



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in Scienze Farmaceutiche
Ciclo XIII NS – 2012-2015

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Gianluca Sbardella

***Analysis and evaluation of potential nutraceutical milk
and dairy products
derived from the Centrale del latte di Salerno***

settore scientifico disciplinare di afferenza: CHIM/08

Dottorando

Dott. Giacomo Pepe

Tutore

Chiar.mo Prof.
Pietro Campiglia

Co-tutore

Chiar.mo Prof.
Gianluca Sbardella

Abstract

Il mio progetto di dottorato ha avuto come principale obiettivo l'analisi e la valutazione del potenziale nutraceutico dei campioni di latte forniti dalla "Centrale del Latte di Salerno" al fine di valutare il loro possibile impiego come integratori alimentari o alimenti fortificati.

Nel corso dei tre anni, l'adempimento di tali obiettivi ha previsto lo sviluppo e la messa a punto di metodiche cromatografiche innovative finalizzate alla caratterizzazione delle principali molecole della frazione proteica, presente sia nei campioni di latte bovino commerciale che nei prodotti conservati a temperatura ambiente oltre la loro data di scadenza.

Per quanto concerne la caratterizzazione della frazione proteica del latte, l'analisi cromatografica risulta essere difficoltosa vista la tendenza delle caseine a formare, in soluzione acquosa, strutture micellari altamente stabilizzate da interazioni di natura non-covalente.

L'ottimizzazione della risoluzione cromatografica delle stesse è stata ottenuta attraverso lo studio degli effetti sortiti da vari solventi e soluzioni denaturanti in grado di alterare la struttura tridimensionale caseinica, così da migliorare l'identificazione delle sue singole frazioni.

La separazione cromatografica migliore è stata ottenuta incubando le caseine liofilizzate, per un'ora a temperatura ambiente, con una soluzione denaturante contenente 8M urea, 165mM Tris-HCl, 44mM citrato di sodio e 0,3% v/v di β -mercaptoetanolo.

Successivamente, le caseine sono state caratterizzate mediante esperimenti di Cap-LC-HRMS, effettuati impiegando una monolitica colonna capillare lab-made (Protein-Cap-RP-Lauryl- γ -monolithic). Il metodo così sviluppato ha permesso di studiare il pattern di degradazione della frazione proteica nei differenti campioni di latte analizzati. I risultati ottenuti hanno evidenziato la buona stabilità dell' α_s - e della κ -caseina ai fenomeni proteolitici, evidenziando la formazione di polipeptidi (proteoso-peptoni) derivanti dalla scissione dell'estremità ammino e carbossi-terminale della β -CN ad opera dell'enzima plasmina bovina.

E' stata valutata una diversa velocità di degradazione proteica osservata nei differenti campioni di latte analizzati. Quanto evidenziato, ha indotto ad ipotizzare un possibile ruolo stabilizzante esercitato dalla frazione lipidica in grado di inibire la degradazione delle caseine nei campioni di latte intero.

Questo fenomeno non è stato osservato nei prodotti di latte scremato mentre solo in parte è stato evidenziato nei campioni di latte parzialmente scremato.

In maniera analoga, è stata studiata la stabilità delle sieroproteine nei campioni di latte parzialmente scremato, in cui è stata valutata una degradazione tempo-dipendente delle principali isoforme della β -lattoglobulina A e B, con conseguente formazione di un elevato numero molecole di natura peptidica.

Infine, sono stati analizzati peptidi della frazione solubile ottenuti dall'idrolisi delle rispettive molecole proteiche in campioni di latte parzialmente scremato conservato a 25°C oltre quattro settimane dopo la data di scadenza. Tali molecole sono state caratterizzate mediante cromatografia liquida bidimensionale on-line di tipo comprehensive.

Elevati valori di peak capacity sono stati ottenuti utilizzando differenti valori di pH tra le due dimensioni ed un gradiente di tipo continuous shifted mode in 2D, ottenendo una soddisfacente selettività ed una buona occupazione dello spazio di separazione 2D. Infine, mediante analisi 1D-LC-ESI-IT-TOF sono state identificate sequenze peptidiche corrispondenti alle β -casomorfine, confermando che la β -caseina è la principale molecola proteica degradata da fenomeni proteolitici.