



Unione europea
Fondo sociale europeo



REGIONE DEL VENETO

Regione del Veneto
Giunta Regionale
Direzione Formazione e Istruzione

RELAZIONE CONSUNTIVA SULL'ATTIVITA' DI RICERCA
(Assegni di ricerca)

DGR n. 1463 del 08/10/2019

Cod. Ente: 1695 Rag. Sociale Università degli studi di Verona Asse Occupabilità

Cod. progetto 1695-0023-1463-2019 Titolo Valorizzazione del siero derivante dalla produzione di formaggi a pasta dura tipo grana per lo sviluppo di ingredienti funzionali

Cod. Intervento 1695/10260669-001/231/DEC/20 Titolo dell'intervento CARATTERIZZAZIONE DELLE PROTEINE DI SIERI DI LATTE CONCENTRATE E SVILUPPO DI INGREDIENTI FUNZIONALI INCAPSULATI Sede Verona

*Il sottoscritto **Gianni Zoccatelli** in qualità di Referente/Tutor per la ricerca*

con riferimento all' intervento in oggetto,

*Il sottoscritto **Giacomo Rossin** in qualità di Destinatario dell'intervento
in oggetto,*

DICHIARANO

che l'intervento in oggetto nel **periodo dal 01/07/2020 al 30/06/2021** si è articolato nelle seguenti attività:

Attività e metodologie operative

All'interno dell'attività di ricerca sono stati studiati diversi tipi di siero di latte forniti dall'Azienda Casearia Silvio Belladelli. I sieri e le WPC (whey protein concentrate) differiscono gli uni dagli altri per provenienza, trattamenti termici subiti, processi di filtrazione/purificazione. Hanno quindi un grado di purezza e di contenuto proteico variabile. I profili proteici dei vari campioni sono stati analizzati tramite elettroforesi per valutare eventuali differenze. I profili ottenuti risultano comparabili gli uni con gli altri sottolineando come i vari processi termici e di filtrazione non portino alla perdita di proteine. Tramite analisi al cromatografo ionico e analisi HPLC sono stati analizzati il contenuto di acidi organici (acido lattico e acido citrico) e degli zuccheri (lattosio, glucosio e galattosio) di varie tipologie di siero e di permeati aziendali. Successivamente sono state testate le capacità emulsionanti dei sieri e delle WPC. Queste ultime, a parità di contenuto proteico, sono risultate le più performanti (Figura 1).

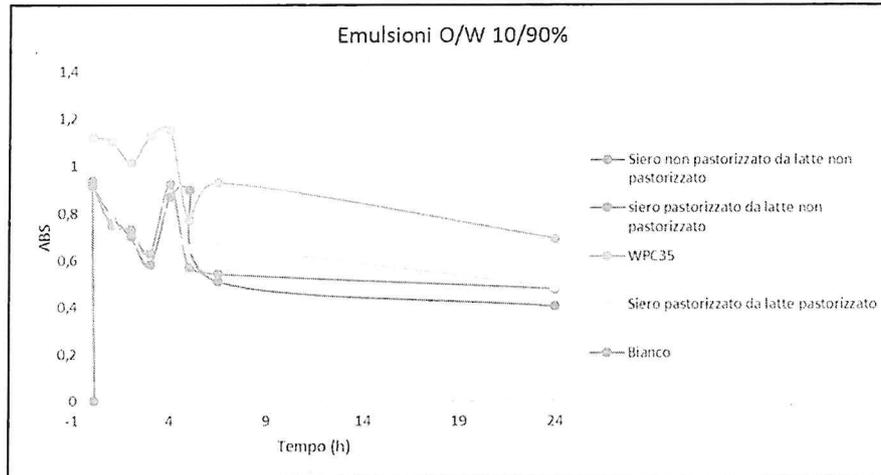


Figura 1: Grafico che mostra le migliori capacità emulsionanti delle WPC35. Il grafico indica il decremento dei valori di assorbanza (500nm) nel tempo (24h). Le WPC35 mostrano una performance migliore anche per quanto riguarda la stabilità dell'emulsione nel tempo.

Un'importante parte del progetto ha previsto la rimozione del rame da campioni di siero/WPC. Sono state prese in considerazione diverse metodiche per la rimozione del rame dal siero derivante dalla produzione di formaggio a pasta dura. In particolare, nell'Azienda partner le WPC sono state trattate tramite un'unità pilota di microfiltrazione. Il rationale dell'uso della microfiltrazione risiede nella sua capacità di separare particelle di grosse dimensioni e in definitiva anche micelle caseiniche dal resto delle proteine del latte. Nonostante il processo di microfiltrazione, tramite analisi elementare basata su tecnologia ICP-MS non è stato osservato un decremento significativo del contenuto di rame rispetto al campione non trattato, nonostante il decremento della percentuale di grasso totale. Per questo motivo è stato deciso di trattare il campione di siero con delle resine a scambio cationico e con una combinazione microfiltrazione/resina a scambio cationico. Il passaggio al microfiltratore con filtro di porosità 0.2 μm e successivo doppio passaggio in resina Lewatit MonoPlus TP207 ha portato ad un decremento del rame totale del 93,7% (concentrazione finale 115 μg di rame per Kg di prodotto). Un problema riscontrato dall'uso di queste resine è che portano all'incremento di cationi nel siero, in particolare di sodio, in quanto contro-ione legato alla resina. È stato possibile quindi rimuovere il rame ma aumentando inevitabilmente altri minerali che rendono necessario poi modificare il profilo salino del siero. Per tale motivo è stato deciso di effettuare un'altra serie di prove utilizzando una tipologia di resine in grado di scambiare idrogeno e non sodio (resine JUCLAS): l'utilizzo di queste resine dovrebbe portare ad una riduzione del rame senza appesantire il prodotto finale di ulteriori sali. I campioni testati sono stati inviati a laboratori esterni specifici per la determinazione di anioni e cationi e sono ancora in fase di analisi. Il filtro da 0.2 μm porta anche ad un'eccessiva perdita di proteina (44%) non tollerabile in ottica industriale (Figura 2).

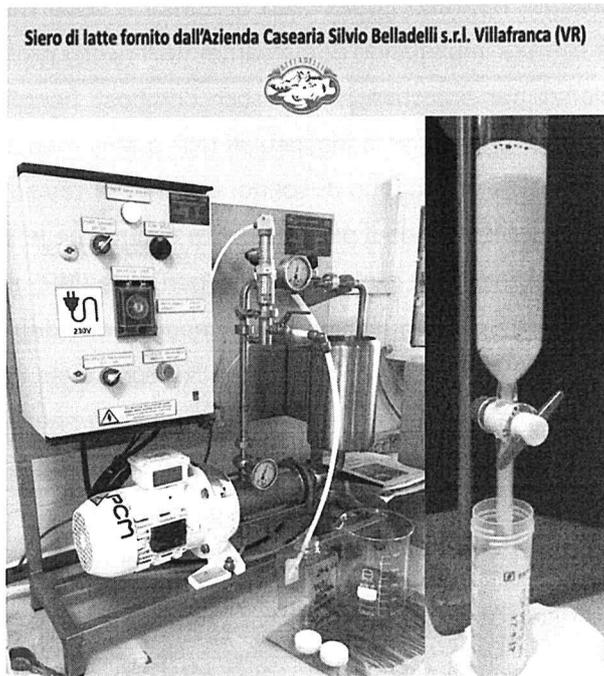


Figura 2: Prove al microfiltratore e passaggio in resina a scambio cationico delle WPC35.

Si è passati poi a valutare la digeribilità delle WPC al fine di comprendere se la loro bioaccessibilità fosse influenzata dai maggiori trattamenti a cui sono soggette rispetto al siero. Sono state effettuate due diverse tipologie di analisi, un'analisi in SDS-PAGE per studiare il profilo digestivo (tecnica non quantitativa) e test OPA-NAC (oftaldialdeide – N-actil cisteina) per una misura quantitativa del grado di digestione delle WPC stesse. Il risultato principale è che le WPC resistono alle fasi salivare e gastrica, mentre in ambiente intestinale si osserva una digestione pressoché completa delle proteine.

In collaborazione con il Dipartimento Neurofarba dell'Università di Firenze è stata messo a punto un protocollo di estrazione green dei fenoli della sansa derivante dalla spremitura dell'oliva (Figura 3).

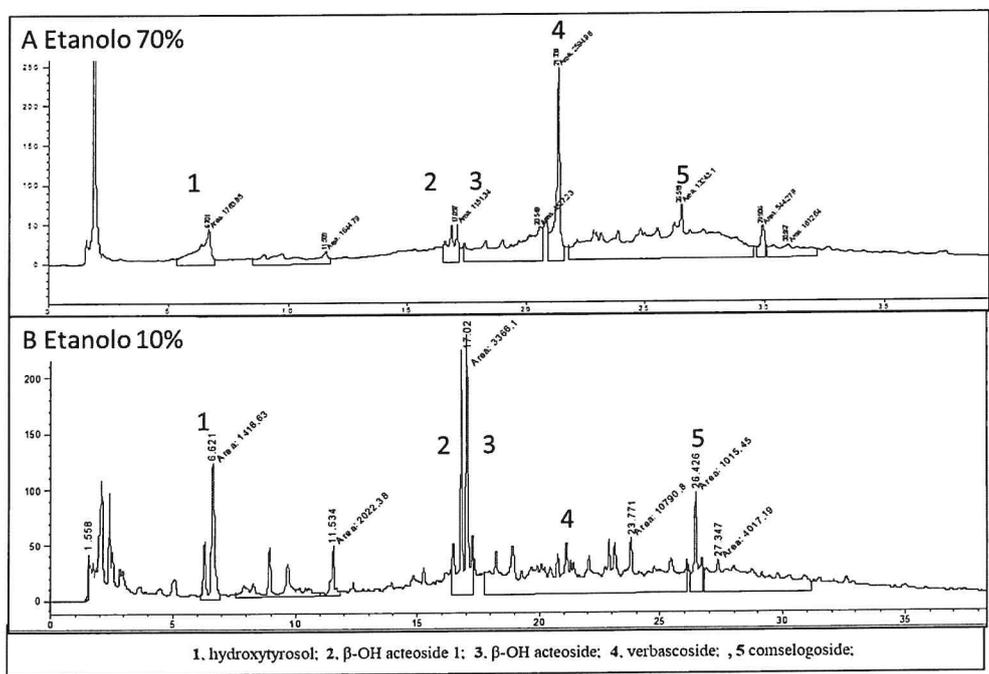


Figura 3: Cromatogramma del profilo dei fenoli dell'estratto green della sansa derivante da spremitura dell'oliva messo a punto dal Dipartimento Neurofarba dell'Università di Firenze. Estrazione con etanolo 70% (A), ed etanolo 10% (B). I numeri indicano i picchi dei principali fenoli contenuti nell'estratto (picco 1 idrossitiroso).

Una volta ottenuto e caratterizzato l'estratto idroalcolico di sansa è stata messa a punto una tecnica di incapsulazione delle molecole estratte impiegando come carrier WPI (whey protein isolate) e WPC, nell'ottica di sviluppare ingredienti funzionali per arricchire alimenti con composti benefici per la salute. Il protocollo definitivo prevede la formazione di nano- o micro-incapsulati (NP o MP) mediante interazioni elettrostatiche tra le proteine del siero e la pectina (altro prodotto di scarto, la cui valorizzazione è da considerarsi virtuosa nell'ottica di un'economia circolare). Modulando il pH è possibile controllare le interazioni tra i due polimeri e ottenere rispettivamente nano particelle (NP) a pH 4 e micro particelle (MP) a pH 3,2. Sono state studiate conformazioni, stabilità a varie condizioni di pH, efficienza d'incapsulazione degli incapsulati formati sia liquidi che in fase solida (liofilizzati o ottenuti tramite spray-drying). Le NP sono state analizzate al DLS mentre le MP al microscopio ottico. È stata valutata l'influenza di alcuni fattori quali temperatura d'esercizio, sonicazione, proporzione tra i polimeri, quantitativo di sansa sulla formazione degli incapsulati. Nel Laboratorio di Chimica Biorganica del Dipartimento di Fisica dell'Università di Trento, gli incapsulati sono stati infine analizzati tramite analisi FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) e NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

Risultati

Le varie analisi effettuate sulle WPC35 prodotte dal partner hanno dimostrato la loro maggior capacità emulsionante rispetto ad altre proteine del siero del latte che hanno subito un numero minore di trattamenti (termici e di filtrazione). L'esperimento di digestione simulata delle WPC mostra invece che non sembrano esserci grandi differenze tra la digeribilità delle proteine del siero e quelle delle WPC.

Per quanto riguarda la rimozione del rame dal campione che permetterebbe l'ingresso in nuovi mercati dedicati all'alimentazione umana (valore di rame consentito inferiore a 2 ppm), il processo di microfiltrazione non è in grado di allontanare grandi quantità del minerale a prescindere dalla porosità del filtro utilizzato. Il passaggio in microfiltratore permette però di ripulire il campione dal grasso (decremento del grasso totale del 23/58% in base alla porosità del filtro utilizzato 1.2/0.2 μm) e rendere quindi le WPC più idonea al successivo passaggio nelle resine a scambio cationico (se nel campione è presente grasso le resine si sporcano più velocemente inficiando l'efficienza del processo). Un filtro troppo selettivo (0.2 μm) porta però ad una eccessiva perdita di proteina (44%) rispetto all'utilizzo dei filtri da 0.8 e 1.2 μm (5 e 1.3%). Il doppio passaggio in resina a scambio cationico porta ad una sensibile riduzione del rame (93.7% con il filtro 0.2 e 83.3% con il filtro 1.2) ma a discapito di un incremento del sodio. Per questo motivo sono state provate altre tipologie di resina che scambiano idrogeno (JUCLAS). I dati su queste resine sono ancora in elaborazione. In collaborazione con l'Università degli Studi di Firenze è stato individuato un protocollo green di estrazione dei polifenoli dalla sansa (prodotto di scarto della lavorazione dell'olio). In particolare, tramite estrazione in una soluzione al 10% di etanolo si garantisce un buon recupero dei fenoli, in particolare dell'idrossitiroso, pur utilizzando un basso contenuto di alcool. Percentuali così basse di alcool permettono di rendere l'estratto particolarmente adatto alle successive fasi di incapsulazione e abbassa notevolmente gli eventuali costi di estrazione.

Per quanto riguarda l'incapsulazione, la formazione delle MP risulta fortemente condizionata dai fattori precedentemente elencati mentre le NP si formano a prescindere. Sono state ottenute delle NP con uno zeta-average medio di 325 nm e un PDI (indice di poli-dispersione) inferiore a 0.2 (tale valore indica che la popolazione di NP prodotte è omogenea). Per quanto riguarda le MP sono state prodotte particelle dal diametro medio di 4 μm , ma per la loro produzione è indispensabile lavorare ad una temperatura di 40°C circa ed è necessario il processo di sonicazione (Figura 4).

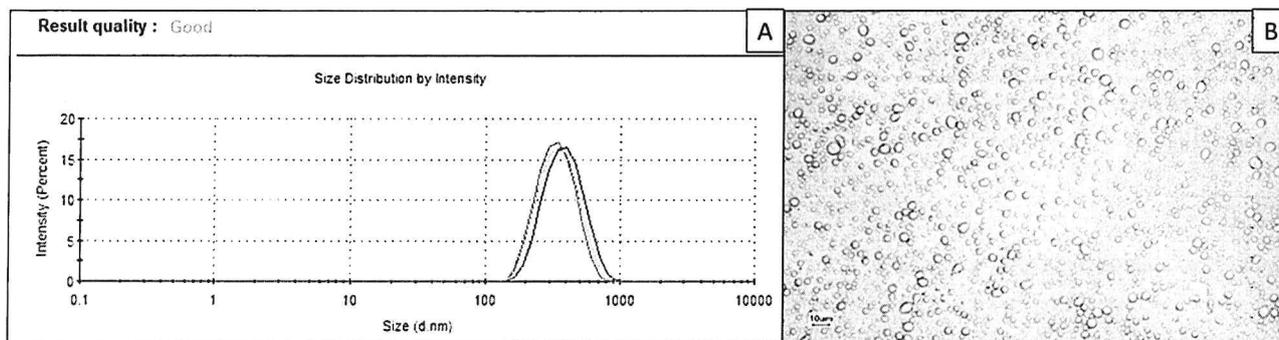


Figura 4: Analisi DLS dei nano-incapsulati (z-avaverage medio 325 nm, PDI <0.2)(A). Immagine al microscopio dei micro-incapsulati (diametro medio 4 μm).

L'efficienza di incapsulazione di queste particelle è stata calcolata essere pari al 90%, un valore molto alto. Questo indica che la maggior parte delle molecole viene intrappolata dalla matrice di proteine e pectina. L'incapsulazione di queste molecole nelle NP, le più promettenti, è stata confermata anche dalle analisi $^1\text{H NMR}$ eseguite presso l'Università di Trento (Figura 5).

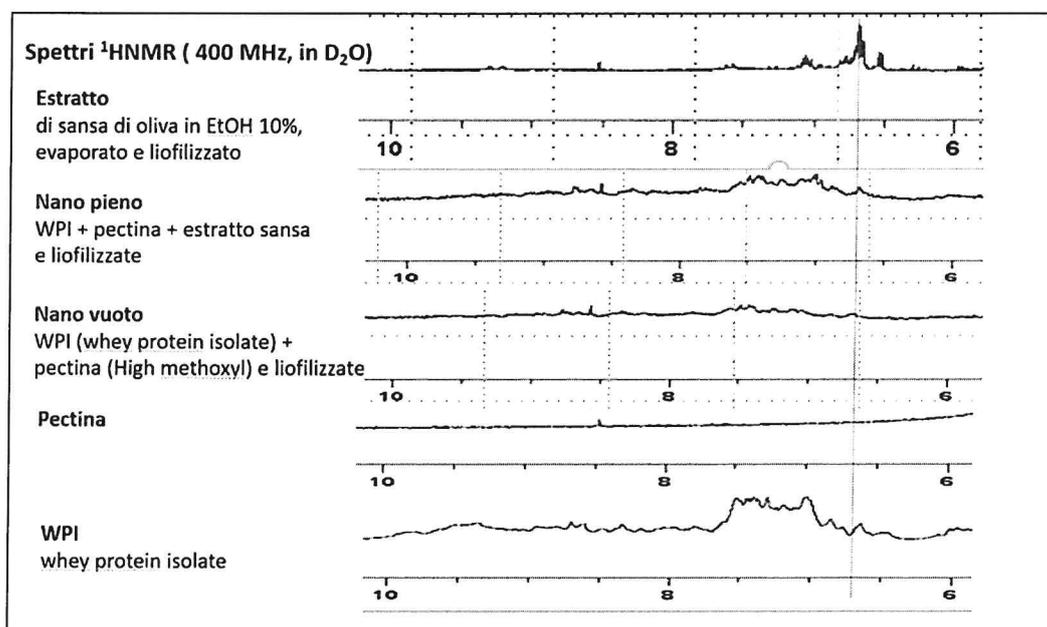


Figura 5: Confronto della zona di interesse per polifenoli estrapolata da spettri registrati per i vari campioni indicati, a 400 MHz in D_2O a 4.89 ppm. Analisi effettuata dal Laboratorio di Chimica Biorganica del Dipartimento di Fisica dell'Università di Trento.

Le analisi FTIR, invece, a causa della bassa sensibilità della metodica, non hanno permesso di apprezzare la presenza di fenoli. In futuro si pensa di migliorare ulteriormente la formulazione includendo una maggiore quantità di fenoli, il ché dovrebbe garantire una rilevazione anche attraverso l'analisi FTIR.

Questi prototipi di incapsulati sono idonei al consumo umano, ed essendo arricchiti di principi attivi con funzionalità nutraceutiche che rappresentano dal punto di vista biochimico-nutrizionale un mezzo attraverso il quale si contribuisce, insieme ad una dieta varia ed equilibrata, a preservare e migliorare lo stato di salute del consumatore. Tali prodotti sono costituiti esclusivamente da materiali di recupero (proteine del siero, pectina

ed estratto di sansa), interessanti quindi in un'ottica di economia circolare. Grazie alla collaborazione tra le varie realtà Accademiche e Aziendali partner del progetto è stato possibile quindi, partendo da prodotti di scarto, ottenere un nuovo prodotto che apre nuove possibilità di business caratterizzata da una maggiore sostenibilità.

Sede di svolgimento dell'attività

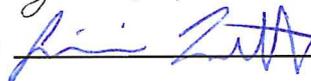
Tutte le attività di ricerca sono state condotte all'interno dell'Università degli studi di Verona e nella sede dell'azienda partner: "Azienda Casearia Silvio Belladelli Spa." di Villafranca (VR). Le analisi FTIR e NMR sono state condotte a Trento presso Laboratorio di Chimica Biorganica del Dipartimento di Fisica dell'Università di Trento. La collaborazione Dipartimento Neurofarba dell'Università di Firenze si è svolta invece "in remoto". La ricerca e le varie prove sperimentali sono state realizzate tra Università e azienda partner nelle tempistiche stabilite nei bandi relativi all'assegno di ricerca.

Luogo e data Verona, 30/06/2021

Firma del Destinatario



Firma del Referente/Tutor per la Ricerca





Unione europea
Fondo sociale europeo



REGIONE DEL VENETO

Regione del Veneto
Giunta Regionale
Direzione Formazione e Istruzione

ABSTRACT DI RICERCA
(intervento assegni di ricerca)

DGR n. 1463 del 08/10/2019

Cod. Ente: 1695 Rag. Sociale Università degli studi di Verona Asse Occupabilità

Titolo progetto Valorizzazione del siero derivante dalla produzione di formaggi a pasta dura tipo grana per lo sviluppo di ingredienti funzionali
cod. 1695-0023-1463-2019 COD. CUP: B35J19001660002

Cod. Intervento 1695/10260669-001/231/DEC/20

Titolo dell'intervento: CARATTERIZZAZIONE DELLE PROTEINE DI SIERI DI LATTE CONCENTRATE E SVILUPPO DI INGREDIENTI FUNZIONALI INCAPSULATI

Relativamente all'intervento in oggetto che si è svolto nel **periodo dal 01/07/2020 al 30/06/2021** viene riportato un breve abstract sull'attività di ricerca svolta

All'interno dell'attività di ricerca sono stati studiati diversi tipi di siero di latte forniti dall'Azienda Casearia Belladelli. I sieri e le WPC (whey protein concentrate) differiscono gli uni dagli altri per provenienza, trattamenti termici subiti, processi di filtrazione/purificazione. Hanno quindi un grado di purezza e di contenuto proteico variabile. I profili proteici dei vari campioni sono stati analizzati tramite elettroforesi per valutare eventuali differenze. I profili ottenuti risultano comparabili sottolineando come i vari processi termici e di filtrazione non portino alla perdita di proteine. Tramite analisi al cromatografo ionico e analisi HPLC sono stati analizzati il contenuto di acidi organici (acido lattico e acido citrico) e degli zuccheri (lattosio, glucosio e galattosio) di varie tipologie di siero e di permeati aziendali. Successivamente sono state testate le capacità emulsionanti dei sieri e delle WPC. Queste ultime, a parità di contenuto proteico, sono risultate le più performanti sia per quanto riguarda la capacità schiumogena sia per quella emulsionante. Un'importante parte del progetto ha previsto la rimozione del rame da campioni di siero/WPC che permetterebbe l'ingresso in nuovi mercati dedicati all'alimentazione umana come i baby foods (rame < 2ppm).

Sono state prese in considerazione diverse metodiche per la rimozione del rame dal siero derivante dalla produzione di formaggio a pasta dura. In particolare, nell'Azienda Casearia Belladelli le WPC sono state trattate tramite un'unità pilota di microfiltrazione. Il rationale dell'uso della microfiltrazione risiede nella sua capacità di separare particelle di grosse dimensioni e in definitiva anche micelle caseiniche o di grasso dal resto delle proteine del latte. Nonostante il processo di microfiltrazione, tramite analisi elementare basata su tecnologia ICP-MS non è stato osservato un decremento significativo del contenuto di rame rispetto al campione non trattato, nonostante il decremento della percentuale di grasso totale. Per questo motivo è stato deciso di trattare il campione di siero con varie tipologie di resine a scambio cationico. Il passaggio al

microfiltratore con filtro di porosità 0.2 µm e successivo doppio passaggio in resina Lewatit MonoPlus TP207 ha portato ad un decremento del rame totale del 93,7% (concentrazione finale 115µg di rame per Kg di prodotto). Con questi passaggio oltre ad un incremento di cationi, in particolare il sodio (contro-ione legato alla resina, si è assistito ad un'eccessiva perdita del carico proteico (-44%). Per tale motivo è stato deciso di effettuare un'altra serie di prove utilizzando una tipologia di resine in grado di scambiare idrogeno e non sodio (resine JUCLAS): l'utilizzo di queste resine dovrebbe portare ad una riduzione del rame senza appesantire il prodotto finale di ulteriori sali abbinando un passaggio al microfiltratore con un filtro di porosità 0.8µm che garantisce una minor perdita di proteine (-5%). I campioni testati sono stati inviati a laboratori esterni specifici per la determinazione di anioni e cationi e sono ancora in fase di analisi.

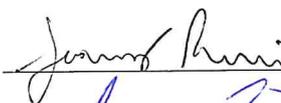
Si è passati poi a valutare la digeribilità delle WPC al fine di comprendere se la loro bioaccessibilità fosse influenzata dai maggiori trattamenti a cui sono soggette rispetto al siero. Sono state effettuate due diverse tipologie di analisi, un'analisi in SDS-PAGE per studiare il profilo digestivo (tecnica non quantitativa) e test OPA-NAC (oftaldialdeide – N-actil cisteina) per una misura quantitativa del grado di digestione delle WPC stesse. Le WPC resistono alle fasi salivare e gastrica, mentre in ambiente intestinale si osserva una digestione pressoché completa delle proteine.

In collaborazione con il Dipartimento Neurofarba dell'Università di Firenze è stata messo a punto un protocollo di estrazione green dei fenoli della sansa derivante della spremitura dell'oliva (utilizzando una soluzione di etanolo 10%). Una volta ottenuto e caratterizzato l'estratto idroalcolico di sansa è stata messa a punto una tecnica di incapsulazione delle molecole estratte impiegando come carrier WPI (whey protein isolate) e WPC, nell'ottica di sviluppare ingredienti funzionali per arricchire alimenti con composti benefici per la salute. Il protocollo definitivo prevede la formazione di nano- o micro-incapsulati (NP o MP) mediante interazioni elettrostatiche tra le proteine del siero e la pectina (altro prodotto di scarto, la cui valorizzazione è da considerarsi virtuosa nell'ottica di un'economia circolare). Sono state studiate conformazioni, stabilità a varie condizioni di pH, efficienza d'incapsulazione degli incapsulati formati sia liquidi che in fase solida (liofilizzati o ottenuti tramite spray-drying). Le NP sono state analizzati al DLS mentre le MP al microscopio ottico. E' stata valutata l'influenza di alcuni fattori quali temperatura d'esercizio, sonicazione, proporzione tra i polimeri, quantitativo di sansa sulla formazione degli incapsulati. Sono state ottenute delle NP con uno zeta-average medio di 325 nm e un PDI (indice di poli-dispersione) inferiore a 0.2 (tale valore indica che la popolazione di NP prodotte è omogenea). Per quanto riguarda le MP sono state prodotte particelle dal diametro medio di 4 µm, ma per la loro produzione è indispensabile lavorare ad una temperatura di 40°C circa ed è necessario il processo di sonicazione. L'efficienza di incapsulazione di queste particelle è stata calcolata essere pari al 90%, un valore molto alto. Questo indica che la maggior parte delle molecole viene intrappolata dalla matrice di proteine e pectina. L'incapsulazione di queste molecole nelle NP, le più promettenti, è stata confermata anche dalle analisi 1HNMR eseguite presso l'Università di Trento.

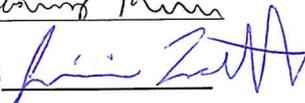
Grazie alla collaborazione tra le varie realtà Accademiche e Aziendali partner del progetto è stato possibile quindi, partendo da prodotti di scarto, ottenere un nuovo prodotto che apre nuove possibilità di business caratterizzata da una maggiore sostenibilità.

Verona , 30/06/2021

Firma del Destinatario (assegnista)



Firma del Referente per la ricerca (prof.)



Firma del responsabile di progetto
(prof. Zoccatelli)

