



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

L'ANALISI DELLE PROTEINE DEL LATTE: dalla
determinazione delle proteine totali alla loro identificazione e
quantificazione mediante approcci proteomici

MILK PROTEIN ANALYSIS: from total protein
determination to identification and quantification using
proteomic approaches

TIPO TESI: Compilativa

Studente:
DONATELLA PAGANO

Relatore:
DOTT. MASSIMILIANO GASPARRINI

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

A mia Madre, mio punto di riferimento costante,
la mia certezza in ogni lacrima, crisi,
fallimento, preoccupazione e vittoria.

A mio Padre, il mio eroe,
pilastro fondamentale della mia vita.
Grazie per avermi trasmesso valori che porto con me ogni giorno.

A mio Fratello, l'esatta metà del mio cuore,
il dono più grande che la vita potesse farmi.
A te, perché ogni mio successo è anche il tuo.
Ti voglio bene più di quanto le parole possano dire.

E infine, a me stessa,
per la determinazione nel perseguire
costantemente i miei sogni..

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	3
ELENCO DELLE FIGURE	4
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	5
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	7
CAPITOLO 1 QUANTIFICAZIONE DEL CONTENUTO PROTEICO TOTALE MEDIANTE METODI DI TITOLAZIONE.....	8
1.1 Metodi di titolazione.....	8
1.2 Metodi spettrofotometrici	9
1.3 Altri metodi.....	13
 CAPITOLO 2 TECNICHE CROMATOGRAFICHE PER LA SEPARAZIONE E LA PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE	14
2.1 Cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC).....	14
2.2 Cromatografia di interazione idrofobica (HIC)	16
2.3 Cromatografia a scambio ionico (IEC).....	16
2.4 Cromatografia ad esclusione molecolare (SEC).....	17
2.5 Cromatografia di affinità.....	18
2.6 Cromatografia liquida proteica rapida (FPLC).....	19
 CAPITOLO 3 TECNICHE ELETTROFORETICHE PER LA SEPARAZIONE, LA VISUALIZZAZIONE E L'IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE	21
3.1 Elettroforesi su gel unidimensionale.....	21
3.2 Focalizzazione isoelettrica (IEF)	23
3.3 Elettroforesi su gel bidimensionale (2-DE).....	23
3.4 Western blotting.....	25
3.5 Elettroforesi capillare (CE).....	26
 CAPITOLO 4 METODI SELETTIVI E RAPIDI PER LA DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE DEL LATTE	28

4.1 Spettroscopia infrarossa con chemiometria.....	28
4.2 Metodi immunoenzimatici (ELISA).....	29
 CAPITOLO 5 CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DELLE PROTEINE	31
5.1Cristallografia a raggi X.....	31
5.2 Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR).....	31
5.3 spettrometria di massa e indagini proteomiche.....	32
5.3.1 Approcci Top-Down.....	34
5.3.2 Approcci Bottom-Up.....	35
5.3.3 Monitoraggio di reazioni multiple (MRM).....	35
5.3.4 Tag isobarico per quantificazione relativa e assoluta (iTRAQ).....	36
 CONCLUSIONI.....	37
 BIBLIOGRAFIA.....	39

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Riepilogo dei metodi di quantificazione delle proteine totali	10
--	----

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1 Apparecchiatura classica metodo Kjeldahl.....	8
Figura 2. Meccanismo di legame del colorante blu brillante di Coomassie.....	11
Figura 3. Principio di base del metodo Dumas.....	13
Figura 4. Separazione RP-HPLC delle proteine del latte bovino.....	15
Figura 5. Purificazione tipica tramite cromatografia di affinità.....	18
Figura 6. Sistema FPLC tipico.....	19
Figura 7. Separazione elettroforetica mediante SDS-PAGE.....	21
Figura 8. Elettroforesi bidimensionale.....	23
Figura 9. DIGE 2-D di MFGP.....	25
Figura 10. Tecnica Western Blotting.....	26
Figura 11. Elettroferogramma HPCE.....	26
Figura 12. Metodo ELISA indiretto	29
Figura 13. Panoramica schematica dei metodi di analisi proteomica.....	32
Figura 14. Tecniche analitiche per la determinazione del contenuto proteico nel latte.....	38

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

2-DE	Elettroforesi su gel bidimensionale
ACE	Enzima di conversione dell'Angiotensina I
BCA	Acido bicinconinico
CE	Elettroforesi capillare
CMC	Concentrazione micellare critica
CYS	Citosina
DTT	Ditiotreitolo
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESI	Cromatografia in fase inversa accoppiata a ionizzazione elettrospray
FPLC	Cromatografia liquida proteica rapida
HIC	Cromatografia di interazione idrofobica
IEC	Cromatografia a scambio ionico
IEF	Focalizzazione isoelettrica
IR	Infrarossi
iTRAQ	Tag isobarico per quantificazione relativa e assoluta
MALDI	Desorbimento laser assistito da matrice
MIR	Medio infrarosso
MRM	Monitoraggio di reazioni multiple
MS	Spettrometria di massa
MS/MS	Spettrometria di massa tandem
NIR	Vicino infrarosso
NMR	Spettroscopia di risonanza magnetica nucleare

OPA	O-ftalaldeide
PHE	Fenilalanina
PVDF	Filtro di polivinilidenfluoruro
RID	Saggio di immunodiffusione radiale
RP-HPLC	Cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa
SDS	Sodio dodecil solfato
SDS-PAGE	Elettroforesi su gel di poliacrilamide con sodio dodecil-solfato
SEC	Cromatografia ad esclusione molecolare
SE-HPLC	Cromatografia liquida ad alte prestazioni con esclusione molecolare
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Il latte rappresenta un'emulsione complessa e non omogenea, costituita da proteine, lattosio, globuli di grasso, minerali e altri componenti presenti in quantità minori (Thompson, Boland e Singh, 2009). La varietà delle proteine del latte permette di trasformarlo in numerosi prodotti, offrendo così molteplici opportunità all'industria lattiero-casearia (Starovojtova et al., 2020). La sua composizione è influenzata da diversi fattori, tra cui la genetica, l'età dell'animale, lo stadio della lattazione, la parità, lo stato di salute, il tipo di alimentazione e le condizioni ambientali (Kalac e Samkova, 2010). Il latte contiene una vasta varietà di proteine, suddivise in caseine ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β e K-caseina) e proteine del siero, tra cui α -lattoalbumina, β -lattoglobulina, albumina sierica bovina, lattoferrina e immunoglobuline. Oltre a queste, sono presenti anche composti azotati non proteici (Dupont, Croguennec e Pochet, 2018). Questi e altri componenti microproteici presenti nel latte, come alcune proteine ed enzimi con capacità di legare i metalli, contribuiscono in modo significativo al suo valore tecnologico e nutrizionale (Lonnerdal, 2013). La struttura e le caratteristiche del latte e dei prodotti lattiero-caseari dipendono dal loro contenuto proteico e dalla relativa composizione (Runthala et al., 2023). Per questo motivo, l'identificazione e la quantificazione delle proteine del latte risultano fondamentali per la progettazione e il controllo della qualità, per una corretta etichettatura degli alimenti e per le attività di ricerca e sviluppo. Di conseguenza, lo studio delle proteine del latte è diventato un tema di grande interesse per tecnologi alimentari e nutrizionisti. In base agli obiettivi dell'analisi, è possibile scegliere tra numerosi metodi analitici, tra cui tecniche spettroscopiche, cromatografiche, elettroforetiche e immunoistochimiche. Nel mio lavoro di tesi analizzerò in maniera dettagliata le diverse tecniche attualmente utilizzate per l'analisi delle proteine del latte, includendo sia i metodi tradizionali sia le più avanzate tecniche proteomiche. Verranno illustrati i principi alla base di ciascun metodo, insieme alle loro peculiarità e ai relativi limiti. Inoltre, saranno presentate alcune applicazioni rilevanti dei metodi analitici esaminati, con particolare riferimento alle analisi del latte e dei prodotti caseari.

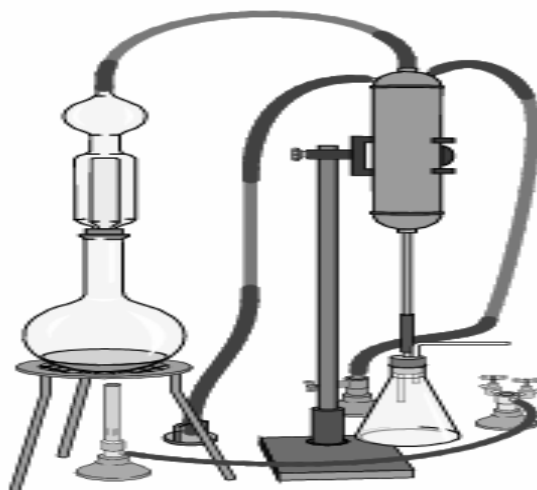
Capitolo 1

QUANTIFICAZIONE DEL CONTENUTO PROTEICO TOTALE MEDIANTE METODI DI TITOLAZIONE E SPETTROSCOPICI

1.1 Metodi di titolazione

La determinazione delle proteine totali, tramite l'analisi del contenuto di azoto totale, viene eseguita utilizzando il metodo descritto da Kjeldahl (1883). Questo metodo permette di mescolare il campione con K_2SO_4/H_2SO_4 per poi convertirlo in solfato di ammonio, seguito dalla trasformazione degli ioni ammonio in gas ammoniacale aggiungendo NaOH e acido bórico. Infine, il gas ammonio viene titolato con acido cloridrico per fornire il contenuto totale di azoto, che viene convertito in contenuto di proteine grezze moltiplicandolo per un fattore di conversione (tipicamente 6,38 per il latte) basato sul contenuto di azoto delle caseine, pari al 15,67%. A causa di questa approssimazione, il metodo Kjeldahl può sovrastimare il contenuto proteico in campioni contenenti grandi quantità di azoto non proteico, tipicamente 3-8% nel latte intero e 25-30% nel siero di latte (Chiacchierini et al., 2003). Nonostante questo però, il metodo Kjeldahl ha un'elevata precisione pur considerando la distorsione che può essere causata dall'uso del fattore di conversione. Questo metodo richiede molto tempo e utilizza grandi quantità di sostanze chimiche aggressive e inquinanti, pertanto, sono da preferire altri metodi per determinare le proteine totali del latte, tra cui la titolazione in formolo e i metodi spettroscopici (Figura 1).

Figura 1. Apparecchiatura classica metodo Kjeldahl, Handbook For Kjeldhal Digestion
<https://it.scribd.com/document/703919619/Handbook-For-Kjeldhal-Digestion>



La titolazione in formolo comporta la reazione dei gruppi amminici (-NH_2) di proteine, peptidi e amminoacidi con formaldeide (HCHO) per creare derivati dell'amminoacido metilenico (-N=CH_2), e titolando i gruppi -COOH con 0.1N NaOH. Non sono state riscontrate differenze significative tra i metodi di titolazione in formolo e il Kjeldhal nella determinazione delle proteine del latte di capra (Gomaa e altri, 2014). Tuttavia, il metodo di titolazione del formolo è facilmente implementabile (James, 1995) e può essere più accurato del metodo Kjeldhal nei campioni contenenti azoto non proteico.

1.2 Metodi spettrofotometrici

Diversi metodi spettrofotometrici vengono oggi utilizzati per una quantificazione rapida e accurata delle proteine del latte e dei prodotti caseari (Tabella 1). Generalmente si usa l'albumina sierica bovina come riferimento, ma questi metodi sono talvolta calibrati per ogni composizione proteica per consentire una certa specificità e accuratezza. L'analisi spettroscopica diretta delle proteine si basa sul loro assorbimento UV dovuto alla presenza di legami peptidici (a 205 nm), agli amminoacidi aromatici (tirosina (Tyr), triptofano (Trp), e in piccola misura, fenilalanina (Phe)) e ai legami disolfuro della cisteina nella loro struttura. Gli spettri di assorbimento degli amminoacidi aromatici differiscono leggermente, ad esempio (i) il picco di assorbimento di Trp si osserva intorno a 290 nm con strutture fini fino a 305 nm, (ii) il massimo di assorbimento di Tyr si verifica tra 275 e 282 nm con una spalla a lunghezze d'onda maggiori che è leggermente oscurata da Trp e (iii) Phe ha numerose bande meno intense ma più nitide tra 255 e 270 nm. I legami disolfuro assorbono debolmente nell'intervallo di assorbimento degli amminoacidi aromatici, principalmente a 280 nm, e si estendono successivamente alla regione 310-330 nm. I campioni di proteine possono essere trattati con agenti riducenti blandi come ditiotreitolo, 2-mercaptoetanololo e tris-(2-carbossietil) -fosfina cloridrato per ridurre al minimo l'assorbimento dei loro legami disolfuro. L'assorbimento degli amminoacidi aromatici dipende in larga misura dal pH del campione. Ad esempio, il picco di assorbimento di Tyr a 275 nm (ϵ -1400 M⁻¹ cm⁻¹) a pH neutro è spostato verso il rosso a 290 nm (ϵ -2300 M⁻¹ cm⁻¹) a pH alcalino a causa della produzione di radicali anioni tirosinati ($\text{Tyr - O}^{\bullet-}$) (Creed, 1984). L'assorbimento a 280 nm differisce significativamente tra le proteine a seconda del loro contenuto relativo di legami disolfuro. Le assorbività molari medie dei cromofori Trp, Tyr, Phe e Cys delle proteine ripiegate in soluzioni acquose a pH 7 e 280 nm sono state trovate essere 5600, 1490, 200, 125 LM⁻¹ cm⁻¹, rispettivamente. Quindi,

$$\text{Assorbanza}_{280} = 5600 (\text{Trp}) + 1490 (\text{Tyr}) + 200 (\text{Phe}) + 125 (\text{SS})$$

L'assorbanza totale, come combinazione lineare delle assorbanze di questi residui di amminoacidi, può essere ottenuta con una accuratezza di circa +5% (Kelly et al., 2005). L'idoneità di questo metodo per l'analisi delle proteine dipende dal contenuto degli amminoacidi reattivi e dalla loro rilevanza rispetto ai fenomeni studiati.

Le proteine possono anche essere misurate in base alla fluorescenza degli amminoacidi. Tra questi, Trp è il più comune, seguito da Tyr, mentre Phe contribuisce molto poco a causa della scarsa assorbanza e della bassa resa quantica (Ghisaidoobe and Chung, 2014). Sebbene Trp abbia una resa quantica simile a Tyr, si ritiene che il gruppo indolico di Trp funga da principale fonte della sua eccitazione a circa 280 nm e dell'emissione a circa 350 nm (Teale and Weber, 1957). Nella maggior parte delle proteine naturali, l'emissione di Tyr è spesso soppressa attraverso il trasferimento di energia a Trp o tramite il contatto con la catena peptidica (Lakowicz, 2013). Rispetto alle caratteristiche complesse di Trp, Tyr può essere considerato un fluoroforo semplice. Trp è fortemente influenzato dal microambiente locale e presenta due componenti di decadimento della fluorescenza, pari a 0,5 e 3,1 ns (Gudgin et al., 1981; Swaminathan et al., 1994) che sono intrinseche alla sua struttura e non sono influenzate dalla lunghezza d'onda di eccitazione (Albani, 2014°, 2014b). Il legame idrogeno, insieme ad altre interazioni non covalenti e alla polarità del microambiente influenzano il massimo della fluorescenza e l'intensità dell'emissione di Trp (Gryczynski et al., 1988; Piston and Kremers, 2007). I metodi spettrofotometrici possono essere utilizzati anche nella quantificazione delle proteine attraverso la misurazione di coloranti colorati formati dalla reazione delle proteine con diversi reagenti. Il Biureto, l'acido bicinconinico, il Lowry modificato e il Bradford sono i test più comunemente utilizzati (tabella 1).

Tabella 1. Riepilogo dei metodi di quantificazione delle proteine totali del latte/ dei prodotti lattiero-caseari. Adattata da (Warakaulle et al., 2024).

Saggio	Principio Chimico	Sensibilità	Vantaggi	Limitazioni / Interferenze
Assorbanza UV	Assorbimento di Trp, Tyr, Phe (280nm) e legame peptidico (205nm).	30-2000 µg/ml.	Semplice, non distruttivo.	Dipendenza stretta dalla composizione amminoacidica
Biureto	Complesso di coordinazione viola tra Cu ²⁺ e atomi C-N peptidici.	150-900 µg/ml.	Indipendente da amminoacidi liberi.	Bassa sensibilità, interferito da ammonio e Tris.
BCA (Acido Bicinconinico)	Riduzione di rame alcalino a Cu ⁺ chelato da BCA (562nm).	20-2000 µg/ml.	Compatibile con tensioattivi fino al 5%.	Interferenza da fosfolipidi e ammonio solfato.
Lowry	Biureto combinato con riduzione del reattivo Folin-Ciocalteu (750nm).	5-200 µg/ml.	Sensibilità elevata.	Interferenza critica da agenti riducenti esterni.
Bradford	Legame ionico/idrofobico con proteine, shift spettrale da 465nm a 595nm.	10-2000 µg/ml.	Estremamente rapido ed economico	Sensibile ai detergenti (SDS) e sbilanciamenti di cariche.

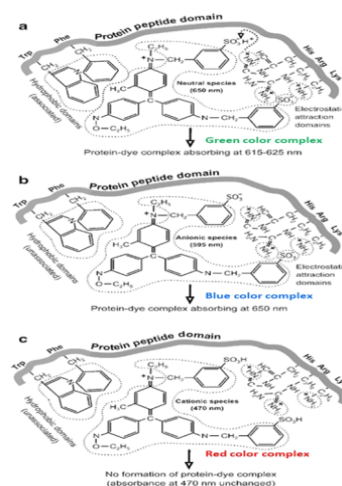
La reazione dei legami peptidici con ioni rame (II) in una soluzione alcalina e la formazione di complessi di coordinazione color malva tra gli ioni Cu^{2+} e gli atomi C-N e C-O sul gruppo peptidico (lunghezza d'onda massima 540 nm) costituisce la base del test del **Biureto** (o di Piotrowski's) (Chang and Zhang, 2017). Sebbene il test non sia influenzato dagli amminoacidi liberi, non è adatto per campioni di proteine purificati mediante precipitazione di solfato di ammonio perché i tamponi, come Tris e ammoniaca, interferiscono con il test.

Sono state sviluppate diverse varianti del test, come l'acido bicinconinico (BCA) e i test Lowry modificati. Il test **BCA** si basa sulla formazione di un complesso idrosolubile viola scuro tra Cu^+ e BCA (lunghezza d'onda massima 562 nm) (Smith et al., 1985). L'assorbanza del complesso BCA/-rame è molto più forte del complesso peptide/rame nel test originale del Biureto, aumentando la sua sensibilità di un fattore di circa 100 e consentendo la quantificazione delle concentrazioni proteiche nell'intervallo 0,0005-2 mg/ml. La presenza di tensioattivi fino al 5% nei campioni è compatibile con il test BCA, rappresentando così un notevole vantaggio legato al suo impiego.

Nel saggio Lowry, Cu^+ è ossidato a Cu^{2+} dal Mo(VI) presente nel reattivo di Folin-Ciocalteu, che viene ridotto a blu di molibdeno (Mo(V)). La presenza di residui di tirosina aumenta la sensibilità del test alle concentrazioni proteiche nell'intervallo di 0,005-2 mg/ml contribuendo alla formazione del blu molibdeno (Lowry et al., 1951). Il segnale può essere ulteriormente amplificato da alcuni coloranti organici, come il verde malachite e l'auramina O, che si legano al blu di molibdeno (Sargent, 1987).

Lo spostamento di assorbanza del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 costituisce la base per un saggio proteico Bradford rapido, sensibile e preciso. In un ambiente acido, la forma cationica libera del colorante è rossa (lunghezza d'onda massimo 465 nm) e cambia colore in blu (lunghezza d'onda massimo 595 nm) quando si lega ad una proteina (Figura 2).

Figura 2. Meccanismo di legame del colorante blu brillante di Coomassie con le proteine (a) residui neutri (b) residui anionici e (c) residui cationici (Warakaulle et al., 2024).



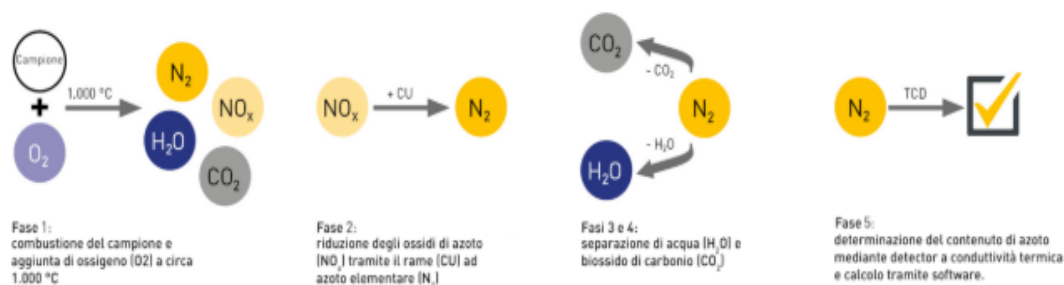
Il cambiamento di colore è causato da forti interazioni non covalenti tra il reagente e la proteina, tra cui le forze di Van Der Waals che causano la formazione di complessi con i gruppi carbossilici della proteina, interazioni elettrostatiche con i gruppi amminici e interazioni idrofobiche con i residui aromatici. Durante la formazione del complesso, il colorante Coomassie inizialmente rosso dona il suo elettrone libero ai gruppi ionizzabili delle proteine, alterando così gli stati nativi delle proteine ed esponendo le loro tasche idrofobiche a legarsi con il colorante Coomassie, portando così alla formazione di complessi blu stabili che possono essere conservati a temperatura ambiente fino a due settimane. Il test proteico di Bradford è caratterizzato da semplicità, rapidità, sensibilità ed economicità. Non è influenzato dall'interferenza di minerali o carboidrati presenti nei campioni, tuttavia, la presenza di detergenti come il sodio dodecil solfato (SDS), che viene utilizzato per la denaturazione delle proteine in SDS-PAGE può influenzare i risultati. Quando le proteine sono presenti a concentrazioni inferiori alla loro concentrazione micellare critica (CMC), l'SDS impedisce il legame del colorante, portando così ad una sottostima delle concentrazioni proteiche. A concentrazioni superiori alla CMC, l'SDS diventa altamente legato al colorante, portando a una sovrastima del contenuto proteico. Tuttavia, l'inclusione di ciclodestrine nella miscela di prova può aiutare a eliminare questi problemi. Inoltre, l'utilizzo di un'elevata concentrazione di tampone durante la preparazione del campione può portare a una sovrastima delle concentrazioni proteiche a causa della formazione di una base coniugata con il reagente. La sequenza proteica e la sua somiglianza con la proteina di riferimento sono fattori cruciali nel test di Bradford perché le reazioni delle proteine differiscono in base all'affinità del colorante per i residui di arginina e lisina (Georgiou et al., 2008). Confrontando i diversi metodi spettrofotometrici per la determinazione delle proteine totali in campioni di latte bovino in polvere, i risultati della tecnica Bradford sono risultati essere i più simili al metodo Kjeldhal (Kamikaze et al., 2003). I metodi spettrofotometrici basati sui coloranti sono particolarmente più sensibili e richiedono meno campioni rispetto alle classiche titolazioni.

Le proteine del latte e dei prodotti caseari sono sottoposte a diversi gradi di proteolisi da parte di enzimi microbici e non microbici. Un saggio spettrofotometrico rapido e pratico che utilizza l'O-ftalaldeide (OPA) un composto organico che viene utilizzato per misurare il grado di idrolisi proteica a 340nm. Il saggio OPA si basa sull'interazione tra OPA e gruppi di amminoacidi liberi che diventano disponibili quando un substrato proteico subisce proteolisi (Church et al., 1985). Questo metodo è comunemente utilizzato per valutare l'entità della proteolisi nello yogurt (Li et al., 2023) e nel formaggio (Myag-honosov et al., 2020).

1.3 Altri metodi

Il metodo Dumas (Figura 3) si basa sulla combustione del campione in ossigeno per generare anidride carbonica, ossidi di azoto, anidride solforosa e acqua. Questi gas vengono raccolti in una specifica colonna di assorbimento che utilizza PbCrO_4 , Cu , NaOH , o P_4O_{10} per rimuovere le quantità appropriate di SO_2 , O_2 , CO_2 , e acqua, misurando contemporaneamente NO_2 attraverso un rilevatore di conduttività termica. E' stato dimostrato che il metodo Dumas fornisce risultati equivalenti a quelli del metodo Kjeldahl in varie applicazioni, suggerendo una possibile sostituzione del metodo Kjeldahl in determinate situazioni (Wiles and Gray, 1998, Simonne et al., 1999, Owu-su-Apenten, 2002). Possono essere utilizzati anche metodi calorimetrici, in cui l'analita viene tenuto in una camera elettrolitica mentre una quantità nota di elettricità viene utilizzata per neutralizzare, ossidare, ridurre o precipitare il materiale e analizzarlo. La formula $Q=nzF$, dove Q è la carica elettrica totale, n sono le moli di peptidi ossidati, z è il numero di elettroni trasferiti per molecola durante il processo redox e F è la costante di Faraday ($9.65 \times 10^4 \text{ C/mol}$). Triptofano, cisteina, tirosina e metionina sono i quattro amminoacidi biologici che possono essere ossidati; il triptofano ha un potenziale redox di 0,23, la cisteina di 0,93, la tirosina di 1,02 e la metionina di 1,5 (Zhao, Zare & Chen, 2019). Il metodo di identificazione e determinazione dei gruppi solfidrici e disolfuro nelle proteine mediante titolazione calorimetrica utilizzando argento in eccesso (I) è in grado di quantificare piccole quantità di proteine (20-1000 $\mu\text{g/ml}$) con una precisione entro il 4% (Ladenson & Purdy, 1973).

Figura 3. Principio di base del metodo Dumas, C. Gerhardt GmbH & Co. KG. Dispense del corso di Laboratorio di Biochimica degli Alimenti, Gasparrini, 2024-2025.



Capitolo 2

TECNICHE CROMATOGRAFICHE PER LA SEPARAZIONE E LA PURIFICAZIONE DELLE PROTEINE

I metodi cromatografici offrono diversi vantaggi nell'analisi delle proteine consentendo la separazione e la quantificazione di singole proteine e peptidi nei campioni.

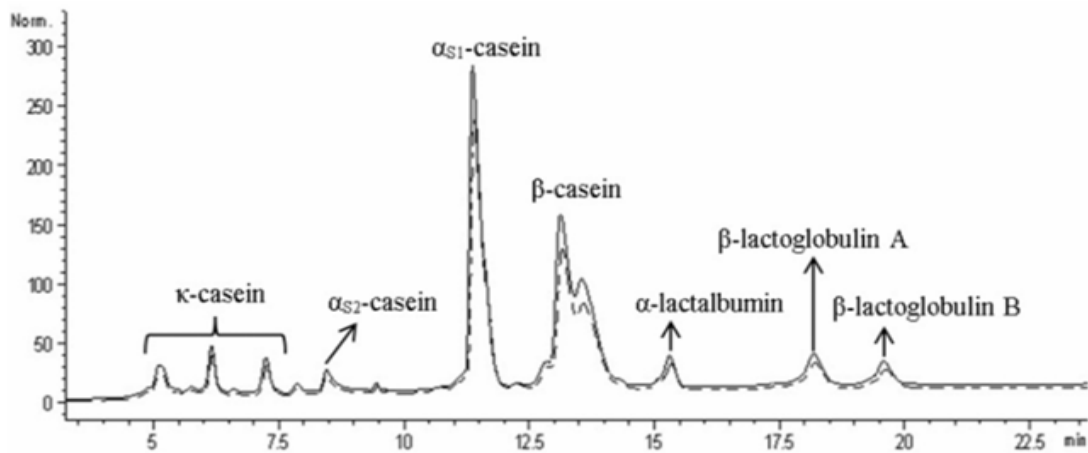
Diverse tecniche utilizzano proprietà differenziali della proteina, ad esempio polarità, idrofobicità, cariche ioniche, dimensioni e affinità selettive, per eseguire le separazioni come spiegato di seguito.

1.1 Cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC)

L'RP-HPLC è una tecnica molto utile per la separazione e la quantificazione delle proteine del latte (Mitulovic' e Mechtler, 2006). I campioni di latte devono essere scremati (ad esempio mediante centrifugazione a 3000 x g a 15°C per 30 minuti), chiarificati (ad esempio mediante l'aggiunta di 7 volumi di tampone Bis-Tris 0,1 M (pH 8,0) contenente urea 8 M, citrato trisodico, 1,3%) e ridotti con ditiotreitolo 0,3% (DTT) durante la notte a 4°C (Miranda et al., 2004). In un metodo analogo, un campione di latte (200 µl) è stato miscelato con 3780 µl di tampone di dissociazione (urea 7M e propano Bis-tris 20mM) e poi 20µl/ml di mercaptoetanolo e il campione è stato filtrato attraverso una provetta da 0,22 o 0,45 µm, filtro PVDF (Figura 4) (Paludetti et al., 2018). E' stato suggerito che diluire i campioni di latte in una miscela ottimizzata di acetonitrile, acqua, acido trifluoroacetico (340:660:1, v/v/v) durante la preparazione del campione consente di avere delle caratteristiche ottimali delle proteine, portando a picchi più nitidi e una migliore separazione (Yuksel & Erdem, 2010).

Le frazioni proteiche del latte e le varianti genetiche possono essere separate in un'unica esecuzione con risoluzioni molto elevate utilizzando metodi RP-HPLC (Jensen et al., 2012). Le separazioni proteiche sono state effettuate utilizzando colonne a fase inversa C4, C5, C8 e C18. Una netta separazione su una colonna C18 è mostrata in Figura 4. In uno studio recente, RP-HPLC è stato utilizzato con le tradizionali tecniche SDS-PAGE, sequenziamento del cDNA e tecniche avanzate di proteomica MS/MS per valutare la diversità molecolare del latte di cammello (Ryskaliyeva et al., 2018).

Figura 4. Separazione RP-HPLC delle proteine del latte bovino mediante colonna Poroshell 300SB C18 (Paludetti et al., 2018).



La separazione completa del macropeptide della caseina, dei proteosi-peptoni, dell' α -lattalbumina (forme glicate sovrapposte), dell'albumina sierica bovina e delle β -lattoglobuline A e B è stata ottenuta entro 6 minuti su una colonna C8 (Sturaro et al., 2016). Il tampone bis-Tris/citrato (pH 7) con cloridrato di guanidina (invece di urea), DDT (invece di 2-mercaptoetanolo) e un sofisticato gradiente a sette passaggi è stato utilizzato per ottenere la separazione e la quantificazione simultanee di caseina e proteine del siero del latte in meno di 40 minuti su una fase stazionaria C8 a 45°C (Bonfatti et al., 2008). Ad esempio, sono state ottenute separazioni di successo utilizzando RP-HPLC per le caseine del latte di bufali d'acqua (Bonfatti et al., 2013) e cavalla (Fessas et al., 2001). La gelificazione dell'età del latte UHT è stata studiata anche utilizzando RP-HPLC accoppiato alla spettrometria di massa (MS/MS) (Reynes et al., 2018). Potrebbero ancora persistere alcune limitazioni, ad esempio, vengono indotti "picchi rumorosi" nella regione della caseina κ - α -2 a causa dell'attività della plasmina nel latte che porta alla co-eluzione parziale dei frammenti di γ -caseina con β -caseina A1 o A2 (Bonfatti et al., 2008). Allo stesso modo, è stata utilizzata una colonna monolitica RP-HPLC in silice ottadecilica per separare le principali proteine della caseina bovina entro cinque minuti (Ramírez-Palomino et al., 2014). Tuttavia, Vincet et al., (2016) hanno suggerito diverse ottimizzazioni dei parametri RP-HPLC e MS per superare la co-eluzione delle proteine del latte bovino e per identificare le differenze nelle varianti proteiche nei campioni di latte in massa.

2.2 Cromatografia di interazione idrofobica (HIC)

L'**HIC** si basa sull'assorbimento di regioni idrofobiche di proteine su ligandi idrofobici immobilizzati, come butile, ottile e gruppi fenilici, legati alla colonna in presenza di elevate concentrazioni saline nella fase mobile (Rustandi, 2013). Per migliorare le loro interazioni con la fase stazionaria, i campioni di proteine vengono inizialmente aggiunti alla resina HIC in un tampone ad alta forza ionica.

Successivamente, le proteine vengono eluite in ordine decrescente di idrofobicità riducendo la forza ionica del tampone (Flatt, 2019). La risoluzione cromatografica è influenzata dai tipi di ligando idrofobico e dalla concentrazione di sale nella soluzione (Zhang et al., 2010). Le cariche proteiche potrebbero influenzare la ritenzione e la separazione delle proteine: ad esempio, i residui di istidina non carichi nel lisozima aumentano la ritenzione mentre i residui di istidina carichi la diminuiscono (Fausnaugh and Regnier, 1986). I profili di eluizione HIC delle frazioni di caseina possono essere utilizzati per identificare la presenza di diversi tipi di latte (capra, pecora e bovino) nelle miscele. La conoscenza della composizione della caseina nelle varie specie è piuttosto importante per due ragioni principali. Innanzitutto, la composizione della caseina influenza la dimensione e la struttura delle micelle, il processo di aggregazione, l'azione degli enzimi proteolitici e, quindi, la lavorazione del latte nell'industria lattiero-casearia. In secondo luogo, un'identificazione e quantificazione affidabile delle principali proteine del latte offre la possibilità di impostare metodi per la valutazione delle adulterazioni del latte. La caseina, in particolare, è meno influenzata dal trattamento termico rispetto alle proteine del siero. (Bramanti et al., 2003). L'eluizione HIC con un gradiente di sale è stata inoltre impiegata per recuperare con successo la β -lattoglobulina dai concentrati di proteine del siero del latte, con un recupero del 45,2% (Santos et al., 2012).

2.3 Cromatografia a scambio ionico (IEC)

L'**IEC** separa le proteine in base alle loro proprietà di carica basandosi sull'attrazione delle molecole caricate in modo opposto dalla fase stazionaria (Cummis et al., 2017). Due modalità IEC, vale a dire scambio cationico e anionico, sono abilitate dalla presenza di una fase stazionaria, che è una matrice organica inerte derivatizzata chimicamente con gruppi funzionali ionizzabili che contengono controioni caricati in modo opposto e mobili, e una fase mobile tampone acquosa (Cummis et al., 2011). Le proteine si assorbono sulla resina in base al loro rapporto carica/massa e possono essere desorbite modificando il pH del tampone e la forza ionica (Ali et al., 2010). Per l'analisi delle proteine del siero del latte è stata

utilizzata un'ampia gamma di metodi di cromatografia a scambio ionico (Goodall et al., 2008; Voswinkel & Kulozik, 2011; Santos et al., 2012; Dizaji, 2016). Prima dell'iniezione del campione nel sistema IEC, i fosfolipidi sono stati rimossi per impedire il blocco dell'adsorbimento delle proteine (Voswinkel, 2011). La separazione delle varianti di α -lattoalbumina e di albumina sierica bovina, ma non di β -lattoglobulina, è stata efficace utilizzando la cromatografia a scambio anionico (Ye et al., 2000; Kim et al., 2003). Circa il 60% della β -lattoglobulina bovina è stata recuperata in forma pura in un unico passaggio utilizzando una colonna a scambio anionico Mon Q 550 GL con eluizione a gradiente di sale (Santos et al., 2012). La forza di legame delle tre principali proteine del latte bovino su uno scambiatore anionico segue l'ordine dimero dell'albumina sierica > monomero di albumina sierica > α -lattoalbumina (Weinbrenner and Etzel, 1994). In alcuni casi è stato segnalato lo spostamento dell' α -lattoalbumina carica negativamente da parte della β -lattoglobulina da una resina a scambio anionico o da una membrana anionica (Goodall et al., 2008). La cromatografia a scambio cationico è stata utilizzata con successo per separare le frazioni di caseina bovina (Hollar et al., 1991). La cromatografia a scambio ionico DEAE-cellulosa e le tecniche SDS-PAGE sono state utilizzate per separare e caratterizzare le proteine del latte di cammello e differenziarle dalle proteine del latte bovino (Saliha et al., 2013). L' α -caseina del latte di pecora è stata efficacemente purificata e separata utilizzando lo scambio ionico DEAE-cellulosa e la cromatografia di esclusione dimensionale sephadex-G-75 (Alkhalidy and Dosh, 2023).

I metodi di scambio ionico DEAE e di filtrazione su gel vengono utilizzati per separare la β -lattoglobulina bovina A, B e α -lattoalbumina nel latte bovino (Yoshida, 1990) mentre la cromatografia a scambio anionico a flusso rapido DEAE-sepharose è stata utilizzata per isolare e purificare le proteine del siero del latte (Mao et al., 2017). Gli approcci proteomici IEC e bidimensionali basati su gel sono stati utilizzati per separare i modelli di isoforme delle proteine del siero del latte bovino e sono state identificate diverse nuove proteine del siero del latte minori (Fong et al., 2008). L'IEC è stata utilizzata anche per determinare gli amminoacidi presenti nel formaggio (Hogenboom et al., 2017).

2.4 Cromatografia ad esclusione molecolare (SEC)

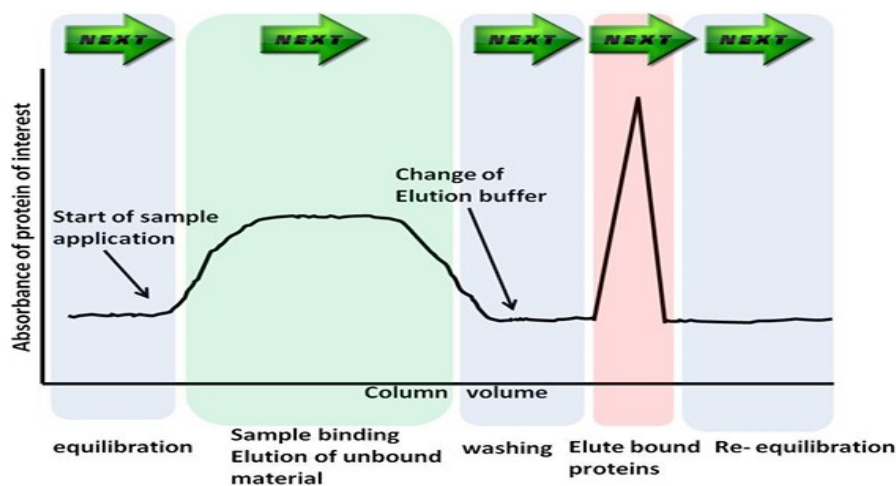
Nella SEC, detta anche cromatografia a permeazione di gel o a filtrazione di gel, le proteine vengono separate su gel porosi in base alle loro dimensioni e pesi molecolari utilizzando calibrazioni adeguate. La SEC può essere utilizzata per rilevare e quantificare l'aggregazione di proteine o proteine modificate con diverse strutture quaternarie (Held and Hofe, 2017). Le

analisi SEC delle proteine del latte crudo e trattato termicamente di bovini e asina hanno fornito risultati compatibili con RP-HPLC e hanno rilevato maggiori informazioni sulle caseine aggregate termicamente in entrambi i latti. Per quanto riguarda la quantificazione della β -lattoglobulina, α -lattoalbumina, lisozima e caseina totale, non sono state osservate differenze significative tra i risultati ottenuti da SE-HPLC e da RP-HPLC per latte crudo e siero di latte. Il riscaldamento del latte di mucca ha promosso l'aggregazione di proteine denaturate come osservato dal SE-HPLC, mentre α -la e β -lg dal latte d'asino sono stati stabili al processo termico a 100°C (5 minuti) (Pinho et al., 2012). SEC è riuscito a separare gli idrolizzati della caseina in base alla lunghezza media dei peptidi (Silvestre et al., 1994). Un confronto tra SEC e la tecnica di frazionamento del campo di flusso asimmetrico ha fornito una buona separazione dei componenti a basso peso molecolare (Kang et al., 2011).

2.5 Cromatografia di affinità

Interazioni specifiche di tipo biologico, come il legame antigene-anticorpo, vengono utilizzate nella cromatografia di affinità per separare proteine specifiche (Hage, 1999). In questa tecnica, il processo consiste in tre fasi principali: incubazione del campione con un ligando anticorpale specifico immobilizzato per consentire il legame, lavaggio degli altri componenti non specifici e infine eluizione della proteina bersaglio in un tampone adatto (Anusha & Sirisha, 2018). (Figura 5).

Figura 5. Purificazione tipica tramite cromatografia di affinità (Anusha & Sirisha, 2018)



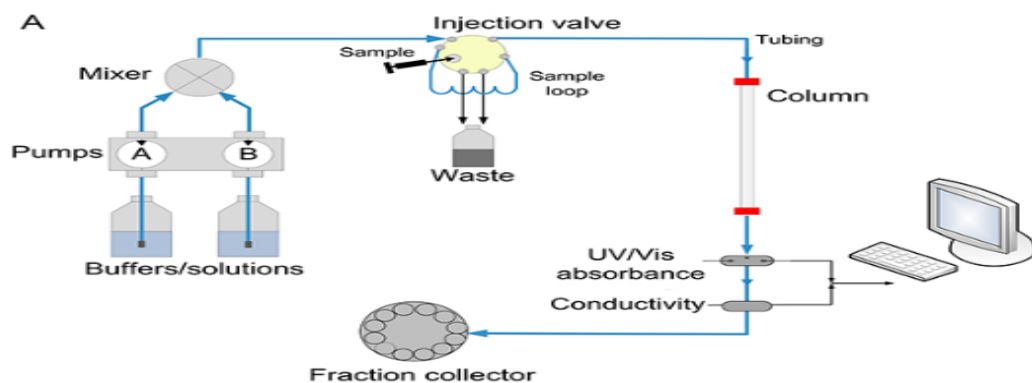
La cromatografia di affinità della lectina è stata utilizzata nella purificazione delle glicoproteine grazie alla capacità della lectina di riconoscere e legare determinati tipi di

residui di carboidrati (Flatt, 2019). La purificazione è resa semplice etichettando una sequenza nota che va da un breve frammento di amminoacidi all'intero dominio o all'intera proteina di interesse. I tag facilitano la purificazione delle proteine agendo come marcatori dell'espressione proteica (Anusha & Sirisha, 2018). In questo processo, le proteine non marcate passeranno prima attraverso la colonna e poi la/le proteina/e bersaglio/i saranno eluite con un eluente adatto che compete con il tag per il legame della proteina o diminuendo il pH e l'affinità del tag per la resina (Flatt, 2019). Le caseine del latte di pecora sono state separate in quattro frazioni (α -s1, α -s2, β , k) utilizzando la cromatografia di affinità attaccata con tiolo-sefariosio 4B attivato e si è concluso che questo risultato può essere utilizzato per determinare il polimorfismo nelle frazioni di caseina (Dall'olio et al., 1990).

2.6 Cromatografia liquida proteica rapida (FPLC)

La separazione e la purificazione delle proteine nel loro stato nativo sono state ottenute mediante FPLC. La FPLC è una forma di cromatografia ad alte prestazioni che sfrutta l'alta risoluzione resa possibile dalle fasi stazionarie di piccolo diametro. È stato originariamente sviluppato per proteine e presenta un'elevata capacità di carico, sistemi acquosi, flussi elevati e la disponibilità di fasi stazionarie nella maggior parte delle modalità di cromatografia comuni. (Madadlou et al., 2011). La possibilità di denaturazione delle proteine è ridotta dalla contropressione relativamente bassa necessaria per azionare le elevate portate (Gonzalez-Llano et al., 1990). Per lo più, le perle di agarosio reticolate con una varietà di dimensioni e ligandi di superficie servono come fase stazionaria in FPLC. FPLC può essere utilizzata per la separazione di proteine su colonne cromatografiche a scambio ionico, SEC, a fase inversa e di affinità, ma le più comunemente utilizzate sono le colonne a scambio anionico (Madadlou et al., 2011). Solitamente, i rilevatori UV vengono utilizzati per misurare la concentrazione proteica a una lunghezza d'onda di assorbimento di 280 nm (Flatt, 2019) (Figura 6).

Figura 6. Sistema FPLC tipico. Immagine da LaVerde, V., Dominici, P. e Astegno, A. (2017).



L'FPLC è stato utilizzato per purificare le caseine α -, β - e κ - per ulteriori indagini (Plank et al., 2008). Una buona separazione e quantificazione delle principali caseine del latte sono state ottenute utilizzando FPLC a scambio anionico su una colonna Mono Q a pH 7 (Davies and Law, 1987). Lo scambio cationico FCLP è stato utilizzato per separare le principali frazioni di caseina (Hollar et al., 1991) mentre lo scambio anionico FCLP è stato utilizzato per separare l' α -lattoalbumina e la β -lattoglobulina dal siero di latte (Geng et al., 2015). L'uso di FPLC con RP-HPLC per il frazionamento della frazione di azoto solubile del latte fermentato contenente peptidi inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina I (ACE) ha prodotto risultati promettenti (Gobbetti et al., 2000).

Capitolo 3

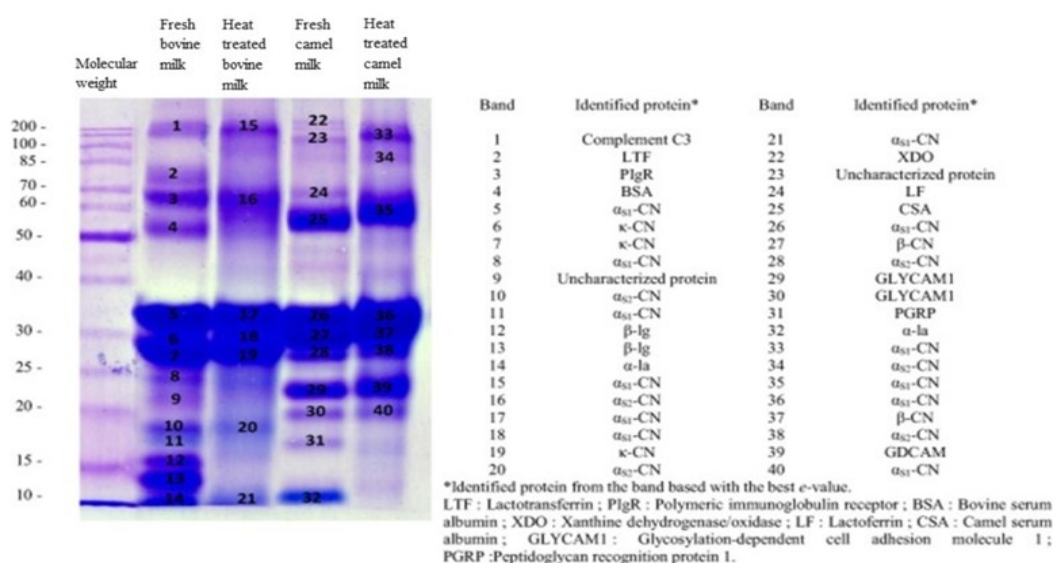
TECNICHE ELETTROFORETICHE PER LA SEPARAZIONE, LA VISUALIZZAZIONE E L'IDENTIFICAZIONE DELLE PROTEINE

Le tecniche elettroforetiche separano le proteine in base alle loro dimensioni e cariche e sono molto affidabili nel fornire le “impronte digitali” delle composizioni proteiche. Possono essere utilizzate per analisi semiquantitative, ad esempio mediante densitometria delle bande separate, nonché per analisi quantitative mediante elettroforesi capillare.

3.1 ELETTROFORESI SU GEL UNIDIMENSIONALE

L'elettroforesi su gel è un metodo semplice che viene comunemente utilizzato per la fenotipizzazione visiva delle proteine su diversi tipi di gel (Ribadeau-Dumas et al., 1989). I metodi di elettroforesi su gel sono convenienti, rapidi, poco costosi e richiedono quantità di proteine nell'ordine dei microgrammi. L'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE) non richiede il frazionamento preventivo di siero e caseine e viene utilizzata per la separazione simultanea di tutte le proteine del latte in base al loro peso molecolare (Basch et al., 1985). Una differenziazione delle proteine del siero del latte e separazione delle caseine bovine in quattro bande diverse che rappresentano α s1-, α s2-, β - e K-caseine si può ottenere utilizzando SDS-PAGE e un agente riducente (Figura 7) (Yelubaeva et al., 2017).

Figura 7. Separazione elettroforetica di campioni freschi e riscaldati (80°C/60 minuti) di latte bovino e di cammello mediante SDS-PAGE (Warakaulle et al., 2024).



SDS-PAGE è stato utilizzato con successo per l'analisi proteomica delle proteine del latte trattate termicamente (Felfoul et al., 2017) e per l'analisi delle proteine del latte nel formaggio dopo aver sciolto i campioni in urea 8M (Hailu et al., 2018; Mbye et al., 2021). L'inclusione di urea nel gel separatore migliora significativamente la separazione delle caseine senza effetti deleteri sulla migrazione proteica. L'elettroforesi Urea-PAGE denatura le proteine senza neutralizzarne le cariche, consentendone così la separazione in base al rapporto carica/massa anziché basandosi esclusivamente sul loro peso molecolare. Le proteine con mobilità elettroforetica simile in SDS-PAGE possono avere mobilità diverse in Urea-PAGE a seconda delle loro cariche intrinseche e del pH del gel. In presenza di agenti riducenti, come 2-mercaptoetanolo o ditiotreitolo, insieme all'urea, le separazioni della caseina possono essere effettuate sia a pH alcalini che acidi. D'altro canto, le separazioni delle proteine del siero del latte vengono effettuate a pH alcalini senza questi reagenti (Ribadeau-Dumas and Grappin, 1989). Mentre le proteine del siero vengono separate in modo ottimale su un gel di poliacrilammide al 12% in assenza di urea e con uno strato superiore di gel a pori larghi, le caseine si sono separate meglio su un gel di poliacrilammide all'8% con urea 4 M. Gli agenti riducenti rompono i ponti disolfuro intermolecolari mentre l'urea facilita la dissociazione degli aggregati micellari di caseina intermolecolari (Ng-Kwai-Hang and Kroeker, 1984). L'elettroforesi su gel è stata utilizzata per studiare le quantità di proteine distinte nel latte di varie specie animali, nonché l'impatto delle variabili genetiche e ambientali e di varie tecniche di lavorazione (Felfoul et al., 2017; Sharma et al., 2017). Tali studi solitamente coinvolgono un gran numero di campioni e più campioni possono essere eseguiti in parallelo per fornire risultati qualitativi facilmente interpretabili (Ng-Kwai-Hang and Kroeker, 1984). I modelli elettroforetici dei campioni bovini e caprini indicavano chiaramente la presenza di due proteine del siero del latte, β -lattoglobulina e α -lattoalbumina, nonché delle quattro varianti della caseina: α s1-, α s2-, β -, e k-caseine. Le allergie delle proteine del latte dei neonati sono spesso scatenate da β -lattoglobulina e α s1-caseina, che non sono presenti nelle proteine del latte umano (Sharma et al., 2017). Attraverso l'elettroforesi su gel, è stata inoltre dimostrata una elevata variabilità nella caseina e nelle proteine del siero del latte di bovini, capre, pecore, bufali e cammelli (Yasmin et al., 2020). La determinazione semiquantitativa del contenuto proteico nel latte scremato, nel latte scremato in polvere, nei concentrati proteici totali e nei concentrati di proteine del siero è stata effettuata mediante elettroforesi su gel, seguita da analisi densitometrica a scansione. Ciò ha richiesto una calibrazione adeguata a causa della variabilità nelle capacità di legame

per i coloranti anionici a seconda del contenuto di amminoacidi basici nelle proteine (Basch et al., 1985).

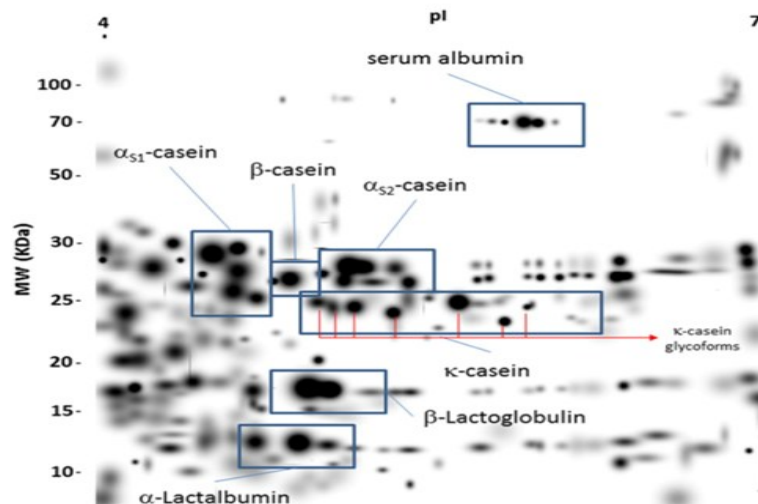
3.2 FOCALIZZAZIONE ISOELETTTRICA (IEF)

L'IEF separa le proteine e i peptidi in base alla loro carica definita dal pKa della molecola (Friedman et al., 2009). I componenti delle proteine del latte sono stati separati utilizzando la tecnica IEF in gel di poliacrilammide spessi 1 mm contenenti anfoliti, urea 7 M e 2-mercaptoetanolo allo 0,1%. L'IEF è stato impiegato per la fenotipizzazione delle proteine del latte su gel di poliacrilammide a strato ultrasottile in un'unica corsa (Seibert et al., 1985). L'IEF è stato utilizzato per separare e identificare α s1-caseina A, B, C; α s2-caseina B; β -caseina A1, A2, A3, B, C, k-caseina A, B, α -lattoalbumina B; e β -lattoglobuline A, B, C (Trieu-Cuot & Gripon, 1981). IEF seguito da PAGE è stato utilizzato per confrontare le proteine del latte di bovini, capre, maiali, topi e umani, permettendo di scoprire che le proteine del latte bovino e caprino mostrano una grande somiglianza, mentre le proteine del latte di non-ruminanti hanno mostrato una somiglianza minima (Kim and Jimenez-Flores, 1994). E' stato inoltre sviluppato un metodo di riferimento basato sull'IEF per tracciare la presenza di latte bovino nei formaggi prodotti con latte di capra e di pecora (Spoljaric et al., 2013).

3.3 ELETTROFORESI SU GEL BIDIMENSIONALE (2-DE)

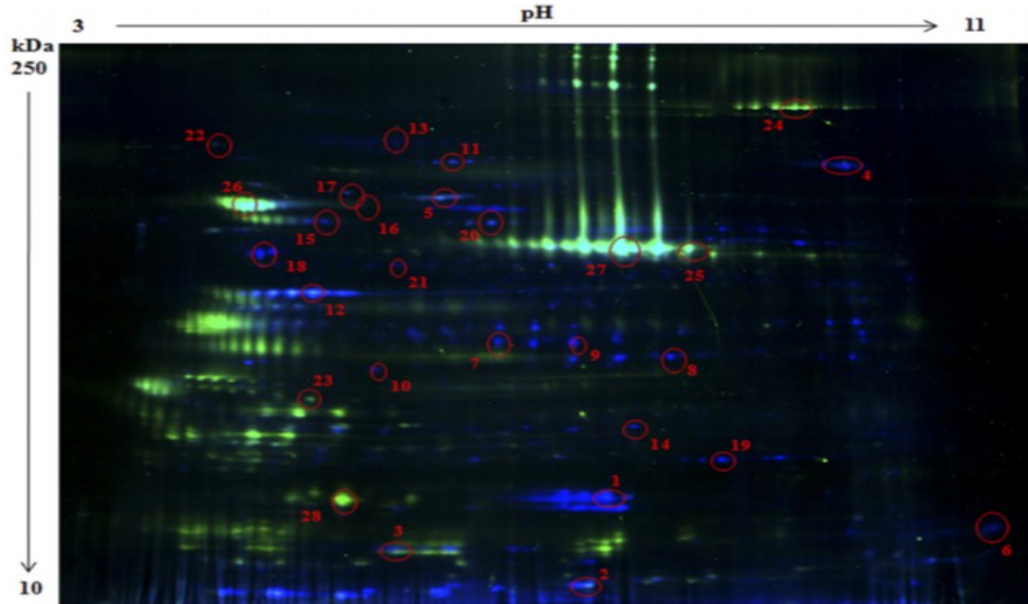
Le miscele proteiche complesse possono essere separate su SDS-PAGE utilizzando l'elettroforesi su gel bidimensionale (2-DE) con aggiunta di sostanze riducenti (Chevalier et al., 2009). Questa tecnica si basa su due caratteristiche molecolari: (i) la focalizzazione isoeletttrica (IEF), che separa le proteine in base alla loro carica e (ii) l'SDS-PAGE, che separa le proteine in base alle loro dimensioni (Figura 8) (O'Donnell et al., 2004).

Figura 8. Elettroforesi bidimensionale delle proteine del latte bovino (Warakaulle et al., 2024).



Un'applicazione alternativa, fornita da PAGE non riducente, consente l'imaging di complessi legati da ponti disolfuro come quelli presenti in campioni di latte pastorizzato e trattato termicamente. 2-DE è stato impiegato per esplorare la proteolisi delle β - e K-caseine (O'Donnell et al., 2004). I frammenti proteolitici della β -caseina, di dimensioni variabili da 9 kDa a frammenti di grandi dimensioni, appena pochi amminoacidi al di sotto della massa della β -caseina, sono stati separati su gel 2-DE (Yamada et al., 2002). Nel siero di latte bovino, sono state identificate anche forme abbreviate C-terminali della β -lattoglobulina utilizzando 2-DE (Zappacosta et al., 1998). I ricercatori hanno studiato la separazione dei componenti delle proteine del latte bovino utilizzando 2-DE accoppiato a diverse tecniche di spettrometria di massa (Galvani et al., 2001). Il 2-DE è stato utilizzato con successo per separare e identificare isoforme della k-caseina con diversi modelli di fosforilazione e glicosilazione (Calverol et al., 2003), e diverse isoforme della caseina nei bovini (Holland et al., 2006), asino (Cunsolo et al., 2009), e latte di capra (Roncada et al., 2002). Il 2-DE collegato alla spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) è stato impiegato per (i) esaminare le proteine del siero in campioni di latte proveniente da animali sani e infetti da mastite (Alonso-Fauste et al., 2012), (ii) identificare le proteine allergiche del latte in due razze di capre (Mansor et al., 2020), (iii) scoprire proteine note e nuove nel siero di latte bovino (Lee et al., 2018), e (iv) delineare la variazione di α s1-caseina, k-caseina e β -lattoglobulina in diverse razze bovine bulgare (Zagorchev et al., 2013). Le proteine del latte di sei razze di capre sono state separate mediante 2-DE e sono state segnalate da 25 a 102 macchie nelle diverse razze (Kumar et al., 2013). Etichettando ogni estratto con coloranti fluorescenti spettralmente risolvibili, di dimensioni e carica corrispondenti, noti come fluorofori CyDye DIGE, è possibile separare più estratti proteici utilizzando l'elettroforesi differenziale bidimensionale su gel (2D-DIGE). Questa tecnica è stata impiegata per analizzare i proteomi dei globuli di grasso del latte provenienti sia da campioni di controllo sia da lattini di pecora infetti da *Mycoplasma agalactiae*. I due gruppi sono stati marcati rispettivamente con gli esteri N-idrossisuccinimidil dei coloranti cianinici Cy3 e Cy2 (Figura 9) (Addis et al., 2011).

Figura 9. DIGE 2-D di MFGP da *M. agalactiae* pecore infette e non infette. Immagine sovrapposta di MFGP estratte da campioni rappresentativi di latte infetto (blu) e non infetto (verde). I punti indicano proteine con differenze statisticamente significative nella quantità tra tutti i campioni esaminati (Warakaulle et al., 2024).

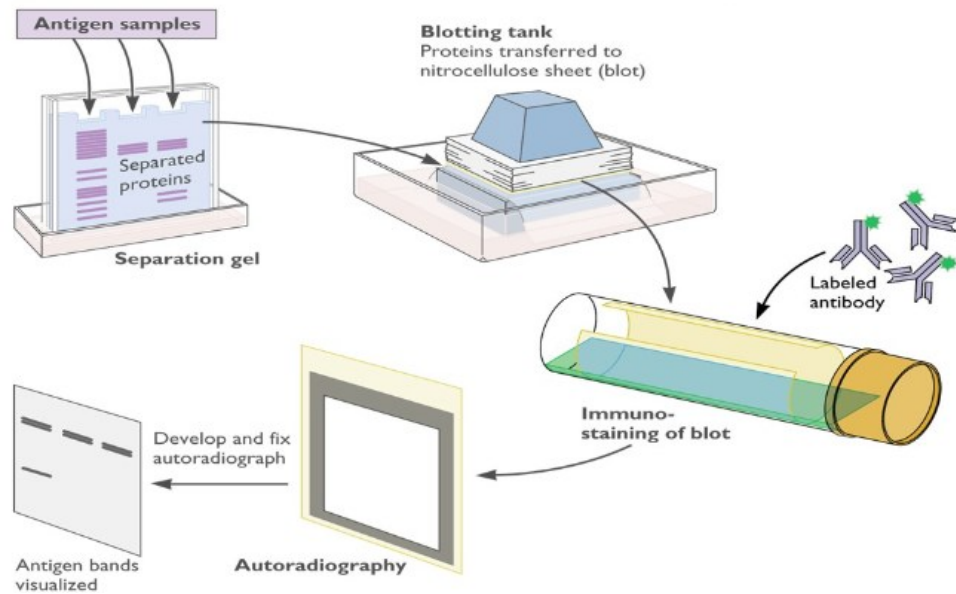


3.4 WESTERN BLOTTING

Il **Western Blotting** comporta il trasferimento o il blotting di singole proteine da gel di separazione per elettroforesi a membrane dove possono essere visualizzate. Sono coinvolti diversi passaggi, tra cui la preparazione del campione, l'elettroforesi su gel 1D o 2D, il blotting sulla membrana e il legame dell'anticorpo, il rilevamento, l'imaging e l'analisi. Il Western blotting è stato utilizzato per identificare e quantificare le proteine del latte bovino e di bufala che segnano la transizione dalla mastite subclinica a quella clinica e ha permesso di scoprire che la proteina associata alla ciclastasi è up-regolata nella mastite subclinica in entrambi i tipi di latte (Maity et al., 2020). L'analisi dei peptidi immunologicamente attivi e delle proteine allergiche è stata studiata utilizzando tecniche di Western blotting (Picariello et al., 2019). Inoltre, questa tecnica è stata utilizzata per analizzare la sintesi proteica del latte e di alcune pathway molecolari, come quella mTOR e l'espressione della β -caseina, gli effetti dei singoli amminoacidi essenziali sul signalling cellulare e i tassi di sintesi proteica nelle cellule mammarie bovine (Appuhamy et al., 2011). Il Western blotting è stato applicato

con successo anche per controllare l'adulterazione di formaggi di capra, pecora e bufala con latte bovino (Molina et al., 1995) (Figura 10).

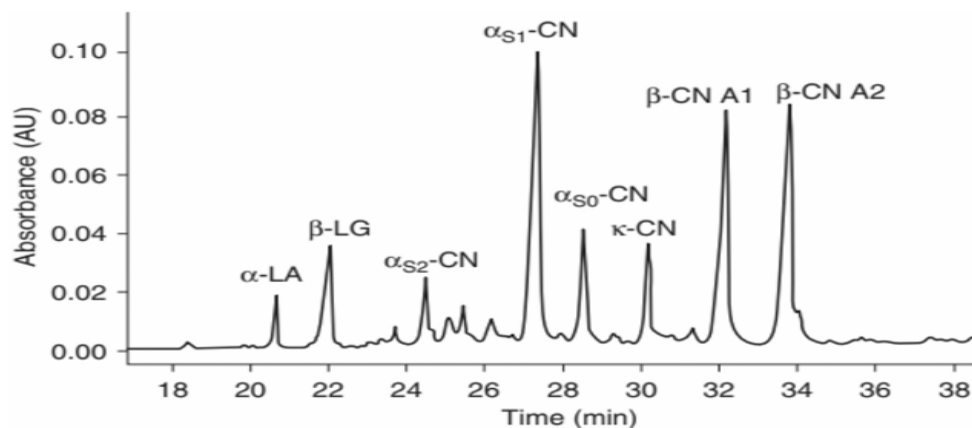
Figura 10. Tecnica Western Blotting (Burrell., 2017).



3.5 ELETTROFORESI CAPILLARE (CE)

Nei processi elettrochimici, le correnti elettriche influenzano il modo in cui le molecole con una carica elettrica si muovono attraverso una colonna capillare. Ciò consente l'isolamento simultaneo ad alta risoluzione di caseina e siero, fornendo una quantificazione accurata e offrendo un'eccellente opportunità per identificare variazioni genetiche, fosforilazione e modelli di glicosilazione nelle proteine del latte (Figura 11) (Heck et al., 2008).

Figura 11. Elettroferogramma rappresentativo delle proteine del latte mediante elettroforesi capillare ad alte prestazioni (HPCE) (Warakaulle et al., 2024).



La separazione della lattoferrina mediante CE è piuttosto scarsa rispetto ad altre proteine del siero del latte a causa delle sue grandi dimensioni (80 kDa), dell'elevato punto isoelettrico basico (pI, 8-9) e delle sue basse concentrazioni (Riechel et al., 1998; Indyk et al., 2007). Tuttavia è stato possibile rilevare la lattoferrina nelle formule per neonati utilizzando un tampone di corsa piuttosto complesso in un tempo di separazione di 30 minuti (Li et al., 2011). La CE è stata utilizzata per separare le caseine del latte di cammello e l' α -lattoalbumina (Mohamed et al., 2020) e per indagare l'adulterazione del latte di bufala da parte del latte bovino esplorando l' α -lattoglobulina come marcatore di adulterazione (Trimboli et al., 2019). Il polimorfismo genetico delle razze ovine australiane è stato studiato da CE e si è scoperto che è fortemente influenzato dalla composizione del latte e dalla resa (Clément et al., 2006). Anche le proteine e i peptidi del latte, del formaggio e del siero del latte sono stati caratterizzati con successo mediante CE utilizzando diversi tamponi (Strickland et al., 2001).

Capitolo 4

METODI RAPIDI E SELETTIVI PER LA DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE DEL LATTE

4.1 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA CON CHEMIOMETRIA

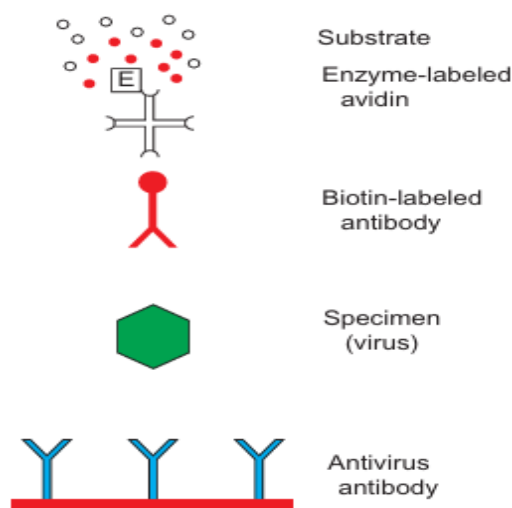
Attualmente, per l'analisi di routine delle proteine del latte vengono utilizzati metodi spettrofotometrici a infrarossi (IR) rapidi, non distruttivi e convenienti. La spettroscopia IR abbinata all'analisi chemiometrica multivariata viene utilizzata per sviluppare modelli di previsione appropriati per la determinazione dei componenti del latte, tra cui le proteine (Dufour, 2011). I modelli di calibrazione vengono costruiti utilizzando un set di 100–150 campioni già analizzati con un metodo di riferimento, impiegati come set di addestramento per correlare i dati spettrali con quelli analitici tramite regressione. Un secondo set indipendente, anch'esso composto da 100–150 campioni analizzati sia in IR sia con il metodo di riferimento, viene poi utilizzato per la validazione del modello (Yakubu et al., 2022). Gli spettri di assorbimento IR derivano dalle diverse modalità di vibrazione dei legami chimici molecolari, come allungamento e piegamento. La spettroscopia IR in trasmissione rileva tali vibrazioni dei legami covalenti nelle regioni del vicino infrarosso (NIR, 800–2500 nm) o del medio infrarosso (MIR, 2500–25.000 nm) (Mohamed et al., 2020). Nel NIR, le vibrazioni caratteristiche delle proteine compaiono alle seguenti lunghezze d'onda: ammidine B 1640–1670 nm (primo overtone della vibrazione di stiramento NH) e le bande ammidine A e ammidine I a 2056 e 2180 nm (combinazioni CH). Nel MIR, le vibrazioni ricadono invece nelle bande: ammidine I a 6060 nm (80% stiramento C–O, 10% stiramento CN, 10% flessione NH), ammidine II a 6500 nm (60% stiramento NH, 40% stiramento CN) e ammidine III a 8064 nm (30% stiramento CN, 30% flessione NH, 10% stiramento C–O, 10% flessione OCN). Anche la diffusione della luce da parte delle micelle proteiche nel visibile e nel NIR a corta lunghezza d'onda (400–1100 nm) può essere efficacemente sfruttata per la quantificazione delle proteine totali nel latte (Bogomolov and Melenteva, 2013). Le lunghezze d'onda di assorbimento NIR e MIR vengono impiegate per caratterizzare i legami CH, C–O e peptidici presenti nelle proteine del latte, così come i gruppi –OH degli acidi grassi, degli esteri, degli amminoacidi e del lattosio. Rispetto alla spettroscopia NIR, si sostiene che la MIR produca risultati più precisi per il contenuto proteico totale nel latte in polvere (Wu et al., 2008). Il MIR è stato utilizzato per determinare la composizione della caseina (α -, β -, e k-caseina) del latte di capra (Daniloski et al., 2022)

ed è stato utilizzato un approccio NIR per determinare il contenuto di lattoferrina nel latte bovino (Soyeurt et al., 2020). Le proteine del latte bovino crudo sono state analizzate utilizzando la spettroscopia MIR e la spettroscopia a riflessione totale attenuata e si è scoperto che questo metodo ha il potenziale per fornire risultati rapidi (Etzion et al., 2004). Diverse aziende hanno sviluppato apparecchiature disponibili in commercio con calibrazioni per l'analisi del latte che sono ampiamente utilizzate dall'industria lattiero-casearia. Le limitazioni della spettroscopia IR sono causate dalla diffusione della luce e dalla riflessione speculare da parte dei globuli di grasso (Holyrod, 2013; Yakubu et al., 2022) e dalla sovrapposizione delle intense bande di assorbimento dell'acqua con quelle delle proteine (Aernouts et al., 2011, Mohamed et al., 2020).

4.2 METODI IMMUNOENZIMATICI (ELISA)

I metodi **ELISA** si basano sul legame di anticorpi e antigeni con elevata specificità e affinità (Hsieh, 2010). I test ELISA sono basati sulla reazione di un antigene (proteina) e anticorpi marcati con enzimi, così da permettere la misurazione quantitativa dei complessi tramite spettrofotometri UV-visibili (Sakamoto et al., 2018). Sono disponibili molti kit ELISA commerciali per l'analisi di diverse proteine del latte con variabilità in termini di sensibilità, specificità, modalità di espressione dei risultati e formato (Downs and Taylor, 2010). La specificità del test è determinata dall'efficienza del legame e dalla cross-reattività con altre proteine. Sono disponibili metodi immunologici, che utilizzano antisieri policlonali, per la quantificazione di α -caseina, β -caseina e β -lattoglobuline (Levieux and Venien, 1994; Anguita et al., 1996; Haza et al., 1999). L'adulterazione del latte di capra, pecora o bufala con latte bovino è stata rilevata utilizzando un metodo ELISA indiretto (Figura 12), altamente selettivo che impiega un anticorpo monoclonale che identifica un epitopo specie-specifico sulla catena pesante delle IgG1 e IgG2 bovine (Hurley et al., 2004).

Figura 12. Metodo ELISA indiretto (Burrell., 2017).



L'adulterazione del latte bovino nel latte di yak è stata rilevata utilizzando una tecnica ELISA specializzata che prende di mira la caseina α S1 bovina (Ren et al., 2014). Un'altra classe di saggi immunologici spesso impiegati nello studio delle proteine del latte sono i saggi di immunodiffusione radiale (RID). In questa tecnica, un anticorpo viene aggiunto a un terreno caldo composto da agar o agarosio disciolti in soluzione salina normale tamponata e la miscela viene posta su una piastra di Petri e lasciata indurire. La soluzione contenente l'antigene di interesse viene introdotta in un pozzetto di gel e, diffondendosi radialmente, forma un cerchio di precipitina nel mezzo; il diametro di questo cerchio viene impiegato per la quantificazione, confrontandolo con i diametri dei cerchi generati da concentrazioni note dello stesso antigene (Stanley, 2002). I metodi RID sono stati impiegati per determinare il contenuto di lattoferrina nelle vacche sane e affette da mastite subclinica (Hagiwara et al., 2003), per quantificare lattoferrina e immunoglobulina G nel latte bovino, di bufala e di cammello e per valutare l'effetto del trattamento termico sulla loro stabilità (Elagamy, 2000), nonché per analizzare la variabilità delle proteine bioattive, come lattoferrina e immunoglobulina G, utilizzando un kit ELISA sviluppato specificamente per il latte di cammello (Mohamed et al., 2021).

Capitolo 5

CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DELLE PROTEINE

5.1 CRISTALLOGRAFIA A RAGGI X

La cristallografia a raggi X può essere utilizzata per ottenere informazioni strutturali per singole proteine, in particolare la configurazione tridimensionale, impiegando la diffrazione dei raggi X della forma cristallina della proteina (Flatt, 2019; Sawyer et al., 2002). Prima dell'esame radiografico, le molecole di caseina non globulari vengono lasciate a formare complessi cristallizzabili con altre sostanze (Holt & Sawyer, 1993). Ad esempio, uno studio che utilizza la cristallografia a raggi X sulla β -lattoglobulina ha rilevato le tre variazioni strutturali A, B e C (Bewley et al., 1997). La cristallografia a raggi X è stata utilizzata anche per studiare l'effetto del pH sulle differenze strutturali e sul comportamento cristallino delle proteine (Timasheff and Townend, 1964).

5.2 SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR)

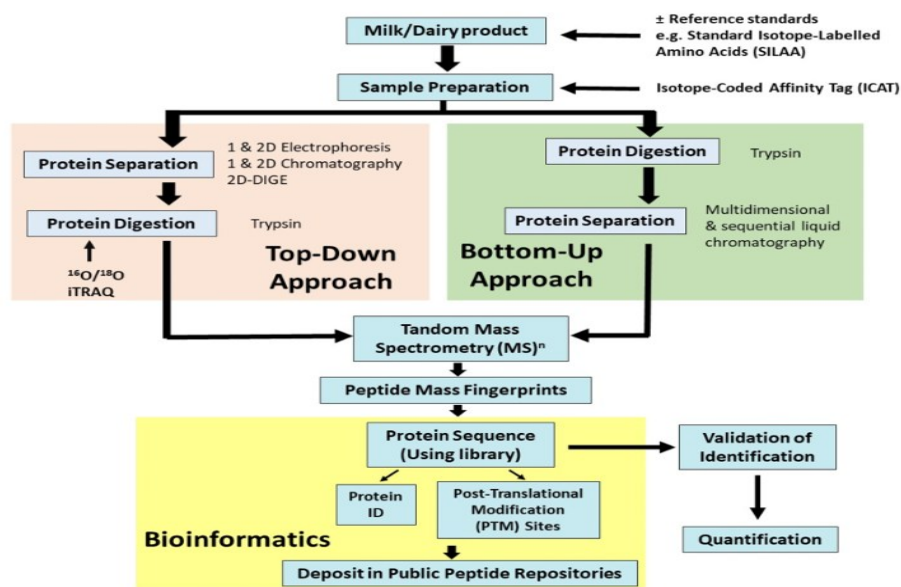
La NMR delle proteine viene utilizzata per studiare la struttura chimica e la dinamica delle proteine isolate, degli acidi nucleici e dei loro complessi (Wahlgren and Drakenberg, 1995). Ad esempio questa tecnica è stata utilizzata per la caratterizzazione dei cambiamenti strutturali nelle caseine (Humphrey and Jolley, 1982), micelle di caseina (Kakalis et al., 1990), proteine del siero del latte (Lubke et al., 2002), proteine e proteine fosforilate (Belloque & Ramos, 2002). Analisi NMR del latte in polvere al 10% in D₂O (noto anche come acqua pesante, è una forma di acqua in cui gli atomi di idrogeno sono sostituiti dal deuterio, l'isotopo pesante dell'idrogeno) ha consentito un bloccaggio più semplice e una risoluzione aumentata (Hu et al., 2004). La spettroscopia HNMR è stata utilizzata per confrontare il comportamento della β -lattoglobulina quando sottoposta ad alte pressioni idrostatiche e ha mostrato che il nucleo della variante A della β -lattoglobulina si è dispiegato più velocemente della variante B (Belloque and Ramons, 1999). Quando riscaldata durante la lavorazione del latte, la β -lattoglobulina interagisce idrofobicamente con specifici fosfolipidi, influenzandone così la struttura terziaria e la funzionalità. Queste informazioni si basano su dati ottenuti da studi di diffusione NMR e dicroismo circolare (Kasinos et al., 2013). L'HNMR combinato con reazioni di scambio di deuterio è stato utilizzato per monitorare lo sviluppo delle proteine del siero del latte indotto dal riscaldamento, dalla pressione e dalla formazione di schiuma (Tanaka and Kunugi, 1996; Belloque and Smith,

1998). Per ottenere ulteriori informazioni sui cambiamenti conformazionali che si verificano durante lo svolgimento delle proteine, la deuterazione viene combinata con 2D- ^1H NMR (Belloque and Smith, 1998). Tra le varie tecniche spettroscopiche NMR utilizzate per studiare le proteine del latte, la spettroscopia ^{31}P NMR è molto utile nello studio delle caseine e delle proteine del siero del latte (Belloque and Ramos, 1999). Il comportamento dell'aggregazione della caseina dopo l'elaborazione e in varie condizioni ambientali è stato analizzato utilizzando ^{31}P NMR, che ad esempio aumenta la mobilità del fosfato inorganico con la diminuzione del calcio (Belton et al., 1985), e la valutazione del grado di chelazione con mobilità del calcio e della caseina nella matrice (Ruliere et al., 2013).

5.3 SPETTROMETRIA DI MASSA E INDAGINI PROTEOMICHE

La proteomica è uno strumento efficace per la caratterizzazione del latte e dei prodotti caseari sulla base delle loro proteine e peptidi (Agrean et al., 2021). I flussi di lavoro proteomici comuni utilizzati nell'autenticazione alimentare sono illustrati in Figura 13.

Figura 13. Panoramica schematica dei metodi di analisi proteomica (Warakaulle et al., 2024).



Queste tecniche sono cruciali perché facilitano l'indagine di diverse proteine del latte contemporaneamente e consentono la loro rilevazione, caratterizzazione e identificazione (O'Donnell et al., 2004). Sono necessari progetti sperimentali complicati per gli studi

proteomici volti a caratterizzare le modifiche post-traduzionali delle proteine. In tali scenari, la spettrometria di massa (MS) consente l'elucidazione dei complessi proteici, dei loro componenti e delle connessioni funzionali, nonché le misurazioni globali delle proteine (Flatt, 2019). L'interpretazione degli spettri di massa generati è agevolata da strumenti bioinformatici e librerie di spettri di massa di proteine e peptidi. Le analisi proteomiche impiegano tecniche analitiche sofisticate per ottenere informazioni multidimensionali sulle strutture e/o funzioni di proteine e peptidi. È possibile utilizzare la combinazione di una o due tecniche di separazione (elettroforesi, HPLC, scambio ionico o esclusione dimensionale, cromatografia di affinità e/o immunoprecipitazione) con spettrometria di massa tandem (MS/MS), spettrometria di massa MALDI-TOF e/o sequenziamento di cDNA (Issaq et al., 2005; Tang et al., 2008; Liu et al., 2010; Mitulovic', 2015). La catalogazione dell'espressione proteica, la descrizione delle interazioni proteiche e l'individuazione dei siti di modificazione proteica sono i tre principali utilizzi della MS nella proteomica (Han et al., 2008). Diversi studi hanno indagato le potenziali applicazioni della proteomica del latte in generale insieme alle modifiche che le proteine del latte subiscono durante l'allattamento, la lavorazione e la conservazione (O'Donnell et al., 2004; Cunsolo et al., 2011b; Abd El-Salam, 2014). L'espressione proteica, la struttura, le variazioni della sequenza genetica, il livello di fosforilazione e i cambiamenti post-traduzionali, così come i cambiamenti causati dall'ambiente, dalla lavorazione o dalla conservazione, possono essere tutti analizzati dall'analisi proteomica del latte (Manso et al., 2005). Le proteine del latte umano sono state analizzate utilizzando la cromatografia a scambio anionico e la spettrometria di massa (Mange et al., 2008). Le proteine a bassa abbondanza nella frazione del siero del latte umano (arricchita da perle ProteoMiner) sono state identificate durante un periodo di allattamento di 12 mesi utilizzando la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) (Liao et al., 2011). Gli approcci di spettrometria di massa tandem (MS/MS) sono stati applicati alle k-caseine del latte bovino per confermare le modifiche post-traduzionali, come la fosforilazione, la glicosilazione (Holland et al., 2004, 2005). La proteomica comparativa è stata impiegata sia per individuare eventuali adulterazioni del latte, sia per valutare l'allergenicità del latte di pecora, cammello, bufalo, cavallo e asina (D'auria et al., 2005; Hinz et al., 2012). I dati provenienti da studi precedenti sono stati integrati per compilare un elenco esaustivo di 573 proteine bovine annotate non ridondanti, la maggior parte delle quali è stata classificata in base ai relativi percorsi biologici e al coinvolgimento nella risposta del sistema immunitario (D'Alessandro et al., 2011). La proteomica è stata utilizzata per studiare le caseine α e β bovine come fosfoproteine modello

(Zhou et al., 2006; Wu et al., 2007). I siti di lattosilazione (è una modificazione non enzimatica delle proteine in cui il lattosio reagisce con i gruppi amminici liberi, in particolare quelli della lisina, dando origine a prodotti di glicazione) della β -lattoglobulina sono stati identificati mediante analisi cromatografica in fase inversa accoppiata a ionizzazione elettrospray (ESI) in cromatografia liquida (Leonil et al., 1997). Studi di lattosilazione sulla β -lattoglobulina utilizzando zuccheri riducenti hanno mostrato che la lisina 100 è l'amminoacido più impegnato seguito dalla lisina 47 (Fogliano et al., 1998). Tuttavia, allo stato secco, i gruppi amminici attivi nelle proteine sono legati dal lattosio invece che dalla lisina 101. Inizialmente, si è scoperto che il lattosio si lega alle lisine 47 e 91 della β -lattoglobulina (Morgan et al., 1998). Nei latt sottoposti a riscaldamento (ad esempio il latte evaporato) sono state identificate le lisine 47 e 60, mentre le lisine 60, 75, 77, 83 e 135 risultavano più frequentemente associate al lattosio nel campione di latte trattato con riscaldamento moderato. Da questo studio è emerso chiaramente che i campioni di latte con differenti trattamenti termici presentano siti di legame del lattosio sulla lisina tra di loro diversi (Meltretter et al., 2014).

5.3.1 APPROCCI TOP-DOWN

Nell'approccio top-down, gli ioni proteici intatti vengono frazionati, separati e analizzati tramite ESI-MS per la loro identificazione e quantificazione, portando a una maggiore analisi della sequenza amminoacidica (McLafferty et al., 2007). Il rilevamento delle modifiche esistenti può essere facilmente ottenuto tramite proteomica top-down, simultaneamente in uno spettro. L'analisi top-down delle proteine intatte preserva le strutture labili di una proteina che vengono distrutte nell'analisi bottom-up e, in quanto tale, è un metodo migliore per esaminare la modificazione proteica (Siuti and Kelleher, 2007). La proteomica top-down ha messo ulteriormente in evidenza variazioni nelle principali isoforme e proteoforme del latte tra diverse razze bovine. In particolare, l' α -lattoalbumina, tutte le forme fosforilate dell' α -S2-caseina A, la β -caseina A2 e la κ -caseina B-1P sono presenti in quantità maggiori nel latte Jersey rispetto a quello Holstein-Friesian (Vincent et al., 2016; Vincent et al., 2018). La conservabilità del latte è stata analizzata mediante un approccio top-down per individuare i processi proteolitici responsabili della gelificazione da invecchiamento del latte UHT. È emerso che il trattamento UHT genera proteoforme lattosilate e che, durante il periodo di conservazione, l'abbondanza delle proteine native intatte diminuiva progressivamente, mentre aumentavano i loro prodotti di degradazione (Raynes et al., 2018). Tuttavia, l'analisi

proteomica top-down è ancora in fase di sviluppo, poiché deve far fronte a numerose sfide tecniche, tra cui la solubilità delle proteine, l'elevata complessità del proteoma, l'ampia gamma del proteoma, l'analisi dei dati e l'associazione delle diverse proteoforme alla loro funzione biologica (Melby et al., 2021).

5.3.2 APPROCCI BOTTOM-UP

Negli approcci bottom-up o shotgun, le miscele proteiche o le proteine purificate vengono sottoposte a digestione enzimatica per generare peptidi, che vengono poi separati mediante cromatografia o elettroforesi e analizzati tramite spettrometria di massa per identificare i peptidi idrolitici risultanti. Di norma, solo un numero limitato di peptidi separati può essere identificato mediante proteomica shotgun, con conseguente copertura solo parziale delle sequenze proteiche (Steen and mann, 2004). Le tecniche di ionizzazione elettrospray (ESI) e di desorbimento laser assistito da matrice (MALDI) sono state utilizzate in parallelo per identificare con sicurezza 39 proteine del latte bovino (Mollé et al., 2009). MALDI è stato utilizzato per l'identificazione di peptidi di dimensioni più ridotte e caratterizzati da maggiore basicità, mentre ESI è risultato preferibile per l'analisi di peptidi più grandi e più idrofobici. Di conseguenza, la copertura del proteoma ottenuta mediante spettrometri di massa dotati di differenti modalità di ionizzazione e rilevazione può essere sfruttata in modo complementare. Le differenze qualitative nei proteomi delle diverse razze bovine sono state investigate tramite un approccio shotgun, che ha permesso di identificare 186 proteine del latte, comprendendo non solo le proteine principali ma anche numerose proteine minori (Vincent et al., 2015). Il siero del latte bovino è stato analizzato utilizzando la proteomica shotgun, con conseguente identificazione di 192 proteine (Hettinga et al., 2011).

5.3.3 MONITORAGGIO DI REAZIONI MULTIPLE (MRM)

Le proteine nei prodotti lattiero-caseari sono state quantificate utilizzando la tecnica MRM (Lutter et al., 2011). Alcune applicazioni comprendono lo studio dei frammenti delle proteine del siero del latte lattosilate presenti nelle polveri di latte (Le et al., 2013), modifiche post-traduzionali della β -lattoglobulina e idrolisi dell'asparagina nei caseinati del latte e dei prodotti caseari (Meltretter et al., 2013, 2014), così come lo studio della glicosilazione utilizzando micelle di caseina e sodio (Moeckel et al., 2016).

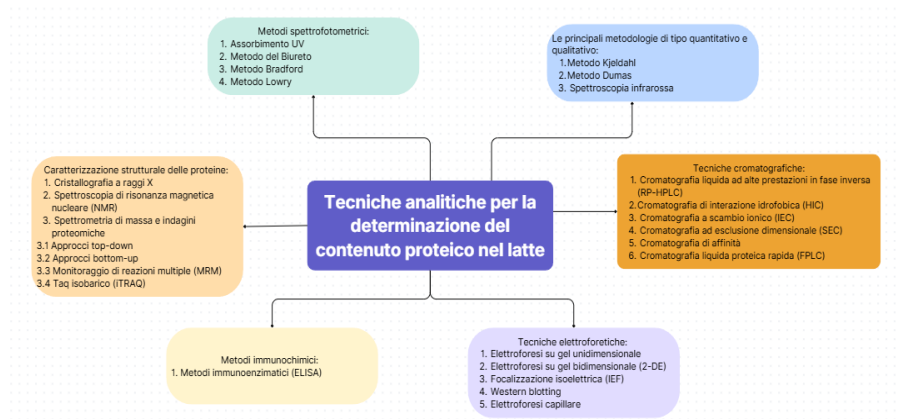
5.3.4 TAG ISOBARICO PER QUANTIFICAZIONE RELATIVA E ASSOLUTA (iTRAQ)

L'identificazione e la quantificazione delle proteine del siero del latte di bovini, bufali, capre, cammelli e yak mediante la tecnica iTRAQ rappresentano un metodo affidabile. Le proteine del siero sono state sottoposte a digestione con tripsina per 16–18 ore a 37 °C e le concentrazioni peptidiche ottenute sono state misurate ad una densità ottica di 280 nm. Successivamente, le miscele di peptidi sono state etichettate con i reagenti iTRAQ seguendo le istruzioni del produttore, e i peptidi così marcati sono stati separati tramite cromatografia a scambio cationico forte utilizzando una colonna in polisolfetile. Successivamente, i peptidi sono stati identificati mediante RP-HPLC utilizzando una colonna Zorbax 300SB-C18. Infine, i peptidi sono stati valutati utilizzando la spettrometria di massa Q-Exactive, con un intervallo di massa di 300-1800 m/z (Yang et al., 2013).

CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi mi ha permesso di esaminare e confrontare diverse tecniche impiegate per l'analisi delle proteine del latte e dei prodotti caseari, spaziando dalla titolazione ai metodi spettroscopici, cromatografici, elettroforetici ed elettrochimici, fino alle tecniche avanzate di spettrometria di massa. La scelta dell'approccio analitico più adeguato dipende dagli obiettivi specifici dell'analisi. I metodi analitici tradizionali continuano a essere utilizzati per determinare il contenuto proteico totale e per l'identificazione, la caratterizzazione e la quantificazione delle diverse proteine presenti nel latte e nei suoi derivati. Le tecniche cromatografiche (HPLC, HIC, IEC, SEC e cromatografia di affinità) e i metodi di elettroforesi capillare consentono la separazione e la purificazione delle proteine. Le tecniche di elettroforesi su gel sono comunemente impiegate per la separazione, la visualizzazione e l'identificazione delle proteine. La focalizzazione isoelettrica sfrutta il fatto che le proteine possiedono cariche differenti lungo un gradiente di pH, permettendo così la loro separazione in base ai punti isoelettrici. Le tecniche di Western blotting prevedono il trasferimento delle singole proteine dal gel di separazione a una membrana di nitrocellulosa per successive analisi. La scelta di questo materiale non è casuale: la nitrocellulosa offre infatti un'elevata capacità di legame per le proteine, una ridotta interferenza di fondo e un'ottima compatibilità con i sistemi di rivelazione, senza necessità di pre-attivazione. Queste caratteristiche la rendono particolarmente adatta quando è necessario ottenere segnali puliti, lineari e facilmente interpretabili. Le membrane in PVDF, pur essendo più resistenti e dotate di una capacità di legame ancora maggiore, richiedono un passaggio preliminare di attivazione con metanolo, tendono a trattenere più anticorpi non specifici e possono generare una maggiore interferenza di fondo, risultando meno indicate in analisi in cui la riduzione del rumore di fondo e la riproducibilità del segnale sono prioritarie. Sono inoltre disponibili metodi IR e tecniche immunoanalitiche, come ELISA e RID, per la determinazione rapida di proteine selezionate. XRF e NMR possono essere utilizzate per identificare le strutture tridimensionali delle proteine. Le analisi proteomiche bottom-up e top-down, che prevedono l'impiego della cromatografia accoppiata ad analisi MS/MS o MALDI-TOF, trovano applicazione nello studio di miscele proteiche complesse. In conclusione, la scelta del metodo più appropriato dipende strettamente dal tipo di informazione che l'analista intende ottenere.

Figura 14. Tecniche analitiche per la determinazione del contenuto proteico nel latte.



BIBLIOGRAFIA

- Abd El-Salam, M.H., 2014. Application of proteomics to the areas of milk production, processing and quality control: a review. *Int. J. Dairy Technol.* 67, 153–166. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12116>.
- Addis, M.F., Pisanu, S., Ghisaura, S., Pagnozzi, D., Marogna, G., Tanca, A., Biosa, G., Cacciotto, C., Alberti, A., Pittau, M., Roggio, T., Uzzau, S., 2011. Proteomics and pathway analyses of the milk fat globule in sheep naturally infected by *Mycoplasma agalactiae* provide indications of the in vivo response of the mammary epithelium to bacterial infection. *Infect. Immun.* 79, 3833–3845. <https://doi.org/10.1128/IAI.00040-11>.
- Aernouts, B., Polshin, E., Lammertyn, J., Saeys, W., 2011. Visible and near-infrared spectroscopic analysis of raw milk for cow health monitoring: reflectance or transmittance? *J. Dairy Sci.* 94, 5315–5329. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4354>.
- Agregan, R., Echegaray, N., Lopez-Pedrouso, M., Kharabsheh, R., Franco, D., Lorenzo, J. M., 2021. Proteomic advances in milk and dairy products: a review. *Molecules* 26, 3832. <https://doi.org/10.3390/molecules26133832>.
- Albani, J.R., 2014a. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 2: Fluorescence lifetimes origin of tryptophan in proteins. *J. Fluoresc.* 24, 105–117. <https://doi.org/10.1007/s10895-013-1274-y>.
- Albani, J.R., 2014b. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes part 1. Fluorescence lifetimes origin of tryptophan free in solution. *J. Fluoresc.* 24, 93–104. <https://doi.org/10.1007/s10895-013-1277-8>.
- Ali, I., Aboul-Enein, H.Y., Singh, P., Singh, R., Sharma, B., 2010. Separation of biological proteins by liquid chromatography. *Saudi Pharm. J.* 18, 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2010.02.001>.

- AlKhalidy, S.J., Dosh, K.S., 2023. Isolation and purification of as-CN from sheep milk and measuring the effectiveness of its enzymatic hydrolysis in inhibiting ACE1. *Chem. Methodol.* 7, 156–167. <https://doi.org/10.22034/chemm.2023.366342.1618>.
- Alonso-Fauste, I., Andr es, M., Iturralde, M., Lampreave, F., Gallart, J., ´Alava, M.A., 2012. Proteomic characterization by 2-DE in bovine serum and whey from healthy and mastitis affected farm animals. *J. Proteom.* 75, 3015–3030. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.11.035>.
- Anguita, G., Martin, R., Garcia, T., Morales, P., Haza, A.I., Gonzalez, I., Sanz, B., Hernandez, P.E., 1996. Immunostick ELISA for detection of cow's milk in ewe's milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine β -casein. *J. Food Prot.* 59, 436–437. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.4.436>.
- Anusha, S., Sirisha, P., 2018. A overview on affinity chromatography: a review. *Indo american journal of pharmaceutical research* 8, 1462–1472. <https://zenodo.org/records/2530650>.
- Appuhamy, J.A.D.R.N., Bell, A.L., Nayananjalie, W.A.D., Escobar, J., Hanigan, M.D., 2011. Essential amino acids regulate both initiation and elongation of mRNA translation independent of insulin in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices. *J. Nutr.* 141, 1209–1215. <https://doi.org/10.3945/jn.110.136143>.
- Basch, J.J., Douglas Jr, F.W., Procino, L.G., Holsinger, V.H., Farrell Jr, H.M., 1985. Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey protein concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland- Ashworth procedure. *J. Dairy Sci.* 68, 23–31. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80792-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80792-X).
- Belloque, J., Smith, G.M., 1998. ^1H -nuclear magnetic resonance studies on the conformational changes related to the foaming properties of β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 81, 2580–2587. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75815-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75815-1).
- Belloque, J., Ramos, M., 1999. Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 313–320. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00012-1).
- Belloque, Josefina, Ramos, M., 2002. Determination of the casein content in bovine milk by ^31P NMR. *J. Dairy Res.* 69, 411–418. <https://doi.org/10.1017/S0022029902005630>.

- Belton, P.S., Lyster, R.L.J., Richards, C.P., 1985. The ^{31}P nuclear magnetic resonance spectrum of cows' milk. *J. Dairy Res.* 52, 47–54. <https://doi.org/10.1017/s0022029900023888>.
- Bewley, M.C., Baker, E.N., Qin, B.Y., Jameson, G.B., Sawyer, L., 1997. Bovine beta-lactoglobulin and its variants: a three-dimensional structural perspective. In *Milk Protein Polymorphism Conference* (Vol. II, pp. 100–109). IDF Seminar Milk Protein Polymorphism: Brussels, Belgium. [〈https://pascalfrancis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=2431662〉](https://pascalfrancis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=2431662).
- Bogomolov, A., Melenteva, A., 2013. Scatter-based quantitative spectroscopic analysis of milk fat and total protein in the region 400–1100nm in the presence of fat globule size variability. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 126, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.02.006>.
- Bonfatti, V., Grigoletto, L., Cecchinato, A., Gallo, L., Carnier, P., 2008. Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *J. Chromatogr. A* 1195, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.075>.
- Bonfatti, V., Giantin, M., Rostellato, R., Dacasto, M., Carnier, P., 2013. Separation and quantification of water buffalo milk protein fractions and genetic variants by RP- HPLC: short communication. *Food Chem.* 136, 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.002>.
- Bramanti, E., Sortino, C., Onor, M., Beni, F., Raspi, G., 2003. Separation and determination of denatured α s1-, α s2-, β - and κ -caseins by hydrophobic interaction chromatography in cows', ewes' and goats' milk, milk mixtures and cheeses. *J. Chromatogr. A* 994, 59–74. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00483-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00483-7).
- Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. A. (2017). Laboratory Diagnosis of Virus Diseases. *Fenner and White's Medical Virology*, 135–154. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375156-0.00010-2>.
- Chang, S.K.C., Zhang, Y., 2017. Protein analysis. In *Food analysis*, 315–331. [〈https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45776-5_18〉](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45776-5_18).

- Chevalier, F., Hirtz, C., Sommerer, N., Kelly, A.L., 2009. Use of reducing/nonreducing two-dimensional electrophoresis for the study of disulfide-mediated interactions between proteins in raw and heated bovine milk. *J. Agric. Food Chem.* 57 (13), 5948–5955. <https://doi.org/10.1021/jf900518n>.
- Chiacchierini, E., D’Ascenzo, F., Restuccia, D., Vinci, G., 2003. Milk soluble whey proteins: fast and precise determination with Dumas method. *Anal. Lett.* 36, 2473–2484. <https://doi.org/10.1081/AL-120024336>.
- Church, F.C., Porter, D.H., Catignani, G., L., Swaisgood, H., E., 1985. An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Anal. Biochem.* 146 (2), 343–348. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90549-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90549-4).
- Claverol, S., Burlet-Schiltz, O., Gairin, J.E., Monsarrat, B., 2003. Characterization of protein variants and post-translational modifications: ESI-MS analyses of intact proteins eluted from polyacrylamide gels. *Mol. Cell. Proteom.* 2, 483–493. <https://doi.org/10.1074/mcp>.
- Cle’ment, P., Agboola, O., Bencinic, R, S., 2006. A study of polymorphism in milk proteins from local and imported dairy sheep in Australia by capillary electrophoresis. *LWT - Food Sci. Technol.* 39, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.11.004>.
- Creed, D., 1984. The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids–i. Tryptophan and its simple derivatives. *Photochem. Photobiol.* 39, 537–562. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1984.tb03890.x>.
- Cummins, P.M., Dowling, O., O’Connor, B.F., 2011. Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligopeptidase. *Protein Chromatogr.* 215–228. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_12.
- Cummins, P.M., Rochfort, K.D., O’Connor, B.F., 2017. Ion-exchange chromatography: basic principles and application. *Protein Chromatogr.* 209–223. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_11.
- Cunsolo, V., Cairone, E., Fontanini, D., Criscione, A., Muccilli, V., Saletti, R., Foti, S., 2009. Sequence determination of α s1-casein isoforms from donkey by mass spectrometric methods. *J. Mass Spectrom.* 44, 1742–1753. <https://doi.org/10.1002/jms.1683>.

- Cunsolo, V., Muccilli, V., Saletti, R., Foti, S., 2011b. Applications of mass spectrometry techniques in the investigation of milk proteome. *Eur. J. Mass Spectrom.* 17, 305–320. <https://doi.org/10.1255/ejms.1147>.
- D'Alessandro, A., Zolla, L., Scaloni, A., 2011. The bovine milk proteome: cherishing, nourishing and fostering molecular complexity: an interactomics and functional overview. *Mol. Biosyst.* 7, 579–597. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/mb/c0mb00027b> .
- Dall'olio, S., Davoli, R., Russo, V., 1990. Affinity Chromatography of Ovine Casein. *Dairy Sci.* 73, 1707–1711. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78847-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78847-9).
- Daniloski, D., McCarthy, N.A., O'Callaghan, T.F., Vasiljevic, T., 2022. Authentication of β -casein milk phenotypes using FTIR spectroscopy. *Int. Dairy J.* 129 <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105350>.
- D'auria, E., Agostoni, C., Giovannini, M., Riva, E., Zetterström, R., Fortin, Greppi, G.F., Bonizzi, L., Roncada, P., 2005. Proteomic evaluation of milk from different mammalian species as a substitute for breast milk (<https://doi.org/>). *Acta Paediatr.* 94, 1708–1713. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2005.tb01842.x>.
- Davies, D.T., Law, A.J.R., 1987. Quantitative fractionation of casein mixtures by fast protein liquid chromatography. *J. Dairy Res.* 54, 369–376. <https://doi.org/10.1017/S0022029900025541>.
- Downs, M.L., Taylor, S.L., 2010. Effects of thermal processing on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of milk residues in a model food matrix. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10085–10091. <https://doi.org/10.1021/jf101718f>.
- Dizaji, N.F., 2016. Minor whey protein purification using ion-exchange column chromatography. PhD Thesis, University of Western Ontario, Canada. <https://ir.lib.uwo.ca/etd/3685> .
- Dufour, E., 2011. Recent advances in the analysis of dairy product quality using methods based on the interactions of light with matter. *Int. J. Dairy Technol.* 64, 153–165. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00665.x>.
- Dupont, D., Croguennec, T., Pochet, S., 2018. Milk proteins - analytical methods. In *Reference Module in Food Science*. Inc. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22616-4>.

- Elagamy, E.I., 2000. Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cows' and buffalo milk proteins. *Food Chem.* 68, 227–232. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00199-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00199-5).
- Etzion, Y., Linker, R., Cogan, U., Shmulevich, I., 2004. Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 87, 2779–2788. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73405-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73405-0).
- Fausnaugh, J.L., Regnier, F.E., 1986. Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A* 359, 131–146. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(86\)80068-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(86)80068-1).
- Friedman, D.B., Hoving, S., Westermeier, R., 2009. Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. B.R. Richard & M.P. Deutscher (Ed.), *Methods in enzymology, guide to protein purification* (2nd ed) (pp. 515–540). Elsevier Inc Publishers. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63030-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63030-5) .
- Felfoul, I., Jardin, J., Gaucheron, F., Attia, H., Ayadi, M.A., 2017. Proteomic profiling of camel and cow milk proteins under heat treatment. *Food Chem.* 216, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.007>.
- Fessas, D., Iametti, S., Schiraldi, A., Francesco Bonomi, F., 2001. Thermal unfolding of monomeric and dimeric β -lactoglobulins. *Eur. J. Biochem.* 268, 5439–5448. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02484.x>.
- Flatt, P.M., 2019. *Biochemistry – Defining Life at the Molecular Level*. Western Oregon University, Monmouth, OR (CC BY-NC SA). <https://wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch450-and-ch451-biochemistry-defining-life-at-the-molecular-level/> .
- Fogliano, V., Monti, S.M., Visconti, A., Randazzo, G., Facchiano, A.M., Colonna, G., Ritieni, A., 1998. Identification of a β -lactoglobulin lactosylation site. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1388, 295–304. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00177-0).
- Fong, B.Y., Norris, C.S., Palmano, K.P., 2008. Fractionation of bovine whey proteins and characterisation by proteomic techniques. *Int. Dairy J.* 18, 23–46. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.06.005>.

- Galvani, M., Hamdan, M., Righetti, P.G., 2001. Two-dimensional gel electrophoresis/matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of commercial bovine milk. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 258–264. <https://doi.org/10.1002/rcm.220>.
- Geng, X.L., Tolkach, A., Otte, J., Ipsen, R., 2015. Pilot-scale purification of from enriched whey protein concentrate by anion-exchange chromatography and ultrafiltration. *Dairy Sci. Technol.* 95, 353–368. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0215-8>.
- Georgiou, C.D., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., Papapostolou, I., 2008. Mechanism of coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Anal Bioanal Chem.* 391, 391–403. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1996-x>.
- Ghisaidoobe, A.B.T., Chung, S.J., 2014. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on forster resonance energy transfer techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22518–22538. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F., Addeo, F., 2000. Production of angiotensin-i-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3898–3904. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3898-3904.2000>.
- Goodall, S., Grandison, A.S., Jauregi, P.J., Price, J., 2008. Selective separation of the major whey proteins using ion exchange membranes. *J. Dairy Sci.* 91, 1–10. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0539>.
- Gomaa, M.S.H., Abdel-Aziz, M.E., Hafez, E.H., Salama, S.I., 2014. New method for determination of protein content of goat's milk and compared with different methods. *J. Food Dairy Sci.* 5, 95–101. https://jfds.journals.ekb.eg/article_52745_587851febe11e7dd8554d83f5f94c832.pdf .
- Gonzalez-Llano, D., Polo, C., Ramos, M., 1990. Update on HPLC and FPLC analysis of nitrogen compounds in dairy products. *Lait* 70, 255–277. <https://hal.science/hal-00929206/document> .

- Gryczynski, I., Wiczek, W., Johnson, M.L., Lakowicz, J.R., 1988. Lifetime distributions and anisotropy decays of indole fluorescence in cyclohexane/ethanol mixtures by frequency-domain fluorometry. *Biophys. Chem.* 32, 173–185. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(88\)87005-4](https://doi.org/10.1016/0301-4622(88)87005-4).
- Gudgin, E., Lopez-Delgado, R., Ware, W.R., 1981. The tryptophan fluorescence lifetime puzzle: a study of decay times in aqueous solution as a function of pH and buffer composition. *Can. J. Chem.* 59, 1037–1044. <https://doi.org/10.1139/v81-154>.
- Hage, D.S., 1999. Affinity Chromatography: a review of clinical applications. *Clin. Chem.* 45, 593–615. <https://doi.org/10.1093/clinchem/45.5.593>.
- Hagiwara, S., Kawai, K., Anri, A., Nagahata, H., 2003. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 319–323. <https://doi.org/10.1292/jvms.65.319>.
- Hailu, Y., Seifu, E., Eshetu, M., Petersen, M.A., Lamestch, R., Rattary, F., Ipsen, R., 2018. Rheological and sensory properties and aroma compounds formed during ripening of soft brined cheese made from camel milk. *Int. Dairy J.* 81, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.01.007>.
- Han, X., Aslanian, A., Yates III, J.R., 2008. Mass spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 483–490. <https://doi.org/10.1042/BIO20200057>.
- Haza, A.I., Morales, P., Martín, R., García, T., Anguita, G., Sanz, B., Hernández, P.E., 1999. Detection and quantification of goat's cheese in ewe's cheese using a monoclonal antibody and two ELISA formats. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1043–1047. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990515\)79:73.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990515)79:73.0.CO;2-5).
- Heck, J.M.L., Olieman, C., Schennink, A., Valenberga, H.J.F.V., Viskerc, M.H.P.W., Meuldijk, R.C.R., Hooijdonk, A.C.M.V., 2008. Estimation of variation in concentration, phosphorylation and genetic polymorphism of milk proteins using capillary zone electrophoresis. *Int. Dairy J.* 18, 548–555. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.004>.
- Held, D., Hofe, T., 2017. Tips & Tricks GPC/SEC: Protein Analysis with Size-Exclusion Chromatography. *Column* 13, 18–23. <https://www.chromatographyonline.com/view/tips-tricks-gpcsec-protein-analysis-size-exclusion-chromatography-0> .

- Hettinga, K., Valenberg, H.V., Vries, D.S., Boeren, S., Hooijdonk, V.T., Arendonk, V.J., Vervoort, J., 2011. The host defense proteome of human and bovine milk. *PloS One* 6, e19433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019433>.
- Hinz, K., O'Connor, P.M., Huppertz, T., Ross, R.P., Kelly, A.L., 2012. Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk (<https://doi.org/>). *J. Dairy Res.* 79, 185–191. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000015>.
- Hogenboom, J.A., D'Incecco, P., Fuselli, F., Pellegrino, L., 2017. Ion-exchange chromatographic method for the determination of the free amino acid composition of cheese and other dairy products: an inter-laboratory validation study (<https://doi.org/>). *Food Anal. Methods* 10, 3137–3148. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0876-4>.
- Holland, J.W., Deeth, H.C., Alewood, P.F., 2004. Proteomic analysis of κ -casein micro-heterogeneity (<https://doi.org/>). *Proteomics* 4, 743–752. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300613>.
- Holland, J.W., Deeth, H.C., Alewood, P.F., 2005. Analysis of O-glycosylation site occupancy in bovine κ -casein glycoforms separated by two-dimensional gel electrophoresis (<https://doi.org/>). *Proteomics* 5, 990–1002. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401098>.
- Holland, J.W., Deeth, H.C., Alewood, P.F., 2006. Resolution and characterisation of multiple isoforms of bovine κ -casein by 2-DE following a reversible cysteine-tagging enrichment strategy (<https://doi.org/>). *Proteomics* 6, 3087–3095. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500780>.
- Hollar, C.M., Law, A.J.R., Dalgleish, D.G., Brown, R.J., 1991. Separation of major casein fractions using cation-exchange fast protein liquid chromatography. *J. Dairy Sci.* 74, 2403–2409. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78414-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78414-2).
- Holt, C., Sawyer, L., 1993. Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the α S1-, β - and κ -caseins. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 89, 2683–2692. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1993/ft/ft9938902683>.
- Holyrod, S., 2013. The use of near infra red spectroscopy on milk and milk products. *J. Infra Red. Spectrosc.* 21, 311–322. <https://doi.org/10.1255/jnirs.1055>.

- Hsieh, Y.-H., P., 2010. Immunoassays. In: Nielsen, S.S. (Ed.), Food analysis, 4th ed., Springer Science Business Media, New York, NY, USA, pp. 301–316. <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-1478-1_17> .
- Hu, F., Furihata, K., Ito-Ishida, M., Kaminogawa, S., Tanokura, M., 2004. Nondestructive observation of bovine milk by NMR spectroscopy: analysis of existing states of compounds and detection of new compounds. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4969–4974. <https://doi.org/10.1021/jf049616o>.
- Hueso, D., Fontecha, J., Gomez-Cortes, P., 2022. Comparative study of the most commonly used methods for total protein determination in milk of different species and their ultrafiltration products. *Front. Nutr.* 9, 925565 <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.925565>.
- Humphrey, R.S., Jolley, K.W., 1982. ³¹P NMR studies of bovine β -casein (<https://doi.org/>). *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 708. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(82\)90439-3](https://doi.org/10.1016/0167-4838(82)90439-3).
- Hurley, I.P., Elyse Ireland, H., Coleman, R.C., Williams, J.H.H., 2004. Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39, 873–878. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00861.x>.
- Indyk, H.E., McGrail, I.J., Watene, G.A., Filonzi, E.L., 2007. Optical biosensor analysis of the heat denaturation of bovine lactoferrin. *Food Chemistry* 101 (2), 838–844. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.025>.
- Issaq, H.J., Chan, K.C., Janini, G.M., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., 2005. Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis (<https://doi.org/>). *J. Chromatogr. B* 817, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.07.042>.
- James, C.S., 1995. Analytical chemistry of foods. Springer publishers, p. 90. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4615-2165-5>.
- Jensen, H.B., Poulsen, N.A., Andersen, K.K., Hammershøj, M., Poulsen, H.D., Larsen, L.B., 2012. Distinct composition of bovine milk from jersey and holstein-friesian cows with good, poor, or noncoagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms. *J. Dairy Sci.* 95, 6905–6917. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5675>.
- Kakalis, L.T., Kumosinski, T.F., Farrell Jr, H.M., 1990. A multinuclear, high-resolution NMR study of bovine casein micelles and submicelles. *Biophys. Chem.* 38, 87–98. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(90\)80043-7](https://doi.org/10.1016/0301-4622(90)80043-7).

- Kalař c, P., Samkov'a, E., 2010. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: a review. *Czech J. Anim. Sci.* 55, 521–537. <https://doi.org/10.17221/2485-cjas>.
- Kamizake, N.K.K., Gonçalves, M.M., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2003. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the kjeldahl method and spectrophotometric methods. *J. Food Compos. Anal.* 16, 507–516. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(03\)00004-8](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(03)00004-8).
- Kang, D., Y., Moon, J., M., Lee, S., 2011. Comparison of size-exclusion chromatography and flow field-flow fractionation for separation of whey proteins (<https://doi.org/>). *Bull. Korean Chem. Soc.* 32, 1315–1320. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2011.32.4.1315>.
- Kasinos, M., Sabatino, P., Vanloo, B., Gevaert, K., Martins, J.C., Van der Meeren, P., 2013. Effect of phospholipid molecular structure on its interaction with whey proteins in aqueous solution. *Food Hydrocoll.* 32, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.007>.
- Kelly, S.M., Jess, T.J., Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Proteins Proteom.* 1751, 119–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>.
- Kim, H.H.Y., Jimenez-Flores, R., 1994. Comparison of milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 77, 2177–2190. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77160-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77160-5).
- Kim, J.I., Choi, D.Y., Row, H.K., 2003. Separation of Whey Proteins by Anion-Exchange Membranes. *Korean J. Chem. Eng.* 20 (3), 538–541. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02705562> .
- Kjeldahl, J., 1883. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen k'örpern. *Fresenius, Z. F. Anal. Chem.* 22, 366–382. <https://doi.org/10.1007/BF01338151>.
- Kuaye, A.Y., 1994. An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. *Food Chem.* 49 (2), 207–211. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90160-0](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90160-0).

- Kumar, A., Rout, P.K., Mohanty, B.P., 2013. Identification of milk protein polymorphism in indian goats by 2D gel electrophoresis. *J. Proteom. Bioinforma.* 6, 1–4. <<https://www.longdom.org/open-access/identification-of-milk-protein-polymorphism-in-indian-goats-by-2d-gel-electrophoresis-32957.html>> .
- Ladenson, J.H., Purdy, W.C., 1973. Coulometric titration of proteins with silver (I). *Anal. Chim. Acta* 64, 259–271. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)82444-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)82444-2).
- La Verde, V., Dominici, P., & Astegno, A. (2017). Determination of hydrodynamic radius of proteins by size exclusion chromatography. *Bio-protocol*, 7(8), e2230-e2230.
- Lakowicz, J.R., 2013. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy, pp. 27-6. In: Lakowicz, J.R. (Ed.), *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed.,. Springer science & business media. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_2.
- Li, A., Han, X., Zheng, J., Zhai, J., Cui, N., Du, P., Xu, J., 2023. Effects of freezing raw yak milk on the fermentation performance and storage quality of yogurt. *Foods* 12, 3223. <https://doi.org/10.3390/foods12173223>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6).
- Le, T.T., Deeth, H.C., Bhandari, B., Alewood, P.F., Holland, J.W., 2013. Quantification of lactosylation of whey proteins in stored milk powder using multiple reaction monitoring. *Food Chem.* 141, 1203–1210. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.073>.
- Lee, J.E., Lin, T., Kang, J.W., Shin, H.Y., Lee, J.B., Jin, D.L., 2018. 2-DE and MALDI-TOF MS-based identification of bovine whey proteins in milk collected soon after parturition. *Korean. J. Agric. Sci.* 45, 635–643. <<https://www.kci.go.kr/kciportal/ci/sereArticleSearch/ciSereArtiView.kci?sereArticleSearchBean.artiId=ART002426831>> .
- Leonil, J., Moll' e, D., Fauquant, J., Maubois, J.L., Pearce, R.J., Bouhallab, S., 1997. Characterization by ionization mass spectrometry of lactosyl β -lactoglobulin conjugates formed during heat treatment of milk and whey and identification of one lactose-binding site. *J. Dairy Sci.* 80, 2270–2281. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76176-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76176-9).

- Levieux, D., Venien, A., 1994. Rapid, sensitive two-site ELISA for detection of cows' milk in goats' or ewes' milk using monoclonal antibodies. *J. Dairy Res.* 61, 91–99. <https://doi.org/10.1017/S0022029900028089>.
- Li, J., Ding, X., Chen, Y., Song, B., Zhao, S., 2011. Determination of bovine lactoferrin in infant formula by capillary electrophoresis with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A* 1244, 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.004>.
- Liao, Y., Alvarado, R., Phinney, B., Lönnerdal, B., 2011. Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period. *J. Proteome Res.* 10, 1746–1754. <https://doi.org/10.1021/pr101028k> .
- Liu, X., Wen, F., Yang, J., Chen, L., Wei, Y., 2010. A review of current applications of mass spectrometry for neuroproteomics in epilepsy. *Mass Spectrom. Rev.* 29, 197–246. <https://doi.org/10.1002/mas.20243>.
- Lönnerdal, B., 2013. Bioactive proteins in breast milk. *J. Paediatr. Child Health* 49, 1–7. <https://doi.org/10.1111/jpc.12104>.
- Lübke, M., Guichard, E., Tromelin, A., Le Quer' e, J.L., 2002. Nuclear magnetic resonance spectroscopic study of β -lactoglobulin interactions with two flavor compounds, γ -decalactone and β -ionone. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7094–7099. <https://doi.org/10.1021/jf020513k>.
- Lutter, P., Parisod, V., Weymuth, H., 2011. Development and validation of a method for the quantification of milk proteins in food products based on liquid chromatography with mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* 94, 1043–1059. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21919337> .
- Madadlou, A., O'Sullivan, S., Sheehan, D., 2011. Fast protein liquid chromatography. *Protein Chromatogr.* 1485, 439–447. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_19.
- Maity, S., Das, D., Ambatipudi, K., 2020. Quantitative alterations in bovine milk proteome from healthy, subclinical and clinical mastitis during *S. aureus* infection. *J. Proteom.* 223, 103815 <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103815>.
- Manso, M.A., J., L'eonil, G., Jan, Gagnaire, V., 2005. Application of proteomics to the characterisation of milk and dairy products. *Int. Dairy J.* 15 (6–9), 845–855. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.07.021>.

- Mansor, M., Al-Obaidi, J.R., Jaafar, N.N., Ismail, I.H., Zakaria, A.F., Abidin, M.A.Z., Selamat, J., Radu, S., Jambari, N.N., 2020. Optimization of protein extraction method for 2de proteomics of goat's milk. *Molecules* 25, 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules25112625>.
- Mange, A., Bellet, V., Tuailon, E., Van de Perre, P., Solassol, J., 2008. Comprehensive proteomic analysis of the human milk proteome: contribution of protein fractionation. *J. Chromatogr. B* 876, 252–256 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.11.003>.
- Mao, X., Zhang, Guo-Fang, Li, C., Zhao, Yu-Cai, Wang, Ting-Ting, Duan, Chun-Ying, Wang, Jing-Ying, Liu, Li-Bo, 2017. One-step method for the isolation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin from cow's milk while preserving their antigenicity. *Int. J. Food Prop.* 20 (4), 792–800. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1181649>.
- Mbye, M., Mohamed, H., Raziq, A., Kamal-Eldin, A., 2021. The effects of camel chymosin and Withania coagulans extract on camel and bovine milk cheeses. *Sci. Rep.* 11, 13573 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92797-6>.
- McLafferty, F.W., Breuker, K., Jin, M., Han, X., Infusini, G., Jiang, H., Kong, X., Begley, T. P., 2007. Top-down MS, a powerful complement to the high capabilities of proteolysis proteomics. *FEBS J.* 274, 6256–6268. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06147.x>.
- Melby, J.A., Roberts, D.S., Larson, E.J., Brown, K.A., Bayne, E.F., Jin, S., Ge, Y., 2021. Novel strategies to address the challenges in top-down proteomics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 32, 1278–1294. <https://doi.org/10.1021/jasms.1c00099>.
- Meltretter, J., Wu"st, J., Pischetsrieder, M., 2013. Comprehensive analysis of nonenzymatic post-translational β -lactoglobulin modifications in processed milk by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6971–6981. <https://doi.org/10.1021/jf401549j>.
- Meltretter, J., Wu"st, J., Pischetsrieder, M., 2014. Modified peptides as indicators for thermal and nonthermal reactions in processed milk. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10903–10915. <https://doi.org/10.1021/jf503664y>.
- Miranda, G., Mah' e, M., Leroux, C., Martin, P., 2004. Proteomic tools to characterize the protein fraction of Equidae milk. *Proteomics* 4, 2496–2509. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300765>.

- Mitulović, G., Mechtler, K., 2006. HPLC techniques for proteomics analysis—a short overview of latest developments. *Brief. Funct. Genom.* 5, 249–260. <https://doi.org/10.1093/bfgp/ell034>.
- Mitulović, G., 2015. New HPLC techniques for proteomics analysis: a short overview of latest developments. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 38, 390–403. <https://doi.org/10.1080/10826076.2014.941266>.
- Moeckel, U., Duerasch, A., Weiz, A., Ruck, M., Henle, T., 2016. Glycation reactions of casein micelles. *J. Agric. Food Chem.* 64, 2953–2961. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00472>.
- Mohamed, H., Johansson, M., Lundh, A., Kamal-Eldin, A., 2020. Short communication: Casein and α -lactalbumin content of camel milk (*Camelus dromedarius*) determined by capillary electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 103, 11094–11099. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19122>.
- Mohamed, H., Ranasinghe, M., Amir, N., Nagy, P., Gariballa, S., Adem, A., Kamal-Eldin, A., 2021. A study on variability of bioactive proteins in camel (*Camelus dromedarius*) milk: insulin, insulin-like growth factors, lactoferrin, immunoglobulin G, peptidoglycan recognition protein-1, lysozyme and lactoperoxidase. *Int. J. Dairy Technol.* 75, 289–297. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12836>.
- Mohamed, H., Nagy, P., Agbaba, J., Kamal-Eldin, A., 2021. Use of near and mid-infrared spectroscopy for analysis of protein, fat, lactose and total solids in raw cow and camel milk. *Food Chem.* 334, 127436 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127436>.
- Molina, E., Fernandez-Fournier, A., De-Frutos, M., Ramos, M., 1995. Western blotting of native and denatured bovine β -lactoglobulin to detect addition of bovine milk in cheese. *J. Dairy Sci.* 79, 191–197. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76350-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76350-6).
- Mollé, D., Jardin, J., Piot, M., Pasco, M., L'éonil, J., Gagnaire, V., 2009. Comparison of electrospray and matrix-assisted laser desorption ionization on the same hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer: application to bidimensional liquid chromatography of proteins from bovine milk fraction. *J. Chromatogr. A* 1216 (12), 2424–2432. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.017>.
- Morgan, F., Bouhallab, S., Mollé, D., Henry, G., Maubois, J.-L., L'éonil, J., 1998. Lactolation of β -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry. *Int. Dairy J.* 8, 95–98. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00025-9).

- Myagkonosov, D.S., Abramov, D.V., Ovchinnikova, E.G., Krayushkina, V.N., 2020. Express method for assessing proteolysis in cheese and aromatic additives with cheese flavor. *Food Syst.* 3 (4), 4–10. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2020-3-4-4-10>.
- Ng-Kwai-Hang, K.F., Kroeker, E.M., 1984. Rapid separation and quantification of major caseins and whey proteins of bovine milk by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 67, 3052–3056. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81671-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81671-9).
- O'donnell, R., Holland, J.W., Deeth, H.C., Alewood, P., 2004. Milk proteomics. *Int. Dairy J.* 14, 1013–1023. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.004>.
- Owusu-Apenten, R.K., 2002. *Food Protein. Anal. - Quant. Eff. Process.* Maecel Dekker, Inc.
 <https://search.library.uq.edu.au/primo-explore/fulldisplay?vid=61UQ&search_scope=61UQ_All&tab=61uq_all&docid=61UQ_ALMA21103652710003131&lang=en_US&context=L> .
- Paludetti, L.F., Jordan, K., Kelly, A.L., Gleeson, D., 2018. Evaluating the effect of storage conditions on milk microbiological quality and composition. *Ir. J. Agric. Food Res.* 57, 52–62.
 <<https://www.jstor.org/stable/26555011>> .
- Picariello, G., De Cicco, M., Nocerino, R., Paparo, L., Mamone, G., Addeo, F., Berni Canani, R., 2019. Excretion of dietary cow's milk derived peptides into breast milk. *Front. Nutr.* 6, 25. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00025>.
- Pinho, C., Martins, Z.E., Petisca, C., Figurska, A.M., Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., 2012. Size exclusion and reversed-phase high-performance liquid chromatography/ uv for routine control of thermal processing of cows' and donkey milk major proteins. *J. Dairy Res.* 79, 224–231. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000064>.
- Piston, D.W., Kremers, G.-J., 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* 32, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.08.003>.
- Plank, J., Andres, P.R., Krause, I., Winter, C., 2008. Gram scale separation of casein proteins from whole casein on a source 30q anion-exchange resin column utilizing fast protein liquid chromatography (fplc). *Protein Expr. Purif.* 60, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.04.003>.
- Ribadeau-Dumas, B., Grappin, R., 1989. Milk protein analysis. *Le. Lait.* 69, 357–416. <https://doi.org/10.1051/lait:1989527>.

- Riechel, P., Weiss, T., Ulber, R., Buchholz, H., Scheper, T., 1998. Analysis of bovine lactoferrin in whey using capillary electrophoresis (ce) and micellar electrokinetic chromatography (mekc). *Adv. Exp. Med. Biol.* 443, 33–39. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9068-9_4.
- Ramírez-Palomino, P., Fernández-Romero, J.M., Gómez-Hens, A., 2014. Rapid chromatographic determination of caseins in milk with photometric and fluorimetric detection using a hydrophobic monolithic column. *Food Chem.* 142, 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.046>.
- Raynes, J.K., Vincent, D., Zawadzki, J.L., Savin, K., Mertens, D., Logan, A., Williams, R.P. W., 2018. Investigation of age gelation in UHT milk. *Beverages* 4, 95. <https://www.mdpi.com/2306-5710/4/4/95> .
- Reichardt, W., Eckert, B., 1991. To determine the protein content of milk, cheese and meat using the biuret reaction. *Mol. Nutr. Food Res.* 35 (7), 731–738. <https://doi.org/10.1002/food.19910350716>.
- Ren, Q.R., Zhang, H., Guo, H.Y., Jiang, L., Tian, M., Ren, F.Z., 2014. Detection of cow milk adulteration in yak milk by ELISA. *J. Dairy Sci.* 97, 6000–6006. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8127>.
- Roncada, P., Gaviraghi, A., Liberatori, S., Canas, B., Bini, L., Greppi, G.F., 2002. Identification of caseins in goat milk. *Proteomics* 2, 723–726. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200206\)2:63.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200206)2:63.0.CO;2-I).
- Rulliere, C., Rondeau-Mouro, C., Raouche, S., Dufrechou, M., Marchesseau, S., 2013. Studies of polyphosphate composition and their interaction with dairy matrices by ion chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. *Int. Dairy J.* 28, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.09.005>.
- Runthala, A., Mbye, M., Ayyash, M., Xu, Y., Kamal-Eldin, A., 2023. Caseins: versatility of their micellar organization in relation to the functional and nutritional properties of milk: a review. *Molecules* 28 (5). <https://doi.org/10.3390/molecules28052023>.
- Rustandi, R.R., 2013. Hydrophobic interaction chromatography to analyze glycoproteins. In: *Glycosylation Engineering of Biopharmaceuticals. Methods in Molecular Biology*, vol. 988. Humana Press,, Totowa, NJ, pp. 211–219. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-327-5_13 .

- Ryskaliyeva, A., Henry, C., Miranda, G., Faye, B., Konuspayeva, G., Martin, P., 2018. Combining different proteomic approaches to resolve complexity of the milk protein fraction of dromedary, bactrian camels and hybrids, from different regions of Kazakhstan. *PLoS ONE* 13, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197026>.
- Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., Morimoto, S., 2018. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J. Nat. Med.* 72, 32–42. [〈https://link.springer.com/article/10.1007/s11418-017-1144-z〉](https://link.springer.com/article/10.1007/s11418-017-1144-z) .
- Saliha, S.A.Z., Dalila, A., Chahra, S., Saliha, B.H., Abderrahmane, M., 2013. Separation and characterization of major milk proteins from algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *Emir. J. Food Agric.* 25, 283–290. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i4.15496>.
- Sargent, M.G., 1987. Fiftyfold amplification of the lowry protein assay. *Anal. Biochem.* 163, 476–481. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90251-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90251-X).
- Santos, M.J., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., 2012. Fractionation of the major whey proteins and isolation of β -lactoglobulin variants by anion exchange chromatography. *Sep. Purif. Technol.* 90, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.02.030>.
- Sawyer, L., Barlow, P.N., Boland, M.J., Creamer, L.K., Denton, H., Edwards, P.J.B., Holt, C., Jameson, G.B., Kontopidis, G., Norris, G.E., Uhrinova, S., Wu, Su-Ying, 2002. Milk protein structure—what can it tell the dairy industry? *Int. Dairy J.* 12, 299–310. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00025-0).
- Seibert, B., Erhardt, G., Senft, B., 1985. Procedure for simultaneous phenotyping of genetic variants in cow's milk by using isoelectric focusing. *Anim. blood Groups Biochem. Genet.* 16, 183–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1985.tb01469.x>.
- Sharma, G., Rout, D.P., Singh, D.G., 2017. Characterization of goat milk protein and comparison of milk proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. *Int. J. Sci. Eng. Appl. Sci.* 4, 13–18. [〈https://ijseas.com/volume3/v3i5/ijseas20170502.pdf〉](https://ijseas.com/volume3/v3i5/ijseas20170502.pdf) .
- Silvestre, M.P.C., 1994. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.* 60, 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00347-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00347-0).

- Simonne, A.H., Simonne, E.H., Eitenmiller, R.R., Mills, H.A., Cresman III, C.P., 1999. Could the dumas method replace the kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods? *J. Sci. Food Agric.* 73, 39–45. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199701\)73:13.O.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199701)73:13.O.CO;2-4).
- Siuti, N., Kelleher, N.L., 2007. Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nat. Methods* 4, 817–821. <https://www.nature.com/articles/nmeth1097> .
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem* 150, 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Soyeurt, H., Grelet, C., McParland, S., Calmels, M.V., Coffey, M., Tedde, A., Delhez, P., Dehareng, F., Gengler, N., 2020. A comparison of 4 different machine learning algorithms to predict lactoferrin content in bovine milk from mid-infrared spectra. *J. Dairy Sci.* 103, 11585–11596. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18870>.
- Spoljarić, J., Mikulec, N., Plavljanić, D., Radeljević, B., Havranek, J., Antunac, N., 2013. Proving the adulteration of ewe and goat cheeses with cow milk using the reference method of isoelectric focusing of γ -casein. *Mljekarstvo* 63, 115–121. <https://hrcak.srce.hr/106581> .
- Starovojtova, K., Tereshchuk, L., Tarlyun, M., Dolgolyuk, I., 2020. Development of an integrated technology for milk processing with the production of functional dairy products and biotech products for food and pharmaceutical industry. *Int. Sci. Conf. Vol. V*, 390–395. Prospects for the Development and Modernization of the Russian Agro-Industrial Sector (TFTS 2019). <https://doi.org/10.2991/assehr.k.200113.208> .
- Stanley, J., 2002. Precipitation: single radial immunodiffusion: laboratory technique 12- 1: radial immunodiffusion test". *Essent. Immunol. Serol.* 172–174 (Albany, New York). <https://archive.org/details/essentialsofimmu0000stan/mode/1up> .
- Steen, H., Mann, M., 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 699–711. <https://www.nature.com/articles/nrm1468> .

- Strickland, M., Johnson, M.E., Broadbent, J.R., 2001. Qualitative and quantitative analysis of proteins and peptides in milk products by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 22, 1510–1517. [〈https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11386663〉](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11386663) .
- Sturaro, A., De Marchi, M., Masi, A., Cassandro, M., 2016. Quantification of whey proteins by reversed phase-HPLC and effectiveness of mid-infrared spectroscopy for their rapid prediction in sweet whey. *J. Dairy Sci.* 99, 68–76. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9077>.
- Swaminathan, R., Krishnamoorthy, G., Periasamy, N., 1994. Similarity of fluorescence lifetime distributions for single tryptophan proteins in the random coil state. *Biophys. J.* 67 (5), 2013–2023. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80685-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80685-X).
- Tanaka, N., Kunugi, S., 1996. Effect of pressure on the deuterium exchange reaction of α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *Int. J. Biol. Macromol.* 18, 33–39. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(95\)01053-X](https://doi.org/10.1016/0141-8130(95)01053-X).
- Tang, J., Gao, M., Deng, C., Zhang, X., 2008. Recent development of multi-dimensional chromatography strategies in proteome research. *J. Chromatogr. B* 866, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.01.029>.
- Teale, F.W., Weber, G., 1957. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochem. J.* 65, 476–482. <https://doi.org/10.1042/bj0650476>.
- Timasheff, S.N., Townend, R., 1964. Structure of the β -lactoglobulin tetramer. *Nature* 203, 517–519. [〈https://www.nature.com/articles/203517a0〉](https://www.nature.com/articles/203517a0) .
- Thompson, A., Boland, M., Singh, H., 2009. Milk proteins: from expression to food. Academic Press,, Amsterdam, Boston, USA. [〈https://ubblab.weebly.com/uploads/4/7/4/6/47469791/milk_proteins_from_expression_to_food.pdf〉](https://ubblab.weebly.com/uploads/4/7/4/6/47469791/milk_proteins_from_expression_to_food.pdf) .
- Trieu-Cuot, P., Gripon, J.C., 1981. Electro focusing and two-dimensional electrophoresis of bovine caseins. *J. Dairy Res.* 48, 303–310. <https://doi.org/10.1017/S0022029900021725>.
- Trimboli, F., Costanzo, N., Lopreiato, V., Ceniti, C., Morittu, V.M., Spina, A., Britti, D., 2019. Detection of buffalo milk adulteration with cow milk by capillary electrophoresis analysis. *J. Dairy Sci.* 102, 5962–5970. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16194>.
- Vincent, D., Ezernieks, V., Elkins, A., Nguyen, N., Moate, P.J., Cocks, Benjamin G., Richford, B.G., S, 2015. Milk bottom-up proteomics: method optimization. *Front. Genet.* 6, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00360>.

- Vincent, D., Elkins, A., Condina, M.R., Ezernieks, V., Rochfort, S., 2016. Quantitation and identification of intact major milk proteins for high-throughput lc-esi-q-tof ms analyses. *Plos One* 11, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163471>.
- Vincent, D., Mertens, D., Rochfort, S., 2018. Optimization of milk protein top-down sequencing using in-source collision-induced dissociation in the maxis quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Molecules* 23, 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules23112777>.
- Voswinkel, L., Kulozik, U., 2011. Fractionation of whey proteins by means of membrane adsorption chromatography. *Procedia Food Sci.* 1, 900–907. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.136>.
- Warakaulle, S., Mohamed, H., Ranasinghe, M., Shah, I., Yanyang, X., Chen, G., Ayyash, M. M., Vincent, D., & Kamal-Eldin, A. (2024). Advancement of milk protein analysis: From determination of total proteins to their identification and quantification by proteomic approaches. *Journal of Food Composition and Analysis*, 126, Article 105854. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105854>
- Wahlgren, N.M., Drakenberg, T., 1995. Milk. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* 31, 275–312. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(08\)60152-0](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(08)60152-0).
- Weinbrenner, W.F., Etzel, M.R., 1994. Competitive adsorption of α -lactalbumin and bovine serum albumin to a sulfopropyl ion-exchange membrane. *J. Chromatogr. A* 662, 414–419. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80530-X](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80530-X).
- Wiles, P.G., Gray, I.K., 1998. Routin analysis of proteins by kjeldahl and dumas methods: Review and interlaboratory study using dairy products. *Journal of AOAC International* 81 (3), 620–632. <https://doi.org/10.1093/jaoac/81.3.620>.
- Wu, D., He, Y., Feng, S., Sun, D.-W., 2008. Study on infrared spectroscopy technique for last measurement of protein content in milk powder based on LS-SVM. *J. Food Eng.* 84, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.031>.
- Wu, H.-Y., Tseng, V.S.-M., Liao, P.-C., 2007. Mining phosphopeptide signals in liquid chromatography-mass spectrometry data for protein phosphorylation analysis. *J. Proteome Res.* 6, 1812–1821. <https://doi.org/10.1021/pr060631d>.
- Yakubu, H.G., Kovacs, Z., Toth, T., Bazar, G., 2022. The recent advances of near-infrared spectroscopy in dairy production: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62, 810–831. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1829540>.

- Yamada, M., Murakami, K., Wallingford, J.C., Yuki, Y., 2002. Identification of low-abundance proteins of bovine colostrum and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by micro-sequencing and mass spectrometry. *Electrophoresis* 23, 1153–1160. [〈https://pubmed.ncbi.nlm.gov/11981865/〉](https://pubmed.ncbi.nlm.gov/11981865/) .
- Yasmin, I., Iqbal, R., Liaqat, A., Khan, W.A., Nadeem, M., Iqbal, A., Chughtai, M.F.J., Rehman, S.J.U., Tehseen, S., Mehmood, T., Ahsan, S., Tanweer, S., Naz, S., Khaliq, A., 2020. Characterization and comparative evaluation of milk protein variants from pakistani dairy breeds. *Food Sci. Anim. Resour.* 40, 689–698. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e44>.
- Ye, X., Yoshida, S., Ng, T.B., 2000. Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 1143–1150. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(00\)00063-7](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(00)00063-7).
- Yelubaeva, M.Y., Buralkhiev, B.A., Serikbayeva, A.D., Narmuratova, M.H., Kenenbay, S. Y., 2017. Electrophoretic identification of casein in various types of milk. *J. Biol. Sci.* 17, 348–352. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2017.348.352>.
- Yoshida, S., 1990. Isolation of β -lactoglobulin and α -lactalbumin by gel filtration using sephacryl S-200 and purification by diethylaminoethyl ion-exchange chromatography. *J. Dairy Sci.* 73, 2292–2298. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78910-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78910-2).
- Yüksel, Z., Erdem, Y.K., 2010. Detection of the milk proteins by RP-HPLC. *GIDA-J. Food* 35, 5–11. [〈https://www.academia.edu/10054621/DETECTION_OF_THE_MILK_PROTEINS_BY_RP-HPLC〉](https://www.academia.edu/10054621/DETECTION_OF_THE_MILK_PROTEINS_BY_RP-HPLC) .
- Zagorchev, L., Dimitrova, M., Odjakova, M., Teofanova, D., Hristov, P., 2013. Electrophoretic characterization of milk proteins from bulgarian rhodopean cattle. *Bulg. J. Agric. Sci.* 19, 197–200. [〈https://agrojournal.org/19/02-50s.pdf〉](https://agrojournal.org/19/02-50s.pdf) .
- Zappacosta, F., Di luccia, A., Ledda, L., Addeo, F., 1998. Identification of C-terminally truncated forms of β -lactoglobulin in whey from romagnola cows' milk by two dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. *J. Dairy Res.* 65, 243–252. <https://doi.org/10.1017/s0022029997002859>.

- Zhang, Y., Luo, J., Bi, J., Wang, J., Sun, L., Liu, Y., Zhang, G., Ma, G., Su, Z., 2010. Efficient separation of homologous α -lactalbumin from transgenic bovine milk using optimized hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* 1217, 3668–3673. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.060>.
- Zhao, P., Zare, R.N., Chen, H., 2019. Absolute quantitation of oxidizable peptides by coulometric mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 2398–2407. <https://doi.org/10.1007/s13361-019-02299-z>.
- Zhou, H., Xu, S., Ye, M., Feng, S., Pan, C., Jiang, X., Li, X., Han, G., Fu, Y., Zou, H., 2006. Zirconium phosphonate-modified porous silicon for highly specific capture of phosphopeptides and MALDI-TOF MS analysis. *J. Proteome Res.* 5, 2431–2437. <https://doi.org/10.1021/pr060162f>.

RINGRAZIAMENTI

Dopo questi anni di università sono finalmente giunta alla conclusione di questo percorso, e ora mi trovo davanti a quella che per me è la parte più impegnativa della tesi: i ringraziamenti. Non perché manchino persone a cui dire grazie, anzi. E' proprio il peso che ciascuna di loro ha avuto nella mia vita a rendere difficile trovare parole all'altezza.

In questi anni ho incontrato molte persone; alcune hanno condiviso con me solo un breve tratto di strada, altre mi hanno accompagnata più a lungo, altre ancora sono rimaste sempre al mio fianco. Alcune si sono allontanate, ma tutte, in modi diversi hanno contribuito a ciò che sono oggi. Il viaggio che mi ha portata fin qui non è stato lineare. Ho attraversato momenti di incertezza, sfide, dubbi, ma anche grandi soddisfazioni. E' stato un cammino di crescita che mi ha insegnato la perseveranza e la forza necessaria per andare avanti anche quando la strada sembrava troppo ripida. Questo percorso ha rappresentato una trasformazione profonda, non solo dal punto di vista accademico, ma anche professionale e personale. Ho imparato a credere in me stessa, ad assumermi le mie responsabilità e a spingermi oltre i miei limiti. Ogni esperienza, positiva o negativa, ha lasciato un segno e ha contribuito a plasmare la persona che sono diventata. Ed è con questa consapevolezza che ora desidero dedicare un pensiero speciale a chi ha camminato al mio fianco durante questo viaggio.

Il mio primo ringraziamento va ai miei genitori. A voi che, quando vi ho detto di desiderare la luna, non avete mai cercato di riportarmi a terra: mi avete presa per mano, mi avete stretta forte e con un amore che non conosce esitazioni mi avete insegnato a volare. A voi che mi avete sempre messa al primo posto, prima di qualsiasi altra cosa. Vi ringrazio per aver creduto in me anche quando ero più un groviglio di problemi che una persona compiuta. Vi ringrazio per avermi lasciata andare, per avermi permesso di allontanarmi da casa per inseguire i miei sogni, mentre il vostro desiderio più grande sarebbe stato avermi accanto. Grazie per i sacrifici immensi, silenziosi e quotidiani che avete affrontato affinché io potessi vivere la vita che desideravo. Grazie per ogni rinuncia fatta senza mai farmela pesare, per ogni notte in cui avete trasformato le vostre preoccupazioni in forza per sostenermi, per ogni volta in cui avete nascosto le vostre paure per non alimentare le mie. Siete stati i miei più grandi sostenitori instancabili, le colonne portanti della mia esistenza, il rifugio sicuro in ogni tempesta e la certezza che, ovunque andassi, avrei sempre avuto un posto in cui tornare. Avete creduto in me con una fiducia così grande da diventare la mia ancora quando vacillavo, la mia spinta quando esitavo, il mio respiro quando mi mancava il coraggio. Se avessi cento vite, vi sceglierei come genitori in ognuna di esse, senza esitazione, senza

cambiamenti, senza condizioni. Perchè nulla, in nessuna vita possibile, potrebbe essere più prezioso di voi.

A mia madre Annamaria, la mia luce nelle tempeste, la donna che ha saputo guardare dentro i miei mostri senza mai spaventarsi. A te che mi hai insegnato a rialzarmi dopo ogni caduta, a credere nel coraggio anche quando tremavo, a non smettere mai di credere nelle fiabe, soprattutto in quelle in cui il lupo non vince mai. Alla Donna più forte che io conosca, il faro che illumina il mio cammino quando tutto sembra buio. Senza di te non ce l'avrei mai fatta. Grazie per avermi insegnato cosa significa essere libera, indipendente e paziente. Grazie per avermi mostrato che il sole arriva sempre, anche quando sembra impossibile. Tu che rendi semplice ciò che per gli altri sarebbe impossibile. Tu che hai creduto in me anche quando io non ci riuscivo più. Tu che hai raccolto le mie paure, i miei silenzi, le mie delusioni e li hai trasformati in forza, in calma e in respiro. Grazie per essere il mio punto fermo, la mia casa, il mio abbraccio sicuro. Per avermi stretta nei momenti più bui e avermi restituito quella serenità che temevo di aver perduto. Sei il dono più prezioso che la vita potesse farmi, qualcosa che sento il bisogno di dover proteggere per sempre. E grazie anche per tutto ciò che non si vede: per aver vegliato su di me senza dirlo, per le preoccupazioni che hai nascosto dietro un sorriso, per le parole che non hai detto per non ferirmi, per quelle che hai sussurrato quando avevo bisogno di crederci ancora. Grazie per avermi amata con quella delicatezza che non chiede nulla in cambio, ma che riesce a cambiare tutto. Spero di averti resa orgogliosa in questo giorno, perchè questa laurea è anche la tua; tu ci hai creduto prima ancora che lo facessi io. A te, devo tutto.

A mio padre Antonio, il mio supereroe fin da quando ero bambina. L'uomo dal cuore d'oro, umile, buono puro come nessuno, bello come il sole. Sei una sorgente inesauribile di pazienza, una presenza che parla anche quando tace. A volte basta un tuo sguardo per farmi sentire al sicuro, amata e protetta. Grazie per l'amore che mi hai donato in ogni gesto, anche in quelli più piccoli che per me sono diventati enormi. A te papà, devo la mia forza, perchè la vita ti ha messo alla prova mille volte, ma tu non hai mai ceduto. Hai sempre trovato il coraggio di rialzarti, di ricominciare, di sorridere ancora con quella luce che solo tu hai. A te che mi somigli più di quanto avrei mai immaginato. A te che con una battuta sai alleggerire il mondo, anche quando il tuo pesa, che riesci a far sorridere gli altri anche nei giorni in cui dentro piove. Ricordo quando da piccola ti aspettavo sul divano e il rumore delle chiavi nella porta era il mio rifugio: il segnale che tutto andava bene, che tu eri lì, che niente poteva farmi paura. Ora che sono cresciuta, riconosco in me i tuoi tratti, la tua ironia, la tua sensibilità e la tua forza. E sì, papà per fortuna o sfortuna ho ereditato il tuo carattere è un dono che

custodisco come un tesoro. Resterai sempre l'uomo più importante della mia vita. La mia radice, il mio porto sicuro, la mia casa. La mia versione maschile, quella più pura, quella che porto nel cuore ogni giorno.

A mio fratello Lemuel, il dono più grande che i miei genitori potessero farmi. Scrivere i ringraziamenti per te è più difficile che scrivere un'intera tesi, perchè nessuna parola è abbastanza grande da contenere quello che provo. Non esiste ancora un linguaggio capace di descrivere questo amore: puro, forte e indissolubile. Tu sei la mia amicizia più vera, il mio complice, la mia unica certezza. Sei il respiro di sollievo quando penso di tornare a casa e il peso sul cuore quando mi ricordo di quanto sono lontana. Lasciare la casa in cui siamo cresciuti insieme e imparare a vivere senza averti accanto è stato uno degli ostacoli più difficili di questo percorso. I fratellini possono essere rumorosi, invadenti, sempre in cerca di attenzioni, ma quanto si è svuotata la mia vita quando sono passata dalle serate con te a non sentirti più bussare alla mia porta solo per darmi fastidio cinque minuti. E quanto mi sono sentita in colpa, per mesi, sapendo di non essere lì ogni giorno, di non poterti vedere crescere e diventare il ragazzo meraviglioso che sei diventato. Questa università mi ha dato tanto, mi ha fatto crescere, mi ha cambiata. Ma mi ha tolto la possibilità di farlo al tuo fianco e per questo ti chiedo scusa. Per tutte le volte in cui hai bussato alla mia porta e hai trovato una stanza vuota, io ero a 500km di distanza a studiare, sperando di vederti entrare da un momento all'altro per mostrarmi un Tiktok o raccontarmi una sciocchezza qualsiasi. Ridere con te è la parte più bella che mi manca di Sasso. E non importa quanto spesso torni giù perchè non è mai abbastanza, lo so anch'io. Grazie per non avermelo mai fatto pesare. Grazie perchè se oggi mi laureo e devo dire grazie a qualcuno, quel qualcuno sei tu. Per tutte le volte in cui mi hai ascoltata ripetere, in crisi, mentre preparavo gli esami. Tanto che ormai conosci il Ciclo di Krebs e le fermentazioni meglio di molti miei colleghi. Tu sei il mio punto di riferimento e io spero di essere il tuo, per sempre. Ti amo con tutto il mio cuore.

A Malang, il mio porto sicuro. Il mio compagno di avventure. Il mio braccio destro e a volte anche il sinistro. Sei arrivato nella mia vita in un momento fragile e nonostante tutto hai scelto di restare. La corona d'alloro che oggi poggia sulla mia testa appartiene anche a te, che mi hai cullata ogni notte prima di un esame, che hai trasformato la stanchezza in forza e il caos in respiro. Nei tuoi occhi ho trovato calma, nei tuoi gesti leggerezza, nel tuo amore la certezza di poter contare su qualcuno che crede in me senza esitazioni. Ti stimo per ciò che fai ogni giorno, per l'amore che sai donare senza mai chiedere nulla in cambio, per la tua luce disarmante che riesce a rischiarare ogni stanza in cui entri. A te, che più di tutti hai attraversato i miei momenti bui, restando sempre luce. A te, che con uno sguardo mi capivi,

che percepivi quando l'ansia mi stringeva il fiato e con la tua sola presenza riuscivi a farmi dimenticare tutto. A te, che mi hai aiutata a diventare la donna che sono oggi. Grazie per la tua pazienza infinita, per le notti passate a studiare con me senza mai lamentarti. Grazie per la tua dolcezza immensa, per capire ogni mio istante, per essere pronto a gioire di ogni mio successo come se fosse il tuo. Grazie per aver fatto il tifo per me sempre, anche quando io non riuscivo a farlo. Ogni traguardo che raggiungo è anche un po' tuo, perchè hai condiviso con me il bello e il difficile, perchè hai reso possibile ciò che sembrava lontano. Questa tesi porta con sé ogni tuo gesto d'amore, ogni tua parola di incoraggiamento, ogni sorriso che ha alleggerito le mie giornate più pesanti. Ti amo profondamente e ti sarò per sempre grata per tutto ciò che hai fatto per me, anche in modi che forse non immagini. Sei il regalo più grande che la vita mi abbia fatto. Ti auguro di brillare sempre come fai adesso. Ti auguro di non perdere mai la curiosità che ti guida, né la bontà che ti distingue. Ti auguro di inseguire i tuoi sogni con la stessa determinazione e lo stesso cuore con cui hai sostenuto i miei. Grazie per l'impegno, il sacrificio, la dedizione e l'amore che mi hai donato. Grazie per aver trasformato la fatica in speranza e la paura in coraggio. Grazie di tutto, dal profondo del mio cuore Mala. Ti amo mio parabatai.

Alla mia famiglia, a voi che mi avete accompagnata in ogni fase della vita, vedendomi crescere e diventare la persona che sono oggi. Non so ancora come riusciate a sopportare i miei sbalzi d'umore, ma forse è proprio questo il segno più grande del vostro affetto. Vi ringrazio perchè ci siete sempre stati, senza mai far pesare nulla e senza bisogno di grandi gesti, nel vostro modo semplice e discreto avete fatto tantissimo. Vi sono profondamente grata per il sostegno, la pazienza e la presenza costante. Vi voglio un bene immenso.

Alla mia amica pazza Tania, fin dal primo momento in cui ti ho incontrata ho capito che saresti diventata parte della mia vita. All'inizio non conoscendoti, mi sembravi un po' squilibrata. Ma la verità è che non me ne importava nulla. Con il tempo ho imparato a conoscerti davvero e ho capito che persona meravigliosa sei. Sei fantastica: genuina, dolce, altruista, gentile, permalosa, impaziente, amorevole, pura e potrei continuare con altri mille aggettivi positivi. Ti ringrazio per essere sempre stata al mio fianco in questi tre lunghissimi anni, soprattutto negli ultimi mesi terrificanti. Ti ringrazio perchè hai portato luce nella mia vita, perchè non mi fai mai mancare il sorriso e ti impegni a farmi ridere anche quando sono arrabbiatissima. Grazie per gli infiniti appunti che mi hai passato, tutti così ordinati e chiari. Ti ricordi quelli di Zootecnica? Ancora oggi mi vengono i brividi da quanto erano perfetti. Grazie per essere sempre stata sincera, anche quando avresti potuto inventarti una bugia per svignartela. Grazie per essere entrata nella mia vita e per aver cercato ogni volta di farmi

ragionare prima di agire d'istinto. Anche se ammettilo, con tutte le stupidagini che ho combinato ti ho fatto morire dalle risate pure a te. Sei un'amica speciale, anzi, più che amica sei la sorella che non ho mai avuto, perchè dopo tutto quello che abbiamo vissuto posso davvero considerarti tale. E già che ci siamo digli a Vittorio che ringrazio anche lui per tutte le risate che mi ha fatto fare. In fondo, ma molto infondo sei una bella persona Vittò. Vi voglio bene inseparabili.

A Greta, Irene, Giorgia, Elisa, Caterina D. e Alessandro, vi ringrazio perchè siete state delle ottime amiche e tu Ale un ottimo amico. Grazie per tutti i bei momenti vissuti insieme in questi tre anni, per l'allegria e la tranquillità che avete portato nella mia vita. Grazie perchè mi avete fatto sentire a casa, anche quando ero lontano dalla mia. Non vi sarò mai abbastanza grata per tutto il bene che mi avete dato.

Alle mie bimbe di Sasso, vi ho viste crescere letteralmente e diventare delle donne straordinarie. Su di voi potrei scrivere un poema, ma mi limito a dirvi grazie. Grazie perchè nonostante la distanza, non mi fate mai sentire esclusa. Ogni volta che torno mi fate sentire accolta, voluta bene, parte di qualcosa che non si è mai spezzato. So che potrò contare su di voi sempre. A volte non mi capite del tutto, ma vi assicuro che spesso non mi capisco neanche io, eppure mi state vicino lo stesso, con quella vostra presenza che sa essere casa. Siete state e sarete per sempre uno dei mie pilastri. Vi adoro follemente.

Al mio Relatore, nonchè Professore di Laboratorio di Biochimica degli Alimenti, Massimiliano Gasparrini, rivolgo i miei ringraziamenti più profondi. Ho scelto il suo corso facoltativo perchè mi ispirava e si è rivelata la scelta più luminosa e significativa del mio percorso universitario. Un Professore brillante, un Relatore competente, ma soprattutto una guida capace di unire professionalità, precisione e una pazienza rara. Ha seguito ogni fase del mio lavoro con un'attenzione minuziosa, curando ogni dettaglio e accompagnandomi con sicurezza e dedizione. Sono immensamente grata, non è semplice incontrare Professori che sappiano essere così presenti, così attenti, così straordinariamente umani. Mi considero davvero fortunata ad aver avuto al mio fianco un Professore e Relatore come lui, uno di quelli che lasciano un segno autentico. Grazie infinite.

A Dio, a colui che più di tutti conosce il mio cuore. Ti ringrazio mio Dio, per essere stato la mia presenza costante, la mia guida silenziosa e il mio sostegno in ogni passo di questo cammino. Grazie per avermi accompagnata nei momenti di incertezza, per avermi donato quella pace interiore che solo tu sai dare e per non avermi mai lasciata sola, nemmeno quando tutto sembrava più difficile. Sono certa che dietro ogni mio successo, piccolo o grande che sia, c'è la tua mano discreta, il tuo "zampino" d'amore che orienta, protegge e

illumina. Per questo ti sarò grata per tutta la vita. Ogni traguardo raggiunto, ogni paura superata, ogni sorriso ritrovato porta un po' del tuo respiro, della tua forza e della tua infinita misericordia. Continua a camminare con me Signore, perchè senza di te nulla avrebbe davvero senso. E io con tutto il mio cuore, continuerò a ringraziarti per ciò che sei e per ciò che fai nascere dentro di me ogni giorno.

Infine il ringraziamento più sincero, profondo e autentico lo rivolgo a me stessa. A quella versione di me fragile, impaurita e insicura che per tanto tempo ho giudicato o cercato di nascondere. Oggi scelgo di abbracciarti. Sono state proprio quelle ombre, insieme alla mia testardaggine a portarmi fin qui. Donatella, ce l'hai fatta davvero. Mi ringrazio per non aver mollato quando la stanchezza sembrava travolgermi e le notti non finivano mai. Per aver trovato la forza di ricominciare dopo ogni vicolo cieco e per aver continuato a credere nelle mie capacità anche quando i dubbi prendevano il sopravvento e la Coca Cola era diventata acqua sporca. Mi sono grata per non aver ceduto quando sarebbe stato più semplice spegnere tutto e far finta di niente; per essermi alzata anche con zero voglia e due occhiaie che avevano vita propria, per aver pianto nei momenti di crollo e poi essermi asciugata le lacrime per tornare a studiare. Mi scuso per tutte le volte in cui mi sono sminuita e per le parole dure che mi sono detta in silenzio. Prometto di non farlo più, voglio diventare la mia prima alleata, non il mio peggior nemico. Questa laurea triennale non è solo un titolo accademico, è la prova concreta che quando dico "ce la posso fare", lo faccio per davvero. E' la testimonianza della mia capacità di trasformare i sacrifici in traguardi, anche quando faccio fatica a crederci fino in fondo. Oggi davanti a questo risultato, posso finalmente dire di essere orgogliosa di ciò che sono e di tutto ciò che ho costruito. So che la bambina che ero sarebbe fiera della donna che sono diventata: di come affronto le sfide, della costanza con cui ho portato a termine questo percorso, della mia determinazione, della mia pazienza e di quel coraggio che mi ha spinto a dire "ancora un capitolo" o "solo un altro paragrafo", scegliendo me stessa invece di rimandare. Faccio pace con le cicatrici lasciate lungo la strada e porto con me la forza di questi anni per costruire, giorno dopo giorno, il mio futuro professionale, orgogliosa di non essermi mai fermata. Auguro a me stessa di non smettere mai di provarci e di volermi bene, anche quando la vita proverà a farmi dubitare del contrario.

Me lo merito. Me lo sono guadagnata. E sono immensamente fiera di essere me.