



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

LA PROTEOMICA COME STRUMENTO
NELL'AUTENTICAZIONE,
NEL CONTROLLO DELLA QUALITÀ E
NELLA SICUREZZA DEI PRODOTTI
LATTIERO-CASEARI

PROTEOMICS AS A TOOL IN THE
AUTHENTICATION, QUALITY CONTROL
AND SAFETY OF DAIRY PRODUCTS

TIPO TESI: compilativa

Studente:
FEDERICO CINGOLANI

Relatore:
DOTT. MASSIMILIANO GASPARRINI

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	7
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	8
CAPITOLO 1 LA PROTEOMICA	9
CAPITOLO 2 PRINCIPI GENERALI DELLA PROTEOMICA	11
CAPITOLO 3 AREE SPERIMENTALI	14
3.1 Proteomica quantitativa	14
3.2 Proteomica qualitativa	15
3.3 Proteomica funzionale	16
CAPITOLO 4 APPLICAZIONI DELLA PROTEOMICA	17
4.1 Approcci proteomici sull'autenticazione degli alimenti	17
4.2 Approcci proteomici sulla qualità alimentare	18
4.3 Approcci proteomici sulla sicurezza alimentare	19
4.3.1 Identificazione patogeni e tossine alimentari.....	19
4.3.2 Identificazione allergeni alimentari	20
CAPITOLO 5 LE PROTEINE DEL LATTE E LA LORO IMPORTANZA NELLA NUTRIZIONE UMANA	22
CAPITOLO 6 PROGRESSI DELLA PROTEOMICA NELLA CARATTERIZZAZIONE DEL LATTE E DEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI.....	26
CAPITOLO 7 VANTAGGI DEI RECENTI PROGRESSI PROTEOMICI NELLA PRODUZIONE DI LATTE E LATTICINI	30
7.1 L'utilizzo della proteomica per garantire la sicurezza del latte e dei prodotti lattiero- caseari	30
7.1.1 Identificazione dei microrganismi patogeni nel latte e nei prodotti lattiero-caseari	30
7.1.2 Identificazione degli allergeni nei prodotti lattiero-caseari	33

7.2 L'utilizzo della proteomica per il controllo dell'autenticità del latte e dei prodotti lattiero caseari	34
7.3 Operazioni industriali che impattano la qualità dei prodotti lattiero-caseari	37
CONCLUSIONI	42
BIBLIOGRAFIA	43

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-1: Classi di proteomica	10
Tabella 5-1: Composizione nutrizionale dei latti più consumati al mondo	23
Tabella 5-2: Principali proteine in diverse specie animali	24
Tabella 7-1: Principali proteine modificate dall'adulterazione (marcatori)	36

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 2-1:Flussi di lavoro proteomici comunemente utilizzati per la ricerca alimentare	12
Figura 3-1: Aree sperimentali chiave della proteomica con le loro funzioni e approcci ..	14
Figura 6-1: Proteine in uno estratto liquido di formaggio di tipo svizzero determinate mediante elettroforesi su gel 2D	27
Figura 6-2 Modifiche post-traduzionali di α S2-CN nel latte ben coagulante e non coagulante	28
Figura 6-3: Numero totale di peptidi AGEs identificati nel latte crudo (RM), latte pastorizzato (P), latte pastorizzato senza lattosio (PLF), latte trattato a temperatura ultraelevata (UHT), latte UHT senza lattosio (ULF) e latte artificiale(IF).....	29
Figura 7-1: Proteine di un latte mastitico confrontate con le proteine di un latte sano.....	31
Figura 7-2: Western blot utilizzando mAb-3F8 come anticorpo primario che reagisce con rFBA purificato	33
Figura 7-3: Western blot utilizzando mAb-2D12 (anti-InlA) insieme a mAb-3F8	33
Figura 7-4: Modificazioni delle proteine del latte durante il trattamento termico e la successiva maturazione	38
Figura 7-5: Spettri MALDI-TOF di (A) latte pastorizzato ad alta temperatura a tempo breve (HTST), (B) latte ad alta temperatura con durata di conservazione estesa (ESL) e (C) latte trattato UHT	39
Figura 7-6: Caseine di mozzarella di bufala a Denominazione di Origine Protetta (DOP) con SDS-PAGE.....	41

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

2-DE	L'elettroforesi su gel bidimensionale
AGEs	Prodotti finali della glicazione avanzata
BSA	Albumina sierica bovina
CMP	Caseinomacropeptide
ESI	Ionizzazione elettrospray
FBA	1,6-bifosfato aldolasi
IEF	Isoelettrofocalizzazione
IPG	Gradiente di pH immobilizzato
LC	Cromatografia liquida
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight
MS	Spettrometria di massa
PTM	Modificazioni post-traduzionali
SDS-PAGE	Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato
UFC	Unità formante colonia
UHT	Temperatura ultraelevata

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

L'adulterazione e il falso etichettaggio, nel settore alimentare, rappresentano un enorme problema a livello mondiale. Specialmente per quanto riguarda gli alimenti di origine animale che possono essere preparati utilizzando prodotti vegetali ed etichettati intenzionalmente in maniera errata. Questo tipo di frode è molto importante per la sicurezza alimentare visto che gli ingredienti non indicati possono causare allergie o essere tossici nei confronti del consumatore finale. Allo stesso modo, anche gli agenti patogeni presenti negli alimenti necessitano di particolare attenzione. In questo contesto lo sviluppo di strumenti analitici efficaci per affrontare le diverse problematiche sta diventando di fondamentale importanza. In tal senso, la proteomica è considerata un promettente strumento per garantire il rispetto della sicurezza, della qualità e dell'autenticità dei prodotti alimentari. In questa tesi, verranno trattate dunque le diverse applicazioni e i ruoli della proteomica facendo particolare riferimento all'impiego delle diverse tecniche nel rispetto dei parametri qualitativi, di sicurezza e di autenticità dei prodotti lattiero-caseari.

Capitolo 1

LA PROTEOMICA

Il termine “proteomica” è stato utilizzato per la prima volta nel 1994 dal Prof. D. Mark Wilkins ed è stato largamente impiegato nei settori della chimica analitica, della microbiologia alimentare, della biotecnologia e nella tecnologia alimentare. Consiste nell’analisi su larga scala delle proteine di uno specifico sistema biologico in uno specifico momento (Boersema, et al., 2015). La proteomica fa parte di una più ampia disciplina scientifica definita “foodomics”, che raggruppa le applicazioni degli approcci omici avanzati negli alimenti. Le altre scienze omiche che fanno parte di questo settore sono l’epigenetica, la trascrittomica, la metabolomica, la peptidomica e/o genomica ma la più utilizzata nella ricerca alimentare è proprio la proteomica (Cifuentes, 2017). Inizialmente era definita come una semplice e completa catalogazione delle proteine di cellule e tessuti, ora invece copre molte più aree e gli approcci della proteomica sono convenzionalmente classificati in sei gruppi (Tabella 1-1): proteomica dell’espressione, interazioni proteina-proteina, proteomica funzionale, proteomica strutturale, proteomica dell’estrazione e modificazioni post-traduzionali (Carbonaro, 2004). Questi approcci includono l’analisi proteomica sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo. Le tecniche proteomiche negli alimenti vengono utilizzate principalmente per l’autenticazione, la sicurezza, identificando i microrganismi patogeni, gli allergeni e le tossine, la validazione e l’ottimizzazione dei processi, per il rilevamento dei componenti bioattivi negli alimenti funzionali e per la rilevazione di biomarcatori specie-specifici utili per autenticare ad esempio carne e prodotti lattiero caseari. La proteomica inoltre è un efficace strumento per identificare le interazioni delle proteine con gli altri componenti degli alimenti (Kvasnička, 2003). Gli approcci con la spettrometria di massa (MS), ad esempio la Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF), possono essere accoppiati con tecniche elettroforetiche e possono essere usate nelle analisi proteomiche dei prodotti alimentari. La MALDI-TOF consiste nell’assorbire il campione d’interesse su di una matrice, la quale all’interno del macchinario, in presenza di condizioni di vuoto, viene irradiata con un fascio laser. La proteomica ha un vasto potenziale di applicazione anche nelle industrie dei mangimi e dei medicinali. Aiuta inoltre a migliorare la qualità dei prodotti alimentari

studiando l'effetto dei diversi processi produttivi sulle proteine alimentari, migliorando così la linea di lavorazione. Tuttavia, diversi sono i limiti nell'uso della proteomica come la mancanza di un sistema di validazione e di standardizzazione delle procedure, e soprattutto la complessità nell'analisi.

Tabella 1-1: Classi di proteomica (Afzaal, et al., 2022).

CLASSI DI PROTEOMICA	
1	Proteomica dell'espressione
2	Interazioni proteina-proteina
3	Proteomica funzionale
4	Proteomica strutturale
5	Proteomica dell'estrazione
6	Modificazioni post-traduzionali

Capitolo 2

PRINCIPI GENERALI DELLA PROTEOMICA

Un'analisi proteomica consiste essenzialmente in quattro steps:

- estrazione proteine;
- separazione e quantificazione delle proteine o peptidi;
- identificazione delle proteine;
- analisi e interpretazioni dei dati raccolti.

L'estrazione è fatta sul campione usato per l'analisi. Nel caso in cui la matrice risulti essere particolarmente complessa, è necessaria una parziale purificazione, un arricchimento selettivo o anche un'eliminazione delle proteine particolarmente abbondanti (Surinova, et al., 2011). La separazione delle proteine e/o peptidi è basata principalmente sull'impiego dell'elettroforesi su gel bidimensionale (2-DE) e/o cromatografia liquida (LC), prima di essere analizzate con la MS. A seconda di come le proteine verranno analizzate nello spettrometro di massa, possono essere seguiti due diversi flussi di lavoro proteomici: gli approcci bottom-up o gli approcci top-down (Gallardo, et al., 2013) (Figura 2-1).

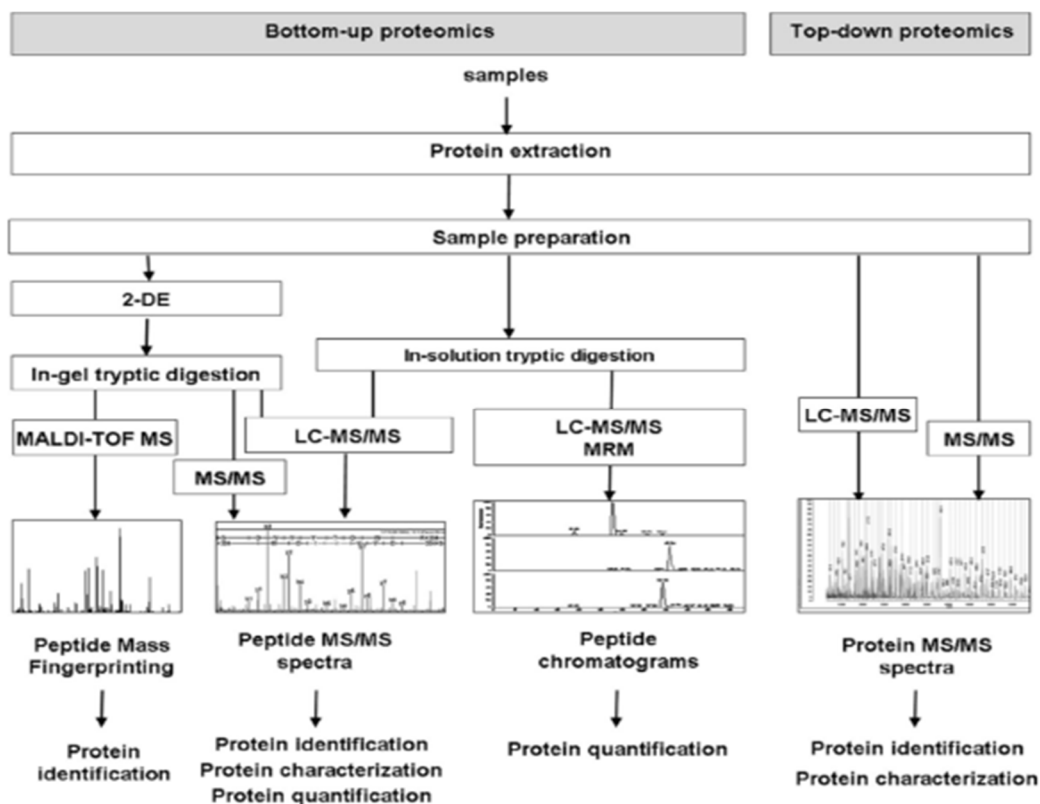


Figura 2-1: Flussi di lavoro proteomici comunemente utilizzati per la ricerca alimentare (Gallardo et al., 2013).

L'approccio più comune è il bottom-up detto anche approccio peptide-based dove le proteine di interesse vengono convertite in peptidi con l'utilizzo di enzimi, come la tripsina: i peptidi frammentati così ottenuti vengono poi analizzati tramite MS (Pandey & Mann, 2000). L'approccio bottom-up può essere ulteriormente diviso se (i) prima della digestione enzimatica si ha una fase di separazione elettroforetica. In questo caso il metodo utilizzato è la 2-DE, in cui le proteine vengono separate in base al loro punto isoelettrico e peso molecolare, in modo che possano essere asportate individualmente dal gel e successivamente digerite in peptidi. Dopo averle separate e digerite, la quantificazione e identificazione delle proteine viene fatta utilizzando la spettrometria di massa come la LC-MS, MALDI-TOF MS, o MS/MS. La MALDI -TOF è usata nelle identificazioni delle proteine mentre le tecniche MS/MS o LC-MS/MS vengono utilizzate nell'identificazione, caratterizzazione e quantificazione delle proteine. Nell'altro caso (ii) il mix di proteine è digerito enzimaticamente senza una separazione iniziale e i peptidi ottenuti vengono analizzati con LC-MS (Gallardo, et al., 2013).

Al contrario, l'approccio top-down permette la caratterizzazione dei peptidi ottenuti dalle proteine integre direttamente frammentate all'interno dello spettrometro di massa, evitando lo step della digestione enzimatica. Questo approccio è possibile grazie all'elevata accuratezza dei nuovi spettrometri di massa ad alta risoluzione, sebbene le loro performance siano piuttosto limitate per via dei vincoli strumentali (Gallardo, et al., 2013).

Capitolo 3

AREE SPERIMENTALI

Le aree sperimentali chiave della proteomica sono essenzialmente tre, quella qualitativa, quella quantitativa e la proteomica funzionale. Nella Figura 3-1 sono evidenziate le funzioni e gli approcci alla base delle diverse tipologie.

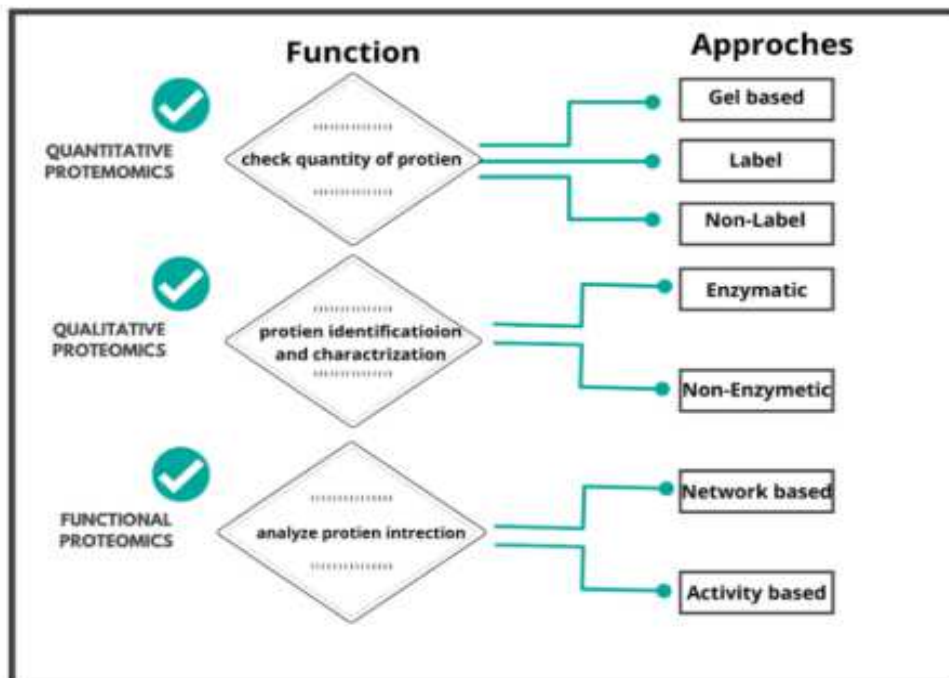


Figura 3-1: Aree sperimentali chiave della proteomica con le loro funzioni e approcci (Afzaal, et al., 2022)

3.1 Proteomica quantitativa

La quantità di proteine in un alimento è influenzata da diversi fattori, come la composizione dell'alimento, la variabilità biologica dei componenti che lo caratterizzano e dai processi tecnologici che l'alimento stesso subisce. La proteomica quantitativa permette di effettuare sia quantificazioni relative quando si va a calcolare specifiche proteine confrontandole tra vari

campioni, sia quantificazioni assolute, quando si prendono in considerazione tutti i peptidi del campione. Questo può essere di particolare aiuto quando si vanno a cercare ad esempio le differenze tra trattamenti diversi, prodotti alimentari sia geneticamente modificati che no, dove in questo caso conoscere l'informazione quantitativa del livello delle proteine (sia assoluta che relativa) può essere molto utile. Tra gli studi più comuni che vengono fatti in termini di proteomica quantitativa ci sono quelli che riguardano le variazioni naturali delle materie prime, i processi tecnologici e lo stoccaggio degli alimenti (Restani, et al., 1997). I metodi basati su gel consentono di comparare la quantità delle proteine presenti in campioni differenti, ad esempio, attraverso la 2-DE. Un particolare impiego dell'elettroforesi bidimensionale è legato alla marcatura fluorescente delle proteine prima dell'analisi, permettendo in questo modo la quantificazione e l'autenticazione di questi nutrienti, così come l'identificazione di specie adulteranti (Minden, et al., 2009). In molti casi questo tipo di analisi quantitative possono essere condotte senza una pre-separazione con gel: la quantificazione relativa per le ammine primarie è ottenuta ad esempio utilizzando dei particolari sistemi di spettrometria di massa marcati, come la dimetil labeling, la quantificazione relativa assoluta con tag isobarici (Ross, et al., 2004), e la tandem mass tags (Thompson, et al., 2003), sistemi in cui la marcatura dei campioni con opportuni tag, facilita la quantificazione e l'identificazione di macromolecole biologiche come proteine e peptidi. La quantificazione senza l'impiego di tag utilizza molteplici metodi di valutazione che si basano o sul conteggio degli spettri, ovvero andando a confrontare la somma degli spettri MS/MS dei peptidi assegnati alla proteina, oppure mediante il calcolo delle aree dei picchi dello spettro ionico di precursori in MS. Le metodologie della proteomica quantitativa sono state notevolmente migliorate (Gallien, et al., 2011) ad esempio implementando la spettrometria di massa con la tecnica del selected reaction monitoring, con cui si monitorano transizioni specifiche, oppure accoppiando la spettrometria di massa alla cromatografia liquida, ampiamente utilizzata nelle ricerche biomediche per validare e verificare candidati biomarker proteici.

3.2 Proteomica qualitativa

La caratterizzazione e il rilevamento delle proteine nei prodotti alimentari, che può riguardare o tutte le proteine o specifici sottoinsiemi di proteine, è conosciuta come proteomica qualitativa. Tipici esempi sono gli enzimi glicolitici nella carne o le caseine nei prodotti lattiero-caseari. I due metodi principali di identificazione proteica sono la Peptide Fragment Fingerprinting e la Peptide Mass Fingerprinting che sono entrambi coinvolti nella digestione enzimatica delle proteine. In alternativa si può utilizzare l'approccio top-down (Lafferty, et

al., 2021) con la spettrometria di massa tandem che viene usata sulle proteine intatte. Tutte queste procedure sono basate sull'impiego di database nei quali sono raccolte le sequenze delle proteine che vengono identificate. I database attualmente disponibili, come ad esempio la UniProtKB (Uniprot Consortium, 2019) o NCBI (National Center for Biotechnology Information), U.S. National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA, nella maggior parte dei casi però non forniscono dati accurati sulle sequenze proteiche per la moltitudine di proteine presenti nei prodotti alimentari di origine vegetale, animale o fungino. Le modificazioni post-traduzionali (PTM) a carico delle proteine possono avvenire a causa dei metodi produttivi degli alimenti, dai trattamenti che questi subiscono e dai sistemi di conservazione che vengono adottati. Solo poche forme di PTM vengono studiate approfonditamente su oltre le 300 conosciute (Zhao & Jensen, 2009) come la glicosilazione, l'acetilazione, l'ossidazione e la fosforilazione. Le PTM non biologiche chiamate anche modificazioni post-traduzionali non enzimatiche come l'idrossilazione aromatica, la reazione di Maillard, l'ossidazione dei tioli, la carbonilazione, la condensazione, la rottura della struttura peptidica e la rimozione della catena laterale, sono quelle che si ottengono più frequentemente durante la conservazione e la lavorazione dei cibi (Clerens, et al., 2012).

3.3 Proteomica funzionale

Le interazioni proteina-proteina, quelle tra proteina e altre molecole, così come i loro effetti, sono gli aspetti principalmente studiati dalla proteomica funzionale (Coombs, 2020). Negli approcci funzionali vengono utilizzate ad esempio delle sonde in grado di marcare covalentemente gli enzimi attivi (Activity-based protein profiling), permettendo in questo modo di screenare un gran numero di composti (Serim, et al., 2012). Un altro aspetto della proteomica funzionale permette di studiare l'attività di base della proteina in un campione (activity-based), così come la sua inibizione e la sua funzione (Elmore, et al., 2021). L'imaging con spettrometria di massa, una nuova modalità di imaging che consente di mappare le proteine all'interno di una sezione di tessuto o di campione, rappresenta un nuovo strumento di proteomica funzionale, in grado di aiutare a comprendere le funzioni delle proteine, localizzandone le diverse isoforme (Angel & Caprioli, 2013).

Capitolo 4

APPLICAZIONI DELLA PROTEOMICA

Oggi, i consumatori non focalizzano più la loro attenzione solo sugli attributi sensoriali dei prodotti alimentari, ma sono interessati anche agli aspetti che riguardano la sicurezza, i nutrienti, i processi e gli additivi presenti (Saeed, et al., 2021). La proteomica ha del potenziale promettente per provare l'affidabilità e la sicurezza dei prodotti alimentari, inoltre è utile nell'industria alimentare in molte aree della qualità, tracciabilità, ottimizzazione e conservazione. Tuttavia, ci vorrà del tempo per adottare strumenti così sofisticati su scala industriale.

Nei prossimi capitoli verranno trattate le applicazioni della proteomica sull'autenticazione, sulla qualità e sulla sicurezza alimentare, con gli approcci tecnologici più comunemente utilizzati.

4.1 Approcci proteomici sull'autenticazione degli alimenti

Vista la stretta relazione tra nutrizione e salute e considerando il crescente interesse da parte dei consumatori, l'autenticazione e l'etichettatura dei prodotti alimentari è oggi fondamentale. Una giusta etichettatura diventa importante, ad esempio, per i consumatori che sono intolleranti a particolari composti, o per quelli che non possono mangiare determinate specie animali per motivi religiosi (Meijer, et al., 2021). Tuttavia, con l'incremento della richiesta di cibo, l'adulterazione e il falso etichettaggio stanno diventando un enorme problema nella catena alimentare rendendo sempre più difficile il monitoraggio e il controllo della qualità degli alimenti. Valutare l'adulterazione in un prodotto è importante anche per un discorso di sicurezza legata alla possibilità che alcuni ingredienti possono causare allergie o problemi di salute al consumatore (Spink & Moyer, 2011). Specifiche autenticazioni, quando fatte con metodi tradizionali, richiedono molto tempo e non possono essere applicate per rilevare adulterazioni minori del 5% del prodotto (Špoljarić, et al., 2013). I metodi proteomici vengono utilizzati attualmente perché sono veloci, adattabili e con un rendimento elevato grazie al recente sviluppo della spettrometria di massa (Piñeiro, et al., 2003). Per questo motivo la proteomica viene usata come parte di molteplici studi per il rilevamento di possibili

adulterazioni nei prodotti alimentari mediante l'identificazione e la rilevazione di specifiche specie di marcatori proteici con l'aiuto delle tecniche della spettrometria di massa (LC-MS, spettrometria di massa tandem e la MALDI-TOF MS). Le tecniche proteomiche che si occupano di autenticazione sono usate principalmente per gli alimenti di origine animale (carne e prodotti lattiero caseari) e in parte anche per gli alimenti di origine vegetale (Leitner, et al., 2006). La proteomica sfrutta dunque i vantaggi della MS che permette rilevamenti, caratterizzazioni e quantificazioni dei peptidi in maniera veloce, affidabile e con resa elevata.

4.2 Approcci proteomici sulla qualità alimentare

Conoscere la composizione dell'alimento può essere utile non solo per dare chiare informazioni al consumatore ma anche per migliorare la qualità degli alimenti. Le proteine agiscono come marker per conoscere la composizione dell'alimento, l'origine e la lavorazione che ha subito (Ortea, et al., 2010). Così, la conoscenza della proteomica può aiutare a migliorare la qualità del cibo ottimizzando i processi produttivi, studiando il loro diverso effetto sulla composizione proteica e identificando le proteine modificate dalle lavorazioni (Renzone, et al., 2021). I differenti processi di lavorazione degli alimenti, quindi, influenzano la qualità del prodotto finale portando cambiamenti al profilo proteico. Queste modificazioni aiutano il produttore a migliorare i processi produttivi andando a studiare i loro effetti causati da particolari trasformazioni avvenute a livello proteico. Ogni operazione unitaria durante la produzione alimentare porta specifici cambiamenti a particolari marker proteici che agiscono come indicatori per capire se il processo è avvenuto correttamente oppure no. Ad esempio, la qualità del prodotto può essere influenzata negativamente da un trattamento termico improprio. Le allergie contro i prodotti lattiero caseari possono essere indotte ad esempio dalla carbonilazione della β -lattoglobulina e di altre proteine del latte durante i processi industriali (Gašo-Sokač, et al., 2010). A tale scopo la tecnica MALDI-TOF MS viene usata proprio per identificare queste proteine carbonilate. Le proteine inoltre determinano le proprietà fisico-chimiche e le qualità nutritive degli alimenti come, ad esempio, il colore, l'odore e nel caso della carne la sua tenerezza. Alcune proteine, gli enzimi, coinvolti nel metabolismo ossidativo sono responsabili del cambiamento del colore della carne, altre come la miosina, actina e tubulina sono coinvolte nella sua tenerezza e rilevandone la loro quantità possiamo andare a misurare specifici parametri qualitativi (Zapata, et al., 2009). La qualità della carne dipende da molti fattori, tra cui i fattori post mortem o le modificazioni delle proteine. Una delle principali degradazioni chimiche delle proteine è la produzione di acido glutammico o acido aspartico prodotti dalla idrolisi rispettivamente della glutammina o asparagina; i metodi

spettrometrici possono essere applicati proprio per la rilevazione di questo tipo di degradazione (Ortea, et al., 2016). In sintesi, la valutazione della modificazione delle proteine degli alimenti ottenuta tramite le analisi proteomiche può aiutare a modificare i processi produttivi, mostrandone la loro validità ed efficacia.

4.3 Approcci proteomici sulla sicurezza alimentare

La sicurezza alimentare è un importante aspetto per la salute umana. Ogni anno molte persone nel mondo soffrono di numerose patologie legate al consumo di determinati alimenti (Bolek, 2020). A volte, negligenze riguardanti la sicurezza alimentare possono portare alla morte come, ad esempio, la sindrome emolitico-uremica causata da *E. coli* O157:H7. Approcci proteomici possono essere applicati a questo settore e, usando tecniche opportune, i microorganismi sporigeni (Gallardo, et al., 2013) e i differenti patogeni alimentari possono essere identificati basandosi sui cambiamenti del loro proteoma (Carrera, et al., 2020). Sono inoltre studiati, tramite la proteomica, anche gli allergeni alimentari. La MALDI-TOF MS e la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata con lo spettrometro di massa con ionizzazione elettrospray (ESI MS/MS) sono le tecniche proteomiche che vengono usate in molti studi per la rilevazione, quantificazione, e identificazione di diversi microbi, delle loro tossine, e di diversi allergeni alimentari.

4.3.1 Identificazione patogeni e tossine alimentari

Più di 250 patogeni sono noti per essere la causa di malattie di origine alimentare, principalmente i microbi e le loro tossine. Per questo motivo per identificare e classificare i microorganismi vengono utilizzati metodi morfologici, biochimici e del DNA. In quest'ultimo caso si effettua prima un prelievo del DNA dalla matrice e se la quantità non è sufficiente viene fatta una amplificazione mediante PCR. Il sequenziamento finale può essere effettuato tramite metodo di Sanger. Le metodologie proteomiche iniziano ad essere utilizzate per aiutare a identificare patogeni e microbi di origine alimentare che possono portare a fenomeni di tossinfezione. Per questo motivo, le nuove tecnologie per determinare e classificare accuratamente e rapidamente i microorganismi, come ad esempio la proteomica MS, complementano le tecniche di identificazione classiche e quelle basate sulla genetica. Le tecnologie proteomiche, principalmente nella microbiologia clinica, di biodifesa, e delle scienze ambientali, vengono utilizzate nelle regolari identificazioni microbiologiche. Nel campo alimentare la MS, tuttavia, viene utilizzata per classificare microorganismi e patogeni di origine alimentare responsabili del deterioramento degli alimenti (Afzaal, et al., 2022). Per

il rilevamento di 24 differenti batteri e patogeni alimentari, come ad esempio i generi *Staphylococcus*, *Yersinia*, *Proteus*, *Escherichia*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Morganella*, e *Salmonella*, viene utilizzata la MALDI-TOF MS su cellule batteriche (Mazzeo, et al., 2006). Basandosi sul profilo totale del proteoma batterico, la MALDI-TOF fornisce una impronta specifica del microorganismo analizzato in quello specifico tempo e in quelle determinate condizioni fisiologiche (Pavlovic, et al., 2013). L'impronta ottenuta tramite questo metodo ha molte applicazioni come, ad esempio, la caratterizzazione di sottospecie, ceppi e sierotipo tipici del microorganismo analizzato (Piras, et al., 2016). La tossina Shiga prodotta da *Escherichia coli* è tra i maggiori responsabili di gravi epidemie di origine alimentare. Può essere identificata usando la spettrometria di massa tandem e la MALDI-TOF (Fagerquist, et al., 2014). Con questa tecnica può essere inoltre rilevata fino ad un'unità formante colonia (CFU) per ml di *L. monocytogenes* in meno di 30 ore. *Staphylococcus aureus* causa malattie in almeno 185 mila persone negli USA ogni anno. Un saggio di spettrometria di massa è stato usato da Callahan et al. (Callahan, et al., 2006) per caratterizzare una delle sue tossine (staphylococcal enterotoxin B). Le tecniche proteomiche come la LC-MS/MS sono inoltre utilizzate per la rilevazione delle tossine come le micotossine e aflatossine negli alimenti.

4.3.2 Identificazione allergeni alimentari

Gli allergeni sono agenti che inducono una risposta del sistema immunitario, aumentando l'istamina, le immunoglobulina-IgE, le citochine e altre risposte del corpo determinando così reazioni allergiche (Jagadeesh, et al., 2017). Per questo motivo le allergie alimentari sono un grande problema legato all'aspetto della sicurezza. Anche gli allergeni possono essere rilevati tramite le tecniche proteomiche. I metodi proteomici per il rilevamento degli allergeni alimentari possono essere gel-based oppure gel-free che sono spesso combinate con tecniche spettrometriche come HPLC-MS/MS (nel caso del gel-free) oppure la 2D immunoblotting e MS (nel caso del gel-based). Carrera e i suoi colleghi (Carrera, et al., 2012) hanno usato la MS/MS per rilevare l'allergene del pesce parvalbumina in meno di 2 ore. Ci sono sei gruppi principali di allergeni alimentari e la loro rilevazione è possibile con la spettrometria di massa sia gel-based che non gel-based HPLC combinata con la spettrometria di massa tandem. Il 90% della ipersensibilità alimentare è causata da allergeni degli alimenti vegetali trovati nelle arachidi, nella soia e nel frumento (Šotkovský, et al., 2008). Nell'allergenomica, ovvero l'utilizzo della proteomica per rilevare ed analizzare gli allergeni, l'immunoblotting delle proteine IgE-reattive viene fatto usando un siero di pazienti allergici mediante la 2-DE (Akagawa, et al., 2007). La quantità di allergeni nella frutta è influenzata dalle tecnologie post-

raccolta. Ad esempio, effettuando un immagazzinamento ad atmosfera controllata si impedisce e/o si riduce la contaminazione di polline sugli alimenti (Pedreschi, et al., 2007).

Capitolo 5

LE PROTEINE DEL LATTE E LA LORO IMPORTANZA NELLA NUTRIZIONE UMANA

Il latte è definito come il liquido secreto dalle mammelle dei mammiferi utilizzato per il nutrimento dei neonati. Tuttavia, sin dall'antichità, gli esseri umani considerano il latte una risorsa preziosa, per via della sua composizione nutrizionale e della sua facile reperibilità. Questa considerazione ha portato ad un cambiamento della sua definizione. Dal punto di vista tecnologico il latte viene quindi meglio definito come il prodotto ottenuto dalla mungitura degli animali che vengono allevati per il solo obiettivo di produrre latte (Edgar & Mixa, 1998). Vengono utilizzati differenti specie di animali: il latte vaccino rappresenta l'80% della produzione globale, seguito da quello di bufala (circa 15%), capra (circa 2,5%), pecora (circa 1%), e cammello (circa 0,4%). È doveroso ricordare che il latte nella dieta umana non viene consumato solo come materia prima. La lavorazione dei prodotti lattiero-caseari fermentati è una tradizione di migliaia di anni, che include una vasta varietà di alimenti con differenti textures, gusti, aromi, forme e dimensioni (Coppola, et al., 2008). Il latte a livello nutrizionale è un alimento molto completo grazie all'equilibrio dei vari componenti, i quali hanno proporzioni variabili che dipendono da diversi fattori, come ad esempio la specie, la razza, il periodo di allattamento e la dieta dell'animale (Guetouache, et al., 2014). Per esempio, il latte di bufala e quello di pecora hanno un più alto contenuto di grasso (rispettivamente 7,5% e 6,4%) rispetto al vaccino (3,3%) e caprino (3,9%). Le composizioni nutrizionali di questi tipi di latte, compreso quello del cammello, sono indicate nella Tabella 5-1 (Muehlhoff, et al., 2013). Il latte è un prodotto biologicamente concepito per fornire al neonato i necessari fabbisogni nutrizionali e, in particolare, la frazione proteica è molto apprezzata per la sua elevata qualità nutrizionale. Il consumo del latte fornisce tutti gli amminoacidi essenziali e altri componenti, come ad esempio le proteine leganti delle vitamine e dei metalli e vari ormoni (Fox, et al., 2015). Il profilo amminoacidico è simile a quello delle uova, sebbene sia contenuto il quantitativo in amminoacidi solforati. Tuttavia, secondo il FAO/WHO/UNU, la varietà e la quantità delle principali molecole presenti nel latte sono sufficienti per soddisfare il fabbisogno giornaliero degli adulti (Pellegrino, et al., 2013). Rafiq et al. hanno riportato un buon equilibrio di amminoacidi essenziali, in tutte le tipologie di latte, specialmente di amminoacidi ramificati

(leucina, isoleucina e valina) importanti per soddisfare il nostro fabbisogno quotidiano (Rafiq, et al., 2016).

Tabella 5-1: Composizione nutrizionale dei latti più consumati al mondo (Muehlhoff, et al., 2013).

	COMPOSIZIONE (g/100g)				
	Vacca	Bufala	Capra	Pecora	Cammello
Acqua	87,8	83,2	87,7	82,1	84,8
Proteine	3,3	4	3,4	5,6	3,9
Grassi	3,3	7,5	3,9	6,4	5
Lattosio	4,7	4,4	4,4	5,1	4,2
Ceneri	0,7	0,8	0,8	0,9	0,9

Le proprietà uniche delle proteine del latte e il loro impatto tecnologico nella produzione di latticini hanno portato a studiarle e caratterizzarle in maniera più approfondita (Goulding, et al., 2019). Le proteine del latte si dividono in due tipologie: caseine e sieroproteine. Le prime sono ottenute dopo una precipitazione mediante acidificazione o aggiunta di caglio; a pH 4,6 la frazione delle caseine è insolubile nel latte. Il liquido che rimane a fine precipitazione viene chiamato siero ed è una soluzione contenente proteine (sieroproteine), lattosio, sali, vitamine e altri componenti in tracce (O' Mahony & Fox, 2013). Le caseine le possiamo distinguere in 5 tipologie: α 1-caseina, α 2-caseina, β -caseina, γ -caseina, e κ -caseina (Farkye & Shah, 2015). Rappresentano circa l'80% delle proteine del latte e si dispongono in particelle colloidali con un diametro di 50-600 nm, chiamate micelle. Sono le responsabili delle caratteristiche più importanti e particolari del latte; come ad esempio il colore bianco, la stabilità alle alte temperature ed infine alla coagulazione dopo l'aggiunta del caglio (Fox & Brodtkorb, 2008). Le micelle caseiniche sono strutture complesse che vengono formate grazie alle caseine altamente fosforilate, le quali interagiscono e si aggregano al fosfato di calcio presente nel latte. La quantità di κ -caseine (localizzate sulla superficie) determina la grandezza delle micelle, oltre a molte altre proprietà; in particolare la stabilità all'aggregazione, fattore determinante nella produzione di latticini (Dagleish, 2011).

Le siero proteine comprendono il 20% delle proteine totali e lo 0,7% del totale del latte vaccino e, come le caseine, sono divise in più tipologie: β -lattoglobulina, α -lattoalbumina e molte altre presenti in minor quantità (Fox, 2009). La più abbondante è la β -lattoglobulina ed è suddivisa in due varianti genetiche, differenziate dalla sostituzione di un residuo di glicina

(variante A) con un altro di acido aspartico (variante B). La β -lattoglobulina è caratterizzata dall'assenza di fosforo e dalla presenza di due gruppi disolfuro e un gruppo solfidrilico libero. Un'altra proteina abbondante nel siero è l' α -lattoalbumina, che rappresenta circa il 13% delle sieroproteine. La molecola ha quattro ponti disolfuro e, come la β -lattoglobulina, non ha il fosforo. Nel siero possiamo individuare altre proteine in minor quantità, come ad esempio le immunoglobuline che appartengono al 2 % delle sieroproteine e sono divise in quattro classi IgG1, IgG2, IgA e IgM o l'albumina sierica bovina (BSA) (Kilara & Vaghela, 2018). Le quantità delle varie tipologie di proteine presenti nel latte e differenziate per le cinque specie animale più utilizzate sono presenti nella Tabella 5-2.

Tabella 5-2: Principali proteine in diverse specie animali. a (Ceballos, et al., 2009); b (Pelmus, et al., 2012); c (Bonfatti, et al., 2013); d (Omar, et al., 2016).

Composizione (g/L di latte)	Vacca ^a	Capra ^a	Pecora ^b	Bufala ^c	Cammello ^d
Proteine grezze	29,4	35,84	55,83	60,10	26,5
Caseine	24	29,64	41,39	50,38	17,34
α s-caseine	11,12	9,83	17,69	24,14	2,89
β -caseine	12,88	19,80	13,95	18,45	12,78
κ -caseine			9,74	7,79	1,67
Siero proteine	5,04	6,20	-	-	-
α -lattoglobulina	-	-	6,57	4,30	2,01
β -lattoglobulina	-	-	7,86	5,42	-

Recentemente, gli studi sulle proteine del latte e sui composti correlati ne hanno rilevato una moltitudine di proprietà benefiche per la salute. Per questo motivo il consumo di latte e latticini può aiutare a prevenire e ritardare la comparsa di alcuni tipi di cancro (Zarogoulidis, et al., 2015). Riguardo questo argomento, Kim et al. hanno riportato che le α -caseine, β -caseine, and β -lattoglobuline proteggono le cellule da stress ossidativi inibendo la senescenza cellulare (Kim, et al., 2019). Questi componenti potrebbero essere utilizzati come supplementi per la prevenzione delle malattie associate all'invecchiamento, specialmente per la perdita muscolare.

Il latte è un mezzo molto nutriente, è una fonte naturale di acidi grassi, amminoacidi e lattosio, che lo rendono anche un ottimo substrato di crescita per i microrganismi. Tuttavia, nel latte, così come nei suoi derivati, vengono trovate anche sostanze antimicrobiche come le

immunoglobuline, lattoferrina, lattoperossidasi e lisozima (Atanasova & Ivanova, 2010). Queste molecole aumentano la stabilità dei prodotti rendendoli così utilizzabili come nutraceutici.

Riassumendo le proteine del latte, specialmente quelle derivanti dal siero, presentano elevate attività biologiche agendo come promotori della salute. La ricerca infatti suggerisce che il loro utilizzo nel trattamento di malattie croniche, come l'obesità, l'ipertensione o il diabete di tipo 2, potrebbe migliorare la prognosi dei pazienti (Korhonen & Marnila, 2013).

Capitolo 6

PROGRESSI DELLA PROTEOMICA NELLA CARATTERIZZAZIONE DEL LATTE E DEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI

Durante gli anni 80' la 2-DE è stata ampiamente utilizzata per mappare il proteoma del latte e dei suoi derivati. Attraverso l'isoelettrofocalizzazione (IEF) e l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) è stato infatti possibile comparare le proteine più abbondanti nelle matrici testate (Rogowska-Wrzesinska, et al., 2013). Tuttavia, quelle presenti in minori quantità non sono rilevabili con questa tecnica. Creando un gradiente di pH immobilizzato (IPG) questo problema viene parzialmente risolto; incrementando in questo modo la risoluzione e garantendo una visualizzazione migliore del profilo proteico (Manso, et al., 2005). L'IPG è una tecnica che si basa sul principio che il gradiente di pH, creato prima della corsa IEF stessa, è copolimerizzato e così insolubilizzato all'interno delle fibre della matrice di poliacrilamide. Questo si ottiene usando come tampone un insieme di sette acidi e basi deboli non anfoteri con concentrazioni che definiscono l'intervallo e la forma del gradiente di pH prodotto (Righetti, et al., 1996). Utilizzando tale metodo è stato possibile isolare e fare una successiva caratterizzazione della variante genetica della β -lattoglobulina del latte vaccino (Conti, et al., 1988). Combinando la 2-DE con uno specifico rilevatore si incrementa notevolmente la sensibilità della caratterizzazione. L'accoppiamento con la MS è stata una delle più importanti innovazioni della proteomica applicata al latte e ai suoi derivati (Mansour, et al., 2015). Utilizzando questa strategia sono state identificate fino a 30 proteine da un estratto liquido di formaggio svizzero in fase di maturazione, incluse le proteine espresse dallo *Streptococcus thermophilus* ITG ST20 e *Lactobacillus helveticus* ITG LH1 che sono microrganismi starter (Figura 6-1) (Jardin, et al., 2012).

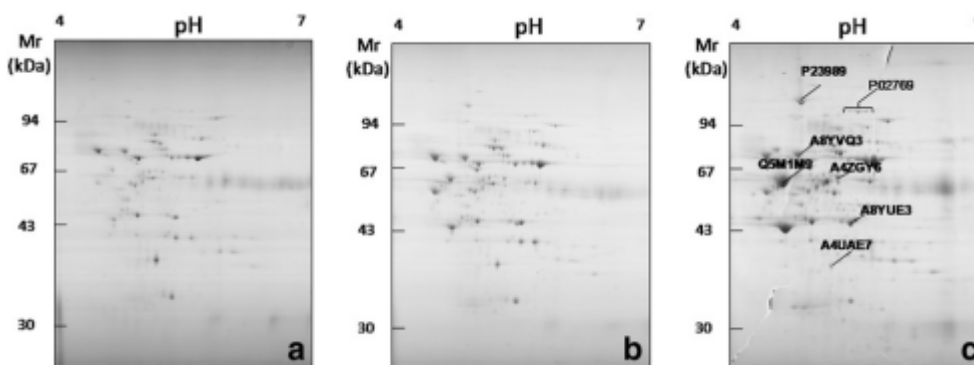


Figura 6-1: Proteine in uno estratto liquido di formaggio di tipo svizzero determinate mediante elettroforesi su gel 2D a (a) 7 giorni, (b) 20 giorni e (c) 69 giorni di maturazione (Jardin, et al., 2012)

In maniera simile è stato caratterizzato da Pourjoula et al., (Pourjoula, et al., 2020) il proteoma e peptidoma del kashz, un latticino iraniano prodotto dal latte acido, combinando tecnologie come la SDS-PAGE e l'HPLC con la MS.

Il proteoma del latte è molto eterogeneo a causa dei numerosi isomeri proteici, i quali si potrebbero essere formati da splicing alternativi di mRNA, mutazioni e PTM. Queste modificazioni proteiche spesso causano variazioni nella massa molecolare e nella carica netta (Holland & Boland, 2014). Le PTM sono molto importanti quando si caratterizza il proteoma poiché influenzano aspetti strutturali o funzionali della proteina coinvolta. Hanno origine dopo la sintesi proteica sui ribosomi cellulari e, dopo il polimorfismo genetico, sono le cause principali dell'espansione del proteoma del latte, con conseguente incremento della sua complessità. Le proteine che hanno subito queste modificazioni causano cambiamenti sulle proprietà del latte come, ad esempio, la stabilità micellare, essenziale nella produzione del formaggio (Le, et al., 2017). Si è scoperto che queste particolari modificazioni sono influenzate da diversi fattori. Pertanto, Fang et al. (Fang, et al., 2017) hanno riportato variazioni nelle concentrazioni relative delle isoforme dell' α_s -caseina fosforilata nel latte vaccino a seconda di fattori intrinseci ed estrinseci. Frederiksen et al. hanno trovato che la presenza di basse proporzioni delle due varianti meno fosforilate di α -caseina (α s1-caseina-8P e α s2-caseina-11P), nel latte Holstein danese, è collegata ad una peggiore coagulazione rispetto ad un campione di latte con più alte proporzioni (Figura 6-2) (Frederiksen, et al., 2011).

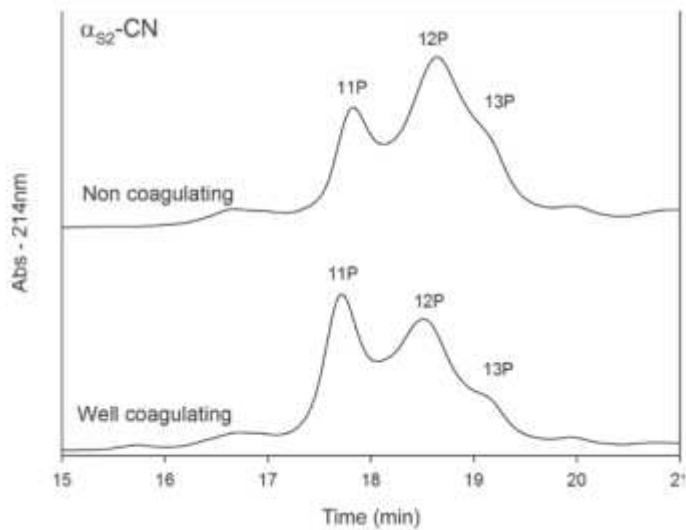


Figura 6-2 Modifiche post-traduzionali di α S2-CN nel latte ben coagulante e non coagulante. I 3 picchi principali di α S2-CN corrispondono alla modifica della proteina con 11, 12 o 13 gruppi fosfato (Frederiksen, et al., 2011).

Meno significativo per la coagulazione del latte sembra essere il livello di fosforilazione della κ -caseina. In uno studio sulle razze bovine Holstein e Jersey sono state identificate sei isoforme di κ -caseina che variavano nei livelli di fosforilazione e glicosilazione indipendenti dalla capacità di coagulazione del latte (Jensen, et al., 2012). I progressi nella proteomica hanno permesso di identificare le modificazioni proteiche collegando in serie più analizzatori di massa. È stato possibile decifrare le proteine di membrana dei globuli di grasso nel latte di diverse specie; Pisanu et al. ne hanno decifrate 150 nel latte di pecora utilizzando la LC tandem mass spectrometry (Pisanu, et al., 2011). Il collegamento in serie degli spettrometri di massa ha permesso di ottenere informazioni più dettagliate sulle strutture molecolari dei composti. L'equipaggiamento con l'ESI-MS o MALDI-TOF risulta molto efficace per il rilevamento di ioni molecolari e per fornire preziose informazioni strutturali. Il primo analizzatore isola gli ioni e li frammenta. Successivamente, l'ultimo analizzatore separa questi frammenti basandosi sui valori di m/z (El-Aneed, et al., 2009). Recenti studi hanno dimostrato l'utilità di questo progresso della MS. Milkovska-Stamenova e Hoffmann hanno identificato 14 diversi tipi di prodotti finali della glicazione avanzata (AGEs) prodotte durante la lavorazione casearia e la conservazione, utilizzando nanoRP-UPLC-ESI-MS/MS. Hanno riportato su marche di latte diverse che più è alta la temperatura del trattamento termico maggiore sarà il numero di AGE prodotti (Figura 6-3) (Milkovska-Stamenova & Hoffmann, 2019). Gli AGEs possono alterare le funzioni proteiche, diminuire il valore nutrizionale e produrre effetti potenzialmente dannosi

alla salute. L'identificazione delle proteine poco abbondanti nel latte e prodotti lattiero-caseari ha ricevuto importanza grazie ai loro possibili effetti benefici sulla salute. Tacoma et al. hanno trovato un totale di 935 proteine presenti in basse quantità nel latte scremato della vacca Holstein e Jersey usando la LC-MS/MS. In questo studio è stato osservato che 43 di queste proteine erano espresse diversamente tra le due razze (Tacoma, et al., 2016). Allo stesso modo, Verma et al. hanno usato una nano-scale LC tandem mass spectrometry per l'identificazione di 1307 proteine funzionali comprese caseine e proteine poco abbondanti. Gli autori riportarono che la maggior parte di queste proteine erano coinvolte nella funzione legante e nelle attività catalitiche e strutturali (Verma, et al., 2020).

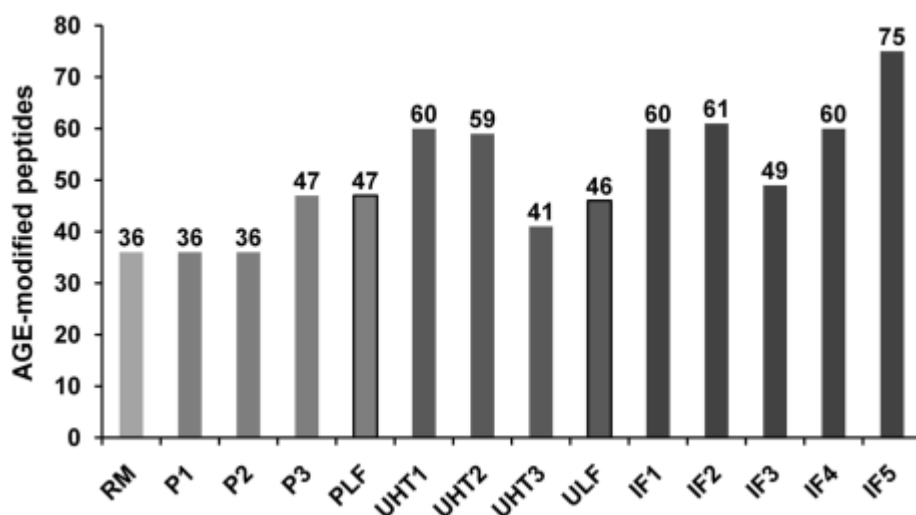


Figura 6-3: Numero totale di peptidi AGEs identificati nel latte crudo (RM), latte pastorizzato (P) di tre marche diverse (1-3), latte pastorizzato senza lattosio (PLF), latte trattato a temperatura ultraelevata (UHT) di tre marche diverse (1-3), latte UHT senza lattosio (ULF) e latte artificiale (IF) di cinque marche diverse (1-5) mediante nanoRP-UPLC ESI-MS/MS (Milkovska-Stamenova & Hoffmann, 2019).

Capitolo 7

VANTAGGI DEI RECENTI PROGRESSI PROTEOMICI NELLA PRODUZIONE DI LATTE E LATTICINI

Nel settore lattiero-caseario, la tutela della salute umana e la garanzia dei valori nutrizionali sono essenziali e necessari per garantire i parametri qualitativi nonché la salubrità del prodotto. L'origine del latte è fondamentale, poiché ad esempio, quello proveniente da una vacca malata di mastite presenta un elevato numero di cellule somatiche, le quali alterano la concentrazione di caseine, sali, acidi grassi liberi e lattosio. Quindi, un latte di bassa qualità influenzerà i prodotti caseari che ne derivano. Per identificare questo tipo di anomalia, è necessario analizzare i pattern proteici, nonché i PTM e la presenza di allergeni, per ottenere tutte le informazioni necessarie per tutelare il consumatore (Soggiu, et al., 2018).

7.1 L'utilizzo della proteomica per garantire la sicurezza del latte e dei prodotti lattiero-caseari

7.1.1 Identificazione dei microrganismi patogeni nel latte e nei prodotti lattiero-caseari

La proteomica è una tecnologia rivoluzionaria per l'analisi dei campioni e per il rilevamento precoce di malattie che potrebbero influenzare l'intera catena produttiva dei prodotti caseari, come ad esempio la mastite. Con la spettrometria MALDI-TOF si riesce a gestire questa problematica grazie ad una migliore rilevazione dei batteri, identificando come biomarcatori le proteine ribosomiali di diversi microorganismi. Questa metodologia ha migliorato i metodi microbiologici risolvendo problemi che si possono verificare durante la preparazione del campione (Soggiu, et al., 2018). La mastite è una malattia che causa lo scarto di numerosi litri di latte se non viene preventivata o controllata adeguatamente, oltre a rappresentare un problema industriale se passa inosservata. È una malattia infiammatoria dovuta all'infezione del tessuto mammario causata da microorganismi patogeni, tra cui gli stafilococchi, streptococchi ed enterobatteri. I più contagiosi e i maggiori responsabili dell'infezione sono *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Gomes & Henriques, 2016). Quando si manifesta, il latte non è più idoneo alla trasformazione e il suo profilo nutrizionale cambia. Questa malattia è caratterizzata da un elevato numero di cellule somatiche

che a loro volta sono correlate ad un cambiamento del proteoma (Piras, et al., 2016). Ogola et al. (Ogola, et al., 2007) hanno infatti osservato un aumento del livello delle frazioni non caseiniche, di sodio, cloruro e acidi grassi liberi, mentre il contenuto delle caseine, di lattosio, potassio e calcio è più basso rispetto a quello del latte di una vacca sana. Pisanu et al. (Pisanu, et al., 2020), applicando l' SDS-PAGE e LC-MS/MS, hanno riscontrato nel latte di bufala con mastite, un aumento di 119 proteine legate alle difese immunitarie o con funzioni strutturali, tra cui la vimentina, la catelicidina, istoni, S100 e proteine dei granuli dei neutrofili, aptoglobina e lisozima. Nello stesso esperimento, gli autori hanno rilevato fino a 33 proteine presenti in quantità ridotte coinvolte nel metabolismo dei lipidi, tra cui butirrofilina, xantina deidrogenasi/ossidasi, ed enzimi biosintetici dei lipidi. Nella stessa maniera, Abdelmegid et al. (Abdelmegid, et al., 2020) hanno utilizzato la proteomica per trovare cambiamenti nei profili proteici nel siero di latte di vacche affette da mastite per identificare biomarcatori utili a diagnosticare la malattia. Applicando l'elettroforesi su gel bidimensionale differenziale accoppiata con LC-MS/MS sono state identificate 28 proteine presenti in elevate quantità in un latte affetto da *S. aureus* (Figura 7-1). Nove di queste proteine sono coinvolte nelle funzioni di difesa dell'ospite, con un ruolo nel sistema immunitario e funzioni antimicrobiche (siero transferrina, complemento C3, fibrinogeno e catepsina B), mentre altre proteine sono associate alla risposta immunitaria ad agenti patogeni, come l'immunoglobulina polimerica, l'antigene MHC di classe I, e β -2-microglobulina (Abdelmegid, et al., 2020).

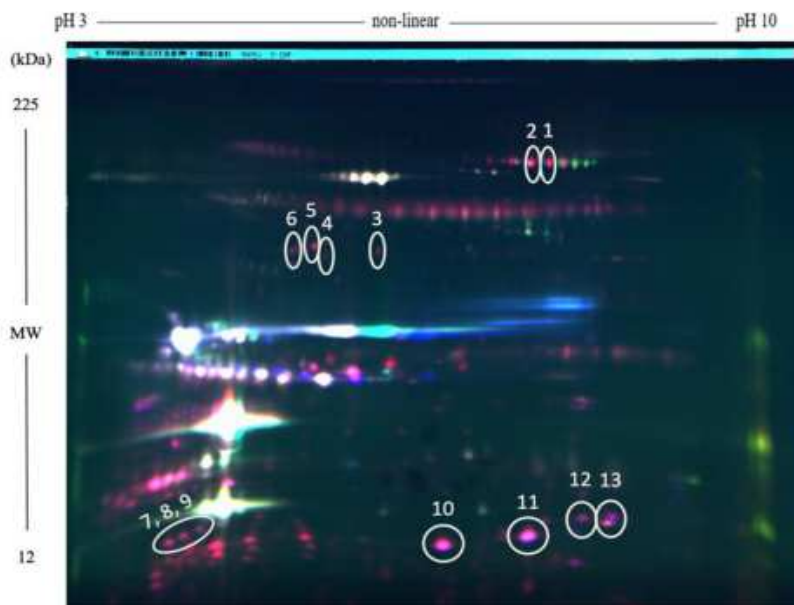


Figura 7-1: Proteine di un latte mastitico (macchie rosse) confrontate con le proteine di un latte sano (macchie verdi) in un'immagine dell'elettroforesi su gel bidimensionale

differenziale. Proteine con livelli simili in entrambi gruppi sono indicati dalle macchie bianche (Abdelmegid, et al., 2020).

I batteri svolgono un ruolo fondamentale nella trasformazione e nella maturazione dei prodotti lattiero-caseari, purché selezionati e introdotti in modo controllato. Tuttavia, quando sono quelli patogeni a prendere il controllo delle reazioni biochimiche, la situazione prende una svolta preoccupante e, se non corretta in tempo, può causare seri danni economici e di salute pubblica. Degli esempi li possiamo trovare nel latticino per eccellenza, il formaggio, spesso considerato un alimento sicuro e stabile. Tuttavia, ci sono microrganismi patogeni che possono essere presenti in quantità pericolose, come ad esempio *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* ed *Escherichia coli* (Soggiu, et al., 2018). Negli ultimi anni sono stati riportati diversi casi di epidemie causate da questi microrganismi e collegate al consumo di formaggio (Raheem, 2016). La proteomica può essere uno strumento utile per rilevare e controllare questi patogeni. Mendonça et al. (Mendonça, et al., 2016) hanno applicato con successo la MALDI-TOF MS/MS per la caratterizzazione del fruttosio 1,6-bifosfato aldolasi (FBA) ed utilizzarlo come antigene target dell'anticorpo mAb-3F8 per riconoscere il gene di *Listeria* (Figura 7-2). I saggi Western Blot hanno ulteriormente dimostrato che mAb-3F8 insieme ad un altro anticorpo (anti-InlA mAb-2D12) potrebbero differenziare le specie di *Listeria* patogene da quelle non patogene (Figura 7-3). In aggiunta, gli studi hanno dimostrato che FBA è presente in ogni frazione delle cellule di *Listeria*, incluso il surnatante e la parete cellulare. Tuttavia, l'eccessivo contenuto proteico del formaggio potrebbe impedire l'identificazione dei patogeni. Karasu-Yalcin et al. (Karasu-Yalcin, et al., 2020) hanno segnalato un ritardo nella rilevazione di *L.monocytogenes* negli alimenti con alto contenuto proteico, causato dall'interferenza dei picchi spettrali dovuta alla diversità dei componenti presenti nel mezzo. Inoltre, il riconoscimento dei batteri nel formaggio di colore bianco, come ad esempio quelli a pasta cruda, non fornisce risultati affidabili. La stessa difficoltà è stata riscontrata anche nell'identificazione di *L.monocytogenes* nel camembert. Jadhav et al. (Jadhav, et al., 2014) hanno ottenuto un rilevamento positivo dopo aver inoculato nel formaggio 10 CFU/mL dell'agente patogeno e un periodo di incubazione di 30 ore. È necessario fare ricerche più approfondite per risolvere questi problemi ed ottenere così un rilevamento affidabile, diretto e rapido dei microrganismi dannosi, implementando la tecnologia proteomica nelle industrie.

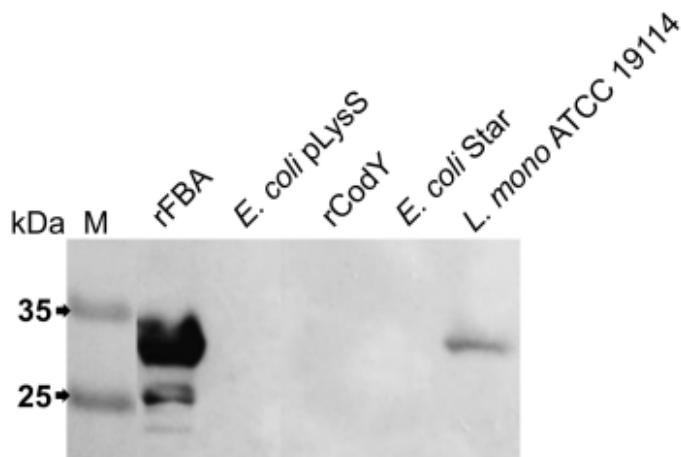


Figura 7-2: Western blot utilizzando mAb-3F8 come anticorpo primario che reagisce con rFBA purificato, nonché con l'estratto proteico di *L.monocytogenes* (Mendonça, et al., 2016).

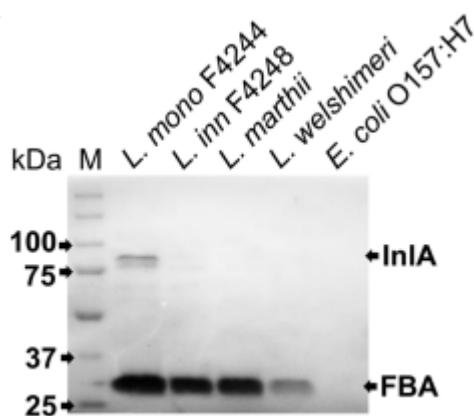


Figura 7-3: Western blot utilizzando mAb-2D12 (anti-InIA) insieme a mAb-3F8, mostrando una banda di 88 kDa corrispondente a InIA, presente solo in *L. monocytogenes* (Mendonça, et al., 2016).

7.1.2 Identificazione degli allergeni nei prodotti lattiero-caseari

Una delle cause di allergia alimentare più frequente è il consumo di latte vaccino. Le proteine α -lattoalbumina, β -lattoglobulina, e caseine sono spesso quelle che causano problemi di ipersensibilità, specialmente nei neonati. Tuttavia, tutte le proteine del latte vaccino possono essere potenziali allergeni, anche quelle presenti in tracce (D'Auria, et al., 2018). L'etichettatura corretta è essenziale per tutelare la salute dei consumatori, così come l'identificazione degli allergeni. L'impiego di saggi immunologici per l'identificazione e la quantificazione degli allergeni è limitato dagli effetti della lavorazione del prodotto e dal

possibile mascheramento degli epitopi. Tradizionalmente, saggi immunologici come il saggio immuno-assorbente legato ad un enzima (ELISA), che si basano sul riconoscimento di anticorpi monoclonali o policlonali, hanno degli svantaggi dovuti dalla denaturazione delle proteine alimentari e dalla degradazione degli epitopi durante il processo termico. L'MS rappresenta un miglioramento dell'analisi proteomica per il rilevamento di allergeni alimentari: attraverso tecniche MS/MS e metodi di acquisizione indipendente dei dati si ottiene migliore selettività, precisione e accuratezza nella quantificazione (López-Pedrouso, et al., 2020). Per la rilevazione degli allergeni, viene spesso usato l'approccio basato sulla ricerca di specifici peptidi con una digestione enzimatica dell'estratto proteico. La selezione dei peptidi può essere effettuata in via preliminare in silico usando strumenti bioinformatici avanzati come le banche dati online per sequenze in formato FASTA (Uniprot), strumenti di ricerca per l'allineamento delle sequenze (BLAST), software gratuiti per metodi target proteomici come Skyline, o tramite analisi MS/MS non dirette di campioni con allergeni digeriti enzimaticamente presenti in estratti alimentari contaminati artificialmente e successiva identificazione di proteine/peptidi basata sull'impiego di software. Una volta che vengono identificati i peptidi marcatori, la rilevazione e la quantificazione degli allergeni possono essere ottenute utilizzando diverse tecnologie MS (Monaci, et al., 2018). La MALDI-TOF MS è stata usata con successo per l'identificazione, nel latte vaccino, delle proteine e delle loro isoforme reattive all'IgE nei bambini, rilevando allergie all' α 1-caseina nel 55% dei pazienti, 90% per α 2-caseina, 15% per β -caseina, 50% per la κ -caseina, 45% per la β -lattoglobulina, 45% per la BSA, 95% per la catena pesante delle IgG e 50% per la lattoferrina (Natale, et al., 2004).

7.2 L'utilizzo della proteomica per il controllo dell'autenticità del latte e dei prodotti lattiero caseari

L'adulterazione del latte provoca la modifica o l'alterazione delle caratteristiche originali del prodotto e la sua vendita è considerata una frode al consumatore. Il latte viene spesso adulterato perché è un prodotto molto richiesto, con breve durata di conservazione e con la mancanza di test di screening adeguati (Kamthania, et al., 2014). La proteomica è una possibile soluzione per la rilevazione del latte fraudolento. L'adulterazione più comune e facile da effettuare è il miscelamento di latti provenienti da animali diversi che, oltre ad essere una frode, può causare problemi di salute. Il latte vaccino è un tipo di latte che solitamente, a causa della presenza di molti allergeni, viene scartato per i neonati e sostituito dal latte di capra (Roncada, et al., 2002). Di Girolamo et al. (Di Girolamo, et al., 2014) sono stati in grado di

rilevare, in maniera più sensibile e robusta rispetto ad altri test analitici, l'adulterazione del latte di asina e capra con latte vaccino, fino ad un limite di 0,5% utilizzando la MALDI-TOF MS. Gli autori hanno sottolineato la facilità di preparazione del campione, la velocità e l'affidabilità di questa analisi per usarla come routine nell'industria casearia. L'autenticità di un prodotto come il formaggio è molto importante specialmente da quando esistono numerose certificazioni riguardanti la sua qualità. L'adulterazione del formaggio utilizzando, per la sua preparazione, latte di qualità inferiore rispetto a quello indicato in etichetta rappresenta uno dei problemi più comuni. I metodi per individuare la presenza di latte vaccino in un latte ovino si basano sulla diversa composizione caseinica, ad esempio, si può utilizzare l'IEF per individuare le bande delle caseine $\gamma 2$ e $\gamma 3$ presenti nel latte vaccino (Ortea, et al., 2016). La combinazione della Urea-PAGE e della HPLC a fase inversa insieme all'analisi dei cluster e all'analisi delle componenti principali si è rilevata efficace per la determinazione di profili proteici, i quali vengono utilizzati come marcatori per verificare l'autenticità dei processi tecnologici dei formaggi DOP (Guerreiro, et al., 2013). Rau et al. hanno descritto la MALDI-TOF MS come una tecnica facile, veloce e specifica per l'identificazione dell'origine animale del latte utilizzato nella produzione di feta e mozzarella (Rau, et al., 2020). Usando la nanoLC-ESI-Ion TRAP (IT)-MS/MS, Nardiello et al. (Nardiello, et al., 2018) hanno scoperto che i peptidi specie-specifici della vacca provenienti dalla β -lattoglobulina e dalla $\alpha 1$ -caseina possono essere utilizzati per l'autenticazione del latte e rilevare l'adulterazione del latte di capra a livelli inferiori dell'1%.

Un altro tipo di frode è l'aggiunta di siero al latte crudo per dare una seconda vita a questo residuo, aumentando così i profitti. Può essere identificato solo se questo latte viene utilizzato per il formaggio visto che l'azione dell'enzima chimosina rilascia il caseinomacropetide (CMP), un peptide che rimane nel siero e che può essere utilizzato come biomarcatore per rilevare l'adulterazione usando la RP-HPLC o la cromatografia liquida per esclusione. Tuttavia, qualche microrganismo psicrotrofico, specialmente *Pseudomonas fluorescens*, può produrre un peptide molto simile al CMP con solo un residuo amminoacidico diverso, la cui rilevazione è possibile solo con tecniche selettive come, ad esempio, la LC-ESI MS la quale identifica l'adulterazione con limiti di 1 $\mu\text{g/mL}$ e un limite di quantificazione di 5 $\mu\text{g/mL}$ (Motta, et al., 2014). Nella Tabella 7-1, sono citate alcune ricerche che utilizzano la proteomica per determinare i cambiamenti dei profili proteici causati dalle adulterazioni del latte, con indicato i marcatori proteici e le tecnologie utilizzate.

Tabella 7-1: Proteine modificate dall'adulterazione (marcatori) trovate in studi di ricerca originali

ADULTERAZIONE	MARCATORI PROTEICI	TECNOLOGIE UTILIZZATE	LIMITE	RIFERIMENTO
Latte di capra e bufalo con latte vaccino	α -lattoalbumina β -lattoglobulina	MALDI-TOF MS	< 5%	(Cozzolino, et al., 2001)
Latte vaccino fresco con latte in polvere	α -lattoalbumina β -lattoglobulina	MALDI-TOF MS	-	(Cozzolino, et al., 2001)
Latte di capra con latte vaccino	β -lattoglobulina	ESI MS	5 %	(Chen, et al., 2004)
Latte e mozzarella di bufala con latte vaccino	β -lattoglobulina caseina α 1 caseina α 2	ESI MS	-	(Czerwenka, et al., 2010)
Latte ovino con latte vaccino	β -caseina κ -caseina caseina α 1 caseina α 2 β -lattoglobulina	MALDI-TOF MS	5 %	(Calvano, et al., 2012)
Latte d'asina con latte bovino o caprino	α -lattoalbumina β -lattoglobulina	MALDI-TOF MS	0,5-2 %	(Cunsolo, et al., 2013)
Mozzarella fatta con latte bovino	β -caseina	ESI-Q-TOF MS/MS	-	(Russo, et al., 2012)
Ricotta fatta con latte bovino	β -lattoglobulina caseina α 1 caseina α 2	MALDI-TOF MS	5 %	(Russo, et al., 2016)
Latte vaccino fresco con latte vaccino in polvere	β -caseina κ -caseina caseina α 1 caseina α 2 β -lattoglobulina α -lattoalbumina	MALDI-TOF MS	<1 %	(Calvano, et al., 2013)

L'aggiunta non dichiarata di proteine non casearie è un altro tipo di frode che influenza la qualità del prodotto. Determinate fonti proteiche hanno un basso costo e una facile disponibilità che inducono il loro l'utilizzo nel latte animale, ingannando in questo modo il consumatore: un esempio è l'adulterazione del latte scremato in polvere con proteine vegetali,

che può essere identificata mediante l'utilizzo della LC-MS, che offre un approccio più specifico riguardo l'origine e il tipo di proteina permettendo così di rilevare la fonte proteica aggiunta (Cordewener, et al., 2009).

7.3 Operazioni industriali che impattano la qualità dei prodotti lattiero-caseari

Nelle industrie il latte viene trattato e/o trasformato per dare origine a differenti prodotti caseari. Durante le diverse operazioni, si possono verificare cambiamenti indesiderati nel profilo proteico che modificano le caratteristiche organolettiche diminuendone in alcuni casi il valore nutrizionale. È per questo importante controllare questi parametri per garantire al consumatore un prodotto ottimale. Il latte rappresenta il substrato perfetto per la crescita dei microrganismi a causa della sua composizione ricca di amminoacidi, acidi grassi e lattosio. Appena estratto dalle mammelle è considerato un prodotto sterile a meno che l'animale non abbia qualche infezione. Da questo momento in poi, il latte viene colonizzato da una vastità di microbi provenienti dalla pelle della mammella, dal rivestimento epiteliale dei dotti mammari e da microrganismi presenti nell'attrezzatura di mungitura o nell'ambiente (Melini, et al., 2017). Per garantire la salubrità del latte e aumentare così la durata di conservazione, vengono effettuati trattamenti termici come, ad esempio, la pastorizzazione e la sterilizzazione che riducono la carica microbica. Tuttavia, questi trattamenti possono avere un impatto negativo sulla qualità del prodotto, influenzando il colore, il gusto e i valori nutrizionali (Afzaal, et al., 2022). È stato riportato che il calore, in alcune proteine termosensibili del latte, causa trasformazioni chimiche come la glicazione, l'ossidazione, la denaturazione e l'aggregazione, che impattano la biodisponibilità e funzionalità proteica (Liu, et al., 2020). La Figura 7-4 mostra le possibili modificazioni che possono avvenire durante il riscaldamento del latte.

TRATTAMENTO TERMICO	CONSERVAZIONE/MATURAZIONE
<ul style="list-style-type: none"> • Diminuzione del contenuto proteico totale • Diminuzione delle α- β- e κ-caseina nella fase micellare • Aumento delle siero proteine α-lattoalbumina e β-lattoglobulina nella fase micellare • Inizio denaturazione delle siero proteine a temperature intorno ai 70 C° • Formazione del complesso tra le proteine denaturate del siero e κ-caseine nella superficie delle micelle o nel siero • Ossidazione della metionina e aumento dell'idrofobicità della superficie proteica • Deaminazione della asparagina e glutammina e diminuzione dell'idrofobicità della superficie proteica • Generazione di prodotti delle prime fasi iniziali della reazione di Maillard 	<ul style="list-style-type: none"> • Reazioni proteolitiche • Possibili crosslinking proteici, interazioni covalenti e non covalenti, defosforilazione e altre reazioni • Diminuzione delle α1, α2 e κ-caseina • Aumento delle siero proteine BSA, α-lattoalbumina e β-lattoglobulina nella fase micellare • Aumento dei prodotti delle prime fasi iniziali della reazione di Maillard formate nel trattamento termico

Figura 7-4: Modificazioni delle proteine del latte durante il trattamento termico e la successiva maturazione (Liu, et al., 2019).

Durante alcuni processi caseari, come la formazione di latte in polvere o la concentrazione delle proteine del latte, potrebbero avvenire reazioni indesiderate come quella di Maillard che causa l'imbrunimento del prodotto e la formazione di possibili prodotti tossici. In questo campo la proteomica può essere utilizzata per rilevare cambiamenti in proteine chiave per comprendere se il prodotto si sia alterato. La α -lattoalbumina e la β -lattoglobulina sono suscettibili nel reagire con il lattosio durante i trattamenti termici, perdendo proprietà funzionali e riducendo la biodisponibilità di importanti aminoacidi. Sono state riportate reazioni di glicazione più intense nel latte senza lattosio a causa della maggiore reattività dei monosaccaridi, come ad esempio il glucosio e il galattosio. L'assenza di lattosio sembra promuovere la reazione delle proteine α -lattoalbumina e β -lattoglobulina con i monosaccaridi, formando addotti e danneggiando l'integrità del latte (Carulli, et al., 2011). Tramite la proteomica sono state studiate altre trasformazioni chimiche che avvengono nel latte UHT e latte in polvere, utili per identificare i prodotti lattiero caseari che hanno subito un eccessivo trattamento termico. In questo modo è possibile verificare e ottenere il resoconto termico dei prodotti caseari (Abd El-Salam, 2014). Ebner et al. (Ebner, et al., 2016) hanno trovato 16 peptidi presenti nel latte che possono essere utilizzati come indicatori di trattamenti termici anormali (Figura 7-5). La quantità relativa di questi peptidi cambia all'aumentare della

temperatura, specialmente la β -caseina 196–209 (m/z 1460,9 Da) che è il peptide più sensibile alle variazioni termiche e che risulta essere quindi un marcatore efficace per monitorare le condizioni di processo del latte.

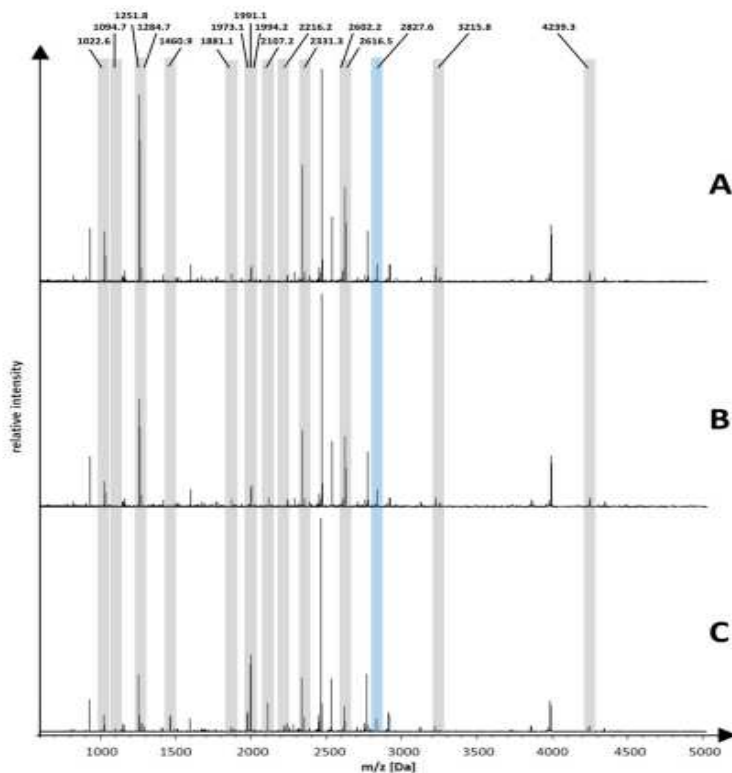


Figura 7-5: Spettri MALDI-TOF di (A) latte pastorizzato ad alta temperatura a tempo breve (HTST), (B) latte ad alta temperatura con durata di conservazione estesa (ESL) e (C) latte trattato UHT. Il segnale α 1-caseina 80–102 (m/z 2827,6 Da), utilizzato come riferimento per la quantificazione, è contrassegnato in blu. I peptidi che mostrano una diminuzione o un aumento del segnale in funzione del trattamento termico sono contrassegnati in grigio (Ebner, et al., 2016).

Liu et al. (Liu, et al., 2020) hanno usato la proteomica per identificare il latte degradato da un eccessivo riscaldamento. Dopo aver sottoposto il latte vaccino a 85°C per 5 minuti, si è registrato mediante la LC-MS/MS, un alto deterioramento della lattoferrina, dell'immunoglobulina, e della lattoperossidasi, rispetto ad un latte che ha ricevuto un trattamento non-termico come, ad esempio, la radiazione ultravioletta o gli ultrasuoni. In altri studi, sono stati identificati nel latte vaccino dopo trattamento termico, cinque nuovi peptidi probabilmente associati alla frazione caseinica. Successivamente, durante lo stoccaggio, è stato osservato un aumento della concentrazione di un peptide, identificato con la MALDI-

TOF MS come N-terminale della α 1-caseina (Meltretter, et al., 2008). Infatti, durante lo stoccaggio, possono avvenire una serie di alterazioni che influenzano la qualità del latte (Figura 7-4). L'attività proteolitica degli enzimi naturalmente presenti può portare a modificazioni del peptidoma utili da analizzare per valutare lo stato del prodotto, sia durante la conservazione che durante la lavorazione (Ebner, et al., 2016). Durante lo stoccaggio del latte UHT, è stato riscontrato che fino a 22 peptidi sono aumentati significativamente a causa dell'attività proteolitica attribuita a proteasi endogene e proteasi microbiche. Dieci peptidi sono stati selezionati come potenziali marker per misurare la qualità del latte, specialmente il peptide β -caseina 196-206 (m/z 1668,9) per differenziare il latte UHT idoneo da quello non adatto al consumo (Dalabasmaz, et al., 2019).

La stagionatura del formaggio è un processo molto importante che incide sulla consistenza e sull'aspetto del prodotto, fornendo inoltre sapori e odori caratteristici tramite complesse reazioni biochimiche. La componente che più viene influenzata durante questa trasformazione è la frazione proteica, specialmente le caseine. Le culture starter sono responsabili delle reazioni di glicolisi, proteolisi e lipolisi, che causano la trasformazione del prodotto. Durante questa fase, c'è una lenta degradazione delle proteine che porta alla formazione di polipeptidi, peptidi e aminoacidi, che successivamente formeranno altri composti.

La proteomica gioca un ruolo fondamentale per comprendere le trasformazioni biochimiche del proteoma dei formaggi durante la maturazione rilevando specifici marker utilizzati per valutare sia l'autenticità che la qualità del prodotto. L'uso della SDS-PAGE e Urea-PAGE ha rilevato una idrolisi anomala durante la maturazione di una mozzarella fatta con latte di bufala. I frammenti della β - e α 1-caseina, identificati tramite l'HPLC-ESI MS, hanno evidenziato l'utilizzo di latte conservato o di cagliata conservata e pressata oppure il riutilizzo di mozzarelle invendute (Figura 7-6) (Petrella, et al., 2015). Il proteoma di ogni formaggio è unico e può essere usato come impronta per la caratterizzazione e differenziazione del prodotto. In questo contesto Silva et al. (Silva, et al., 2016) hanno lavorato sulla caratterizzazione del proteoma del Coalho, un formaggio brasiliano, nel quale sono stati rilevati tramite MS da 57 a 72 peptidi, di cui 32 identificati con successo (11 dalla caseina α S1, tre dalla caseina α S2, 15 dalla β -caseina e tre dalla κ -caseina). L' SDS-PAGE insieme alla MALDI-TOF MS sono metodi adatti per separare e identificare le proteine non idrolizzate durante la maturazione del formaggio, come le siero proteine (α -lattoalbumina, β -lattoglobulina e albumina sierica). Per il rilevamento di peptidi presenti in minori quantità una buona opzione è la TOF-MS quadrupolo che in coniugazione con il sequenziamento N-

terminale e la LC-MS può fornire il peptidoma completo di un estratto acquoso di formaggio (Pappa, et al., 2008).

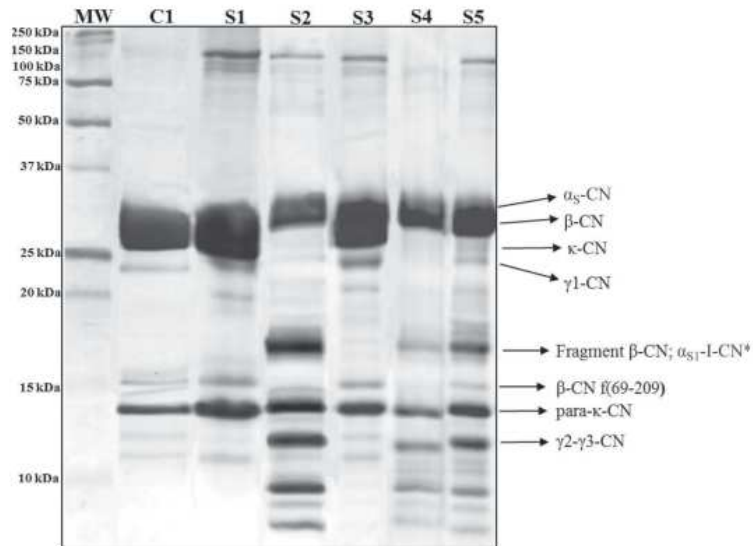


Figura 7-6: Caseine di mozzarella di bufala a Denominazione di Origine Protetta (DOP) con SDS-PAGE. Corsia MW = standard di massa molecolare; corsia C1 = caseine della mozzarella di bufala DOP fresca; corsie da S1 a S5 = caseine di campioni con diversi livelli di proteolisi (Petrella, et al., 2015).

CONCLUSIONI

Negli ultimi decenni si sono compiuti importanti progressi per caratterizzare completamente il proteoma dei campioni biologici. Il proteoma del latte è certamente complesso, con fino al 5% di proteine difficili da rilevare perché presenti a basse concentrazioni. Inizialmente, la 2-DE è apparsa come una tecnologia rivoluzionaria che però ha permesso solo parzialmente la quantificazione delle proteine nelle matrici di latte. La combinazione della 2-DE con la MS ha aumentato la sensibilità per caratterizzare il profilo proteico rappresentando così un importante sviluppo della proteomica. Recenti progressi della MS, come le tecniche ESI e MALDI hanno permesso una caratterizzazione ancora più completa, veloce ed esaustiva. Tutte queste innovazioni hanno fornito dei metodi nuovi per il monitoraggio della sicurezza, autenticità e qualità del latte e dei prodotti lattiero caseari. Per sviluppare, ottimizzare ed implementare questi metodi su scala industriale, è necessaria la collaborazione tra le aziende e la comunità scientifica. Tuttavia, l'implementazione richiede un forte investimento economico che non tutti gli imprenditori sono disposti a sostenere; basti pensare alla sola spettrometria di massa, indispensabile per la proteomica, che richiede una attrezzatura costosa, fragile e in continua manutenzione. Tuttavia, essendo una tecnologia recente, i margini di miglioramento sono ampi e l'innovazione è costante. Perciò, si presuppone che con il tempo i metodi che coinvolgono queste costose tecnologie possano diventare accessibili ed essere, nel medio termine, incorporate nei protocolli industriali.

BIBLIOGRAFIA

- Abd El-Salam, M., 2014. Application of Proteomics to the Areas of Milk Production, Processing and Quality Control—A Review. *International Journal of Dairy Technology*, Volume 67, p. 153–166.
- Abdelmegid, S., Kelton, D., Caswell, J. & Kirby, G., 2020. Proteomic 2d-Dige Analysis of Milk Whey from Dairy Cows with *Staphylococcus aureus* Mastitis Reveals Overexpression of Host Defense Proteins. *Microorganisms*. Volume 8, p. 1883.
- Afzaal, M. et al., 2022. Proteomics as a promising biomarker in food authentication, quality and safety: A review.. *Food Science & Nutrition*, Volume 10, p. 2333–2346.
- Akagawa, M. et al., 2007. Proteomic analysis of wheat flour allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), p. 6863–6870.
- Angel, P. M. & Caprioli, R. M., 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry: In situ molecular mapping. *Biochemistry*, 52(22), p. 3818–3828.
- Atanasova, J. & Ivanova, I., 2010. Antibacterial Peptides from Goat and Sheep Milk Proteins. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Volume 24, p. 1799–1803.
- Boersema, P. J., Kahraman, A. & Picotti, P., 2015. Proteomics beyond large-scale protein expression analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 34, p. 162–170.
- Bolek, S., 2020. Consumer knowledge, attitudes, and judgments about food safety: A consumer analysis. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 102, p. 242–248.
- Bonfatti, V. et al., 2013. Separation and Quantification of Water Buffalo Milk Protein Fractions and Genetic Variants by RP-HPLC. *Food Chemistry*, Volume 136, p. 364–367.
- Callahan, J. H., Shefcheck, K. J., Williams, T. L. & Musser, S. M., 2006. Detection, confirmation, and quantification of staphylococcal enterotoxin B in food matrixes using liquid chromatography– mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(6), p. 1789–1800.

- Calvano, C., de Ceglie, C., Monopoli, A. & Zambonin, C., 2012. Detection of Sheep and Goat Milk Adulterations by Direct MALDI-TOF MS Analysis of Milk Tryptic Digests. *Journal of Mass Spectrometry*, Volume 47, p. 1141–1149.
- Calvano, C. et al., 2013. Proteomic Approach Based on MALDI-TOF MS to Detect Powdered Milk in Fresh Cow's Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 61, p. 1609–1617.
- Carbonaro, M., 2004. Proteomics: Present and future in food quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3-4), pp. 209-216.
- Carrera, M., Cañas, B. & Gallardo, J. M., 2012. Rapid direct detection of the major fish allergen, parvalbumin, by selected MS/MS ion monitoring mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, 75(11), p. 3211–3220.
- Carrera, M., Piñeiro, C. & Martinez, I., 2020. Proteomic strategies to evaluate the impact of farming conditions on food quality and safety in aquaculture products. *Foods*, 9(8), p. 1050.
- Carulli, S., Calvano, C., Palmisano, F. & Pischetsrieder, M., 2011. MALDI-TOF MS Characterization of Glycation Products of Whey Proteins in a Glucose/Galactose Model System and Lactose-Free Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 59, p. 1793–1803.
- Ceballos, L. et al., 2009. Composition of Goat and Cow Milk Produced under Similar Conditions and Analyzed by Identical Methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 22, p. 322–329.
- Chen, R. et al., 2004. Quantification of Cow Milk Adulteration in Goat Milk Using High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 18, p. 1167–1171.
- Cifuentes, A., 2017. Foodomics, foodome and modern food analysis.. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 96, p. 1.
- Clerens, S., Plowman, J. E. & Dyer, J. M., 2012. Food proteomics: Mapping modifications. *Proteomic Applications in Biology*, pp. 3-32.
- Conti, A. et al., 1988. Bovine β -Lactoglobulin H: Isolation by Preparative Isoelectric Focusing in Immobilized PH Gradients and Preliminary Characterization. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, Volume 16, pp. 205-214.

- Coombs, K. M., 2020. Update on Proteomic approaches to uncovering virus-induced protein alterations and virus–host protein interactions during the progression of viral infection. *Expert Review of Proteomics*, 17(7-8), pp. 513-532.
- Coppola, S., Blaiotta, G. & Ercolini, D., 2008. Dairy products. In: L. Coccolin & D. Ercolini, a cura di *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. New York, NY, USA: Springer, p. 31–90..
- Cordewener, J. et al., 2009. Untargeted LC-Q-TOF Mass Spectrometry Method for the Detection of Adulterations in Skimmed-Milk Powder. *Journal of Separation Science* , Volume 32, p. 1216–1223.
- Cozzolino, R. et al., 2001. Identification of Adulteration in Milk by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, Volume 36, p. 1031–1037.
- Cunsolo, V., Muccilli, V., Saletti, R. & Foti, S., 2013. . MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Monitoring of She-Donkey’s Milk Contamination or Adulteration. *Journal of Mass Spectrometry*, Volume 48, p. 148–153.
- Czerwenka, C., Muller, L. & Lindner, W., 2010. Detection of the Adulteration of Water Buffalo Milk and Mozzarella with Cow’s Milk by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of β -Lactoglobulin Variants. *Food Chemistry*, Volume 122, p. 901–908.
- D’Auria, E. et al., 2018. Precision Medicine in Cow’s Milk Allergy: Proteomics Perspectives from Allergens to Patients. *Journal of Proteomics*, Volume 188, p. 173–180.
- Dalabasmaz, S. et al., 2019. Identification of Peptides Reflecting the Storage of UHT Milk by MALDI-TOF-MS Peptide Profiling. *Journal of Proteomics*, Volume 207.
- Dalgleish, D., 2011. On the Structural Models of Bovine Casein Micelles—Review and Possible Improvements. *Soft Matter*, Volume 7, pp. 2265-2272.
- Di Girolamo, F. et al., 2014. A Sensitive and Effective Proteomic Approach to Identify She-Donkey’s and Goat’s Milk Adulterations by MALDI-TOF MS Fingerprinting. *International Journal of Molecular Sciences*, Volume 15, p. 13697–13719.
- Ebner, J., Baum, F. & Pischetsrieder, M., 2016. Identification of Sixteen Peptides Reflecting Heat and/or Storage Induced Processes by Profiling of Commercial Milk Samples. *Journal of Proteomics*, Volume 147, p. 66–75.

- Edgar, S. & Mixa, A., 1998. *Milk and Dairy Product Technology*. 1st ed. a cura di New York, NY, USA: Taylor and Francis.
- El-Aneed, A., Cohen, A. & Banoub, J., 2009. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews*, Volume 44, p. 210–230.
- Elmore, J. M., Griffin, B. D. & Walley, J. W., 2021. Advances in functional proteomics to study plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 63, p. 102061.
- Fagerquist, C. K. et al., 2014. Top-down proteomic identification of Shiga toxin 2 subtypes from shiga toxin producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization–tandem time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), p. 2928–2940.
- Fang, Z. et al., 2017. Genetic and Nongenetic Factors Contributing to Differences in AS-Casein Phosphorylation Isoforms and Other Major Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, Volume 100, p. 5564–5577.
- Farkye, N. & Shah, N., 2015. Milk proteins. In: Z. Ustunol, a cura di *Applied Food Protein Chemistry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, pp. 427-458.
- Fox, P., 2009. Milk: An overview. In: A. Thompson, M. Boland & H. Singh, a cura di *Milk Proteins: From Expression to Food*. Cambridge, MA, USA: Academic Press, pp. 1-54.
- Fox, P. & Brodtkorb, A., 2008. The Casein Micelle: Historical Aspects, Current Concepts and Significance.. *Int. Dairy J.*, Volume 18, p. 677–684.
- Fox, P., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. & O’Mahony, J., 2015. Milk proteins. In: *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, pp. 145-239.
- Frederiksen, P. et al., 2011. Composition and Effect of Blending of Noncoagulating, Poorly Coagulating, and Well-Coagulating Bovine Milk from Individual Danish Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, Volume 94, p. 4787–4799.
- Gallardo, J. M., Ortea, I. & Carrera, M., 2013. Proteomics and its applications for food authentication and food-technology research. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 52, p. 135–141.

- Gallien, S., Duriez, E. & Domon, B., 2011. Selected reaction monitoring applied to proteomics. *Journal of Mass Spectrometry*, 46(3), pp. 298-312.
- Gašo-Sokač, D., Kovač, S. & Josić, D., 2010. Primjena proteomike u prehrambenoj tehnologiji i biotehnologiji: Razvoj procesa, kontrola kakvoće i sigurnost proizvoda. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), p. 284–295.
- Gomes, F. & Henriques, M., 2016. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*, Volume 72, p. 377–382.
- Goulding, D., Fox, P. & O'Mahony, J., 2019. Milk proteins: An overview. In: M. Boland & H. Singh, a cura di *Milk Proteins: From Expression to Food*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, pp. 21-98.
- Guerreiro, J. et al., 2013. Principal Component Analysis of Proteolytic Profiles as Markers of Authenticity of PDO Cheeses. *Food Chemistry*, Volume 136, p. 1526–1532.
- Guetouache, M., Guessas, B. & Medjekal, S., 2014. Composition and Nutritional Value of Raw Milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, Volume 2, pp. 155-122.
- Holland, J. & Boland, M., 2014. Post-translational modifications of caseins. In: H. Singh, M. Boland & A. Thompson, a cura di *Milk Proteins, 2nd ed.* San Diego, CA, USA: Academic Press, p. 141–168.
- Jadhav, S., Seviar, D., Bhave, M. & Palombo, E., 2014. Detection of *Listeria monocytogenes* from Selective Enrichment Broth Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Proteomics*, Volume 97, p. 100–106.
- Jagadeesh, D. S., Kannegundla, U. & Reddy, R. K., 2017. Application of proteomic tools in food quality and safety. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 5(5), p. 213–225.
- Jardin, J. et al., 2012. Quantitative Proteomic Analysis of Bacterial Enzymes Released in Cheese during Ripening. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 155, p. 19–28.
- Jensen, H., Holland, J., Poulsen, N. & Larsen, L., 2012. Milk Protein Genetic Variants and Isoforms Identified in Bovine Milk Representing Extremes in Coagulation Properties. *Journal Dairy Science*, Volume 95, pp. 2891-2903.

- Kamthania, M., Saxena, J., Saxena, K. & Sharma, D., 2014. Milk Adultration: Methods Of Detection & Remedial Measures. *International Journal of Engineering Research and Technology*, Volume 1, p. 15–20.
- Karasu-Yalcin, S., Soylemez-Milli, N., Eren, O. & Eryasar-Orer, K., 2020. Reducing Time in Detection of *Listeria monocytogenes* from Food by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Food Science and Technology*.
- Kilara, A. & Vaghela, M., 2018. Whey proteins. In: I. Rickey, a cura di *Proteins in Food Processing, 2nd ed.* Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Inc., p. 93–126.
- Kim, Y. et al., 2019. Alpha-Casein and Beta-Lactoglobulin from Cow Milk Exhibit Antioxidant Activity: A Plausible Link to Antiaging Effects. *Journal of Food Science*, Volume 84, p. 3083–3090.
- Korhonen, H. & Marnila, P., 2013. Milk bioactive proteins and peptides. In: W. Young, F. George & D. Haenlein, a cura di *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Ltd, p. 148–171.
- Kvasnička, F., 2003. Proteomics: General strategies and application to nutritionally relevant proteins. *Journal of Chromatography B*, 787(1), p. 77–89.
- Lafferty, A. et al., 2021. Molecular subtyping combined with biological pathway analyses to study Regorafenib response in clinically relevant mouse models of colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 27(21), p. 5979–5992.
- Leitner, A., Castro-Rubio, F., Marina, M. L. & Lindner, W., 2006. Identification of marker proteins for the adulteration of meat products with soybean proteins by multidimensional liquid Chromatography– Tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 5(9), p. 2424–2430.
- Le, T., Deeth, H. & Larsen, L., 2017. Proteomics of Major Bovine Milk Proteins: Novel Insights. *International Dairy Journal*, Volume 67, pp. 2-15.
- Liu, H. et al., 2019. Changes in Milk Protein Interactions and Associated Molecular Modification Resulting from Thermal Treatments and Storage. *Journal of Food Science*, Volume 84, p. 1737–1745.
- Liu, Y. et al., 2020. Changes in the Milk Serum Proteome after Thermal and Non-Thermal Treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Volume 66.

- López-Pedrouso, M., Lorenzo, J., Gagaoua, M. & Franco, D., 2020. Current Trends in Proteomic Advances for Food Allergen Analysis. *Biology*, Volume 9, p. 247.
- Manso, M., Léonil, J., Jan, G. & Gagnaire, V., 2005. Application of Proteomics to the Characterisation of Milk and Dairy Products. *International Dairy Journal*, Volume 15, p. 845–855.
- Mansour, A., Zayed, A. & Basha, O., 2015. Contamination of the Shell and Internal Content of Table Eggs With Some Pathogens During Different Storage Periods. *Assiut Veterinary Medical Journal*, Volume 61, pp. 8-15.
- Mazzeo, M. F. et al., 2006. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), p. 1180–1189.
- Meijer, G. W. et al., 2021. Towards effective labelling of foods. An international perspective on safety and nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 118, pp. 45-56.
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F. & Ruzzi, M., 2017. Raw and Heat-Treated Milk: From Public Health Risks to Nutritional Quality. *Beverages*, Volume 3, p. 54.
- Meltretter, J. et al., 2008. Analysis of the Peptide Profile of Milk and Its Changes during Thermal Treatment and Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 56, p. 2899–2906.
- Mendonça, M. et al., 2016. Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase, a Novel Immunogenic Surface Protein on *Listeria* Species. *PLoS ONE*, Volume 11.
- Milkovska-Stamenova, S. & Hoffmann, R., 2019. Diversity of Advanced Glycation End Products in the Bovine Milk Proteome. *Amino Acids*, Volume 51, p. 891–901.
- Minden, J. S., Dowd, S. R., Meyer, H. E. & Stühler, K., 2009. Difference gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 30(S1), p. S156–S161.
- Monaci, L., de Angelis, E., Montemurro, N. & Pilolli, R., 2018. Comprehensive Overview and Recent Advances in Proteomics MS Based Methods for Food Allergens Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 106, p. 21–36.
- Motta, T. et al., 2014. Detection and Confirmation of Milk Adulteration with Cheese Whey Using Proteomic-like Sample Preparation and Liquid Chromatography–Electrospray–Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Talanta*, Volume 498–505, p. 120.

- Muehlhoff, E., Bennett, A. & McMahon, D., 2013. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Nardiello, D. et al., 2018. Milk Authenticity by Ion-Trap Proteomics Following Multi-Enzyme Digestion. *Food Chemistry*, Volume 244, p. 317–323.
- Natale, M. et al., 2004. Cow's Milk Allergens Identification by Two-Dimensional Immunoblotting and Mass Spectrometry. *Molecular Nutrition & Food Research*, Volume 48, p. 363–369.
- O' Mahony, J. & Fox, P., 2013. Milk proteins: Introduction and historical aspects. In: P. McSweeney & P. Fox, a cura di *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*, 4th ed.. New York, NY, USA: Springer, p. 43–85.
- Ogola, H., Shitandi, A. & Nanua, J., 2007. Effect of Mastitis on Raw Milk Compositional Quality. *Journal of Veterinary Science*, Volume 8, p. 237–242.
- Omar, A., Harbourne, N. & Oruna-Concha, M., 2016. Quantification of Major Camel Milk Proteins by Capillary Electrophoresis. *International Dairy Journal*, Volume 58, p. 31–35.
- Ortea, I. et al., 2010. Identification of commercial prawn and shrimp species of food interest by native isoelectric focusing. *Food Chemistry*, 121(2), p. 569–574.
- Ortea, I., O'Connor, G. & Maquet, A., 2016. Review on proteomics for food authentication. *Journal of Proteomics*, Volume 147, p. 212–225.
- Pandey, A. & Mann, M., 2000. Proteomics to study genes and genomes.. *Nature*, 405(6788), p. 837–846.
- Pappa, E. et al., 2008. Application of Proteomic Techniques to Protein and Peptide Profiling of Teleme Cheese Made from Different Types of Milk. *International Dairy Journal*, Volume 18, p. 605–614.
- Pavlovic, M., Huber, I., Konrad, R. & Busch, U., 2013. Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *The Open Microbiology Journal*, Volume 7, p. 135.
- Pedreschi, R. et al., 2007. Proteomic analysis of core breakdown disorder in Conference pears (*Pyrus communis* L.). *Proteomics*, 7(12), p. 2083–2099.
- Pellegrino, L. et al., 2013. Nutritional quality of milk proteins. In: P. F. P. McSweeney, a cura di *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*. New York, NY, USA: Springer, p. 515–538.

- Pelmus, R. et al., 2012. Preliminary Study on Milk Composition and Milk Protein Polymorphism in the Romanian Local Sheep Breed Teleorman Black Head Tsigai. *Romanian Biotechnological Letters*, Volume 17, p. 7583.
- Petrella, G. et al., 2015. Study of Proteolysis in River Buffalo Mozzarella Cheese Using a Proteomics Approach. *Journal of Dairy Science*, Volume 98, p. 7560–7572.
- Piñeiro, C. et al., 2003. Proteomics as a tool for the investigation of seafood and other marine products. *Journal of Proteome Research*, 2(2), p. 127–135.
- Piras, C. et al., 2016. Proteomics in food: Quality, safety, microbes, and allergens. *Proteomics*, 16(5), p. 799–815.
- Pisanu, S. et al., 2020. Impact of *Staphylococcus aureus* Infection on the Late Lactation Goat Milk Proteome: New Perspectives for Monitoring and Understanding Mastitis in Dairy Goats. *Journal of Proteomics*, Volume 221.
- Pisanu, S. et al., 2011. The Sheep Milk Fat Globule Membrane Proteome. *Journal of Proteomics*, Volume 74, p. 350–358.
- Pourjoula, M. et al., 2020. The Protein and Peptide Fractions of Kashk, a Traditional Middle East Fermented Dairy Product. *Food Research International*, Volume 132.
- Rafiq, S. et al., 2016. Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. *Asian Australas. J. Anim. Sci*, Volume 29, pp. 1022-1028.
- Raheem, D., 2016. Outbreaks of Listeriosis Associated with Deli Meats and Cheese: An Overview. *AIMS Microbiology*, Volume 2, p. 230–250.
- Rau, J. et al., 2020. Rapid Animal Species Identification of Feta and Mozzarella Cheese Using MALDI-TOF Mass-Spectrometry. *Food Control*, Volume 117.
- Renzone, G., Arena, S. & Scaloni, A., 2021. Cross-linking reactions in food proteins and proteomic approaches for their detection. *Mass Spectrometry Reviews*, pp. 1-38.
- Restani, P. et al., 1997. Meat allergy: III—Proteins involved and cross-reactivity between different animal species.. *Journal of the American College of Nutrition*, 16(4), p. 383–389.
- Righetti, P. G., Gelfi, C. & Chiari, M., 1996. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients. In: *Methods in Enzymology*. s.l.:Academic Press, pp. 235-255.

- Rogowska-Wrzesinska, A., le Bihan, M., Thaysen-Andersen, M. & Roepstorff, P., 2013. 2D Gels Still Have a Niche in Proteomics. *Journal of Proteomics*, Volume 88, pp. 4-13.
- Roncada, P. et al., 2002. Identification of Caseins in Goat Milk. *Proteomics*, Volume 2, p. 723–726.
- Ross, P. L. et al., 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(12), p. 1154–1169.
- Russo, R., Rega, C. & Chambery, A., 2016. Rapid Detection of Water Buffalo Ricotta Adulteration or Contamination by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Volume 30, p. 497–503.
- Russo, R. et al., 2012. Detection of Buffalo Mozzarella Adulteration by an Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Methodology. *Journal of Mass Spectrometry*, Volume 47, p. 1407–1414.
- Saeed, F., Afzaal, M., Hussain, M. & Tufail, T., 2021. Advances in assessing product quality. In: C. Galanakis, a cura di *Food Losses, Sustainable postharvest and food technologies*. s.l.:Academic Press, pp. 191-218.
- Serim, S., Haedke, U. & Verhelst, S. H., 2012. Activity-based probes for the study of proteases: Recent advances and developments. *ChemMedChem*, 7(7), p. 1146–1159.
- Silva, R. et al., 2016. Proteomic and Peptidomic Profiling of Brazilian Artisanal “Coalho” Cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 96, p. 4337–4344.
- Soggiu, A., Roncada, P. & Piras, C., 2018. Proteomics in milk and dairy products. In: A. Almeida, D. Eckersall & I. Miller, a cura di *Proteomics in Domestic Animals: From Farm to Systems Biology*. New York, NY, USA: Springer International Publishing, p. 169–193.
- Šotkovský, P. et al., 2008. Proteomic analysis of wheat proteins recognized by IgE antibodies of allergic patients. *Proteomics*, 8(8), p. 1677–1691.
- Spink, J. & Moyer, D. C., 2011. Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76(9), p. R157–R163.
- Špoljarić, J. et al., 2013. Proving the adulteration of ewe and goat cheeses with cow milk using the reference method of isoelectric focusing of γ -casein. *Mljekarstvo/Dairy*, 63(3), p. 115–121.

- Surinova, S. et al., 2011. On the development of plasma protein bio-markers. *Journal of Proteome Research*, 10(1), p. 5–16.
- Tacoma, R. et al., 2016. Characterization of the Bovine Milk Proteome in Early-Lactation Holstein and Jersey Breeds of Dairy Cows. *Journal of Proteomics*, Volume 130, p. 200–210.
- Thompson, A. et al., 2003. Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(8), p. 1895–1904.
- Verma, M. et al., 2020. Functional Milk Proteome Analysis of Genetically Diverse Goats from Different Agro Climatic Regions. *Journal of Proteomics*, Volume 227.
- Zapata, I., Zerby, H. N. & Wick, M., 2009. Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), p. 4956–4963.
- Zarogoulidis, P. et al., 2015. Use of Proteins as Biomarkers and Their Role in Carcinogenesis. *Journal of Cancer*, Volume 6, pp. 9-18.
- Zhao, Y. & Jensen, O. N., 2009. Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics*, 9(20), p. 4632–4641.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio tutti coloro che mi sono stati vicino e che hanno creduto in me durante questo percorso.

In particolar modo vorrei iniziare ringraziando il mio relatore, il Dott. Massimiliano Gasparrini, per tutto l'impegno che ha fornito aiutandomi nel migliore dei modi nella stesura. In tempi molto brevi mi ha dato suggerimenti sempre utilissimi per migliorare il mio lavoro. La sua disponibilità, il suo continuo supporto e la sua professionalità hanno fatto sì che io affrontassi questo percorso con zero ansie e stress. Grazie mille ancora.

Voglio ringraziare la mia famiglia, insieme abbiamo festeggiato tutte le gioie e affrontato le difficoltà che questo percorso mi ha dato. Mi avete sostenuto ogni qualvolta ne avevo bisogno. Grazie degli auguri che rigorosamente prima di ogni esame mi avete fatto e che sono risultati efficaci.

Un ringraziamento speciale va anche alla mia fidanzata Giulia che per me è stata anche una preziosa compagna di studio durante la preparazione degli esami. Mi hai sempre spronato a dare il meglio di me ogni volta e mi hai continuamente tranquillizzato facendomi affrontare gli esami il più serenamente possibile.

Un ringraziamento va anche alla sua famiglia per essermi stata sempre vicino compreso in questo giorno importante per me.