,8	600 + 654 + 720 + 799 + 899 + 1027	7183
$\beta$ -CN(f193-209)	64,5	471 + 628 + 941	1881

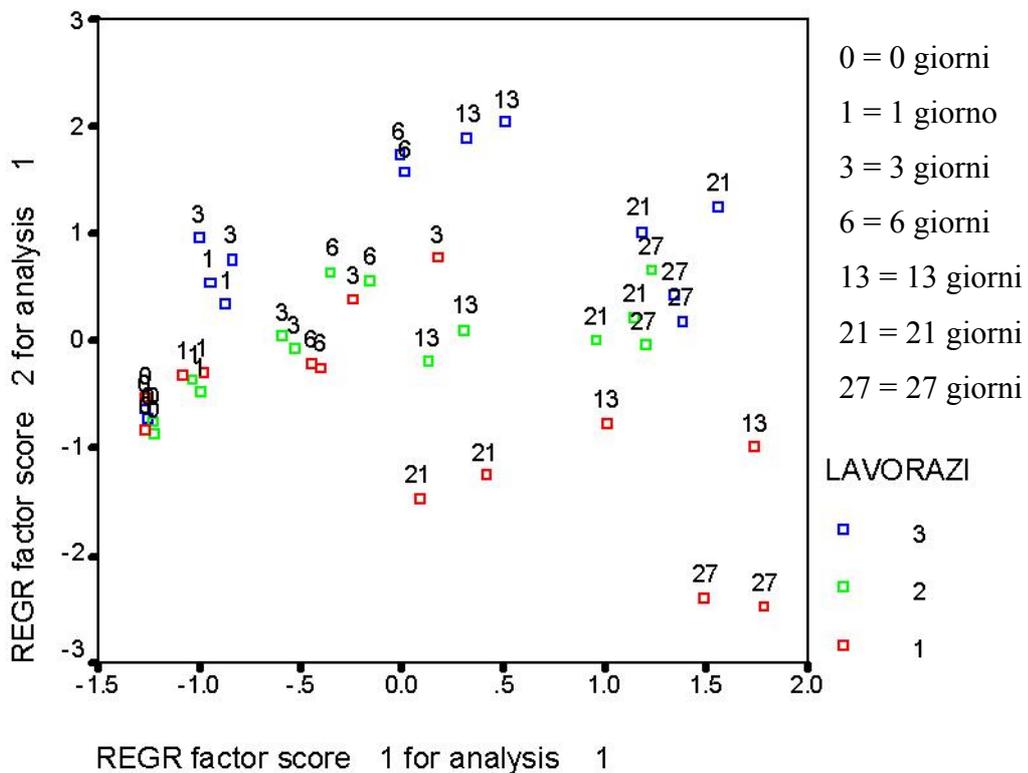
I peptidi considerati sono stati semiquantificati in tutti i campioni analizzati, secondo il metodo descritto nel capitolo precedente<sup>2</sup>, in cui si è utilizzata la fenilalanil fenilalanina (Phe-Phe) come standard interno.

### 7.2.3 Analisi statistica dei risultati della semiquantificazione dei peptidi

Per evidenziare le differenze tra i formaggi a diversi tempi di stagionatura e differenti trattamenti tecnologici, l'analisi statistica è stata applicata ai dati ricavati; in particolare sono state eseguite l'analisi delle componenti principali (PCA) e l'analisi della varianza ad una via (ANOVA).

#### 7.2.3.1 Analisi delle componenti principali (PCA)

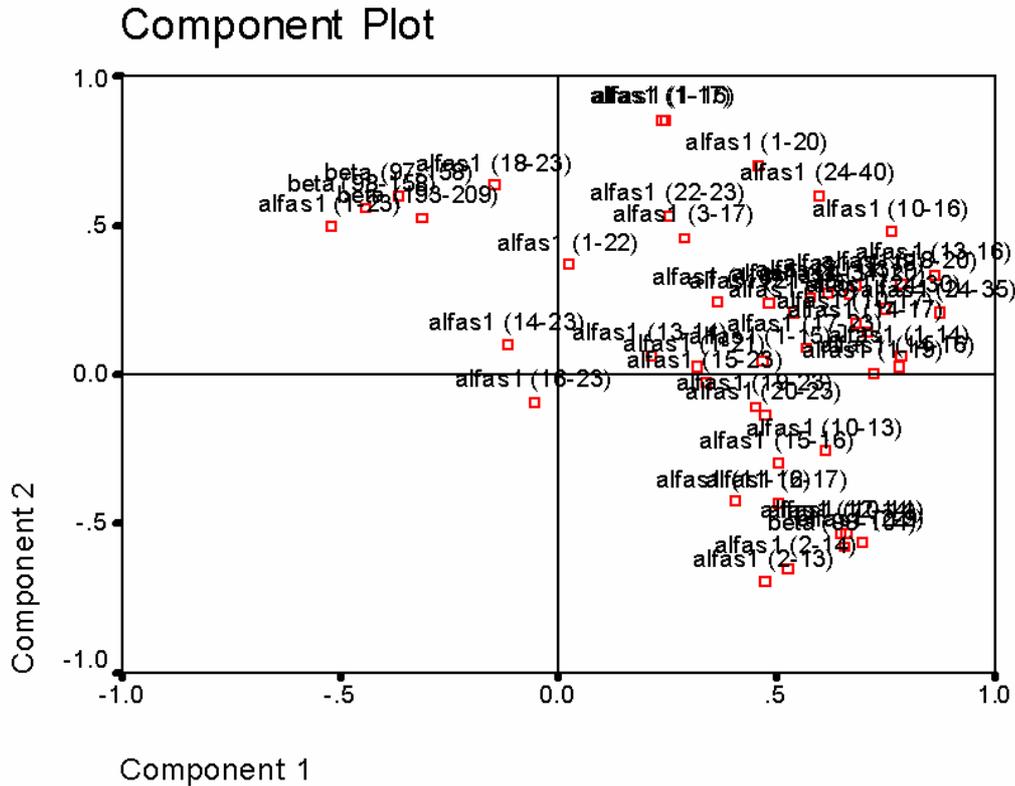
Lo score plot dell'analisi delle componenti principali (descritta nel capitolo precedente), effettuata sui risultati semiquantitativi ottenuti per la frazione oligopeptidica, è riportata in figura 7.4. I campioni sono stati etichettati con i giorni di stagionatura, mentre i diversi colori evidenziano il tipo di trattamento a cui è stato sottoposto il latte.



**Figura 7.4. Score plot dei risultati della semiquantificazione dei peptidi (rosso = latte crudo; verde = latte omogeneizzato; blu = latte pastorizzato)**

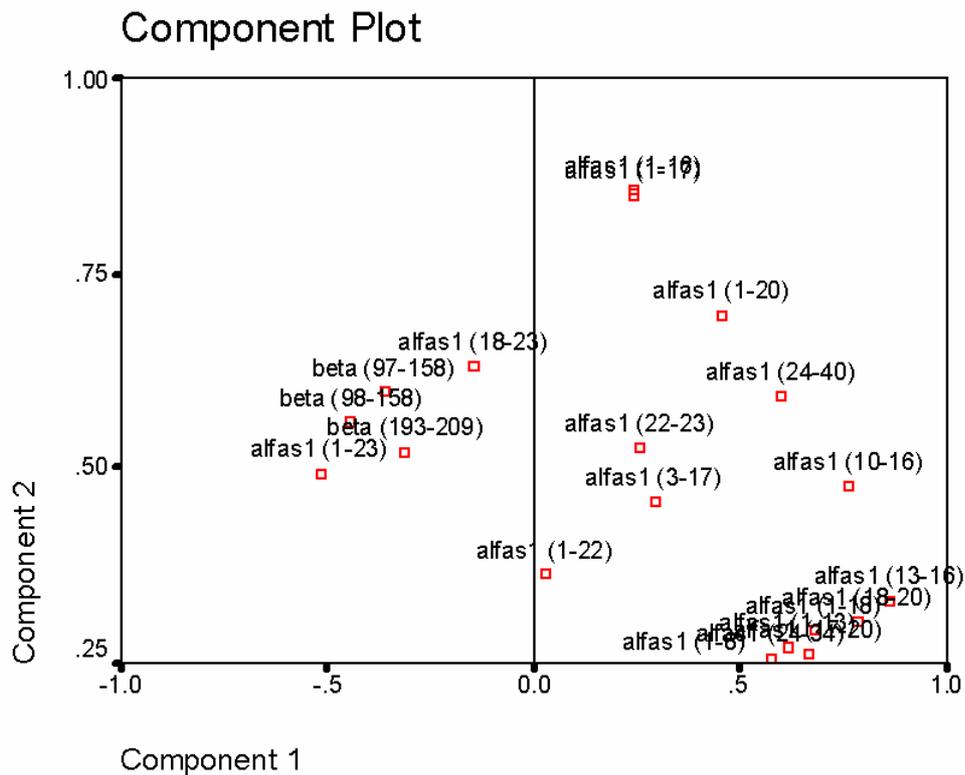
Si nota che i campioni si distinguono abbastanza bene sia in base al tempo di stagionatura, sia in base alla tecnologia produttiva, sebbene i campioni a 0 e 1 giorno siano ancora molto omogenei, indifferentemente dal trattamento subito dal latte.

In figura 7.5 è mostrato il loading plot impostato sulle 2 componenti principali:



**Figura 7.5. Loading plot della semiquantificazione dei peptidi**

Il loading plot generale risulta molto complicato, per cui sono di seguito riportati gli ingrandimenti per ogni quadrante d'interesse.



**Figura 7.6. Ingrandimento del loading plot tra 0,25 e 1 lungo la PC2**

Questo ingrandimento interessa il settore superiore del loading plot (da -1 a +1 per la componente 1, da +0,25 a +1 per la componente 2).

In questo ingrandimento si possono evidenziare peptidi che sono correlati tra loro per un'alto loading nella componente 2.

In particolare notiamo la presenza di un gruppo di peptidi caratterizzati da un'origine comune, cioè derivanti tutti dalla stessa azione enzimatica:

- $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23)
- $\alpha_{S1}$ -CN(f193-209)
- $\beta$ -CN(f97-158)
- $\beta$ -CN(f98-158)

I primi due provengono dall'azione della chimosina, che è probabilmente all'origine anche degli altri due; questi 4 peptidi insieme, subito dopo la salatura, cioè all'inizio della stagionatura, rappresentano da soli il 50-60% di tutta la frazione oligopeptidica studiata, per poi arrivare, al 27° giorno al 10-15% in seguito alla loro degradazione a peptidi più piccoli.

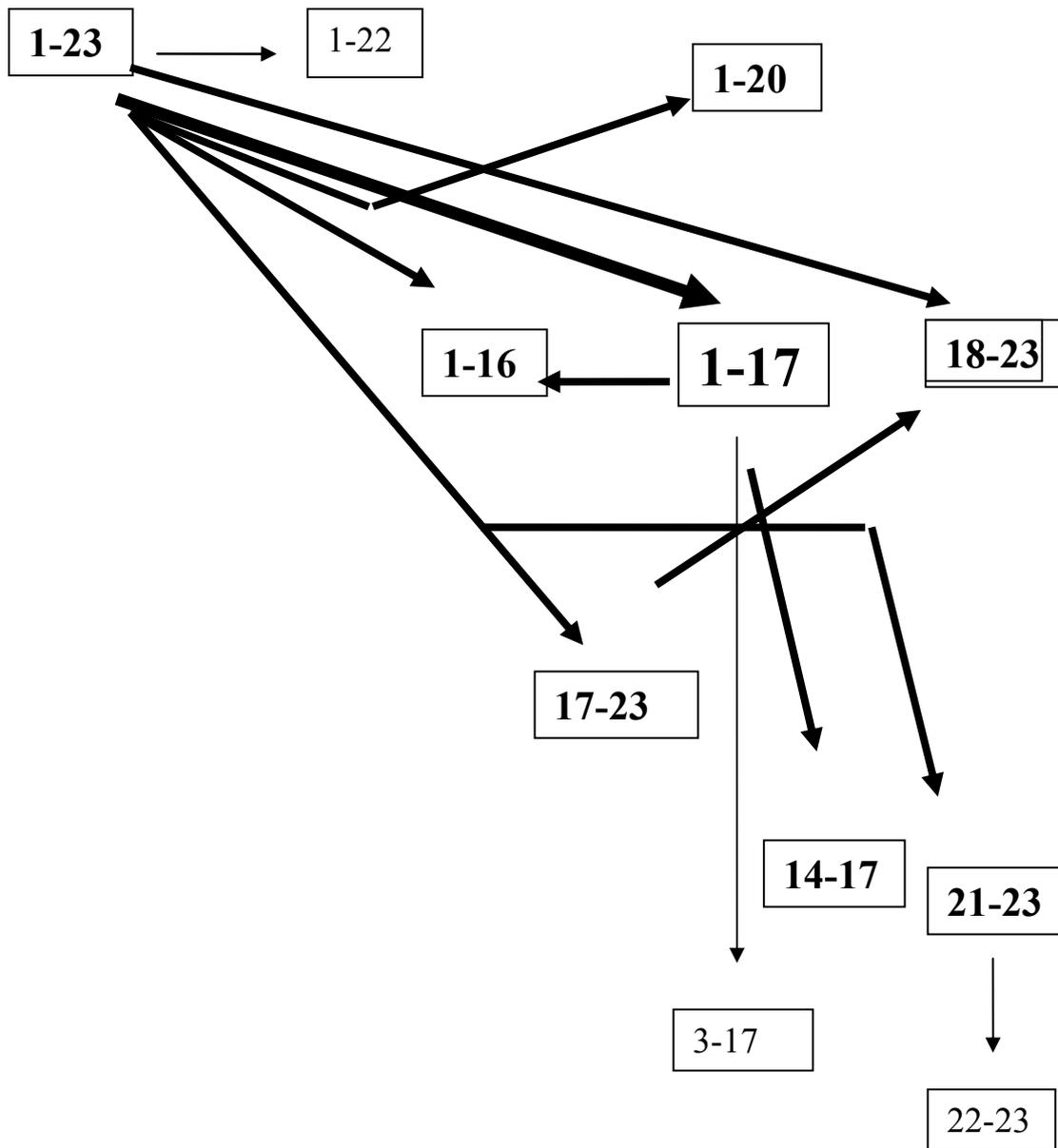
Un'altra relazione degna di nota è la presenza in questa zona di peptidi complementari, come l' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-17) e l' $\alpha_{S1}$ -CN(f18-23), derivanti dall' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23) in seguito al taglio tra Asn 17 e Glu 18; è da notare, inoltre, che il peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-17) è praticamente sovrapposto al peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-16), e ciò fa presupporre che l' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-16) provenga soprattutto dall' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-17) per degradazione carbossipeptidasica, oltre che dall' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23) per taglio endopeptidasico.

In questo quadrante si nota anche la presenza di un peptide che termina con l'ammino acido Leu 20,  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-20), e ciò fa ipotizzare che ci sia un salto diretto, tramite taglio endopeptidasico, dal peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23) all' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-20). Questo sito di taglio è correlato a quello da cui si genera il peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f24-40), prossimo nel loading plot al peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-20), e ciò può essere attribuito alla somiglianza tra le due posizioni di taglio, formate rispettivamente da leucina-leucina (20-21) e da leucina-serina (40-41).

Inoltre la presenza in questa zona del peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-22) è indicativa di un'azione carbossipeptidasica direttamente sull' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23).

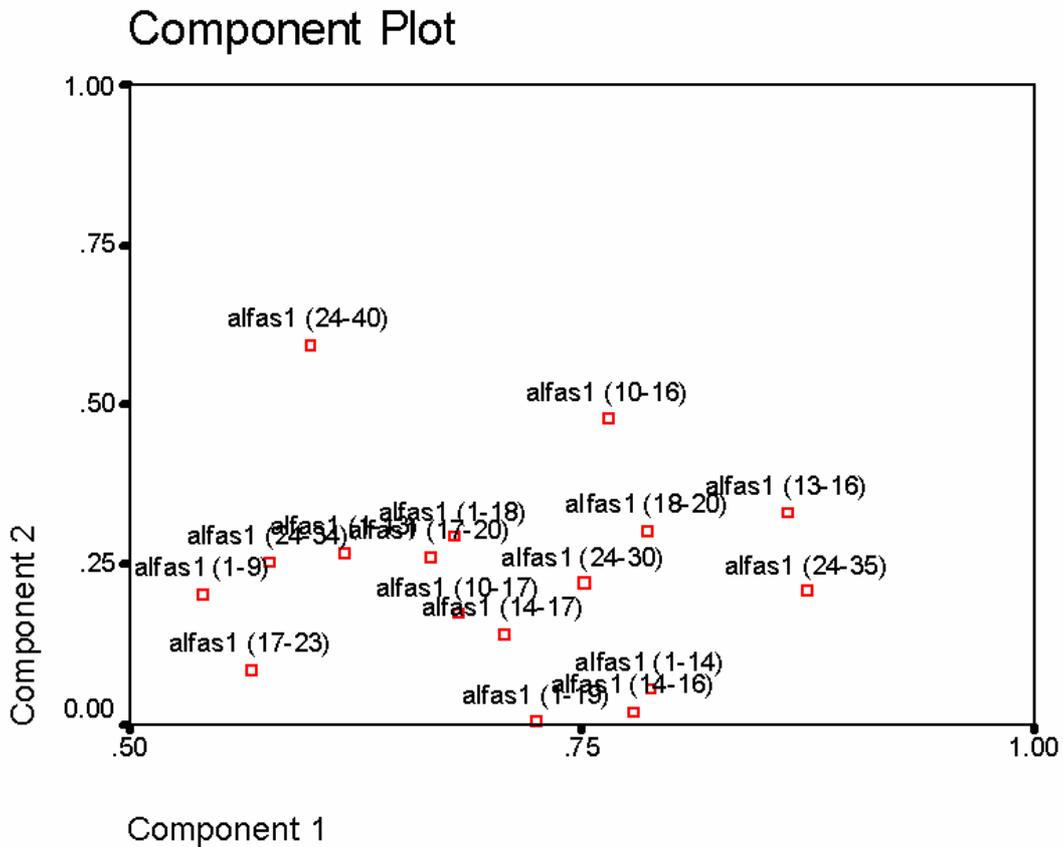
L'ultima osservazione che si può fare è la presenza del peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f3-17), che proviene molto probabilmente dall' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-17) per taglio di due ammino acidi dal lato N-terminale; il secondo di questi due ammino acidi è una prolina, ed è nota nei prodotti lattiero caseari la presenza di una dipeptidilpeptidasi, PepX, proveniente dal sistema proteolitico dei batteri lattici, che rilascia dipeptidi di tipo X-Pro dall'estremità N-terminale di peptidi<sup>3</sup>.

I peptidi presenti nella zona del loading plot considerata sono riportati in figura 7.7, con i pattern proteolitici ipotetici che si possono ricavare dalle considerazioni di cui sopra; tali degradazioni rappresentano, probabilmente, la via proteolitica principale di demolizione dell' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23).



**Figura 7.7. Vie principali di degradazione dell' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23); lo spessore delle frecce è indicativo della maggiore o minore probabilità di quella determinata via**

Passiamo, ora, al secondo ingrandimento del loading plot.



**Figura 7.8. Ingrandimento del Loading plot nel quadrante in alto a destra**

Questa zona è l'ingrandimento del quadrante in alto a destra (da +0,5 a +1 per la componente 1, da 0 a +1 per la componente 2).

Osserviamo la presenza di alcuni peptidi generati dalla degradazione dell' $\alpha_{S1}$ -CN(f24-199), ciò che resta dell' $\alpha_{S1}$ -caseina dopo l'azione della chimosina, come  $\alpha_{S1}$ -CN(f24-40) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f24-35).

Soprattutto però si vedono comparire peptidi indicativi di ulteriori tagli endoproteolitici a carico di  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23): troviamo peptidi che cominciano con la glicina 10, come  $\alpha_{S1}$ -CN(f10-17) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f10-16), seguiti a breve distanza dal loro complementare  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-9).

Compaiono anche una serie di peptidi che iniziano con Glu 14, come  $\alpha_{S1}$ -CN(f14-17) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f14-16), seguiti a breve distanza dal loro complementare  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-13): questi peptidi sono sicuramente indicativi di un taglio endopeptidasico tra 9-10 e tra 13-14; tali siti di

taglio sono molto simili tra loro, infatti sono composti rispettivamente dagli ammino acidi glutammina-glicina e glutammina-glutammico.

La caratteristica interessante dei peptidi suddetti, come ben si evince da quelli a loro complementari, è che i tagli endopeptidasici avvengono non tanto a carico dell' $\alpha_{S1}$ -CN(1-23), quanto sui suoi prodotti di degradazione  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-17) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-16); questo potrebbe indicare che gli enzimi proteolitici responsabili si attivino più lentamente di quelli che tagliano in posizione 17-18, per cui il loro substrato di elezione diventa il peptide maggiormente presente dopo qualche giorno di stagionatura, cioè  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-17). I tagli in 9-10 e 13-14 potrebbero anche avvenire direttamente sull' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23), ma l'assenza dei loro complementari,  $\alpha_{S1}$ -CN(f10-23) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f14-23), conferma quanto ipotizzato.

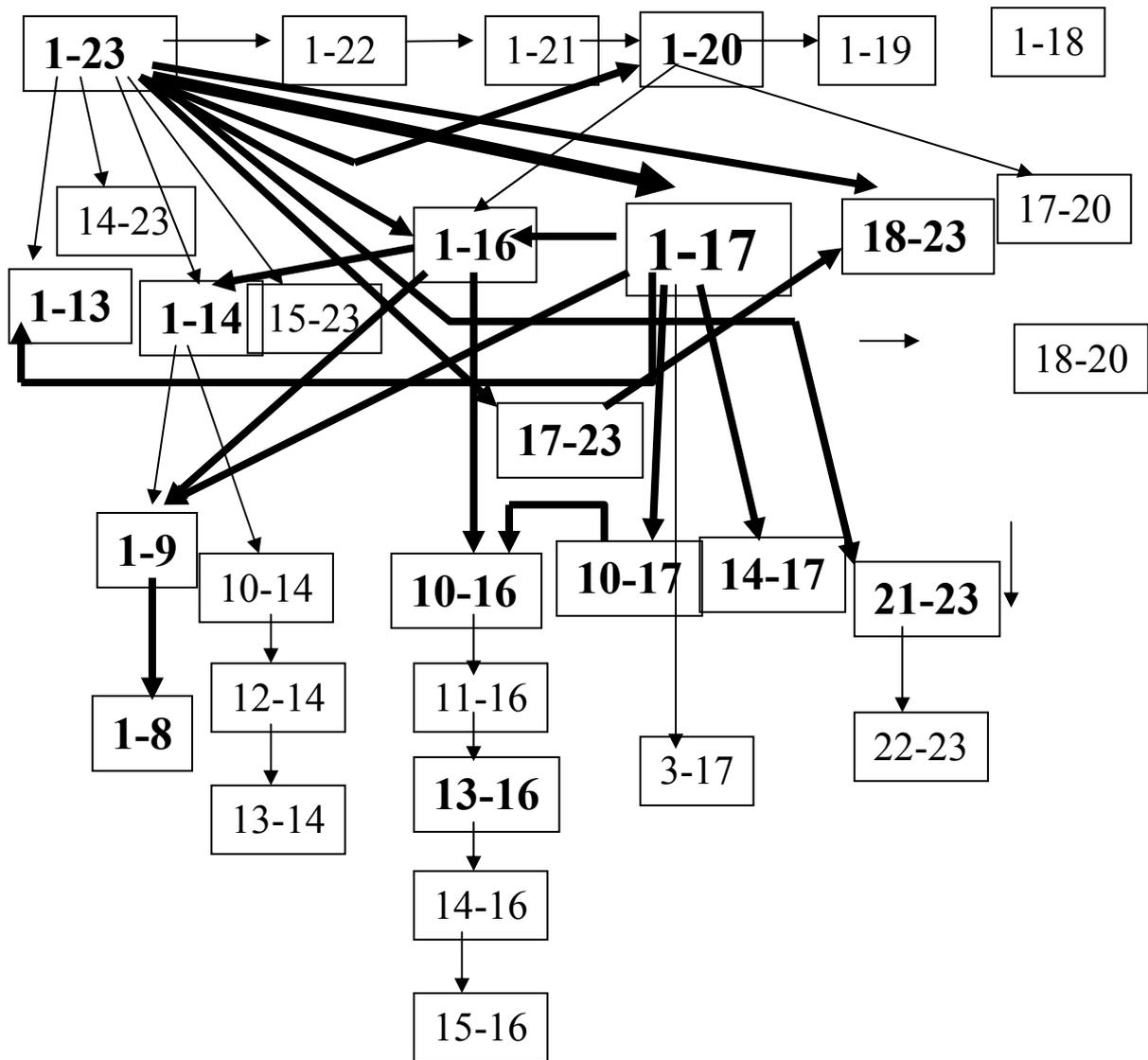
L'assenza di peptidi terminanti con l'ammino acido 17, oltre al 10-17, fa ulteriormente supporre una degradazione carbossipeptidasica di  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-17) per dare una serie di peptidi terminanti con l'ammino acido 16:

- $\alpha_{S1}$ -CN(f1-16)
- $\alpha_{S1}$ -CN(f10-16)
- $\alpha_{S1}$ -CN(f11-16)
- $\alpha_{S1}$ -CN(f13-16)
- $\alpha_{S1}$ -CN(f14-16)
- $\alpha_{S1}$ -CN(f15-16)

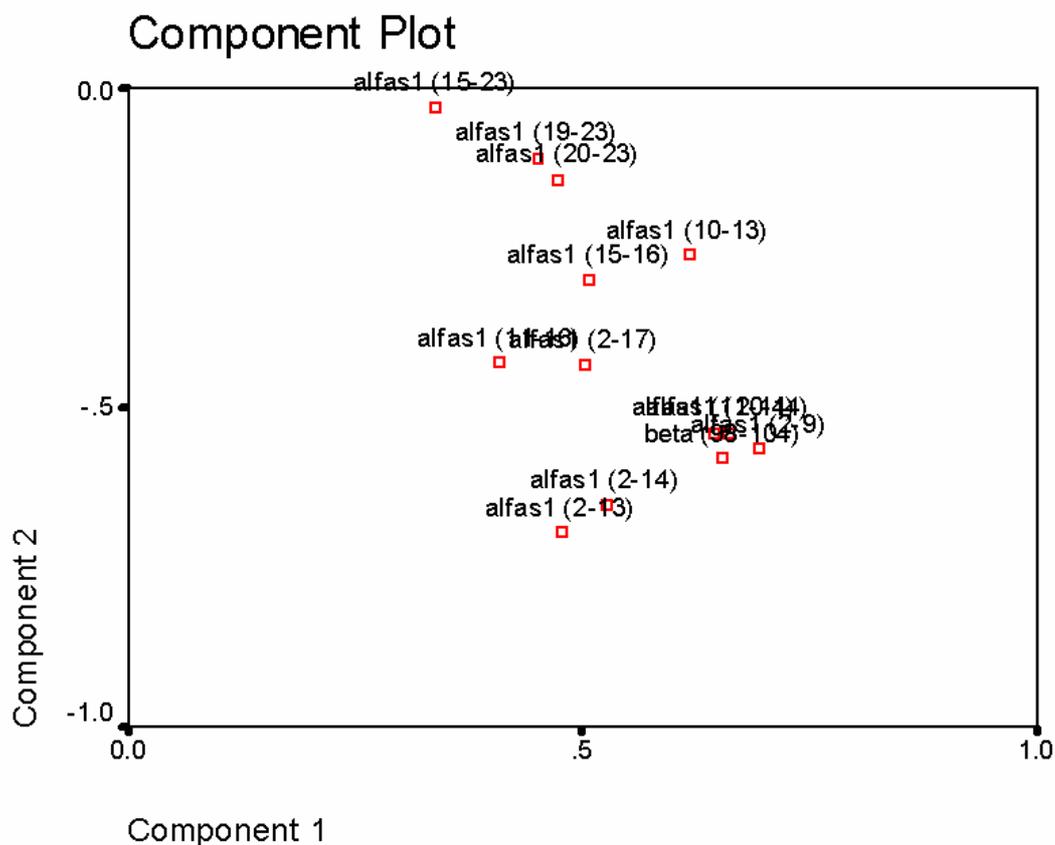
Nell'ingrandimento è possibile anche osservare come si ritrovino peptidi derivanti dalla degradazione carbossipeptidasica che avviene a carico del peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-20), i peptidi  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-19) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-18).

Un altro punto da commentare è la presenza dei peptidi  $\alpha_{S1}$ -CN(f17-20) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f18-20), i quali provengono probabilmente dall' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-20) per taglio endopeptidasico tra 16-17 e tra 17-18.

Tali ipotetici cammini proteolitici sono riassunti in figura 7.9.



**Figura 7.9. Vie secondarie di degradazione dell' $\alpha_{S1}\text{-CN}(f1-23)$ , e degradazione di  $\alpha_{S1}\text{-CN}(f1-16)$  e  $\alpha_{S1}\text{-CN}(f1-17)$ ; lo spessore delle frecce è indicativo della maggiore o minore probabilità di quella determinata via**



**Figura 7.10. Ingrandimento del quadrante in basso a destra del loading plot**

Nell'ultimo ingrandimento del loading plot (da 0 a +1 per la componente 1, da -1 a 0 per la componente 2) si nota subito la presenza di peptidi che iniziano con la prolina in posizione 2, quali:  $\alpha_{S1}$ -CN(f2-9),  $\alpha_{S1}$ -CN(f2-13),  $\alpha_{S1}$ -CN(f2-14) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f2-17).

Tali peptidi sono particolarmente interessanti perché, data la loro posizione nel loading plot, si può presumere, per confronto con lo score plot, che essi siano correlati ad un formaggio fatto a partire da latte crudo.

In questa zona troviamo anche peptidi che derivano dalla degradazione ammino peptidasica del peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f18-23), il complementare dell' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-17), con formazione di  $\alpha_{S1}$ -CN(f19-23) e di  $\alpha_{S1}$ -CN(f20-23).

### 7.2.3.2 Analisi della varianza ad una via (ANOVA)

Tramite tale analisi si sono valutati i peptidi significativamente diversi nei formaggi prodotti con diverse tecnologie. Poiché i campioni corrispondenti a 0 ed 1 giorno di stagionatura si sono mostrati, dall'analisi della PCA, scarsamente significativi nel definire la frazione oligopeptidica, essi sono stati esclusi da tale analisi.

I risultati sono riassunti in tabella 7.3.

**Tabella 7.3. Peptidi caratterizzanti i diversi trattamenti tecnologici (livello di significatività  $P < 0.05$ )**

Formaggio da latte crudo	Formaggio da latte pastorizzato	Formaggio da latte omogeneizzato
		$\alpha_{S1}$ -CN(f1-20)
		$\alpha_{S1}$ -CN(f1-18)
	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-17)	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-17)
		$\alpha_{S1}$ -CN(f1-16)
	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-13)	
	$\alpha_{S1}$ -CN(f1-9)	
	$\alpha_{S1}$ -CN(f18-23)	$\alpha_{S1}$ -CN(f18-23)
		$\alpha_{S1}$ -CN(f13-16)
$\alpha_{S1}$ -CN(f10-14)		
$\alpha_{S1}$ -CN(f12-14)		
$\alpha_{S1}$ -CN(f2-13)		
$\alpha_{S1}$ -CN(f2-14)		
		$\alpha_{S1}$ -CN(f18-20)
		$\alpha_{S1}$ -CN(f17-20)
		$\alpha_{S1}$ -CN(f24-40)

Il formaggio da latte omogeneizzato è quello con il maggior numero di peptidi caratterizzanti, indice di un pattern proteolitico decisamente caratteristico.

Tali peptidi sono indicativi di una maggiore degradazione della zona carbossiterminale del peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23) rispetto al crudo e al pastorizzato: osserviamo, infatti, la presenza di  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-20),  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-17), il suo complementare  $\alpha_{S1}$ -CN(f18-23),  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-16),  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-18),  $\alpha_{S1}$ -CN(f18-20), ed  $\alpha_{S1}$ -CN(f17-20).

Per quanto riguarda i formaggi da latte pastorizzato, è interessante notare come esso si differenzi non solo per una produzione più intensa di peptidi  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-17) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f18-23) (taglio tra 17 e 18), caratteristica che condivide con l'omogeneizzato, ma anche per i peptidi  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-13) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-9), derivanti da tagli endoproteasici che si attivano solo verso la fine della stagionatura.

Per quanto riguarda i formaggi da latte crudo, molto interessanti sono i peptidi  $\alpha_{S1}$ -CN(f2-13) e  $\alpha_{S1}$ -CN(f2-14), indicativi di una attività ammino peptidasica sull'arginina N-terminale, molto bassa nei formaggi da latte pastorizzato e omogeneizzato.

### **7.3 PARTE SPERIMENTALE**

Per la parte sperimentale, relativa ai materiali ed alla strumentazione utilizzata, all'estrazione della frazione peptidica, ai tagli molecolari, ed alle condizioni di analisi in HPLC-MS, si rimanda interamente a quella del capitolo 6.

La preparazione dei formaggi modello è stata eseguita come descritto nella parte “Risultati e discussione”.

Per ogni tipologia di formaggio (da latte crudo, pastorizzato, ed omogeneizzato mediante alte pressioni) sono stati prelevati ed analizzati campioni relativi alle seguenti fasi di maturazione:

- 0 giorni
- 1 giorno
- 3 giorni
- 6 giorni
- 13 giorni
- 21 giorni
- 27 giorni

I risultati relativi alla semiquantificazione dei peptidi sono riportati nelle tabelle seguenti.

**Tabella 7.4. Risultati della semiquantificazione dei peptidi dei formaggi modello tipo caciotta ottenuti a partire da latte omogeneizzato (0, 1, 3 e 6 giorni)**

Sequenza	Omogeneizzato 0 gg		Omogeneizzato 1 gg		Omogeneizzato 3 gg		Omogeneizzato 6 gg	
	media	dev.std	media	dev.std	media	dev.std	media	dev.std
alfaS1 (1-23)	1,8912606	0,0498362	2,8522828	0,2360121	4,1570921	0,4724678	3,2091695	0,0780799
alfaS1 (1-22)	0,0464101	0,0044277	0,1570509	0,0300184	0,0898663	0,0089481	0,1322509	0,0473422
alfaS1 (1-21)	0,011367	0,0015657	0,0960349	0,0103733	0,0547128	0,0111276	0,0801333	0,0055614
alfaS1 (1-20)	0,131059	0,0245551	0,975317	0,07743	1,1711716	0,1327063	2,1593455	0,0329916
alfaS1 (1-19)	0	0	0	0	0	0	0,0452827	0,0046201
alfaS1 (1-18)	0,0171736	0,0016737	0,1177095	0,0296816	0	0	0,2926352	0,0045782
alfaS1 (1-17)	2,2499932	0,0919459	4,4479526	0,1532642	6,1454512	0,3529181	8,0639092	1,2499019
alfaS1 (1-16)	0,3283161	0,0525945	0,9827703	0,013061	1,269956	0,0371766	1,5438232	0,1110526
alfaS1 (1-15)	0,0090596	0,000248	0,0305077	0,0044017	0	0	0,0672587	0,0011911
alfaS1 (1-14)	0,0262134	0,0065952	0,0767449	0,0065844	0,107217	0,0123958	0,1594682	0,0047811
alfaS1 (1-13)	0,1873983	0,0274243	0,4135315	0,0303737	0,6115008	0,0187432	1,0128301	0,0236797
alfaS1 (1-9)	0,2814369	0,0271288	0,9999975	0,0621241	0,8368674	0,0210129	1,4188906	0,0330974
alfaS1 (1-8)	0,1305178	0,0274199	0,110176	0,016335	0,1958596	0,0329367	0,2990232	0,0238285
alfaS1 (14-23)	0,0290218	0,0056197	0,0903333	0,003779	0,5194164	0,6285666	0,0639577	0,0009289
alfaS1 (15-23)	0,0255011	0,0014552	0,0703892	0,0030026	0,0789235	0,0016208	0,0855764	0,0012455
alfaS1 (16-23)	0,0396289	0,0047085	0,1426395	0,0033521	0	0	0,1365673	0,0137496
alfaS1 (17-23)	0,1271651	0,0393681	0,6855019	0,0615239	0	0	0,7365235	0,0616208
alfaS1 (18-23)	0,4751256	0,0719541	0,184175	0,0178553	1,1947754	0,0413165	1,123701	0,0581244
alfaS1 (19-23)	0,0695787	0,0079919	0,1424276	0,0058929	0,2542924	0,3026127	0,0910563	0,0018851
alfaS1 (20-23)	0	0	0,0110811	0,0034619	0	0	0,028879	0,0030833
alfaS1 (21-23)	0,0290555	0,0053013	0,0998876	0,0086909	0,1668535	0,0186713	0,3890575	0,035215
alfaS1 (22-23)	0,015647	0,0008218	0,0505026	0,0045641	0,152979	0,0137448	0,2614351	0,1063973
alfaS1 (10-13)	0	0	0	0	0	0	0,0098018	0,0012562
alfaS1 (10-16)	0,097652	0,0083424	0,5510702	0,0200514	0,8926492	0,0387768	1,4232102	0,0865561
alfaS1 (11-16)	0	0	0	0	0	0	0,0113983	0,0020834
alfaS1 (13-16)	0,0363723	0,0037198	0,1771619	0,0129184	0,5094526	0,0572004	1,1780962	0,0552852
alfaS1 (14-16)	0	0	0,003013	0,0003713	0,0089141	0,0008281	0,0173095	0,0028984
alfaS1 (15-16)	0,0285455	0,0041922	0	0	0,008665	0,0010443	0,0149221	0,0087615
alfaS1 (10-14)	0,001524	0,0002307	0,0033211	0,0006565	0	0	0,0210532	0,0150429
alfaS1 (12-14)	0,0041532	0,0006544	0,0081117	0,0012686	0,0814889	0,0915575	0,0142742	0,0201867
alfaS1 (13-14)	0	0	0	0	0	0	0,0914503	0,1293303
alfaS1 (2-17)	0,0069116	0,0004548	0,1867241	0,0549802	0,1266488	0,0108049	0,1431665	0,0512178
alfaS1 (3-17)	0	0	0,0455934	0,0122624	0	0	0,1643914	0,0970138
alfaS1 (10-17)	0	0	0,1094156	0,0161359	0	0	0,1939679	0,0720697
alfaS1 (14-17)	0,0067101	0,0031345	0,0186033	0,0043127	0,0311535	0,0074252	0,0852944	0,1206245
alfaS1 (2-9)	0	0	0	0	0	0	0	0
alfaS1 (2-13)	0,0217926	0,0031075	0	0	0	0	0	0
alfaS1 (2-14)	0	0	0,0059811	0,0005259	0	0	0	0
alfaS1 (18-20)	0,0318401	0,0026311	0,0303898	0,0054685	0,0595646	0,0050289	0,1954595	0,0255259
alfaS1 (17-20)	0,0060525	0,0002169	0,0188246	0,0037872	0,0372865	0,0046559	0,160634	0,0026256
alfaS1 (24-30)	0,0538721	0,0035729	0,2042058	0,0299813	0,2713383	0,020743	0,3278017	0,0114811
alfaS1 (24-34)	0,2914896	0,0064141	0,8681351	0,0524803	0,7026077	0,0176115	0,7170935	0,0389994
alfaS1 (24-35)	0,0975967	0,021963	0,2913755	0,0352468	0,3102489	0,0231482	0,5860402	0,0419209
alfaS1 (24-40)	0,1996128	0,0278698	0,6183083	0,0336035	0,2594875	0,0144662	2,1402358	0,2096275
beta (98-104)	0	0	0,0075327	0,0002353	0,0179447	0,000445	0,0327	0,0050331
beta (98-158)	1,2897062	0,1008114	6,1106052	0,8748316	6,5403215	1,4825419	4,2945495	0,1775142
beta (97-158)	0,6655696	0,0812286	4,7534085	0,5251665	2,1784817	0,2001742	2,5729251	0,2640726
beta (193-209)	1,2172387	0,1852139	1,3692731	0,2011946	2,0668916	0,2217973	2,0249441	0,2282892

**Tabella 7.5. Risultati della semiquantificazione dei peptidi dei formaggi modello tipo caciotta ottenuti a partire da latte omogeneizzato (13, 21, e 27 giorni)**

Sequenza	omogeneizzato 13 gg		omogeneizzato 21 gg		omogeneizzato 27 gg	
	media	dev.std	media	dev.std	media	dev.std
alfaS1 (1-23)	2,5274439	0,1242432	14494882	0,3607166	0,9491185	0,1187243
alfaS1 (1-22)	0,043487	0,0157472	0	0	0,0620706	0,0068375
alfaS1 (1-21)	0,0700499	0,0159847	0	0	0,0972424	0,0042593
alfaS1 (1-20)	2,2801071	0,1200589	68959656	1,7161156	2,9629118	0,0990954
alfaS1 (1-19)	0	0	12113122	0,3014446	1,2454545	0,0924823
alfaS1 (1-18)	0,3433853	0,0438504	16908144	0,4207725	0,6266688	0,0631615
alfaS1 (1-17)	0,2738866	0,0442121	342384416	8,5205072	2,1870067	0,072982
alfaS1 (1-16)	1,324746	0,232914	45893808	1,1421037	0,7585218	0,088701
alfaS1 (1-15)	0,027256	0,0385458	9319930	0,2319338	0,0501937	0,0055089
alfaS1 (1-14)	0,2807737	0,050184	13638816	0,3394127	0,3091955	0,0138697
alfaS1 (1-13)	1,5617955	0,1601931	77488824	1,9283707	0,2126168	0,0196238
alfaS1 (1-9)	0,4711908	0,0452842	67263722	1,673911	2,2374564	0,1377262
alfaS1 (1-8)	0,2639509	0,0596114	6777321	0,168659	0,3999772	0,0229433
alfaS1 (14-23)	0	0	729533	0,018155	0,0209505	0,0023084
alfaS1 (15-23)	0	0	1955745	0,0486703	0,0516903	0,0027021
alfaS1 (16-23)	0	0	0	0	0,0181477	0,001658
alfaS1 (17-23)	0	0	28310108	0,7045194	1,4826248	0,1281515
alfaS1 (18-23)	1,012026	0,0750363	16144465	0,4017678	0,2890486	0,028345
alfaS1 (19-23)	0	0	7880360	0,196109	0,2774372	0,0386877
alfaS1 (20-23)	0	0	4123294	0,1026114	0,6965074	0,0229642
alfaS1 (21-23)	0,4773371	0,0592571	33867212	0,8428124	0,3672269	0,0189873
alfaS1 (22-23)	0,2477681	0,0260592	2338356	0,0581918	0	0
alfaS1 (10-13)	0	0	0	0	0,0469842	0,0031887
alfaS1 (10-16)	2,5467461	0,0966111	114624375	2,8525183	1,7002292	0,0597079
alfaS1 (11-16)	0,0222158	0,0314179	1709275	0,0425367	0,033831	0,0031658
alfaS1 (13-16)	1,7756405	0,0805398	96478752	2,4009501	1,4782462	0,0669462
alfaS1 (14-16)	0,0089322	0,012632	7542284	0,1876957	0,1049748	0,015993
alfaS1 (15-16)	0	0	1123616	0,0279621	0,3632058	0,4086978
alfaS1 (10-14)	0,0315184	0,0081698	761814	0,0189583	0,04124	0,0019942
alfaS1 (12-14)	0,0502355	0,0032175	2185260	0,0543819	0,0686359	0,0047049
alfaS1 (13-14)	0,0030044	0,0042488	0	0	0	0
alfaS1 (2-17)	0,1896957	0,0377415	0	0	0,1760855	0,0151394
alfaS1 (3-17)	0,1743511	0,0294931	0	0	0,1474016	0,0112255
alfaS1 (10-17)	0,5695171	0,0942339	24282984	0,6043013	0,2369205	0,0142913
alfaS1 (14-17)	0,341292	0,0757634	16371538	0,4074187	0,3611028	0,0300918
alfaS1 (2-9)	0	0	0	0	0,2025707	0,0197554
alfaS1 (2-13)	0	0	0	0	0,0307872	0,0024236
alfaS1 (2-14)	0	0	0	0	0	0
alfaS1 (18-20)	0,2326479	0,0231973	19871014	0,4945059	0,6079441	0,0366822
alfaS1 (17-20)	0,2587778	0,0349694	25601656	0,6371175	0,4103996	0,0226245
alfaS1 (24-30)	0,6779302	0,0777473	44395792	1,1048244	0,40607	0,0187173
alfaS1 (24-34)	1,1675109	0,0828006	34448828	0,8572864	1,0031698	0,0293181
alfaS1 (24-35)	1,0076075	0,0434618	45325316	1,1279564	0,6915527	0,0471439
alfaS1 (24-40)	3,5560249	0,1229415	130880112	3,2570552	2,2068929	0,0379343
beta (98-104)	0,0579485	0,007824	1846316	0,045947	0,0683743	0,0043618
beta (98-158)	4,2644452	0,3406158	40166564	0,9995767	0,1694913	0,0263189
beta (97-158)	3,3957582	0,1230887	30032218	0,7473755	0,5991485	0,0566427
beta (193-209)	2,312086	0,0271208	55547692	1,3823483	1,3260866	0,0466664

**Tabella 7.6. Risultati della semiquantificazione dei peptidi dei formaggi modello tipo caciotta ottenuti a partire da latte crudo (0, 1, 3 e 6 giorni)**

Sequenza	Crudo 0 gg		Crudo 1 gg		Crudo 3 gg		Crudo 6 gg	
	media	dev.std	media	dev.std	media	dev.std	media	dev.std
alfaS1 (1-23)	1,676789	0,283874	2,711023	0,149223	4,829355	1,871509	2,319526	0,02556
alfaS1 (1-22)	0,029731	0,024366	0,04747	0,005412	0,083447	0,012565	0,057333	9,19E-05
alfaS1 (1-21)	0,019488	0,000721	0,029851	0,000437	0,046268	0,065433	0,027609	0,012718
alfaS1 (1-20)	0,086999	0,015154	0,227794	0,012727	0,569578	0,115944	0,339087	0,013787
alfaS1 (1-19)	0	0	0	0	0,187915	0,07236	0,047844	0,067662
alfaS1 (1-18)	0	0	0	0	0,018551	0,026235	0	0
alfaS1 (1-17)	1,471032	0,204039	2,455058	0,053892	6,296794	1,478537	3,873707	0,027456
alfaS1 (1-16)	0,24186	0,04197	0,57062	0,114049	1,157844	0,298833	0,704728	0,007947
alfaS1 (1-15)	0,015566	0,009642	0,052117	0,005513	0,170151	0,005247	0,130916	0,005174
alfaS1 (1-14)	0,059013	0,011671	0,058588	0,00382	0,291071	0,054802	0,160548	0,028206
alfaS1 (1-13)	0,215278	0,025981	0,191877	0,216816	0,986618	0,25503	0,798844	0,03776
alfaS1 (1-9)	0,28746	0,075381	0,747244	0,043435	0,945318	0,193643	0,765798	0,103938
alfaS1 (1-8)	0,090032	0,031103	0,068728	0,001191	0,284961	0,012947	0,08745	0,064199
alfaS1 (14-23)	0,016379	0,023163	0,08013	0,016049	0,206867	0,073788	0,153977	0,008817
alfaS1 (15-23)	0,034147	0,017984	0,04669	0,003629	0,09992	0,021933	0,063569	0,00608
alfaS1 (16-23)	0,037067	0,052421	0	0	0,075449	0,106701	0,080576	0,026951
alfaS1 (17-23)	0,164091	0,02634	0,314714	0,14235	11,03071	2,030699	0,390571	0,048201
alfaS1 (18-23)	0,317839	0,05434	0,637408	0,110423	0,86858	0,160142	0,555548	0,015255
alfaS1 (19-23)	0,007634	0,010796	0,070588	0,020873	0,04217	0,059637	0,031939	0,003647
alfaS1 (20-23)	0,085963	0,111611	0,013269	0,004621	0,031124	0,044016	0,026546	0,002814
alfaS1 (21-23)	0,00908	0,002093	0,032948	0,011089	0,07398	0,009768	0,071132	0,000882
alfaS1 (22-23)	0,009976	0,001908	0,028787	0,003418	0,098543	0,073803	0,051484	0,002459
alfaS1 (10-13)	0,005773	0,001283	0	0	0,033046	0,00839	0,005358	0,007578
alfaS1 (10-16)	0,191184	0,02337	0,469219	0,016317	0,669252	0,741745	1,136195	0,034584
alfaS1 (11-16)	0,004931	0,006973	0,016465	0,007059	0,033812	0,021402	0,031045	0,000184
alfaS1 (13-16)	0,034002	0,013415	0,268059	0,109694	0,386323	0,376024	0,624111	0,006195
alfaS1 (14-16)	0	0	0	0	0,007232	0,010227	0,004737	0,006698
alfaS1 (15-16)	0,008966	0,01268	0,010638	0,003121	0,262721	0,288102	0,023537	0,000329
alfaS1 (10-14)	0	0	0,006261	0,001201	0,084036	0,077559	0,058514	0,019214
alfaS1 (12-14)	0,007595	0,002001	0,037058	0,005904	0,068923	0,041922	0,133298	0,001783
alfaS1 (13-14)	0	0	0,004769	0,001192	0,05396	0,054762	0,004054	0,005734
alfaS1 (2-17)	0,000508	0,000718	0,045446	0,012255	0,080558	0,021965	0,211045	0,015643
alfaS1 (3-17)	0	0	0	0	0,804853	1,138234	0,008249	0,011666
alfaS1 (10-17)	0,063949	0,02283	0,154593	0,040691	0,203728	0,175361	0,2314	0,005008
alfaS1 (14-17)	0,003885	0,005494	0,018369	0,002254	0,494696	0,564167	0,096981	0,002631
alfaS1 (2-9)	0,022594	0,001885	0,061356	0,013969	0,037968	0,028971	0,085935	0,01918
alfaS1 (2-13)	0,012985	0,001221	0,033271	0,012543	0,040065	0,006015	0,076354	0,004809
alfaS1 (2-14)	0	0	0	0	0,031619	0,044717	0,036685	0,037323
alfaS1 (18-20)	0,003977	0,005624	0,021299	0,006979	0,072976	0,004458	0,050967	0,006307
alfaS1 (17-20)	0,001277	0,001806	0	0	0,022841	0,032302	0,036318	0,002079
alfaS1 (24-30)	0,067596	0,013468	0,164603	0,028229	0,288827	0,054328	0,325206	0,003022
alfaS1 (24-34)	0,446479	0,078076	0,722266	0,169632	1,114068	0,469887	0,683518	0,015712
alfaS1 (24-35)	0,12542	0,02133	0,331744	0,088348	0,553416	0,123463	0,59329	0,011952
alfaS1 (24-40)	0,09568	0,016887	0,435329	0,108904	1,066451	0,015566	0,976404	0,001158
beta (98-104)	0,00816	0,001965	0,04379	0,013326	0,132251	0,03634	0,13885	0,020841
beta (98-158)	1,793058	0,542009	2,701845	0,157855	2,103411	0,194609	3,133401	0,433259
beta (97-158)	1,068751	0,341916	1,769159	0,034051	1,365226	0,132805	1,904237	0,137029
beta (193-209)	1,964967	0,472482	1,705379	0,075304	2,312677	0,330745	1,356019	0,019632

**Tabella 7.7. Risultati della semiquantificazione dei peptidi dei formaggi modello tipo caciotta ottenuti a partire da latte crudo (13, 21, e 27 giorni)**

Sequenza	Crudo 13 gg		Crudo 21 gg		crudo 27 gg	
	media	dev.std	media	dev.std	media	dev.std
alfaS1 (1-23)	1,34648	0,135224	0,511521	0,077256	0,723182	0,136617
alfaS1 (1-22)	0,460725	0,56531	0,010199	0,001704	0,02493	0,003156
alfaS1 (1-21)	0,395378	0,485847	0	0	0	0
alfaS1 (1-20)	0,492612	0,037816	0,570812	0,072399	0,143118	0,035609
alfaS1 (1-19)	0,549321	0,072883	0	0	0,319324	0,0863
alfaS1 (1-18)	0,124098	0,022208	0,143894	0,173617	0,241349	0,00884
alfaS1 (1-17)	4,113482	0,391535	1,489466	0,103902	1,447247	0,134422
alfaS1 (1-16)	0,78242	0,123199	0,291331	0,023082	0,292277	0,060543
alfaS1 (1-15)	0,072777	0,009792	0	0	0,171444	0,021611
alfaS1 (1-14)	0,644014	0,019943	0,24556	0,028253	0,2205	0,028493
alfaS1 (1-13)	1,493619	0,234909	0,682911	0,036639	0,873968	0,103635
alfaS1 (1-9)	0,683464	0,047207	0,492668	0,038549	1,055333	0,051023
alfaS1 (1-8)	0,119109	0,025316	0,447368	0,522246	0,148085	0,021083
alfaS1 (14-23)	0,13011	0,033293	0,049486	0,003939	0,071831	0,014671
alfaS1 (15-23)	0,106163	0,018506	0,032695	0,004817	0,088365	0,003736
alfaS1 (16-23)	0,337698	0,398507	0,007039	0,001059	0,025529	0,003507
alfaS1 (17-23)	0,870668	0,049269	0,302392	0,005147	0,462717	0,037131
alfaS1 (18-23)	0,423302	0,051869	0,153382	0,016768	0,175017	0,007124
alfaS1 (19-23)	0,466927	0,563568	0,049569	0,009913	0,198118	0,224679
alfaS1 (20-23)	0,101634	0,013613	0,609703	0,126569	0,067453	0,00663
alfaS1 (21-23)	0,160757	0,008652	0,882452	0,102919	0,162535	0,012749
alfaS1 (22-23)	0,060323	0,010342	0,044509	0,002371	0,07864	0,012501
alfaS1 (10-13)	0,149505	0,167945	0,022483	0,000989	0,070778	0,00385
alfaS1 (10-16)	1,752439	0,155413	0,793633	0,012199	1,192105	0,129279
alfaS1 (11-16)	0,082507	0,003535	0,057596	0,011167	0,512676	0,599621
alfaS1 (13-16)	1,264571	0,049971	0,697346	0,006017	1,446395	0,01812
alfaS1 (14-16)	0,038803	0,002588	0,032013	0,005386	0,074668	0,011341
alfaS1 (15-16)	0,160053	0,007559	0,081703	0,003658	0,36042	0,006223
alfaS1 (10-14)	0,222771	0,015785	0,109546	0,003426	0,308838	0,033005
alfaS1 (12-14)	0,392882	0,117435	0,198504	0,011623	0,364979	0,02132
alfaS1 (13-14)	0,040341	0,006808	0,035438	0,004613	0,026359	0,003119
alfaS1 (2-17)	0,480469	0,054387	0,526348	0,031615	0,864922	0,087178
alfaS1 (3-17)	0,198469	0,012497	0,010977	0,000396	0	0
alfaS1 (10-17)	0,38508	0,023426	0,278774	0,088851	0,357832	0,053796
alfaS1 (14-17)	0,328943	0,017556	0,120961	0,020842	0,470065	0,185065
alfaS1 (2-9)	0,257703	0,020233	0,179855	0,017539	0,764456	0,101879
alfaS1 (2-13)	0,170465	0,021453	0,280695	0,021374	0,550769	0,307123
alfaS1 (2-14)	0,140182	0,029014	0,202321	0,035904	0,655181	0,082834
alfaS1 (18-20)	0,722043	0,043794	0,077533	0,016335	0,201408	0,036551
alfaS1 (17-20)	1,721148	0,128893	0,072733	0,004346	0,232171	0,053488
alfaS1 (24-30)	0,933506	0,046672	0,303066	0,018528	0,592919	0,108799
alfaS1 (24-34)	0,785572	0,043774	0,324606	0,011791	0,757109	0,008314
alfaS1 (24-35)	0,339584	0,005083	0,601887	0,190402	0,933614	0,048153
alfaS1 (24-40)	0,942164	0,036527	0,632167	0,053258	1,370459	0,121953
beta (98-104)	0,536183	0,13561	0,214204	0,004097	0,466272	0,04238
beta (98-158)	0,639095	0,009385	0,522175	0,021957	0,318325	0,054256
beta (97-158)	0,630028	0,003438	0,313074	0,011989	0,12901	0,022138
beta (193-209)	1,824926	0,156466	0,496736	0,015379	0,895029	0,036967

**Tabella 7.8. Risultati della semiquantificazione dei peptidi dei formaggi modello tipo caciotta ottenuti a partire da latte pastorizzato (0, 1, 3 e 6 giorni)**

Sequenza	pastorizzato 0 gg		pastorizzato 1 gg		pastorizzato 3 gg		pastorizzato 6 gg	
	media	dev.std	media	dev.std	media	dev.std	media	dev.std
alfaS1 (1-23)	0,8296628	1,1733202	1,4707874	0,1497952	2,4934695	0,0427652	2,7721449	0,1607191
alfaS1 (1-22)	0,0222619	0,031483	0,0396883	0,0020647	0,0618819	0,0050275	0,0441438	0,0039425
alfaS1 (1-21)	0	0	0,0006707	0,0009485	0,061165	0,0025384	0,04574	0,0034181
alfaS1 (1-20)	0,0357228	0,0505197	0,178841	0,0205835	0,3188167	0,0101214	0,7265618	0,0104412
alfaS1 (1-19)	0	0	0,0042719	0,0060414	0,1092647	0,015584	0,143312	0,2026738
alfaS1 (1-18)	0	0	0,0110725	0,0156589	0	0	0	0
alfaS1 (1-17)	0,948344	1,3411608	2,6296183	0,1198627	4,3505209	0,2284155	6,2963309	0,4724061
alfaS1 (1-16)	0,1317944	0,1863854	0,3875889	0,0334881	0,6014932	0,0162174	0,9256956	0,0472774
alfaS1 (1-15)	0		0,0708937	0,009864	0,1495074	0,0078894	0,1072446	0,1516668
alfaS1 (1-14)	0,0407282	0,0575984	0,0499333	0,0048799	0,2038955	0,0116012	0,228122	0,0097367
alfaS1 (1-13)	0,0968395	0,1369517	0,4071182	0,0240564	0,608598	0,0162225	0,9035497	0,0212437
alfaS1 (1-9)	0	0	0,476919	0,0170474	0	0	1,1927746	0,0389542
alfaS1 (1-8)	0	0	0,1244347	0,0135373	0,2407803	0,0196402	0,2461848	0,0272716
alfaS1 (14-23)	0	0	0,0477139	0,0053349	0,0716101	0,0029538	0,0998705	0,0056994
alfaS1 (15-23)	0,0128177	0,018127	0,0568821	0,0006415	0,0608987	0,0033249	0,0883789	0,0044847
alfaS1 (16-23)	0	0	0,0717352	0,0042322	0,109071	0,0111744	0	0
alfaS1 (17-23)	0,0981789	0,138846	0,2316611	0,3276182	0,6823934	0,0470437	0,5059466	0,0272296
alfaS1 (18-23)	0,1467729	0,2075682	0,7089742	0,0341495	0,6860577	0,0190437	0,8576224	0,0305908
alfaS1 (19-23)	0	0	0,112709	0,012413	0	0	0,047834	0,0028737
alfaS1 (20-23)	0	0	0,0175291	0,0014703	0,0436551	0,0024813	0,03	0,0424264
alfaS1 (21-23)	0,0057277	0,0081002	0,0414873	0,0047198	0,0712138	0,0029355	0,1752851	0,0298025
alfaS1 (22-23)	7,774E-10	1,099E-09	0,0461751	0,0032634	0,1180867	0,0123073	0,1409696	0,001512
alfaS1 (10-13)	0	0	0	0	0	0	0,0149685	0,002308
alfaS1 (10-16)	0,1322895	0,1870856	0,4585374	0,0368465	0,8393906	0,0413387	1,5975768	0,2286158
alfaS1 (11-16)	0	0	0,0067545	0,0095523	0,0216813	0,0030498	0,0214268	0,003007
alfaS1 (13-16)	0,0432295	0,0611357	0,2589644	0,0179386	0,6042768	0,0177457	0,9782392	0,0399001
alfaS1 (14-16)	0	0	0,0006859	0,0004987	0	0	0,0083899	0,0006051
alfaS1 (15-16)	0,0056177	0,0079447	0,0188094	0,004271	0,02524	0,0018139	0,021	0,0296985
alfaS1 (10-14)	0	0	0,0070875	0,0003379	0	0	0,0208903	0,0015089
alfaS1 (12-14)	0,0020827	0,0029454	0,0219621	0,000387	0,0691529	0,0031777	0,0580696	0,0053324
alfaS1 (13-14)	0	0	0	0	0	0	0,0059957	0,0002554
alfaS1 (2-17)	0,0039273	0,005554	0,0436648	0,0024409	0	0	0,031161	0,0025866
alfaS1 (3-17)	4,285E-10	0	0	0	0	0	0,04995	0,0014991
alfaS1 (10-17)	0,0810771	0,1146604	0,1689643	0,0198971	0,3006609	0,0230489	0,3415368	0,0292001
alfaS1 (14-17)	2,055E-10	0	0,0166603	0,0025513	0,0599688	0,002155	0,2038181	0,01762
alfaS1 (2-9)	0	0	0,0209158	0,0017435	0,0562238	0,0035802	0,051084	0,0016741
alfaS1 (2-13)	0,0593992	0,0840032	0,0399762	0,0024072	0	0	0,0442948	0,0038762
alfaS1 (2-14)	0	0	0	0	0,0234503	0,0331637	0	0
alfaS1 (18-20)	2,591E-10	0	0,0211212	0,0035827	0,0468326	0,00357	0,0967523	0,0106522
alfaS1 (17-20)	0,0037946	0,0053664	0	0	0,0197971	0,0013193	0,0541548	0,0035274
alfaS1 (24-30)	0	0	0,0989907	0,0038093	0,23185	0,0218555	0,3046274	0,012385
alfaS1 (24-34)	0,3058946	0,4326003	0,4706886	0,0169083	0,7831851	0,0460753	0,6270282	0,0438088
alfaS1 (24-35)	0,0679213	0,0960552	0,214482	0,0353651	0,4427885	0,0274746	0,511642	0,0227835
alfaS1 (24-40)	0,0437446	0,0618642	0,49876	0,1284027	0,4736684	0,6662019	1,767161	0,074655
beta (98-104)	0,0039246	0,0055503	0,0865407	0,0966679	0,0692549	0,0047696	0,0688278	0,0030861
beta (98-158)	0,3425741	0,4844729	2,2099443	0,1202804	1,9834412	0,0658235	152451282	215598666
beta (97-158)	0,4092258	0,5787325	1,306858	0,0816094	1,0567289	0,0895804	2,1000923	0,045373
beta (193-209)	0,9449133	1,336309	2,0225599	0,0815884	1,805878	0,0932705	1,6868122	0,0396137

**Tabella 7.9. Risultati della semiquantificazione dei peptidi dei formaggi modello tipo caciotta ottenuti a partire da latte pastorizzato (13, 21, e 27 giorni)**

Sequenza	pastorizzato 0 gg		pastorizzato 1 gg		pastorizzato 3 gg		pastorizzato 6 gg	
	media	dev.std	media	dev.std	media	dev.std	media	dev.std
alfaS1 (1-23)	0,8296628	1,1733202	1,4707874	0,1497952	2,4934695	0,0427652	2,7721449	0,1607191
alfaS1 (1-22)	0,0222619	0,031483	0,0396883	0,0020647	0,0618819	0,0050275	0,0441438	0,0039425
alfaS1 (1-21)	0	0	0,0006707	0,0009485	0,061165	0,0025384	0,04574	0,0034181
alfaS1 (1-20)	0,0357228	0,0505197	0,178841	0,0205835	0,3188167	0,0101214	0,7265618	0,0104412
alfaS1 (1-19)	0	0	0,0042719	0,0060414	0,1092647	0,015584	0,143312	0,2026738
alfaS1 (1-18)	0	0	0,0110725	0,0156589	0	0	0	0
alfaS1 (1-17)	0,948344	1,3411608	2,6296183	0,1198627	4,3505209	0,2284155	6,2963309	0,4724061
alfaS1 (1-16)	0,1317944	0,1863854	0,3875889	0,0334881	0,6014932	0,0162174	0,9256956	0,0472774
alfaS1 (1-15)	0	#DIV/0!	0,0708937	0,009864	0,1495074	0,0078894	0,1072446	0,1516668
alfaS1 (1-14)	0,0407282	0,0575984	0,0499333	0,0048799	0,2038955	0,0116012	0,228122	0,0097367
alfaS1 (1-13)	0,0968395	0,1369517	0,4071182	0,0240564	0,608598	0,0162225	0,9035497	0,0212437
alfaS1 (1-9)	0	0	0,476919	0,0170474	0	0	1,1927746	0,0389542
alfaS1 (1-8)	0	0	0,1244347	0,0135373	0,2407803	0,0196402	0,2461848	0,0272716
alfaS1 (14-23)	0	0	0,0477139	0,0053349	0,0716101	0,0029538	0,0998705	0,0056994
alfaS1 (15-23)	0,0128177	0,018127	0,0568821	0,0006415	0,0608987	0,0033249	0,0883789	0,0044847
alfaS1 (16-23)	0	0	0,0717352	0,0042322	0,109071	0,0111744	0	0
alfaS1 (17-23)	0,0981789	0,138846	0,2316611	0,3276182	0,6823934	0,0470437	0,5059466	0,0272296
alfaS1 (18-23)	0,1467729	0,2075682	0,7089742	0,0341495	0,6860577	0,0190437	0,8576224	0,0305908
alfaS1 (19-23)	0	0	0,112709	0,012413	0	0	0,047834	0,0028737
alfaS1 (20-23)	0	0	0,0175291	0,0014703	0,0436551	0,0024813	0,03	0,0424264
alfaS1 (21-23)	0,0057277	0,0081002	0,0414873	0,0047198	0,0712138	0,0029355	0,1752851	0,0298025
alfaS1 (22-23)	7,774E-10	1,099E-09	0,0461751	0,0032634	0,1180867	0,0123073	0,1409696	0,001512
alfaS1 (10-13)	0	0	0	0	0	0	0,0149685	0,002308
alfaS1 (10-16)	0,1322895	0,1870856	0,4585374	0,0368465	0,8393906	0,0413387	1,5975768	0,2286158
alfaS1 (11-16)	0	0	0,0067545	0,0095523	0,0216813	0,0030498	0,0214268	0,003007
alfaS1 (13-16)	0,0432295	0,0611357	0,2589644	0,0179386	0,6042768	0,0177457	0,9782392	0,0399001
alfaS1 (14-16)	0	0	0,0006859	0,0004987	0	0	0,0083899	0,0006051
alfaS1 (15-16)	0,0056177	0,0079447	0,0188094	0,004271	0,02524	0,0018139	0,021	0,0296985
alfaS1 (10-14)	0	0	0,0070875	0,0003379	0	0	0,0208903	0,0015089
alfaS1 (12-14)	0,0020827	0,0029454	0,0219621	0,000387	0,0691529	0,0031777	0,0580696	0,0053324
alfaS1 (13-14)	0	0	0	0	0	0	0,0059957	0,0002554
alfaS1 (2-17)	0,0039273	0,005554	0,0436648	0,0024409	0	0	0,031161	0,0025866
alfaS1 (3-17)	4,285E-10	0	0	0	0	0	0,04995	0,0014991
alfaS1 (10-17)	0,0810771	0,1146604	0,1689643	0,0198971	0,3006609	0,0230489	0,3415368	0,0292001
alfaS1 (14-17)	2,055E-10	0	0,0166603	0,0025513	0,0599688	0,002155	0,2038181	0,01762
alfaS1 (2-9)	0	0	0,0209158	0,0017435	0,0562238	0,0035802	0,051084	0,0016741
alfaS1 (2-13)	0,0593992	0,0840032	0,0399762	0,0024072	0	0	0,0442948	0,0038762
alfaS1 (2-14)	0	0	0	0	0,0234503	0,0331637	0	0
alfaS1 (18-20)	2,591E-10	0	0,0211212	0,0035827	0,0468326	0,00357	0,0967523	0,0106522
alfaS1 (17-20)	0,0037946	0,0053664	0	0	0,0197971	0,0013193	0,0541548	0,0035274
alfaS1 (24-30)	0	0	0,0989907	0,0038093	0,23185	0,0218555	0,3046274	0,012385
alfaS1 (24-34)	0,3058946	0,4326003	0,4706886	0,0169083	0,7831851	0,0460753	0,6270282	0,0438088
alfaS1 (24-35)	0,0679213	0,0960552	0,214482	0,0353651	0,4427885	0,0274746	0,511642	0,0227835
alfaS1 (24-40)	0,0437446	0,0618642	0,49876	0,1284027	0,4736684	0,6662019	1,767161	0,074655
beta (98-104)	0,0039246	0,0055503	0,0865407	0,0966679	0,0692549	0,0047696	0,0688278	0,0030861
beta (98-158)	0,3425741	0,4844729	2,2099443	0,1202804	1,9834412	0,0658235	15,2451282	2,15598666
beta (97-158)	0,4092258	0,5787325	1,306858	0,0816094	1,0567289	0,0895804	2,1000923	0,045373
beta (193-209)	0,9449133	1,336309	2,0225599	0,0815884	1,805878	0,0932705	1,6868122	0,0396137

## 7.4 CONCLUSIONI

Nell'ambito di questo lavoro si è studiata la frazione oligopeptidica di formaggi modello tipo "caciotta", prodotti a partire da latte crudo, latte pastorizzato, e latte omogeneizzato ad alta pressione.

Mediante interfacciamento di HPLC a fase inversa con spettrometria di massa elettrospray è stato possibile identificare e semiquantificare una serie di oligopeptidi dei quali si è studiata, mediante analisi statistica, la correlazione con la stagionatura e con la tecnologia di produzione.

In particolare si è focalizzata l'attenzione sui peptidi originati dalla degradazione della sequenza  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23), che, derivando dall'azione enzimatica diretta della chimosina, si forma copiosamente fin dalle prime fasi produttive del formaggio; dalla presenza di alcune sequenze, e dall'assenza di altre, è stato possibile ipotizzare i possibili percorsi degradativi di tale peptide.

L' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23) viene scisso da diversi tagli endopeptidasici, tra cui il più importante è quello che avviene tra Asn 17 e Glu 18, ed i prodotti che si formano sono ulteriormente degradati da endopeptidasi ed esopeptidasi, secondo un pattern proteolitico che è stato possibile ipotizzare utilizzando l'analisi delle componenti principali applicata ai risultati di semiquantificazione per i campioni a diversi tempi di stagionatura.

Si è evidenziato anche come i diversi tagli endopeptidasici, frutto probabilmente dell'azione delle proteasi del complesso sistema proteolitico dei batteri lattici, non sono contemporanei, ma avvengono a tempi diversi della stagionatura.

Significative differenze sono emerse nella composizione oligopeptidica delle tre tipologie di formaggio studiate, in particolare i formaggi a partire da latte omogeneizzato si distinguono per una maggiore attività carbossipeptidasica sull' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23), mentre i formaggi da latte crudo si distinguono per un'elevata attività amminopeptidasica a carico dell'arginina in posizione 1 dell' $\alpha_{S1}$ -caseina.

## 7.5 BIBLIOGRAFIA

---

<sup>1</sup> McSweeney, P.L.H.; Olson, N.F.; Fox, P.F.; Healy, A.; Højrup, P. (1993) *J Dairy Res*, **60**, 401-412.

---

<sup>2</sup> Sforza, S.; Ferroni, L.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R. (2003) *J Agr Food Chem*, **51**, 2130-2135.

<sup>3</sup> Christensen, J.E.; Dudley, E.G.; Pederson, J.A.; Steele, J.L. (1999) *Ant. Van Leeuw.*, **76**, 217-246.

## **8. Peptidi come marker di origine del latte destinato alla caseificazione**

In questa parte del lavoro di tesi si è inteso valutare la possibilità di sfruttare la frazione oligopeptidica dei formaggi al fine di individuare potenziali marker peptidici di adulterazione del latte utilizzato per la produzione casearia: sono stati utilizzati a tale scopo formaggi modello tipo pecorino prodotti a partire da latte 95% ovino + 5% vaccino, la cui frazione peptidica è stata confrontata con quella dei corrispondenti campioni prodotti a partire da latte ovino puro.

### **8.1 Metodi per la determinazione dell'autenticità dei prodotti lattiero-caseari**

In molte nazioni ci sono delle leggi con lo scopo di proteggere i prodotti caseari da pratiche fraudolenti; queste leggi non sono particolarmente restrittive, ma concordano sulla necessità di dichiarare in etichetta l'origine del latte usato per la preparazione del formaggio, specialmente nel caso dei prodotti tutelati a livello europeo dalla Denominazione di Origine Protetta (DOP).

Nonostante queste precauzioni, al giorno d'oggi l'aggiunta di latte vaccino a quello ovino, quando non dichiarata in etichetta, rappresenta una frequente pratica di adulterazione nell'industria casearia, per via del minor costo del latte vaccino rispetto a quello ovino, e della sua minore suscettibilità a variazioni stagionali.

Da questo punto di vista c'è una forte richiesta di nuovi rapidi metodi in grado di rivelare adulterazioni di questo tipo, soprattutto in quelle nazioni che vantano una serie di formaggi a latte ovino di grande pregio.

Attualmente in letteratura ci sono numerosi articoli che focalizzano l'attenzione sull'adulterazione del latte di pecora con quello di mucca, la maggior parte dei quali sono basati sull'analisi delle proteine del latte integre, quali l' $\alpha$ -lattalbumina, la  $\beta$ -lattoglobulina e le caseine; i metodi che sono principalmente utilizzati per questo scopo sono l'elettroforesi su gel<sup>1</sup>, l'elettroforesi capillare<sup>2</sup>, l'HPLC<sup>3</sup> e il MALDI-TOF<sup>4</sup>. L'elettroforesi su gel e l'ELISA permettono un'analisi quantitativa dei prodotti caseari, ma con alcune limitazioni, in quanto non sono in grado di rivelare piccole percentuali di taglio; molto più

efficaci, da questo punto di vista, risultano le tecniche cromatografiche, e sono noti in letteratura anche articoli in cui viene utilizzata la PCR<sup>5</sup>.

Il principale inconveniente di tutti questi approcci consiste nel fatto che vengono analizzate le proteine del latte tal quali, caseine in particolare, per cui ci si basa sulle piccole differenze che esistono tra le caseine ovine e vaccine, caratterizzate da un'elevata omologia di sequenza, ed aventi, quindi, caratteristiche molto simili; risultati migliori potrebbero essere ottenuti, da questo punto di vista, andando a focalizzare l'attenzione sulla frazione oligopeptidica derivante dalla proteolisi delle caseine stesse.

L'RP-HPLC interfacciato con la spettrometria di massa elettrospray consente, come visto nei capitoli precedenti, di analizzare in modo approfondito le frazioni oligopeptidiche di formaggi, nonostante la loro elevata complessità, per cui un altro approccio al problema potrebbe essere quello di andare a cercare, mediante tale tecnica, peptidi specifici che derivano dalla proteolisi delle caseine vaccine.

## **8.2 RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **8.2.1 Preparazione dei formaggi modello da latte ovino e da latte misto**

I formaggi modello utilizzati per questo lavoro sono stati preparati presso i laboratori di Cesena della Facoltà di Scienze Alimentari dell'Università di Bologna, nelle tre tipologie da latte crudo, omogeneizzato ad alte pressioni, e pastorizzato (vedi capitolo 6), e per ognuna di esse si sono preparate forme utilizzando solo latte ovino, o latte misto con un 5% di latte vaccino; la scelta di analizzare campioni da latte misto al 5% vaccino rappresenta un buon compromesso tra limite di rivelazione e significatività commerciale.

In tutti i casi si sono effettuati campionamenti a 0 giorni (inizio stagionatura), 13 giorni, e 21 giorni, per un totale di 18 campioni schematizzati in tabella 8.1.

**Tabella 8.1. Simbologia dei campioni analizzati.**

100% ovino	CRU	OMO	PAST
0 giorni	C T0	O T0	P T0
13 giorni	C T13	O T13	P T13
21 giorni	C T21	O T21	P T21
MIX (5% vaccino)			
0 giorni	C T0 MIX	O T0 MIX	P T0 MIX
13 giorni	C T13 MIX	O T13 MIX	P T13 MIX
21 giorni	C T21 MI	O T21 MIX	P T21 MIX

CRU=latte crudo; OMO=latte omogeneizzato; PAST=latte pastorizzato.

### 8.2.2 Peptidi come marker di origine del latte

Durante il lavoro d'identificazione delle sequenze peptidiche in formaggi modello tipo pecorino (capitolo 6), sono state riscontrate forti analogie tra alcuni degli oligopeptidi studiati, ed altri caratterizzanti per i formaggi vaccini (si veda il capitolo 7); in particolare, in entrambe le tipologie di formaggi è stata riscontrata la presenza di tre sequenze comuni:

- $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14)
- $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23)
- $\alpha_{S1}$ -CN(f1-20)

Tali analogie sono dovute al fatto che molti degli enzimi proteolitici all'opera nei diversi formaggi sono gli stessi, e che le caseine ovine e bovine presentano numerosi siti di taglio comuni, vista la loro elevata omologia di sequenza; da ciò consegue il rilascio di peptidi che hanno la stessa localizzazione nella sequenza caseinica, ma che possono differire per alcuni residui amminoacidici, rappresentando, in questo modo, dei potenziali marker del latte di origine. In particolare abbiamo focalizzato l'attenzione sul frammento  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14), che è fortemente rappresentato in entrambe le tipologie di formaggio, da latte ovino e vaccino; le sequenze del peptide ovino e vaccino sono riportate di seguito:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

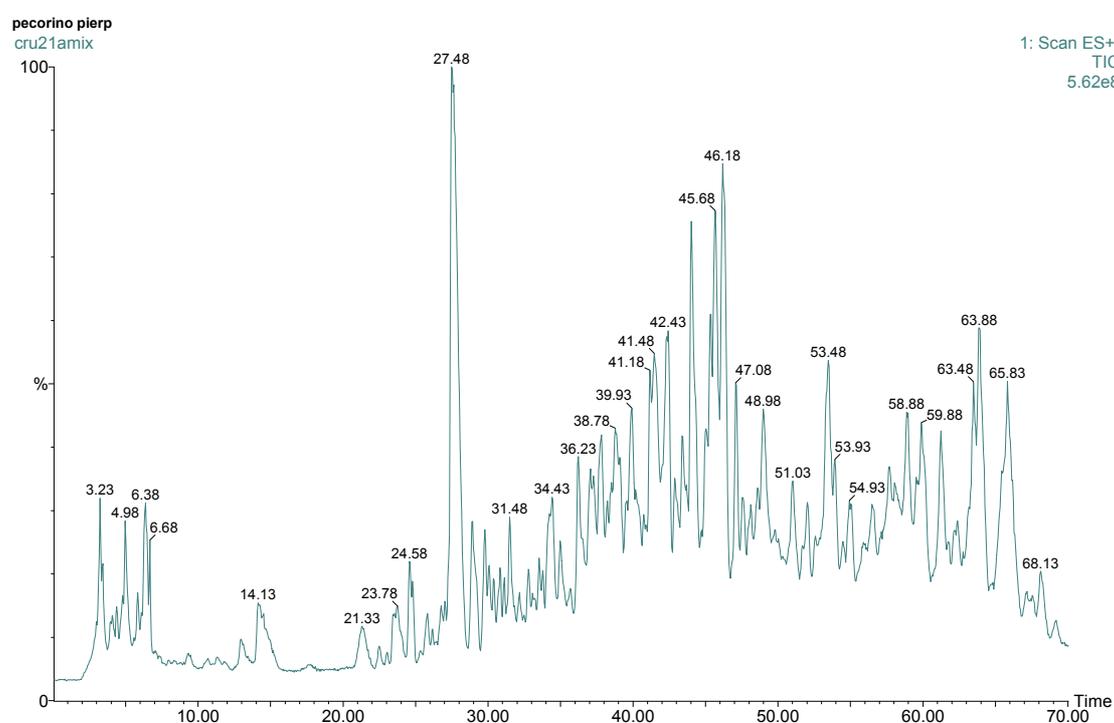
OVINO : R P K H P I K H Q G L S P E P.M.= 1624 Ioni caratteristici= 542+813

VACCINO : R P K H P I K H Q G L P Q E P.M.= 1665 Ioni caratteristici= 556+833

Come si può notare, i due oligopeptidi differiscono solo per due posizioni, laddove la serina 12 nella sequenza ovina è sostituita dalla prolina in quella vaccina, mentre la prolina 13 è rimpiazzata da un residuo di glutamina; ciò porta ad un cambiamento nel peso molecolare, anche se ci aspettiamo che i due peptidi abbiano un tempo di ritenzione molto simile.

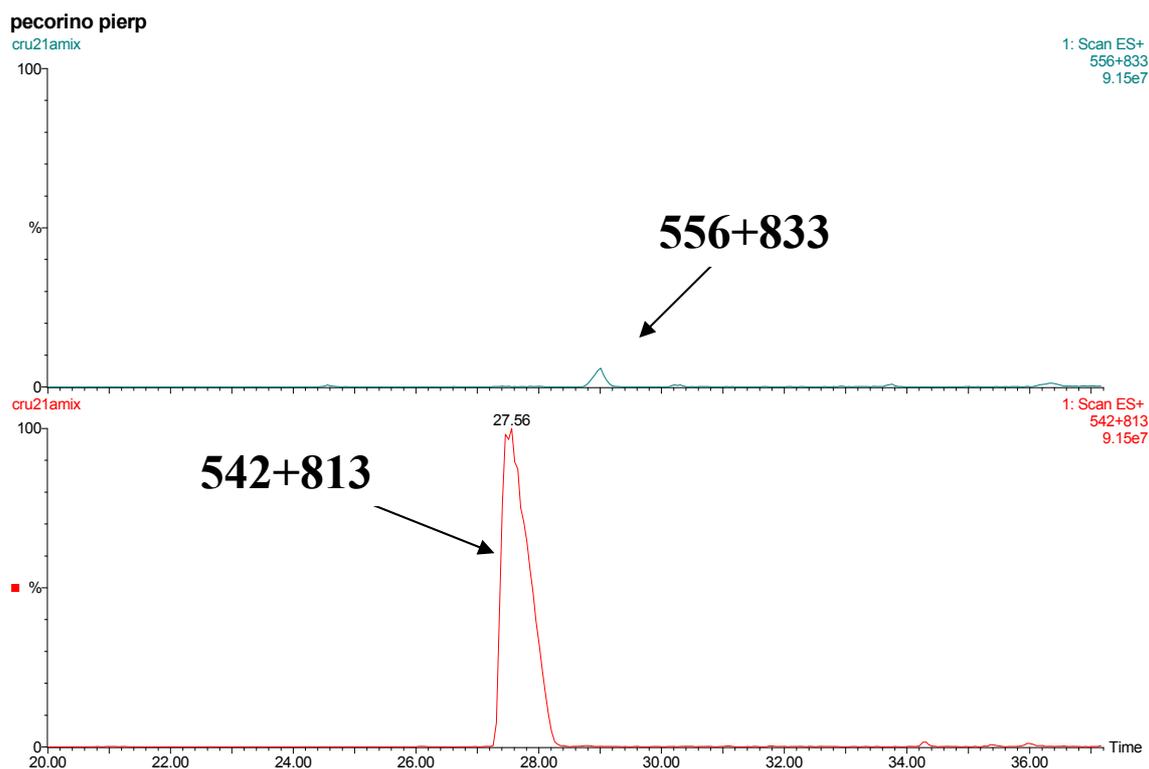
Partendo da queste considerazioni, abbiamo ricercato la presenza del peptide vaccino nei campioni prodotti a partire da latte misto (per la preparazione dei campioni e le condizioni di analisi in HPLC-MS si veda il capitolo 6).

In figura 8.1 è riportato il cromatogramma in corrente ionica totale (TIC) di un campione di pecorino prodotto con latte crudo misto, e stagionato 21 giorni.



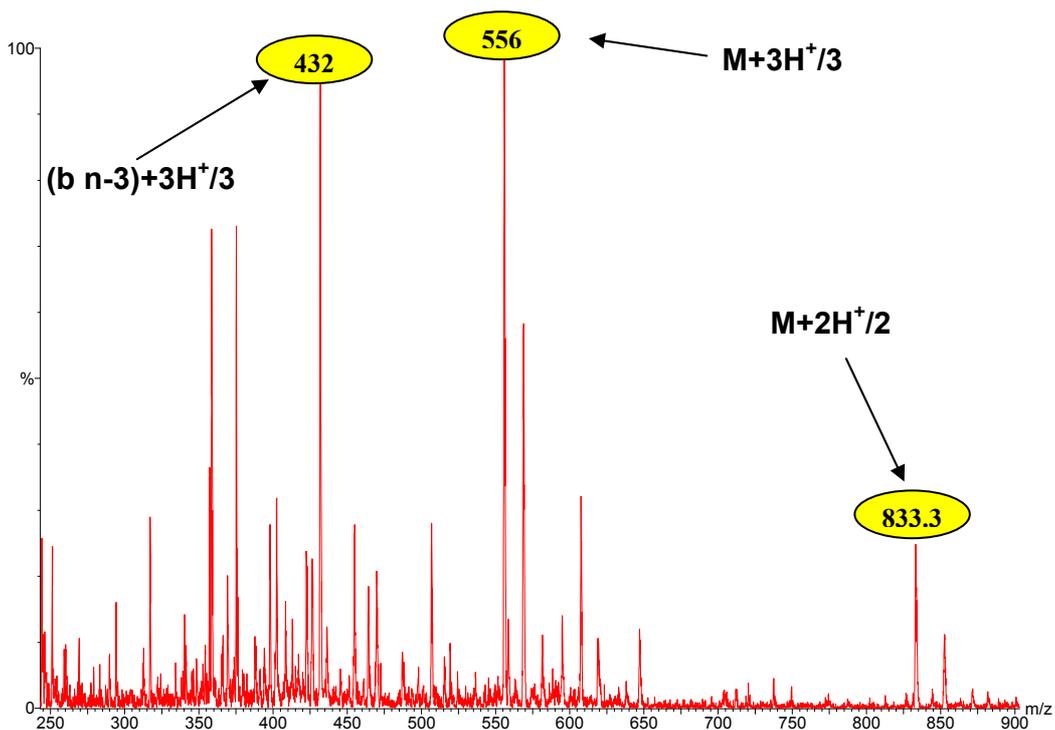
**Figura 8.1. Cromatogramma in corrente ionica totale di un campione di pecorino da latte crudo misto a 21 giorni di stagionatura**

Estraendo dal cromatogramma TIC del campione gli ioni caratteristici relativi ai due peptidi (556-833m/z e 542-813m/z, triplo e doppio caricato della sequenza vaccina ed ovina rispettivamente), abbiamo ottenuto i cromatogrammi XIC (extracted ion chromatogram) riportati in figura 8.2 (i due cromatogrammi estratti sono in scala).

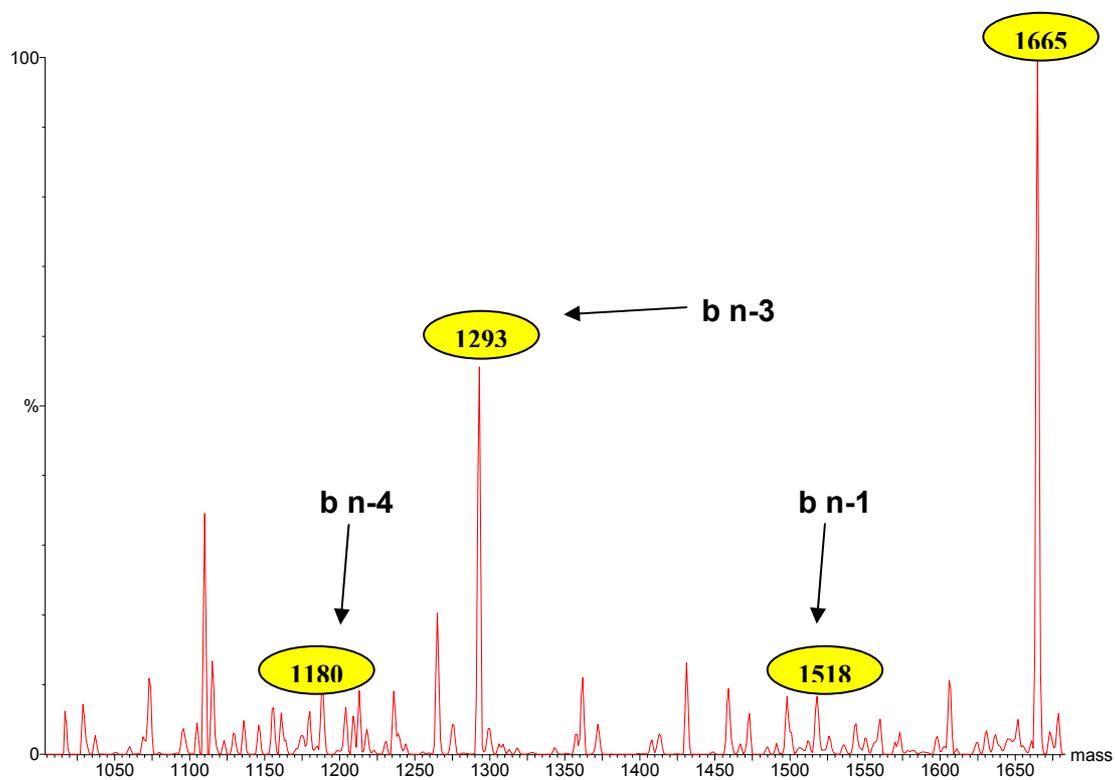


**Figura 8.2. Cromatogrammi XIC del campione CRU T21 MIX ottenuti estraendo gli ioni caratteristici di  $\alpha_{S1}$ -CN (f1-14) bovino e di  $\alpha_{S1}$ -CN (f1-14) ovino**

Se consideriamo lo spettro di massa del picco estratto inserendo gli ioni caratteristici della sequenza vaccina (figura 8.3), esso mostra un pattern di ioni multicarica tipico di una molecola peptidica, dal quale è possibile ottenere il corrispondente spettro ricostruito (figura 8.4). Quest'ultimo, mostrando il peso molecolare del peptide ed il suo pattern di frammentazione, ci ha permesso di identificare tale sequenza come  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) vaccina, in modo del tutto analogo a quanto fatto per la corrispondente sequenza ovina (vedere capitolo 6).

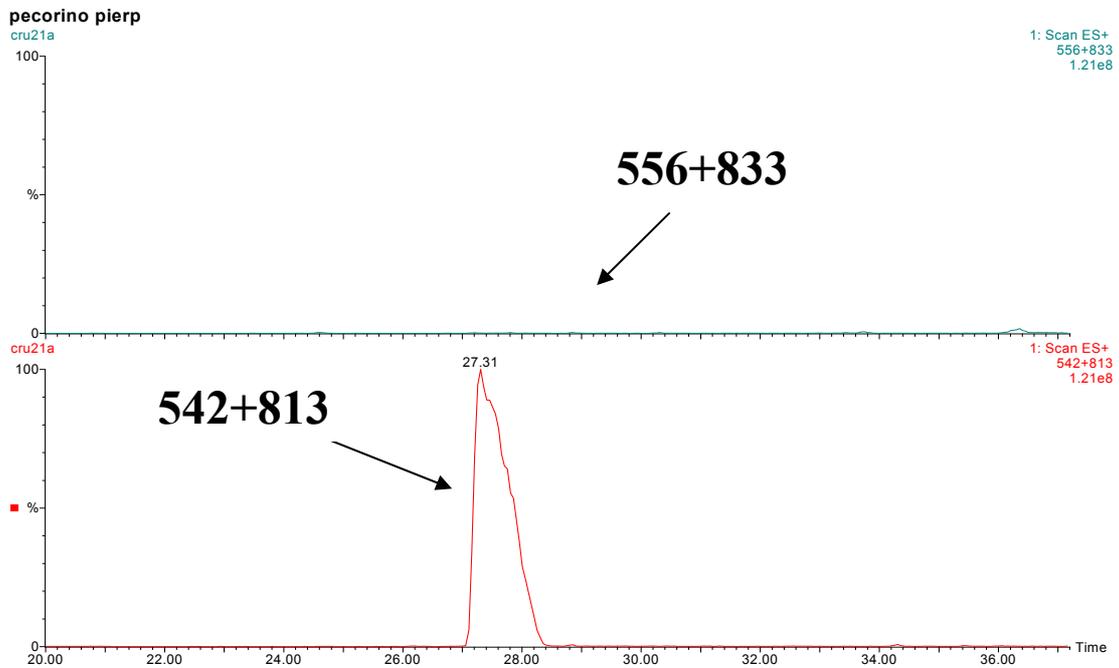


**Figura 8.3. Spettro di massa del picco estratto inserendo gli ioni caratteristici della sequenza vaccina**



**Figura 8.4. Spettro ricostruito del picco estratto inserendo gli ioni caratteristici della sequenza vaccina**

Si è successivamente verificata l'assenza del peptide vaccino nel campione a 21 giorni di stagionatura, prodotto con il 100% di latte ovino, estraendo in modo analogo dal suo cromatogramma gli ioni caratteristici relativi ai due peptidi (figura 8.5).



**Figura 8.5. Cromatogrammi XIC del campione CRU T21 ottenuti estraendo gli ioni caratteristici di  $\alpha_{S1}$ -CN (1-14) bovino e di  $\alpha_{S1}$ -CN (1-14) ovino**

Allo stesso modo abbiamo analizzato tutti i campioni, verificando l'assenza del peptide vaccino in tutti quelli prodotti da latte ovino al 100%. Per i campioni prodotti a partire da latte misto abbiamo calcolato la percentuale della sequenza bovina rispetto a quella ovina, applicando la seguente formula:

$$[\text{Area}_{\text{peptide vaccino}} / (\text{Area}_{\text{peptide vaccino}} + \text{Area}_{\text{peptide ovino}})] \times 100.$$

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 8.2.

**Tabella 8.2. Rapporto percentuale tra  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) bovino ed ovino**

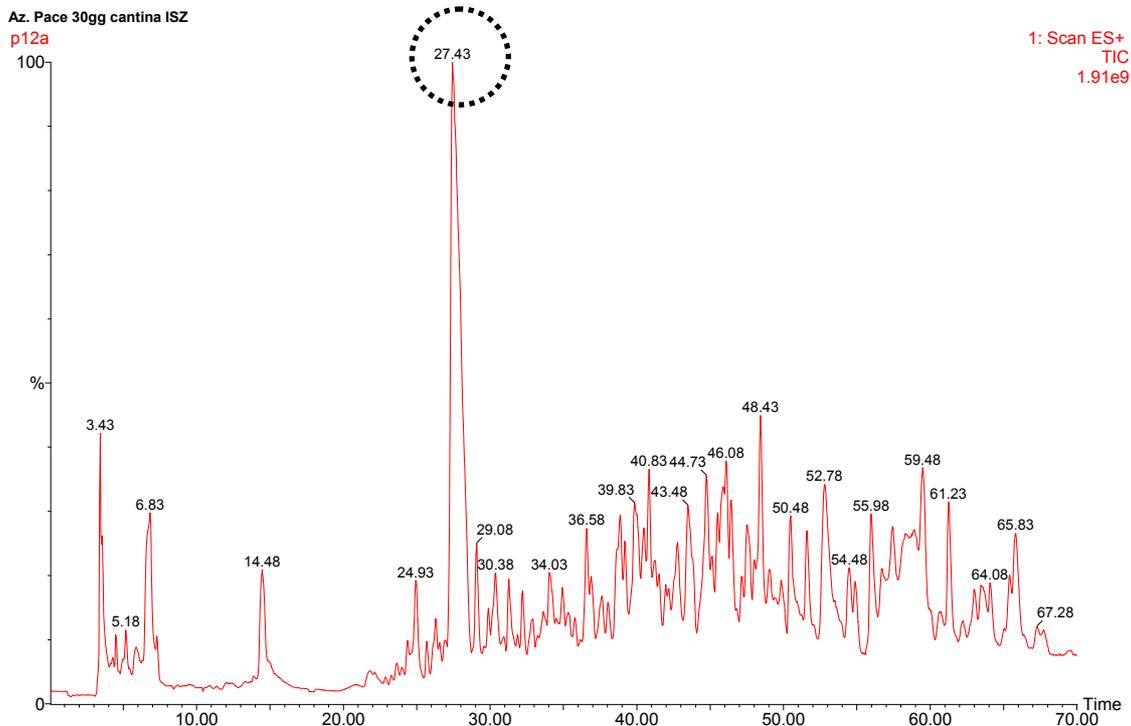
	T0 MIX	T13 MIX	T21 MIX
CRU	0	3,8	2,3
OMO	0	8,4	5,5
PAST	0	0	0

Dall'analisi di questi dati si può affermare che il peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) bovino si presta bene alla determinazione di eventuali aggiunte di latte bovino al 5%, ma solo per i campioni da latte crudo ed omogeneizzato, ed a tempi di stagionatura sufficientemente elevati. Inoltre il rapporto percentuale calcolato sembra essere abbastanza indicativo della percentuale di latte bovino utilizzato. Per i campioni a tempi di stagionatura inferiori ai tredici giorni tale rapporto non è calcolabile, questo probabilmente perché il peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) bovino, derivando dal 5% di latte vaccino, risulta rivelabile solo dopo un certo numero di giorni di stagionatura, quando si è formato in quantità sufficiente; tale ipotesi è confermata dal fatto che il corrispondente peptide ovino, derivante da un sito di taglio comune sulla caseina di pecora, presenta proprio un andamento di questo tipo (vedere capitolo 6). Per i campioni da latte pastorizzato, invece, l' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) bovino non risulta rivelabile a nessuno dei tempi di stagionatura considerati, il che potrebbe essere spiegato con una parziale inattivazione, dovuta al processo di pastorizzazione, dell'enzima in grado di generare il frammento 1-14, sia ovino che vaccino. La minor presenza di tali peptidi fa sì che la sequenza vaccina non possa essere utilizzata come marker di adulterazione nei campioni da latte pastorizzato con una percentuale di latte vaccino del 5%; tuttavia ciò non toglie che a percentuali di taglio superiori, commercialmente più significative, lo possa ridiventare.

I campioni analizzati rappresentano un sistema modello, e sono stati appositamente preparati in laboratorio utilizzando la percentuale di latte vaccino del 5%; inoltre, per la loro preparazione non è stato utilizzato alcuno starter microbico, in quanto si è preferito far sviluppare e moltiplicare in latte la flora microbica già presente (latto-innesto). Le colture naturali sono ancora molto usate nelle produzioni artigianali e per quelle più tipiche, tuttavia presentano lo svantaggio di essere poco costanti, motivo per cui a livello industriale si preferisce far uso delle più affidabili colture starter (latto-fermento). Si è quindi proceduto ad investigare la presenza dei suddetti peptidi in campioni commerciali di pecorino.

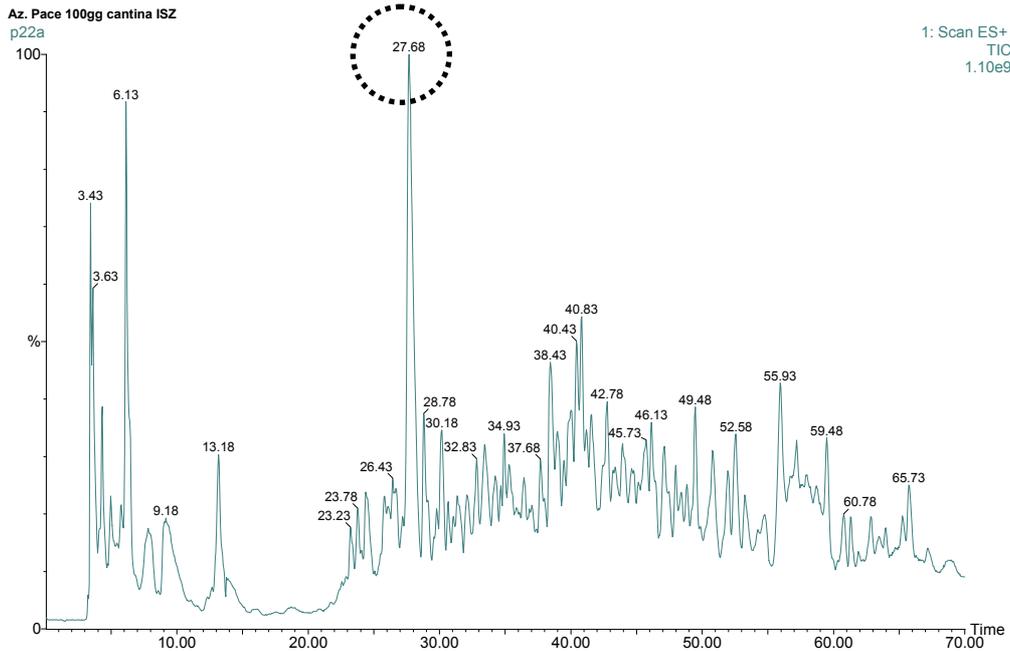
Sono stati analizzati alcuni campioni di Pecorino di Filiano (formaggio DOP) forniti dall'Università di Potenza e prodotti da solo latte ovino crudo; i campioni, a tempi di stagionatura compresi tra i 0 ed i 120 giorni, provengono da due ditte distinte, e sono stati fatti stagionare in tre ambienti diversi, una cella frigo mantenuta in condizioni controllate, una grotta in tufo a temperatura ed umidità controllate, ed una cantina artificiale. In figura

8.6 è riportato il cromatogramma in corrente ionica totale di un campione di Pecorino di Filiano a 30 giorni di stagionatura, stagionato in grotta:



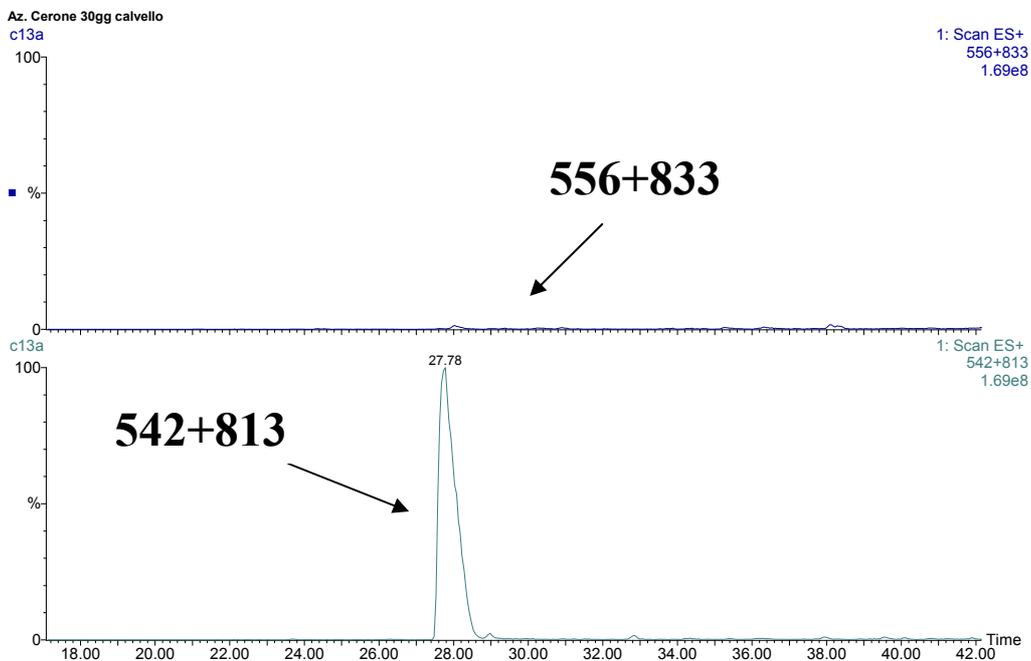
**Figura 8.6. Cromatogramma in corrente ionica totale di un campione di Pecorino di Filiano a 30 giorni di stagionatura**

Come si può osservare dal cromatogramma, il profilo oligopeptidico risulta molto simile a quello osservato per i campioni modello preparati presso i laboratori di Cesena, in particolare si può vedere come anche in questo caso il peptide maggiormente rappresentato (tempo di eluizione intorno ai 27 minuti) corrisponda proprio all' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) ovina, a dimostrazione della elevata verosimiglianza del modello da noi studiato. Inoltre, se si considera lo stesso formaggio a 100 giorni di stagionatura (figura 8.7), è evidente come la frazione oligopeptidica si mantenga piuttosto inalterata a tempi di stagionatura superiori, a conferma che il modello potrebbe essere applicato anche a formaggi più stagionati.



**Figura 8.7. Cromatogramma in corrente ionica totale di un campione di Pecorino di Filiano a 100 giorni di stagionatura**

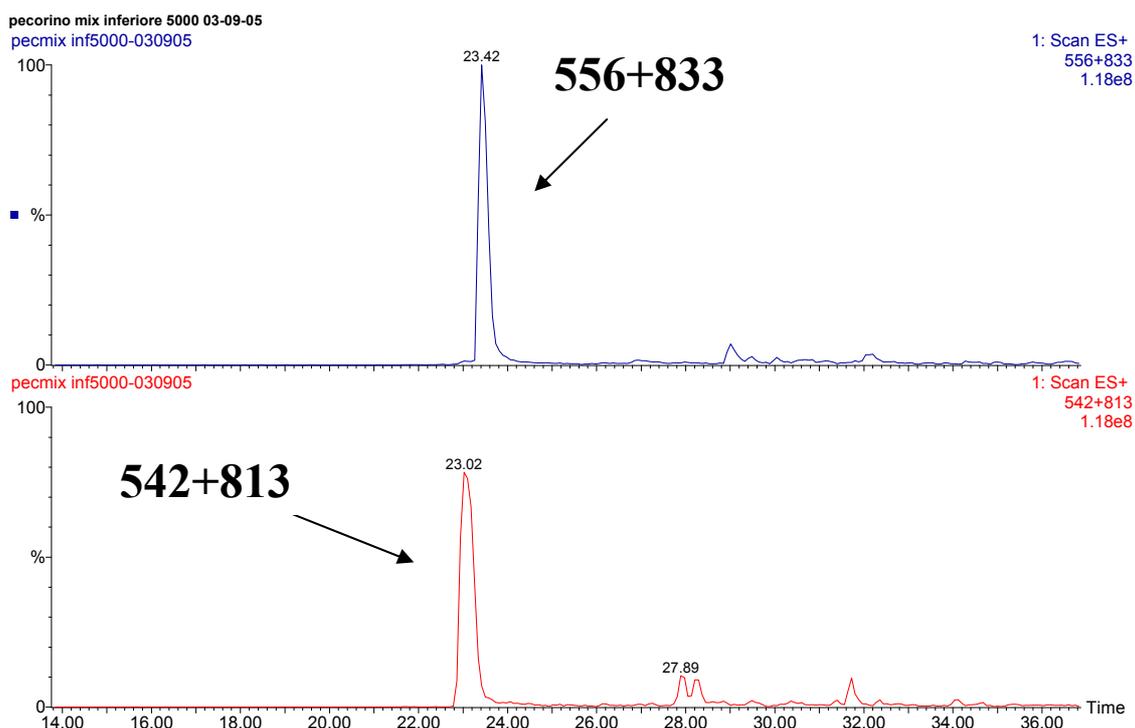
Per tutti i campioni analizzati abbiamo verificato l'assenza della sequenza vaccina; in figura 8.8 sono riportati, come esempio, i cromatogrammi XIC relativi ad  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) vaccino ed ovino di un campione stagionato 30 giorni nella cantina artificiale.



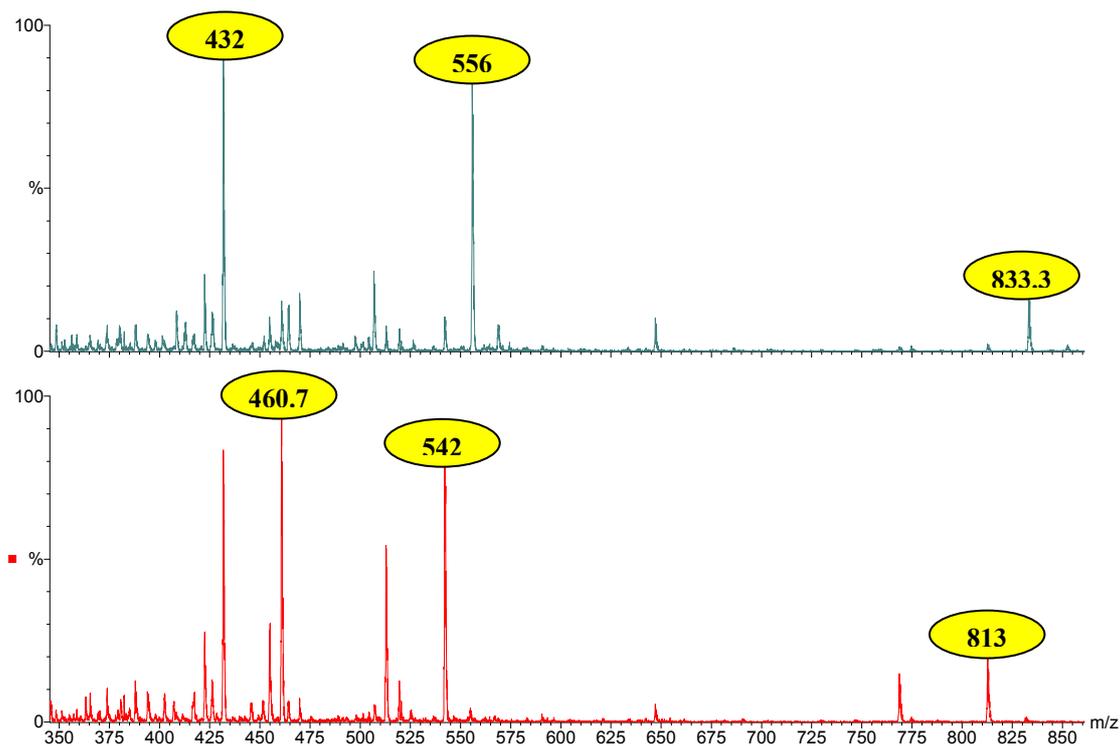
**Figura 8.8. Cromatogrammi XIC di un campione di Pecorino di Filiano (30 giorni) ottenuti estraendo gli ioni caratteristici di  $\alpha_{S1}$ -CN (1-14) bovino ed ovino**

In modo analogo si è investigata la presenza del marker in altri campioni commerciali. Particolarmente significativo è stato, in questo senso, un campione prodotto a partire da latte misto (dichiarato in etichetta). Dall'analisi degli XIC relativi alla sequenza vaccina ed ovina (figura 8.9) si osserva che i tempi di eluizione sono leggermente anticipati, intorno ai 23 minuti, e questo è dovuto all'utilizzo di acetonitrile da solo al posto della miscela acqua/acetonitrile 60:40, come secondo eluente per l'analisi HPLC-MS. Si può immediatamente osservare la compresenza dei due peptidi, confermati dall'analisi dei corrispondenti spettri di massa (figura 8.10).

Il formaggio in questione è stato prodotto a partire da latte pastorizzato, e questo avvalorava l'ipotesi che l'utilizzo della sequenza vaccina quale marker di adulterazione nel caso dei formaggi da latte pastorizzato non debba essere escluso, ma che semplicemente sia efficace nel caso di tagli percentualmente più sostenuti, peraltro quelli con un maggiore significato economico.



**Figura 8.9. Cromatogrammi XIC di un campione di pecorino commerciale da latte misto ottenuti estraendo gli ioni caratteristici di  $\alpha_{S1}$ -CN (1-14) bovino ed ovino**



**Figura 8.10. Confronto tra gli spettri di massa**

### **8.3 PARTE SPERIMENTALE**

Per la parte sperimentale, relativa ai materiali ed alla strumentazione utilizzata, all'estrazione della frazione peptidica, ai tagli molecolari, ed alle condizioni di analisi in HPLC-MS, si rimanda interamente a quella del capitolo 6.

La preparazione dei formaggi modello è stata eseguita come descritto nella parte "Risultati e discussione".

Per ogni tipologia di formaggio (da latte crudo, pastorizzato, ed omogeneizzato mediante alte pressioni) sono stati prelevati ed analizzati campioni relativi alle seguenti fasi di maturazione:

- 6 giorni
- 13 giorni
- 21 giorni

## 8.4 CONCLUSIONI

Dallo studio, mediante l'interfacciamento di HPLC a fase inversa con spettrometria di massa elettrospray, della frazione peptidica di formaggi modello tipo pecorino prodotti a partire da latte 95% ovino + 5% vaccino, e dal confronto con quella dei corrispondenti campioni prodotti con solo latte ovino, è stato possibile identificare un potenziale marker per la rivelazione di adulterazioni derivanti dal taglio di latte ovino con latte vaccino: il peptide  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) vaccino. Tale frammento permette di rivelare adulterazioni già al 5% di taglio ma solo per i campioni da latte crudo ed omogeneizzato; nel caso di formaggi da latte pastorizzato, il suo eventuale utilizzo si presta a valutare tagli di origine percentualmente più elevati.

Inoltre il rapporto percentuale calcolato tra tale peptide ed il corrispondente ovino sembra essere abbastanza indicativo della percentuale di latte bovino utilizzato per il taglio.

## 8.5 BIBLIOGRAFIA

---

<sup>1</sup> Veloso, A.C.A.; Teixeira, N.; Peres, A.M.; Mendonça, Á.; Ferreira, I. (2004) *Food Chem*, **87**, 289-295.

<sup>2</sup> Herrero-Martínez, J.M.; Simó-Alfonso, E.F.; Ramis-Ramos, G.; Gelfi, C.; Rigetti, P.G. (2000) *J Chromatogr A*, **878**, 261-271.

<sup>3</sup> Urbanke, W.; Luf, W.; Brandl, E. (1992) *Z Lebensm Unters Forsch*, **195**, 137-142.

<sup>4</sup> Cozzolino, R.; Passalacqua, S.; Salemi, S.; Garozzo, D. (2002) *J Mass Spectr*, **37**, 985-991.

<sup>5</sup> Bottero, M.T.; Civera, T.; Numerà, D.; Rosati, S.; Sacchi, P.; Turi, R.M. (2003) *Int Dairy J*, **13**, 277-282.

**B: STUDIO DELLA BIOATTIVITA' DI  
PEPTIDI NEGLI ALIMENTI**

## 9. Valutazione dell'attività di ACE-inibizione di peptidi naturalmente presenti nei formaggi

In questa parte del lavoro di tesi si è inteso valutare l'eventuale attività di ACE-inibizione di peptidi naturalmente presenti nei formaggi, sia come prodotto dei fenomeni proteolitici che avvengono a carico delle caseine, sia formati ex-novo in seguito ad attività enzimatica; per tale fine, si è ricorso ad un test spettrofotometrico riportato in letteratura<sup>1</sup>, che, opportunamente ottimizzato, ci potrà consentire uno screening ad ampio raggio sia di estratti di formaggi, che di peptidi singoli particolarmente abbondanti nei formaggi stessi.

### 9.1 RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 9.1.1 Controllo della validità del test spettrofotometrico per la determinazione dell'attività ACE-inibitrice

Sono noti in letteratura diversi test *in vitro* per valutare l'attività ACE-inibitrice di un determinato composto; questi ultimi, essi, per quanto per nulla indicativi di eventuali problemi legati alla farmacocinetica della molecola, hanno l'innegabile vantaggio di essere estremamente rapidi, e come tali sono da considerarsi molto validi quali test di tipo preliminare.

Un metodo spettrofotometrico largamente usato, messo a punto da Holmquist et al.<sup>1</sup>, si basa sulla idrolisi del substrato specifico N-[3-(2-furil)acriloil]-L-fenilalanilglicilglicina (FAPGG) a N-[3-(2-furil)acriloil]-L-fenilalanina (FAP) e glicilglicina (GG), ad opera dell'angiotensin-converting enzyme (ACE).

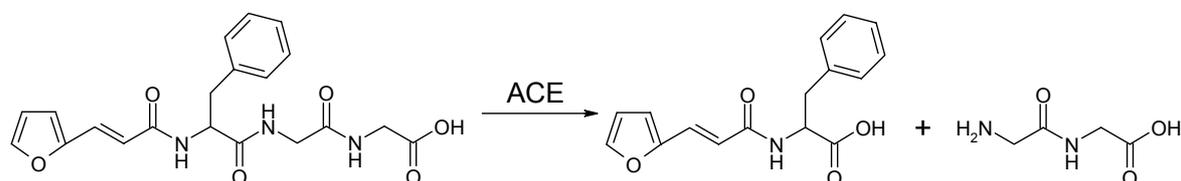


Figura 9.1. Schema di reazione del test di ACE-inibizione

La reazione viene monitorata per via spettrofotometrica a 340nm, e quello che si osserva è la riduzione di assorbanza via via che il FAPGG viene degradato.

Test precedenti condotti utilizzando l'enzima puro liofilizzato hanno dato esiti negativi, probabilmente per problemi di elevata deperibilità dell'enzima stesso; tale inconveniente è stato risolto utilizzando un reagente, il rabbit lung acetone extract (estratto in acetone di polmone di coniglio) che, sospeso in un opportuno tampone (300mM NaCl, 50mM Tris, pH 8) e centrifugato a 12000 rpm per 3 ore, fornisce un surnatante rosso vinoso dotato di elevata attività ACE ed elastasica. Un lavoro presente in letteratura (Vermeirssen et al.<sup>2</sup>) ha dimostrato la validità dell'utilizzo di tale surnatante nella conduzione del test spettrofotometrico, in quanto l'attività elastasica non influenza minimamente i livelli di FAPGG; l'unico inconveniente è rappresentato dal fatto che l'attività dell'ACE varia sensibilmente ogni volta che viene preparato il reagente, per cui è necessario effettuare un bianco per ogni nuova preparazione dell'enzima, e confrontare i risultati del test per i vari campioni con quelli del bianco corrispondente.

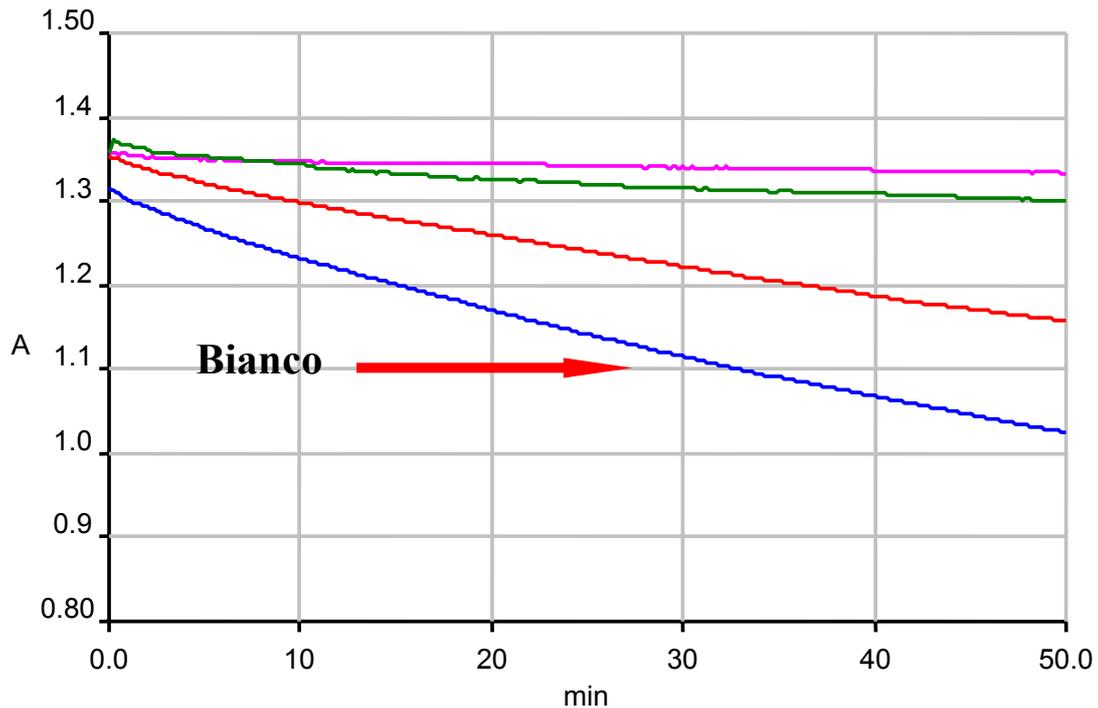
Per l'esecuzione del test spettrofotometrico è necessario operare a pH 8 ed a una temperatura di 37°C, in modo da portarsi nelle condizioni di *optimum* per l'attività enzimatica; inoltre si utilizza un eccesso di FAPGG, in modo che la sua concentrazione non rappresenti un fattore limitante. La percentuale di inibizione enzimatica è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$ACE_{\text{inibizione \%}} = [1 - (\Delta A_{\text{inibitore}} / \Delta A_{\text{bianco}})] \times 100$$

dove  $\Delta A_{\text{inibitore}}$  è l'assorbanza misurata a 10 min meno quella misurata a 40 min in presenza del campione, mentre  $\Delta A_{\text{bianco}}$  è la stessa differenza misurata in assenza del campione (bianco).

Inizialmente, il metodo è stato validato determinando la curva di inibizione dell'Enalaprilato<sup>®</sup>, la forma bioattiva dell'Enalapril<sup>®</sup> (estere etilico del primo), uno dei più potenti ACE-inibitori attualmente in commercio; poiché l'Enalaprilato<sup>®</sup> come tale non è disponibile commercialmente, si è dovuto procedere all'idrolisi della funzione esterea dell'Enalapril<sup>®</sup>, utilizzando NaOH 1N a riflusso per 2 ore, in modo da ottenere quantità sufficienti della forma bioattiva.

Su quest'ultima è stato condotto il test spettrofotometrico; in figura 9.2 è possibile osservare l'andamento del test spettrofotometrico a concentrazioni via via crescenti di inibitore.

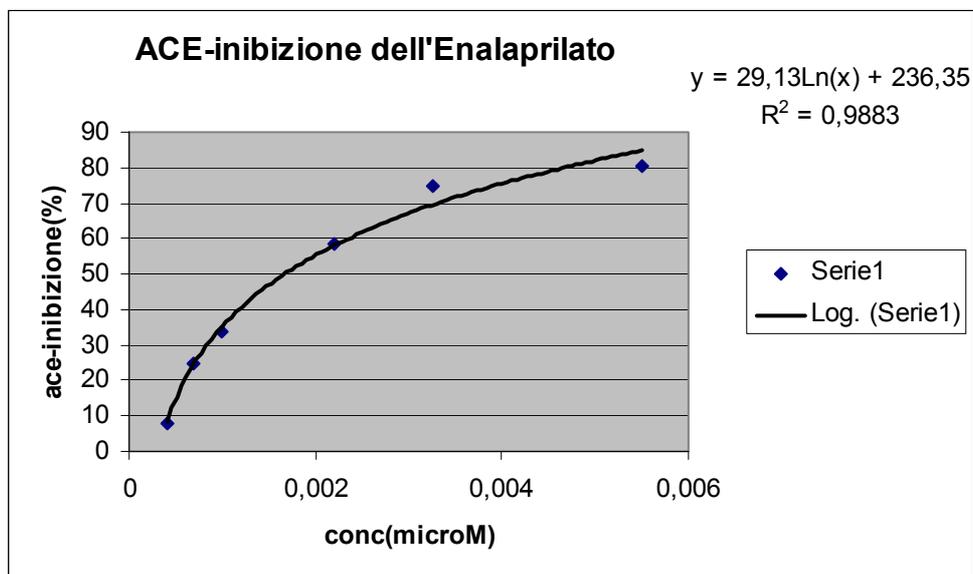


**Figura 9.2. Andamento del test spettrofotometrico a concentrazioni crescenti di inibitore.**

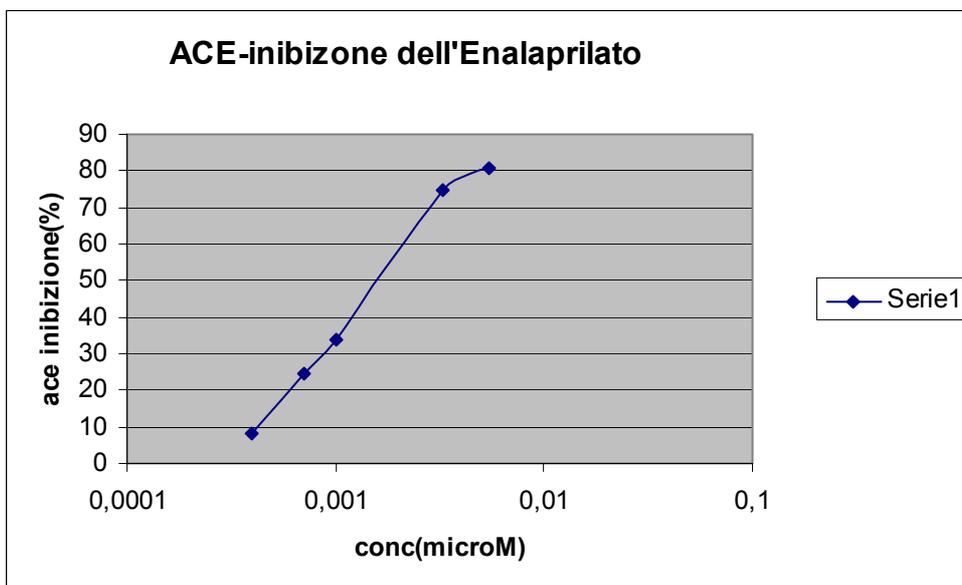
Il test sull'Enalaprilato<sup>®</sup> è stato eseguito a 6 diverse concentrazioni (0,4nM; 0,7nM; 1nM; 2,2nM; 3,25nM; 5,5nM); in questo modo è stato possibile costruire una curva di inibizione per tale molecola, mostrata in figura 9.3 insieme alla corrispondente curva semilogaritmica. Da tali curve è possibile desumere un valore di  $IC_{50}$  di 1,6nM, molto vicino a quello riportato in letteratura<sup>2</sup>, a conferma che si tratta di un metodo valido ed affidabile.

Come già riportato nell'introduzione (capitolo 2), molti peptidi derivanti dall'idrolisi enzimatica delle caseine mostrano una discreta attività di tipo ACE-inibitrice; per cui, avendo a disposizione un test spettrofotometrico estremamente rapido e di facile esecuzione, ci è sembrato logico applicarlo ad una serie di peptidi presenti naturalmente nei formaggi, nonché alle stesse frazioni oligopeptidiche preparate con il metodo dei tagli molecolari descritto nei capitoli precedenti.

(A)



(B)

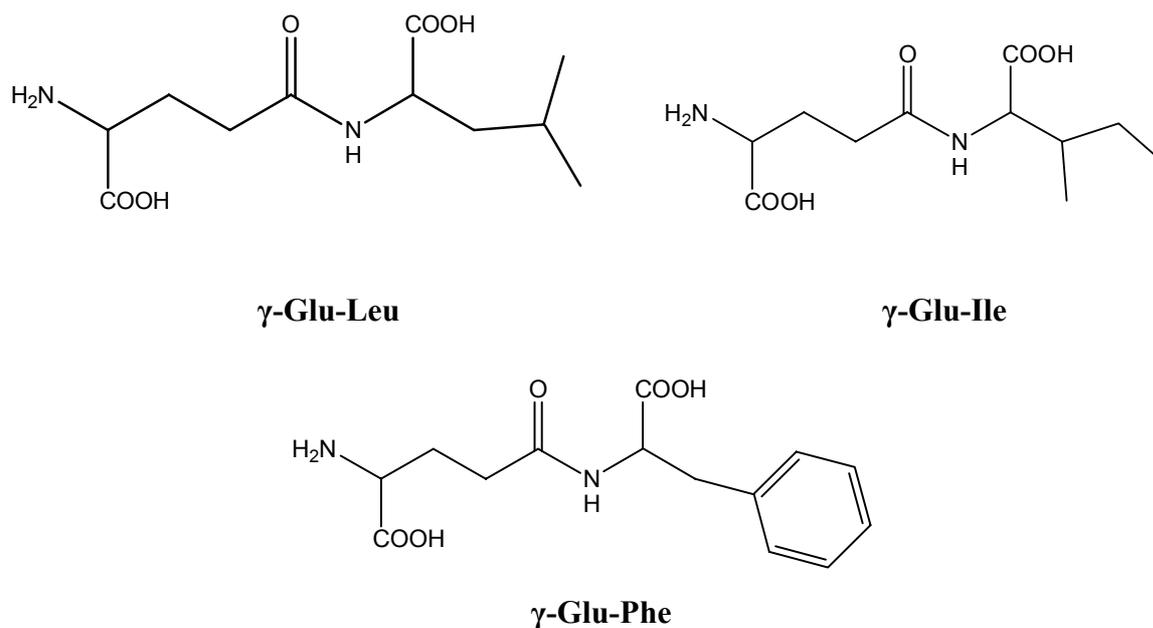


**Figura 9.3. Curva di inibizione dell'Enalaprilato (A)  
e corrispondente curva semilogaritmica (B)**

## 9.1.2 Valutazione dell'attività ACE-inibitrice

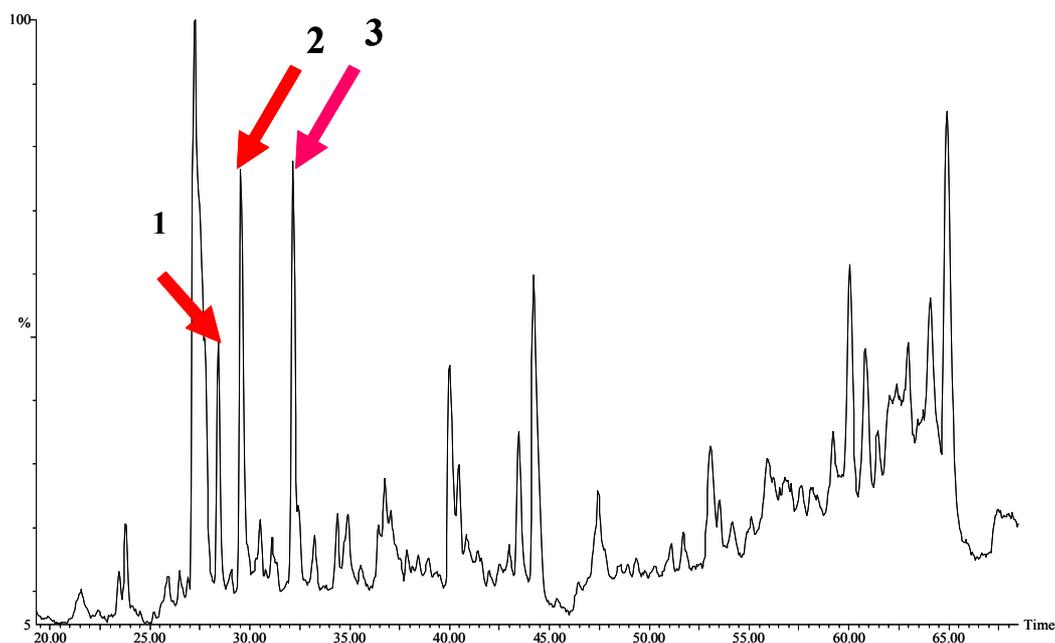
### 9.1.2.1 $\gamma$ -glutamil dipeptidi

I primi composti che si è deciso di testare sono i tre  $\gamma$ -glutamil dipeptidi  $\gamma$ -Glu-Leu,  $\gamma$ -Glu-Ile, e  $\gamma$ -Glu-Phe (figura 9.4), identificati precedentemente nel Parmigiano Reggiano, nel Grana Padano, e nel Prosciutto Crudo di Parma<sup>3</sup>.



**Figura 9.4. Strutture dei tre  $\gamma$ -glutamil dipeptidi identificati nel Grana Padano, nel Parmigiano Reggiano, e nel Prosciutto Crudo di Parma**

In figura 9.5 è mostrato un cromatogramma in corrente ionica totale della frazione oligopeptidica di un campione di Parmigiano Reggiano stagionato 24 mesi, in cui è possibile vedere i picchi corrispondenti ai tre  $\gamma$ -glutamil dipeptidi.

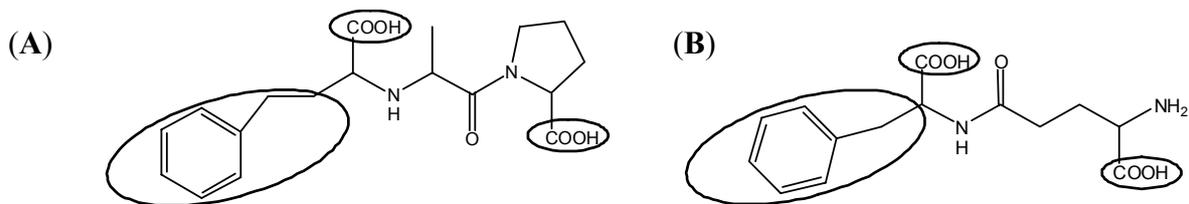


**Figura 9.5. Cromatogramma in corrente ionica totale di un campione di Parmigiano Reggiano a 24 mesi di stagionatura (1  $\gamma$ -Glu-Ile; 2  $\gamma$ -Glu-Leu; 3  $\gamma$ -Glu-Phe)**

Inizialmente, sulla base del loro peso molecolare e dall'analisi del loro pattern di frammentazione all'elettrospray, si supponeva che fossero semplicemente i tre dipeptidi Glu-Leu, Glu-Ile, e Glu-Phe. Si è quindi proceduto a sintetizzare tutte e sei le molecole (i tre  $\gamma$ -glutamil dipeptidi ed i corrispondenti derivati con legame  $\alpha$ -peptidico), e, dal loro utilizzo quali standard, è stato possibile confermare che si tratta di  $\gamma$ -glutamil dipeptidi (dati non mostrati)<sup>3</sup>.

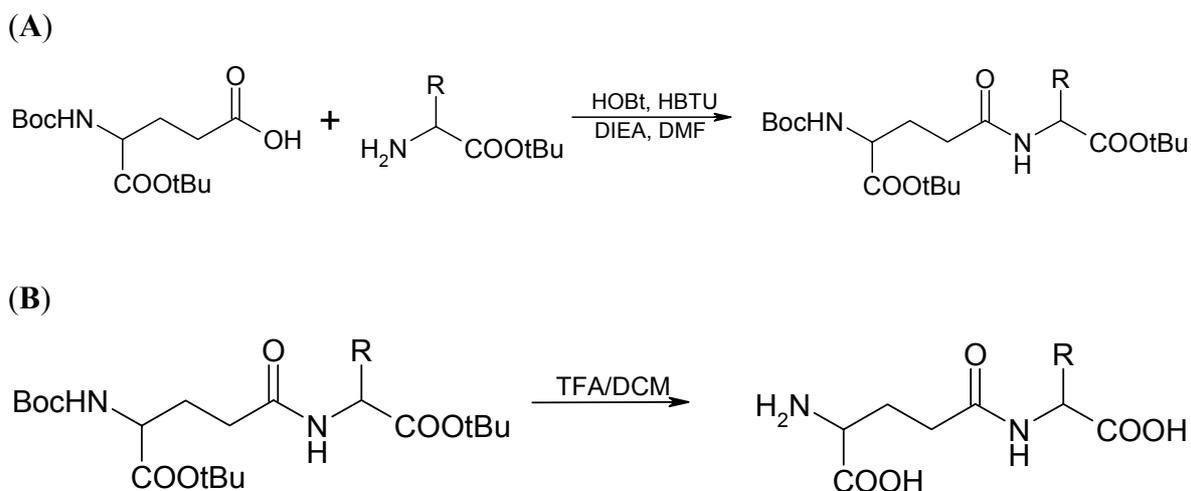
Essendo tali dipeptidi caratterizzati da un legame ammidico tra il gruppo  $\gamma$ -carbossilico dell'acido glutammico, ed il gruppo  $\alpha$ -amminico del secondo ammino acido, si può escludere l'origine proteolitica, in quanto questo tipo di legame non è naturalmente presente nelle catene proteiche. Esiste però un enzima, la  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidasi, praticamente ubiquitario negli organismi viventi, che è in grado di catalizzare la formazione di tale legame<sup>4</sup>. L'attività enzimatica  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasica presente nei formaggi (osservata sperimentalmente<sup>3</sup>) produce questi peptidi durante la stagionatura: non essendo  $\alpha$ -peptidi, sono più resistenti alla degradazione e tendono quindi ad accumularsi, fungendo da marker della stagionatura stessa.

Tali interessanti scoperte ci hanno spinto a valutare l'eventuale attività biologica dei  $\gamma$ -glutamil dipeptidi; in particolare si è notata una certa somiglianza tra la  $\gamma$ -glutamil-fenilalanina e l'enalapril, come mostrato in figura 9.6.



**Figura 9.6. Confronto tra l'Enalaprilato (A) e  $\gamma$ -Glu-Phe (B)**

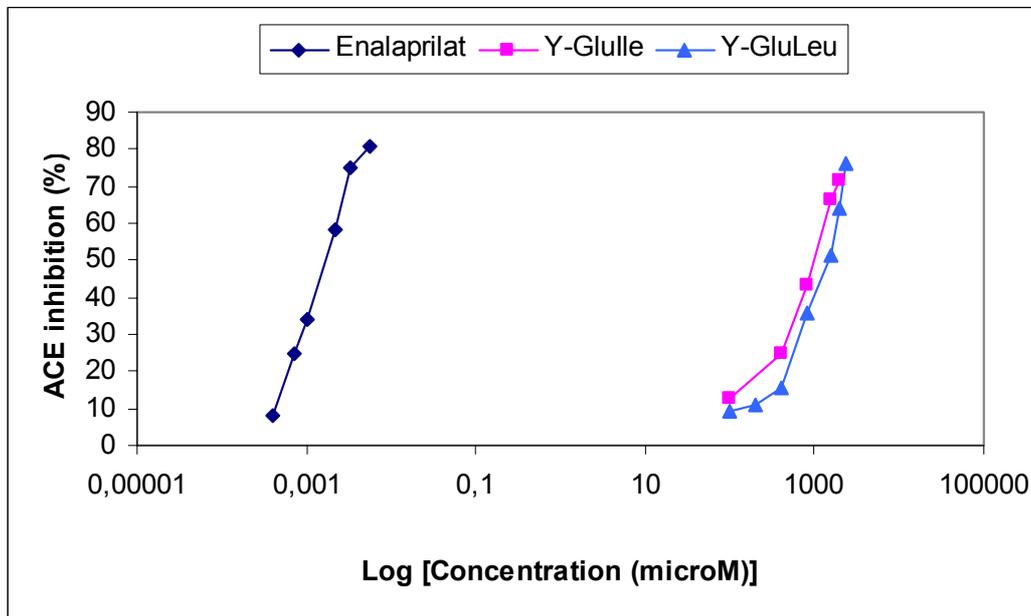
Si è proceduto, quindi, alla sintesi in soluzione dei dipeptidi, secondo lo schema di reazione riportato in figura 9.7 (vedere parte sperimentale).



**Figura 9.7. Schema di reazione dei  $\gamma$ -glutamil dipeptidi: coupling (A) e rimozione dei gruppi protettori (B)**

Una volta ottenuto i tre composti con un sufficiente grado di purezza (>95%), sono stati sottoposti al test spettrofotometrico a diverse concentrazioni;  $\gamma$ -Glu-Leu e  $\gamma$ -Glu-Ile hanno mostrato una attività ACE-inibitrice dose dipendente, ma in misura decisamente minore rispetto all'Enalaprilato, con valori di  $IC_{50}$  di 1,6mM e 1,1mM rispettivamente (figura 9.8). Tali valori, confrontati con quelli di altri peptidi riportati in letteratura come dotati di

attività ACE-inibitrice sono rappresentativi di una scarsissima capacità di inibizione enzimatica; inoltre, a concentrazioni così elevate, non è da escludere un'azione di tipo aspecifico.



**Figura 9.8. Confronto tra  $\gamma$ -Glu-Leu (blu),  $\gamma$ -Glu-Ile (viola) ed Enalaprilato (nero).**

La  $\gamma$ -Glu-Phe è il composto che ha mostrato la più debole attività in assoluto, con un'inibizione del 28% a concentrazioni molto elevate (2mM); per cui è assolutamente da escludere un'attività di questo tipo. Molto probabilmente l'inserimento di un gruppo fortemente ingombrato come il fenile al posto di una catena alchilica flessibile, fa decadere completamente la blanda attività mostrata dai derivati con la leucina e l'isoleucina.

Da questi risultati possiamo escludere la possibilità che l'assunzione dei  $\gamma$ -glutamili dipeptidi attraverso i formaggi o il prosciutto possa avere l'effetto di abbassare la pressione sanguigna, soprattutto se si tiene conto dell'elevato contenuto in sale di tali alimenti, che sono assolutamente da evitare nella dieta di una persona ipertesa.

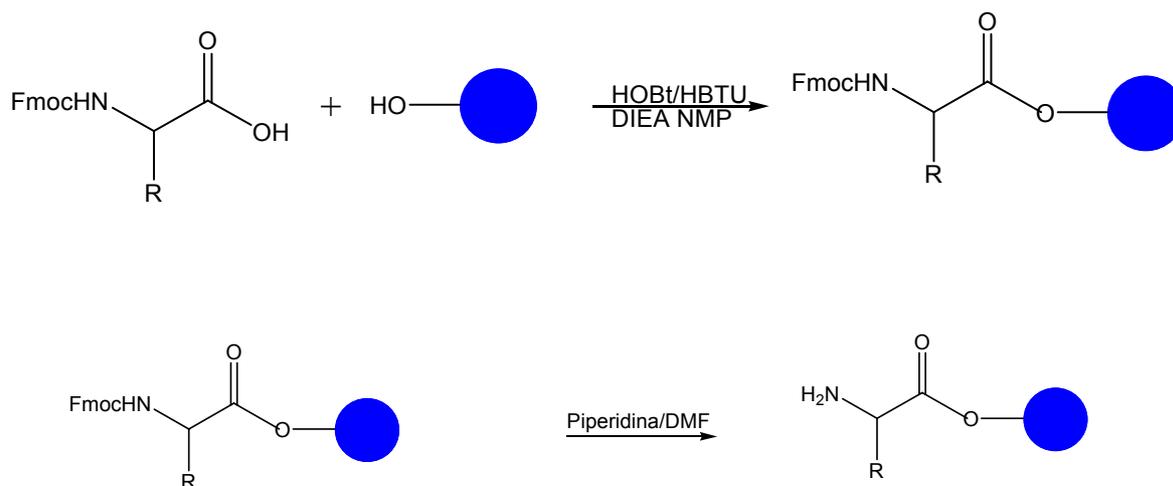
### 9.1.2.2 Peptide $\beta$ -CN (f193-209) vaccino

In letteratura è riportato che la sequenza 193-202 della  $\beta$ -caseina vaccina ( $\beta$ -casochinina-10) possiede una discreta attività di tipo ACE-inibitrice, con un valore di  $IC_{50}$  di  $300\mu M^5$ , ed una non chiara attività immunomodulante, in quanto a seconda della concentrazione è in grado di stimolare o sopprimere la proliferazione dei linfociti murini<sup>6</sup>.

La  $\beta$ -casochinina-10 non è naturalmente presente nei formaggi, che invece contengono quantità consistenti del frammento 193-209, corrispondente alla sequenza C-terminale della  $\beta$ -caseina vaccina, e derivante dall'azione della chimosina a livello del legame Leu192-Tyr193; tale peptide differisce dal primo per la presenza di una sequenza aggiuntiva (202-209) che contribuisce in modo decisivo all'attività immunostimolante, in quanto  $\beta$ -CN(f193-209) è noto in letteratura per la sua capacità di stimolare la proliferazione linfocitaria, oltre che per le sue spiccate proprietà antimicrobiche<sup>7</sup>.

Sulla base di questi presupposti si è voluto vedere se la presenza della sequenza aggiuntiva è in grado di influenzare in modo positivo anche l'attività di ACE-inibizione.

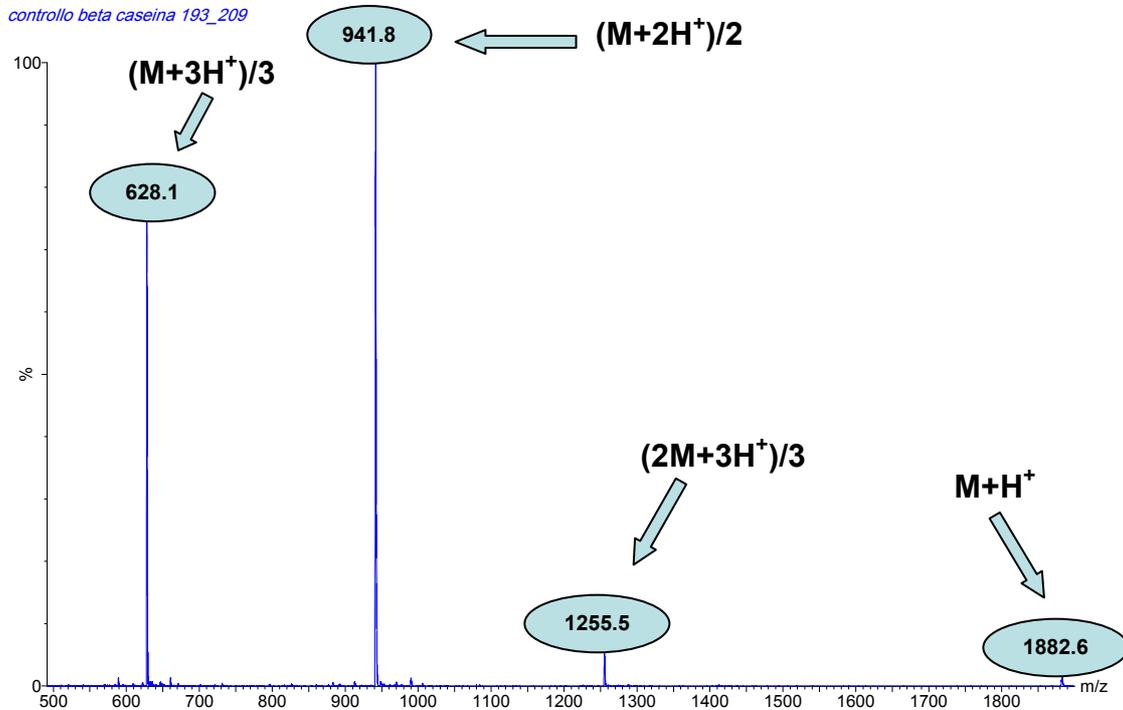
In modo analogo a quanto visto per i  $\gamma$ -glutamildipeptidi, si è proceduto alla sintesi del frammento 193-209, di sequenza YQEPVLGPVRGPFPIIV, seguendo una strategia sintetica in fase solida via Fmoc, con protezione in catena laterale di tipo ortogonale; lo schema generale di sintesi è riportato in figura 9.9 (vedere parte sperimentale).



**Figura 9.9. Schema generale di sintesi peptidica in fase solida con strategia Fmoc**

Vista la presenza di un elevato numero di residui di prolina, che inducono un ripiegamento di tipo  $\beta$ -turn nella catena peptidica, e di numerosi residui particolarmente ingombrati, si è optato per eseguire diversi doppi coupling. Ultimata la sintesi, si è proceduto alla fase di distacco del peptide dalla resina e contemporanea rimozione dei gruppi protettori in catena laterale utilizzando l'acido trifluoroacetico (TFA), con opportune quantità di scavengers quali m-cresolo e tioanisolo. Successivamente si è purificato il peptide mediante RP-HPLC

preparativo, e la purezza del prodotto è stata verificata mediante RP-HPLC/MS (>95%); in figura 9.10 è mostrato lo spettro di massa relativo alla sequenza sintetizzata (PM 1881), in cui è possibile osservare la presenza del doppio e triplo caricato quali ioni caratteristici.



**Figura 9.10. Spettro di massa del peptide  $\beta$ -CN (f193-209)**

Una volta ottenuto il peptide di interesse, si è proceduto all'esecuzione del test spettrofotometrico, utilizzando concentrazioni crescenti della molecola; tuttavia, a concentrazione di  $300\mu\text{M}$ , pari al valore di  $\text{IC}_{50}$  della  $\beta$ -casochinina-10, preso come riferimento, l'attività ACE-inibitrice è risultata essere nulla.

Il peptide da noi sintetizzato contiene la sequenza 193-202, che come detto possiede la capacità di inibire l'ACE, tuttavia questo non è sufficiente perché a sua volta conservi un'attività di questo tipo: è sufficiente la presenza di una sequenza aggiuntiva (203-209) perché l'attività cali drasticamente, probabilmente per un effetto di aumento dell'ingombro sterico che va ad interferire nell'interazione con il sito attivo dell'enzima.

### 9.1.2.3 Frazioni oligopeptiche di Parmigiano Reggiano

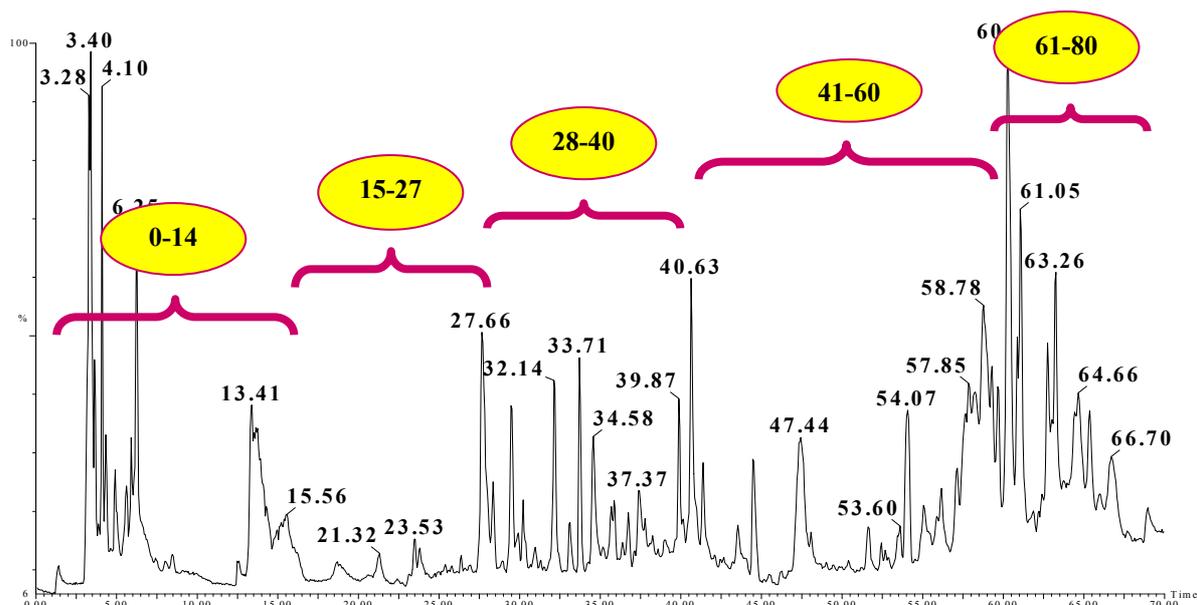
Visto che i risultati ottenuti con i  $\gamma$ -glutamil dipeptidi e con  $\beta$ -CN (f193-209), appositamente sintetizzati, non si sono rivelati entusiasmanti, abbiamo ritenuto non produttivo applicare tale strategia ad ogni singolo peptide di un estratto di formaggio.

Invece, la strategia più logica appare quella di sottoporre al test enzimatico non più singole molecole, ma miscele di peptidi, ad esempio la frazione oligopeptidica di un formaggio, opportunamente frazionata mediante RP-HPLC preparativo; la scelta è ricaduta sulla frazione oligopeptidica di un formaggio stagionato quale il Parmigiano Reggiano, già studiata in precedenza<sup>8</sup>.

E' stato utilizzato un campione di Parmigiano Reggiano a 12 mesi di stagionatura, da cui si è estratta la frazione oligopeptidica con il metodo dei tagli molecolari messo a punto nei nostri laboratori e riportato nei capitoli precedenti<sup>9</sup>; successivamente si è proceduto al frazionamento dell'estratto mediante RP-HPLC preparativo, in modo da ottenere frazioni a minore complessità (il gradiente di eluizione è lo stesso di quello usato per l'analisi in HPLC-ESI-MS degli estratti di formaggio; vedere capitolo 6). Le frazioni raccolte in base ai tempi di ritenzione sono le seguenti:

1. 0-14 min (85% in peso dell'estratto, principalmente ammino acidi);
2. 15-27 min (5%, ammino acidi idrofobici e piccoli peptidi);
3. 28-40 min (2,5%, piccoli peptidi apolari);
4. 41-60 min (2,5%, peptidi di peso molecolare intermedio);
5. 61-80' (5%, peptidi idrofobici di grosso peso molecolare)

In figura 9.11 è riportato il cromatogramma in corrente ionica totale della frazione peptidica di Parmigiano, con il frazionamento effettuato; ovviamente si tratta solo di una schematizzazione, in quanto nel passare da una colonna analitica ad una preparativa i tempi di ritenzione dei singoli peptidi possono variare notevolmente, per cui sarà necessario caratterizzare successivamente le singole frazioni mediante HPLC-MS, per valutarne l'effettiva composizione.



**Figura 9.11. Frazionamento della frazione oligopeptidica del Parmigiano Reggiano**

Si è quindi proceduto all'esecuzione del test spettrofotometrico sulle singole frazioni, alle concentrazioni di 1mg/100ml, 1mg/10ml, e 1mg/ml; per quest'ultima concentrazione si è osservato un fenomeno di intorbidimento nel caso delle frazioni 41-60 e 61-80, dovuto probabilmente a precipitazione dei peptidi di grosso peso molecolare ed a elevata idrofobicità. Poiché l'intorbidimento interferiva con l'esecuzione del test, si è deciso di effettuare la misurazione a concentrazioni inferiori (1mg/5ml e 1mg/2,5ml), alle quali non si è osservata precipitazione.

**Tabella 9.1. Concentrazioni utilizzate per l'esecuzione del test spettrofotometrico**

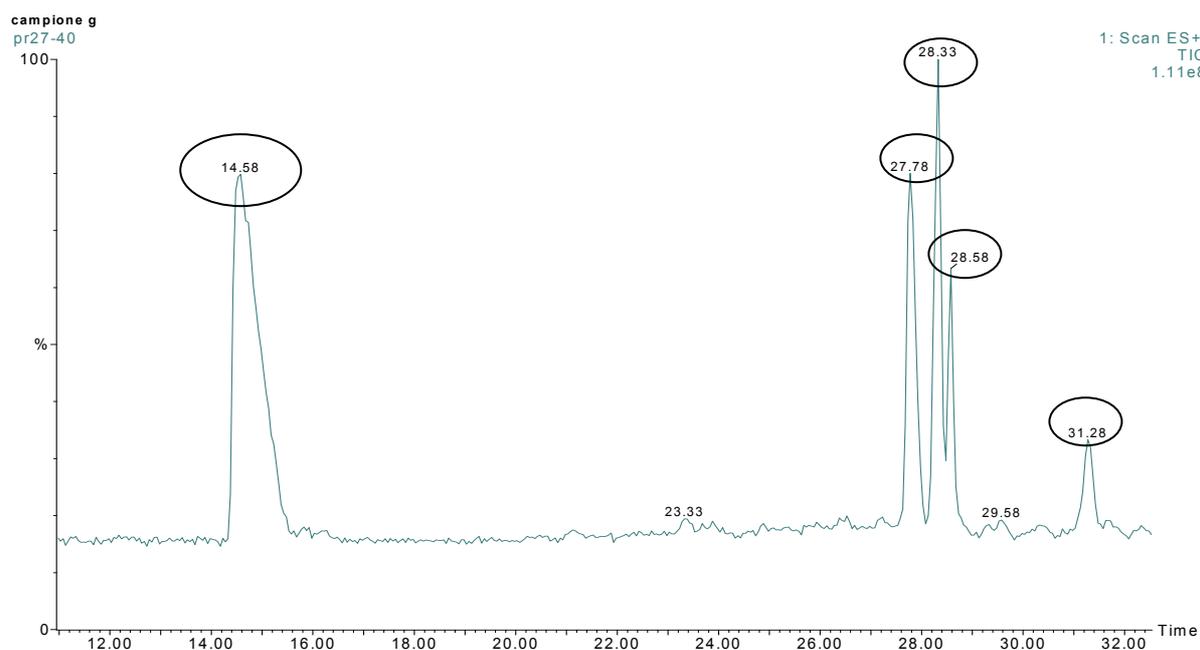
frazione (min)	1mg/100ml	1mg/10ml	1mg/5ml	1mg/2,5ml	1mg/ml
0-14	-	-	n.f.	n.f.	-
15-27	-	-	n.f.	n.f.	-
28-40	-	-	n.f.	n.f.	<b>11%</b>
41-60	-	-	-	-	pr.
61-80	-	-	-	40%	pr.

n.f.=non fatto; pr.=si osserva precipitazione

Solo le frazioni a 28-40 min e 61-80 min hanno mostrato una significativa percentuale di inibizione, e comunque a concentrazioni elevate; inoltre, nel caso della frazione a 61-80

min, alla concentrazione di 1mg/2,5ml si è osservato un leggero intorbidimento, che potrebbe aver inficiato le misure (risultato poco riproducibile).

Si è comunque proceduto a caratterizzare tali frazioni mediante HPLC-ESI-MS; le condizioni di analisi sono le stesse di quelle utilizzate per l'estratto totale di formaggio (vedere parte sperimentale). In figura 9.12 è riportato il TIC corrispondente alla frazione a 27-40 min.



**Figura 9.12. Cromatogramma in corrente ionica totale della frazione a 27-40 min**

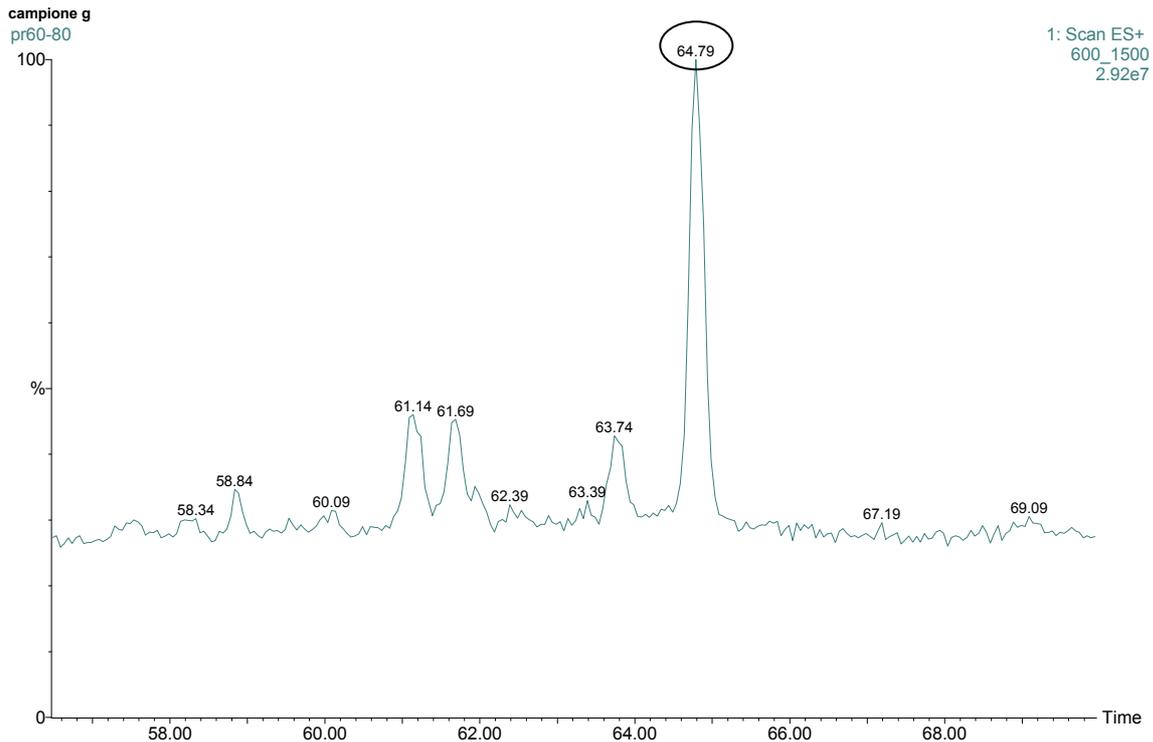
Si è proceduto all'identificazione dei singoli picchi (tabella 9.2):

**Tabella 9.2. Peptidi identificati nella frazione 27-40**

Tempo di ritenzione (min)	PM (Da)	Identificazione
14,58	165	fenilalanina
27,78	204	triptofano
28,33	226+260	$\gamma$ -Glu-Ile (PM260)+molecola incognita
28,58	260	$\gamma$ -Glu-Leu
31,28	294	$\gamma$ -Glu-Phe

A parte la presenza dei due amminoacidi fenilalanina e triptofano, a conferma della forte variazione nei tempi di ritenzione che si osserva nel passare da una colonna preparativa ad una analitica, la frazione considerata è caratterizzata principalmente dalla presenza dei tre  $\gamma$ -glutamil dipeptidi, il che spiegherebbe la bassa percentuale di inibizione enzimatica osservata (11%).

La cosa che più stupisce deriva dall'analisi della frazione a 61-80 min (figura 9.13):



**Figura 9.13. Cromatogramma in corrente ionica totale della frazione a 61-80 min**

Dal cromatogramma si evince la presenza quasi esclusiva del peptide  $\beta$ -CN (f193-209) (cerchiato in figura), che abbiamo precedentemente dimostrato essere privo di una significativa attività ACE-inibitrice; questo avvalorerebbe l'ipotesi che il risultato osservato (40%) sia più dovuto ad un artificio strumentale, o che possa essere imputabile alla presenza, anche se in minore quantità, di un peptide con una spiccata attività ACE-inibitrice.

Il frazionamento cromatografico, accoppiato ad una buona caratterizzazione delle frazioni, rimane comunque la via migliore per arrivare ad identificare molecole bioattive in miscele di una certa complessità; in questo caso, il metodo, applicato ad un'estratto oligopeptidico non particolarmente complesso, quale è quello di Parmigiano Reggiano, ha confermato la

blanda attività ACE-inibitrice mostrata dai  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi; sarebbe interessante procedere alla sua applicazione ad estratti dei formaggi visti nei capitoli 6 e 7 (pecorino e caciotta), che sono molto ricchi in peptidi a basso peso molecolare.

## 9.2 PARTE SPERIMENTALE

### 9.2.1 Reagenti

- N<sup>α</sup>-Boc-L-Glu-OtBu (Novabiochem)
- HBTU (Novabiochem)
- HOBt (Aldrich)
- Diisopropietilammina (Aldrich)
- L-Phe-OtBu (Novabiochem)
- L-Leu-OtBu (Novabiochem)
- L-Ile-OtBu (Novabiochem)
- Diclorometano (Carlo Erba)
- Dimetilformammide (Carlo Erba)
- m-Cresolo (Fluka)
- Tioanisolo (Fluka)
- KHSO<sub>4</sub> (Aldrich)
- NaHCO<sub>3</sub> (Aldrich)
- NaCl (Baker)
- Acido trifluoroacetico 99% (Aldrich)
- Fmoc-Val-Wang (Fluka)
- Tutti gli ammino acidi protetti usati per la sintesi in fase solida sono stati forniti dalla Novabiochem, eccetto Fmoc-Gln(Trt)-OH e Fmoc-Arg(Pbf)-OH (Fluka)
- Rabbit lung acetone powder (Sigma-Aldrich)
- Tris (Aldrich)
- FAPGG (Fluka)
- Enalapril<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich)
- Acido cloridrico 0,1 N (ottenuto con fiala Normex; il contenuto viene portato al volume di 1000 ml con H<sub>2</sub>O bidistillata)
- Fenilalanilfenilalanina (Sigma)
- Etere etilico (Riedel de Haën)

- Acetonitrile per HPLC (Carlo Erba)
- Acido formico puro 99% (Acros)
- Acqua bidistillata ottenuta con il sistema Millipore Alpha Q

### 9.2.2 Strumentazione

- L'omogeneizzatore usato è l'ULTRATURRAX T25 basic IKA.
- I filtri per ultrafiltrazione sono AMICON ULTRAFILTERS YM10 (per il cut-off a 10000 Da) e AMICON ULTRAFILTERS YM3 (per il cut-off a 3000 Da). Questi filtri sono montati sugli appositi kit per ultrafiltrazione AMICON MICROPARTITION SYSTEM MPS-1.
- Le centrifughe utilizzate sono ALC CENTRIFUGETTE 4206 (a 5000 rpm per i kit di ultrafiltrazione) e ALC 4237R termostata (utilizzata per l'estrazione della frazione peptidica a 5000 rpm a 5°C).
- Per la filtrazione a 0,45  $\mu\text{m}$  sono stati utilizzati filtri MILLIPORE tipo HVLP montati su un opportuno sistema per la filtrazione sotto vuoto (Millipore 47 mm Steril Aseptic System).
- HPLC-MS: La colonna utilizzata per le analisi dei peptidi è una JUPITER 5  $\mu\text{m}$  C18 300 Å (250 \* 4.6 mm). Le analisi sono state condotte utilizzando un sistema costituito da una pompa a quattro vie modello ALLIANCE WATERS 2695 connessa ad uno spettrometro di massa MICROMASS ZMD a singolo quadrupolo dotato di interfaccia ESI.
- Acquisizione dei dati mediante il software MASSLYNX 3.5
- Lo spettrofotometro utilizzato è un LAMBDA BIO 20 (PERKIN ELMER) associato ad un sistema peltier PTD-6 (PERKIN ELMER)

### 9.2.3 Sintesi dei $\gamma$ -glutamyl dipeptidi

Tutti i  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi sono stati sintetizzati in soluzione.  $\text{N}^{\alpha}$ -Boc-L-Glu-OtBu (1mmol) viene disciolto in DMF dry insieme con HBTU e HOBt (0,95mmol), e la soluzione viene mantenuta in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 10 minuti, in modo da permettere l'attivazione della funzione carbossilica; l'estere t-butilico dell'altro ammino acido (Phe, Leu, or Ile, 0,95mmol) viene aggiunto insieme alla diisopropiletilammina (DIEA, 2mmol), e la reazione viene lasciata proseguire per 3 ore, monitorando mediante TLC. Al termine della reazione la DMF viene allontanata sotto

vuoto, ed il residuo viene ripreso con diclorometano. La soluzione organica viene sottoposta ad estrazioni con soluzioni sature di  $\text{KHSO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$  and  $\text{NaCl}$  (3 x 60mL per ogni soluzione), disidratata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , e filtrata su carta. Il solvente viene allontanato mediante rotavapor, ed il residuo viene sciolto in 10ml di una miscela di TFA/DCM (1:1), usando un 2% di m-cresolo e tioanisolo come scavengers. La miscela di reazione viene lasciata in agitazione magnetica per 1hr a temperatura ambiente, ed a reazione ultimata si allontana il più possibile il solvente sotto vuoto; si procede quindi all'aggiunta di etere etilico, in modo da far precipitare il dipeptide libero. Il precipitato viene lavato con etere etilico, e sciolto con una soluzione di acido formico a pH3, in modo da procedere alla purificazione mediante RP-HPLC preparativo, usando una C18. La purezza e la massa del  $\gamma$ -glutamyl dipeptide viene valutata mediante RP-HPLC interfacciato con spettrometro di massa elettrospray (>95%). Le rese calcolate per i tre dipeptidi sono: 70% ( $\gamma$ -Glu-Ile), 63% ( $\gamma$ -Glu-Leu), 54% ( $\gamma$ -Glu-Phe).

#### 9.2.4 Sintesi del peptide $\beta$ -CS (f193-209) vaccino

Il peptide corrispondente alla sequenza 193-209 della  $\beta$ -caseina bovina è stato sintetizzato in fase solida, seguendo una strategia sintetica via Fmoc con protezione in catena laterale di tipo ortogonale; la resina utilizzata è la Wang, precaricata con Fmoc-Valina, e con grado di sostituzione pari a 0,57mmoli/g. Il grado di sostituzione è stato determinato per via spettrofotometrica: si pesa una quantità di resina precaricata in una cuvetta da 3ml, si procede all'aggiunta di 3ml di una soluzione di piperidina in DMF 80:20, e dopo energica agitazione si va a misurare l'assorbanza a 290nm. Il grado di sostituzione è dato dalla seguente formula:

$$\text{mmoli/g} = (A_{290} - A_{400}) / 1,65 \times \text{mg pesati.}$$

Per la sintesi è stato utilizzato un sintetizzatore automatico dell'Applied Biosystem, ed una scala 5 $\mu$ molare, per la quale sono richieste le seguenti soluzioni:

- soluzione di HOBt/HBTU 0,19M in DMF;
- soluzione di DIEA 0,4M in DMF;
- soluzione di capping (4,75ml di anidride acetica, 2,25ml di DIEA, 1,5ml di HOBt 1M in NMP, il tutto è stato portato a 100ml con NMP);
- piperidina assoluta.

Gli ammino acidi vengono usati in un eccesso di 5:1 rispetto ai siti reattivi della resina (25 $\mu$ moli): Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH,

Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ile-OH.

Si carica la quantità pesata per ogni ammino acido in apposite cartridge, portando in soluzione con NMP (100µl); poiché la sequenza è abbastanza ingombrata, si è optato per eseguire diversi doppi coupling.

Ultimata la sintesi, si procede alla fase di sblocco del peptide dalla resina e contemporanea rimozione dei gruppi protettori in catena laterale: si recupera la resina in un reattore munito di setto di vetro sinterizzato, si aggiunge 1ml di una miscela di sblocco costituita da TFA, acqua, e triisopropilsilano (scavenger) nel rapporto 9:0,5:0,5 , e si lascia sotto agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. Si procede quindi ad una filtrazione sottovuoto, recuperando il filtrato in una provetta da centrifuga, si riduce di volume sotto flusso di azoto, e si fa precipitare il peptide, in forma di sale dell'acido trifluoroacetico, mediante aggiunta di etere etilico a freddo. Il precipitato viene lavato più volte con etere, e sciolto con una soluzione di acido formico a pH3, in modo da procedere alla purificazione mediante RP-HPLC preparativo, usando una C18: la purezza e la massa del peptide viene valutata mediante RP-HPLC interfacciato con uno spettrometro di massa ad electrospray (>95%).

### **9.2.5 Preparazione dell'estratto di Parmigiano Reggiano**

Si è seguita la procedura solita riportata nel capitolo 6, e qui di seguito riassunta:

- 5g formaggio grattugiato + 45 mL di una soluzione acquosa di HCl a 0,1N
- omogeneizzazione per 1 minuto a 1000gpm (Ultraturrax T50, Janke&Junkel Italabortechnik)
- centrifuga a 5000rpm per 30 minuti a 4°C (centrifuga ALC 4237R)
- filtrazione su carta da filtro (cut off 15-20 µm)
- estrazione dei lipidi con etere etilico (4 lavaggi)
- filtrazione su filtri a taglio 0,45 µm, sistema Millipore 46mm Steril Asptic System, sotto vuoto
- prelievo di un'aliquota di 3mL ed evaporazione del solvente al rotavapor
- ripresa del campione con 2 mL di una soluzione di acido formico a pH 3
- filtrazione su filtri Amicon Ultrafilter YM10 (Taglio molecolare a 10KDa) e successiva filtrazione su filtri Amicon Ultrafilter YM3 (taglio molecolare 3KDa) con un Amicon Micropartition System MPS-1

- il filtrato è portato a secco sotto flusso di azoto e conservato a -20°C.

### 9.2.6 Frazionamento dell'estratto di Parmigiano

Il frazionamento dell'estratto di Parmigiano è stato eseguito in HPLC preparativo a fase inversa con colonna C18 e gradiente acqua:acetonitrile.

L'aliquota di estratto è iniettata in colonna (JUPITER PHENOMENEX 5µm, C 18, 300Å), ad ogni iniezione è iniettato 1ml di soluzione (campione disciolto in soluzione di acido formico a pH 3, concentrazione finale del campione 20mg/mL). Il flusso dell'eluente è di 10ml/min.

Gli eluenti utilizzati sono i seguenti:

- A : H<sub>2</sub>O + 0,2%CH<sub>3</sub>CN + 0.1%HCOOH
- B : 65%H<sub>2</sub>O 35%CH<sub>3</sub>CN +0.1%HCOOH

Il gradiente utilizzato è riportato in tabella 9.3:

**Tabella 9.3. Gradiente utilizzato per il frazionamento**

Tempo (min.)	Eluente A (%)	Eluente B(%)
0.00	99	1
15.0	99	1
60.0	10	90
69.0	10	90
70.0	99	1
90.0	99	1

Il rivelatore è uno spettrofotometro UV settato a λ 214nm con sensibilità 1AUFS.

Le frazioni sono raccolte manualmente in differenti palloni al procedere dell'eluizione. Le quattro frazioni raccolte sono state

1. 0-14 min (dove si è raccolto l'85% dell'estratto)
2. 15-27 min (5%)
3. 28-40 min (5%)
4. 41-60 min (2,5%)
5. 61-80 min (2,5%)

Tali frazioni sono state successivamente testate per valutare l'attività ACE-inibitrice.

## 9.2.7 Valutazione dell'attività di ACE-inibizione mediante test spettrofotometrico

L'attività ACE-inibitrice è stata misurata utilizzando il metodo messo a punto da Holmquist et al. **Errore. Il segnalibro non è definito.**, con alcune modifiche, soprattutto riguardanti la fonte dell'enzima ACE, che è stata l'estratto acetone di polmone di coniglio, come descritto Vermeirssen et al.<sup>2</sup>. Tale estratto viene preparato sospendendo 100mg di rabbit lung acetone powder (Sigma-Aldrich) in 1ml di 50mM Tris-HCl buffer (pH8) contenente 300mM NaCl, e centrifugando la sospensione, dopo energica miscelazione, per 3h a 12000rpm; in questo modo si ottiene un surnatante rosso vinoso che possiede un'elevata attività ACE, e che viene diluito 10 volte con lo stesso buffer prima di procedere al test spettrofotometrico. 250µl di una soluzione 1mM di FAPGG vengono miscelati in una cuvetta da 550µl con 150µl della soluzione del campione a differenti concentrazioni [il campione e FAPGG vengono disciolti in tampone 50mM Tris-HCl (pH8) contenente 300mM NaCl], quindi si procede all'aggiunta di 150µl dell'estratto dotato di attività ACE, diluito di 10 volte. Viene misurata la diminuzione di assorbanza a 340nm durante 30 min a 37°C ( $\Delta A_{\text{inhibitor}}$ ). Per esperimenti di bianco viene usato il tampone al posto della soluzione del campione ( $\Delta A_{\text{blank}}$ ); un bianco viene eseguito ogni volta che viene preparato dell'estratto, in quanto quest'ultimo presenta una propria diversa attività ACE, per cui ogni esperimento eseguito con un dato estratto viene confrontato con il corrispondente bianco. L'Enalapril<sup>®</sup>, precedentemente idrolizzato nella forma attiva Enalaprilat<sup>®</sup>, è stato usato come controllo positivo per l'ACE inibizione. La percentuale di inibizione dell'enzima viene calcolata come segue:  $[1 - (\Delta A_{\text{inhibitor}} / \Delta A_{\text{blank}})] \times 100$ ; per ogni concentrazione di campione sono state eseguite 3 misure, ed i risultati sono stati mediate. La IC<sub>50</sub> dell'enzima ACE viene calcolata come la concentrazione del campione in grado di inibire l'attività ACE al 50% in queste condizioni.

## 9.3 CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata investigata la potenziale bioattività di peptidi naturalmente presenti nei formaggi, focalizzando l'attenzione sull'attività ACE-inibitrice.

Dagli esperimenti condotti sull'Enalaprilato è stata confermata la possibilità di utilizzare il rabbit lung acetone extract (estratto in acetone di polmone di coniglio) come fonte di

angiotensin converting enzyme (ACE) nell'esecuzione del test spettrofotometrico riportato in letteratura, test che si è rivelato, affidabile e di facile esecuzione.

L'esecuzione del test su peptidi singoli naturalmente presenti nei formaggi ha dato risultati deludenti: nel caso dei  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi, i valori di IC<sub>50</sub> calcolati per  $\gamma$ -Glu-Ile e  $\gamma$ -Glu-Leu sono rappresentativi di una scarsissima capacità di inibizione enzimatica, per la quale non è da escludere un'azione di tipo aspecifico, mentre per  $\gamma$ -Glu-Phe è assolutamente da escludere un'attività di questo tipo.

In modo analogo si è eseguito il test sul peptide  $\beta$ -CN (f193-209), presente in quantità consistenti in molte varietà di formaggi; tale peptide contiene la sequenza 193-202, nota in letteratura per la sua attività ACE-inibitrice, tuttavia questo non è sufficiente perché a sua volta conservi un'attività di questo tipo: i risultati sperimentali hanno dimostrato un drastico calo nella capacità di inibire l'enzima, probabilmente per un effetto di aumento dell'ingombro sterico che va ad interferire nell'interazione con il sito attivo enzimatico.

Risultati più incoraggianti si sono avuti nel momento in cui siamo passati a testare non più singole molecole, ma miscele a maggiore complessità, quali estratti oligopeptidici di Parmigiano Reggiano; il frazionamento cromatografico, accoppiato ad una buona caratterizzazione delle frazioni, rappresenta la via migliore per arrivare ad identificare molecole bioattive in miscele di una certa complessità, in quanto nel nostro caso ha confermato la blanda attività ACE-inibitrice mostrata dai  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi.

## 9.4 BIBLIOGRAFIA

---

<sup>1</sup> Holmquist, B.; Bunning, P.; Riordan, J. F. (1979) *Anal Biochem*, **95**, 540-548.

<sup>2</sup> Vermeirssen, V.; Van Camp, J.; Verstraete, W. (2002) *J Biochem Biophys Methods*, **51**, 75-87.

<sup>3</sup> Sforza, S.; Aquino, G.; Cavatorta, V.; Durrieu, C.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Martial, A.; Marchelli R. *J Agr Food Chem*, *in press*.

<sup>4</sup> Tate, S.S.; Meister, A. (1981) *Mol Cell Biochem*, **39**, 357-368.

<sup>5</sup> Maruyama, S.H.; Mitachi, H.; Tanaka, H.; Tomizuka, N.; Suzuki, H. (1987) *Agric Biol Chem*, **51**, 1581-1586.

<sup>6</sup> Migliore-Samour, D.; Floch, F.; Jollès, P. (1989) *J Dairy Res*, **56**, 357-362.

<sup>7</sup> Minkiewicz, P.; Slangen, C.J.; Dziuba, J.; Visser, S.; Mioduszevska, H. (2000) *Milchwissenschaft*, **55**, 14-17.

---

<sup>8</sup> Sforza, S.; Galaverna, G.; Neviani, E.; Pinelli, C.; Dossena, A.; Marchelli, R. (2004) *Eur J Mass Spectrom*, **10**, 421-427.

<sup>9</sup> Sforza, S.; Ferroni, L.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R. (2003) *J Agr Food Chem*, **51**, 2130-2135.

## **10. Valutazione dell'attività immunomodulante di peptidi naturalmente presenti nei formaggi**

In questa parte del lavoro di tesi si è inteso valutare l'eventuale attività di immunomodulazione mostrata da estratti di formaggi, e da singoli peptidi naturalmente presenti nei formaggi; per fare ciò ci siamo serviti di opportuni test colorimetrici in micropiasta, condotti su linee cellulari di linfociti T umani.

Si vuole, inoltre, investigare la possibilità che un attività di questo tipo possa essere mediata dall'interazione con recettori oppioidi.

### **10.1 RISULTATI E DISCUSSIONE**

#### **10.1.1 Determinazione dell'attività immunomodulante in micropiastrea**

In un progetto generale di valutazione della biotività di peptidi presenti nei formaggi, si è focalizzata l'attenzione sull'attività immunomodulante. La capacità di estratti di formaggio di stimolare la risposta immunitaria è stata valutata presso il Laboratoire de Recherche en Genie Industriel Alimentaire (LRGIA) dell'Università "Claude Bernard" di Lione, in collaborazione con il gruppo di ricerca della prof.ssa Martial, mediante un metodo messo a punto da Durrie et al.<sup>1</sup>. Sono stati condotti in parallelo due test colorimetrici in vitro, il test BrdU (5-bromo-2'-desossiridina), che permette di valutare l'influenza dell'estratto sulla sintesi del DNA, ed il test MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro], che permette di valutare l'influenza sul metabolismo cellulare; in entrambi i casi si sono utilizzate linee cellulari di linfociti T umani (Jurkat), coltivate in micropiastre da 96 pozzetti, in modo da poter monitorare molti campioni in parallelo ed a diverse concentrazioni.

Per ogni studio, l'attività biologica dei peptidi è stata valutata su due tipi di cellule, quelle adattate al 2,5% di Siero fetale di vitello (SVF), e quelle non adattate, cioè coltivate fino al momento della manipolazione in un mezzo al 5% di siero e solo al momento del test inoculate direttamente in un mezzo al 2,5% di siero; un basso tenore di siero (2,5%) rende le cellule sensibili anche a miscele molto complesse quali possono essere gli estratti di formaggio, escludendo qualsiasi influenza di tipo nutrizionale.

L'utilizzo sia di cellule adattate che non adattate al così basso tenore di SVF permette di ottenere diverse informazioni :

- le cellule adattate rispondono agli estratti come un sistema stabile, con un ben determinato metabolismo;
- le cellule non adattate rispondono come sistema sotto stress, con un metabolismo “di emergenza”, e così si può valutare come e con quale velocità rispondono alla presenza dei peptidi.

I test per seguire la coltura in micropiastre sono stati scelti in base alla letteratura, e sono il test BrdU<sup>2</sup> e il test MTT<sup>3</sup>, per valutare l'effetto degli estratti almeno sotto due punti di vista: il primo quantifica la sintesi del DNA (strettamente correlata alla proliferazione cellulare), attraverso la valutazione del tasso di incorporazione della BrdU (5-bromo-2'-desossipuridina) al posto della timidina durante la sintesi del DNA ad opera delle cellule in fase S di crescita, mentre il secondo valuta l'attività metabolica delle cellule attraverso la reazione di riduzione del sale di tetrazolio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] che avviene ad opera dei cofattori NADH e NADPH prodotti dalle cellule metabolicamente attive. Questo secondo indice è meno legato alla proliferazione cellulare, però valuta l'influenza generale delle molecole sul metabolismo della cellula.

L'effetto che gli estratti e le molecole hanno su questi parametri sono stati valutati come IS, indice di stimolazione, così definito:

$$IS = \frac{DO \text{ coltura addizionata di peptidi} - DO \text{ mezzo (bianco)}}{DO \text{ coltura senza peptidi (riferimento)} - DO \text{ mezzo (bianco)}}$$

dove DO sono le assorbanze delle risposte colorimetriche dei test; se IS>1 la proliferazione cellulare è stimolata, se IS<1 la proliferazione cellulare è inibita. Per ogni esperimento sono state eseguite più misure, ed i risultati mediati.

La proliferazione cellulare è stata valutata a due tempi di incubazione (cinetica discontinua), corrispondenti a fasi fondamentali di crescita delle cellule: fine fase di latenza (48h), e fase esponenziale (96h).

Per ogni prova sono sempre state previste delle colture di riferimento: cellule in stato ottimale di crescita (inoculate al 5% di siero), in condizioni sfavorevoli di crescita

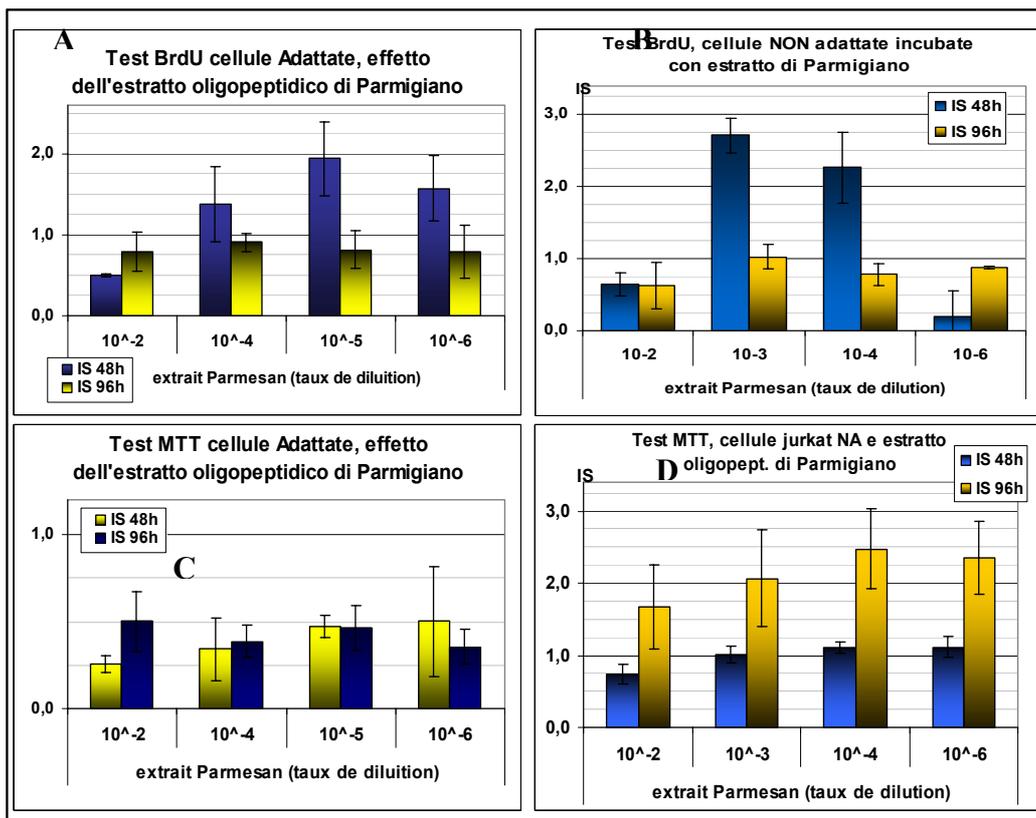
(inoculate in un mezzo allo 0% di siero), ed il riferimento senza peptidi, fondamentale per valutare gli IS.

## 10.1.2 Valutazione dell'attività immunomodulante

### 10.1.2.1 Estratto oligopeptidico di Parmigiano Reggiano

Si è proceduto a testare la frazione oligopeptida totale di Parmigiano Reggiano utilizzando in parallelo i test BrdU e MTT, sia con cellule adattate che con cellule in condizioni di stress (il campione di partenza è lo stesso che è stato utilizzato per il test spettrofotometrico di ACE-inibizione, Parmigiano Reggiano a 12 mesi di stagionatura); al momento dei test, la frazione oligopeptidica è stata opportunamente ripresa con il mezzo di base della coltura Jurkat, con diluizioni a partire da 1% v/v (indicato come  $10^{-2}$ ), e sterilizzata su filtri 0,22 $\mu$ m per evitare contaminazioni.

I risultati dei test relativi alla frazione oligopeptidica totale sono riportati graficamente in figura 10.1.



**Figura 10.1. Effetto dell'estratto di Parmigiano Reggiano sulle linee cellulari JURKAT (A-test BrdU, cellule adattate; B- test BrdU, cellule non adattate; C- test MTT, cellule adattate; D- test MTT, cellule non adattate)**

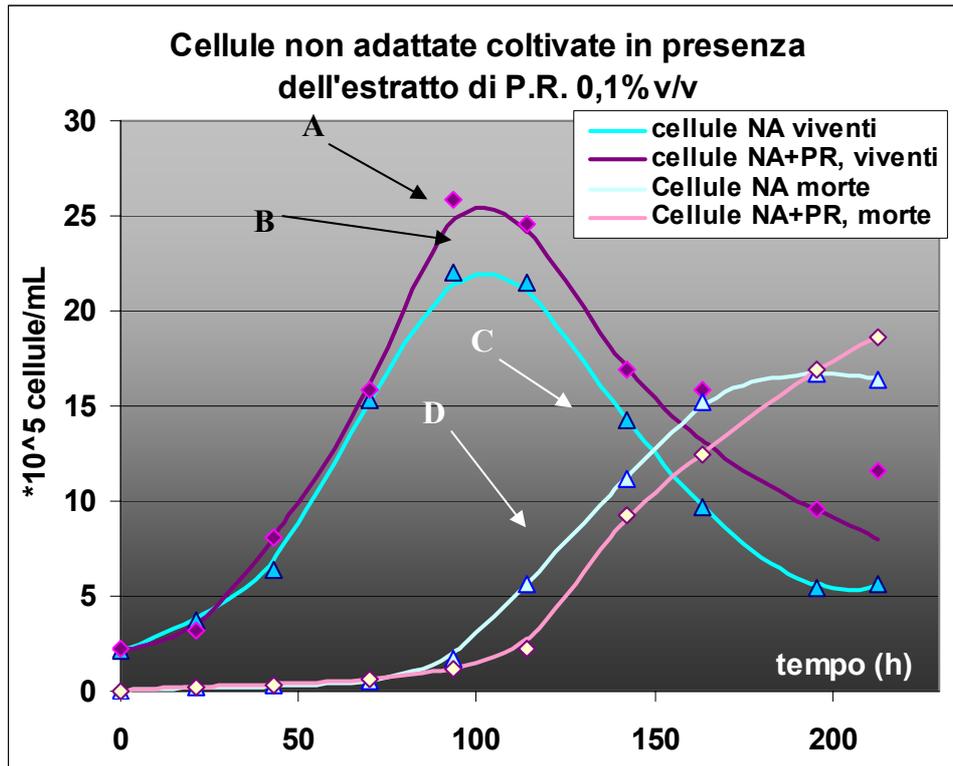
I tempi di incubazione considerati sono quelli relativi alla fase di latenza ed a quella esponenziale della curva di crescita cellulare (48 e 96h); si può vedere come nel caso del test BrdU, escludendo la diluizione minore ( $10^{-2}$ ), l'indice di stimolazione sia sempre superiore ad 1 nella fase di latenza, sia per le cellule adattate che per quelle non adattate (la deviazione standard calcolata per la diluizione  $10^{-6}$  relativa alle cellule non adattate fa pensare che in questo caso non fosse significativa la misura), mentre nel caso del test MTT questo si verifica in fase esponenziale, anche se solo per le cellule non adattate (nel caso delle cellule adattate si osserva una forte inibizione a tutte le diluizioni considerate, comportamento insolito che va tenuto scarsamente in considerazione).

La frazione oligopeptidica di Parmigiano, quindi, ha stimolato consistentemente entrambi gli indici: la sintesi del DNA è promossa soprattutto in fase di latenza, il metabolismo cellulare soprattutto in fase esponenziale, ad indicare una buona complementarità, visto che nella fase di latenza si verifica un incremento della sintesi di DNA, in preparazione della fase esponenziale, metabolicamente attiva; inoltre si può escludere un effetto di tipo nutrizionale, in quanto i risultati peggiori di stimolazione si verificano proprio alle concentrazioni maggiori ( $10^{-2}$ ).

Risultati così incoraggianti ci hanno spinto a passare all'analisi su più grande scala dei flask di coltura, in modo da valutare l'effetto dell'estratto sulle linee cellulari in maniera globale, continua e più fedele alla realtà.

In flask la coltura è stata seguita quotidianamente per conta diretta delle cellule viventi e morte (attraverso la colorazione al Blu Trypan), per dosaggio dell'enzima intracellulare lattato deidrogenasi LDH, rilasciato dalle cellule morte, e seguendo la cinetica di consumo del glucosio.

L'estratto di Parmigiano è stato testato a diluizione  $10^{-3}$ , in presenza di cellule non adattate, che si sono mostrate particolarmente sensibili nei test effettuati in micropiastra; in figura 10.2 è mostrato graficamente l'effetto dell'estratto sulla coltura cellulare, per conta nel tempo delle cellule vive e delle cellule morte.



**Figura 10.2. Cellule Jurkat non adattate coltivate in presenza di estratto di Parmigiano alla concentrazione di  $10^{-3}$  (A-cellule vive in presenza dell'estratto; B-cellule vive in assenza dell'estratto; C-cellule morte in assenza dell'estratto; D-cellule morte in presenza dell'estratto)**

L'analisi in flask ha decisamente confermato i risultati ottenuti in micropiastre, in quanto appare ben evidente l'aumento della proliferazione cellulare, con conseguente rallentamento della morte della popolazione.

### **10.1.2.2 Frazionamento dell'estratto di Parmigiano Reggiano**

Vista la buona capacità immunostimolante mostrata dalla frazione oligopeptidica totale del Parmigiano Reggiano, ci è apparso logico proseguire nella direzione del frazionamento in RP-HPLC preparativo, in modo da ottenere delle miscele peptidiche a minore complessità; questo nell'ottica di risalire ai singoli peptidi che possano essere responsabili dell'attività di immunostimolazione.

Il gradiente di eluizione è lo stesso di quello usato per l'analisi in HPLC-ESI-MS degli estratti di formaggio(vedere parte sperimentale del capitolo 9); le frazioni raccolte sono le seguenti:

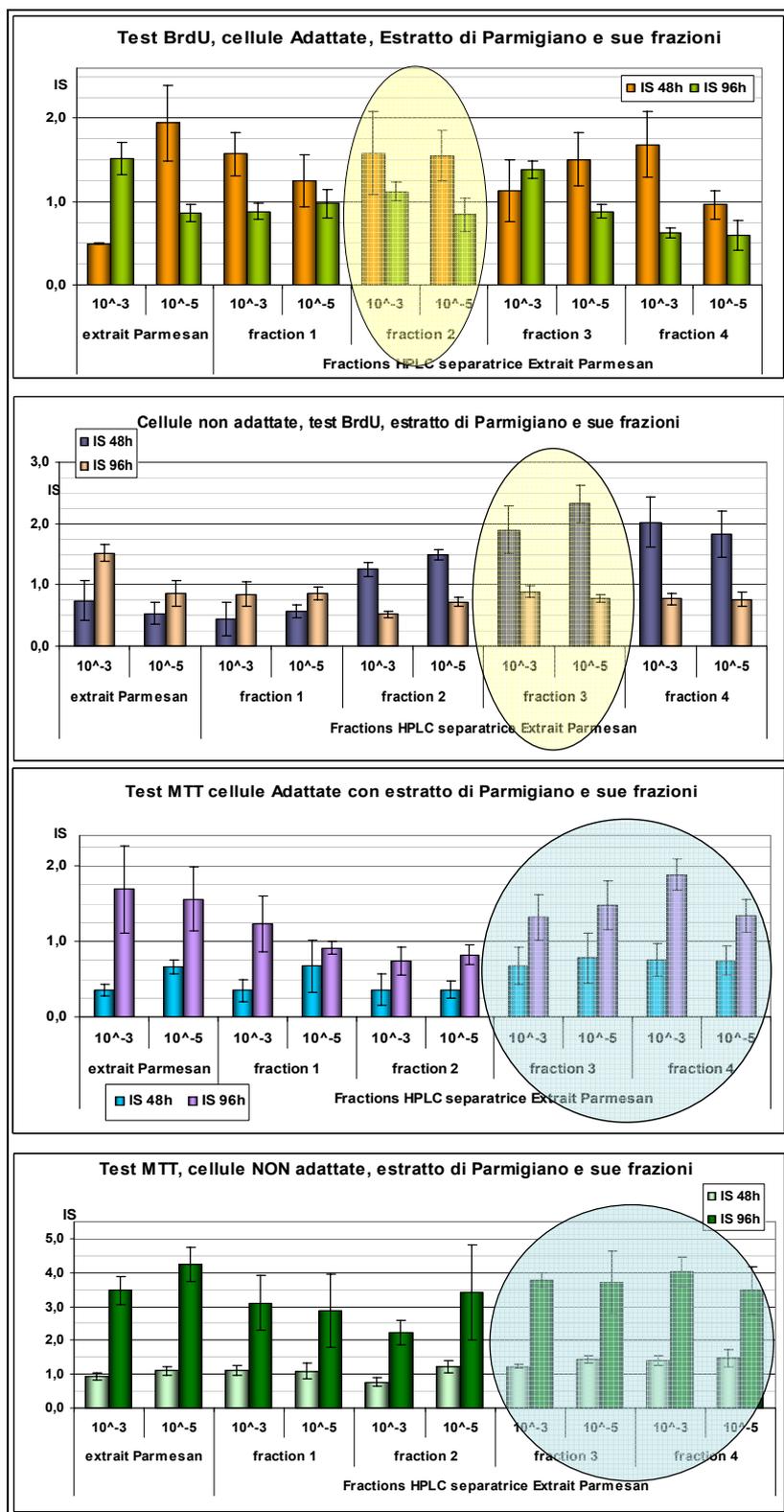
1. 0-14 min (85% in peso dell'estratto, principalmente ammino acidi);
2. 15-27 min (5%, ammino acidi idrofobici e piccoli peptidi);
3. 28-59 min (5%, piccoli peptidi apolari e peptidi di peso molecolare intermedio);
4. 60-80 min (5%, peptidi idrofobici di grosso peso molecolare).

Tutte le frazioni sono state testate in micropiastra nelle quattro condizioni suddette; i risultati relativi alle diverse frazioni, confrontati con quelli dell'estratto totale, sono visualizzati graficamente in figura 10.3.

Nel caso del test BrdU condotto sulle cellule adattate, il comportamento delle diverse frazioni risulta sensibilmente diverso, e nell'ambito di ciascuna frazione la diluizione non sembra incidere molto sull'effetto mostrato. La seconda frazione (evidenziata) è quella che ad entrambi i tempi di incubazione, ed ad entrambe le diluizioni, stimola comunque maggiormente la sintesi del DNA. La situazione varia notevolmente quando il test viene eseguito sulle cellule non adattate, per le quali la terza frazione è risultata la più attiva; inoltre, anche in questo caso l'effetto non sembra dipendere dalla concentrazione.

Molto più chiari sono i risultati relativi al test MTT: la terza e la quarta frazione sono quelle che hanno più stimolato il metabolismo cellulare, sia nel caso delle cellule adattate che di quelle non adattate; inoltre, ancora una volta, l'effetto delle frazioni non sembra dose-dipendente. Da notare i valori molto elevati di indice di stimolazione, che nel caso della quarta frazione ci stupiscono poco, visto che dalla sua analisi in HPLC-MS (vedere il capitolo 9, figura 9.13) emerge la presenza del peptide  $\beta$ -CN (f193-209), che possiede una ben nota attività di questo tipo<sup>4</sup>; molto più interessante è invece la terza frazione, che, fra tutte, è quella ad aver stimolato la proliferazione cellulare in modo più costante.

Anche in questo caso la caratterizzazione della sua composizione mediante HPLC-MS ci può essere di aiuto nell'identificazione dei singoli peptidi responsabili per questa attività.



**Figura 10.3. Effetto delle frazioni di Parmigiano Reggiano sulla proliferazione cellulare (dall'alto in basso: test BrdU, cellule adattate; test BrdU, cellule non adattate; test MTT, cellule adattate; test MTT, cellule non adattate)**

### 10.1.2.3 $\gamma$ -glutamil dipeptidi

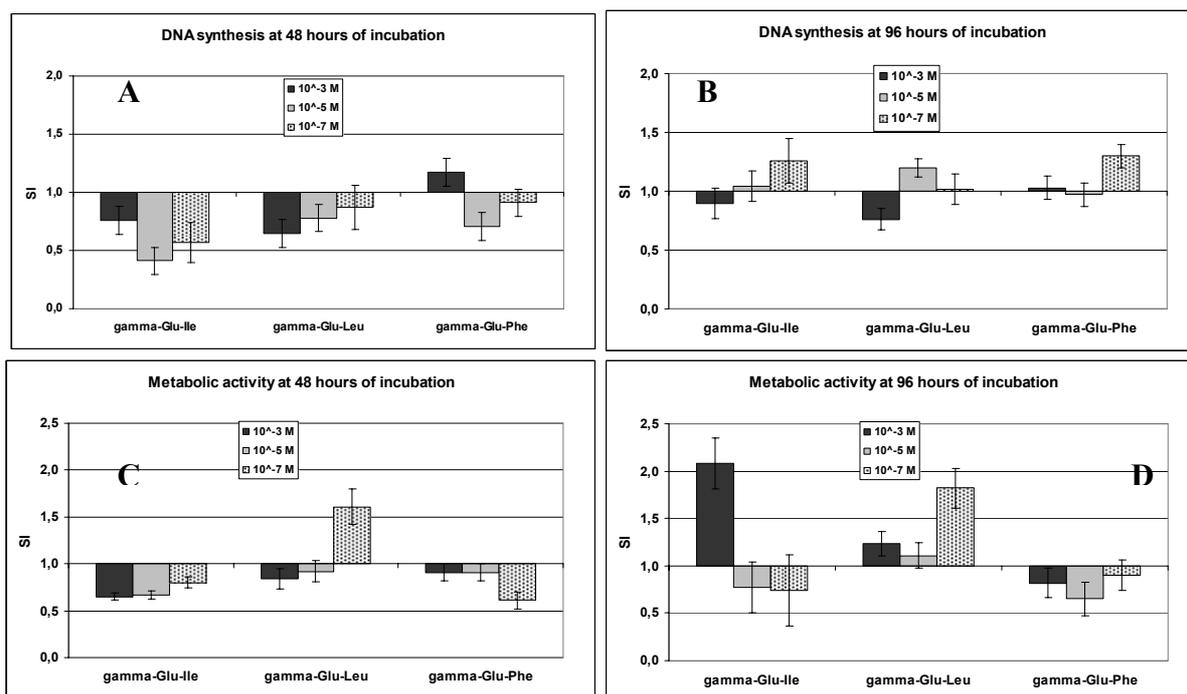
Quando una miscela piuttosto complessa, quale può essere un estratto di formaggio, viene sottoposta a test che contemplano l'utilizzo di colture cellulari, in cui bisogna tener conto di un gran numero di variabili, i risultati che si ottengono non sempre sono di facile interpretazione, e spesso è richiesto un numero sufficientemente elevato di ripetizioni dell'esperimento, perché i dati possano essere trattati con un certo grado di sicurezza.

Le cose si semplificano notevolmente quando ad essere testate sono singole molecole, poiché, in questo caso, è possibile attribuire gli effetti osservati all'attività del singolo composto, senza dover considerare, ad esempio, fenomeni di tipo nutritivo.

In quest'ottica abbiamo pensato di sottoporre ai test in micropiastra gli stessi  $\gamma$ -glutamildipeptidi che sono stati valutati per l'attività ACE-inibitrice; le condizioni operative utilizzate per i tre composti sono le stesse viste per le frazioni peptidiche di Parmigiano.

In figura 10.4 è riportato graficamente l'effetto dei tre  $\gamma$ -glutamil dipeptidi a differenti concentrazioni (da  $10^{-3}$ M a  $10^{-7}$ M) sulla sintesi del DNA e sull'attività metabolica dei linfociti T umani JURKAT, nella fase stazionaria (48h) e nella fase esponenziale (96h); i risultati si riferiscono solo agli esperimenti condotti sulle cellule adattate ad un basso tenore di siero (2,5%), che si sono mostrate più sensibili all'aggiunta dei dipeptidi, rappresentando un modello migliore. I risultati sono espressi come Indici di Stimolazione, e rappresentano la media di almeno otto replicati.

La prima cosa che salta all'occhio è che l'influenza sulla sintesi del DNA non sembra collegata all'effetto sull'attività metabolica, ed in quasi tutti i casi gli effetti non sembrano essere dose dipendente, come del resto già riportato in letteratura per altri peptidi immunomodulanti<sup>5</sup>.



**Figura 10.4. Effetto dei tre  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi sui linfociti T umani Jurkat adattate (A-test BrdU a 48h; B-test BrdU a 96h; C-test MTT a 48h; D-test MTT a 96h)**

La  $\gamma$ -glutamyl-isoleucina e la  $\gamma$ -glutamyl-leucina hanno mostrato la capacità di influenzare la sintesi del DNA in modo molto simile: durante la fase di latenza, hanno inibito tale sintesi a praticamente tutte le concentrazioni, con valori di IS che vanno da 0,45 a 0,87; durante la fase esponenziale, invece, il loro comportamento risulta piuttosto caratteristico, in quanto alla concentrazione di  $10^{-3}$ M si sono comportati da inibitori (SI intorno a 0,8), per poi stimolare leggermente alle altre concentrazioni.

In modo del tutto differente, la  $\gamma$ -glutamyl-fenilalanina ha stimolato la sintesi del DNA durante la fase di latenza ad alte concentrazioni (IS=1,2), e l'ha inibita a concentrazioni minori; nel caso della fase esponenziale, invece, l'unico effetto significativo si è avuto alla concentrazione più bassa ( $10^{-7}$ M), alla quale il peptide ha stimolato la sintesi con un IS di 1,3.

Per quanto riguarda l'attività metabolica, dall'analisi dei risultati sembra che tutti e tre i peptidi la inibiscano durante la fase di latenza, fatta eccezione della  $\gamma$ -glutamyl-leucina che, a bassa concentrazione, ha mostrato un'effetto di stimolazione (IS=1,6); durante la fase esponenziale, solo la  $\gamma$ -glutamyl-fenilalanina sembra aver inibito l'attività metabolica a tutte le concentrazioni considerate, mentre gli altri due peptidi hanno mostrato un effetto

piuttosto variabile: da sottolineare il comportamento della  $\gamma$ -glutamil-isoleucina, che a concentrazioni minori ha inibito la fase metabolica, ma l'ha fortemente stimolata ad elevata concentrazione, raggiungendo un valore di IS pari a 2,08.

Gli effetti immunomodulanti mostrati dai tre  $\gamma$ -glutamil dipeptidi, il più delle volte inibitori, assumono un notevole interesse, soprattutto nell'ottica che tali molecole, essendo a basso peso, potrebbero essere assorbite facilmente attraverso l'epitelio intestinale, e raggiungere inalterate i linfociti periferici, data la presenza di un legame peptidico insolito che potrebbe renderle particolarmente resistenti all'attività delle esterasi del sangue.

### **10.1.3 Attività immunomodulante mediata da recettori oppioidi**

Come già descritto nell'introduzione (capitolo 2), esiste una forte relazione tra sistema oppioide e sistema immunitario, in quanto studi farmacologici di funzionamento cellulare, di binding, e di determinazione di mRNAs che esprimano i recettori oppioidi, hanno rivelato la loro presenza sui leucociti. In particolare, numerosi lavori hanno messo in evidenza la presenza dei recettori oppioidi proprio su linfociti T Jurkat<sup>6</sup>; tuttavia, sebbene molti degli effetti della morfina *in vitro* si verificano a concentrazioni molto basse, per via dell'elevata affinità che tale alcaloide presenta per i recettori oppioidi, nel caso dell'attività a livello dei linfociti T bisogna salire con la concentrazione, il che lascerebbe pensare ad una diversa natura dei recettori oppioidi linfocitari rispetto a quelli neuronali.

L'effetto oppioide di molecole in genere viene valutato *in vitro* con particolari sistemi biologici isolati, scelti per l'abbondanza di terminazioni nervose e quindi di recettori oppioidi presenti sulle loro superfici (l'ileo del maialino di Guinea, vasi deferenti di topi). Applicare questo principio a cellule linfocitarie, quindi a sistemi senza terminazioni nervose, è di grande interesse metodologico e solo pochi e innovativi studi cominciano ad utilizzarlo<sup>7</sup>.

Sulla base di tutte queste considerazioni, si è voluto investigare la possibile interazione dei  $\gamma$ -glutamil dipeptidi con i recettori oppioidi presenti sulla membrane delle cellule Jurkat, valutando il loro comportamento in presenza di Naloxone; l'utilizzo del Naloxone, un potente antagonista dei recettori oppioidi, è dettata dalla considerazione che se esso è in grado di modificare l'attività di un certo composto sulla proliferazione cellulare, tale attività potrebbe essere mediata da recettori oppioidi. Tale metodo è stato messo a punto presso i laboratori LRGIA dell'Università di Lione, effettuando prove preliminari con le  $\beta$ -casomorfine, peptidi esogeni ad attività oppioide derivanti dalla sequenza 60-70 della  $\beta$ -

caseina (vedere introduzione; capitolo 2): si è visto che essi modulano la proliferazione dei linfociti Jurkat attraverso una generale inibizione degli indici ottenuti con i test BrdU e MTT, ma in presenza del Naloxone l'effetto viene annullato, lasciando presumere un'attività mediata da recettori oppioidi; il solo Naloxone a contatto delle cellule in coltura non comporta invece variazioni (dati non mostrati).

Per quanto riguarda i  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi, si è andato a confrontare la risposta cellulare durante i due test (BrdU e MTT) in presenza ed in assenza del naloxone, aggiunto alla coltura al momento dell'incubazione in micropiastre, ad una concentrazione di  $10^{-5}$ M.

Nel caso del test BrdU, la sintesi di DNA, per tutti e tre i peptidi, non è stata influenzata in modo significativo dalla presenza del Naloxone a nessuna concentrazione (dati non mostrati): questo comportamento sta ad indicare, probabilmente, che l'effetto osservato per i  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi sulla sintesi del DNA non sia mediato dall'interazione con i recettori oppioidi.

Molto più interessante è stato il test MTT, in quanto si è visto che la capacità dei dipeptidi di modulare l'attività metabolica è significativamente influenzata dalla presenza dell'antagonista oppioide (risultati riassunti in tabella 10.1; i dati sono espressi come medie di  $IS \pm deviazione\ standard$ ), in particolare nel caso della  $\gamma$ -glutamyl-isoleucina e della  $\gamma$ -glutamyl-fenilalanina, che hanno mostrato un forte aumento dell'indice di stimolazione in presenza di Naloxone, passando da un comportamento inibitorio ad uno decisamente di stimolazione della proliferazione cellulare (si noti che per  $\gamma$ -Glu-Ile, a concentrazione di  $10^{-7}$ M, il valore di IS passa addirittura da 0,74 a 5,14).

**Tabella 10.1. Effetto dei  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi sull'attività metabolica dei linfociti T umani Jurkat in assenza (recettori liberi) ed in presenza (recettori bloccati) di Naloxone**

Fase di crescita	Recettori oppioidi	$\gamma$ -Glu-Ile			$\gamma$ -Glu-Leu			$\gamma$ -Glu-Phe		
		$10^{-3}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-3}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-7}$ M	$10^{-3}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-7}$ M
latenza (48h)	liberi	0.65 $\pm 0.10$	0.67 $\pm 0.15$	0.80 $\pm 0.15$	0.85 $\pm 0.12$	0.92 $\pm 0.27$	1.61 $\pm 0.23$	0.91 $\pm 0.38$	0.91 $\pm 0.21$	<b>0.61</b> $\pm 0.12$
	bloccati	1.26 $\pm 0.11$	1.37 $\pm 0.16$	1.81 $\pm 0.15$	1.34 $\pm 0.12$	1.44 $\pm 0.26$	2.69 $\pm 0.20$	2.07 $\pm 0.38$	2.12 $\pm 0.21$	<b>2.07</b> $\pm 0.12$
		**	**	**	*	NS	*	NS	**	***
esponenziale (96h)	liberi	2.08 $\pm 0.55$	0.77 $\pm 0.17$	<b>0.74</b> $\pm 0.12$	1.23 $\pm 0.19$	1.11 $\pm 0.32$	1.82 $\pm 0.43$	0.82 $\pm 0.11$	0.65 $\pm 0.50$	0.90 $\pm 0.63$
	bloccati	2.80 $\pm 0.55$	1.73 $\pm 0.18$	<b>5.14</b> $\pm 0.13$	2.20 $\pm 0.19$	1.99 $\pm 0.32$	2.62 $\pm 0.37$	1.61 $\pm 0.11$	3.15 $\pm 0.43$	3.20 $\pm 0.63$
		NS	**	***	**	NS	NS	**	*	*

Significatività (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ , NS: non significativo,  $p > 0.05$ )

Tali risultati sono estremamente interessanti, e lascerebbero pensare che, in condizioni normali  $\gamma$ -Glu-Ile e  $\gamma$ -Glu-Phe interagiscano con i recettori oppioidi espressi sulla membrana delle cellule linfocitarie, con l'effetto di reprimere l'attività metabolica; in seguito all'aggiunta del Naloxone, i recettori oppioidi, bloccati dall'antagonista, non sono più nella condizione di interagire con i peptidi, che potrebbero causare un aumento della proliferazione cellulare attraverso altri meccanismi.

A questo punto, vista la probabile affinità dei  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi per i recettori oppioidi presenti sulle cellule del sistema immunitario, sarebbe interessante valutare un loro possibile effetto oppioide a livello centrale.

## 10.2 PARTE SPERIMENTALE

### 10.2.1 Reagenti

- Acido cloridrico 0,1 N (ottenuto con fiala Normex; il contenuto viene portato al volume di 1 L con H<sub>2</sub>O bidistillata)
- Fenilalanilfenilalanina (Sigma)
- Etere etilico (Riedel de Haën)

- Acetonitrile per HPLC (Carlo Erba)
- Acido formico puro 99% (Acros)
- Acqua bidistillata ottenuta con il sistema Millipore Alpha Q
- Linfociti T umani JURKAT E6.1, provenienti dalla banca inglese “European Collection of Cell Culture” ECACC, n°88042803
- Mezzo di coltura RPMI 1640 (Sigma)
- Siero di vitello fetale SVF GIBCO BRL 10270-098
- Kit “Cell Proliferation ELISA BrdU” (Sigma)
- Kit “Cell Proliferation Kit 1 MTT” (Sigma)
- Naloxone cloridrato diidrato (Sigma)

### **10.2.2 Strumentazione**

- L’omogeneizzatore usato è l’ULTRATURRAX T25 basic IKA.
- I filtri per ultrafiltrazione sono AMICON ULTRAFILTERS YM10 (per il cut-off a 10000 Da) e AMICON ULTRAFILTERS YM3 (per il cut-off a 3000 Da). Questi filtri sono montati sugli appositi kit per ultrafiltrazione AMICON MICROPARTITION SYSTEM MPS-1.
- Le centrifughe utilizzate sono ALC CENTRIFUGETTE 4206 (a 5000 rpm per i kit di ultrafiltrazione) e ALC 4237R termostata (utilizzata per l’estrazione della frazione peptidica a 5000 rpm a 5°C).
- Per la filtrazione a 0,45 µm sono stati utilizzati filtri MILLIPORE tipo HVLP montati su un opportuno sistema per la filtrazione sotto vuoto (Millipore 47 mm Steril Aseptic System).
- HPLC-MS: La colonna utilizzata per le analisi dei peptidi è una JUPITER 5 µm C18 300 Å (250 \* 4.6 mm). Le analisi sono state condotte utilizzando un sistema costituito da una pompa a quattro vie modello ALLIANCE WATERS 2695 connessa ad uno spettrometro di massa MICROMASS ZMD a singolo quadrupolo dotato di interfaccia ESI.
- Acquisizione dei dati mediante il software MASSLYNX 3.5
- Cappa a flusso laminare FASTER BHA72
- Incubatore (Haeraeus Instruments typ BB16)
- Centrifuga per micropiastre (SIGMA 3K18 Bioblock Scientific, rotor 11222)
- Lettore per micropiastre (Dynex)

### 10.2.3 Sintesi dei $\gamma$ -glutamildipeptidi

Per la sintesi e purificazione in soluzione dei 3  $\gamma$ -glutamildipeptidi si rimanda alla parte sperimentale del capitolo 9.

### 10.2.4 Preparazione dell'estratto di Parmigiano Reggiano

Per la preparazione dell'estratto oligopeptidico di Parmigiano Reggiano si rimanda alla parte sperimentale del capitolo 9.

### 10.2.5 Frazionamento dell'estratto di Parmigiano

Il frazionamento dell'estratto di parmigiano è stato eseguito in HPLC preparativo a fase inversa con colonna C18 e gradiente acqua/acetonitrile, in modo del tutto analogo a quanto visto nella parte sperimentale del capitolo 9.

L'unica differenza consiste nel fatto che sono state raccolte solo quattro frazioni:

1. 0-14 min (dove si è raccolto l'85% dell'estratto)
2. 15-27 min (5%)
3. 28-60 min (5%)
4. 60-70 min (5%)

Tali frazioni sono state successivamente testate per valutare l'attività immunomodulante.

### 10.2.6 Valutazione dell'attività immunomodulante in micropiastre

L'attività immunomodulante degli estratti di formaggio è stata valutata secondo un metodo messo a punto da Durrie et al.<sup>1</sup>, usando due test colorimetrici *in vitro*, quello dello bromodeossiridina (BrdU) e quello di MTT; per entrambi i test sono state usate linee cellulari JURKAT (linfociti T umani), coltivate in micropiastre da 96 pozzetti, ed incubate a 37°C in un'atmosfera umidificata con il 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule di Jurkat sono state inizialmente coltivate in un mezzo contenente il 5% di siero di vitello fetale (SVF), ma i due test sono stati condotti su cellule coltivate in differenti condizioni: cellule adattate ad un mezzo contenente una minore quantità di SVF (2,5%), più responsive all'aggiunta di soluzioni del campione, e cellule inoculate direttamente da un mezzo al 5% ad uno al 2,5% di SVF (cellule non-adattate), rappresentanti un sistema in condizioni di stress.

Per quanto riguarda il test della BrdU, le cellule (10<sup>5</sup>/ml) vengono incubate con il campione a diverse concentrazioni, quindi si procede all'aggiunta di 20 $\mu$ l per pozzetto di una soluzione 100 $\mu$ M di BrdU 6h prima della fine del tempo di incubazione; le piastre vengono

centrifugate a 1000g, e le cellule sono sottoposte a lisi con un'apposita soluzione denaturante (FixDenat, fornita con il kit). Si procede all'aggiunta di anticorpi di topo anti-BrdU coniugati alla perossidasi (POD), e si lascia ad incubare a temperatura ambiente per 90 minuti; dopo la rimozione degli anticorpi in eccesso mediante lavaggi con PBS, si dà inizio alla reazione enzimatica mediante l'aggiunta di una soluzione di tetrametilbenzidina (TMB), per poi bloccarla dopo 10 minuti mediante l'aggiunta di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. Viene misurata l'assorbanza entro 5 minuti a 450nm usando un lettore di piastre ELISA. Per ogni concentrazione di campione sono state eseguite 4 misure, ed i risultati sono stati mediati; per esperimenti di bianco sono stati usati 200µl di mezzo di coltura con solo 20µl della soluzione di BrdU.

In parallelo è stato condotto il test di MTT, descritto originariamente da Mosmann<sup>3</sup>. Le cellule, coltivate nelle stesse condizioni descritte per il test della BrdU, vengono incubate con il campione a differenti concentrazioni, per poi procedere all'aggiunta di 10µl per pozzetto di una soluzione di MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro, 5mg/ml in PBS] 4h prima della fine del tempo di incubazione. Quindi si procede all'aggiunta di 100µl di una soluzione di solubilizzazione (10% SDS in 0,01M HCl), e le piastre vengono incubate tutta la notte a 37°C per disciogliere i cristalli di formavano. Viene misurata la densità ottica (OD) mediante un lettore di piastre ELISA a 580nm. Per ogni concentrazione di campione sono state eseguite 4 misure, ed i risultati sono stati mediati; per esperimenti di bianco sono stati usati 100µl di soluzione solubilizzante.

Per valutare la possibile interazione con i recettori oppioidi, i due test sono stati condotti in modo analogo in presenza di Naloxone, aggiunto alla coltura al momento dell'incubazione in micropiastre, ad una concentrazione di 10<sup>-5</sup>M. La risposta delle cellule ai campioni con e senza Naloxone è stata confrontata con colture di controllo senza peptidi, e con colture di controllo senza peptidi, ma in presenza di Naloxone. Per ogni concentrazione di campione sono state eseguite almeno 8 misure, ed i risultati sono stati mediate. I test colorimetrici sono stati condotti a due tempi di incubazione, 48 e 96h, corrispondenti, rispettivamente, alla fine della fase di latenza, ed alla fase esponenziale della crescita cellulare. I risultati sono espressi come Indice di Stimolazione (IS), corrispondente al rapporto tra l'assorbanza della coltura trattata con i peptidi, e quella della coltura di controllo senza peptidi. Nel caso dell'esperimento con il Naloxone, l'IS corrisponde al rapporto tra l'assorbanza della coltura trattata con il campione in presenza del Naloxone, e quella della coltura di controllo con Naloxone, ma senza il campione.

## 10.3 CONCLUSIONI

Il metodo in micropiastra condotto sui linfociti T umani Jurkat, messo a punto nei laboratori di Lione, è risultato particolarmente versatile ed efficace, mostrando una buona affidabilità sia nel caso di estratti di formaggio che di molecole singole.

La frazione oligopeptidica di Parmigiano ha mostrato una buona capacità immunostimolante, in quanto ha stimolato consistentemente sia la sintesi del DNA che il metabolismo cellulare, ed è da escludere un effetto di tipo nutrizionale, in quanto i risultati peggiori di stimolazione si verificano proprio alle concentrazioni maggiori ( $10^{-2}$ ).

Questi risultati, confermati anche dalla successiva analisi in flask, ci hanno indotto ad effettuare un frazionamento in HPLC preparativo, al fine di testare le diverse frazioni: ancora una volta il frazionamento cromatografico ci è stato molto di aiuto, in quanto ha permesso di evidenziare le singole frazioni responsabili per questa attività.

Buoni risultati si sono ottenuti anche quando si è proceduto all'esecuzione del test su molecole di sintesi: i tre  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi hanno mostrato, generalmente, un effetto di soppressione della proliferazione cellulare, in particolare  $\gamma$ -Glu-Ile e  $\gamma$ -Glu-Phe hanno mostrato una forte capacità di inibizione della proliferazione cellulare, agendo principalmente sull'attività metabolica.

Esperimenti successivi condotti in presenza di un antagonista oppioide, il Naloxone, lasciano ipotizzare che tali effetti siano mediati dall'interazione con recettori oppioidi, la cui presenza sulle cellule Jurkat è stata dimostrata.

## 10.4 BIBLIOGRAFIA

---

<sup>1</sup> Durrieu, C.; Degraeve, P.; Carnet-Pantiez, A.; Martial, A. *Biotech. Lett.*, in press.

<sup>2</sup> Portsmann T. et al. (1985) *J Immunol Methods*, **82**, 169-179.

<sup>3</sup> Mossman T. (1983) *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.

<sup>4</sup> Minkiewicz, P.; Slangen, C.J.; Dziuba, J.; Visser, S.; Mioduszevska, H. (2000) *Milchwissenschaft*, **55**, 14-17.

<sup>5</sup> Kayser, H.; Meisel, H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters* **1996**, **383**, 18-20.

<sup>6</sup> Heagy W. et al. (1999), *Cell Immunol*, **191**, 34-48.

<sup>7</sup> Elitsur, Y.; Luk, G.D. (1991) *Clin Exp Immunol*, **85**, 493-497.

**C: METODI LC/MS PER LA  
DETERMINAZIONE DELLA SEQUENZA  
DI UNA PROTEINA ALLERGENICA**

## **11. Utilizzo della digestione triptica congiunta ad analisi HPLC-ESI-MS nella delucidazione della sequenza di una proteina allergenica: il caso della LTP di pesca (Pru p 3)**

In questa parte del lavoro di tesi si è voluto valutare le potenzialità di un'analisi di tipo HPLC-ESI-MS, condotta sul digerito triptico di una proteina, al fine di ricavare informazioni sulla sequenza proteica. Si è focalizzata l'attenzione sul principale allergene della pesca, Pru p 3, una lipid transfer protein di cui sono depositate in banca dati due sequenze, una proposta da Pastorello et al.<sup>1</sup>, l'altra da Diaz-Perales et al.<sup>2</sup>, differenti per soli due residui amminoacidici; l'analisi HPLC-MS effettuata sulla miscela di peptidi derivante dalla digestione triptica della proteina nativa verrà utilizzata per confermare l'una o l'altra sequenza.

Essendo nota l'elevata resistenza delle LTPs all'azione idrolitica della pepsina, si vuole inoltre verificare il comportamento del principale allergene della pesca in una simulazione di digestione gastrointestinale; anche in questo caso, la successiva analisi HPLC-MS effettuata sul digerito sarà utile per valutare l'entità di digestione della proteina, e la natura dei principali prodotti formati.

### **11.1 Le LTP di origine vegetale: una nuova famiglia di allergeni alimentari**

L'allergia pollino-simile rappresenta la più comune forma di ipersensibilizzazione alimentare nella popolazione adulta<sup>3</sup>; in particolare si è visto che molte persone affette da allergia pollino-simile ai frutti delle *Rosaceae* (principalmente mela), a vegetali come carote e tuberi, ed alle nocciole, si concentrano soprattutto in quelle zone (Europa del nord e centrale) dove gli alberi di betulla sono molto abbondanti<sup>4</sup>: sembrerebbe che ad essere responsabili di questa reattività crociata siano soprattutto allergeni omologhi appartenenti alle famiglie di Bet v 1 (il principale allergene del polline di betulla) e della profilina<sup>5</sup>.

I pazienti affetti da questo tipo di allergia presentano in generale una sintomatologia di tipo lieve, limitata al cavo orale (oral allergy syndrome, OAS), e la sensibilizzazione primaria è dovuta principalmente agli allergeni pollinei<sup>6</sup>; la mancanza di gravi fenomeni sistemici è

probabilmente da ascrivere al fatto che sia le profilline che gli omologhi della Bet v 1 mostrano una scarsa resistenza alla digestione gastrointestinale<sup>7</sup>.

In contrasto con questo quadro clinico, nell'area mediterranea la popolazione allergica ai frutti delle *Rosaceae* (specialmente pesca) presenta un quadro clinico differente, in quanto, in molti casi, si registra una forma di allergia priva di reattività crociata al polline (infatti sono difficilmente rivelabili IgE contro Bet v 1)<sup>8</sup>, e spesso la sintomatologia è complicata da fenomeni di tipo sistemico, anche in assenza di sindrome orale; è stato visto che in tale popolazione l'insorgenza di fenomeni allergici è dovuta principalmente ad un diverso tipo di proteine, le Lipid Transfer Proteins (LTPs) non-specifiche<sup>9</sup>, che, a differenza degli allergeni suddetti, mostrano una elevata resistenza all'azione idrolitica della pepsina ed ai trattamenti termici<sup>10</sup>.

Le LTPs di origine vegetale rappresentano una famiglia di proteine basiche (pI~9) a basso peso molecolare, con un numero di residui amminoacidici compreso tra 91 e 95, ed un peso intorno ai 9kDa<sup>11</sup>; le diverse proteine mostrano un vario grado di omologia di sequenza (da 30% a 95%), tuttavia sono accomunate dal possedere 8 residui di cisteina altamente conservati, che, formando tra loro 4 ponti disolfuro, sono responsabili della forma altamente compatta di queste proteine. Studi strutturali condotti sulla LTP di cereale hanno permesso di ipotizzare una struttura in cui la catena polipeptidica si organizza in 4  $\alpha$ -eliche separate da corte sequenze turn, terminando in una coda C-terminale flessibile e non strutturata<sup>12</sup>; la conformazione tridimensionale altamente ripiegata è successivamente assicurata dalla formazione dei suddetti ponti disolfuro, e presenta al suo interno, lungo l'asse principale della proteina, una cavità idrofobica probabilmente coinvolta nella funzione di trasporto di componenti lipidiche.

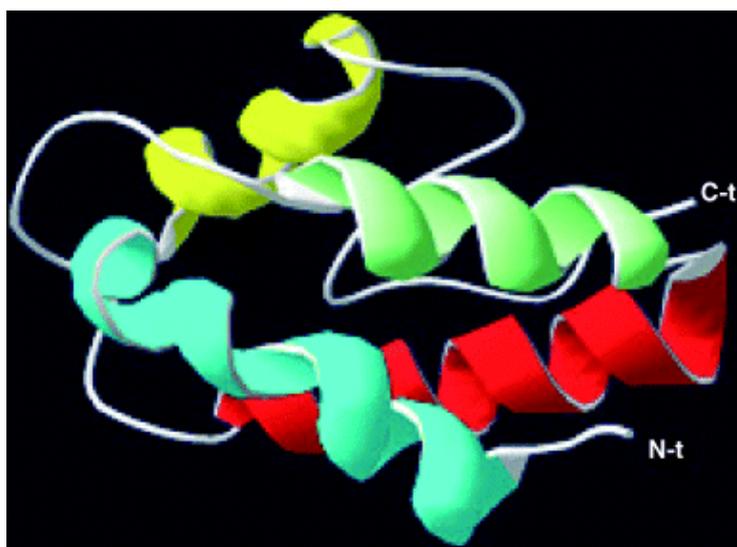
Queste proteine sono principalmente espresse negli organi aerei delle piante (foglie, semi, fiori, frutti)<sup>13</sup>, accumulandosi in particolare negli strati cellulari epidermici più esterni, quali la buccia dei frutti<sup>14</sup>, mentre risulta praticamente nulla la presenza degli allergeni nelle radici.

Inizialmente si era propensi a credere che il ruolo fisiologico delle LTPs fosse quello di trasporto intracellulare di lipidi (di qui il nome), supportato dal fatto che queste proteine sono in grado di trasportare *in vitro* un gran numero di lipidi attraverso le membrane<sup>11</sup>; tuttavia ciò è in contrasto con la loro localizzazione extracellulare, associate alla barriera cellulare, e con le ultime evidenze sperimentali per cui queste proteine manifesterebbero una potente attività battericida e fungicida, indicando quindi un loro ruolo primario nei

meccanismi di difesa delle piante contro patogeni esterni<sup>14</sup>. Tale ruolo sarebbe, comunque, compatibile con altre possibili funzioni postulate per le LTPs, prima fra tutte quella di assemblare, a livello extracellulare, polimeri lipofili di superficie (cutina e suberina)<sup>12</sup>, mediante il trasporto delle loro unità monomeriche verso gli strati più esterni degli organi aerei.

Le lipid transfer proteins sono allergeni alimentari particolarmente tenaci, prima di tutto per la loro elevata resistenza alla digestione gastrointestinale, in particolare all'azione idrolitica della pepsina, che consente loro di mantenere inalterata la loro capacità di interagire con il sistema immunitario dell'epitelio gastrointestinale, e quindi di provocare effetti a livello sistemico<sup>15</sup>; inoltre sono proteine con un'elevata resistenza ai trattamenti termici, il che implica la presenza di forme allergenicamente immutate all'interno di cibi e bevande (marmellate, succhi di frutta, dolci, etc.)<sup>16</sup>.

Sin dal 1992 sono state scoperte, in estratti di frutti di *Rosaceae*, bande elettroforetiche nel range di 8-13 kDa in grado di legare IgE di pazienti mediterranei allergici a tali frutti ma non al polline di betulla<sup>17</sup>. I primi ad identificare nel 1999 tali bande come lipid transfer proteins sono stati Sánchez-Monge et al.<sup>18</sup>, e Pastorello et al.<sup>19</sup>, che hanno isolato dalla pesca (*Prunus persica*) e dalla mela (*Malus domestica*) due allergeni di 9078 e 9138 Da, designati rispettivamente Pru p 3 e Mal d 3; in figura 11.1 è riportata la struttura altamente ripiegata di Pru p 3.



**Figura 11.1. Struttura della LTP di pesca (Pru p 3)**

Durante gli ultimi anni sono stati identificati numerosi allergeni di origine vegetale appartenenti alla famiglia delle LTP. Si tratta generalmente di proteine di frutti delle *Rosaceae*: oltre a Pru p 3 e Mal d 3, allergeni con elevata omologia di sequenza (>80%) sono stati identificati nell'albicocca (*Prunus armeniaca*; Pru ar 3)<sup>20</sup>, nella ciliegia (*Prunus avium*; Pru av 3)<sup>21</sup>, e nella prugna (*Prunus domestica*; Pru d 3)<sup>22</sup>. Tuttavia LTP allergeniche con diverso grado di omologia di sequenza sono state riscontrate anche in altri frutti, quali l'uva da vino, in vegetali, quali l'asparago, la carota, e la lattuga, nella nocciola ed in prodotti derivati da cereali; fenomeni di cross-reaction tra queste lipid transfer proteins e quelle delle *Rosaceae* sono state dimostrate sia *in vitro*<sup>23</sup> che *in vivo*<sup>24</sup>.

L'allergene Pru p 3 è stato molto studiato negli ultimi anni, ne è stata caratterizzata estensivamente la struttura, e sono stati identificati gli epitopi riconosciuti dalle IgE<sup>25</sup>; tuttavia di questa proteina sono state depositate in banca dati due sequenze leggermente diverse, una da Pastorello et al. (1999), che l'ha ricavata sequenziando la proteina tal quale, isolata dal frutto (NLT1\_PRUPE)<sup>1</sup>, l'altra da Diaz-Perales et al. (2002), che l'ha ricavata a partire dalla corrispondente sequenza genomica (Q9LED1)<sup>2</sup>. Le due sequenze sono in entrambi i casi formate da 91 ammino acidi, e sono praticamente identiche, tranne che per due residui amminoacidici; si potrebbe trattare di due isoforme della stessa proteina, anche se alcune evidenze sperimentali, quali uguale punto isoelettrico ed uguale mobilità elettroforetica, farebbero pensare che si tratti della medesima proteina.

## 11.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

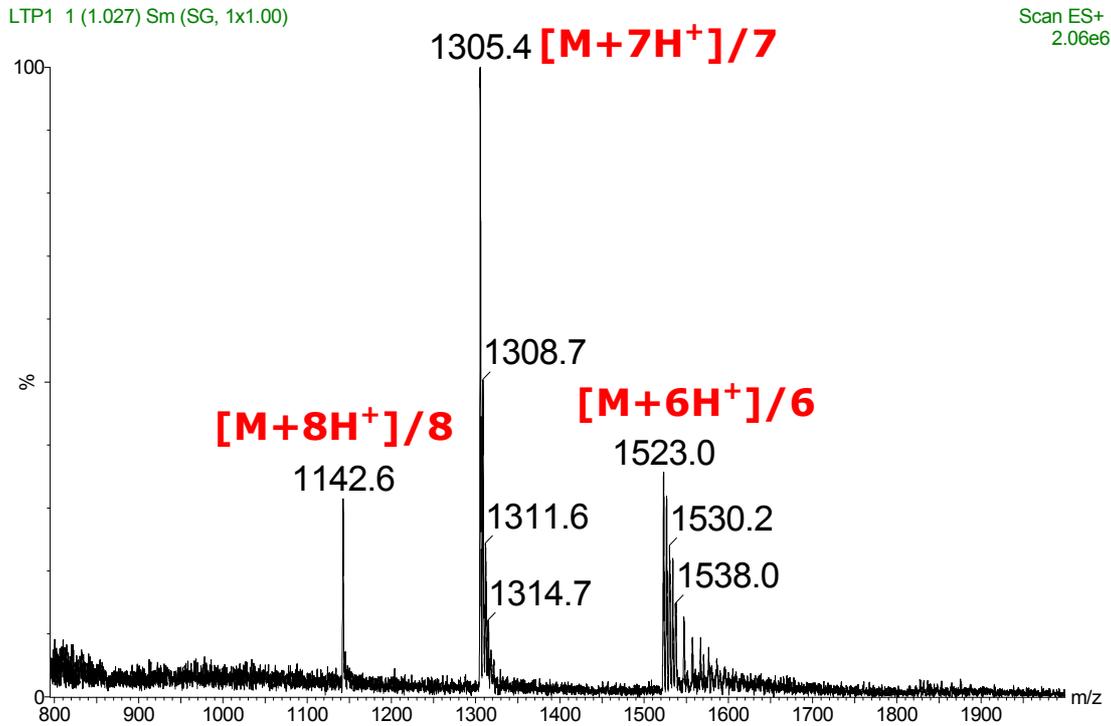
### 11.2.1 Determinazione del peso molecolare della LTP di pesca per infusione in massa

Le due sequenze depositate in banca dati differiscono, come detto, unicamente per due residui amminoacidici; in particolare le due serine in posizione 9 e 76 della sequenza di Diaz-Perales et al. sono sostituite, rispettivamente, da una alanina ed una istidina nella sequenza proposta da Pastorello et al., comportando in questo modo una differenza nel peso molecolare.

Basandoci sulla proteina nativa fornita dalla prof.ssa Pastorello, per prima cosa si è eseguita un'infusione in elettrospray, al fine di determinare, in modo più rigoroso possibile, la massa della proteina. Sono stati calcolati i pesi molecolari delle due sequenze, tenendo conto, in

entrambi i casi, della presenza dei quattro ponti disolfuro: 9163,5 Da per la sequenza depositata da Pastorello et al., 9129,5 Da per quella di Diaz-Perales et al.

L'infusione della proteina nativa ha dato lo spettro di massa riportato in figura 11.2.



**Figura 11.2. Spettro di massa della LTP nativa di pesca**

Dallo spettro di massa si evidenzia la presenza di un pattern multicarica tipico di una proteina, con una serie di segnali corrispondenti rispettivamente alla molecola con 8, 7, e 6 protoni.

In tabella 11.1 sono riportati i rapporti massa/carica calcolati per le due sequenze ipotetiche, e confrontati con quelli trovati sperimentalmente:

**Tabella 11.1. Confronto tra i rapporti massa/carica per le due sequenze ipotetiche**

z	m/z sperimentale	m/z Q9LED1	m/z NLT1_PRUPE
8	1142,6	1142,2	1146,4
7	1305,4	1305,2	1310,1
6	1523,0	1522,6	1528,3

z = numero di cariche; m/z = rapporto massa/carica

Si può osservare subito come i rapporti massa/carica osservati siano molto simili a quelli calcolati per la sequenza depositata da Diaz-Perales et al.; di conseguenza anche il corrispondente peso molecolare calcolato sulla base di tali segnali (9132 Da) è molto più vicino a quello di Q9LED1 (9130 Da) che a quello di NLT1\_PRUPE (9164 Da).

Questa è sicuramente una prima evidenza sperimentale molto importante a favore della sequenza Q9LED1.

### **11.2.2 Digestione triptica della LTP nativa**

Il solo peso molecolare, per quanto indicativo, non fornisce informazioni sulla sequenza di una proteina, si è quindi evidenziata la necessità di operare una digestione enzimatica al fine di analizzare per HPLC-MS la miscela di peptidi derivanti, e ricercare quelle sequenze che contengano al loro interno i residui amminoacidici diagnostici della sequenza effettiva; la scelta è ricaduta sulla tripsina in quanto la LTP, avendo un punto isoelettrico elevato (~9), è molto ricca di residui basici, e quindi di siti di taglio per l'azione di tale enzima.

Il principale inconveniente della LTP di pesca consiste nel fatto che, come tutte le altre LTP attualmente note, possiede una conformazione fortemente ripiegata, tenuta insieme da ben quattro ponti disolfuro<sup>11</sup>; è necessario quindi operare una denaturazione della proteina, con concomitante riduzione dei ponti disolfuro ed alchilazione dei residui di cisteina liberi, perché l'enzima possa raggiungere agevolmente tutti i siti di taglio teorici.

Nelle tabelle 11.2 e 11.3 sono riportati i frammenti teorici che ci si dovrebbe aspettare dalla digestione triptica delle due sequenze: diagnostici risulterebbero i due peptidi corrispondenti alle sequenze 1-18 e 73-80, in quanto contenenti le due posizioni di incertezza, e che quindi avrebbero diverso peso molecolare; la loro effettiva presenza nel digerito triptico sarebbe un prova decisiva nel confermare l'una o l'altra sequenza.

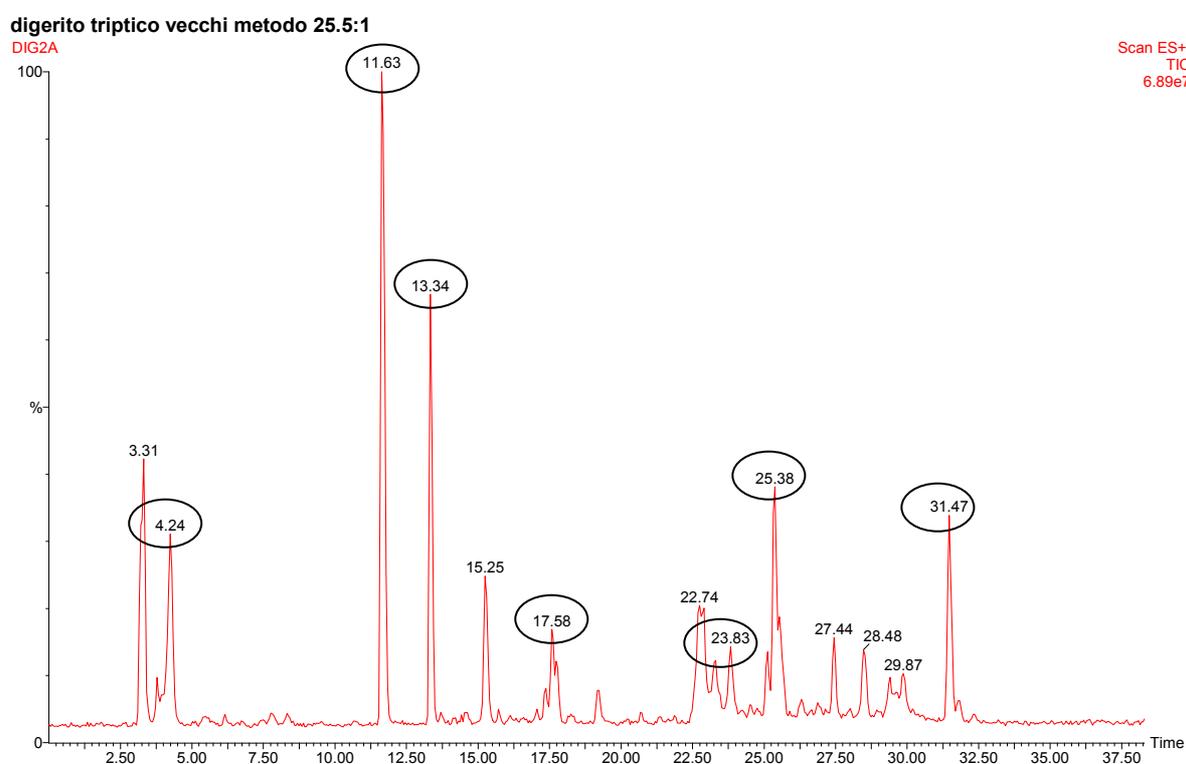
**Tabella 11.2. Frammenti attesi per NLT1\_PRUPE**

Peso molecolare	Posizione	Sequenza
1905,0	53-72	QLSASVPGVNPNNAAALPGK
1878,2	1-18	ITCGQVSSALAPCIPYVR
1271,5	19-32	GGGAVPPACCNGIR
1094,2	81-91	ISASTNCATVK
916,0	73-80	CGVHIPYK
850,0	45-52	QAACNCLK
799,9	33-39	NVNNLAR
588,6	40-44	TTPDR

**Tabella 11.3. Frammenti attesi per Q9LED1**

Peso molecolare	Posizione	Sequenza
1905,0	53-72	QLSASVPGVNPNNAAALPGK
1894,2	1-18	ITCGQVSSSLAPCIPYVR
1271,5	19-32	GGGAVPPACCNGIR
1094,2	81-91	ISASTNCATVK
866,0	73-80	CGVSIPYK
850,0	45-52	QAACNCLK
799,9	33-39	NVNNLAR
588,6	40-44	TTPDR

In un primo momento si è provato a digerire direttamente la proteina nativa: la digestione è stata condotta in tampone di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM a (pH=7,8), e sono state fatte numerose prove utilizzando diversi rapporti proteasi/proteina e diversi tempi di digestione: i risultati migliori si sono ottenuti con un rapporto di 1:27,5, e prolungando la digestione per 24h; la reazione enzimatica è stata quindi bloccata per congelamento a  $-18^\circ\text{C}$ , e la miscela di peptidi ottenuta è stata analizzata per HPLC-MS, utilizzando una colonna a fase inversa C18, e come rivelatore uno spettrometro di massa con analizzatore a singolo quadrupolo ed interfacciamento elettrospray. Il cromatogramma in corrente ionica totale è riportato in figura 11.3.



**Figura 11.3. TIC del digerito triptico della LTP di pesca nativa**

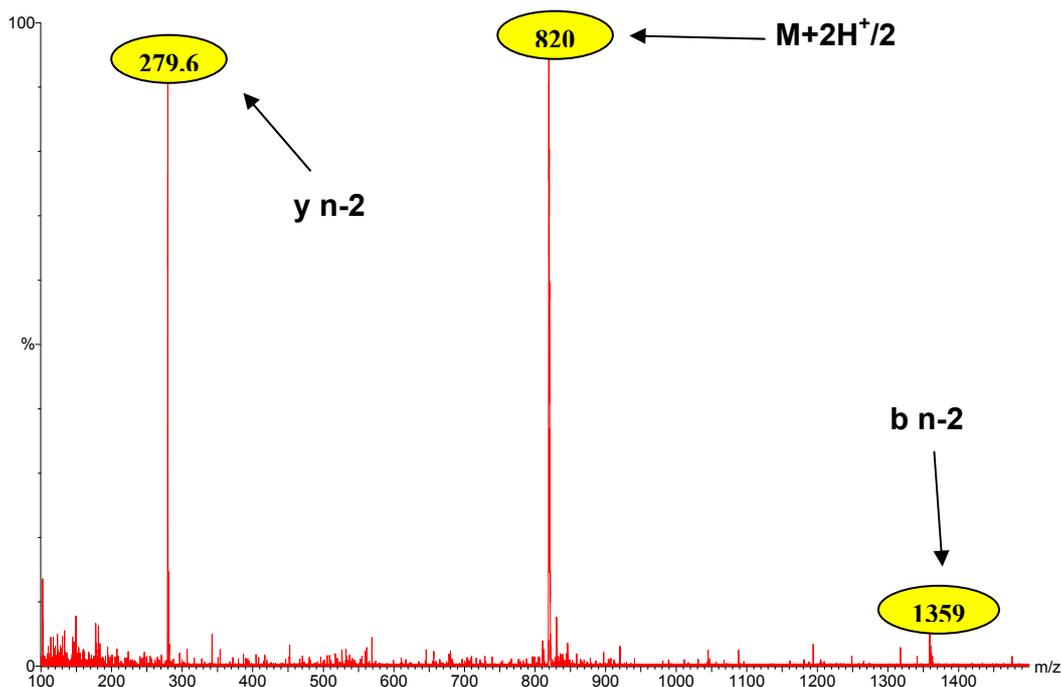
Si è proceduto quindi all'identificazione dei picchi, sulla base del peso molecolare e del pattern di frammentazione (si veda il capitolo 6); per molti di essi è stato possibile risalire alla sequenza, e quindi alla posizione all'interno della LTP (tabella 11.4).

**Tabella 11.4. Identificazione dei peptidi del digerito triptico della proteina nativa**

Tempo di ritenzione (min)	PM (Da)	Posizione	Sequenza
4,24	273	17-18	VR*
11,63	588	40-44	TTPDR
13,34	473	36-39	NLAR*
17,58	741	65-72	NAAALPGK*
23,83	1183	53-64	QLSASVPGVNP*
25,38	1905	53-72	QLSASVPGVNPNNAAALPGK
31,47	1638	1-16	ITCGQVSSSLAPCIPY*

\* frammenti insoliti

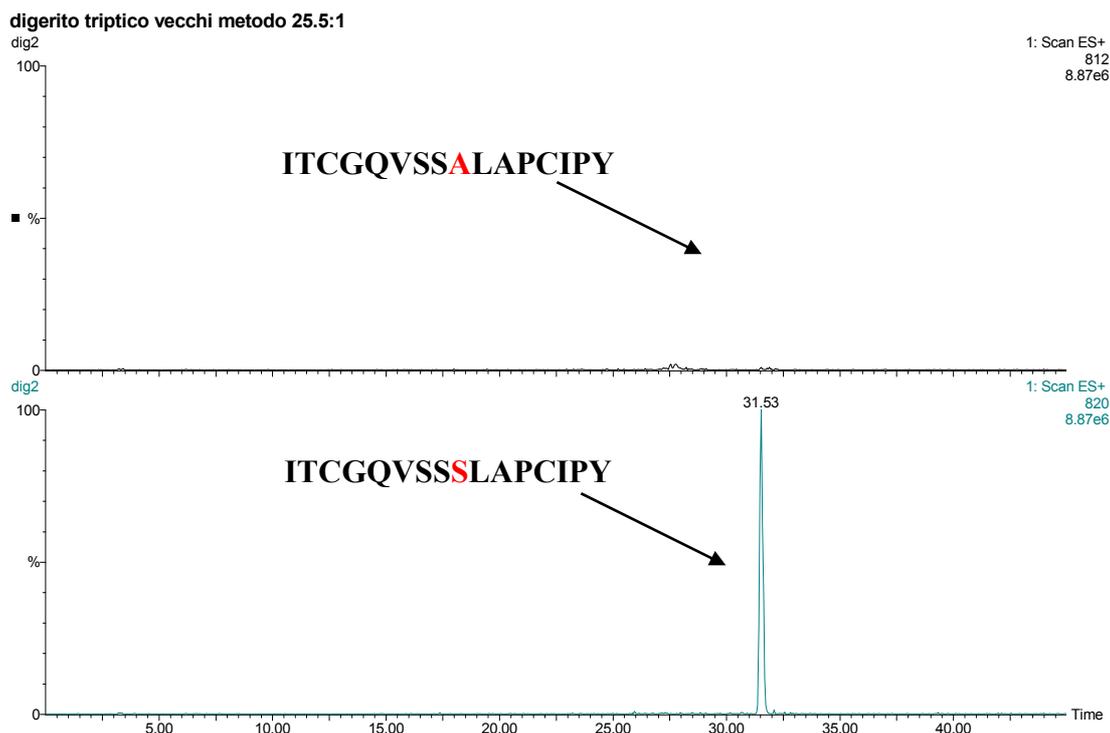
Si può subito vedere come i peptidi identificati non siano in grado di coprire l'intera sequenza della proteina, in quanto, come ci si aspettava, non si trovano frammenti relativi al core centrale ricco di cisteine; inoltre, contrariamente a quanto ci si potrebbe aspettare, si trovano una serie di peptidi insoliti, derivanti da taglio aspecifico della tripsina. Tuttavia si evidenzia la presenza di un peptide particolarmente diagnostico, con tempo di ritenzione di 31,47 minuti, ed un peso molecolare di 1638 Da; l'analisi del suo spettro di massa (figura 11.4), in cui lo ione caratteristico è quello corrispondente al doppio caricato, ed in cui si vede chiaramente la perdita del dipeptide C-terminale PY, ha permesso di identificare tale peptide come il frammento 1-16, di peso molecolare coincidente con la sequenza proposta da Diaz-Perales et al., con un residuo di serina in posizione 9.



**Figura 11.4. Spettro di massa del frammento 1-16**

Si tratta di un peptide anch'esso insolito, in quanto generato da un taglio aspecifico tra la tirosina 16 e la valina 17, ma il fatto di trovare nel cromatogramma, con tempo di eluizione pari a 4,24 minuti, anche il dipeptide VR (posizione 17-18) farebbe pensare che l'attività triptica generi in un primo momento la sequenza attesa 1-18, da cui viene poi rimossa aspecificamente (si consideri anche il tempo prolungato di digestione) il dipeptide C-terminale.

Per essere sicuri che non ci trovassimo di fronte ad una miscela di due isoforme della stessa proteina, si è provato ad estrarre dal cromatogramma TIC sia lo ione caratteristico osservato per il frammento 1-16 (doppio caricato = 820m/z), sia quello ipotetico corrispondente alla sequenza proposta da Pastorello et al., con un residuo di alanina in posizione 9 (doppio caricato = 812m/z); in figura 11.5 è riportato il confronto tra i due cromatogrammi estratti (XIC).



**Figura 11.5. Confronto tra gli XIC delle due ipotetiche sequenze 1-16**

La totale assenza della sequenza contenente l’alanina porta ad escludere l’ipotesi della miscela di due isoforme, che sarebbe stata messa in evidenza anche dalla precedente infusione in massa.

A questo punto si hanno due evidenze sperimentali a favore della sequenza di Diaz-Peralez et al.: l’ulteriore conferma deriverebbe dall’analisi dell’altra posizione di incertezza, la 76, che si trova nel “core” centrale non intaccato dalla digestione della proteina tal quale; di qui la necessità di sottoporre il digerito triptico ad una procedura di riduzione dei ponti disolfuro e di alchilazione dei residui liberi di cisteina con iodoacetammide.

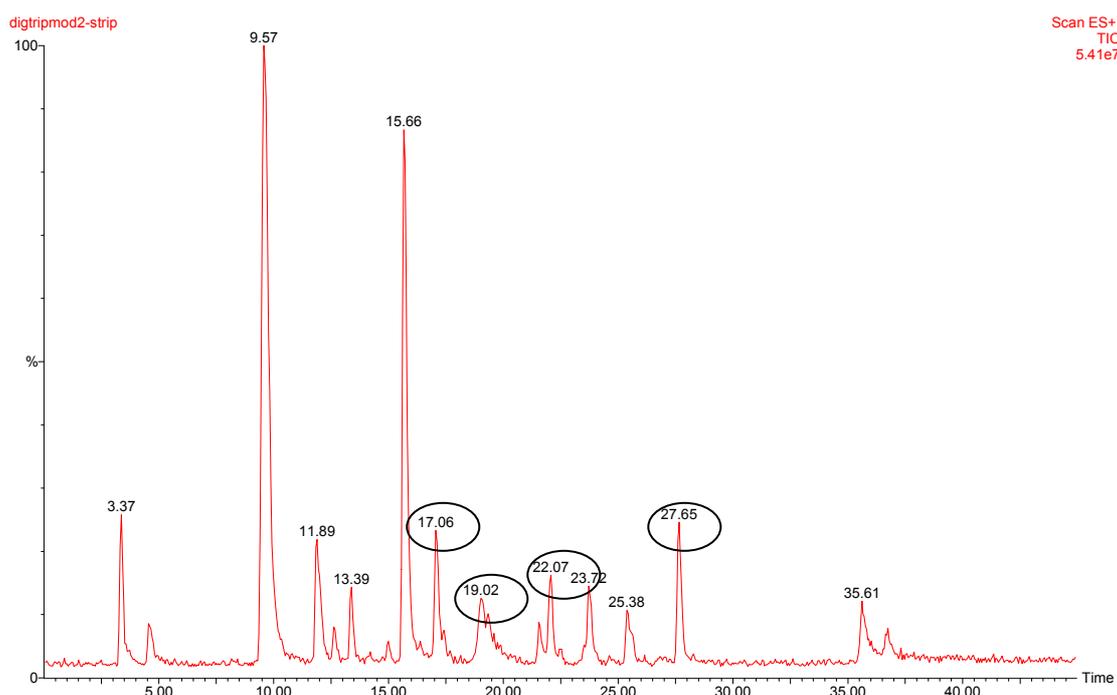
### **11.2.3 Riduzione dei ponti disolfuro ed alchilazione delle cisteine libere post-digestione**

I primi esperimenti condotti operando la procedura di denaturazione seguita da digestione non hanno dato buoni risultati, probabilmente per via del fatto che gli otto residui di cisteina potrebbero riarrangiarsi in altro modo a formare nuovi ponti disolfuro, rendendo così complicata la successiva azione enzimatica.

Si è optato quindi per un'altra via: digestione iniziale della proteina nativa, al fine di rompere tutti i siti di taglio situati all'esterno della proteina (si veda il paragrafo precedente), e successiva riduzione ed alchilazione dei residui di cisteina.

La riduzione dei ponti disolfuro sul digerito triptico è stata condotta utilizzando il ditiotreitolo come agente riducente, e lasciando reagire per 1h a temperatura ambiente; si è proceduto quindi all'aggiunta di un largo eccesso di iodoacetammide, al fine di alchilare i residui di cisteina liberi. Anche in questo caso la reazione è stata condotta per un'ora a temperatura ambiente, e l'eccesso di iodoacetammide è stato successivamente neutralizzato utilizzando lo stesso ditiotreitolo.

La miscela di reazione è stata analizzata per HPLC-MS, in modo del tutto analogo a quanto visto in precedenza; il cromatogramma in corrente ionica totale corrispondente è riportato in figura 11.6.



**Figura 11.6. TIC del digerito triptico sottoposto a riduzione ed alchilazione**

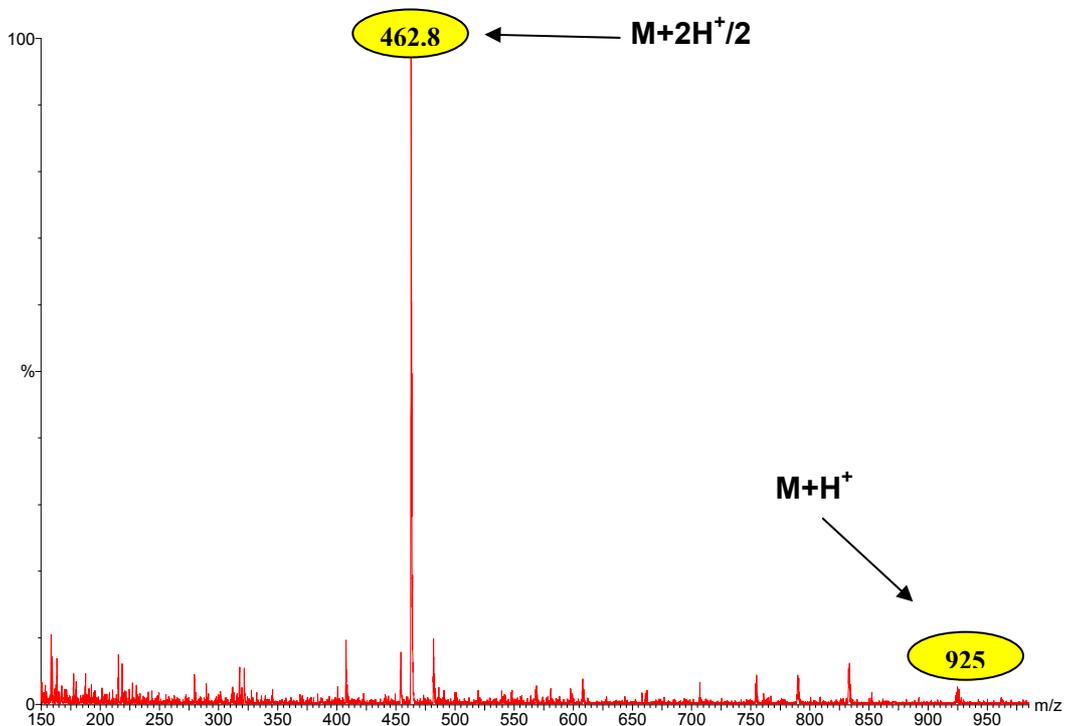
Si osserva una serie di nuovi picchi corrispondenti a molecole di natura peptidica, per cui, analogamente a quanto visto prima, si è proceduto alla loro identificazione (tabella 11.5); i due picchi con tempo 9,57 minuti e 15,66 minuti corrispondono, rispettivamente, al ditiotreitolo dialchilato ed al dimero del ditiotreitolo monoalchilato.

**Tabella 11.5. Identificazione dei peptidi del digerito triptico dopo riduzione ed alchilazione**

Tempo di ritenzione (min)	PM (Da)	Posizione	Sequenza
17,06	1152	81-91	ISASTNC*ATVK
19,02	1386	19-32	GGGAVPPAC*C*NGIR
22,07	924	73-80	C*GV <b>S</b> IPYK
27,65	1753	1-16	ITC*GQVSS <b>L</b> APC*IPY

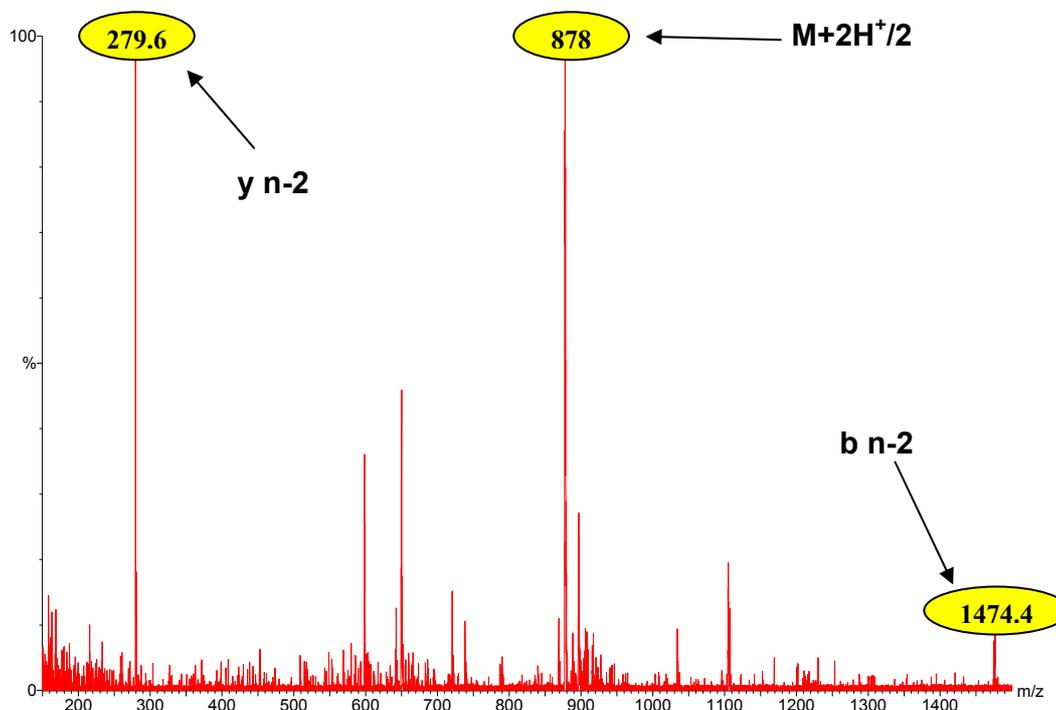
C\* = cisteina alchilata

La prima cosa che si osserva è che compaiono i peptidi corrispondenti al nucleo centrale della proteina; in particolare uno di questi (22,07 minuti) corrisponde alla sequenza 73-80, al cui interno si trova la seconda posizione di incertezza, ed il cui peso molecolare è in accordo con la sequenza proposta da Diaz-Perales, con una residuo di serina in posizione 76 (spettro di massa in figura 11.7).



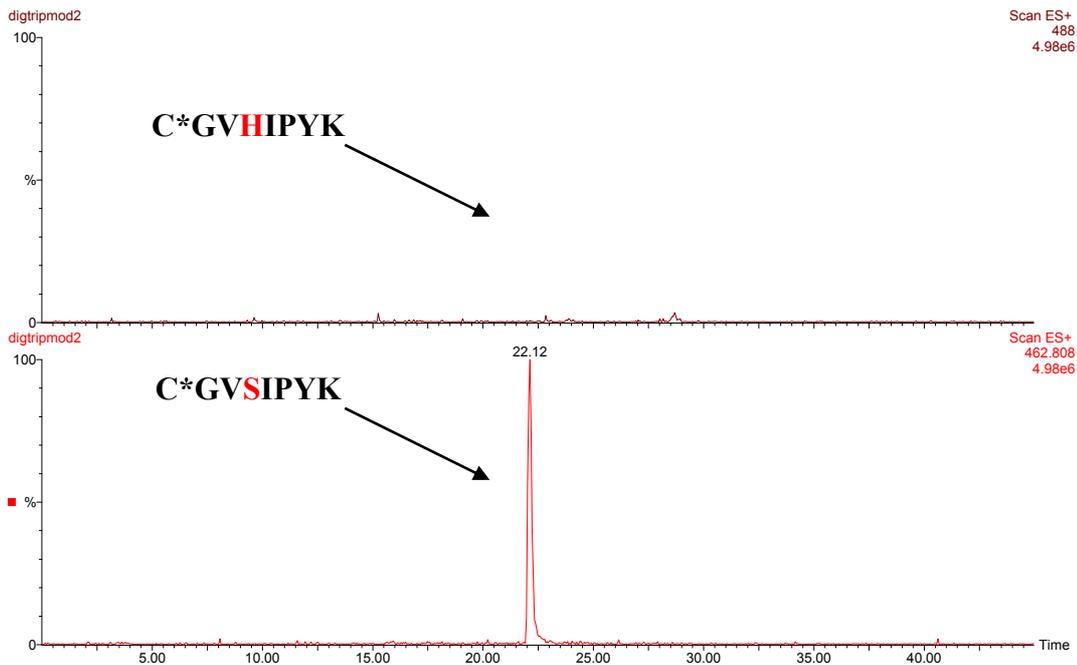
**Figura 11.7. Spettro di massa del frammento 73-80 monoalchilato**

Inoltre si osserva la scomparsa del peptide 1-16, che, contenendo due residui di cisteina, ricompare in forma dialchilata con un tempo di eluizione inferiore (27,65 minuti), ad ulteriore conferma che si trattasse proprio della sequenza postulata (spettro di massa riportato in figura 11.8).

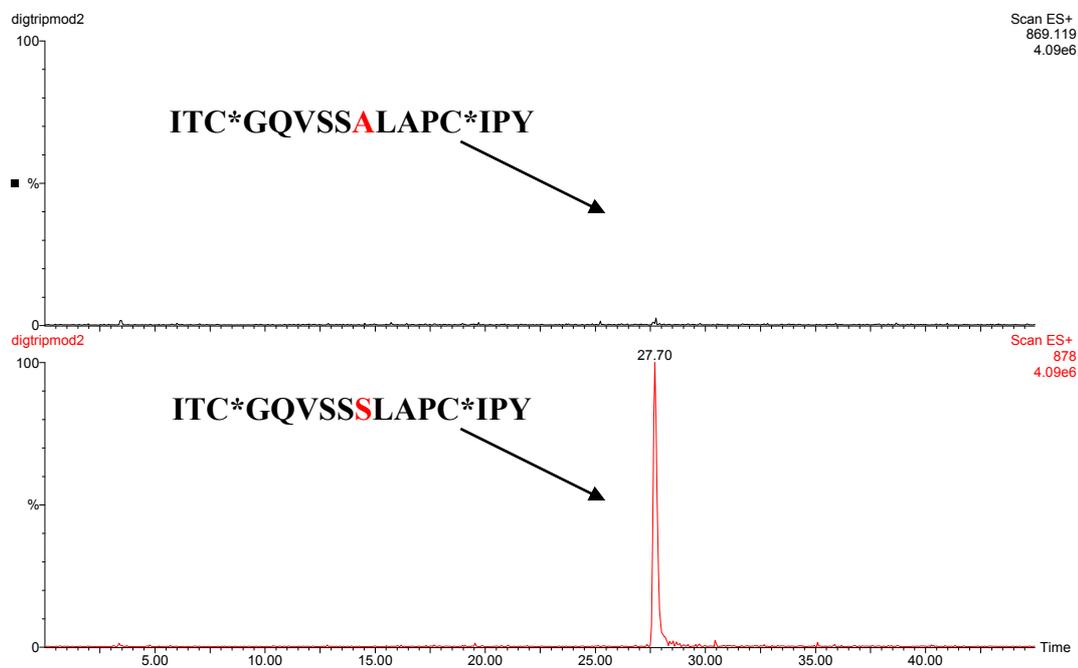


**Figura 11.8. Spettro di massa del frammento 1-16 dialchilato**

Anche per questi due peptidi si sono cercati, mediante la tecnica dello ione estratto (XIC), i corrispondenti con i residui di istidina e di alanina rispettivamente (sequenza proposta da Pastorello et al.), verificandone la totale assenza (figure 11.9 e 11.10).



**Figura 11.9. Confronto tra gli XIC delle due ipotetiche sequenze 73-80 monoalchilate (ioni estratti: 488 e 462.8, entrambi doppi caricati)**



**Figura 11.10. Confronto tra gli XIC delle due ipotetiche sequenze 1-16 dialchilate (ioni estratti: 869 e 878, entrambi doppi caricati)**

A questo punto tutte le evidenze sperimentali portano a concludere che la sequenza da noi analizzata corrisponda a quella depositata in banca dati da Diaz-Perales (Q9LED1).

La sequenza Q9LED1 è stata ricavata a partire dalla sequenza genomica codificante per l'allergene **Errore. Il segnalibro non è definito.**: mediante PCR è stato ottenuto il cDNA corrispondente, che, successivamente, è stato inserito in un opportuno vettore, ed espresso in *Pichia pastoris*; la proteina ricombinante è stata quindi purificata mediante cromatografia gel-filtration, seguita da RP-HPLC, e sottoposta a sequenziamento automatizzato.

Pastorello et al. hanno, invece, ricavato la sequenza NLT1\_PRUPE sequenziando direttamente la proteina tal quale, isolata dal frutto<sup>1</sup>; si è eseguita la digestione triptica sulla proteina ridotta e piridiletalata, seguita da separazione dei peptidi derivanti mediante RP-HPLC, e sequenziamento di questi ultimi mediante degradazione di Edman. In parallelo, in modo da avere dei peptidi sovrapposti, è stata effettuata la digestione con l'endoproteinasi Asp-N, sia sulla proteina ridotta (idrolisi dei legami X-Asp), sia sulla proteina ossidata con acido performico (idrolisi dei legami X-Asp e X-CysA; CysA = acido cisteico); i peptidi derivanti dalle due digestioni sono stati sequenziati in modo analogo al digerito triptico.

Entrambi i lavori sono molto rigorosi, pertanto è possibile che la differenza osservata tra le due sequenze sia da imputare a diverse isoforme della stessa proteina, probabilmente estratte a partire da differenti qualità di pesca.

#### **11.2.4 Simulazione di digestione gastrointestinale della LTP**

Come già menzionato in precedenza, le proprietà allergeniche delle lipid transfer proteins sono particolarmente spiccate, in quanto si tratta di proteine con una elevata resistenza alla digestione gastrointestinale, soprattutto all'azione idrolitica della pepsina<sup>10</sup>; questo fa sì che sia elevata la quota di proteina integra in grado di arrivare a livello intestinale, mantenendo inalterata la capacità di interagire con il sistema immunitario dell'epitelio qui presente, e quindi di provocare effetti a livello sistemico. Sulla base di queste considerazioni, si è voluto verificare il comportamento del principale allergene della pesca in una simulazione di digestione gastrointestinale.

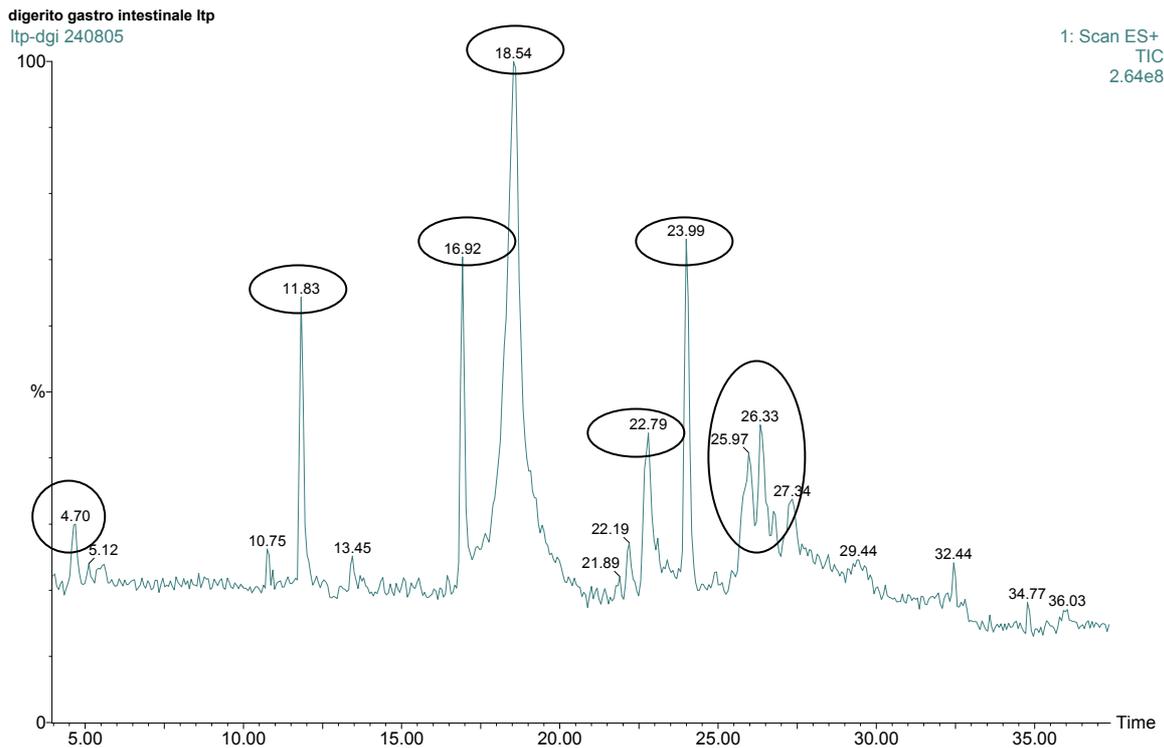
In letteratura sono presenti molti articoli relativi a prove di questo tipo condotte su diversi allergeni di origine alimentare, ognuno dei quali propone una procedura alquanto diversificata, sia per quanto riguarda il rapporto proteasi/proteina, sia per quanto riguarda i tempi ed i volumi di digestione; quasi tutti però concordano sulla necessità di operare in

due stadi, nel primo dei quali viene simulata la digestione gastrica, utilizzando la pepsina ed un pH prossimo a 2, mentre nel secondo si aggiusta il pH a circa 7,8 (pH dell'intestino) al fine di portarsi ad un optimum per l'azione enzimatica di tripsina e  $\alpha$ -chimotripsina (la temperatura di digestione per entrambi gli stadi è mantenuta a 37°C)<sup>26</sup>.

In questo lavoro si è cercato di operare utilizzando piccoli volumi e mantenendo concentrazioni di proteina simili a quelle viste per gli esperimenti precedenti. La simulazione di digestione gastrica è stata effettuata utilizzando una soluzione di HCl a pH 2, prossimo a quello fisiologico, ed un rapporto pepsina/LTP di 1:60,5, valore mediato tra i diversi riportati in letteratura; si è lasciato, quindi, digerire per 3 ore a 37°C, in modo da mimare il più possibile le condizioni fisiologiche. La digestione intestinale è stata condotta aggiustando il pH a circa 7,8 mediante un tampone 50mM di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (in queste condizioni la pepsina viene inattivata), e procedendo all'aggiunta della tripsina e dell' $\alpha$ -chimotripsina, in modo da avere un rapporto finale proteasi/proteina di 1:60,5 per entrambi gli enzimi; dopo 4 ore di digestione a 37°C si è proceduto all'analisi per HPLC-MS nelle condizioni viste in precedenza.

Al fine di valutare l'entità di digestione della LTP nelle suddette condizioni si è ritenuto opportuno aggiungere, all'inizio, alla miscela di reazione una quantità nota di un acido peptido nucleico (PNA; vedere parte sperimentale per la sequenza) che, essendo resistente all'attività proteasica, non ha subito degradazione nel corso della digestione; in parallelo è stato effettuato un controllo che, con le stesse concentrazioni di LTP e PNA, è stato sottoposto allo stesso trattamento senza l'aggiunta degli enzimi.

In figura 11.11 è riportato il cromatogramma in corrente ionica totale del digerito gastrointestinale.



**Figura 11.11. TIC del digerito gastrointestinale della LTP di pesca**

Si è proceduto all'identificazione dei singoli picchi (tabella 11.6).

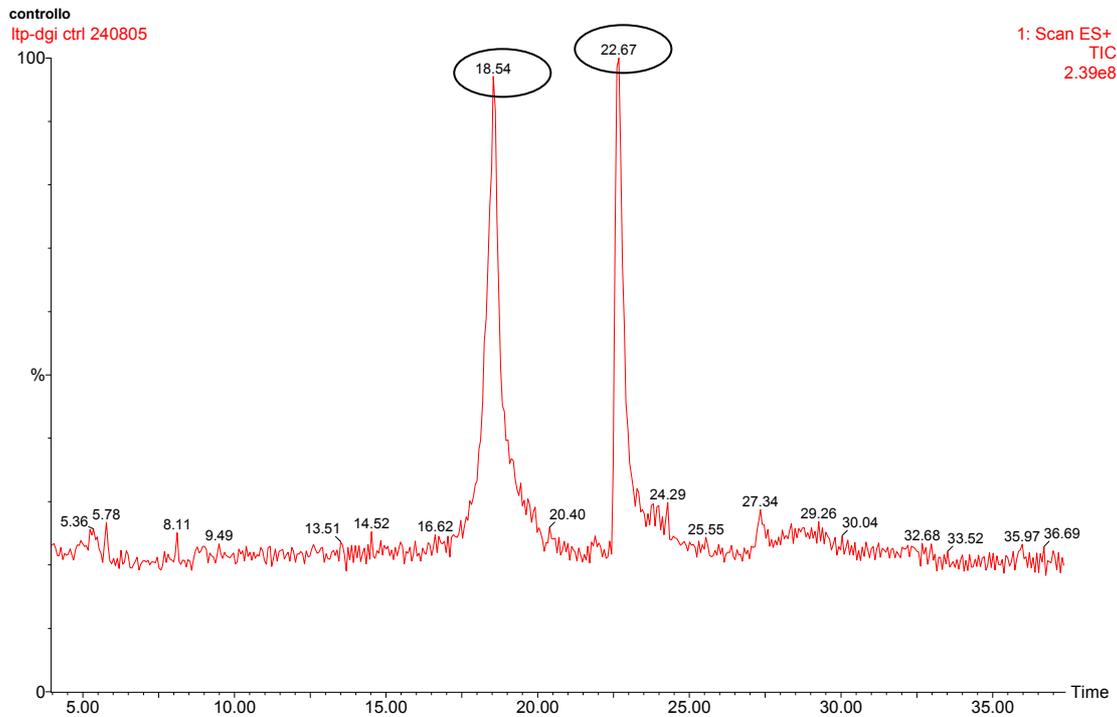
Si può osservare subito che tutti i peptidi identificati derivano da un'attività triptica, a conferma che le LTP sono proteine molto resistenti all'azione enzimatica della pepsina; inoltre si osserva tutta una serie di peptidi di grosso peso molecolare che verosimilmente corrispondono al core interno della proteina altamente inattaccabile in quanto tenuto insieme dai 4 ponti disolfuro.

Al fine di valutare l'entità di digestione dell'allergene, si è confrontata mediante HPLC-ESI-MS la quantità di proteina prima e dopo la digestione, effettuando un rapporto semiquantitativo con lo standard interno (PNA); il cromatogramma della proteina non digerita (controllo) è riportato in figura 11.12.

**Tabella 11.6. Identificazione dei picchi del digerito gastrointestinale**

Tempo di ritenzione (min)	PM (Da)	Posizione	Sequenza
4,7	273	17-18	VR
11,83	588	40-44	TTPDR
16,9	799	33-39	NVNNLAR
18,54	4238		PNA (standard)
22,8	9137		LTP integra
24	1905	53-72	QLSASVPGVNPNNAAALPGK
25,8	5385	-	-
25,9	5712	-	-
26,4	5584	-	-
26,5	7599	-	-
26,75	5258	-	-

- = sequenza non identificata



**Figura 11.12. TIC della LTP non digerita (18,54 min-PNA; 22,67 min-LTP)**

Sia per il cromatogramma del digerito gastrointestinale, che per quello relativo al controllo, sono stati estratti gli XIC relativi alla LTP ed al PNA usato come standard, e si è calcolato il rapporto tra le aree dei due; dal confronto percentuale dei due rapporti si evince che l'allergene integro dopo la digestione corrisponde al 26%. Questo dato dimostrerebbe che la proteina arriva in quantità consistente a livello dell'epitelio gastrointestinale, dove può esplicare la sua attività allergenica; è anche vero che i principali prodotti di degradazione sono rappresentati dai peptidi di grosso peso molecolare corrispondenti al "core" interno, che probabilmente continuano a mantenere una forte attività allergenica: in quest'ottica, la nota capacità della LTP di dare luogo a reazioni allergiche anche in seguito alla digestione gastrointestinale<sup>15</sup> sarebbe dovuta sia alla quota di proteina che arriva intatta a livello dell'epitelio intestinale, sia ai prodotti di grosso peso molecolare che si originano dall'attività proteasica.

## 11.3 PARTE SPERIMENTALE

### 11.3.1 Reagenti

- Tripsina suina, metilata sui residui di lisina (Trypsin Gold, mass spectrometry grade; Promega)
- $\alpha$ -chimotripsina (Sigma-Aldrich)
- Pepsina (Sigma-Aldrich)
- Ditiotreitolo (Sigma-Aldrich)
- Iodoacetammide (Sigma-Aldrich)
- Acido acetico glaciale (Carlo Erba)
- Tris (Sigma-Aldrich)
- Ammonio idrogenocarbonato (Aldrich)
- Acido cloridrico 0,1 N (ottenuto con fiala Normex; il contenuto viene portato al volume di 1000 ml con H<sub>2</sub>O bidistillata)
- Acetonitrile HPLC-grade (Carlo Erba)
- Acido formico puro 99% (Aldrich)
- Acqua bidistillata ottenuta con il sistema Millipore Alpha Q

### 11.3.2 Strumentazione

- La digestione è stata effettuata utilizzando un termociclatore PCR SPRINT della THERMO HYBAID.
- HPLC-MS: La colonna utilizzata per le analisi dei peptidi è una JUPITER 5  $\mu\text{m}$  C18 300 Å (250 x 4,6 mm). Le analisi sono state condotte utilizzando un sistema costituito da una pompa a quattro vie modello ALLIANCE WATERS 2695 connessa ad uno spettrometro di massa MICROMASS ZMD a singolo quadrupolo dotato di interfaccia ESI.
- Acquisizione dei dati mediante il software MASSLYNX 3.5.

### 11.3.3 Determinazione del peso molecolare della LTP di pesca per infusione in massa

Si procede all'infusione di 100 $\mu\text{l}$  di una soluzione di LTP 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in una miscela  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  1:1 con lo 0,2% di acido formico.

I parametri di acquisizione sono i seguenti:

- Ionizzazione: ioni positivi
- Voltaggio capillare: 3 kV
- Voltaggio cono: 30 V
- Temperatura sorgente: 100°C
- Temperatura desolvatazione: 150°C
- Gas di spray ( $\text{N}_2$ ): 100 l/h
- Gas di desolvatazione ( $\text{N}_2$ ): 400 l/h
- Acquisizione: full scan (150-1500 Da)
- Modalità: continua
- Tempo di scansione: 2,9 secondi
- Intervallo interscansione: 0,1 secondi

### 11.3.4 Digestione triptica della LTP nativa

Si miscelano in un eppendorf 10  $\mu\text{l}$  di una soluzione di LTP (5,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 100  $\mu\text{l}$  di tampone  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM (pH=7,8), e 2  $\mu\text{l}$  di tripsina Gold (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in soluzione di acido acetico 50mM); in questo modo il rapporto proteasi/proteina è di 1:27,5.

Si lascia digerire per 24 h a 37°C, quindi si blocca la reazione enzimatica per congelamento.

Si procede all'analisi in HPLC/MS:

- colonna a fase inversa C18
- interfacciamento ESI
- analizzatore a singolo quadrupolo

Gli eluenti utilizzati sono i seguenti:

- A: acqua + 0,2% acetonitrile + 0.1% ac.formico
- B: acetonitrile + 0,2% acqua + 0.1% ac.formico

Il gradiente utilizzato per l'analisi è riportato in tabella 11.7.

**Tabella 11.7. Gradiente utilizzato per l'analisi HPLC-MS**

T (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	100	0
5	100	0
35	60	40
45	60	40
46	0	100
56	0	100

Il volume iniettato è di 40 µl; il flusso utilizzato è 1 ml/min, ottenendo una efficiente separazione dei peptidi.

Parametri di acquisizione:

- Ionizzazione: ioni positivi
- Voltaggio capillare: 3 kV
- Voltaggio cono: 30 V
- Temperatura sorgente: 100°C
- Temperatura desolvatazione: 150°C
- Gas di spray (N<sub>2</sub>): 100 l/h
- Gas di desolvatazione (N<sub>2</sub>): 400 l/h

- Acquisizione: full scan (150-1500 Da)
- Modalità: continua
- Tempo di scansione: 2,9 secondi
- Intervallo interscansione: 0,1 secondi

### **11.3.5 Riduzione dei ponti disolfuro ed alchilazione delle cisteine libere post-digestione**

- Si aggiungono alla miscela di digestione 2,8 µl di una soluzione di ditionitrito (20mM in tampone tris 100mM) e si lascia per 1 h a temperatura ambiente, in modo da ridurre i ponti disolfuro;
- si aggiungono 11,2 µl di una soluzione di iodoacetammide (20mM in tampone tris 100mM) e si lascia per 1 h a temperatura ambiente, con conseguente alchilazione dei gruppi tiolici liberi;
- si aggiungono 11,2 µl della soluzione di ditionitrito e si lascia per 1 h a temperatura ambiente in modo da consumare la iodoacetammide che non ha reagito;
- si procede all'analisi in HPLC/MS nelle condizioni precedentemente descritte.

### **11.3.6 Simulazione di digestione gastrointestinale della LTP**

- Si miscelano in un eppendorf 11 µl di una soluzione di LTP (5,5µg/µl), 40 µl di una soluzione di HCl a pH 2, 2µl di una soluzione di pepsina (0,5µg/µl in acqua), e 11,6µl di una soluzione di un PNA (H-AEEA-TGCTAGAGTCAGCTT-NH<sub>2</sub>, 2,5µg/µl), opportunamente scelto come standard di digestione in quanto resistente all'attività proteolitica; in questo modo viene simulata la digestione gastrica (pH=2), con un rapporto proteasi/proteina di 1:60,5, e si lascia digerire per 3h a 37°C;
- si prosegue con la simulazione della digestione intestinale: si aggiusta il pH a 7,8 mediante l'aggiunta di 40µl di tampone NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM (pH=7,8), quindi si aggiungono 1µl di una soluzione di tripsina (1 µg/µl in acido acetico 50mM) e 2µl di una soluzione di chimotripsina (0,5µg/µl in acido acetico 50mM); il rapporto finale proteasi/proteina è di 1:60,5 per entrambi gli enzimi. Si lascia digerire per 4 h a 37°C, quindi si blocca la reazione enzimatica per congelamento. In parallelo si esegue un controllo, che viene sottoposto allo stesso trattamento senza l'aggiunta degli enzimi, sostituiti da uguali aliquote di tampone;

- si procede all'analisi in HPLC/MS nelle condizioni viste per la sola digestione triptica.

## 11.4 CONCLUSIONI

La digestione triptica della LTP della pesca, accoppiata ad un'analisi HPLC-ESI-MS del digerito triptico, ci ha permesso di dimostrare che la sequenza dai noi analizzata è identica a quella depositata da Diaz-Perales et al., in cui in posizione 9 e 76 sono presenti due residui di serina.

La LTP della pesca, come tutte le LTP finora note, è caratterizzata dalla presenza di 8 residui di cisteina altamente conservati, che si organizzano a formare 4 ponti disolfuro responsabili della conformazione altamente ripiegata della proteina, nonché della sua elevata stabilità alla digestione enzimatica; a tale proposito, particolarmente efficace si è rivelata l'idea di effettuare la riduzione dei ponti disolfuro, e la successiva alchilazione dei residui di cisteina liberi, non sulla proteina tal quale, ma sulla miscela di peptidi derivanti dalla digestione triptica della proteina. Tale procedura ci ha permesso di ottenere informazioni utili sulla sequenza proteica grazie all'ottenimento dei peptidi corrispondenti al "core" centrale, difficilmente accessibile.

La simulazione di digestione gastrointestinale condotta sull'allergene, ancora una volta unita ad analisi HPLC-ESI-MS della miscela di peptidi derivanti, ha confermato la nota resistenza di tale proteina alla digestione peptica, in quanto la maggior parte dei peptidi del digerito derivano da taglio triptico; inoltre, l'allergene integro dopo la digestione corrisponde al 26%, a dimostrazione che la proteina arriva in quantità consistente a livello dell'epitelio gastrointestinale, dove può esplicare la sua attività allergenica.

Quest'ultima potrebbe essere dovuta, oltre alla proteina integra, anche ai prodotti di grosso peso molecolare corrispondenti al nucleo centrale, che rappresentano i principali prodotti della simulazione di digestione.

## 11.5 BIBLIOGRAFIA

---

<sup>1</sup> Pastorello, E.A.; Ortolani, C.; Baroglio, C.; Pravettoni, V.; Ispano, M.; Giuffrida, M.G. et al. (1999) *Biol Chem*, **380**, 1315-1320.

<sup>2</sup> Díaz- Perales, A.; Garcia-Casado, G.; Sánchez-Monge, R.; García-Sellés, F.J.; Barber, D.; Salcedo, G. (2002) *Clin Exp Allergy*, **32**, 87-92.

- 
- <sup>3</sup> Ma, S.; Sicherer, S.H.; Nowak-Wegrzyn, A. (2003) *J Allergy Clin Immunol*, **112**, 784-788.
- <sup>4</sup> Eriksson, N.E.; Formgren, H.; Svenonius, E. (1982) *Allergy*, **37**, 437-443.
- <sup>5</sup> Vieths, S.; Scheurer, S.; Ballmer-Weber, B. (2002) *Ann NY Acad Sci*, **964**, 47-68.
- <sup>6</sup> Ebner, C.; Hirschwehr, R.; Bauer, L. et al. (1995) *J Allergy Clin Immunol*, **95**, 962-969.
- <sup>7</sup> Rodriguez-Perez, R.; Crespo, J.F.; Rodriguez, J. et al. (2003) *J Allergy Clin Immunol*, **111**, 634-639.
- <sup>8</sup> Fernández-Rivas, M.; González-Mancebo, E.; Rodríguez-Pérez, R. et al. (2003) *J Allergy Clin Immunol*, **112**, 789-795.
- <sup>9</sup> Salcedo, G.; Sanchez-Monge, R.; Diaz-Perales, A.; Garcia-Casado, G.; Barber, D. (2004) *Clin Exp Allergy*, **34**, 1336-1341.
- <sup>10</sup> Asero, R.; Mistrello, G.; Roncarolo, D. et al. (2000) *Int Arch Allergy Immunol*, **122**, 20-32.
- <sup>11</sup> Kader, J.C. (1996) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **47**, 627-654.
- <sup>12</sup> Douliez, J.P.; Micron, T.; Elmorjani, K.; Marion, D. (2000) *J Cereal Sci*, **32**, 1-20.
- <sup>13</sup> Botton, A.; Begheldo, M.; Rasori, A.; Bonghi, C.; Tonutti, P. (2002) *Plant Sci*, **163**, 993-1000.
- <sup>14</sup> García-Olmedo, F.; Molina, A.; Segura, A.; Moreno, M. (1995) *Trends Microbiol*, **3**, 72-74.
- <sup>15</sup> Van Ree, R. (2002) *Biochem Soc Trans*, **30**, 910-913.
- <sup>16</sup> Brenna, O.; Pompei, C.; Ortolani, C.; Pravettoni, V.; Farioli, L.; Pastorello, E.A. (2000) *J Agric Food Chem*, **48**, 493-497.
- <sup>17</sup> Lleonart, R.; Cistero, A.; Carreira, J.; Batista, A.; Moscoso del Prado, J. (1992) *Ann Allergy*, **69**, 128-130.
- <sup>18</sup> Sánchez-Monge, R.; Lombardero, M.; García-Sellés, F.J. et al. (1999) *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 514-519.
- <sup>19</sup> Pastorello, E.A.; Farioli, L.; Pravettoni, V. et al. (1999) *J Allergy Clin Immunol*, **103**, 520-526.
- <sup>20</sup> Conti, A.; Fortunato, D.; Ortolani, C. et al. (2001) *J Chromatogr B*, **756**, 123-129.
- <sup>21</sup> Scheurer, S.; Pastorello, E.A.; Wangorsch, A.; Kästner, M.; Hausteiner, D.; Vieths, S. (2001) *J Allergy Clin Immunol*, **107**, 724-731.
- <sup>22</sup> Pastorello, E.A.; Farioli, L.; Pravettoni, V. et al. (2001) *J Chromatogr B*, **756**, 123-129.

- 
- <sup>23</sup> Díaz- Perales, A.; Lombardero, M.; Sánchez-Monge, R. et al. (2000) *Clin Exp Allergy*, **30**, 1403-1410.
- <sup>24</sup> García-Sellés, F.J.; Díaz- Perales, A.; Sánchez-Monge, R. et al. (2002) *Int Arch Allergy Immunol*, **128**, 115-122.
- <sup>25</sup> Garcia-Casado, G.; Pacios, L.F.; Díaz- Perales, A.; Sánchez-Monge, R.; Lombardero, M.; García-Sellés, F.J.; Polo, F.; Barber, D.; Salcedo, G. (2003) *J Allergy Clin Immunol*, **112**, 599-605.
- <sup>26</sup> Vermeirssen, V.; Van Camp, J.; Devos, L.; Verstraete, W. (2003) *J Agri Food Chem*, **51**, 5680-5687.

## **CONCLUSIONI FINALI**

## 12. Conclusioni finali

In questo lavoro di tesi si è valutata la grande potenzialità dell'interfacciamento dell'HPLC a fase inversa con la spettrometria di massa elettrospray applicata allo studio dei peptidi in matrici alimentari anche molto complesse, quali i formaggi. Un passaggio molto critico in un'analisi di questo tipo è rappresentata dalla fase di estrazione della frazione oligopeptidica, e dalla successiva deproteinizzazione, al fine di focalizzare l'attenzione esclusivamente sui peptidi a basso peso molecolare; in questo caso è stata utilizzata una procedura messa a punto dal nostro gruppo di ricerca, basata su precipitazione delle proteine con un agente precipitante blando (HCl 0,1N), e successive ultrafiltrazioni a cut-off progressivamente minore. Questo metodo di deproteinizzazione consente un recupero più completo della frazione oligopeptidica rispetto all'impiego di forti agenti precipitanti, quali acido tricloroacetico o trifluoroacetico, che oltre a far precipitare le proteine, porta, in genere, anche ad un impoverimento della frazione estratta.

In una prima parte del lavoro, l'analisi HPLC-ESI-MS è stata applicata allo studio della frazione oligopeptidica di formaggi modello tipo pecorino, prodotti a partire da latte crudo, omogeneizzato ad alte pressioni, e pastorizzato; tale analisi ha consentito di identificare e semiquantificare una serie di oligopeptidi, dei quali si è studiata, mediante analisi statistica, la correlazione con la stagionatura e con la tecnologia di produzione. L'analisi statistica ha messo in evidenza che nelle prime fasi della produzione casearia, così come nei primi giorni di stagionatura, non è possibile distinguere i campioni in base alla tecnologia di produzione, per via del fatto che il profilo peptidico risulta ancora molto povero e poco complesso. Le cose cambiano nettamente per tempi di stagionatura superiori, per i quali il profilo peptidico appare estremamente distintivo del trattamento di sanitizzazione subito dal latte; in particolare i campioni da latte pastorizzato mostrano un andamento molto diverso rispetto a quelli da latte crudo ed omogeneizzato, che invece sono tra loro piuttosto simili, ad indicare che il trattamento alle alte pressioni non modifica sostanzialmente l'attività enzimatica caratteristica del latte crudo. Meno spiccato è l'effetto della stagionatura sulla frazione oligopeptidica, soprattutto per i campioni da latte crudo ed omogeneizzato. Inoltre, sulla base dell'analisi statistica, è stato possibile osservare che i peptidi si sono distribuiti in due gruppi ben distinti, uno caratterizzante per il formaggio da latte pastorizzato ed uno caratterizzante per i formaggi da latte crudo ed omogeneizzato; all'interno di questi due gruppi è ipotizzabile che vi siano percorsi metabolici comuni.

L'analisi HPLC-ESI-MS è stata successivamente applicata allo studio della frazione oligopeptidica di formaggi vaccini modello tipo “caciotta”, anch'essi prodotti a partire da latte crudo, latte pastorizzato, e latte omogeneizzato ad alta pressione; analogamente a quanto visto per i formaggi di pecora, l'interfacciamento di HPLC a fase inversa con spettrometria di massa elettrospray ha permesso di identificare e semiquantificare una serie di oligopeptidi, focalizzando, in questo caso, l'attenzione soprattutto su quelli originati dalla degradazione della sequenza  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23). L'analisi statistica applicata ai risultati della semiquantificazione, e l'assenza di alcune particolari sequenze, hanno permesso di ipotizzare i possibili percorsi degradativi del suddetto peptide. L' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23), generato dall'azione diretta della chimosina sull' $\alpha_{S1}$ -caseina, viene rilasciato copiosamente fin dalle prime fasi di produzione, ma a sua volta subisce una rapida degradazione in seguito a diversi tagli endopeptidasici, dei quali il più importante sembra essere quello che avviene tra Asn 17 e Glu 18. L'analisi statistica ha evidenziato che i diversi tagli endopeptidasici, frutto probabilmente dell'azione delle proteasi del complesso sistema proteolitico dei batteri lattici, non sono contemporanei, ma avvengono a tempi diversi della stagionatura. I peptidi derivanti dai suddetti tagli, vanno a loro volta incontro a degradazione peptidasica, secondo pattern proteolitici che l'analisi statistica permette solo di ipotizzare. Significative differenze sono emerse nella composizione oligopeptidica delle tre tipologie di formaggio studiate, in particolare i formaggi a partire da latte omogeneizzato si distinguono per una maggiore attività carbossipeptidasica a carico dell' $\alpha_{S1}$ -CN(f1-23), mentre i formaggi da latte crudo si distinguono per un'elevata attività amminopeptidasica a carico dell'arginina in posizione 1 dell' $\alpha_{S1}$ -caseina.

Dal confronto tra la frazione oligopeptidica di formaggi da latte vaccino e quella di formaggi da latte ovino, è stato possibile evidenziare la presenza di sequenze peptidiche derivanti da siti di taglio comuni tra le caseine ovine e bovine; tali peptidi hanno la stessa localizzazione nella sequenza caseinica, ma possono differire per alcuni residui amminoacidici, rappresentando, in questo modo, dei potenziali marker del latte di origine. In particolare abbiamo focalizzato l'attenzione sul frammento  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14), che è fortemente rappresentato in entrambe le tipologie di formaggio, ma con diversi pesi molecolari: la presenza della sequenza vaccina è stata verificata in formaggi modello tipo pecorino prodotti a partire da latte misto (95% ovino, 5% vaccino), ma solo per campioni ottenuti da latte crudo ed omogeneizzato. Per questi campioni,  $\alpha_{S1}$ -CN(f1-14) vaccino rappresenta un ottimo marker di origine del latte, ed il rapporto percentuale calcolato tra

tale peptide ed il corrispondente analogo ovino sembra essere abbastanza indicativo della percentuale di latte bovino utilizzato per il taglio. Nel caso di formaggi da latte pastorizzato, la suddetta sequenza si presta a valutare aggiunte di latte vaccino percentualmente più elevate, che sono, peraltro, commercialmente più significative.

In una seconda parte del lavoro di tesi, si è investigata la potenziale bioattività di peptidi naturalmente presenti nei formaggi, in particolare nel Parmigiano Reggiano, focalizzando l'attenzione sull'attività ACE-inibitrice ed immunomodulante.

Per quanto riguarda l'attività di ACE-inibizione, esperimenti condotti utilizzando l'Enalaprilato<sup>©</sup> come controllo hanno confermato la possibilità di utilizzare il rabbit lung acetone extract (estratto in acetone di polmone di coniglio) come fonte di angiotensin converting enzyme (ACE) nell'esecuzione di un test spettrofotometrico riportato in letteratura<sup>1</sup>, test che si è rivelato affidabile e di facile esecuzione. In un primo momento sono stati testati i tre  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi  $\gamma$ -Glu-Leu,  $\gamma$ -Glu-Ile, e  $\gamma$ -Glu-Phe, identificati nel Parmigiano Reggiano, ma anche in alimenti come il prosciutto, e derivanti da una attività enzimatica di tipo  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasi, effettivamente osservata nel Parmigiano; tuttavia i valori di IC<sub>50</sub> calcolati per  $\gamma$ -Glu-Ile e  $\gamma$ -Glu-Leu (1,1mM e 1,6mM rispettivamente) sono rappresentativi di una scarsissima capacità di inibizione enzimatica, per la quale non è da escludere un'azione di tipo aspecifico, mentre per  $\gamma$ -Glu-Phe, è assolutamente da escludere un'attività di questo tipo. In modo analogo si è eseguito il test sul peptide  $\beta$ -CN (f193-209), presente in quantità consistenti in molte varietà di formaggi; tale peptide contiene la sequenza 193-202, nota in letteratura per la sua attività ACE-inibitrice<sup>2</sup>. Tuttavia i risultati sperimentali hanno dimostrato un drastico calo nella capacità di inibire l'enzima, probabilmente per un effetto di aumento dell'ingombro sterico che va ad interferire nell'interazione con il sito attivo enzimatico.

Risultati più incoraggianti si sono avuti nel momento in cui siamo passati a testare non più singole molecole, ma miscele peptidiche a maggiore complessità estratte dal Parmigiano, frazionate per via cromatografica e caratterizzate mediante HPLC-ESI-MS; il frazionamento cromatografico, accoppiato ad una buona caratterizzazione delle frazioni, ha permesso di identificare molecole bioattive in miscele di una certa complessità, ed ha confermato la blanda attività ACE-inibitrice dei  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi.

Per la valutazione dell'attività immunomodulante sono stati invece utilizzati in parallelo due metodi colorimetrici in micropiastra, condotti sui linfociti T umani Jurkat presso il Laboratoire de Recherche en Genie Industriel Alimentaire (LRGIA) dell'Università

“Claude Bernard” di Lione, in collaborazione con il gruppo di ricerca della prof.ssa Martial: tale metodologia è risultata particolarmente versatile ed efficace, ed ha mostrato ancora una volta una buona affidabilità sia nel caso di estratti di formaggio che di molecole singole. La frazione oligopeptidica di Parmigiano ha mostrato una buona capacità immunostimolante, in quanto ha stimolato consistentemente sia la sintesi del DNA che il metabolismo cellulare.

Questi risultati, confermati anche dalla successiva analisi in flask, ci hanno indotto ad effettuare un frazionamento in HPLC preparativo, al fine di testare le diverse frazioni: ancora una volta il frazionamento cromatografico ci è stato molto di aiuto, in quanto ha permesso di evidenziare le singole frazioni responsabili per questa attività.

Invece, i tre  $\gamma$ -glutamyl dipeptidi hanno mostrato, generalmente, un effetto di soppressione della proliferazione cellulare, in particolare  $\gamma$ -Glu-Ile e  $\gamma$ -Glu-Phe, agendo principalmente sull'attività metabolica.

Esperimenti successivi condotti in presenza di un antagonista oppioide, il Naloxone, lasciano ipotizzare che tali effetti siano mediati dall'interazione con recettori oppioidi, la cui presenza sulle cellule Jurkat è stata dimostrata.

Infine, in una terza parte della tesi, è stata valutata la potenzialità della digestione triptica, congiunta ad analisi HPLC-ESI-MS della miscela peptidica derivante, al fine di ricavare informazioni sulla sequenza di una proteina allergenica: si è focalizzata l'attenzione sulla lipid transfer protein (LTP) della pesca, Pru p 3, di cui sono riportate in letteratura due sequenze, differenti per soli due residui amminoacidici. La LTP della pesca è caratterizzata dalla presenza di 8 residui di cisteina, conservati in tutte le LTP finora note, che si organizzano a formare 4 ponti disolfuro responsabili della conformazione altamente ripiegata della proteina, nonché della sua elevata stabilità alla digestione enzimatica. A tale proposito, particolarmente efficace si è rivelata l'idea di effettuare la riduzione dei ponti disolfuro, e la successiva alchilazione dei residui di cisteina liberi, non sulla proteina tal quale, ma sulla miscela di peptidi derivanti dalla digestione triptica della proteina. L'analisi HPLC-ESI-MS successivamente condotta sulla miscela di digestione ha permesso di confermare una delle due sequenze riportate in letteratura, attraverso l'identificazione dei peptidi contenenti i residui di incertezza.

In un secondo momento, sull'allergene si è operata una simulazione di digestione gastrointestinale. L'analisi HPLC-ESI-MS della miscela di peptidi derivanti ha confermato la nota resistenza di tale proteina alla digestione peptica, in quanto la maggior parte dei

peptidi del digerito derivano dall'attività enzimatica della tripsina; inoltre, l'allergene integro dopo la digestione corrisponde al 26%, a dimostrazione che la proteina arriva in quantità consistente a livello dell'epitelio gastrointestinale, dove può esplicare la sua attività allergenica. Quest'ultima potrebbe essere dovuta, oltre alla proteina integra, anche ai prodotti di grosso peso molecolare corrispondenti al nucleo centrale, che rappresentano i principali prodotti della simulazione di digestione.

---

<sup>1</sup> Holmquist, B.; Bunning, P.; Riordan, J. F. (1979) *Anal Biochem*, **95**, 540-548.

<sup>2</sup> Maruyama, S.H.; Mitachi, H.; Tanaka, H.; Tomizuka, N.; Suzuki, H. (1987) *Agric Biol Chem*, **51**, 1581-1586.

### **13. Ringraziamenti**

Desidero ringraziare caldamente i miei due tutor, il prof. Novellino, per avermi dato l'opportunità di svolgere il lavoro di dottorato su un argomento estremamente interessante come la chimica degli alimenti, e la prof.ssa Marchelli, cui sono profondamente riconoscente per l'accoglienza offertami in questi tre anni, e per la cura che ha sempre mostrato nel seguire il mio lavoro, fino all'ultimo, facendomi sentire parte integrante del suo attivissimo gruppo di ricerca.

Un ringraziamento grandissimo va al prof. Stefano Sforza, per la fonte inesauribile di idee e consigli, per la competenza e la professionalità dimostrata ogni giorno, per l'innata capacità di comunicare entusiasmo nel lavoro, ma soprattutto perchè senza di lui questa tesi non esisterebbe.

Desidero ringraziare, inoltre, il prof. Arnaldo Dossena, che, con la sua esperienza in materia di peptidi ed ammino acidi, ha rappresentato per me un vero punto di riferimento, e mi ha permesso di risolvere non pochi problemi; il prof. Gianni Galaverna, con cui ho avuto il piacere di collaborare su altri argomenti; ed il prof. Roberto Corradini, che si è sempre mostrato disponibile all'occorrenza.

Un ringraziamento doveroso va alla prof.ssa Adèle Martial ed alla dott.ssa Christèle Durrieu, dell'Università di Lione, per il lavoro svolto sull'attività immunomodulante; alla prof.ssa Elide Pastorello, del Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Milano, per averci fornito la LTP della pesca necessaria all'esecuzione degli esperimenti; la prof.ssa Elisabetta Guerzoni, del Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agro-alimentare dell'Università di Bologna, per averci fornito i campioni di formaggio modello su cui sono stati eseguiti gli studi sulla proteolisi; e la prof.ssa Patrizia Romano, dell'Università della Basilicata, per i campioni di Pecorino di Filiano (DOP) che abbiamo utilizzato nel lavoro sul marker peptidico.

Desidero infine ringraziare tutti coloro che hanno contribuito in modo decisivo al lavoro esposto in questa tesi: il dott. Andrea Faccini e la dott. Chiara Dall'Asta, che sono stati i miei pazienti maestri in materia di HPLC- MS, nonché fonte inesauribile di consigli; la dott.ssa Tullia Tedeschi, che mi ha seguito nella sintesi peptidica e nell'utilizzo dello spettrofotometro UV; la dott.ssa Elena Scaravelli, che ha lavorato inizialmente sul progetto della LTP della pesca; il dott. Pierpaolo Ferrari ed il dott. Daniele Poli, che hanno svolto un

ruolo importante nel lavoro di analisi dei peptidi nei formaggi; e la dott.ssa Cinzia Grisendi, cui sono profondamente riconoscente per avermi seguito con pazienza nei primi mesi di dottorato. Un ringraziamento grandissimo va in particolare alla dott.ssa Valeria Cavatorta, che, oltre ad aver eseguito i test di immunomodulazione presso l'Università di Lione, è stata negli ultimi mesi la mia più preziosa collaboratrice; a lei spetterà il compito non facile di reggere sulle proprie spalle il gruppo di ricerca dei peptidi, ma la competenza e le capacità che la distinguono non lasciano dubitare che vi riuscirà alla perfezione.