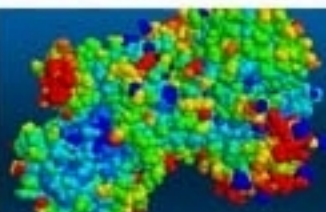


ENEA

Ente per le Nuove tecnologie,
l'Energia e l'Ambiente



Società Sieroproteine Srl
Comune di Belcastro (CZ)

Tecnologie di processo per il recupero e la valorizzazione delle componenti del siero di latte



A cura di Massimo Pizzichini

Tecnologie di processo per il recupero e la valorizzazione delle componenti
del siero di latte

A cura di *Massimo Pizzichini*

Con la collaborazione di:

Mauro Spadoni, Claudio Russo, Pietro Tasselli (ENEA)

e di:

*Fabio Aiello, Enrico Ballista, Domenico Caponio, Eugenia Magarò,
Felice Monterossi, Isabella Pisani, Mariangela Frangella, Daniele Pizzichini,
Laura Martino, Orazio Amata* (Soc. Sieroproteine Srl)

ENEA
Ente per le Nuove tecnologie,
l'Energia e l'Ambiente
2006

ISBN: 88-8286-138-4

Al centro della copertina una fotografia di impianti pilota a membrana per il
frazionamento del siero di latte



Ente per le Nuove Tecnologie,
l'Energia e l'Ambiente



Società Sieroproteine SRL
Comune di Belcastro (CZ)

TECNOLOGIE DI PROCESSO PER IL RECUPERO E LA VALORIZZAZIONE DELLE COMPONENTI DEL SIERO DI LATTE

A CURA DI MASSIMO PIZZICHINI

Lo studio è stato eseguito nell'ambito della Misura 2.1.a - PIA INNOVAZIONE - del PON "Sviluppo imprenditoriale locale" dal Ministero per le Attività Produttive

Soggetto finanziato: *Soc. Sieroproteine Srl*

Titolo del programma:

"Trasformazione del latte, del siero e della scotta bovina e ovi-caprina in specialità farmaceutiche ad ampio spettro curativo"

Decreto MAP n. 127514 del 5 agosto 2003

Supporto scientifico: *ENEA*

Responsabile scientifico: *Massimo Pizzichini* (ENEA, Unità Tecnico-Scientifica Biotecnologie, protezione della salute e degli ecosistemi)

Referente scientifico del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca scientifica e tecnologica: *Alessandro Bozzini*

La collaborazione fra l'ENEA e la Soc. Sieroproteine è stata formalizzata con specifico contratto di ricerca: rif. Prot. ENEA/2005/5663/BIOTEC-STG

Dedica

Al ricordo del mio collega ed amico ing. Franco Iacovoni, che mi ha trasmesso la forte passione per la ricerca nel rispetto del rigore scientifico, e l'impegno sociale contro le ingiustizie nei confronti delle categorie più deboli

Presentazione

L'industria casearia italiana può veramente essere considerata un fiore all'occhiello del Paese per il novero e la qualità dei prodotti immessi nel mercato, sempre più conosciuti ed imitati in tutto il mondo.

Notoriamente impiega latte bovino, ovino, caprino e bufalino, prodotti un po' in tutto il Paese, ma con elevate concentrazioni in varie regioni, dove rappresenta un importante fattore di sviluppo e di occupazione nel settore primario e nell'industria di trasformazione.

Mentre i formaggi hanno avuto da sempre una priorità nella ricerca nazionale ed internazionale, il prodotto secondario principale, il siero, che ammonta complessivamente all'enorme quantità di oltre 7 milioni di tonnellate annue, è stato notevolmente trascurato dalla nostra ricerca quanto a caratterizzazione e possibilità di utilizzazione, limitandone, di fatto, l'uso alla alimentazione suina o addirittura cercando un suo smaltimento con i relativi costi di processo, spesso anche al di fuori del rispetto delle normative ambientali.

Il lavoro di Massimo Pizzichini e dei numerosi collaboratori coinvolti nei programmi di ricerca e sviluppo, scaturisce da un lungo impegno programmatico dell'ENEA proprio nel settore specifico, come dimostrano le pubblicazioni scientifiche riportate nella ricca bibliografia.

Le competenze dell'ENEA hanno trovato il giusto supporto organizzativo in una precisa collaborazione industriale, che dovrebbe consentirne il normale trasferimento tecnologico, proprio come richiede il "sistema paese".

Questo lavoro è presentato in modo analitico, completo in ogni sua parte, ricco di originali sperimentazioni di laboratorio, discusse e confrontate con la letteratura internazionale aggiornata fino ad oggi.

L'opera è presentata secondo un'originale impostazione editoriale, arricchita di tabelle ed immagini fotografiche che ne rendono più agevole la consultazione e la comprensione delle tematiche.

Da anni si sentiva la necessità di un contributo di questo tipo, che in Italia mancava completamente.

Il lavoro permetterà di far conoscere al pubblico interessato la possibilità di ricavare da un prodotto considerato perfino un refluo pericoloso e di difficile e costoso smaltimento, una vera miniera di prodotti nobili di valore nutraceutico e biomedico, che possono generare fatturati non inferiori a quelli derivanti dal prodotto caseario.

Vengono forniti precisi dati analitici sulla caratterizzazione del siero e delle sue frazioni separate con membrane, sulle condizioni ottimali per raggiungere le separazioni volute e per la valorizzazione dei numerosi prodotti, che possono rappresentare una ulteriore importante sorgente di reddito, di cui potrebbe godere tutta la filiera ed il notevole comparto produttivo.

Ancora una volta si dimostra come la ricerca dell'ENEA, se opportunamente indirizzata e finalizzata alla soluzione di problemi del nostro comparto produttivo, può fornire soluzioni estremamente vantaggiose dal punto di vista economico e di rispetto dell'ambiente.

Il tema della ricerca ed i risultati raggiunti dimostrano in modo scientifico e verificabile che è possibile ricavare prodotti di interesse farmaceutico (ricchezza) da un effluente industriale, dimostrando che un modello largamente evocato, anche dai mass media, come quello dello "sviluppo sostenibile" ha un suo reale riscontro.

Ci si augura che la nostra imprenditoria agro-industriale sappia cogliere al volo tali opportunità, contribuendo alla soluzione di un importante problema ambientale e fornendo al Paese prodotti pregiati che, a caro prezzo, troviamo negli scaffali delle farmacie, dei negozi sportivi, nelle palestre ed anche nella grande distribuzione.

È evidente che l'imprenditoria estera è stata più lungimirante di quella nazionale.

Prof. Alessandro Bozzini

Indice

Riassunto	10
Scopo del lavoro	12
1. Il siero di latte in Italia: una risorsa da valorizzare	13
1.1 I prodotti derivati dal siero	17
2. Chimica e microbiologia del siero	19
2.1 La chimica del siero	21
2.2 La vitamina B2	26
2.3 La vitamina B5 (acido pantotenico, pantetina)	28
2.4 Aspetti microbiologici del siero	28
2.4.1 Le contaminazioni batteriche	29
2.4.2 Le contaminazioni da lieviti e muffe	37
2.5 Metodologie analitiche per sieroproteine e lattosio	39
2.5.1 Analisi delle sieroproteine	39
2.5.2 Analisi dei glucidi per HPLC con rivelatore IR	47
2.6 Bibliografia	50
3. Le sieroproteine	51
3.1 La struttura delle proteine	53
3.2 La lattoferrina (LF)	56
3.3 Le immunoglobuline (Ig)	57
3.4 La β -lattoglobulina (β -LG)	59
3.5 La α -lattalbumina (α -LA)	60
3.6 La lattoperossidasi (LP)	62
3.7 La sieralbumina (SA)	63
3.8 Proprietà nutrizionali e funzionali delle sieroproteine	64
3.9 Proprietà biomediche delle sieroproteine	68
3.10 Denaturazione termica e coagulazione	70
3.11 Ciclo di lavorazione del latte	71
3.12 Bibliografia	72
4. Peptidi bioattivi	75
4.1 Le proteasi, enzimi idrolitici delle proteine	77
4.2 Idrolisi delle proteine del latte	83
4.3 I peptidi bioattivi	86
4.3.1 Le funzioni biologiche dei peptidi bioattivi	89
4.3.2 Estrazione dei peptidi bioattivi dal siero	93
4.4 Bibliografia	98
5. Lattosio e galattoso-oligo-saccaridi	103
5.1 Cristallizzazione del lattosio	106
5.2 Idrolisi enzimatica del lattosio	107
5.3 Cinetica di formazione dei galattoso-oligo-saccaridi	112
5.4 Bibliografia	115

6. I processi separativi a membrana	117
6.1 Concetto di filtrazione tangenziale	119
6.2 Tecniche specifiche di filtrazione tangenziale	124
6.3 Classificazione e composizione delle membrane	126
6.3.1 Le membrane ceramiche	128
6.3.2 Le membrane polimeriche	131
6.4 Meccanismi di trasporto	134
6.4.1 Il modello del gel per la previsione del flusso di permeato	138
6.5 Idrodinamica dei sistemi a membrana	141
6.6 Consumo energetico	144
6.7 Lavaggi delle membrane	145
6.8 Principali applicazioni dei processi a membrana	147
6.9 Bibliografia	149
 7. Processi di trattamento del siero di latte	 151
7.1 Processi tradizionali di trattamento del siero	153
7.2 Le tecnologie di membrana nel frazionamento del siero	155
7.2.1 La microfiltrazione del latte	163
7.2.2 La microfiltrazione del siero di latte	164
7.2.2.1 Siero ovino	164
7.2.2.2 Siero caprino	168
7.2.3 L'ultrafiltrazione del siero: confronto fra prove diverse	173
7.2.4 Nanofiltrazione del siero: confronto fra prove diverse	178
7.2.5 Processo di osmosi inversa	181
7.2.6 Ottimizzazione dei parametri di processo	185
7.3 Bibliografia	187
 8. Separazione delle sieroproteine per cromatografia	 189
8.1 Principi teorici della cromatografia a scambio ionico	191
8.2 Resine a scambio ionico e capacità legante	195
8.3 Frazionamento selettivo delle sieroproteine con cromatografia a scambio ionico	197
8.4 Bibliografia	207
 9. Formulati commerciali di siero in polvere	 209
9.1 Le polveri commerciali a base di siero di latte	211
9.2 Analisi chimica delle nostre polveri e di quelle commerciali	216
9.3 Bibliografia web	220
 10. La Società Sieroproteine Srl	 225
10.1 La hall tecnologica	228
10.1.1 Gli impianti pilota a membrane	228
10.1.2. Unità pilota a membrane polimeriche	228
10.1.3 Unità pilota a membrane ceramiche	229
10.1.4 Unità pilota di osmosi inversa	230
10.2. Atomizzatori Spray Dryer	231
10.3 Il Gruppo di ricerca	233

11. Valutazioni tecnico-economiche e discussione	235
11.1 Valutazioni per un impianto di trattamento di 100.000 litri/giorno di siero	237
11.1.1 Il mercato internazionale dei prodotti siero-derivati	237
11.1.2 Strategie di produzione	238
11.1.3 Impianti di trasformazione	238
11.1.4 Dati di input della proposta progettuale	238
11.1.5 Quantitativi di prodotti grezzi recuperati dal processo	239
11.1.6 Ricavi lordi	239
11.1.7 Costi dell'impianto di trattamento	240
11.1.8 Utili lordi del processo	242
11.2 Discussione	242
12. Conclusioni	247
Tabelle di conversione delle unità di misura	251
Ringraziamenti	252

Riassunto

Questo studio affronta il problema principale dell'industria casearia, cioè il trattamento di depurazione e di trasformazione del siero di latte per produrre sostanze ad alto valore aggiunto, in modo da ricavarne un profitto, come già avviene in molti paesi del mondo. Sono illustrate ed analizzate criticamente le tecnologie ed i processi tradizionali impiegati per il trattamento del siero di latte per risolvere il problema più urgente, che riguarda la depurazione e, contemporaneamente, massimizzare il recupero dei suoi componenti chimici.

È stata dedicata particolare attenzione alla illustrazione dei processi separativi mediante membrane, indicando i principi di funzionamento, le caratteristiche delle membrane, le condizioni idrodinamiche ed i parametri che condizionano le loro prestazioni.

L'applicazione delle tecniche separative a membrana, come la microfiltrazione (MF), l'ultrafiltrazione (UF), la nanofiltrazione (NF), la diafiltrazione (DF) e l'osmosi inversa (OI) nel frazionamento del siero di latte, costituisce il tema centrale del presente lavoro. Queste tecniche vengono applicate al frazionamento selettivo dei costituenti del siero, al fine di massimizzare i recuperi di materia, ed eliminare completamente l'impatto ambientale della matrice.

Sono state condotte numerose campagne sperimentali con unità pilota a membrana in grado di trattare dai 200 ai 500 l di siero per singola prova.

Vengono descritte le condizioni operative ottimali, in ogni sezione di trattamento a membrana, indicando i risultati sperimentali raggiunti, fra cui la produttività delle membrane, la reiezione ai soluti, l'effetto della pressione, della temperatura e delle condizioni idrodinamiche, che consentono di tenere sotto controllo il problema del "fouling" cioè dell'intasamento delle membrane.

Parallelamente allo studio del processo di trattamento, sono stati approfonditi gli studi di qualificazione e caratterizzazione chimica dei prodotti recuperati dal siero.

Vengono descritte le caratteristiche funzionali delle sieroproteine che permettono il loro impiego in larghi settori dell'industria alimentare (pasta, biscotti, sughi, dolci, gelati ecc.). Sono illustrate le caratteristiche biochimiche delle sieroproteine, lattosio, vitamine, sali minerali e della stessa acqua, che è il costituente più abbondante del siero. Per aumentare il valore aggiunto delle sieroproteine e del lattosio sono stati studiati e messi a punto due processi di trasformazione di queste sostanze, rispettivamente in peptidi bioattivi che mostrano interessanti proprietà biomediche, ed in glucidi idrolizzati e galattoso-olisaccaridi (GOS), con caratteristiche prebiotiche.

Sono descritte le funzioni biochimiche delle sieroproteine e le modalità di produzione dei peptidi bioattivi, che presentano funzioni biomediche ancora non completamente esplorate.

È stato descritto il protocollo sperimentale per la produzione degli oligo-saccaridi, a partire dal concentrato di NF, attraverso l'idrolisi del lattosio, impiegando l'enzima β -galattosidasi in speciali condizioni di pH, temperatura e tempo di reazione.

È stata studiata la cinetica di formazione dei GOS e sono state definite le condizioni di processo per ottenere il massimo rendimento produttivo, pur utilizzando un substrato reale, cioè il lattosio del siero di latte.

Dei peptidi bioattivi sono illustrate, sia le proprietà biomediche, che le condizioni per recuperarli dal processo di frazionamento del siero, con tecnologie di membrana.

È stato sviluppato un nuovo processo di trasformazione delle SP in peptidi bioattivi, impiegando una proteasi specifica, che ha permesso di idrolizzare quantitativamente le SP, generando una moltitudine di peptidi che sono stati analizzati con spettrometria di massa per caratterizzarne la struttura molecolare, cui sono associate le proprietà biomediche.

Le sperimentazioni con tecniche di cromatografia a scambio ionico hanno permesso di separare selettivamente alcune molecole di SP fra loro, in modo da recuperare quelle di particolare interesse biomedico, come la lattoferrina e la lattoperossidasi.

È stato raggiunto un rendimento di estrazione per le due sieroproteine indicate dell'87%.

Sono illustrate le tecniche per ottenere polveri sieroproteiche non denaturate, con processo di spray dryer, sul concentrato di UF, preceduto da una fase di diafiltrazione per ridurre il contenuto salino ed aumentarne il valore percentuale proteico, rispetto alla composizione del formulato in polvere.

È stata determinata la composizione chimica delle polveri ottenute, confrontata con alcuni formulati in distribuzione, da cui emerge che i nostri prodotti risultano, in media, più purificati di quelli commerciali.

Sono state descritte le metodologie analitiche, messe a punto sperimentalmente, per caratterizzare tutte le componenti chimiche del siero.

Key words: sieroproteine, siero di latte, lattosio, membrane, gos, peptidi bioattivi.

Scopo del lavoro

La funzione strategica del presente lavoro è quella di far conoscere le proprietà biochimiche e le straordinarie funzioni biomediche dei costituenti chimici del siero di latte, illustrare le tecnologie di trattamento e contribuire con queste informazioni a sviluppare una industria di trasformazione del siero di latte nel nostro paese, come è già avvenuto nel Nord Europa e negli USA.

Si vuole promuovere un'industria nazionale specializzata nella produzione di sieroderivati ad alto valore aggiunto, attraverso un processo che consente di eliminare definitivamente l'impatto ambientale dei caseifici e generare risorse e plus valore (impresa), dalla trasformazione di un effluente industriale, che l'industria nazionale considera un pericoloso rifiuto.

Questi obiettivi sono perfettamente in linea con il modello di "sviluppo sostenibile" di cui rappresentano un concreto riscontro applicativo.

In questo impegno, si inserisce l'azione a tutto campo dell'ENEA, Ente pubblico di ricerca, per le Nuove tecnologie, l'Energia e l'Ambiente, che da oltre 20 anni è impegnato nelle ricerche in questo settore.

La Società Sieroproteine Srl affianca, come partner industriale, le ricerche dell'ENEA per trovare uno sbocco commerciale ai prodotti che si possono ottenere dal siero di latte.

In questa iniziativa comune sono state eseguite sperimentazioni a tutto campo, condotte presso il Centro Ricerche ENEA della Casaccia (Roma) e presso la Società Sieroproteine di Belcastro (Catanzaro) in cui operano giovani ricercatori.

Oltre allo sviluppo delle attività di ricerca è stata posta particolare attenzione alla formazione di nuove figure professionali, specializzate nel settore della chimica fine, dell'ingegneria di processo, e degli aspetti squisitamente commerciali, legati al mercato sempre più interessante dei nuovi prodotti (marketing).

In sintesi, lo scopo della ricerca, oggetto del presente lavoro, consiste:

- nello studio approfondito delle caratteristiche biochimiche fondamentali dei costituenti del siero, in particolare delle sieroproteine dei peptidi bioattivi, dei galattosio-oligo-saccaridi e delle vitamine, rimarcandone le spiccate proprietà biomediche;
- nel descrivere criticamente le tecnologie vecchie e nuove che permettono di recuperare sieroproteine, zuccheri sali minerali e acqua, partendo dal siero di latte, cioè da un effluente dell'industria lattiero-casearia considerato un prodotto di scarto;
- nell'approfondire i nostri risultati di due anni di ricerche, ottenuti sperimentalmente presso l'ENEA e presso la Soc. Sieroproteine, operando anche in scala impiantistica pilota, supportata da un laboratorio analitico molto specializzato;
- nel tentativo di promuovere l'attività commerciale della Società Sieroproteine, nel contesto socio-economico nazionale, in cui sembra molto difficile far comprendere alle industrie casearie che il siero di latte è una miniera d'oro;
- nell'informare i nostri lettori, come primo passo per lo sviluppo di nuove imprese commerciali.

CAPITOLO 1

IL SIERO DI LATTE IN ITALIA: UNA RISORSA DA VALORIZZARE



Ciclo di lavorazione caseario per la produzione della ricotta dal siero

Indice dei paragrafi

1.1 I prodotti derivati dal siero

17

Il siero di caseificazione costituisce ciò che rimane del latte a seguito del processo di cagliatura. L'industria lattiero-casearia tradizionale considera da sempre questa matrice come un rifiuto da destinare prevalentemente all'alimentazione dei suini.

Al Centro e Sud Italia, dove gli allevamenti di maiali sono piuttosto scarsi, il siero viene smaltito nei modi più strani, comunque sotto-utilizzato.

Nell'ultimo ventennio la comunità scientifica ha contribuito a caratterizzare più estesamente questa matrice conferendole progressivamente più dignità. È emerso infatti che il siero contiene sostanze di grande interesse sia sotto il profilo alimentare che sotto quello farmaceutico: proteine e derivati proteici, zuccheri con proprietà prebiotiche di assoluto rilievo.

Le sieroproteine (SP) costituiscono una delle famiglie di composti più importanti del siero. Sono presenti nel latte di vacca, di capra e di pecora in concentrazioni che variano da una specie animale all'altra. Esse vengono assunte con il consumo del latte ma non del formaggio. Le SP, infatti, permangono prevalentemente nel siero di caseificazione, dopo la formazione della cagliata, processo che determina la precipitazione delle caseine e della sostanza grassa. Dalla cagliata derivano poi tutti i prodotti e le specialità casearie, fra cui è doveroso ricordare la mozzarella ed il parmigiano, prodotti tipici e di largo consumo del nostro Paese.

Le SP non vengono utilizzate completamente dall'industria casearia, ma solo in minima parte, attraverso la produzione della ricotta (vedi immagine nella pagina accanto), un prodotto presente solo in alcuni periodi dell'anno e poco diffuso nel Nord Italia.

Invece, si registra su tutto il territorio nazionale una grande produzione di siero di caseificazione, valutata in circa 8 milioni di t/anno, localizzata soprattutto al settentrione, come mostra la figura 1.1, in cui si riporta schematicamente la distribuzione dei caseifici (quadrati gialli) a livello regionale.



Figura 1.1
Concentrazione dei caseifici sul territorio nazionale

Come mostrato nella figura, il grande bacino di produzione del siero è quello lombardo-emiliano, ma importanti concentrazioni di caseifici sono rilevabili nelle province di Sassari, Latina, Bari, Caserta, Salerno, Ragusa, ecc.

Al Nord gli ingenti quantitativi di siero, derivanti dalla produzione di parmigiano, provolone e gorgonzola, sono ancora oggi destinate agli allevamenti zootecnici (figura 1.2); nel Meridione, dove invece scarseggiano gli allevamenti di suini, il destino di siero e scotta si concretizza più spesso nello smaltimento soprattutto illegale; che consiste nello spargimento a terra, nello sversamento del siero in corsi d'acqua o in mare.

In Sardegna si valuta in circa 120.000 t/ giorno la produzione di scotta ovina, in gran parte utilizzata per allevamenti zootecnici.

Le industrie casearie devono pertanto sostenere onero di smaltimento più o meno legali, valutati fra (2 e 5 €/m³) e sono gravate dal rischio, sempre più incombente, di incorrere in sanzioni o in denunce penali.

Una terza opzione per la risoluzione del problema siero in Italia, molto diffusa nel Nord Italia, consiste nel cedere quantitativi importanti di siero a grandi gruppi industriali, come il gruppo Besnier, in particolare la Lactoserum France.

Questa azienda preleva il siero di parmigiano e di gorgonzola, lo trasforma, parzialmente in Italia ed in parte in Francia, per poi ricollocare sul mercato (anche italiano) i prodotti derivati raffinati, ad alto valore aggiunto, destinati soprattutto all'industria agroalimentare e degli integratori per lo sport.



Figura 1.2
Il siero viene largamente impiegato per l'alimentazione zootecnica

1.1 I prodotti derivati dal siero

Alla luce degli studi recenti, condotti sul siero nell'ultimo trentennio, e sulla base delle possibili applicazioni delle sue componenti chimiche, emergono nuove ed importanti informazioni scientifiche che dimostrano il grande valore nutriceutico dei composti presenti nel siero di latte.

Dal siero si ricavano prodotti che potrebbero sostituire il 30% di quelli prodotti dell'industria farmaceutica, con il vantaggio che non comportano controindicazioni biomediche.

In questo senso, sono state utilizzate e si continuano a sfruttare profittevolmente le proprietà funzionali delle SP, come ad esempio la capacità di assorbire l'acqua, di formare gel, emulsioni ecc. Le SP hanno inoltre la funzione di "fat replacer", cioè di sostituire il sapore del grasso e di esaltare il gusto e gli aromi dei cibi in generale.

Tali proprietà hanno consentito di impiegare i sieroderivati nell'industria alimentare (pasta, cioccolato, biscotti, maionese, sughi, prodotti per l'infanzia ecc.).

Le industrie nazionali hanno bisogno di grandi quantità di SP in forma di polvere, che necessariamente devono importare, per un ammontare di circa 30.000 t/anno.

I semilavorati grezzi (SP indistinte + lattosio) hanno un prezzo all'ingrosso compreso fra 3 e 7 €/kg, in funzione del grado di raffinazione e del contenuto percentuale in SP.

Si importano semilavorati di natura diversa, in forma di polveri di diversa composizione chimica, oppure in formulati già pronti per la vendita al minuto come integratori alimentari.

Per un lungo arco di tempo, a seguito di una consolidata prassi di impiego di queste sostanze nell'industria alimentare, si è ignorato il potere biomedico e nutrizionale della frazione sieroproteica del latte e del siero. Sino ad oggi non si è posta attenzione sul problema della separazione delle SP dalla matrice originaria, ma si è solamente provveduto ad ottenere un concentrato sieroproteico indistinto, teoricamente destinato alla zootecnia, che è anche, più o meno illegalmente, utilizzato per l'alimentazione umana, specialmente nei Paesi in via di sviluppo.

Man mano che le evidenze sperimentali prodotte dalla comunità scientifica proponevano all'attenzione del consumatore l'influenza positiva di SP, di galattosio-oligo-saccaridi (GOS) e di peptidi bioattivi, è cominciata a farsi strada a livello internazionale l'esigenza di recuperare e purificare queste preziose molecole, per impiegarle nell'industria farmaceutica.

Oggi sono migliaia le industrie che producono polvere di siero come integratori e come sostanze nutriceutiche che migliorano la salute e lo stato di benessere dei consumatori.

La domanda di integratori alimentari, impiegati per lo più da sportivi, aumenta in modo sensibilmente ogni anno di circa il 13%, a fronte di un'offerta di materia prima sempre più ridotta.

La categoria di prodotti denominati "integratori alimentari" è molto vasta, comprende anche sostanze ed estratti vegetali, fibre, sostanze minerali. Gli integratori a base di siero sono costituiti principalmente da sieroproteine purificate, in cui viene indicato anche il processo di produzione, in particolare le confezioni indicano la tecnica di ultrafiltrazione ed indicano che la purificazione del prodotto è stata ottenuta con resine a scambio ionico.

Sono presenti sul mercato anche peptidi bioattivi e GOS con prezzi molto alti, dell'ordine dei 40 \$/kg.

Come precisato sopra, tutto questo avviene nello scenario internazionale, ma l'Italia, che pure annovera studi importanti sulle proprietà cliniche di questi composti, è ancora molto indietro, proprio nello sviluppo di processi industriali finalizzati a recuperare e a qualificare queste preziose molecole.

In sostanza, le scoperte recenti sulle proprietà biomediche di proteine intere, di peptidi bioattivi e di oligosaccaridi, hanno creato un grandissimo interesse a livello mondiale, in molti casi tali interessi si sono tradotti in realtà produttive, come si può verificare da una ricerca sul web.

Tutto questo nonostante il *target* biomedico sia ancora molto poco sfruttato, per cui è ragionevole prevedere ricadute economiche di grande importanza dai prodotti del siero.

In Italia ancora non è maturo il concetto che considera il siero una risorsa e non più un effluente scomodo, di cui ci si deve sbarazzare al più presto. Analizzare le ragioni socio-economiche di questo ritardo italiano non rientra negli obiettivi del presente lavoro.

Certamente il nostro comparto lattiero caseario si caratterizza per una gestione produttiva di stampo tradizionalista, per l'innovazione di prodotto, di processo, ed anche per la politica di gestione dei reflui.

Per questo la realizzazione di un impianto di trattamento del siero, in grado di valorizzare commercialmente le SP, il lattosio, i sali minerali e l'acqua, sembra essere ancora di là da venire. Questa considerazione appare ancor più sconcertante se si considera che in più parti, nel nostro Paese, sono mature le condizioni per la realizzazione di grossi impianti.

In alcune regioni come la Lombardia, la Campania, la Puglia, la produzione casearia è così elevata e territorialmente concentrata, da poter ipotizzare agevolmente la realizzazione di impianti di trattamento, dimensionati per migliaia di m³/giorno.

È interessante confrontare i risultati di un'indagine che si può eseguire con un qualunque motore di ricerca sul web: digitando "whey products" (prodotti derivati dal siero di latte) si ottiene una lunga lista di produttori esteri di formulati derivati dal siero di caseificazione, nonché ricerche di mercato, e dati relativi al commercio e all'import-export di questi prodotti.

Effettuando la stessa ricerca in italiano si ottengono per lo più collegamenti a normative più o meno stringenti, per regolamentare lo smaltimento del siero.

Questa verifica è un esercizio per tutti. Dalla stessa indagine si nota che nella stessa Cina, notoriamente un modesto produttore di latte, è già attivo il mercato della trasformazione industriale e della commercializzazione dei sieroderivati.

Portare all'attenzione del consumatore le proprietà nutrizionali e biologiche dei costituenti chimici del siero di latte, divulgare le conoscenze aggiornate in questo settore, sviluppare le tecnologie di produzione delle specialità a base di SP, peptidi bioattivi e GOS, impostare una linea di commercializzazione dei prodotti ricavati, costituisce il principale obiettivo strategico del presente lavoro.

CAPITOLO 2

CHIMICA E MICROBIOLOGIA DEL SIERO



Preparazione dei campioni di siero per le analisi chimiche

Indice dei paragrafi

2.1 La chimica del siero	21
2.2 La vitamina B2	26
2.3 La vitamina B5 (acido pantotenico, pantetina)	28
2.4 Aspetti microbiologici del siero	28
2.4.1 Le contaminazioni batteriche	29
2.4.2 Le contaminazioni da lieviti e muffe	37
2.5 Metodologie analitiche per sieroproteine e lattosio	39
2.5.1 Analisi delle sieroproteine	39
2.5.2 Analisi dei glucidi per HPLC con rivelatore IR	47
2.6 Bibliografia	50

2.1 La chimica del siero

La composizione chimica e microbiologica del siero è simile a quella del latte, da cui deriva, con l'eccezione per le caseine ed i grassi, che rimangono quasi completamente nel formaggio a seguito del processo di caseificazione. Il lattosio, i sali minerali, con l'esclusione del calcio, alcune vitamine e le sieroproteine sono le stesse di quelle presenti nel latte. Per meglio comprendere le applicazioni delle tecnologie di trattamento, che verranno discusse di seguito, è necessario considerare con attenzione la composizione chimica, fisica e microbiologica del latte.

Il latte è un'emulsione di sostanza grassa sotto forma globulare, in un liquido che presenta analogie con il plasma sanguigno. Questo liquido è a sua volta una sospensione di materie proteiche in un siero; quest'ultimo è una soluzione neutra contenente principalmente lattosio e sali.

Ci sono dunque, nel latte, quattro tipi di componenti importanti:

1. i lipidi, formati essenzialmente da grassi ordinari (trigliceridi);
2. le proteine (caseine, albumine, globulina);
3. i glucidi, essenzialmente il lattosio;
4. i sali.

Sono presenti anche numerosi altri costituenti, in quantità minime: lecitine, vitamine, enzimi, nucleotidi, gas disciolti ecc; alcuni dei quali hanno una grande importanza per la loro attività biologica.

Il siero di caseificazione è un prodotto molto diluito, l'acqua costituisce il 94%, con un contenuto di circa il 6% di solidi disciolti.

Il siero contiene alcune vitamine come l'acido pantotenico, la vitamina C, tracce di vitamina B (tiamina) ecc. Il siero presenta un colore giallo paglierino dovuto alla presenza della riboflavina (vitamina B2), contiene spesso frammenti di coaguli di caseine e una percentuale di grasso di circa lo 0,2-0,5%.

In figura 2.1 viene mostrata un'immagine del siero di capra nella fase di riscaldamento antecedente la produzione di ricotta.



Figura 2.1
Siero caprino nella fase di riscaldamento per la produzione della ricotta

Composizione Chimica del siero	
Parametri	Valori
PH	5,5-6
COD (mg/L)	70.000
Densità (g/cm ³)	1,025
Carica mic. (UCF/g)	120.000
Ceneri (g/L)	5,5
Grassi (g/L)	0,5
Lattosio (g/L)	47,0
Acido L-lattico (g/L)	1,3
Proteine totali (g/L)	8,6
NPN (g/L)	0,35
Sostanza secca (g/L)	64,0

Tabella 2.1
Composizione chimica media del siero

Il siero è di per sé un brodo di coltura, quindi è facilmente fermentabile per la presenza di batteri lattici che trasformano soprattutto il lattosio in acido lattico.

Il contenuto batterico dipende dal suo stato di conservazione, esso si attesta mediamente fra 100.000 e 2 milioni di ufc/ml. La composizione chimica media del siero bovino è riportata in tabella 2.1.

In tabella 2.2 si riportano a confronto le composizioni chimiche e le caratteristiche fisiche del siero ovino, di quello ottenuto dalla produzione del parmigiano e della scotta ovina, cioè dal siero dopo la produzione della ricotta. Il carico inquinante varia tra 60.000 e 90.000 mg/L di ossigeno. Le proteine variano fra 8 e 12 g/L (Pizzichini M. 2001; M. Pizzichini 2003). La composizione delle SP varia da una specie all'altra di mammifero ed è collegata alla composizione del latte. Nella tabella 2.2 si riporta la composizione del latte di diversi mammiferi, fra cui quello umano (Alais 1995). Dalla tabella si possono cogliere alcune differenze macroscopiche: nei bovini il contenuto di proteine è più basso di quello ovino.

PARAMETRI	SIERO OVINO	SIERO PARMIGIANO	SCOTTA OVINA
SH	5,00	5,1	4,2
pH	6,5	6,2	6,4
Densità (g/cm ³)	1,018	1,09	1,026
Viscosità(cp)	0,8	0,82	0,75
Ceneri (g/L)	3,4	3,3	4,4
Grassi (g/L)	0,1	0,5	0,5
Lattosio (g/L)	44,0	55,5	45-52,2
Acido L-lattico (g/L)	0,11	0,1	0,095
NPN (g/L)	2,2	2,0	3,2
Proteine vere	10,1	12,5	4,5-8
Proteine totali (g/L)	11,5-12,0	18,5	8,5
Sostanza secca (g/L)	61,31	79,9	66,8

Tabella 2.2
Composizione del siero ovino, del siero di parmigiano e della scotta ovina

Nel grafico di figura 2.2 si confrontano l'analisi HPLC del siero ovino e caprino. La BSA è molto diluita nel siero di capra che presenta anche una concentrazione inferiore di immunoglobuline.

La tabella 2.3 riporta una composizione media fra gruppi di mammiferi, uomo compreso, la stessa composizione per tipologia di animale, varia con la stagione in conseguenza della diversa alimentazione del bestiame. Nel periodo primaverile, quando gli animali si nutrono prevalentemente di erba e foraggio, aumenta nel siero il contenuto di sieroproteine e lattosio (Alais 1995; P. Cayot 1996). La composizione delle SP varia da una specie all'altra di mammifero ed è collegata alla composizione del latte.

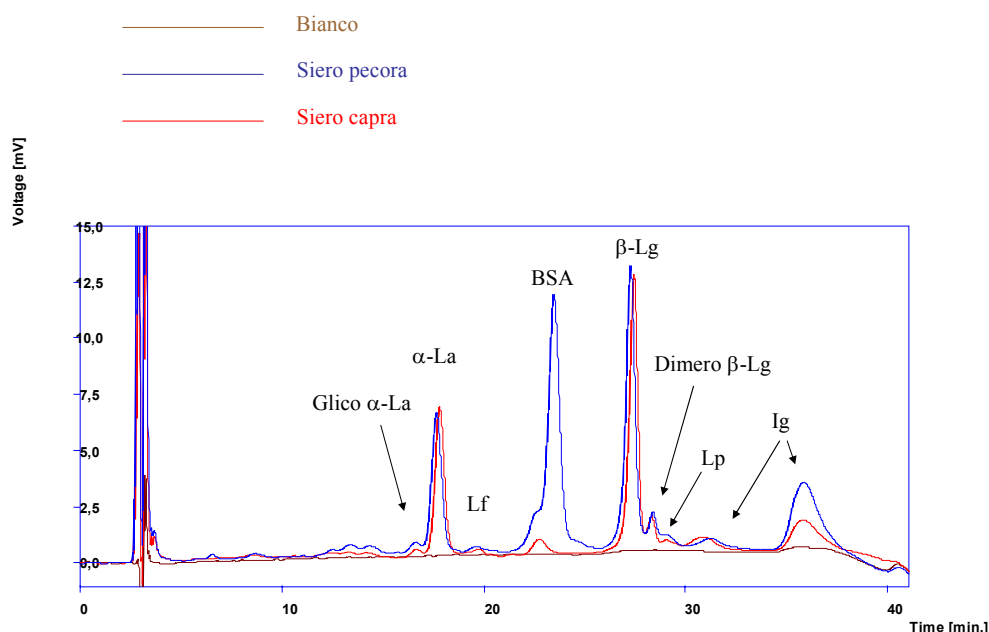


Figura 2.2
Analisi HPLC del siero di pecora (blu) e di quello di capra (rosso)

Proteine	Bovino	Ovino	Caprino	Bufalino	P. M (Dalton)	P.I (pH)
β-Lattoglobulina	2,7	3,116	3,920	3,8	18.400-36.800	5,2
α-Lattalbumina	1,2	1,92	1,078	1,3	14.200	4,5-4,8
(BSA) albumina	0,45	2,94	0,153	0,42	69.000	4,8
Immunoglobuline	0,65	1,254	0,792	0,72	150.000-900.000	5,5-8,3
Lattoferrina	0,15	0,482	0,12	0,121	78.000	9
Lattoperossidasi	0,02	0,343	0,08	0,07	89.000	9,5
Glicomacropeptidi	1,2	-	1,5	1,5	6.700	5,1-6,0

Tabella 2.3
Concentrazioni proteiche del siero bovino, ovino, caprino e bufalino (g/L)

Acido grasso	%
C ₄ butirrico	3,0
C ₆ caproico	3,6
C ₈ caprilico	3,8
C ₁₀ caprico	10,8
C ₁₂ laurico	4,7
C ₁₄ miristico	9,8
C _{14:1} miristoleico	0,1
C ₁₅ pentadecanoico	0,7
C ₁₆ palmitico	26,4
C _{16:1} palmitoleico	1,0
C ₁₇ eptadecanoico	0,5
C _{17:1} eptadecenoico	0,3
C ₁₈ stearico	8,9
C _{18:1} oleico	23,5
C _{18:2} linoleico	2,5
C _{18:3} linolenico	0,3
C ₂₀ arachico	0,2

Tabella 2.4
Composizione degli acidi grassi di siero di capra

Mentre i bovini (mucche e bufale) assicurano una produzione costante di latte durante tutto l'arco dell'anno, gli ovini ed i caprini presentano nel nostro paese un fermo di produzione nel periodo estivo, in particolare da fine luglio a fine settembre.

Anche la composizione degli acidi grassi varia da specie a specie ma rimane piuttosto simile fra bovini e caprini mentre varia sensibilmente fra animali mono e poligastrici.

Nella tabella 2.4 si riporta la composizione degli acidi grassi del siero di capra.

Nella tabella 2.5 si riportano le concentrazioni di acidi grassi presenti nel siero vaccino. Nella terza colonna si riportano le stesse concentrazioni che si trovano nel retentato di ultrafiltrazione (UF) con cut-off 20 kDa. In questa prova il siero non è stato trattato con tecnica di microfiltrazione (MF). L'acido oleico, lo stesso che si trova nell'olio di oliva, è presente nei due sieri per il 23%, mentre l'acido palmitico è quello a più alta concentrazione, per il 30,9% nel siero bovino e per il 26,4% nel siero di capra.

La tabella 2.5 dimostra che l'UF rimuove il grasso, ma questo processo penalizza la produttività della membrana; per questo deve essere rimosso per centrifugazione o per MF, come si vedrà in seguito.

La composizione minerale del siero è piuttosto stabile fra i sieri di diversi mammiferi. La composizione salina del siero, se si esclude la concentrazione del calcio e dei fosfati che rimangono nella cagliata, è sostanzialmente uguale a quella del latte di provenienza.

Acidi grassi	Tal quale (%)	Concentrato di UF (%)
Acido butirrico	3,67	25,69
Acido capronico	2,41	16,87
Acido caprilico	1,48	10,36
Acido caprinico	3,12	21,84
Acido laurico	3,45	24,15
Acido tridecanoico	0,09	0,63
Acido miristico	11,89	83,23
Acido miristoleico	0,90	6,30
Acido pentadecanoico	1,30	9,10
Acido pentadecenoico	0,42	2,94
Acido palmitico	30,19	211,33
Acido palmitoleico	1,48	10,36
Acido eptadecanoico	0,32	2,24
Acido stearico	11,82	82,74
Acido oleico	23,01	161,07
Acido linoleico	2,34	16,38
Acido arachico	0,70	4,90
Acido eicosenoico	0,19	1,33
Acidi grassi saturi	70,81	495,67
Acidi grassi monoinsaturi	26,32	184,24

Tabella 2.5
Concentrazione degli acidi grassi nel siero vaccino tal quale e nel concentrato di ultrafiltrazione (UF)

Nella tabella 2.6 sono messe a confronto le composizioni saline medie del latte bovino, del siero bovino e di quella scotta di bufala campana. Si osserva che i cationi e gli anioni monovalenti rimangono sostanzialmente nel siero, mentre i bivalenti vengono rimossi dal siero perché finiscono nella cagliata.

Nella colonna 3 della tabella si osserva la composizione salina di una scotta di bufala, in cui si evidenzia l'elevata concentrazione di NaCl, dovuta alla pratica casearia che prevede l'aggiunta di sale, per migliorare il sapore del formaggio e soprattutto della ricotta.

Nell'industria casearia, la salagione dei formaggi e della scotta, complica ulteriormente il problema dello smaltimento dei reflui caseari, poiché il sale è un noto antibatterico, quindi ostacola la depurazione biologica di queste matrici.

Composti	Latte bovino	Siero bovino	Scotta di bufala
Ceneri (%)	12,0	0,5	0,87
Solidi totali (g)	6,6	4,0	6,5
Calcio (mg)	1.100	430	256,10
Fosfati (mg)	910	400	295,60
Potassio	1.380	1.600	1149,18
Sodio	450	500	2.086,84
Magnesio (mg)	160	100	92,63
Cloruri (mg)	960	1.100	3.148,33
Fluoruri	400	400	786,36
Ammonio	180	110-150	238,76

Tabella 2.6
Contenuto salino del latte, del siero e della scotta bufalina

2.2 La Vitamina B 2

Questa vitamina idrosolubile, particolarmente ricca nel siero, svolge importanti funzioni biologiche, con effetti positivi nella cura del cancro e delle malattie cardiocircolatorie. Inoltre partecipa attivamente all'assorbimento del ferro ed ha effetti positivi sulla vista (Powers).

Nella figura 2.3 si riporta la formula di struttura della riboflavina.

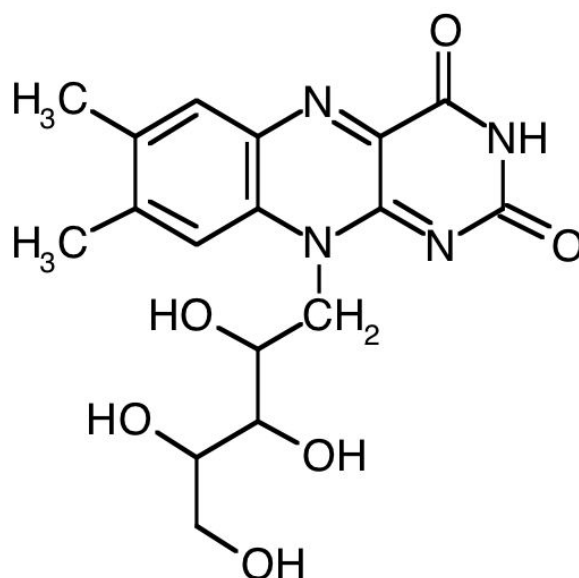


Figura 2.3
Formula di struttura della riboflavina

Dal punto di vista biochimico la riboflavina è coinvolta in numerose reazioni metaboliche che coinvolgono la biosintesi di altre vitamine. Una dieta povera di riboflavina può quindi tradursi in uno stato pluricarenziale sotto l'aspetto vitaminico.

La carenza di riboflavina provoca: alterazioni mitocondriali, inibizione della conversione della vitamina B₆ nelle sue forme coenzimatiche (pellagra), aumento della perossidazione lipidica, anemia da carenza di ferro, aumento della sintesi di glutathione e conseguente diminuzione degli aminoacidi coinvolti in questo processo; può provocare inoltre disturbi della crescita e dello sviluppo nonché affezioni all'apparato visivo (Boisvert; I. 1993).

In figura 2.4 si riporta l'immagine di un concentrato di nanofiltrazione (NF – vedere più oltre i capitoli 6 e 7), in cui è evidente la forte colorazione gialla dovuta alla presenza di riboflavina. Nella tabella 2.7 si riportano le malattie causate dalla mancanza di riboflavina.

Nel siero la concentrazione della riboflavina è di circa 1,9 g/L, e raggiunge i 9 g/L nel concentrato di NF.



Figura 2.4
Immagine del concentrato di nanofiltrazione (NF)

Efficacia nella cura di malattie	Malattie
Apparato intestinale	Diarrea, vermi
Articolazioni	Artrite
Capelli/cuoio capelluto	Calvizie
Cervello/sistema nervoso	Morbo di Parkinson Neurite, vertigini Sclerosi multipla
Gambe	Crampi
Ghiandole	Esaurimento surrenale
Occhio	Abbassamento della vista, congiuntivite Glaucoma, cecità notturna, cataratta Lacrimazione eccessiva
Orecchio	Sindrome di Ménière
Pelle	Acne, ulcera Dermatiti Piaghe da decubito
Polmoni/apparato respiratorio	Influenza
Reni	Nefrite
Sangue/apparato circolatorio	Diabete
Sistema riproduttivo	Vaginite
Stomaco	Dispepsia Ulcera peptica
Generale	Cancro, etilismo Pellagra, stress

Tabella 2.7
Malattie da avitaminosi B2

2.3 La vitamina B5 (acido pantotenico, pantetina)

L'acido pantotenico, fa parte del complesso vitaminico B, è idrosolubile ed è presente in tutte le cellule viventi, i lieviti, le muffe, i batteri e nelle cellule individuali di tutte le piante e animali. L'acido pantotenico viene sintetizzato nell'organismo dalla flora batterica dell'intestino. Le carni degli organi, il lievito di birra, il tuorlo d'uovo e i cereali integrali ne sono le fonti più ricche.

Recentemente è stato condotto uno studio sul ruolo di un metabolita dell'acido pantotenico chiamato pantetina, nell'abbassamento del colesterolo e nella cura delle malattie cardiovascolari. L'acido pantotenico, la cui formula di struttura è riportata in figura 2.5, è stato dimostrato essere attivo nella detossificazione dall'alcool e come immuno-stimolante.

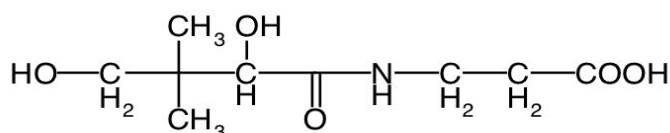


Figura 2.5
Formula di struttura dell'acido pantotenico

Esiste una stretta correlazione tra l'acido pantotenico presente nei tessuti e il funzionamento della corteccia surrenale; questo stimola, infatti, le ghiandole surrenali e aumenta la produzione di cortisone e di altri ormoni implicati nel mantenimento funzionale dell'epidermide e dei nervi. L'acido pantotenico assolve, inoltre, un ruolo importantissimo nel metabolismo cellulare. in qualità di coenzima, essendo un costituente essenziale del coenzima A. L'acido pantotenico è essenziale nella sintesi del colesterolo, degli steroidi e degli acidi grassi, e favorisce l'utilizzazione di altre vitamine, principalmente la riboflavina (Kirschmann 2002). Nel siero l'acido pantotenico ha una concentrazione media di circa 4 g/L e si concentra nel retentato di NF.

2.4 Aspetti microbiologici del siero

Poiché si intende produrre specialità alimentari e farmaceutiche a partire dal siero di latte, appare necessario valutare quali possono essere le possibili contaminazioni batteriche di questa matrice.

La sicurezza igienica del latte è intesa come salubrità del prodotto, di conseguenza la sua immissione sul mercato non risulta possibile se qualora fosse accertata la presenza di contaminanti in concentrazioni inaccettabili dal punto di vista tossicologico.

Per contaminante si intende una sostanza non aggiunta intenzionalmente ai prodotti alimentari e presente in questi ultimi sotto forma di residuo delle fasi di produzione: fabbricazione, preparazione, trattamento, trasformazione, imballaggio, condizionamento, trasporto, immagazzinamento oppure a seguito di contaminazione di origine ambientale. Le fonti da cui possono provenire i contaminanti sono diverse, anche se le principali sono di origine biologica e chimica.

I contaminanti di natura biologica (organismi vitali e/o loro tossine) appartengono a due grosse categorie: i microrganismi (batteri, lieviti e muffe) e gli organismi superiori.

Il fenomeno di inquinamento definito “contaminazione” può essere di tipo primario se i microrganismi sono presenti nell’alimento all’origine, oppure di tipo secondario se questi penetrano nell’alimento durante le fasi di lavorazione, di conservazione, di stoccaggio e di somministrazione.

I residui, potenzialmente rischiosi per la salute, che contaminano gli alimenti, hanno varia provenienza:

- pratiche agronomiche (pesticidi, fertilizzanti);
- diffusioni e cessioni da parte di macchinari e contenitori;
- inquinamento ambientale di origine industriale e urbana (diossina, metalli pesanti).

I pericoli di natura biologica dovuti a cibi contaminati rappresentano un serio problema, poiché i dati recenti rivelano che la *Salmonella* è ancora il più importante agente di contaminazione.

Occorre però precisare che diverse sono le ripercussioni sulla salute se si considerano i contaminanti di origine biologica e quelli di natura chimica.

Mentre per i primi gli effetti si manifestano, in genere, in modo acuto e a breve distanza dall’ingestione dell’alimento contaminato, attraverso disturbi associati all’apparato gastrointestinale, innalzamento della temperatura e, nei casi più gravi, anche con la morte, nei secondi anche a bassi livelli di assunzione le conseguenze hanno carattere latente e si manifestano a distanza di tempo con patologie molto gravi (in alcuni casi di natura neoplasica) e sintomatologie variabili e di difficile individuazione.

2.4.1 Le contaminazioni batteriche

Le malattie a trasmissione alimentare più frequenti sono di origine microbiologica. I microbi sono ovunque e possono introdursi in qualsiasi punto della filiera del latte, dall’alimentazione del bestiame fino al confezionamento del prodotto.

Nel latte, già all’atto della mungitura, è presente una microflora molto variabile, questa dipende sia dalle condizioni di salute dell’animale che dalle condizioni igieniche dell’ambiente nonché dal suo trattamento nelle fasi di mungitura e raccolta.

Oltre alla flora microbica endogena (micrococchi e corinebatteri) presente all’interno dei canalicoli intramammari, l’animale può essere portatore di germi patogeni; quali: *Staphylococcus aureus*, *Microbacterium tuberculosis*, brucelle, *Escherichia coli*, varie famiglie di streptococchi. Altro contributo alla flora propria del latte è da addebitarsi a microrganismi saprofiti o patogeni presenti in serbatoi naturali quali il suolo, le acque e l’aria: tra i patogeni possiamo ricordare la *Listeria spp*, la *Yersinia spp*, *Bacillus cereus*, mentre tra i saprofiti i coliformi, le pseudomonacee, i clostridi, i lieviti, muffe, oltre ai propioni batteri ed ai batteri lattici (Bottazzi 1993).

Ultime possibilità di contaminazione biologica, ma non per importanza, sono quelle legate agli apporti microbici dovuti all'uomo (attraverso le mani, i vestiti, gli utensili e gli strumenti di lavoro, i germi di persone malate o di portatori sani e le contaminazioni accidentali).

Per di più l'entità della contaminazione biologica può essere influenzata anche da altri fattori come:

- la natura dell'alimento (es. gli alimenti di natura proteica facilitano la crescita batterica);
- il contenuto di acqua libera;
- il pH dell'alimento (generalmente più il pH è basso e più bassa risulta la possibilità di sviluppo di microrganismi);
- la temperatura di conservazione (le basse temperature non facilitano lo sviluppo di microrganismi);
- il tempo che intercorre tra la preparazione ed il consumo (più è lungo questo tempo, maggiore è la possibilità di proliferazione dei microrganismi).

Sono diverse le modalità attraverso le quali il latte può subire contaminazioni e cambiamenti nelle sue caratteristiche fisiche, chimiche e organolettiche le quali, a loro volta, possono provocare nel consumatore infezioni, intossicazioni.

Le infezioni alimentari possono essere causate dall'ingestione di microrganismi patogeni vivi contenuti in cibi contaminati. Vengono di seguito riportate delle brevi note dei principali gruppi di batteri del latte responsabili delle infezioni.

Salmonella

L'ingestione di salmonella (figura 2.6) può provocare una forma di gastroenterite molto grave, soprattutto in soggetti debilitati o con un sistema immunitario debole o in formazione come i neonati. Si tratta di batteri bastoncellari mobili Gram negativi, asporigeni, aerobi facoltativi con un optimum di temperatura fra i 6 °C e i 45 °C ed un pH tra 4,1 e 9. Appartengono alla famiglia delle Entobacteriaceae e presentano la caratteristica di fermentare il glucosio con produzione di gas. Risultano termolabili alle normali temperature di pastorizzazione del latte.

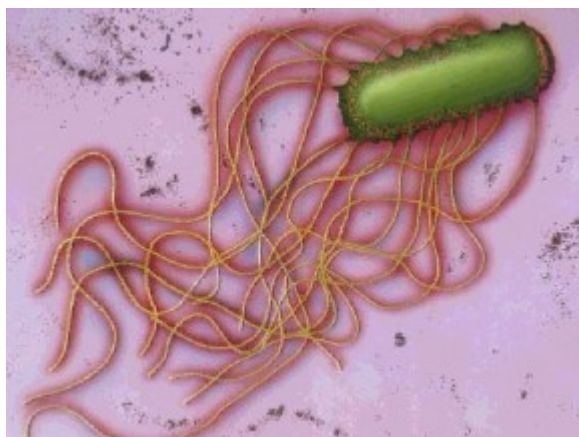


Figura 2.6
Salmonella

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes (figura 2.7) è un batterio bastoncellare, Gram positivo, psicrotrofo anaerobio-aerobio facoltativo, asporigeno in grado di fermentare debolmente il lattosio. È l'agente eziologico della listeriosi, malattia che colpisce sia gli animali che l'uomo.

In quest'ultimo la sintomatologia associata a questa patologia si estrinseca in meningiti, la granulomatosi splenica, la placentite e può determinare l'aborto nelle donne in gravidanza. Tuttavia la maggior parte dei casi riscontrati nell'uomo sono da ritenersi sporadici; ad essere colpiti sono in genere anziani e giovanissimi e soggetti immunodepressi.

Negli animali, in particolar modo nei bovini, l'infezione determinata da questo batterio è causa di encefaliti, setticemie ed endocarditi, e come effetto secondario può insorgere anche la mastite.

In virtù della loro localizzazione intracellulare, le listerie possono resistere ai trattamenti di pastorizzazione e moltiplicarsi successivamente nelle fasi di refrigerazione del prodotto.



Figura 2.7
Listeria monocytogenes

Mycobacterium tuberculosis

Il *Mycobacterium tuberculosis* (var. *hominis*, var. *bovis* con localizzazione a livello della mammella oltre che polmonare) è l'agente eziologico della tubercolosi, un bacillo aerobio obbligato Gram positivo. Il pericolo è circoscritto all'alimento consumato crudo dato che un buon trattamento di pastorizzazione uccide i Microbatteri.

Brucelle

Tre specie di *Brucelle* (*abortus*, *suis* e *melitensis*), piccoli batteri bastoncellari immobili Gram negativi, aerobi, asporigeni, molto esigenti dal punto di vista nutrizionale, sono responsabili di un'infezione alimentare nota come brucellosi (febbre maltese, febbre ondulante).

Il contagio può avvenire per via diretta mediante contatto con l'animale infetto o con le sue deiezioni.

Più frequente è la trasmissione per via indiretta, cioè attraverso alimenti contaminati, per lo più latte crudo e formaggi freschi.



Figura 2.8
Brucelle

Escherichia coli

Escherichia coli è un bacillo Gram negativo, asporigeno, in grado di fermentare il lattosio. Appartiene alla famiglia delle Entobacteriaceae ed è un ospite abituale dell'intestino.

Alcuni ceppi sono patogeni per l'uomo in quanto questo microrganismo produce enterotossine che aggrediscono solitamente l'intestino causando gastroenteriti.

Vengono generalmente distrutti dalla pastorizzazione, ma alcuni ceppi termoresistenti riescono a sopportare anche tali trattamenti. Possono essere presenti nel latte crudo di animali affetti da gastroenteriti e mastiti oppure per contaminazione d'origine fecale durante la mungitura.

In certi casi si riscontrano nel latte pastorizzato a causa di trattamenti termici difettosi o insufficienti oppure per inquinamento delle tubazioni o della macchina confezionatrice.

Streptococchi

Gli streptococchi rientrano nelle forme patogene dei batteri lattici, sono cocchi Gram positivi, aerobi e vengono distrutti da un buon trattamento di pastorizzazione.

Lo *Streptococcus agalactiae* è il principale agente eziologico della mastite catarrale contagiosa dei bovini, ha la capacità di idrolizzare il lattosio e, aspetto molto importante, ha attività emolitica.

Lo *Streptococcus dysgalactiae*, solitamente non emolitico, è meno insidioso del precedente poiché sporadico, provoca però mastiti acute e anche piuttosto gravi.

Lo *Streptococcus pyogenes* patogeno per l'uomo reperito nelle mastiti streptococciche degli animali è beta-emolitico e assume un notevole interesse in patologia umana, specialmente nei casi di "angina streptococcica" di origine latte che possono assumere carattere di estrema gravità sia per il numero di individui colpiti sia per gli esiti letali relativamente frequenti.

Yersinia enterocolitica

Yersinia enterocolitica (figura 2.9) è un batterio bastoncellare Gram negativo, psicrotrofo, patogeno intestinale sia per gli animali che per l'uomo a causa della liberazione di una enterotossina termostabile che provoca problemi gastrointestinali e attacchi di appendicite.

Le sorgenti di infezione più comuni sono il bestiame, i maiali e i roditori che contaminano diversi alimenti tra cui il latte crudo. La refrigerazione rappresenta una condizione favorevole alla moltiplicazione, mentre i trattamenti termici di pastorizzazione sono risolutivi per l'eradicazione del germe.



© 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

Figura 2.9
Yersinia enterocolitica

Campylobacter

Il genere *Campylobacter* comprende batteri Gram negativi, asporigeni e termosensibili, facilmente inattivati dalla pastorizzazione.

Il principale serbatoio di infezione sono polli, bovini e suini.

L'uomo è solo un ospite occasionale e può infettarsi per ingestione di latte crudo e manifestare dissenteria.

Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli* sono commensali intestinali di animali domestici e selvatici che, veicolati dal latte crudo, colonizzano il tratto intestinale causando gastroenteriti con decorso generalmente benigno.

Bacillus anthracis

Batterio sporigeno, aerobio, Gram positivo, acidifica e coagula leggermente il latte.

Il suo habitat ideale sono il suolo e l'acqua, risulta veicolato dagli animali e dagli alimenti e può essere patogeno per l'uomo, poiché è l'agente eziologico del carbonchio ematico.

La sorgente di infezione è rappresentata dal bestiame, e la malattia è caratterizzata dalla formazione di pustole rischiose per allevatori, veterinari e mandriani che possono infettarsi per via cutanea.

Bacillus anthracis presenta spore molto resistenti all'essiccamento, facilmente distrutte però dalla pastorizzazione.

Pasteurella

Pasteurella è un Gram negativo asporigeno, agente eziologico delle setticemie emorragiche nei bovini, negli ovini e altri animali.

Tale microrganismo non resiste al processo di pastorizzazione.

Leptospira

Leptospira è un batterio Gram negativo, termolabile, appartenente alla famiglia delle Spirochetaceae, microrganismi a forma di filamento elicoidale che provocano la leptospirosi.

La malattia infettiva colpisce l'uomo, che può ammalarsi senza trasmettere ad altri l'infezione, e numerose specie di animali selvatici e domestici, anche se i principali portatori sono i roditori che diffondono i batteri attraverso le urine.

La contaminazione può avvenire sia per contatto diretto con animali infetti, sia tramite suolo, acqua, foraggi contaminati

Alcune patologie, note come **tossinfezioni**, sono determinate dalla presenza sia di tossine preformate nell'alimento che di batteri che producono tossine; i casi più studiati sono le tossinfezioni da *Clostridium perfringens* e da *Bacillus cereus*.

Clostridium perfringens

Clostridium perfringens è un grosso bastoncino sporigeno Gram positivo, immobile ed anaerobio obbligato. La produzione di tossine avviene durante il passaggio dalla forma vegetativa a quella di spora e può avvenire sia nell'alimento che nell'apparato gastrointestinale dell'ospite; delle sei tossine solo quella di tipo A è coinvolta nella tossinfezione. La causa di contaminazione del latte più frequente è costituita dallo sterco bovino pullulante di spore, da una scarsa pulizia delle mammelle e dall'alimentazione di vacche con insilati.

Data la relativa sensibilità della tossina al calore, questa viene inattivata a temperature superiori ai 60°C; gli alimenti più a rischio sono quelli non trattati termicamente.

Bacillus cereus

Bacillus cereus (figura 2.10) è un grosso bastoncino sporigeno Gram positivo che cresce bene a valori di pH compresi tra i 4,5 e 9,2 e a una temperatura tra i 30-37 °C. Oltre a causare processi deteriorativi in molti alimenti, tra cui il latte, è responsabile di tossinfezioni alimentari per l'elaborazione di un complesso enterotossico rappresentato da due esotossine:

1. la prima è una molecola che viene inattivata a 56 °C per 5 minuti, e provoca accumulo di liquido nell'intestino e diarrea;
2. la seconda è una tossina emetizzante, termostabile a 126 °C per 90 minuti, che provoca nausea e vomito.

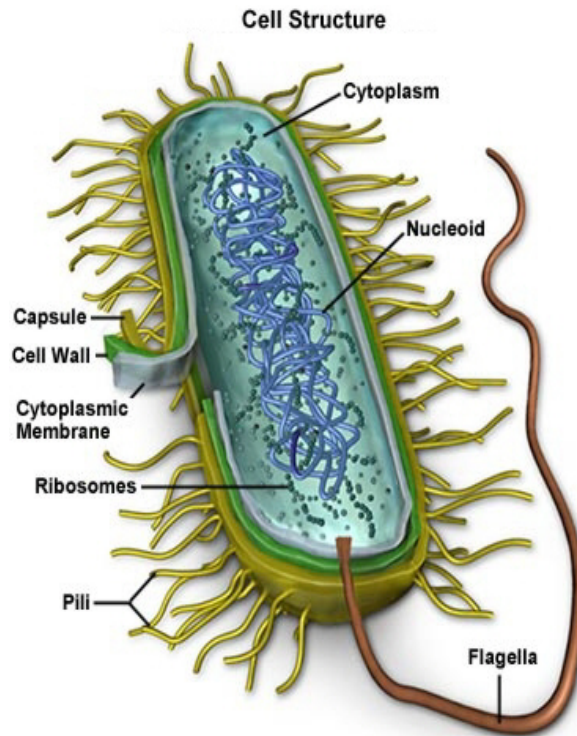


Figura 2.10
Sezione di bacillus cereus

Il rischio di tossinfezioni per ingestione di latte risiede nella termoresistenza delle spore alla temperatura di pastorizzazione e nella psicrotrofia della cellula vegetativa, in grado di moltiplicarsi anche intorno ai 70 °C.

Si definiscono **intossicazioni** le patologie che hanno come causa l'ingestione di tossine già presenti nell'alimento ove microrganismi tossigeni hanno potuto moltiplicarsi e svilupparsi.

La tossicità di tali forme microbiche è legata alla capacità di formare tossine che possono essere di due tipologie:

- endotossine;
- esotossine.

Le endotossine sono componenti della parete cellulare dei batteri Gram negativi e dal punto di vista chimico sono dei lipopolisaccaridi, cioè molecole di grassi legate a molecole di zuccheri.

L'attività tossica è associata alla parte lipidica e l'attività immunogenetica è collegata alla parte glucidica.

Le *endotossine*, quindi, non sono composti extracellulari prodotti dai batteri, ma sono componenti della membrana batterica che hanno azione tossica solo in seguito alla disaggregazione cellulare. Sono meno specifici, meno potenti delle esotossine, ma sono termoresistenti. La loro presenza denuncia quindi una precedente proliferazione batterica e la loro termoresistenza ha dato non pochi problemi.

Infatti, il trattamento a caldo che garantisce la sterilità (cioè assenza di cellule vive), non garantisce la mancanza dei residui dei corpi cellulari capaci di provocare rialzo della temperatura, ipertensione, iperglicemia ecc.

Le *esotossine* sono molecole proteiche semplici, termolabili con peso molecolare variabile, prodotte e liberate all'esterno dai batteri patogeni nei tessuti da loro colonizzati, raggiungono mediante la circolazione sanguigna qualsiasi distretto corporeo; in tal modo anche un'infezione localizzata può causare interessamento generale.

La loro caratteristica risiede nella possibilità di essere prodotte già negli alimenti, come nel caso dello *Staphylococcus* e del *Clostridium botulinum* o successivamente nell'uomo come per il *Clostridium perfringens*; il loro organo di attacco preferenziale è solitamente l'intestino per cui vengono dette anche enterotossine.

Fa eccezione il *Clostridium botulinum* che produce neurotossine con azione sul sistema nervoso.

Le esotossine hanno diversi meccanismi di azione; alcune agiscono come enzimi, altre si comportano come antimetaboliti, altre esercitano i loro effetti patogeni in maniera del tutto sconosciuta.

Tossine da Stafilococchi

Gli Stafilococchi fermentano il glucosio con notevole abbassamento del pH.

I microbiologi degli alimenti distinguono tale batterio in due gruppi: quelli patogeni come lo *Staphylococcus aureus*, capace di produrre enterotossine, e quelli non patogeni incapaci di creare tossine, ma testimoni di scarsa igienicità.

Lo *Staphylococcus aureus* è un batterio di forma coccica, Gram positivo, anaerobio facoltativo, saprofita delle mucose e della cute di uomo e animali.

La sua principale caratteristica è quella di produrre un enterotossina termostabile, pertanto i normali trattamenti di cottura non sono in grado di inattivarla.

Sono abitualmente state identificate 5 diverse enterotossine indicate come A-B-C-D- ed E.

La tossina A è quella maggiormente implicata nei casi di intossicazione (circa 80%), seguono poi la D, la C e la B, mentre la E è molto rara.

Si tratta di proteine semplici e benché diverse tra loro possiedono una certa capacità di reazione incrociata.

La fonte principale di *Stafilococchi* enterotossici è rappresentata dall'uomo e dagli animali colpiti da mastiti, ferite e affezioni alle vie respiratorie.

Tra i principali gruppi di microrganismi alterativi del latte responsabili di intossicazione troviamo:

- coliformi;
- pseudomonas;
- batteri lattici.

Tra le Enterobacteriaceae più frequentemente riscontrate nel latte e derivati ricordiamo i *Coliformi* (termine generico che comprende: *E. coli* (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klesbiella*). Sono batteri bastoncellari Gram negativi, aerobi-anaerobi facoltativi, asporigeni, generalmente non patogeni. Una proprietà biochimica di questi batteri è la fermentazione degli zuccheri con liberazione di gas, di acidi e sostanze dal sapore sgradevole. Questa loro caratteristica è accresciuta dalla facoltà di svilupparsi a temperature molto diverse che vanno dai 10 °C ai 40 °C. Li possiamo ritrovare nelle feci, nelle acque, nel terreno e nei vegetali grazie alle loro scarse esigenze nutrizionali, al fatto di essere psicrotrofi e di crescere in un ampio *range* di pH. La loro presenza negli alimenti è indice di inquinamento e segnala il rischio potenziale della contemporanea presenza di enterobatteri patogeni. La conta di questi batteri è uno dei mezzi più significativi per valutare la qualità igienica del latte e l'efficacia dei trattamenti di risanamento che esso ha subito.

Nella microflora psicrotrofa del latte rileviamo un'altra famiglia di batteri, quella della *Pseudomonadaceae*, bacilli asporigeni, Gram negativi, aerobi facoltativi o obbligati e psicrotrofi. Si tratta di forme saprofiti che si trovano nel terreno, nell'acqua e sui vegetali e hanno un optimum di temperatura basso (20-30 °C). Sono ubiquitari e molto frugali e risultano indesiderabili per la loro attività proteolitica e lipolitica.

A seguito di una contaminazione ambientale, il latte può contenere una certa quantità di *Batteri Lattici* in grado di modificare il sapore e l'odore caratteristico di questo alimento. Si tratta di bacilli Gram positivi, asporigeni, immobili, anaerobi, in grado di fermentare gli zuccheri con la produzione di acido lattico. Questo processo può determinare la coagulazione del latte a causa della precipitazione della caseina e della diminuzione del pH che, a sua volta, favorisce lo sviluppo di batteri che decompongono le sostanze organiche, accelerando i processi putrefattivi. In relazione alla temperatura, i batteri lattici si distinguono in mesofili e termofili. I primi si sviluppano a temperature al di sotto dei 40 °C, come *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc lactis*, i secondi si accrescono a temperature superiori ai 40 °C e sono in genere riscontrabili nei formaggi cotti.

2.4.2 Le contaminazioni da lieviti e muffe

I lieviti sono microrganismi attribuiti in genere al regno vegetale, aerobi facoltativi che, crescendo più facilmente in presenza di aria, sono sensibili al calore; un buon trattamento di pastorizzazione infatti, uccide sia loro sia eventuali spore. Nel latte crudo si trovano frequentemente lieviti non sporigeni (genere *Candida*), che producono gas, lieviti sporigeni, che sviluppano alcool fermentando il lattosio, altri ancora in grado di conferire gusti sgradevoli e colorazioni anormali.

Le muffe sono microrganismi eucarioti, eterotrofi, filamentosi e presentano una riproduzione che avviene per mezzo di spore, risultando estremamente resistenti ed adattabili alle diverse condizioni ambientali. Per questo motivo le ritroviamo ovunque sulle pareti, sulle superfici, sui soffitti e nei canali di aerazione, di conseguenza vanno eliminate immediatamente prima che possano produrre numerosi danni:

- sgradevoli colorazioni (come feltri sulla superficie degli alimenti);
- alterazione del latte e dei suoi derivati (in particolare i generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Geotrichum candidum*);
- produzione di sostanze tossiche quali le micotossine.

Le micotossine sono molecole tossiche prodotte naturalmente dal metabolismo di alcune specie di funghi, generalmente saprofiti, appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, che si sviluppano in particolari condizioni su foraggi insilati, cereali e mangimi aziendali o industriali. Lo sviluppo delle muffe e dei loro metaboliti sulle derrate alimentari può verificarsi in qualsiasi fase del ciclo produttivo, a partire dalla coltivazione fino ad arrivare al consumo:

- in campo, prima del raccolto, a seguito di condizioni ambientali sfavorevoli (eccessiva umidità, temperature elevate, infestazione da insetti) o di pratiche colturali inadeguate (mancanza di rotazione delle colture, sistema di irrigazione improprio, eccessivo utilizzo di pesticidi);
- in seguito al momento del raccolto, durante il trasporto o lo stoccaggio a causa di scorrette pratiche di conservazione delle derrate alimentari.

Tra gli alimenti di origine animale e quindi di interesse per l'alimentazione umana, il latte ed i suoi derivati sono i prodotti più frequentemente contaminati dalla presenza di micotossine, a causa del trasferimento di questi metaboliti dai mangimi, foraggi e cereali contaminati. I bovini sono in grado di operare una bioconversione ruminale delle micotossine in prodotti meno dannosi, tuttavia non risultano immuni dalla loro azione nociva. Infatti, si possono riscontrare sintomi caratteristici come diminuzione o aumento di ingestione di sostanza secca. Nel primo caso si può pensare ad una presenza di aflatossine, nel secondo alla presenza della tossina DON o zearalenone .

Le condizioni ideali per lo sviluppo dei funghi sono:

- **umidità ambientale o acqua libera (aw):** definita come il rapporto tra la pressione di vapore di un substrato rispetto all'acqua pura, è utile nello stimare le probabilità di sviluppo fungino. In base al diverso comportamento in funzione della disponibilità di acqua, le muffe sono state suddivise in: igrofile, mesofile, xerofile. Pertanto, se un substrato presenta un valore basso d'acqua libera, c'è una minore disponibilità d'acqua per lo sviluppo fungino.
- **temperatura:** le temperature ideali per lo sviluppo dei funghi sono comprese tra 15 e 30 °C, con un optimum di 20-25 °C. In effetti, alcune tossine, come le ocratossine ed i tricoteceni, possono ritrovarsi già a temperature di + 4-6 °C (ottimale sui 18 °C), mentre le aflatossine vengono prodotte preferibilmente in condizioni di caldo-umido (ottimale sui 25 °C). Climi più temperati e secchi sono ideali per le muffe produttrici di fumonisina e zearalenone (temperatura di sviluppo intorno ai 14 °C).
- **pH e ossigeno:** Lo sviluppo delle muffe si verifica generalmente con valori di pH compresi tra 4 e 8; alcune di esse, tuttavia, sono in grado di comparire anche a valori più bassi o più elevati. Generalmente, le muffe, essendo organismi aerobi, si sviluppano sulla superficie dei substrati. Diverse specie, tuttavia, possono crescere anche in profondità o su substrati liquidi, con bassa disponibilità di ossigeno.

2.5 Metodologie analitiche per sieroproteine e lattosio

Le metodologie analitiche per determinare le concentrazioni delle sieroproteine presenti nella matrice siero e nelle frazioni separate con tecniche di membrana comprendono:

- la metodica Kieldhal (proteine totali tramite la misura dell'azoto trasformato in ammonio);
- l'elettroforesi su gel (tecnica qualitativa);
- l'HPLC tecnica di separazione e rilevazione a fotodiodi (sistema Waters.)

2.5.1 Analisi delle sieroproteine

Le metodologie analitiche per la determinazione delle SP nella soluzione reale di siero o di latte comprendono tecniche tradizionali come il metodo Kieldahl per l'azoto proteico e per l'azoto non proteico (NPN), quelle prevalentemente qualitative come l'elettroforesi su gel, e quelle spiccatamente quantitative come l'HPLC con sistemi di rilevazione del tipo DAD (Diode Array Detector) oppure ultravioletto (UV).

Di seguito vengono brevemente descritte alcune di queste metodologie analitiche, pochissimo utilizzate in Italia: nel nostro Paese il siero di latte rimane un oggetto sconosciuto. Gli istituti ed i laboratori che si occupano routinariamente di analisi del settore lattiero-caseario, non sono in grado di determinare specificatamente le SP, se non in forma grossolana. Ad esempio si eseguono analisi Kjeldahl sul siero, senza conoscere il contenuto delle singole molecole sieroproteiche, per non parlare dei peptici bioattivi.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide con SDS

Questa tecnica si basa sulla corsa delle singole molecole sieroproteiche che vengono sottoposte ad un campo elettrico che le fa muovere su una lastrina di poliacrilammide con SDS (sodio dodecil solfato). La tecnica richiede un'elevata manualità e l'osservanza di un protocollo analitico estremamente rigoroso, altrimenti si ottengono delle corse elettroforetiche che non permettono l'identificazione chimica delle singole famiglie sieroproteiche.

L'impiego di standard analitici, di assoluta purezza, è essenziale per una buona analisi qualitativa e offre indicazioni sulla quantitativa.

Principio

Il metodo elettroforetico è utilizzato per l'analisi qualitativa delle famiglie proteiche presenti nelle diverse matrici di siero e nelle frazioni separate. Attraverso la mobilità elettroforetica nel gel di poliacrilammide è possibile identificare le proteine presenti nel campione. L'elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) è una delle tecniche che meglio si adattano ad una rapida visualizzazione dello stato di purezza di una preparazione proteica. Le proteine migrano attraverso le maglie del polimero, sotto l'effetto di un campo elettrico, in base a tre caratteristiche: peso molecolare, carica netta e conformazione strutturale.

Apparecchiature

- Power Pac Universal Biorad (figura 2.11)
- Tank & Lid With Cables
- Casting module 0,75 MM-10 Wellcomb
- Mini-Protean II Upgrade Kit
- Frigorifero
- Generatore di acqua ultrapura (Human Power I)
- Bilancia analitica $\pm 0,0001$ g
- Vortex
- Agitatore magnetico termostato
- Pipettatrice automatica Gilson
- Aspiratore automatico
- Agitatore basculante.

Materiali e reagenti

Materiali

- Navicelle in plastica
- Tubi in polipropilene da 15 ml (Falcon)
- Eppendorf da 1,5 ml
- Puntali per micropipette automatiche da 5 ml, 1 ml, 200 μ l
- Puntali per micropipette automatiche da 100 μ l per elettroforesi
- Cilindri graduati da 500 ml
- Guanti in lattice
- Mascherine
- Parafilm
- Matracci da 10 ml di classe a, da 100 ml di classe a, da 500 ml di classe a

Reagenti

- Acrylamide, 99,9% *Electrophoresis Purity Reagent* (Bio-Rad)
- Bis N,N'- Methylene-bis-acrylamide *Electrophoresis Purity Reagent* (Bio-Rad)
- TRIS (hydroxymethyl)-aminomethane *Electrophoresis Purity Reagent* (Bio-Rad)
- Sodium dodecyl sulphate (SDS) *Electrophoresis Purity Reagent* (Bio-Rad)
- N,N,N',N'-Tetra-methylethylenediamine TEMED (Bio-Rad)
- Ammonium Persulfate (APS) (Bio-Rad)
- Tris/glicine/SDS 10X Buffer (Bio-Rad)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad)
- Laemmli sample buffer (Bio-Rad)
- 2-Mercaptoethanol *Electrophoresis Purity Reagent* (Bio-Rad)
- Acqua distillata
- Acido cloridrico 36-38% (J.T. Baker)
- Acido acetico 99-100% glaciale (J.T. Baker)
- Alcol metilico (J.T. Baker)
- Lattoferrina (*Lf*) purezza minima 90% (Sigma)
- Immunoglobulina (*Img*) purezza minima 95% (Sigma)
- Albumina serica bovina (*BSA*) purezza minima 96% (Sigma)
- β -lattoglobulina (β -*Lg*) purezza minima 90% (Sigma)
- Lattoperossidasi (*Lp*) (Sigma)
- α -lattalbumina (α -*La*) purezza minima 85% (Sigma).



Figura 2.11
Power Pac Universal Biorad, Tank & Lid With Cables, Casting module 0,75
MM-10 Wellcomb, Mini-Protean II Upgrade Kit

Modalità Operative

Precauzioni

L'acrylamide ed i reagenti utilizzati per l'elettroforesi sono particolarmente nocivi, pertanto è necessario proteggersi con l'uso di guanti e mascherine.

Preparazione delle soluzioni

- I. *Soluzione di acrylamide/bisacrylamide al 12%*: pesare 3,00 g di acrylamide e 0,08 g di bisacrylamide. Trasferire le polveri in una Falcon da 15 ml e lentamente portare al volume di 10 ml con acqua distillata.
- II. *Soluzione di APS al 10%*: in una Eppendorf da 1,5 ml pesare 0,03 g di APS ed aggiungere 300 µl di acqua distillata.
- III. *Soluzione di SDS al 10%*: sciogliere 10 g di SDS, in un matraccio da 100 ml, e portare a volume con acqua distillata.
- IV. *Separating gel buffer*: sciogliere 90,8 g di TRIS, in un matraccio da 500 ml, con 20 ml di SDS al 10% e 300 ml di acqua distillata. Aggiustare il pH a 8,8 con HCl e portare al volume di 500 ml con acqua distillata.
- V. *Separating gel*: introdurre in una Falcon da 15 ml i seguenti componenti:
 - 3,20 ml della soluzione (I) acrylamide/bisacrylamide al 12%;
 - 2,00 ml del separating gel buffer (IV);
 - 2,80 ml di acqua distillata;
 - 45 µl della soluzione (II) di APS al 10%;
 - 10 µl di TEMED.

Agitare delicatamente.

- VI. *Stacking gel buffer*: sciogliere 30,3 g di TRIS, in un matraccio da 500 ml, con 20 ml di SDS al 10% e 300 ml di acqua distillata. Aggiustare il pH a 6,8 con HCl e portare al volume di 500 ml con acqua distillata.
- VII. *Stacking gel*: introdurre in una Falcon da 15 ml i seguenti componenti:
 - 0,75 ml della soluzione (I) acrylamide/bisacrylamide al 12%;
 - 1,25 ml del stacking gel buffer (VI);

- 3,00 ml di acqua distillata;
- 30 µl della soluzione (II) di APS al 10%;
- 5 µl di TEMED.

Agitare delicatamente.

VIII. *Laemmli buffer*: introdurre (in una Eppendorf da 1,5 ml) 950 µl di Laemmli sample buffer e 50 µl di 2-mercaptoetanol e “vortexare” per 60 s.

IX. *Running buffe*: in un cilindro da 500 ml trasferire 30 ml di Tris/glicine/SDS 10X Buffer e portare al volume di 300 ml con acqua distillata.

X. *Soluzione colorante*: in un matraccio da 500 ml introdurre i seguenti componenti:

- 50 ml di acido acetico glaciale;
- 200 ml di alcol metilico;
- 250 ml di acqua distillata;
- 0,5088 g di Coomassie Brilliant Blue R-250.

XI. *Soluzione decolorante*: in un matraccio da 500 ml introdurre i seguenti componenti:

- 50 ml di acido acetico glaciale;
- 200 ml di alcol metilico;
- 250 ml di acqua distillata.

XII. *Soluzioni madre di sieroproteine di 1mg/ml*: pesare 10 mg di lattoferrina in un matraccio da 10 ml e portare a volume con acqua distillata. Ripetere l’operazione per l’immunoglobulina, l’albumina serica bovina, la β -lattoglobulina, la lattoperossidasi e la α -lattoalbumina.

Impostazione corsa elettroforetica con Power Pac Universal Biorad

Il programma di migrazione elettroforetica utilizzato è il seguente:

1° step: 50 Volt per 15 min

2° step: 110 Volt per 75 min.

Preparazione di campioni e standard

Prelevare 20 µl di campione o di soluzione standard (XII), trasferirli in una Eppendorf ed aggiungere 40 µl di Laemmli buffer (VIII). “Vortexare” per 5 min. e riscaldare a bagnomaria a 90 °C per 5 min.

Metodica d’analisi

Inserire i vetrini da elettroforesi nel porta vetrini (Casting Frame).

Inserire 3 ml di separating gel (V) tra i vetrini e aspettare che polimerizzi.

Aggiungere lo stacking gel e posizionare i pozzetti spaziatori.

Avvenuta la polimerizzazione estrarre i vetrini dal Casting Frame ed inserirli nell’Electrode Assembly quindi incastrarli nel Clamping Frame ed introdurre il tutto nel Mini Tank.

Estrarre con cura i pozzetti spaziatori ed introdurre in corrispondenza di ciascun pozzetto 20 µl di campione o standard.

Riempire la vaschetta (Mini Tank) con il running buffer (IX).

Impostare ed avviare il programma di corsa elettroforetica.

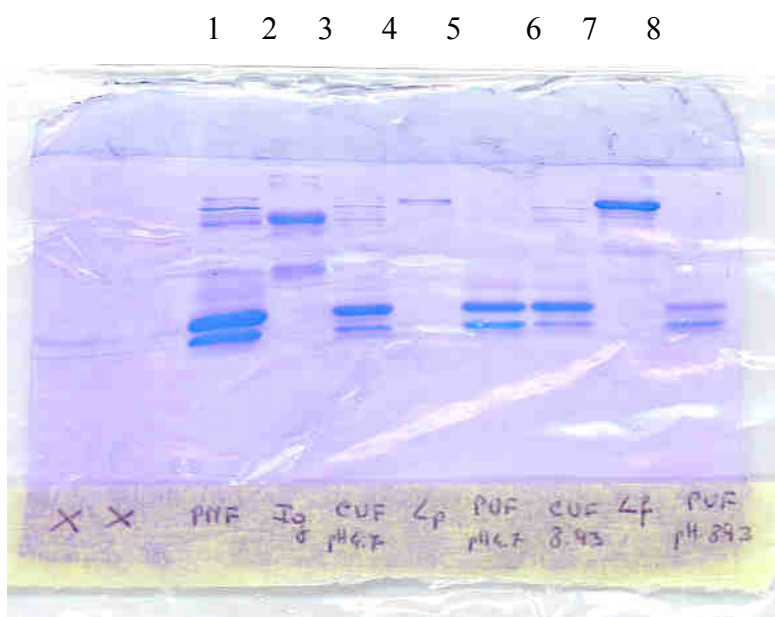
Completata la corsa, estrarre i vetrini, staccare il gel ed introdurlo in 500 ml di soluzione colorante (X) per 30 min. su agitatore basculante.

Allontanare la soluzione colorante e sostituirla con la soluzione decolorante (XI) fino a completa decolorazione del gel.

Recuperare il gel e conservarlo in frigo a 4 °C.

Tale metodica è stata utilizzata per l'analisi di frazioni di siero, in particolare per rivelare la presenza di sieroproteine nel permeato di microfiltrazione (PMF), nel permeato di ultrafiltrazione (PUF) e nel concentrato di ultrafiltrazione (CUF) di siero ovino portati ai diversi pH.

Gli standard utilizzati per questa analisi sono: Img, Lp, Lf, BSA, α -La.



1. PMF 0,2 µm non diluito
2. Img
3. CUF 100 kD pH 7 diluito 1:30
4. Lp
5. PUF 100 kD pH 7 non diluito
6. CUF 100 kD pH 8,93 diluito 1:30
7. Lf
8. PUF 100 kD pH 8,93 non diluito

Figura 2.12
Elettroforesi su gel di poliacrilammide relativa al permeato di microfiltrazione e a permeati e concentrati di ultrafiltrazione a differenti pH

Analisi con cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC)

Principio

La cromatografia riunisce un gruppo di metodi in grado di separare componenti chimicamente simili fra loro da miscele complesse. In tutte le separazioni cromatografiche il campione viene disciolto in una fase mobile, che può essere un gas,

un liquido, o un fluido supercritico. Questa fase mobile viene poi fatta passare attraverso una fase stazionaria, immiscibile, posta in una colonna o su una superficie solida. Le due fasi vengono scelte in modo tale che i composti presenti nel campione si distribuiscano in diversa proporzione tra la fase mobile e quella stazionaria. I componenti che vengono maggiormente trattenuti dalla fase stazionaria eluiscono più lentamente.

Al contrario, i componenti che vengono debolmente trattenuti dalla fase stazionaria, eluiscono più rapidamente. Aggiunte continue di fase mobile trasportano le molecole dell'analita lungo la colonna: lungo il tragitto ha luogo una serie continua di scambi tra la fase mobile e quella stazionaria.

Si possono così isolare le singole specie facendo eluire una quantità di fase mobile sufficiente a far giungere le bande isolate in fondo alla colonna, dove possono essere rivelate qualitativamente e/o quantitativamente.

Apparecchiature

- HPLC Waters W600
- Autocampionatore Waters 717 plus
- Rivelatore UV a fotodiodi Waters W2996
- Colonna RESOURCETM RPC 3 ml impaccata con SOURCETM 15RPC (6,4 i.d. X 100 mm)
- PC Intel Pentium IV
- Software Empower per la gestione HPLC 1
- Apparecchio ad ultrasuoni
- Agitatore magnetico
- Micropipette automatiche Gilson (10, 100, 200, 1000, 5000 µl)
- Generatore di acqua ultrapura (Human Power I)
- Bilancia analitica Orma model BC

Materiali e reagenti

Materiali

- Spatole in acciaio inox della Falc
- Navicelle in plastica mm 40 x 40 della Carlo Erba Reagenti
- Vials 1 ml Waters WAT02505c
- Guanti in lattice
- Mascherine
- Parafilm
- Puntali per micropipette automatiche da 5 ml, 1 ml
- Puntali per micropipette automatiche da 100 µl, 200µl
- Matracci da 5, 10, 20 ml di classe A

Reagenti

- Acetonitrile per HPLC (Carlo Erba)
- Metanolo per HPLC (J.T. Baker)
- Acido Trifluoroacetico 99% (Carlo Erba)
- Acqua ultrapura
- Elio per degasaggio eluenti
- Lattoferrina (Lf) purezza minima 90%
- Immunoglobulina (ImG) purezza minima 95%
- Albumina serica bovina (BSA) purezza minima 96%

- β -lattoglobulina (β -Lg) purezza minima 90%
- Lattoperossidasi (Lp)
- α -lattalbumina (α -La) purezza minima 85%.

Modalità operative

Preparazione delle soluzioni

- I. *Soluzione madre di α -lattalbumina (α -La) di 1000 ppm:* sono stati pesati 10 mg di α -Lattalbumina e sono stati portati a volume con H₂O ultrapura in un matraccio da 10 ml.
- II. Tre campioni della soluzione madre sono stati successivamente diluiti fino alle concentrazioni desiderate di 500, 100 e 10 ppm;
- III. *Soluzione madre di β -lattoglobulina (β -Lg) di 1000 ppm:* sono stati pesati 10 mg di β -lattoglobulina e sono stati portati a volume con H₂O ultrapura in un matraccio da 10 ml. Tre campioni della soluzione madre sono stati successivamente diluiti fino alle concentrazioni desiderate di 200, 50 e 20 ppm;
- IV. *Soluzione madre di Albumina Serica Ovina (BSA) di 1000 ppm:* sono stati pesati 10 mg di Albumina Serica Ovina (BSA) e sono stati portati a volume con H₂O ultrapura in un matraccio da 10 ml. Tre campioni della soluzione madre sono stati successivamente diluiti fino alle concentrazioni desiderate di 500, 100 e 10 ppm;
- V. *Soluzione madre di Immunoglobuline (ImG) di 2000 ppm:* sono stati pesati 20 mg di Immunoglobuline (ImG) e sono stati portati a volume con H₂O ultrapura in un matraccio da 20 ml. Tre campioni della soluzione madre sono stati successivamente diluiti fino alle concentrazioni desiderate di 1000, 100 e 10 ppm;
- VI. *Soluzione madre di Lattoferrina (Lf) di 100 ppm* sono stati pesati 1 mg di Lattoferrina (Lf) e sono stati portati a volume con H₂O ultrapura in un matraccio da 10 ml.
- VII. Tre campioni della soluzione madre sono stati successivamente diluiti fino alle concentrazioni desiderate di 50, 20 e 10 ppm;
- VIII. *Soluzione madre di Lattoperossidasi (Lp) di 1000 ppm* sono stati pesati 10 mg di Lattoperossidasi (Lp) e sono stati portati a volume con H₂O ultrapura in un matraccio da 10 ml. Tre campioni della soluzione madre sono stati successivamente diluiti fino alle concentrazioni desiderate di 100, 50 e 20 ppm;

HPLC

- Fasi mobili: *eluente A*: H₂O ultrapura con lo 0,1% di Acido Trifluoroacetico (TFA);
- *eluente B*: acetonitrile (ACN) con lo 0,1% di TFA;
- *eluente D*: metanolo (CH₃OH) per la conservazione della colonna;
- Flusso: 1 ml/min;
- Loop : 20 μ l;
- Lunghezza d'onda: 214 nm selezionata in un *range* di 200-400 nm;
- Colonna utilizzata: Resource RPC 3 ml

In figura 2.13 si riporta un cromatogramma HPLC di standard sieroproteici.

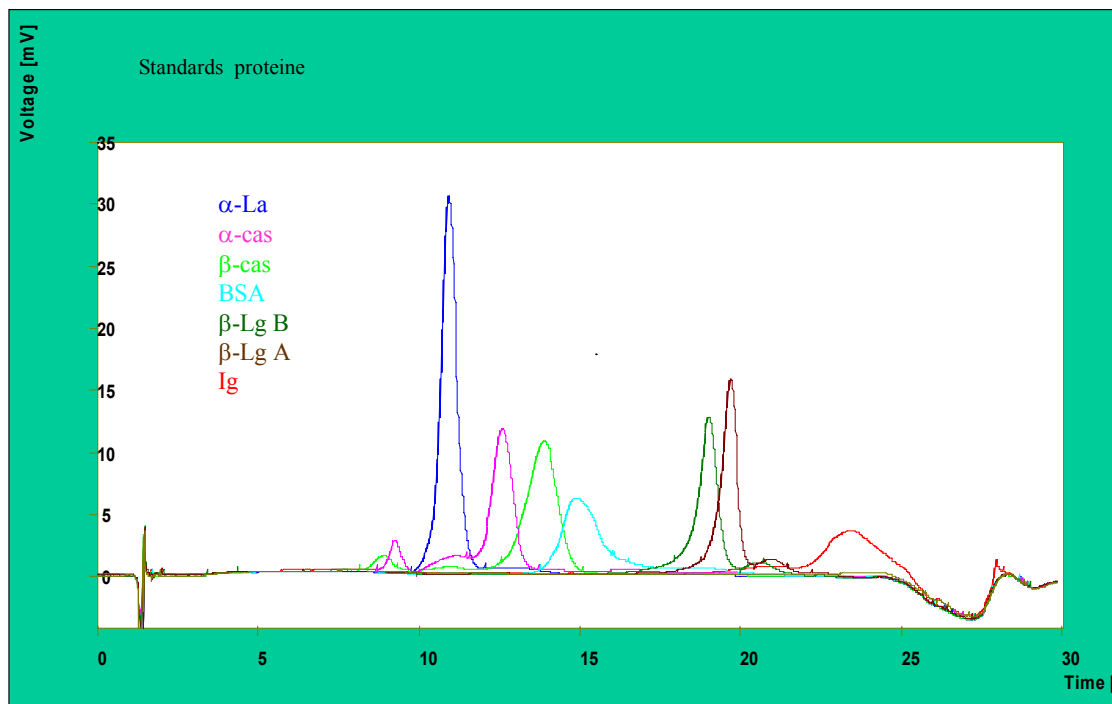


Figura 2.13
Cromatogramma HPLC standard di sieroproteine Sigma-Aldrich

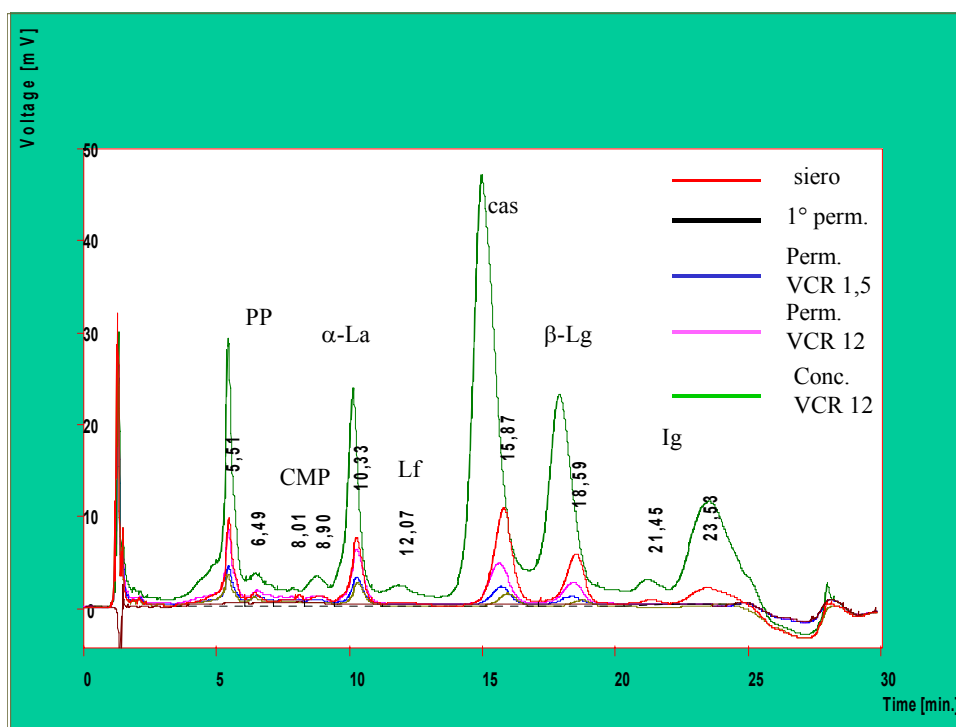


Figura 2.14
HPLC del siero ovino, del concentrato finale e dei permeati di UF

Le analisi delle sieroproteine nelle correnti liquide ottenute dal trattamento di UF del siero sono riportate nel cromatogramma HPLC di figura 2.14.

Nel cromatogramma si vedono i proteo peptoni (PP) e i caseino macropeptidi (CMP) che escono dalla colonna entro i primi 8 minuti dopo l'iniezione del campione.

È da notare come si vengono a concentrare le SP nel retentato di UF ottenuto a VCR 12.

Nella figura si possono anche notare le concentrazioni di SP che si perdono nel permeato di UF, che tuttavia rimangono al di sotto dell'1 % rispetto a quelle del siero di partenza (tracciato in rosso).

2.5.2 Analisi dei glucidi per HPLC con rivelatore IR

Scopo

Determinazione dei glucidi mediante tecniche di cromatografia ionica ad alta pressione con rivelatore ad indice di rifrazione.

Principio

Le determinazioni dei glucidi sono state eseguite mediante HPLC con rivelatore ad indice di rifrazione. Questo tipo di rivelatore è utilizzato principalmente per quei composti che non hanno forti gruppi cromofori; tradizionalmente si applica all'analisi dei carboidrati e dei lipidi. La colonna cromatografica opera per scambio ionico, mediante gruppi solfonici ai quali sono legati ioni calcio in grado di formare legami di coordinazione con gli analiti.

Apparecchiature

- Pompa isocratica Waters 1515 (figura 12.5);
- Detector ad indice di rifrazione Waters 2414
- Modulo di controllo della temperatura Waters TCM II
- Fornetto esterno Waters CHM
- Degasatore Waters In-line degasser AF
- Colonna Waters Sugar-Pak I (6,5 i.d. x 300 mm)
- Software Empower per la gestione HPLC 2
- Apparecchio ad ultrasuoni;
- Agitatore magnetico;
- Pipettatrici automatiche Gilson;
- Bilancia analitica $\pm 0,0001$ g;
- Aspiratore automatico;
- Generatore di acqua ultrapura (Human Power I);

Materiali e reagenti

Materiali

- Ancorette magnetiche;
- Beaker;
- Bottiglie per reagenti da 1 l;
- Filtri (SRP 25 0,45 μ m);
- Guanti in lattice;
- Imbuti in vetro;
- Mascherine;

- Matracci da 50 ml di classe A;
- Matraccio da 1 l di classe A;
- Navicelle in plastica;
- Occhiali;
- Pipette graduate in vetro da 25 ml;
- Pipette Pasteur;
- Puntali per micropipette automatiche da 5 ml e 1 ml;
- Spatole;
- Spruzzette;
- Tettarelle.

Reagenti

- Acqua distillata;
- Acqua ultrapura;
- Lactose anhydrous;
- D-(+) Glucose;
- Galactose;
- Maxilact (β -galattosidasi da *Kluyveromyces lactis*).



Figura 2. 15
Analizzatore HPLC Waters

Modalità Operative

Preparazione delle soluzioni

- (I) *Soluzione madre di galattosio, glucosio e lattosio 500 ppm*: pesare 10 mg di galattosio, 10 mg di glucosio e 10 mg di lattosio in un matraccio da 10 ml e portare a volume con acqua distillata. Agitare.
- (II) *Soluzione di galattosio, glucosio e lattosio 50 ppm*: prelevare 1 ml della soluzione (I), trasferirli in un matraccio da 10 ml e portare a volume con acqua distillata. Agitare.
- (III) *Soluzione di galattosio, glucosio e lattosio 100 ppm*: prelevare 2 ml della soluzione (I), trasferirli in un matraccio da 10 ml e portare a volume con acqua distillata. Agitare.
- (IV) *Soluzione di galattosio, glucosio e lattosio 200 ppm*: prelevare 4 ml della soluzione (I), trasferirli in un matraccio da 10 ml e portare a volume con acqua distillata. Agitare.

HPLC

- Fase mobile: acqua ultrapura
- Flusso: 0,5 ml/min;
- Loop: 20 µl;
- Temperatura del detector: 35 °C
- Temperatura della colonna: 90 °C

Metodica d'analisi

Quando il segnale della linea di base risulta stabile, procedere con le seguenti iniezioni:

Iniettare 20 µl della soluzione (II).

Iniettare 20 µl della soluzione (III).

Iniettare 20 µl della soluzione (IV).

Iniettare 20 µl della soluzione (V).

Le soluzioni di galattosio, glucosio e lattosio 50 ppm (II), 100 ppm (III) e 200 ppm (IV) sono state utilizzate per la costruzione delle curve di calibrazione (figura 2.16) che permettono di effettuare un'analisi quantitativa dei glucidi.

In figura 2.16 viene mostrato il cromatogramma della soluzione di zuccheri a diverse concentrazioni utilizzata per la costruzione delle rette di calibrazione.

Con i dati di calibrazione acquisiti si può quindi procedere all'analisi del campione iniettandone 20 µl dopo essere stato opportunamente diluito di un fattore minimo di 1:500 e filtrato con filtro 0,45 µm, per allontanare eventuali impurezze.

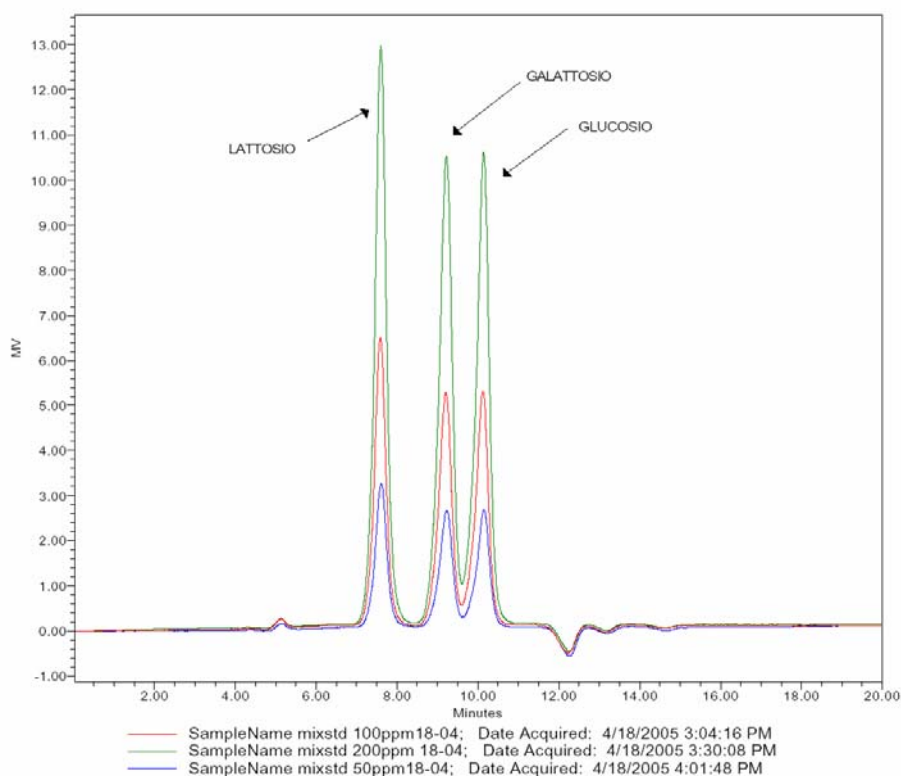


Figura 2.16
Cromatogramma delle soluzioni standard a diverse concentrazioni

2.6 Bibliografia

Alais (1995). Scienza del latte, Hoepli.

Boisvert; I., M., C., Castenada (1993). "Riboflavin requirement of healthy elderly humans and its relationship to the macronutrient composition of the diet." J. Nutr. **123**: 915-925.

Bottazzi (1993). Microbiologia lattiero-casearia, Edagricole.

Kirschmann, G. J. (2002). Almanacco della Nutrizione. Roma, Ed. Alfa Omega

M. Pizzichini, C. R., P. Feliziani (2003). "Prodotti ad alto valore biologico dal siero di caseificazione." AGRIculture **3**: 15-19.

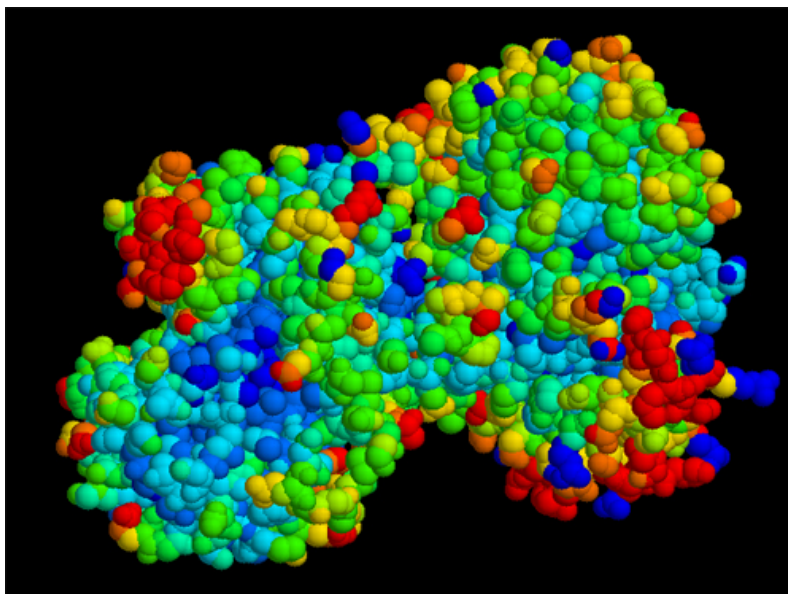
P. Cayot, D. L. (1996). "Structure-Function Relationships of Whey Proteins." Food Proteins and their Applications.

Pizzichini M., R. M., F. Ruscio (2001). "Il siero di latte: da rifiuto zootecnico a materia prima per alimenti e farmaci." L'Informatore Agrario **16**: 49-53.

Powers, H. J. "Riboflavin and health." American J of Clinical Nutrition.

CAPITOLO 3

LE SIEROPROTEINE



Indice dei paragrafi

3.1 La struttura delle proteine	53
3.2 La lattoferrina (LF)	56
3.3 Le immunoglobuline (Igg)	57
3.4 La β -lattoglobulina (β -LG)	59
3.5 La α -lattalbumina (α -LA)	60
3.6 La lattoperossidasi (LP)	62
3.7 La sieroalbumina (SA)	63
3.8 Proprietà nutrizionali e funzionali delle sieroproteine	64
3.9 Proprietà biomediche delle sieroproteine	68
3.10 Denaturazione termica e coagulazione	70
3.11 Ciclo di lavorazione del latte	71
3.12 Bibliografia	72

3.1 La struttura delle proteine

Le proteine sono copolimeri lineari ottenuti per condensazione di amminoacidi (monomeri) legati tra loro da un legame ammidico o peptidico (-CO-NH-), a questo legame e alle sue caratteristiche chimico-fisiche sono collegate numerose proprietà delle proteine.

Il legame peptidico non è un legame semplice, ma ha un'elevata percentuale (circa il 40%) di doppio legame. Questo fatto, da attribuire al peso che la formula limite ha nell'ibrido di risonanza (figura 3.1), conferisce una certa rigidità al gruppo -CO-NH-

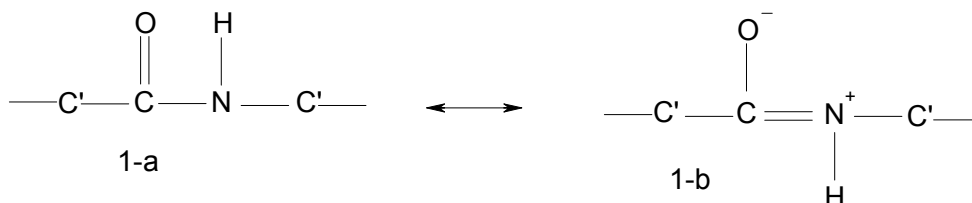


Figura 3.1
Risonanza nel legame peptidico nelle proteine

Le proteine hanno un peso molecolare che varia in un *range*: da 6.000 a 7.000.000 Dalton.

Nell'organismo vivente svolgono essenzialmente una funzione strutturale e catalitica (enzimi). La loro struttura risulta particolarmente complessa.

La determinazione della struttura delle proteine consiste nello stabilire, infatti, non solo l'esatta sequenza dei vari amminoacidi e il numero delle catene che compongono la proteina, ma anche la loro disposizione nello spazio.

Normalmente, parlando della struttura delle proteine si fa riferimento a quattro diversi livelli di complessità: struttura primaria, struttura secondaria, struttura terziaria e struttura quaternaria.

Struttura primaria (figura 3.2): si determina con tecniche cromatografiche, ci rivela quali amminoacidi sono presenti nella molecola, quante volte ogni amminoacido ricorre nella molecola, la sequenza degli amminoacidi, ossia in che ordine gli amminoacidi sono legati l'uno all'altro.

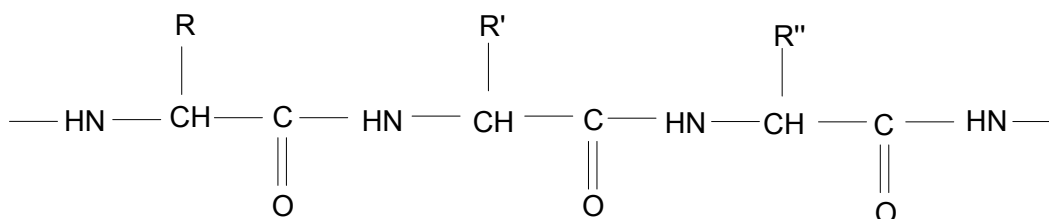


Figura 3.2
Rappresentazione della struttura primaria di una proteina. R,R',R'' sono gruppi sostituenti diversi

Struttura secondaria. A causa del contributo della formula limite all'ibrido di risonanza che descrive il legame peptidico, gli atomi C'-C-N-C' si trovano a giacere su un piano (figura 3.3); la struttura peptidica, perciò, ha, in corrispondenza di questa zona un elemento di rigidità, mentre può ruotare intorno ai legami C-C e N-C caratterizzati, rispettivamente, dagli angoli torsionali ϕ e ψ . A causa di questa relativa flessibilità, la proteina può disporsi nello spazio secondo un certo numero di conformazioni che rappresentano la cosiddetta struttura secondaria.

L'equilibrio tra le conformazioni possibili, rispondente sempre al criterio di raggiungere il minimo di energia, è limitata dalla necessità di mantenere le catene laterali lontane da posizioni in cui possano avere interazioni repulsive e dalla necessità di favorire il maggior numero di legami idrogeno tra i vari gruppi carbonilici e α -amminici della catena. Il legame idrogeno, infatti, anche se ad esso è associata un'energia compresa tra le 2 e le 5 kcal mol⁻¹, è un elemento importante nel mantenimento di determinate conformazioni.

Tra le principali conformazioni delle catene proteiche si possono ricordare l'elica α -destrorsa, l'elica 3_{10} , la banda 2_7 , l'elica poliprolinica e lo strato di catene β -antiparallele. È da notare che l'elica α , data la minore tensione collegata ai legami di idrogeno, approssimativamente paralleli all'asse dell'elica stessa, rappresenta una conformazione particolarmente stabile (Stryer 1996).

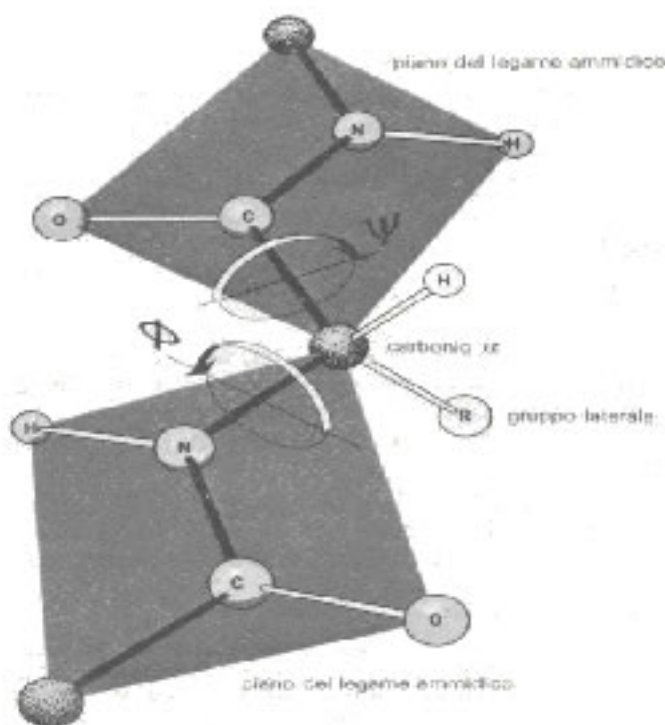


Figura 3.3
Angoli ϕ e ψ del legame peptidico



Figura 3.4
Struttura terziaria delle proteine

Struttura terziaria. I gruppi presenti nelle catene laterali possono interagire tra loro costringendo la proteina in una struttura ancora più complessa ed organizzata. Questa struttura, non necessariamente regolare, mantenuta sia da legami covalenti sia da interazioni di natura elettrostatica, viene detta struttura terziaria (figura 3.4).

I legami covalenti sono quelli dovuti alla eventuale presenza di ponti disolfuro. Questo è l'unico tipo di legame covalente (oltre, naturalmente, quello peptidico) che contribuisce al mantenimento della struttura delle proteine.

Le principali interazioni chimiche delle molecole proteiche coinvolgono: (a) legami idrogeno; (b) legame di idrogeno o legame ionico (la sua energia dipende dalla distanza tra i due gruppi carichi); (c) interazione elettrostatica (repulsiva) anch'essa dipendente dalla distanza; (d) interazioni idrofobiche.

La struttura terziaria tiene conto della particolare conformazione sferoidale o ellissoidale che assume la molecola proteica per ridurre l'effetto idrofobo, dovuto ai radicali paraffinici degli amminoacidi (idrofobici) che tendono a diminuire la solubilità delle proteine in acqua. La molecola, infatti, subisce un ripiegamento globulare consistente nell'orientare le catene apolari verso il centro della molecola e quelle polari verso la superficie così da aumentare, tramite i gruppi polari rivolti verso l'esterno della molecola, la solubilità in acqua delle proteine.

In tal modo la molecola proteica assume una conformazione antipatica, che ne determina le proprietà di formare schiume, comunque di assumere una struttura ordinata all'interfaccia acqua-aria

Struttura quaternaria: Numerose proteine proseguono ancora in questa scalata verso strutture sempre più complesse organizzandosi in aggregati polimerici costituiti da diverse unità proteiche (sub-unità), ognuna con la propria struttura primaria, secondaria e terziaria. Questo tipo di struttura, dovuta alle interazioni non covalenti esistenti tra le unità che ne fanno parte, viene detta struttura quaternaria (Stryer 1996).

Le sieroproteine costituiscono la frazione proteica del latte, idrosolubile, non caseinica. Sono in altre parole quelle sostanze azotate proteiche che non precipitano al raggiungimento, per acidificazione, del punto isoelettrico della caseina (HP 4,6-4,7).

Esse rappresentano il 17-21% delle sostanze totali del latte di vacca e dei ruminanti in genere; nei monogastrici la percentuale è molto più elevata. Le proteine del siero comprendono: β -lattoglobulina, α -lattalbumina, sieralbumina, immunoglobuline, peptidi bioattivi.

Di seguito vengono illustrate le caratteristiche biochimiche e strutturali delle principali sieroproteine.

3.2 La lattoferrina (LF) (PM: 78 kDa, pI : 9)

La lattoferrina (LF) appartiene alla famiglia delle transferrine, proteine implicate nel mantenimento della omeostasi del ferro nei fluidi corporei. Si tratta di una glicoproteina monometrica, di 78 kDa, in grado di legare due ioni Fe^{3+} a due gruppi CO_3^{2-} . La relazione sinergica dei due ioni ferro e con i due gruppi leganti rappresenta una caratteristica unica del comportamento chimico della lattoferrina e delle transferrine in generale.

Il legame del ferro è comunque reversibile e in funzione del pH: al decrescere di questo il ferro comincia ad essere rilasciato. La LF umana rilascia il ferro a valori di pH inferiori a 5 mentre nella LF bovina tale tendenza si attenua, e il rilascio si osserva già a valori di pH prossimi a 6 (Mazurier 1980). L'alta affinità per lo ione Fe^{3+} e i meccanismi di rilascio sono di fondamentale importanza per la funzione assolta dalle transferrine. Prima del processamento del latte la lattoferrina bovina è saturata con il ferro solo per il 15-20%. Una LF depleta di ferro, saturata cioè per il 5%, viene definita apolattoferrina.

La lattoferrina bovina è costituita di una singola catena polipeptidica di 689 residui, di soli due residui più corta rispetto alla lattoferrina umana (Pierce A. 1991); come quest'ultima è ripiegata in due lobi (il lobo N- e il lobo C- rispettivamente la porzione amino- e carbossiterminale della proteina) ogni lobo si divide in due domini. In ciascuno dei due lobi, in corrispondenza del punto di giunzione dei due domini, si localizza un sito di legame per il ferro costituito da quattro residui aminoacidici (due Tyr, un His, un Asp) (figura 3.5).

I lobi C- ed N- sono collegati da un motivo costituito da tre giri di alfa elica (residui 334-344. Vedi figura 3.5) Questo tratto costituisce un carattere distintivo tra lattoferrine e transferrine, le seconde contengono diverse proline nella regione di interconnessione tra i due lobi e non mostrano, in questo tratto, un motivo ad alfa elica (Bailey 1988; Kurokawa 1995).

La lattoferrina costituisce un antiossidante non-enzimatico presente nel siero e nel colostro (primo latte prodotto dall'animale). La concentrazione di lattoferrina nel latte umano e nel colostro è rispettivamente di 2 mg/ml e 7 mg/ml, mentre nel latte e nel colostro bovini si abbassa a 0,2 mg/ml e 1,5 mg/ml (Levay P.F. 1995). Le concentrazioni medie in lattoferrina delle polveri presenti in commercio si collocano in un *range* che va dallo 0,35% al 2% (K. Marshall 2003).

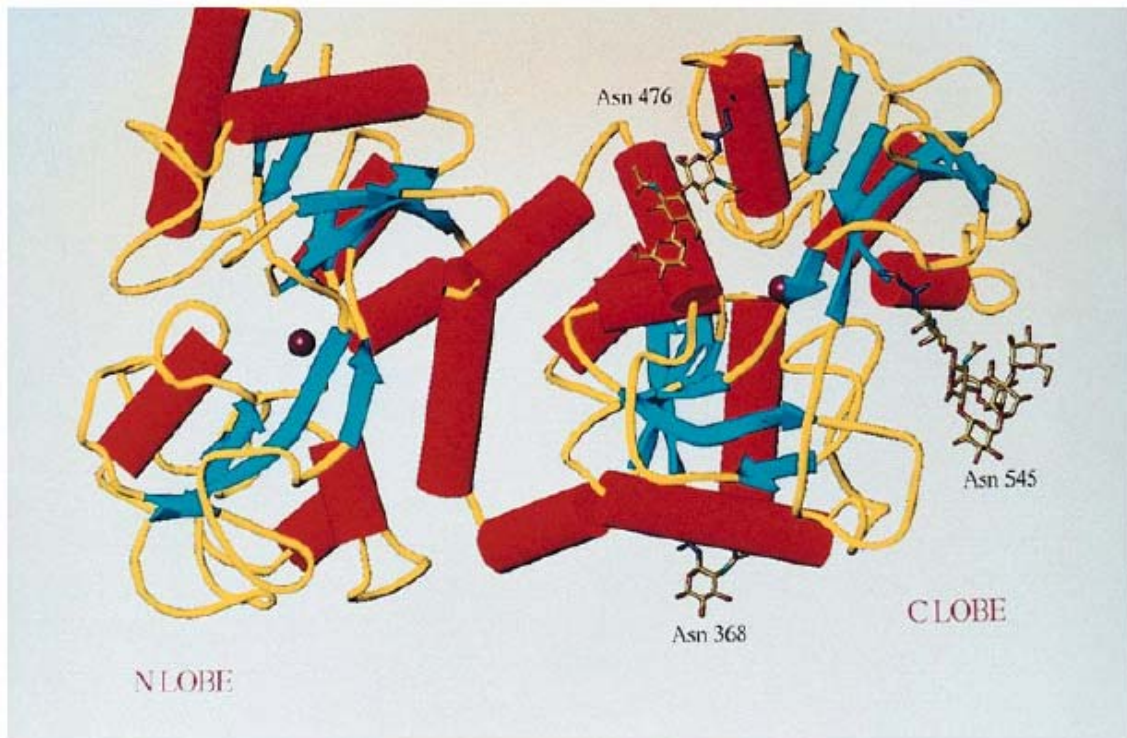


Figura 3.5

Diagramma schematico della struttura della lattoferrina bovina. I motivi ad alfa-elica sono rappresentati come cilindri mentre i foglietti beta come strisce e frecce. Gli atomi di ferro sono raffigurati da sfere viola, in modalità "stick" sono riportate tre residui glucidici

Da: S. A. Moore, B. F. Anderson, C. R. Groom, M. Haridas, E. N. Baker: *Three-dimensional Structure of Diferric Bovine Lactoferrin at 3.8 Å Resolution* (1997) *J. Mol. Biol.* 274:222-236

3.3 Le immunoglobuline (IgG) (PM: 150-900 kDa, pI : 5,5-8,3)

Le immunoglobuline (IgG) rappresentano i soggetti molecolari implicati nella risposta immunitaria.

La struttura tipica di una immunoglobulina consta di due specie di catene polipeptidiche, una catena leggera (L) di 25 kDa e una catena pesante (H) di 50 kDa. Ogni Ig è costituita da due catene leggere e due catene pesanti, ciascuna catena L, è legata ad una catena H da un ponte disolfuro, e le stesse catene H sono a loro volta vincolate tra loro da almeno un ponte disolfuro (figura 3.6-A).

Le catene L sono costituite da una regione variabile e una regione costante.

La catena H, lunga circa il doppio della catena L, anch'essa è costituita di una regione costante e di una regione variabile. Tre segmenti all'interno delle catene L e tre segmenti all'interno delle catene H presentano una variabilità di gran lunga maggiore di quella riscontrata in altre zone nelle regioni variabili. Queste isole ad alta variabilità sono responsabili del riconoscimento della complementarità con l'antigene e, di conseguenza, sono le regioni alla base della specificità dell'anticorpo.

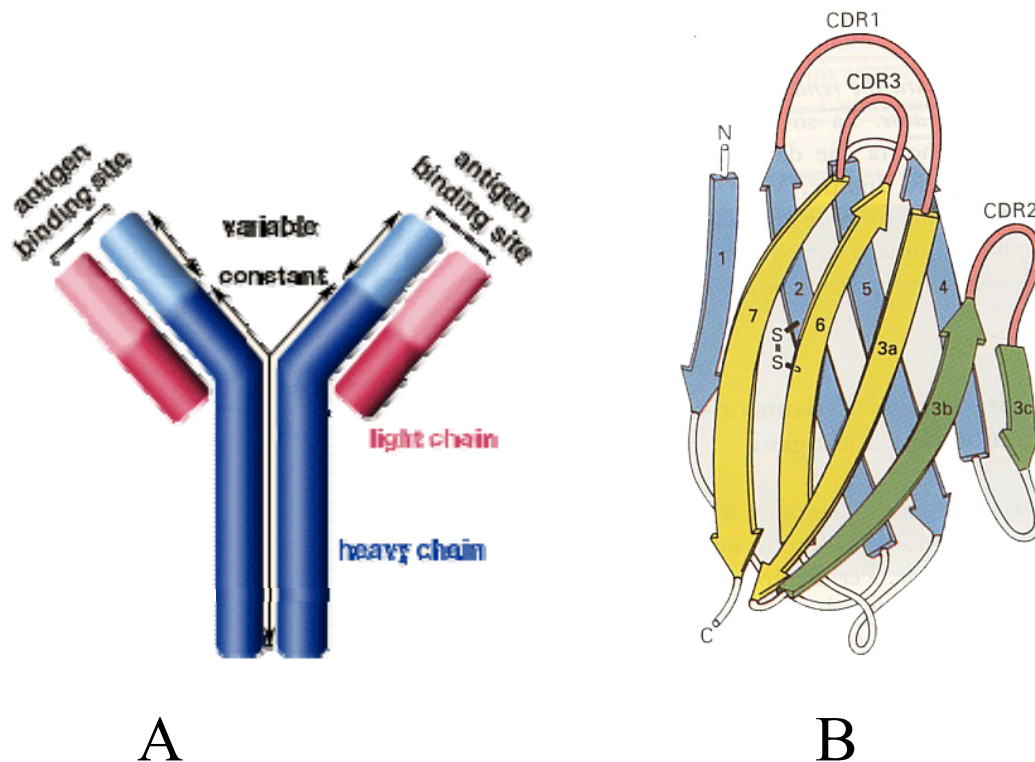


Figura 3.6
Immunoglobuline:

A – struttura modello di un anticorpo, è rappresentata l'organizzazione spaziale delle catene leggere, pesanti, e delle zone variabili e di legame all'antigene

B – struttura della zona di riconoscimento e di legame all'antigene, sono evidenziate in rosso le porzioni ipervariabili (CDR) ove avviene il riconoscimento dell'antigene (Stryer 1996)

La struttura dei siti ad alta variabilità è costituita da due ampi foglietti di filamenti beta anti paralleli; tali foglietti sono vincolati tra loro da ponti disolfuro. Le posizioni che determinano la specificità sono localizzati in anse su di un lato del sandwich costituito dai foglietti (CDR regions) (figura 3.6).

Il Centro di una immunoglobulina forma un'impalcatura che rende possibile un numero praticamente infinito di variazione delle anse, e di conseguenza della specificità dell'anticorpo(Stryer 1996).

Sono state identificate 5 classi di anticorpi: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Le immunoglobuline G costituiscono approssimativamente il 75% degli anticorpi di un individuo adulto.

Le IgG sono trasferite dalla madre al figlio nell'utero, attraverso il cordone ombelicale e tramite l'allattamento. Le immunoglobuline G costituiscono la prima linea di difesa del nascituro.

Le IgA sono secrete nel latte e solo alla fine trasferite al tratto digestivo nel nuovo nato fornendo, in tal modo, una migliore immunità rispetto ai preparati in bottiglia per i neonati, in alcuni casi è stata dimostrata la loro resistenza all'azione nei confronti degli enzimi digestivi. È perciò probabile che siano in grado di conferire immunità che può essere portata agli uomini in seguito all'allattamento (Kulczycki A. Jr 1985).

Le immunoglobuline sono presenti nel siero in concentrazioni che variano dai 0,6 ai 0,9 mg/ml; il colostro contiene invece concentrazioni significativamente più alte di IgG rispetto al latte maturo; in quest'ultimo le IgG raggiungono il massimo della concentrazione 24-48 ore dopo il parto, e decrescono con un andamento dipendente dal tempo.

Allo stesso modo, la frazione di siero di latte contiene un significativo quantitativo di IgG, approssimativamente 10-15% della frazione totale di sieroproteine presenti nel siero di latte. Studi condotti sul latte grezzo di mucche non immunizzate dimostrano che esso contiene specifici anticorpi nei confronti di alcuni virus come ad esempio il rotavirus umano come pure anticorpi ai batteri quali *E. coli*, *Salmonella enteridis*, *S. Tiphymurium* e *Shigella* (Yolken R.H. 1985; Losso JN and ;5:231-239. 1993).

3.4 La β -lattoglobulina (β -LG) (PM: 18,4-36,8 kDa, pI : 5,2)

La β -LG è presente nel latte di molti mammiferi, rappresenta approssimativamente metà della frazione sieroproteica presente nel siero, mentre il latte umano ne risulta privo (K. Marshall 2003).

In condizioni fisiologiche, la proteina bovina esiste come un omodimero, i cui monomeri sono costituiti ciascuno da 162 aminoacidi, corrispondenti ad una massa molecolare di $2 \times 18,4$ kDa. La β -LG appartiene alla famiglia delle lipocaline, famiglia che comprende le proteine in grado di legare alcuni retinoidi (retinolo, acido retinoico) (Newcomer 1984). Una delle funzioni associate alla proteina è, infatti, il trasporto della vitamina A. Le proteine che compongono tale famiglia presentano come caratteristica conformazionale un motivo caliciforme costituito da un sistema di 8 foglietti beta antiparalleli (figura 3.7) (Green 1979; Papiz 1986; Monaco 1987; Brownlow 1997). In tale sito avviene il legame al ligando. La β -LG mostra un ampio spettro di transizioni di natura chimica, fisica, spettroscopica, dipendenti dal pH in un *range* che va da 6 a 8 (Pedersen 1936).

Il suo coefficiente di sedimentazione aumenta all'aumentare del pH. La proteina mostra anche variazioni in termini di rotazione ottica, e un comportamento anomalo durante la titolazione. Ad esempio alcuni gruppi titolabili (gruppi carbossilici pK_a 8,3 risultano esposti a pH bassi e nascosti a pH alti) (Tanford 1959). La β -LG sembra implicata nella modulazione della risposta linfatica. Le proprietà biofisiche e biochimiche della proteina rivestono un grande interesse dal punto di vista industriale in ragione delle sue proprietà funzionali.



Figura 3.7
Struttura tridimensionale di uno dei monomeri della β-LG.
Sono riportati gli elementi di struttura secondaria alfa eliche e foglietti
beta, sono riportati i numeri dei residui aminoacidici.
I foglietti beta antiparalleli descrivono la struttura caliciforme ove avviene
il legame dei retinoidi (K. M. G. Oliveira 2001)

3.5 La α-lattalbumina (α-LA) (PM: 14.2 kDa, pI 4,5-4,8)

La α-LA bovina è una proteina regolatoria implicata nella biosintesi del lattosio. Viene secreta nel latte materno (K. Marshall 2003). La α-LA è in grado di legare ioni calcio (Ca^{2+}). questi hanno un ruolo strutturale in quanto responsabili della corretta distribuzione dei ponti disolfuro indirettamente implicati nel corretto folding della proteina.

La struttura cristallina della α-LA è caratterizzata da due porzioni lobulari separate da un loop. Il più grande dei due lobi costituito per lo più di strutture ad alfa elica comprende sia la porzione amino- sia carbossi terminale della catena polipeptidica (residui 1-34 e 86-123). Il lobo più piccolo comprende una porzione costituita di 3 foglietti β antiparalleli, una piccola alfa elica 3_{10} e alcune strutture irregolari.

Il sito di legame ad alta affinità per gli ioni calcio Ca^{2+} è localizzato alla giunzione dei due lobi (anche detti sottodomini) ed è composto di una sezione contigua della catena polipeptidica (residui 79-88) che connette l'alfa elica 3_{10} al sottodominio β (residui 86-98) e contiene residui di aspartato altamente conservati in grado di legare il Ca^{2+} .

Sono presenti inoltre specifici siti di legame per lo ione SO_4^{2-} e per lo ione Zn^{2+} (E D. Chrysina 2000), un sito secondario di legame per il Ca^{2+} .

È stato identificato 7.9 Å lontano dal sito di legame primario (figura 3.8).

In assenza di Ca^{2+} , la α -LA denaturata con i ponti disolfuro intatti si ripiega lentamente in una conformazione nativa e questo processo è accelerato di circa 2 ordini di grandezza dal legame principale del Ca^{2+} che è in grado di legarsi ad intermedi ad alta energia (Kuwajima 1989).

La α -LA è una delle principali sieroproteine presenti sia nel latte umano quanto in quello bovino. Costituisce circa il 25% della frazione sieroproteica presente nel siero, e contiene un'ampia varietà di aminoacidi essenziali e ramificati, presenti in una forma facilmente assimilabile. La α -LA purificata viene normalmente utilizzata nella formulazione di latti speciali per i neonati, dal momento che nella sua conformazione nativa essa risulta fortemente somigliante alla α -LA umana, presente nel latte materno (K. Marshall 2003).

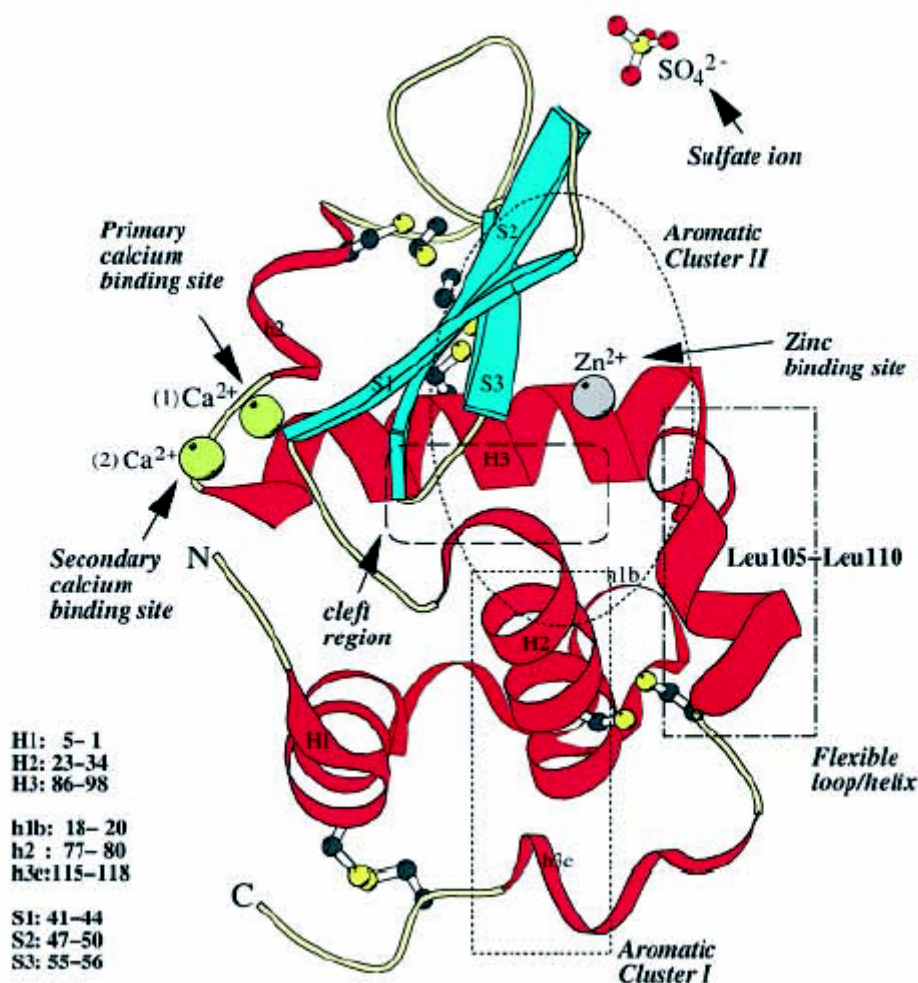


Figura .3.8
Struttura della α -LA bovina e delle strutture funzionali

Uno studio condotto su cavie da laboratorio ha messo in evidenza come la α -LA è in grado sia nel suo stato nativo che idrolizzato, di promuovere la risposta anticorpale a seguito di induzione da parte di un antigene. Lo stesso gruppo ha messo in luce l'effetto diretto della α -LA sulla funzione dei linfociti B, nonché la funzione di soppressore delle risposte mediate dalle cellule T (Bounous G. 1982).

Le strutture funzionali mostrano la localizzazione degli ioni metallici identificati all'interno della struttura cristallina; sono inoltre riportate gli elementi di struttura secondaria (*loops*, alfa eliche, foglietti beta elica 3_{10}). In basso a sinistra sono riportate le definizioni dei domini in termini di residui aminoacidici (E D. Chrysina 2000).

3.6 La lattoperossidasi (LP) (PM: 89 kDa, pI: 9,5)

La LP consiste di una singola catena polipeptidica costituita da 612 aminoacidi (Cals 1991), la sua massa molecolare è di circa 80 kDa. Essa contiene 15 residui di mezze cisterne e molecole di carboidrati che rappresentano circa il 10% del peso della intera molecola (Carlstrom 1969). Lattoperossidasi, mieloperossidasi, le perossidasi eosinofile e le perossidasi presenti nella tiroide contengono -eme e mostrano dal 50 al 70% di identità nella sequenza aminoacidica (S. Watanabe 2000).

Un alto livello di omologia può essere trovato. Il centro catalitico delle perossidasi dei mammiferi è costituito da una protoporfirina. La struttura cristallina della LP non è ancora disponibile tuttavia è stata definita la struttura della mieloperossidasi (figura 3.9). La struttura dell'eme nella LP è stata intensamente studiata in termini di trasferimento elettronico (Sievers 1979) e l'-eme risulta importante per quanto attiene alle reazioni di ossidazione e riduzione. La funzione dell'-eme nelle perossidasi non è ancora stata chiarita del tutto (Fenna 1995).

Il siero contiene numerosi tipi di enzimi: idrolasi, transferasi, liasi, proteasi e lipasi. La LP rappresenta per lo 0,25-0,5% della frazione sieroproteica del siero di latte. Questo enzima catalizza la riduzione del perossido di idrogeno (H_2O_2) una specie reattiva in grado di generare un grosso danno ossidativo all'interno della cellula. Questo enzima inoltre catalizza la riduzione del tiocianato e di alcuni ioduri e bromuri, molecole in grado di generare prodotti che inibiscono e/o uccidono un ampio *range* di specie batteriche. L'enzima non viene inattivato durante la fase di pastorizzazione mostra, in altre parole, un elevato grado di resistenza alle alte temperature (K. Marshall 2003).

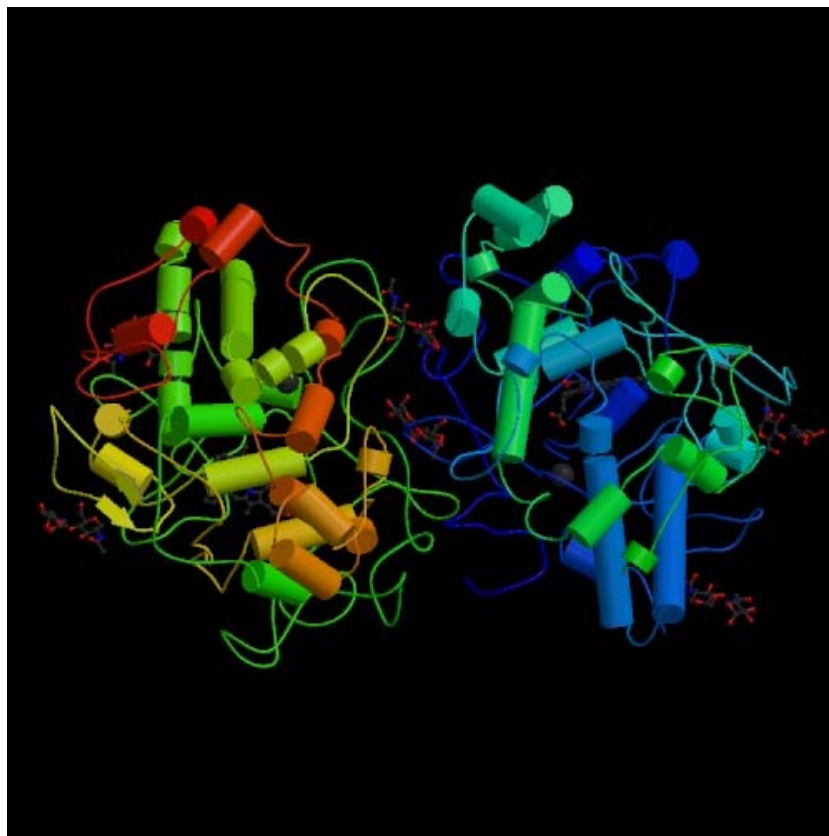


Figura 3.9
Struttura della mielo-perossidasi

3.7 La sieroalbumina (SA) (PM: 69 kDA pI: 4,8)

La sieroalbumina umana (HSA) costituisce la proteina più abbondante presente nel plasma sanguigno, con una concentrazione di 5 g/100 ml. Le sue proprietà fisiologiche e farmacologiche sono state estensivamente studiate per diversi decenni. Tali studi hanno rivelato che la HSA ha una alta affinità per un ampio *range* di sostanze quali Cu^{2+} e Zn^{2+} , acidi grassi, metaboliti come la bilirubina e molti altri composti. Il ruolo fisiologico più importante della proteina è perciò considerato il trasporto di soluti nel flusso sanguigno agli organi target, e il mantenimento della omeostasi sanguigna per quanto concerne il pH e la pressione osmotica del plasma.

La sequenza primaria rivela che la proteina è costituita da un singolo polipeptide di 585 aminoacidi contenente 17 paia di ponti disolfuro e una cisteina libera (Cys 34). La SA umana, come pure le sieroalbumine di altre specie, consta di tre domini originati forse per duplicazione genica. Numerosi studi di cristallografia a raggi X sono stati condotti allo scopo di chiarificare come la proteina riesca a mettere in atto il legame con i vari ligandi (Sugio S. 1999).

La struttura cristallina della SA umana ha messo in evidenza la presenza di tre domini ad alfa elica simili, con otto paia di legami disolfuro. Ogni dominio è ulteriormente diviso in due sottodomini la Cys 34 l'unica sisteina con un gruppo sulfidrilico libero, non partecipa alla formazione di ponti disolfuro con legandi esterni. Profonde tasche idrofobiche cariche positivamente sono localizzate in posizioni simili all'interno dei sottodomini, e si pensa corrispondano ai siti di legame per vari composti.

Tre possibili siti di legame per acidi grassi a lunga catena sono localizzati sulla superficie della proteina, gli interni molecolari di questi siti di legame si presentano chimicamente differenti (A. A. Bhattacharya 2000).

La SA bovina (BSA) è una grande proteina che costituisce il 10-15% del totale di sieroproteine, strutturalmente identica alla SA presente nel siero sanguigno; molto probabilmente viene trasportato al latte tramite giunzioni leaky dei vasi sanguigni a livello delle ghiandole mammarie. Le sieralbumine sono proteine in grado di legare e veicolare gli acidi grassi. La BSA è anch'essa una fonte di aminoacidi essenziali ma poco è conosciuto sulle sue potenzialità terapeutiche (K. Marshall 2003)

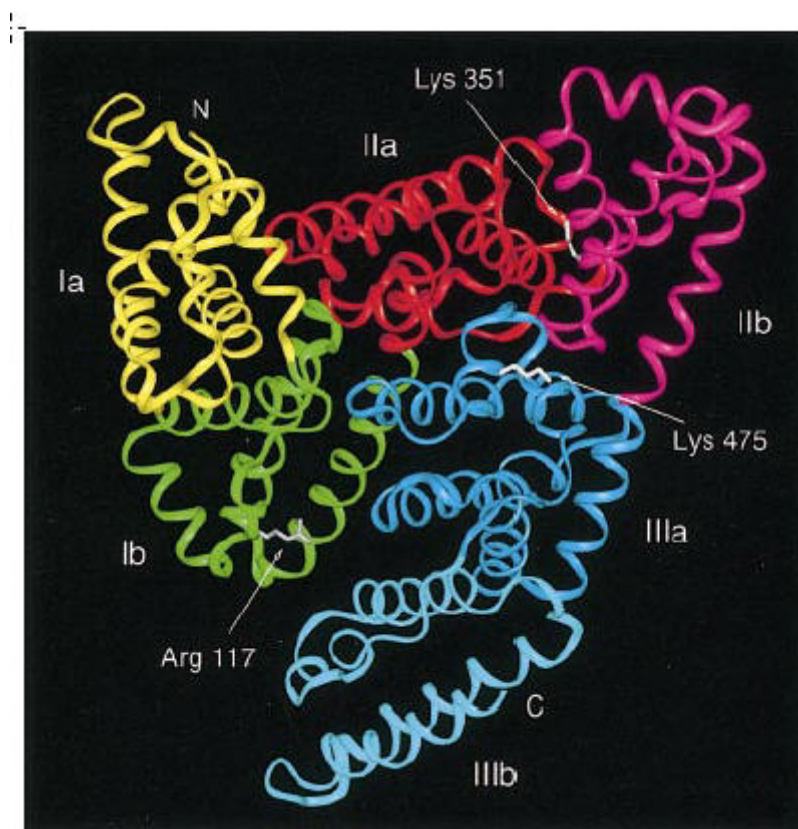


Figura 3.10
Disegno schematico della sieralbumina umana. Ogni sottodominio è contrassegnato da un differente colore. I residui Arg 117 e Lys 475, putativi siti di legame per molecole di acidi grassi a lunga catena sono contrassegnati in bianco (Sugio S 1999)

3.8 Proprietà nutrizionali e funzionali delle sieroproteine

Le SP in forma di polvere sono utilizzate da sempre nell'industria alimentare in funzione delle loro importantissime proprietà nutrizionali e funzionali.

Le proprietà nutrizionali sono correlate al valore biologico (VB) che indica la percentuale di alimento che viene assimilata dal corpo umano, durante la digestione, in rapporto a quella ingerita con la dieta (P. Coyot 1996)

Nella tabella 3.1 si riportano a confronto alcuni VB di famiglie proteiche comunemente utilizzate dall'industria alimentare.

Proteine	Valore biologico (%)
Sieroproteine	95
Uovo (tuorlo)	93
Latte	86
Caseine	75
Carne bovina	70
Soia	70
Grano	61

Tabella 3.1
Valore biologico di alcune proteine alimentari

Questi indici alti delle SP dipendono dalla composizione media in aminoacidi della SP, come riportato nella tabella 3.2, che riporta il contenuto in aminoacidi essenziali presenti nel latte nella cagliata e nel siero.

Aminoacidi	Latte (g/L)	Cagliata (caseine) (g/L)	Siero di latte (g/L)
Acido aspartico	66,0	65,0	105
Treonina	50,0	45,0	50,0
Serina	53,0	206	173
Acido Glutammico	213	206	173
Prolina	100	104	50
Glicina	18	25	20
Alanina	31	28	50
Valina	62	66	52
Metionina	22	26	17
Isoleucina	58	56	54
Leucina	89	85	114
Tiroxina	46	58	37
Fenilalanina	44	46	34
Lisina	70	75	94
Istidina	24	28	18
Arginina	23	38	29
Cisteina	26	3	37
Triptofano	12	26	20

Tabella 3.2
Aminoacidi essenziali (in grassetto) presenti nel latte, nella caseina e nel siero (da Alais: Scienza del latte)

Gli aminoacidi essenziali (AE) sono quelli che l'organismo non è in grado di sintetizzare ex novo, che, pertanto, devono essere assunti con la dieta.

È curioso che la percentuale di AE, come lisina e leucina, sia più elevata nel siero rispetto al latte. Ciò è dovuto al fatto che il dato percentuale è stato calcolato rispetto alle proteine totali, che nel siero sono quantitativamente inferiori a quelle del latte e della cagliata.

Le SP inoltre sono particolarmente digeribili perché non vengono coagulate nello stomaco e contengono aminoacidi ramificati molto utili per la formazione della massa muscolare.

Dal punto di vista delle attività biologiche, in particolare per le funzioni biochimiche che svolgono, come si è visto nei paragrafi precedenti, le molecole più interessanti sono nell'ordine la lattoferrina, le immunoglobuline, la lattoperossidasi, BSA, β -lattoglobulina, la α -lattalbumina ecc.

Per proprietà funzionali delle SP si intendono le caratteristiche chimico-fisiche che ne consentono un grande utilizzo nell'industria alimentare, poiché assorbono acqua, formano composti gelificati, formano schiume ecc. Una delle caratteristiche chimiche più interessanti ai fini applicativi delle SP, riguarda la loro elevata solubilità in acqua da pH 2 a circa 10, come si può notare dal grafico di figura 3.11.

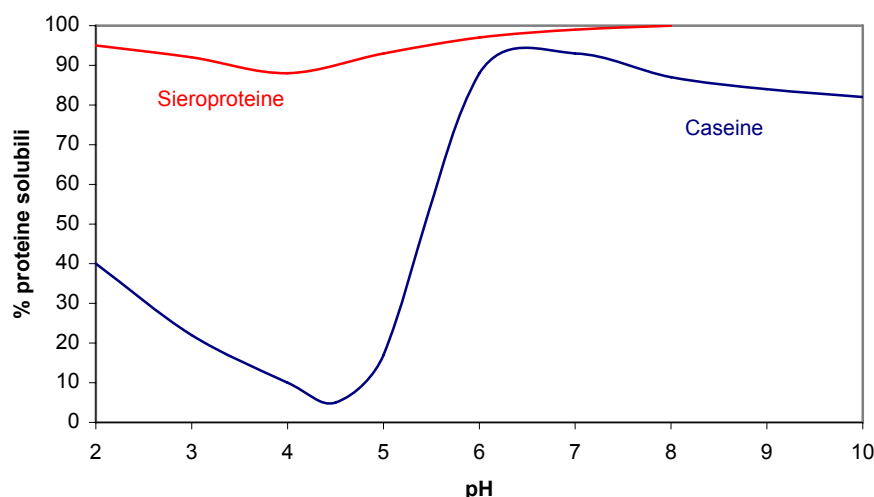


Figura 3.11
Solubilità delle sieroproteine e delle caseine in rapporto al pH

Le SP in ragione delle proprietà funzionali vengono utilizzate nell'industria alimentare per la preparazione di diversi composti di largo consumo (tabella 3.3).

Industria (prodotti)	Proprietà funzionali	Tipo sieroproteine
Pane	Assorbimento acqua	WPC, caseinati
Biscotti	Emulsione grassi Imbrunimento	WPC
Cereali per colazione	Emulsione stabile	WPC
Pasta	Effetto strutturante	Siero WPC
Cioccolato	Schiuma stabile	WPC
Sughi	Emulsione stabile	WPC, caseinati, tuorlo d'uovo
Yogurt	Emulsione stabile	WPC, caseinati
Zuppe	Assorbimento acqua	WPC, caseinati, tuorlo d'uovo
Cibi pronti	Aumento sapore, potere nutrizionale	WPC, caseinati, uovo intero
Latte	Emulsione stabile	WPC
Bevande alcoliche	Stabilizzazione crema	WPC

Tabella 3.3
Sieroproteine impiegate nella preparazione di specialità alimentari
(M. Pizzichini 2001)

Le proprietà funzionali delle SP sono utilizzate non soltanto dall'industria alimentare che rimane quella più importante, ma anche per la produzione di linee dietetiche di alimenti, nell'industria cosmetica e parzialmente in quella farmaceutica, come riportato nella tabella 3.4.

Ancora non sono completamente note le interazioni chimiche fra proteine, glucidi, lipidi e sali minerali, come avviene nella matrice latte e siero, ma è evidente che le caratteristiche funzionali sono correlate a quelle strutturali delle molecole proteiche e che tali aspetti dipendono dalla complessità chimica della soluzione in cui le SP si trovano.

Queste considerazioni sono particolarmente importanti anche ai fini dello sviluppo dei processi separativi, per i quali è necessario considerare non semplicemente il peso molecolare delle SP nude, ma quello dei sistemi aggregati che si trovano in soluzione costituiti da SP legate fra loro, con i grassi, con il lattosio ed il calcio costituisce un ulteriore legante chimico.

Industria	Prodotti commerciali	Matrice base	Proprietà
Dietetica	Integratori proteici	Diafiltrato siero Idrolizzati WPC WPC	Diminuzione contenuto lattosio Aumento contenuto proteico
	Prodotti dietetici		
	Diete speciali		
Cosmetica	Crema, lozioni, emulsioni	Siero concentrato WPC	Nutrienti capelli e derma
	Crema anti-tetà	Siero, WPC	Dermoprotezione Anti-tetà
Farmaceutica	Latti in polvere per infanti Latti umanizzati Integratori sportivi Antiossidanti Antitumorali	Diafiltrato siero Idrolizzati WPC WPI	Integratori muscolari Antiossidanti Peptidi con proprietà farmacologiche

Tabella 3.4
Applicazioni cosmetiche e farmaceutiche dei sieroderivati

3.9 Proprietà biomediche delle sieroproteine

Le SP dimostrano di agire come antiossidanti, anti-ipertensivi, antitumorali, hanno proprietà ipolipidemiche, antivirali e antibatteriche. Il meccanismo biochimico primario, attraverso il quale agiscono, si esplica attraverso la conversione dell'aminoacido cisteina in glutatione, un potente antiossidante cellulare.

Numerosi test clinici basati sull'impiego delle SP sono stati sperimentati con successo nella cura contro il cancro, l'HIV, l'epatite B, le malattie cardiovascolari e l'osteoporosi.

Le SP dimostrano anche effetti benefici nel settore sportivo poiché favoriscono l'aumento delle masse muscolari, in ragione di una forte presenza di aminoacidi ramificati.

È stato dimostrato (P. Coyot 1996) che le proteine del siero denaturato, addizionate in piccole dosi di Vitamina B1 e B2, favoriscono l'aumento di peso corporeo e di massa magra in pazienti sieropositivi, riducono i tumori, l'incidenza della polmonite e ritardano l'invecchiamento. Le vitamine del gruppo B sono necessarie per attivare l'attività enzimatica, in modo da metabolizzare correttamente gli aminoacidi.

Queste SP svolgono importanti funzioni nutrizionali e fisiologiche, come riportato nella tabella 3.5.

Le SP inoltre dimostrano proprietà ipolipidemiche, antivirali e antibatteriche.

Le SP hanno un indice glicemico basso, e possono così ottimizzare la curva della insulina, di conseguenza massimizzare il bilancio del glucagone a bruciare i grassi. Le SP possono abbassare il colesterolo più della caseina e della soia e, allo stesso tempo, se usate nelle quantità appropriate, diminuire il senso di appetito. Una porzione di 25-30 g di proteine stimola il rilascio della colecistochinina (CCK), un ormone in grado di placare il senso di appetito.

Proteine	% nel siero	Funzione ed attività biologica
β-lattoglobulina	50-55%	• Lega le vitamine liposolubili (vit. A ed E) ed i minerali (zinco, calcio ecc.) rendendoli più disponibili per l'organismo • È in grado di trasportare gli acidi grassi • Contiene alti livelli di aminoacidi a catena ramificata (BCAAs) che possono essere direttamente utilizzati dal muscoloscheletrico per produrre energia
α-lattalbumina	20-25%	• La principale proteina presente nel latte umano • È il componente preferito nei formulati per neonati • Fornisce tutti gli aminoacidiaminoacidiaminoacidiaminoacidiaminoacidi essenziali compresi quelli a catena ramificata (BCAAs) • Ha un alto contenuto in triptofano • Le sono attribuite proprietà antitumorali ed antimicrobiche • Aumenta la produzione di serotonina nel cervello, migliora l'umore e diminuisce i livelli di cortisolo
Immunoglobuline	10-15%	• Raggruppano le IgA, IgM, IgE ed IgG • Supportano i meccanismi di immunità passiva • Recenti studi valutano i benefici che una dieta ricca di immunoglobuline apporta alla popolazione in età avanzata
Albumina serica	5-10%	• Ha un alto contenuto in cisterna, amminoacido implicato nella produzione di glucatione • Proprietà antiossidanti ed antimutageniche • Lega avidamente gli acidi grassi liberi • Chela i metalli di transizione (pro-ossidanti)
Lattoferrina	0,5%	• Fa parte della famiglia delle Transferrine, proteine in grado di legare il ferro • È attiva a basse concentrazioni • Ha proprietà antibatteriche, antivirali e previene la proliferazione di patogeni nell'intestino • Sottrae il ferro libero che potrebbe altrimenti catalizzare processi ossidativi con conseguente formazione dei radicali • È implicata nel sistema di difesa immunitario, regolando l'attività dei macrofagi e simulando la proliferazione dei linfociti • È uno dei principali fattori di resistenza aspecifici trovati nelle ghiandole mammarie • È molto utilizzata nei formulati per infanti, nei coluttori e nelle paste dentifriche
Lattoperossidasi	0,2%	• È un enzima in grado di disattivare il perossido d'idrogeno • Ha proprietà antibatteriche • Si studia la possibilità di utilizzarlo come stabilizzante nella formulazione degli yogurt • È utilizzato come batteriostatico del cavo orale nella formulazione di coluttori e paste dentifriche

Tabella 3.5
Principali proprietà biomediche delle sieroproteine

3.10 Denaturazione termica e coagulazione

Le proprietà funzionali dipendono da molteplici fattori chimici e chimico-fisici insieme, ad esempio il pH, agisce sulla conformazione strutturale delle SP, e modifica anche la suscettibilità termica della molecola. Ad esempio, al decrescere del pH, a valori prossimi a 4, la conformazione dell' α -lattalbumina cambia notevolmente, e la molecola diventa più sensibile alla denaturazione termica.

Anche il grado di dissociazione dei monomeri che compongono la β -lattoglobulina dipende dal pH, sopra pH 8 essa viene irreversibilmente denaturata anche senza l'intervento del calore (D.M. Mulvihill 1987)

La denaturazione termica è costituita da una modificazione della struttura secondaria, terziaria e quaternaria, non accompagnata da una rottura dei legami peptidici coinvolti nella struttura primaria.

Il metodo più semplice per indurre la denaturazione delle proteine globulari è l'impiego del calore. Tale fenomeno può condurre anche alla precipitazione delle proteine, ma ciò si verifica solo in determinate condizioni di concentrazione e di pH.

Fra le principali metodologie analitiche impiegate per misurare il grado di denaturazione delle proteine segnaliamo: la determinazione della solubilità in acqua, che risulta molto semplice da effettuare; oppure le determinazioni strumentali in assorbimento UV, spettrofotometria di fluorescenza, infrarosso, il dicroismo circolare, la calorimetria differenziale, l'Elettroforesi, il Light Scattering e l'HPLC.

La denaturazione delle SP segue due stadi di processo:

- il primo, denominato di *unfolding*, cioè di modificazione della struttura terziaria, che può essere reversibile e irreversibile;
- il secondo, denominato di aggregazione, che comporta una modificazione irreversibile cioè una denaturazione vera e propria (Wit 1998) (vedi figura 3.12).

Lo srotolamento delle proteine globulari è accompagnato da un effetto endotermico che può essere osservato con calorimetria differenziale (DSC). Si tratta di una reazione di primo ordine (4) su Marschall Rhon-Poulenc award lecture (1997).

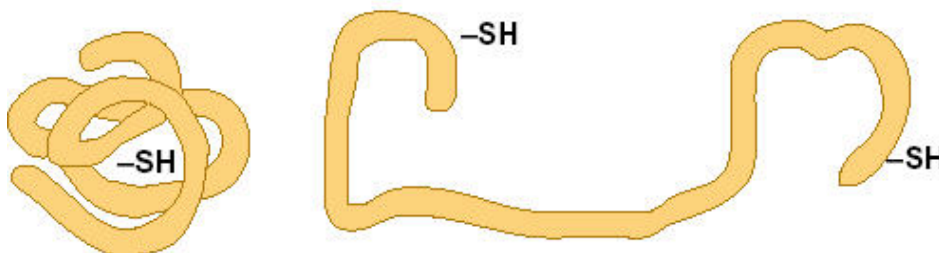


Figura 3.12
Schema grafico del processo di denaturazione

3.11 Il ciclo di lavorazione del latte

Bisogna considerare con attenzione che il siero di latte che giunge, ad esempio, ad un centro di trattamento specializzato per essere frazionato, come nei nostri intendimenti, non è un prodotto vergine (nativo) ma si tratta di un prodotto industriale.

Si tratta cioè di una matrice che ha subito una serie di trattamenti insieme al latte di provenienza. Quindi, di una matrice che ha una sua storia, fatta da trattamenti meccanici e trattamenti termici.

In termini molto schematici possiamo riassumere i passaggi industriali che ha subito prima il latte poi il formaggio, come indicato di seguito:

1. mungitura sotto-vuoto
2. cicli termici di raffreddamento e riscaldamento (pastorizzazione)
3. trattamenti meccanici derivanti dai diversi stadi di pompaggio del latte
4. trattamenti di scrematura (centrifugazione)
5. processo di caseificazione (cagliatura)
6. trasporto e conservazione del siero.

Tutte queste operazioni possono modificare la condizione chimico-fisica dei suoi costituenti. La stessa pastorizzazione (riscaldamento del latte a 73 °C per 13-20 secondi) può causare modificazioni importanti delle molecole del siero.

Infatti, la denaturazione delle proteine può avvenire per effetti termici, meccanici o di fermentazioni batteriche. Per questo motivo, la maggior parte delle proteine che derivano dal latte, rischiano di non trovarsi più in condizione di svolgere le loro funzioni biologiche.

Pertanto, tali modificazioni possono avere ripercussioni sui prodotti finiti, con conseguente alterazione delle proprietà funzionali dei formulati (proprietà: schiumogene, di gelificazione, di assorbimento dell'acqua, di solubilità in acqua.).

Va peraltro precisato che il processo di trattamento del latte non necessariamente implica il peggioramento delle sue caratteristiche; in alcuni casi è alla base dell'incremento di alcune caratteristiche funzionali, ad esempio: la rottura dei legami peptidici delle caseine e SP incrementa alcune proprietà come la formazione di emulsioni, la capacità di assorbimento dell'acqua, di formare gel ecc.

Schematicamente si può affermare che il danneggiamento della struttura nativa delle proteine, incide negativamente sulle proprietà biologiche di queste ultime, ma migliora quelle più visibili a livello commerciale, cioè quelle funzionali.

Tuttavia lo scopo della presente ricerca non è solo quello di utilizzare le SP in polvere per applicazioni alimentari, ma soprattutto quello di impiegarle nel settore degli integratori alimentari in quello farmaceutico. Per questo scopo abbiamo bisogno di una matrice siero il più possibile integra, non degradata o denaturata, altrimenti le proprietà biomediche sarebbero compromesse all'origine, indipendentemente dalla bontà del processo che vogliamo sviluppare.

3.12 Bibliografia

A. A. Bhattacharya, T. G. a. S. C. (2000). "Crystallographic Analysis Reveals Common Modes of Binding of Medium and Long-chain Fatty Acids to Human Serum Albumin." J. Mol. Biol. **303**: 721-732.

Bailey, S., Evans, R. W., Garratt, R. C., Gorinsky, B., Hasnain, S., Horsburgh, C., Jhoti, H., Lindley, P. F., Mydin, A., Sarra, R. & Watson, J. L. (1988). "Molecular structure of serum transferrin at 3.3 Å resolution" Biochemistry **27**: 5804-5813.

Bounous G, K. P. (1982). "Influence of dietary proteins on the immune system of mice." J. Nutr. **112**: 1747-1755.

Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C.T. & Sawyer, L. (1997). "Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution ± still an enigmatic lipocalin." Structure **5**: 481-495.

Cals, M. M., Maillart, P., Brignon, G., Anglade, P., and Dumas, B. R. (1991). "Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family." J. Biochem.Eur. **198**: 733-739.

Carlstrom (1969). "Physical and compositional investigations of the subfractions of lactoperoxidase A." Acta Chem. Scand. **23**: 185-203.

D.M. Mulvihill, M. D. (1987). "Whey proteins and their thermal denaturation - A review." Irish Journal of Food Science Technology **11**(43).

E D. Chrysina, K. B., K. R. Acharya (2000). "Crystal Structures of Apo- and Holo-bovine α -Lactalbumin at 3.2- Å Resolution Reveal an Effect of Calcium on Inter-lobe Interactions." J. Biol. Chem. **275**(47): 37021-37029.

Fenna, R., Zeng, J., and Davey, C. (1995). "Structure of the green heme in myeloperoxidase." Arch. Biochem. Biophys. **316**: 653-656.

Green, D. W., Aschaffenburg, R., Camerman, A., Coppola, J.C., Diamand, R.D., Dunnill, P., Simmons, R.M., Komorowski, E.S., Sawyer, L., Turner, E.M.C. & Woods, K.F. (1979). "Structure of bovine beta-lactoglobulin at 6 Å resolution." J. Mol. Biol. **131**: 375-397.

K. M. G. Oliveira, V. L. V.-M., M. M. Botelho, L. Sawyer, S. T. Ferreira, I. Polikarpov (2001). "Crystal structures of bovine β -lactoglobulin in the orthorhombic space group C222." Eur. J. Biochem **268**: 477-483.

K. Marshall, N., MS (2003). "Therapeutic Applications of Whey Proteins." Alt. Med. Rev **9**(2): 136-156.

- Kulczycki A Jr, M. R. (1985). "Bovine IgG and human immune responses: Con A-induced mitogenesis of human mononuclear cells is suppressed by bovine IgG." Int Arch Allergy Appl Immunol **77**: 255-258.
- Kurokawa, H., Mikami, B. & Hirose, M. (1995). "Crystal structure of diferric ovotransferrin at 3.4 Å resolution." J. Mol. Biol. **254**: 196-207.
- Kuwajima, K., Mitani, M., and Sugai, S. (1989). "Characterization of the critical state in protein folding. Effects of guanidine hydrochloride and specific Ca²⁺ binding on the folding kinetics of alpha-lactalbumin." J. Mol. Biol. **206**: 547-561.
- Levy P.F., V. M. (1995). "Lactoferrin: a general review." Haematologica **80**: 252-267.
- Losso JN, D. J., Kummer A, et al.; 5:231-239. (1993). "Detection of antibody specificity of raw bovine and human milk to bacterial lipopolysaccharides using PCFIA." Food Agric Immunol.
- M. Pizzichini, R. M., F. Ruscio. (2001). "Il siero di latte: da rifiuto zootecnico a materia prima per alimenti e farmaci ." L'Inf. Agrario **16**: 49-53.
- Mazurier, J. S., G. (1980). "Comparative study iron-binding properties of human transferrins." Biochimica et Biophysica Acta **629**: 399-408.
- Monaco, H. L., Zanotti, G., Spadon, P., Bolognesi, M., Sawyer, L. & Eliopoulos, E.E. (1987). "Crystal-structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol at 3.5 Å resolution." J. Mol. Biol. **197**: 695-706
- Newcomer, M. E., Jones, T.A., Aquist, J., Sundelin, J., Eriksson, U. Rask, L. & Peterson, P.A. (1984). "The 3-dimensional structure of retinol-binding protein." EMBO J **3**: 1451-1454.
- P. Coyot, D. L. (1996). Food Proteins and Their Applications. E. S. D. A. Paraf. Dijon: 225-256.
- Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findley, J.B.C., Sirvapasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E. & Kraulis, P.J. (1986). "The structure of beta-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein." Nature **324**: 205-231.
- Pedersen, K. O. (1936). "Ultracentrifugal and electrophoretic studies on the milk proteins. II. The lactoglobulins of Palmer." Biochem. J. **30**: 961-970.
- Pierce A, C. D., Benaissa M, et al. (1991). "Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin." European Journal of Biochemical **196**: 177-184.
- S. Watanabe, S. M., H. Kumura, S. Nakamura, A. Bollen, N. Moguilevsky, and K. Shimazaki (2000). "Bovine Lactoperoxidase and Its Recombinant: Comparison of

Structure and Some Biochemical Properties.” Biochem. Biophys. Res. Comm **274**: 756-761.

Sievers, G. (1979). “The prosthetic group of milk lactoperoxidase is protoheme IX.” Biochim. Biophys. Acta **579**: 181-190.

Stryer, L. (1996). Biochimica, Zanichelli.

Sugio S, K. A., Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. (1999). “Crystal structure of human serum albumin at 3.5 Å resolution.” Protein Eng. Jun **12**(6): 439-46.

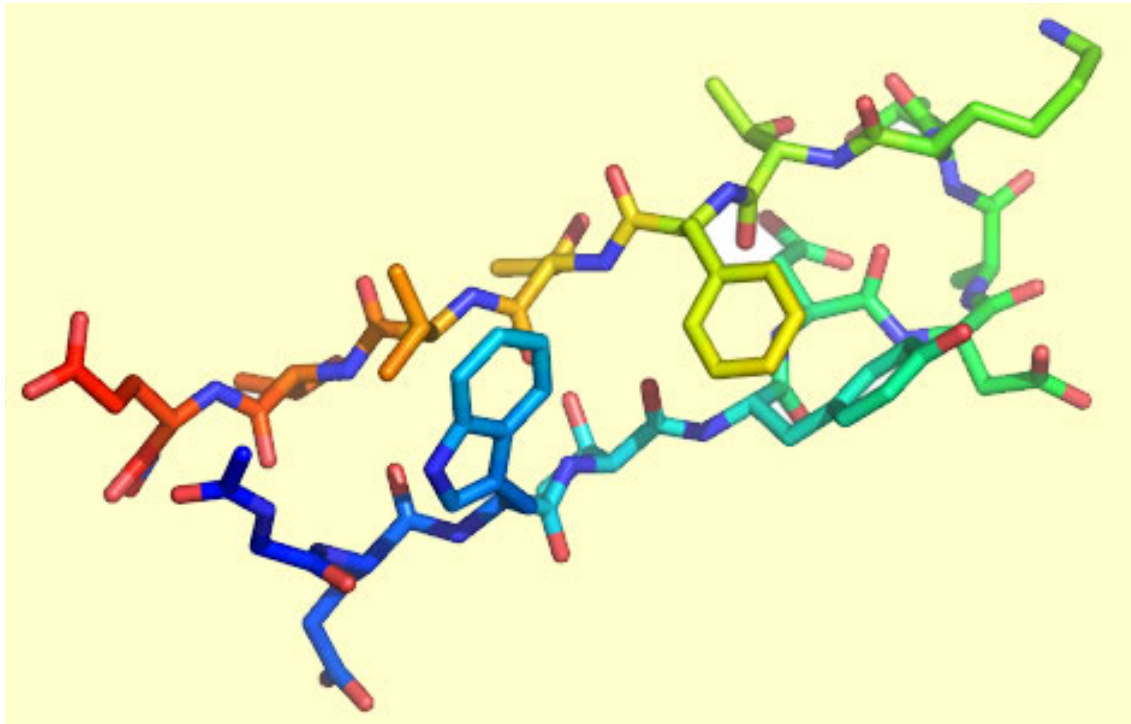
Tanford, C., Bunville, L.G. & Nozaki, Y. (1959). “The reversible transformation of b-lactoglobulin at pH 7.5.” J. Am. Chem. Soc.: 4032-4035.

Wit, J. N. D. (1998). “Nutritional and Functional Characteristics of Whey proteins in Food Products.” J. Dairy Science **81**: 597-608.

Yolken R.H., L. G. A., Vonderfecht S., et al. (1985). “Antibody to human rotavirus in cow’s milk.” N. Engl. J. Med **312**: 605-610.

CAPITOLO 4

PEPTIDI BIOATTIVI



Indice dei paragrafi

4.1 Le proteasi, enzimi idrolitici delle proteine	77
4.2 Idrolisi delle proteine del latte	83
4.3 I peptidi bioattivi	86
4.3.1 Le funzioni biologiche dei peptidi bioattivi	89
4.3.2 Estrazione dei peptidi bioattivi dal siero	93
4.4 Bibliografia	98

4.1 Le proteasi, enzimi idrolitici delle proteine

L'importanza nutrizionale del latte nella dieta umana è dimostrata non solo dallo stretto sodalizio biologico, che fa del latte la prima ed unica fonte di nutrienti del neonato, ma anche dagli innumerevoli studi di ricerca volti ad evidenziare il ruolo funzionale dei costituenti del latte e dei suoi derivati, nell'ambito di una corretta alimentazione umana.

Oltre alle caseine e alle sieroproteine, sono presenti nel latte anche sostanze azotate non proteiche, il cui peso molecolare è inferiore a 500 dalton. Nel latte dei ruminanti rappresentano una debole parte del totale azotato, dal 5 al 7% in media (circa 1,6 g/L). Le componenti principali di questa frazione non proteica (NPN) sono in ordine: urea, creatina, creatinina, ammoniaca, nucleotidi, basi azotate, acido orotico.

L'idrolisi è una degradazione conseguente alla rottura dei legami peptidici, che porta alla distruzione della struttura primaria e alla conseguente liberazione di frammenti proteici più o meno lunghi.

L'idrolisi può avvenire sia per via chimica, sia per via enzimatica.

Alcuni agenti denaturanti di natura chimica possono provocare l'idrolisi, se fatti reagire in modo più intenso o più prolungato; è il caso del riscaldamento oltre 100 °C, impiegando basi e acidi forti.

L'idrolisi enzimatica avviene in condizioni più blande di pH e temperatura, tramite l'impiego di proteasi di provenienza diversa. L'idrolisi dei legami peptidici è una reazione di primaria importanza:



La maggior parte dei substrati degli enzimi proteolitici sono proteine o polipeptidi nei quali i legami peptidici coinvolgono gruppi α -carbossilici o α -aminici e gli aminoacidi sono nella cosiddetta configurazione-L o "naturale" (Clemente 2000).

In base al fatto che tutti gli enzimi proteolitici attaccano legami peptidici e che la specificità non dipende dalla lunghezza della catena del substrato, ma dalla natura delle catene aminoacidiche laterali e dalla presenza o assenza di gruppi ionici adiacenti, in genere sono usate le seguenti definizioni:

- le ESOPEPTIDASI (o peptidasi) idrolizzano legami peptidici adiacenti ai gruppi α -aminici o α -carbossilici terminali e, nel caso delle dipeptidasi, entrambi devono essere adiacenti al legame. Questo gruppo di enzimi include aminopeptidasi, carbossipeptidasi e dipeptidasi;
- le ENDOPEPTIDASI (o proteinasi) possono attaccare sia legami peptidici centrali che terminali. Questa classe include le ben conosciute proteinasi gastrointestinali, pepsina, tripsina, chimotripsina, molti enzimi derivanti da piante, enzimi animali intracellulari, la cathepsina e molti enzimi di origine batterica e da lieviti come la subtilisina.

Attualmente tre differenti proteasi sono individuate in base alla natura chimica dei loro siti attivi.

Molti enzimi hanno un'attività dipendente dalla presenza di uno o più gruppi tiolici e sono inattivati da sostanze che possono reagire con i gruppi tiolici, ioni di metalli pesanti e loro derivati, da agenti chimici ed ossidanti. Tra questi si includono gli enzimi derivanti da piante, certe cathepsine, e alcune proteinasi batteriche e da lieviti.

Un secondo gruppo comprende quegli enzimi la cui attività è dipendente da ioni metallici legati, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} e altri. Questo gruppo include molte delle esopeptidasi, leucina aminopeptidase e prolidase e può includere anche alcune proteinasi batteriche.

Una terza categoria include le proteinasi che sono inibite dal diisopropil fosfofluoridato (DFP) e composti organofosforici simili. Questi enzimi non sono inibiti da reagenti tiolici o da metalli. Alcuni degli enzimi proteolitici in questo gruppo sono la tripsina, la chimotripsina, la subtilisina e la trombina (Lardy H. 1960).

Le esopeptidasi

Idrolizzano legami peptidici adiacenti ai gruppi α -aminici o α -carbossilici terminali.

Le carbossipeptidasi

Le più conosciute sono le carbossipeptidasi A e B ottenute dal pancreas. Per l'azione di questi enzimi è necessaria la presenza nel substrato di un gruppo α -carbossilico terminale non ionizzato. Il sito di azione è sul legame peptidico adiacente.

La specificità d'azione della carbossipeptidase non è condizionata dalla lunghezza del peptide dal quale l'aminoacido carbossilico terminale è rimosso, per cui ci si può aspettare che la carbossipeptidase sia attiva sia sulle proteine che sui polipeptidi.

Un substrato proteico, naturalmente, è resistente all'azione dell'enzima se è privo di un gruppo carbossilico terminale, come in presenza di una catena polipeptidica ciclica o di un gruppo α -aminico terminale. Altre configurazioni resistenti alla carbossipeptidase A sono quelle con gruppo terminale carbossilico non conforme alla specificità dell'enzima, come i carbossili terminali dell'arginina o della lisina. Inoltre la prolina, come gruppo carbossilico terminale o penultimo, blocca l'azione dell'enzima.

La presenza di gruppi carichi vicino al gruppo carbossilico terminale può variare il pH ottimale d'azione della carbossipeptidase. In effetti, è noto che il pH ottimale decresce da 7,5 a 5,5 per l'azione della carbossipeptidase sull'acido glutammico e che, invece, aumenta fino a valori alcalini per la rimozione dell'istidina dalla β -lattoglobulina.

Naturalmente la struttura terziaria delle proteine tende ad opporsi all'attività della carbossipeptidase sui gruppi carbossilici terminali. Dopo la rottura dei legami disolfidici, per mezzo di ossidazione o riduzione, o dopo denaturazione delle proteine, la sequenza carbossilica terminale diventa suscettibile alla rottura del legame peptidico da parte della carbossipeptidase e si liberano molti aminoacidi.

Il pH influisce molto sull'azione dell'enzima: con valori superiori a pH 8,3, la velocità di reazione aumenta con l'aumentare del pH.

Ad esempio, nella β -lattoglobulina che contiene 2 catene polipeptidiche, ciascuna terminante con la sequenza istidina- isoleucina, a pH 7,6 le 2 isoleucine sono rilasciate abbastanza velocemente e le due istidine molto lentamente, mentre a pH 9,2 anche le due istidine sono rilasciate velocemente.

Per quanto riguarda la carbossipeptidase B, i substrati su cui agisce sono gli stessi di quelli su cui agisce la carbossipeptidase A, eccetto per il fatto che il legame peptidico suscettibile è quello legato all'arginina e alla lisina (Lardy H. 1960; A. Pihlanto-Leppälä 2001).

Le aminopeptidasi

Questi enzimi richiedono per la loro azione un gruppo α -amminico terminale ed il sito di azione è il legame peptidico adiacente. L'enzima più conosciuto è la leucina aminopeptidase, derivante dal rene di maiale o dalle mucose intestinali. Enzimi identici o simili alla leucina aminopeptidase sono largamente distribuiti in piante, microrganismi e tessuti animali.

La leucina aminopeptidase idrolizza un gran numero di amidi e peptidi con un gruppo amminico libero e con configurazione-L. Il grado d'idrolisi del substrato aumenta con la dimensione e diminuisce con la polarità del gruppo R.

Si è notato che soltanto alcune proteine con un gruppo amminico terminale sono idrolizzate dalle aminopeptidasi; altre non reagiscono ed altre ancora, come la β -lattoglobulina, reagiscono molto lentamente. Questo comportamento può essere spiegato solo assumendo che la configurazione tridimensionale impedisce l'idrolisi della regione N-terminale.

Le endopeptidasi d'origine batterica e da lieviti

Durante gli ultimi decenni molti studi sono stati focalizzati sulla purificazione e caratterizzazione degli enzimi proteolitici dei microrganismi.

Come gli enzimi di origine animale, le proteasi batteriche e da lieviti includono enzimi attivi a valori di pH acidi, neutri o basici; comunque molte sono le differenze tra gli enzimi proteolitici di origine animale e microbiologica.

Gli enzimi proteolitici sono in genere classificati in proteinasi (endopeptidasi) che agiscono sui legami peptidici più interni o particolarmente sostituiti e le peptidasi (esopeptidasi) che agiscono solamente sul legame peptidico adiacente all'aminoacido terminale. Questa distinzione, però, non è adeguata per le proteinasi microbiche, che idrolizzano non solo le proteine, ma anche molti oligo-peptidi. Inoltre, in contrasto con gli enzimi di origine animale, le proteasi microbiche hanno un *range* di specificità sulla catena peptidica molto vasto.

Proteasi Batteriche (*Bacillus subtilis*)

Le colture filtrate di *Bacillus subtilis* e batteri simili sono le più abbondanti e convenienti per un uso industriale.

Dal ceppo di *B. subtilis* si è in grado di produrre due tipi di proteasi extracellulari, una proteasi neutra con attività massima a pH 7 ed una alcalina con attività massima a pH 10,5. Le proteasi neutre sono prodotte in maggiore quantità, ma vista la loro instabilità durante il periodo di coltura e nei processi di purificazione, si lavora, in genere, con le proteasi alcaline.

Dalle colture di diversi ceppi di *Bacillus subtilis* sono state ottenute due proteasi: subtilisina e BPN' (Bacillus proteasi, ceppo N').

L'attività proteolitica della subtilisina e della BPN' è sempre maggiore di quella della tripsina (attività proteolitica sulle caseine).

La subtilisina attacca più specificatamente i legami peptidici del gruppo carbossilico adiacente alla leucina, cisteina, acido glutammico e glutammina.

Però, molti altri legami sono rotti a prescindere dalla presenza di gruppi acidi, basici, alchilici, aromatici, adiacenti al gruppo carbossilico o amminico. Inoltre questi enzimi possono idrolizzare, non solo i legami interni, ma anche i legami terminali, fornendo così aminoacidi liberi.

Ad esempio, nell'idrolisi della caseina, sono attaccati circa 1/3 dei legami peptidici e si vengono a formare anche molti aminoacidi liberi.

Proteasi derivanti da lieviti

La maggior parte dei lieviti producono apprezzabili quantità di enzimi proteolitici ed alcuni di loro sono stati utilizzati nell'industria alimentare, come nella produzione della salsa di soia con l'*Aspergillus* e di particolari tipi di formaggio con il *Penicillium*.

Le proteasi derivanti da lieviti sono classificate in 3 gruppi in base alla relazione tra l'attività ed il pH nell'idrolisi della caseina e in base all'azione di pochi inibitori proteolitici.

Le proteasi impiegate per l'idrolisi delle proteine del latte

Si possono distinguere due matrici proteasiche: quelle presenti negli organismi superiori (mammiferi) che svolgono funzioni digestive (pepsina, tripsina, chimotripsina ecc.) e quelle ricavate da microrganismi (lieviti, batteri ecc.). Le proteasi servono a migliorare le "proprietà funzionali" delle proteine, in particolare la solubilità in acqua, il potere schiumogeno e la capacità di formare gel stabili.

Estratti di enzimi commerciali, ad attività proteolitica, sono già largamente prodotti a livello industriale per scopi alimentari e farmaceutici (D.G. Schmidt 1993).

Nella tabella 4.1 si riportano alcune specifiche di proteasi commerciali impiegate nel settore farmaceutico e alimentare.

L'idrolisi delle proteine si dimostra interessante anche per produrre alimenti particolari nel settore bio-medico, come quello della rianimazione, o anche per ridurre o eliminare l'allergia alle proteine non soltanto del latte, ma anche di altri substrati naturali di origine vegetale. Il substrato proteico deve avere una struttura che consenta l'attacco enzimatico: farina, concentrati e isolati di proteine vegetali, caseine e sieroproteine, sono già nella forma adatta per la degradazione, ma altri substrati, come carne o fiocchi di soia, richiedono un adeguato pretrattamento.

Le caseine e ancora di più le sieroproteine sono responsabili di fenomeni allergenici per la prima infanzia, in ragione del fatto che la β -lattoglobulina non è presente nel latte materno. Quindi tali SP divengono intolleranti per certe categorie come bambini e neonati (FitzGerald 2000). Con proteasi di diversa natura chimica, si possono produrre idrolizzati enzimatici, ad un grado di idrolisi più o meno spinto, privi di quelle parti proteiche che scatenano le allergie.

Produttore	Enzima	Funzione	Provenienza
Novo Nordisk	Alcalase 2.4 LFG	Endopeptidasi	<i>Bacillus licheniformis</i>
Novo Nordisk	Protamex	Endopeptidase	Mix batterico
Novo Nordisk	Flavourzyme 500 MG	Aminopeptidasi	?
Novo Nordisk	Pancreatic Trypsin PTN 6.0S*	Endopeptidase	Pancreas porcino
Novo Nordisk	Pancreatic Trypsin PTN 3.0 p**	Endopeptidase	Pancreas porcino
Amano Enzymes	Protease A 2G	Endopeptidase e esopeptidase	<i>Aspergillus oryzae</i>
Amano Enzymes	Protease M	Endopeptidase e esopeptidase	<i>Rhizopus oryzae</i>
Amano Enzymes	Peptidase N		<i>Bacillus subtilis</i>
Sigma	Protease type VIIIA		<i>Bacillus licheniformis</i>
Sigma	Protease type XXIII		<i>Aspergillus oryzae</i>

Tabella 4.1
Specifiche generali di alcune proteasi commerciali

* tipo purificato da sali

** tipo tecnico con sali

La Società Amano ha selezionato proteasi specifiche, di provenienza microbica, per l'idrolisi delle caseine e delle sieroproteine. Nella tabella 4.2 si riportano le principali proteasi Amano attive sulle sieroproteine.

La tabella indica la specificità analitica d'alcuni preparati enzimatici, riportando la capacità idrolitica nei confronti delle due principali proteine del siero. Infatti, un alto livello idrolitico verso la β -lattoglobulina è in ogni modo un indice di bassa allergenicità dell'idrolizzato.

Enzima	% d'idrolisi	α-lattalbumina	β-lattoglobulina
Protease A-Amano 2G	89	Basso	Alto
Protease M	91	Basso	Medio
Protease P	84	Basso	Medio
Protease N	80	Basso	Alto
Protease S	80	Medio	Alto
Proleather FG-F	81	Alto	Alto
Peptidase R	75	Basso	Basso
Pancreatina F	74	Basso	Alto

Tabella 4.2
Effetto delle proteasi Amano sull'idrolisi delle sieroproteine

Fornitore	Enzima	pH	T °C	Tempo (ore)	Conc (mg/L)
Novo Nordisk	Alcalase 2.4 LFG	7	55	0.5	128-320
Novo Nordisk	Protamex	6,6	55	0.5	128-320
Novo Nordisk	Flavourzyme	6,5	55	4-16	320-800
Amano	Amano M	4,5-5	40-50	3-6	128-640
Amano	Amano 2G	7	50	3-6	128-640

Tabella 4. 3
Condizioni ottimali delle proteasi impiegate

Gli enzimi commerciali utilizzati per l'idrolisi del latte sono forniti dalla Novo Nordisk e dalla Amano, come specificato nella tabella 4.3.

Alcalase Novo Nordisk

L'Alcalase è una proteasi batterica molto efficiente, commercializzata in forma liquida, di colore marrone scuro.

È un enzima commerciale sviluppato soprattutto per l'idrolisi di proteine alimentari. L'Alcalase è un prodotto della fermentazione di un ceppo selezionato di *Bacillus Licheniformis*. Il principale componente enzimatico è una endopeptidase, la subtilisina A (vedi *Bacillus Subtilis*).

Le condizioni ottimali per l'Alcalase 2.4 L sono temperatura 55 °C o 70 °C, in base al tipo di substrato, e pH compreso tra 6,5 e 8,5. Il peso molecolare approssimativo è di 27,3 kDa .

In base ai risultati di prove eseguite con l'Alcalase, è noto che il grado di idrolisi sulle proteine del siero (inteso come percentuale di legami peptidici aperti), dopo 4 ore di reazione a pH 8 e temperatura di 70 °C, è quasi del 100%.

L'Alcalase può essere inattivato da un processo termico in trenta minuti a 72 °C o di più, quando il pH è 4, e in dieci minuti a 85 °C o di più, quando il pH è 8. Comunque l'inattivazione dipende molto dal substrato e dal pH, per cui l'eliminazione dell'Alcalase si deve verificare con diverse analisi per la determinazione dell'attività residua.

Nella figura 4.1 si riporta l'attività enzimatica dell'Alcalase in funzione della temperatura.

Il grafico mostra l'azione dell'enzima su di una soluzione di ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranoside). Secondo le indicazioni del fornitore, il *range* di temperatura in cui l'Alcalase 2.4 L è più efficiente è tra 57-63 °C, in base al tipo di substrato utilizzato, mentre l'intervallo ottimale di pH è compreso tra 6,5 e 8,4.

Nel grafico di figura 4.2 si riporta l'attività dell'Alcalase in funzione del pH.

Come si vede dal grafico, l'optimum di attività enzimatica dell'Alcalase si colloca intorno a 7,3, quindi al pH del latte. Sotto il pH 6 l'attività scende sensibilmente, il che dimostra che non può essere impiegata per idrolizzare sieri acidi (Lardy H. 1960; G. Iqbal 1996).

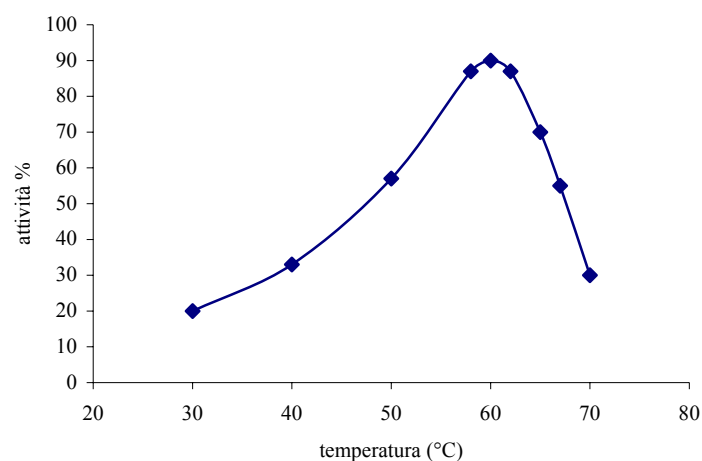


Figura 4.1
Attività dell'Alcalase 2.4 L al variare della temperatura

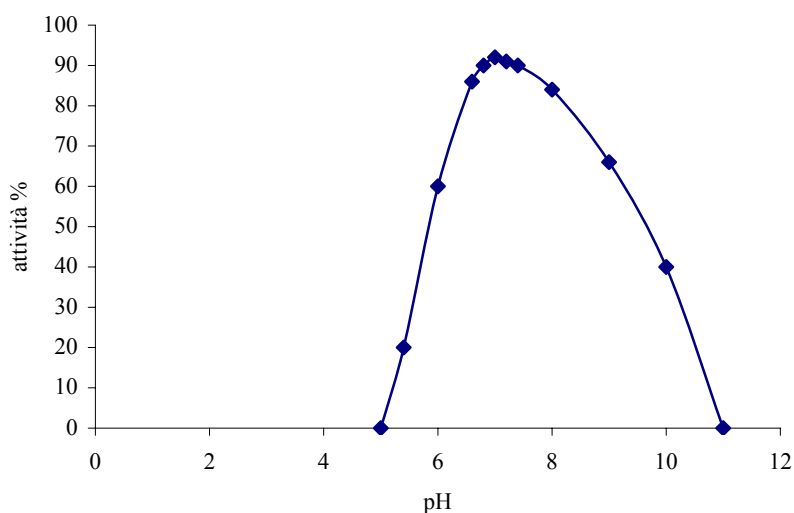


Figura 4.2
Attività dell'Alcalase 2.4 L al variare del pH

4.2 Idrolisi delle proteine del latte

Le prove di idrolisi enzimatica sul latte bovino sgrassato, sono state eseguite come indicato nello schema di figura 4.3. Il latte, totalmente scremato e con una concentrazione proteica dichiarata dal produttore di 33 g/L, è stato idrolizzato con l'enzima Alcalase. Il dosaggio dell'enzima è di 0,35 g/L e la reazione d'idrolisi ha proceduto per 4 ore a 45 °C. Il pH non è stato necessario aggiustarlo perchè era di 7,3. La reazione idrolitica è stata condotta sotto agitazione magnetica, per 2,5 ore. Al termine dell'idrolisi il fermentato è stato ultrafiltrato con membrane a diverso taglio molecolare. Sui permeati sono state effettuate le analisi dei peptidi generati dalla idrolisi enzimatica.

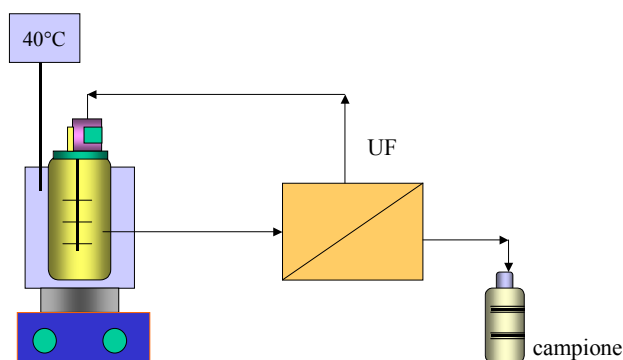


Figura 4.3
Schema del processo idrolitico delle proteine del latte

Nel processo non si osserva alcuna formazione di coaguli, come invece avviene con fermenti batterici, mentre il latte, col procedere dell'idrolisi, assume un colore leggermente marrone. Durante l'idrolisi il pH diminuisce da 6,57 del latte tal quale a 6,02 dopo due ore di incubazione. Con l'aggiunta di un adeguato quantitativo di sodio idrato diluito, il pH si è stabilizza intorno a 6,20.

Il latte idrolizzato, al termine della reazione, presenta ancora uno spiccato e netto sapore amaro.

La prova di ultrafiltrazione è stata effettuata con membrane a spirale avvolta in PVDF, con un cut-off nominale di 10 kDa. Le condizioni di esercizio sono indicate nella tabella 4.4.

Il latte tal quale, il latte idrolizzato (alimento), il permeato ed il concentrato di UF sono stati analizzati con il metodo Kjeldhal. Le concentrazioni di azoto totale ottenute sono riportate nella tabella 4.5.

Volume alimento	2 L
Pressione uscita concentrato	3 bar
Temperatura di esercizio	25 °C
Velocità tangenziale	1,2 m/s
Flusso di permeato	2,37 ml/min

Tabella 4.4
**Condizioni della prova di UF del latte idrolizzato con A "Amano" 12
con membrana piana PVDF, 10 kdalton**

Flusso	Concentrazione (g/L)
Latte tal quale	34,03
Latte idrolizzato con Amano 2A	34,46
Permeato di UF	27,12
Concentrato di UF	29,58

Tabella 4.5
**Azoto totale della prova di UF del latte idrolizzato con Amano 2°
con membrana piana PVDF, 5-10 kDalton**

Il rapporto percentuale di azoto totale tra il permeato e l'alimento è del 78,7%, il che indica che le proteine sono state abbondantemente idrolizzate.

Sul latte tal quale, sull'idrolizzato ed il permeato di UF è stato eseguito uno studio elettroforetico, da cui risulta che il permeato di UF, anche se concentrato 15 volte, non presenta più le bande delle SP, in particolare della β -lattoglobulina, per cui tutte le proteine del latte sono state idrolizzate; al loro posto si sono formati peptidi, cioè frazioni proteiche attive.

Con la stessa metodologia, quindi con lo stesso enzima, è stato trattato il siero bovino e sul permeato di UF sono state eseguite analisi HPLC per evidenziare eventuali tracce di SP (figura 4.4).

È evidente dal grafico che il permeato (linea blu) non contiene SP, quindi è un prodotto utilizzabile come alimento dai soggetti sensibili (allergici) alle proteine del latte.

Il problema pratico è costituito dal sapore amaro del prodotto, che tuttavia si può coprire con l'aggiunta di edulcoranti o eccipienti al sapore di cacao, vaniglia ecc.

Dal punto di vista pratico la ricerca eseguita ha dovuto affrontare alcune condizioni particolari, come la scelta dell'enzima, le condizioni di idrolisi e la scelta della membrana di UF per ottenere solo peptidi bioattivi.

La scelta dell'enzima dipende non soltanto dai fattori biochimici (affinità per le caseine e le SP), ma anche da aspetti commerciali.

Infatti, il preparato enzimatico deve avere un costo compatibile con un processo industriale di lavorazione del latte. Ciò ha comportato l'esclusione di enzimi specifici per l'idrolisi delle caseine e delle SP che presentano costi elevati, in un range tra 25 e 250 €/g.

Per questi motivi sono stati scelti enzimi di provenienza microbica il cui costo è dell'ordine di qualche €/g, quindi molto economico.

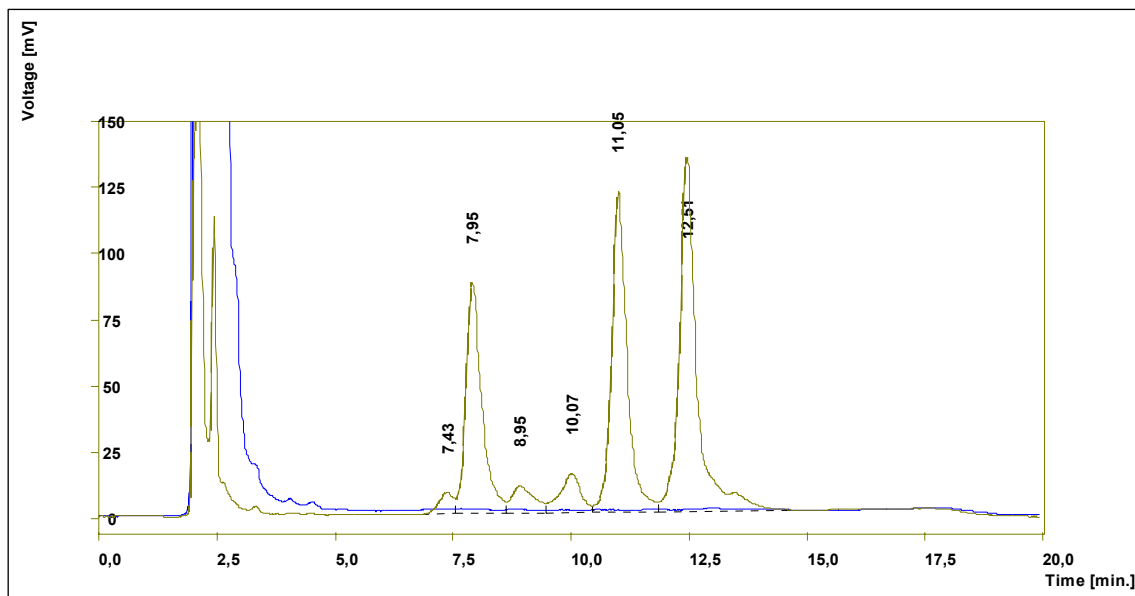


Figura 4.4
Cromatogramma del siero concentrato e dell'idrolizzato
Verde= siero concentrato; blu = siero idrolizzato

Le condizioni di idrolisi, devono essere in parte prefissate, dal momento che il substrato è il latte. Di conseguenza il pH, deve essere vicino alla neutralità, la concentrazione proteica della matrice è definita, come pure le condizioni chimico-fisiche del substrato. La temperatura può oscillare nel *range* 20-55 °C.

La scelta degli enzimi idrolitici è stata fatta in accordo alle condizioni di idrolisi delle proteine del latte.

Il processo di idrolisi è stato eseguito in batch agitato e termostato, regolando i parametri come il pH, l'agitazione, il dosaggio degli enzimi, la temperatura e il tempo di reazione.

La scelta delle membrane

Così come la scelta dell'enzima idrolitico condiziona il processo d'idrolisi, anche l'andamento del processo idrolitico condiziona la scelta della membrana.

Infatti, qualora l'enzima non avesse effetto sulla rottura delle famiglie proteiche, la membrana dovrebbe garantirne la ritenzione delle proteine con effetti allergenici.

È necessario osservare che la discriminazione tra le frazioni proteiche idrolizzate da parte della membrana non dipende solo dal cut-off, ma anche da altri fattori come la carica elettrica dei protidi, la loro struttura chimica e conformazionale, la salinità del mezzo, la possibile formazione di aggregati molecolari con altre molecole in soluzione (lattosio, calcio, fosfati ecc.).

La sperimentazione ha dimostrato che la membrana agisce come selettore di frazioni proteiche, lasciando passare quelle a più basso peso molecolare (peptidi bioattivi). Ciò è stato ottenuto con membrane a spirale avvolta, in particolare con quelle di acetato di cellulosa rigenerato, con taglio molecolare inferiore a 30 kDa. Questo taglio molecolare, apparentemente ampio rispetto ai PM delle SP, le esclude completamente perché non passano nel permeato.

4.3 I peptidi bioattivi

Come abbiamo visto in precedenza, il latte contiene componenti che forniscono elementi nutritivi basilari, sostanze deputate al potenziamento delle difese immunitarie, come le immunoglobuline, il lisozima, la lattoferrina ecc., e sostanze bioattive per individui adulti e neonati.

Dalla frazione proteica del latte è possibile ottenere a seguito di processi digestivi e di reazioni idrolitiche in vitro, un pool di peptidi a peso molecolare basso, i quali possono essere separati e testati individualmente per le loro proprietà biologiche. I peptidi bioattivi sono stati identificati all'interno della sequenza aminoacidica delle proteine native del latte. Reazioni idrolitiche come quelle catalizzate dagli enzimi digestivi, come le proteasi, determinano il loro rilascio. Questi peptidi influenzano direttamente i numerosi processi biologici, stimolando specifiche risposte fisiologiche a livello comportamentale, ormonale e gastrointestinale.

Le SP ed i peptidi bioattivi rappresentano la frazione più rilevante di componenti del siero, ad essi tuttavia si affiancano in questa matrice numerose altre molecole di diversa origine, biologicamente attive.

Il siero è infatti ricco di vitamine (riboflavina e vitamina A, biotina), di glucidi derivati dall'idrolisi del lattosio. A tali composti sono associate numerose proprietà funzionali e biologiche, pertanto la presenza di queste componenti nella matrice garantisce un incremento del valore aggiunto del prodotto finale (Alais 1995; Clare H. 1999).

Di seguito vengono considerate le caratteristiche dei peptidi bioattivi, mentre nel Capitolo 5 verranno approfonditi alcuni aspetti della produzione e delle proprietà biomediche dei GOS.

I peptidi biologicamente attivi (PB) sono frammenti proteici derivanti dalla rottura di α -, β -, κ -caseine e di alcune SP, in particolare dalla β -lattoglobulina e α -lattalbumina. Tale frammentazione avviene naturalmente da parte degli enzimi proteolitici presenti nell'intestino (pepsina, tripsina) in seguito a consumo alimentare del latte, oppure artificialmente ad opera degli enzimi che operano il processo di cagliatura (chimosina, chimotripsina), e anche dai lattobacilli durante la fermentazione lattica (V. Bottazzi 2004). Essi hanno caratteristiche biochimiche molto diversificate tra loro per quanto attiene a struttura primaria, punto isoelettrico, peso molecolare; quest'ultimo in media rimane compreso fra 200 e 1.900 Da. A seconda della loro specifica composizione aminoacidica presentano proprietà biomediche diverse (Gauthier 1993).

In figura 4.5 è riportato uno schema del taglio enzimatico delle proteasi sulla struttura primaria della β -lattoglobulina.

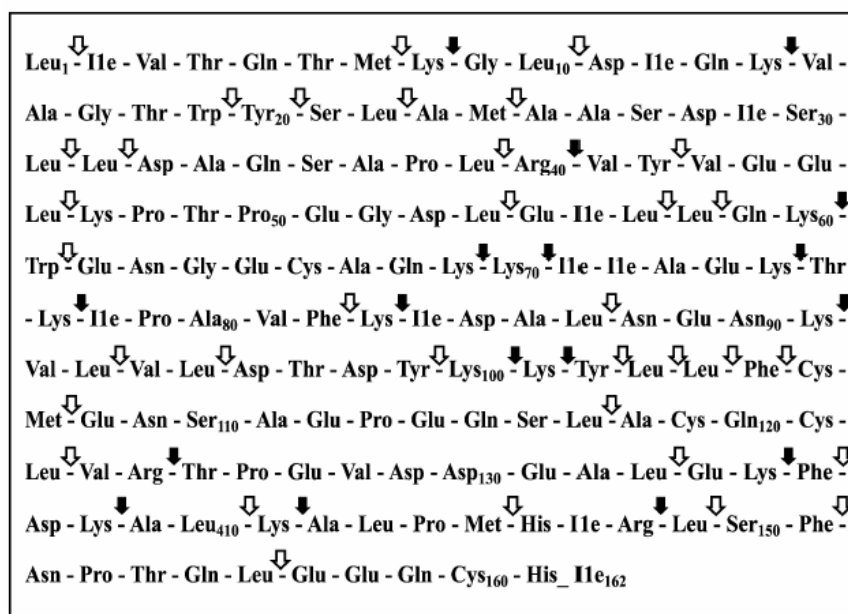


Figura 4.5
Punti di apertura del legame peptidico della β -lattoglobulina, tramite
tripsina (freccia nera) e chimotripsina (freccia chiara)
(Gauthier and Pouliot)

I caseinomacropeptidi (CMP)

Costituiscono la famiglia più importante dei PB in ragione delle proprietà biomediche ad essi collegate. Derivano dalla idrolisi della α , β e κ caseina operata dalla tripsina presente nel caglio, l'enzima interviene frammentando la caseina in diversi punti della catena aminoacidica.

Essi costituiscono il 15-10% della componente proteica del siero. I CMP sono prevalentemente costituiti dai residui 106-169 della κ -caseina (S.F. Gauthier 2003).

Considerando che in media il contenuto proteico del siero è di circa 8-12 g/L, i CMP presentano una concentrazione compresa fra 1 e 1,8 g/L.

I glicomacropeptidi (GMP)

La loro produzione è dovuta all'azione della chimosina che agisce sulle caseine durante il processo di caseificazione. I GMP si formano unicamente quando la chimosina è presente al momento del processo di cagliatura, presentano un alto contenuto in aminoacidi ramificati e mancano totalmente di aminoacidi aromatici come la fenilalanina. Questa particolarità rende tali molecole interessanti per l'alimentazione di individui fenilchetonurici (K. Marshall).

I GMP sono difficilmente assorbibili tal quali, quindi per giungere nel torrente ematico ed esplicare i loro effetti devono essere scissi in frammenti più piccoli. I GMP, insieme ai proteso-peptoni prodotti durante la digestione parziale delle proteine e degli acidi grassi a lunga catena, stimolano la liberazione della colecistochinina, ormone secreto dalle cellule "T" della mucosa del duodeno e del digiuno, responsabile della sensazione di sazietà e di molte altre funzioni gastrointestinali quali l'inibizione della motilità gastrica, la dismissione di bile ed enzimi pancreatici nel lume dell'intestino tenue.

Nella tabella 4.6 si riportano le proteine che generano alcuni PB, ed i frammenti proteici attivi isolati da latti fermentati con diversi ceppi batterici (E. Lahove 1971; V. Bottazzi 2004).

Nella tabella 4.7 si riportano i PB che si ottengono dalla α -LA e β -LG (S.F. Gauthier 2003).

Proteine	Frammenti proteici
α-caseina	(23-34) (23-37) (28-34) (104-109) (142-147) (143-148) (157-164) (194-199)
β-caseina	(57-64) (74-76) (84-86) (108-113) (169-175) (177-183) (193-198)
κ-caseina	(58-59) (108-110)
α-LA	(50-53) (105-110)
β-LG	(9-14) (15-20) (102-105) (142-148)

Tabella 4.6
Frammenti peptidici attivi derivanti dalle proteine del latte

SP di origine	Sequenza peptidica	Peso molecolare	Punto isoelettrico (pH)	Funzione biomedica
β -LG	9-14	673	5,8	Ace inibitore
β -LG	15-19	696	5,1	Ace inibitore
β -LG	32-40	857	5,8	Ace inibitore
β -LG	78-83	546	5,5	Battericida
β -LG	92-100	1065	4,2	Battericida
β -LG	142-146	837	9,8	Ace inibitore
α -LA	1-5	-	-	Battericida
α -LA	99-108	-	-	Immunoregolazione

Tabella 4.7
Peptidi bioattivi isolati in lisati enzimatici di β -lattoglobulina bovina e α -lattalbumina ottenuti con l'enzima tripsina

4.3.1 Le funzioni biologiche dei peptidi bioattivi

Il ruolo delle proteine nella dieta è limitato alla disponibilità dell'azoto richiesto per la biosintesi dei tessuti, delle proteine circolatorie e per la biosintesi degli acidi nucleici. Le attuali conoscenze sul ruolo fisiologico e biochimico dell'azoto nutrizionale, che si sono sviluppate nell'ultima decade, hanno mostrato che i frammenti peptidici, risultanti dall'azione delle proteasi nel tratto digestivo, non solo forniscono gli amminoacidi all'organismo, ma sono anche regolatori fisiologici sia direttamente, come neurotrasmettitori, che indirettamente, perchè intervengono nella secrezione di ormoni ed enzimi dai recettori intestinali (Brody 2000; Eisenstein 2002).

Peptidi antimicrobici

Il potere antibatterico del latte è dovuto alla cooperazione sinergica delle varie componenti che assolvono una funzione batteriostatica.

Una parte dei peptidi antimicrobici deriva dalla idrolisi enzimatica delle caseine (caseidina) mentre alcuni altri originano dalla idrolisi della lattoferrina (lattoferricina) entrambi queste classi di composti presentano attività battericida e fungicida nei confronti di molti ceppi microbici e funghi.

Il meccanismo di azione di molti di questi peptidi sembra sia legato alla carica netta positiva di cui sono dotati, con la quale sono in grado di alterare la permeabilità della membrana cellulare di numerosi microrganismi (Clare H. 1999).

Peptidi con proprietà anti ipertensive.

I peptidi del latte cui è stata associata una funzione anti-ipertensiva agiscono sull'enzima che catalizza la conversione della angiotensina I ad angiotensina II ACE (Angiotensin Converting Enzyme) (Nakamura 1995; Nakamura 1995; Yamamoto 1997). L'enzima in questione è una peptidil-dipeptidasi in grado di rimuovere un dipeptide dalla porzione N-terminale della molecola del substrato.

La conversione di Angiotensina I in Angiotensina II determina un incremento della pressione sanguigna e dei livelli di aldosterone, nonché l'inattivazione della azione di controllo svolta dalla Bradichinina. I peptidi in grado di bloccare tale conversione derivano ancora una volta dalla frammentazione triptica delle caseine, vengono comunemente denominate casochinine. Esse sono state individuate all'interno della sequenza della β - e κ -caseina umana (Kohmura et al. 1989, Kohmura et al. 1990).

La porzione C-terminale, rilasciata in seguito all'idrolisi delle caseine presenta un motivo strutturale in grado di legarsi alla cavità di legame sull'enzima ACE. Il sito di legame sull'enzima mostra affinità per aminoacidi idrofobici.

È stato inoltre osservato che la presenza di un residuo di lisina o arginina nella porzione C-terminale è di cruciale importanza perché l'enzima sia effettivamente inibito. La rimozione di tale residuo dalla sequenza dell'inibitore bradichinina si concretizza in una perdita totale della capacità inibitoria dell'enzima (Maruyama 1987; Chiba 1989; Meisel 1993).

Peptidi con attività antitrombotiche

La coagulazione del latte durante il processo di cagliatura ad opera dell'enzima chimosina sembra essere comparabile con il processo di coagulazione del sangue ad opera del fibrinogeno. È stato infatti osservato che il dodecapeptide derivante dal fibrinogeno umano e l'undecapeptide originato dall'idrolisi della κ -caseina sono strutturalmente e funzionalmente abbastanza simili.

Questi peptidi derivati dalle caseine sono definiti "casopiastrine" e sono in grado di agire sul processo di aggregazione piastrinico impedendo il legame del fibrinogeno al suo sito di legame sulle piastrine attivate leganti l'ADP (Jolles 1986).

Altre molecole peptidiche derivanti dall'azione della tripsina sulle caseine intervengono ancora sul fibrinogeno, senza alterarne le capacità di legame alle piastrine, ma inibendo comunque l'aggregazione di queste ultime (Fiat 1989; Fiat 1989; Fiat 1993).

Caseinofosfopeptidi (CPP)

I caseinofosfopeptidi sono costituiti da residui peptidici di caseine fosforilati. I residui di fosfato sono organizzati in cluster di serine fosforilate seguite da acido glutammico.

Questa frazione peptidica mostra un eterogeneo grado di fosforilazione dei residui di serina, sembra che il livello fosforilazione sia direttamente in relazione con il loro potere chelante nei confronti di molti ioni.

Tali peptidi sono infatti in grado di formare dei complessi sali organofosforici e di veicolare pertanto alcuni ioni tra cui il calcio (Sato 1986; Meisel 1997). Questi peptidi risultano resistenti all'attacco da parte degli enzimi digestivi nel tratto gastrointestinale, pertanto sono le principali molecole in grado di aumentare l'assorbimento di minerali nella porzione distale del tratto intestinale negli animali nutriti con mangimi a base di caseine del latte, rispetto agli animali allevati con foraggio a base di soia (Yuan 1991; Kitts 1992; Yuan 1994).

Peptidi immunomodulatori

I peptidi immunomodulatori del latte coinvolgono sia il sistema immunitario sia la risposta anticorpale mediata da cellule. Alcuni peptidi anti ACE come le casochinine intervengono indirettamente a rimuovere l'inibizione operata da questo enzima sul repressore Bradichinina il quale è in grado di promuovere alcune risposte immunitarie. Peptidi derivanti dall'idrolisi delle caseine sono in grado di attivare nell'uomo la fagocitosi da parte dei macrofagi nei confronti dei globuli rossi senescenti (Jolles 1981; Migliore-Samour 1989; Fiat 1993).

Anche la lattoferrina, peptide derivante dalla lattoferrina, mostra analoghe proprietà di incremento dell'attività fagocitica (Miyauchi 1998)

Piccoli peptidi corrispondenti alla porzione N-terminale della α -Lattalbumina e della κ -caseina sono alla base di alcuni meccanismi di proliferazione dei linfociti del sangue negli umani (H. Kayser 1996; Kayser and H. 1996)). In generale molti dei meccanismi con cui tali peptidi sono in grado di stimolare la risposta immunitaria rimangono non chiariti (Elitsur 1991)

Peptidi oppioidi

I peptidi ad azione oppioide derivano dalla idrolisi della α e β -caseina, l' α -lattalbumina, manifestano delle attività simili alla morfina e vengono appunto denominate β -casomorfine (Brantl 1979; Henschen 1979; Yoshikawa 1986). In generale i peptidi derivanti dalla α - e β -caseina danno luogo a risposte agoniste, mentre quelli derivanti dalla κ -caseina risposte antagoniste.

Con l'eccezione dell' α -caseina, la maggior parte di questi peptidi mostra un tipo di struttura comune, definita da un residuo di tirosina amino terminale che è assolutamente essenziale per l'attività (Chang 1981; Holtt 1983). Tipicamente, un secondo residuo aminoacidico aromatico, come fenilalanina o tirosina è anche presente in terza o quarta posizione. Questo motivo strutturale si adatta molto bene alla cavità di legame del recettore oppioide. Uno dei più potenti peptidi oppioidi ottenuti dal latte, la β -casomorfina -4-amide (o morfocetina) contiene anche un residuo di prolina cruciale per l'espletamento della sua funzione (Mierke 1990).

Oppioidi agonisti

Alcune β -casomorfine sono considerate dei promotori della attività oppioide, e corrispondono alla frazione della β -caseina costituita dai residui da 60 a 70. Questa è considerata normalmente la "zona strategica" della proteina (Koch 1985). Le β -casomorfine sono resistenti agli enzimi digestivi del tratto gastrointestinale (Meisel 1986). Dal momento che il loro assorbimento nello stomaco non è stato osservato negli individui adulti, generalmente si assume che il loro effetto a livello fisiologico si espleti solo a livello del tratto gastrointestinale con importanti ricadute a livello dell'assorbimento di aminoacidi (Schulte-Frohlinde 1994; Teschemacher 1994).

Una volta entrati nel flusso ematico questi peptidi sono rapidamente degradati. Al contrario, nei neonati le β -caseinomorfine sono trasportate passivamente attraverso la mucosa intestinale e possono determinare risposte a livello neurologico come un diffuso senso di calma e una predisposizione al sonno (Svedberg 1985).

Le β -casomorfine in qualità di ligandi dal potere oppioide, arrivano a modulare il comportamento, presentano numerosi effetti analgesici (Panskeep 1984; Paroli 1988), prolungano il tempo di transito attraverso l'intestino limitando la peristalsi intestinale (Tome 1987), operano inoltre una azione antisecretoria (Daniel et al. 1990).

Essi modulano il trasporto degli aminoacidi (Brandsch 1994). In altri casi i peptidi oppioidi intervengono a modulare il senso di appetito determinando il rilascio di insulina e somatostatina da parte del pancreas (Nieter et al. 1981).

Peptidi oppioidi antagonisti

Alcuni peptidi sono in grado di sopprimere l'attività oppioide.

Le casoxine A e B sono state sintetizzate chimicamente e si è potuta constatare la loro omologia con alcuni frammenti di sequenza appartenenti alla κ -caseina (Chiba 1989).

La casoxina C è un oppioide antagonista ottenuto dalla digestione triptica della κ -caseina bovina. Le lattoferroxine sono peptidi oppioidi antagonisti originati dalla lattoferrina umana (Tani 1990).

Nella tabella 4.8 si riportano le specifiche chimiche di questi peptidi e le relative funzioni biologiche.

Peptide sequence ¹	Name	AA ² segment	Physiological classification	Release protease
FFVAP	α_1 -Casokinin-5	α_1 -CN (f 23–27)	ACE inhibitor	Proline endopeptidase
AVPYPQR	β -Casokinin-7	β -CN (f 177–183)	ACE inhibitor	Trypsin
YGLF	α -Lactorphin	α -LA (f 50–53)	ACE inhibitor and opioid agonist	Synthetic peptide
ALPMHIR	β -Lactorphin	β -LG (f 142–148)	ACE inhibitor	Trypsin
KVLPVPQ	Antihypertensive peptide	β -CN (f 169–174)	Antihypertensive peptide	Lactobacillus CP790 protease & synthetic peptide
MAIPPKKNQDK	Casoplatelin	κ -CN (f 106–116)	Antithrombotic	Trypsin & synthetic peptide
KDQDK	Thrombin inhibitory peptide	κ -CN glyco-macropptide (f 112–116)	Antithrombotic	Trypsin
KRDS	Thrombin inhibitory peptide	Lactotransferrin (f 39–42)	Antithrombotic	Pepsin
QMEAES*IS*S*	Caseinophosphopeptide	α_1 -CN (f 59–79)	Calcium binding and transport	Trypsin
EEIVPNS*VEQK LLY	Immunopeptide	β -CN (f 191–193)	Immunostimulatory (+)	Synthetic
FKCRRWQWRMK KLGAPSITCVRR AF	Lactoferricin B	Lactoferrin (f 17–41)	Immunomodulatory (+) and antimicrobial	Pepsin
YQQPVLGPVR	β -Casokinin-10	β -CN (f 193–202)	Immunomodulatory (+/-) & ACE Inhibitor	Synthetic
RYLGYLE	α -Casein exorphin	α_1 -CN (f 90–96)	Opioid agonist	Pepsin
YGFQNA	Serorphin	BSA (f 399–404)	Opioid agonist	Pepsin
YLLF-NH ₂	β -Lactorphin (amide)	β -LG (f 102–105)	Opioid agonist = ACE Inhibitor	Synthetic or Trypsin
YIPQYVLSR	Casoxin C	κ -CN (f 25–34)	Opioid antagonist	Trypsin
[YVPF PPF]	Casoxin D	α_1 -CN (f 158–164)	Opioid antagonist	Pepsin-chymotrypsin
YLGSGY-OCH ₃	Lactoferroxin A	Lactoferrin (f 318–323)	Opioid antagonist	Pepsin

Tabella 4.8
Esempi di peptidi bioattivi del latte
(da Clare et al. 2000)

I proteoso-peptoni (PP)

I proteoso-peptoni costituiscono una frazione proteica presente nel latte e nel siero che manifesta una alta stabilità termica e chimica.

La frazione dei proteoso-peptoni è di norma divisa in due gruppi: il primo gruppo è composto da quei peptidi risultanti dalla proteolisi delle caseine da parte di proteasi indigene del latte, il secondo gruppo è invece composto da quella frazione non correlata alle caseine chiamata componente PP3 (proteoso-peptone 3) (Girardet 1996).

Il componente PP3 è costituito principalmente da una specifica glicoproteina fosforilata. Il PP3 di origine bovina è costituito da una singola catena polipeptidica di 135 aminoacidi.

La frazione totale dei proteoso-peptoni presente nel latte risulta di particolare interesse per via delle sue speciali proprietà funzionali; nello specifico, è stata dimostrata una grande capacità di formare emulsioni. Diversi autori assegnano alla frazione PP3 l'origine di tali proprietà (Shimizu 1989). Altra caratteristica di questa frazione proteica altamente idrofobica è la fortissima affinità per le interfaccia acqua/olio ed una spiccata capacità di ridurre la tensione superficiale (Courthaudon 1985).

4.3.2 Estrazione dei peptici bioattivi dal siero

Da quanto è stato riportato, in merito alle proprietà biomediche dei PB è evidente l'interesse commerciale per recuperare industrialmente queste molecole naturali, con notevoli funzioni biomediche.

Queste si possono ricavare direttamente dal latte, previo intervento di enzimi specifici come la tripsina, come parzialmente avviene nel processo di caseificazione. Tuttavia, dal punto di vista pratico è più interessante ricavarli dal siero, che è considerato un sottoprodotto, quindi ha un costo notevolmente inferiore a quello del latte.

Nel siero sono sempre presenti CMP che hanno un peso molecolare medio intorno a 6 kDa, e sono parzialmente presenti in tracce anche peptidi derivanti dalla idrolisi delle SP, cioè i GMP.

Nel siero inoltre, quando si applica il processo di UF, si può procedere all'idrolisi specifica delle SP, per aumentare sensibilmente la produzione di PB. Quindi si effettua l'idrolisi sul concentrato di UF che ha una concentrazione almeno 10 volte superiore a quella del siero. In pratica 90-100 g/L rispetto a 6-9 g/L di SP nel siero bovino.

Queste molecole, a basso peso molecolare, passano interamente la barriera filtrante della MF, vengono parzialmente trattenuti dall'UF, perchè si trovano in parte aggregati con le SP ed i glucidi, ma passano abbondantemente sul permeato di UF.

Il processo ottimale di produzione dei PB è quello di idrolizzare il concentrato di UF in modo da trasformare tutte le SP in molecole idrolizzate.

Tali molecole inoltre si trovano particolarmente concentrate nel processo tradizionale a membrana di scomposizione del siero di latte, come verrà trattato nel capitolo 6.

In particolare si trovano nel concentrato di NF, dove sono ritenuti insieme al lattosio, alla riboflavina e ad altre sostanze a basso peso molecolare, cioè inferiore a 200 kDa.

Nel grafico di figura 4.6 si riportano le analisi HPLC del concentrato di NF ottenuto dal siero vaccino, senza l'impiego specifico di nessun enzima idrolitico. Il cromatogramma mostra i picchi dei frammenti proteici a basso peso molecolare.

In questo cromatogramma non sono presenti molecole di SP intere, perché sono state portate via dal processo di UF, cioè si trovano nel retentato di UF.

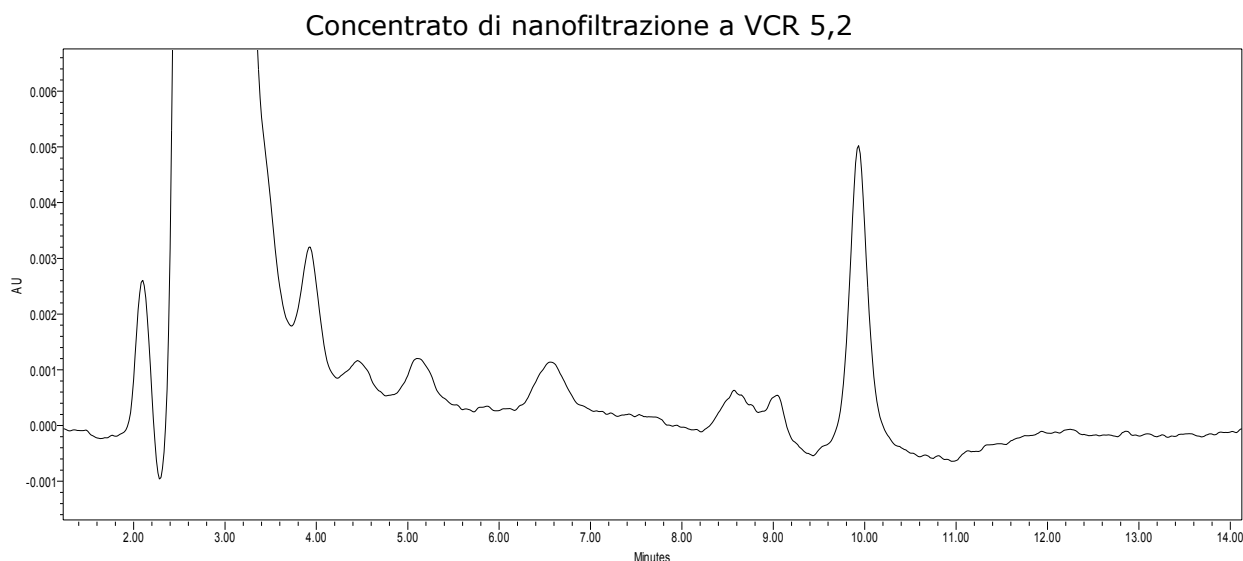


Figura 4.6
Analisi HPLC dei peptici bioattivi nel concentrato di nanofiltrazione
di siero di capra

Una prova è stata condotta sul siero vaccino, partendo dal concentrato di UF che è stato successivamente idrolizzato con Alcalase 2.4, al fine di produrre quantità più importanti di PB.

L'enzima è stato utilizzato come descritto nel paragrafo 4.1. Al termine dell'idrolisi enzimatica il prodotto è stato trattato nuovamente in UF impiegando una membrana con taglio molecolare 30 kDa.

Nel grafico di figura 4.7 si riporta il cromatogramma relativo ai PB ed alle SP effettuato rispettivamente sul primo concentrato di UF dopo l'idrolisi (traccia rossa), e sul permeato della seconda UF a cut-off 30 kDa (traccia verde).

Sul permeato della seconda UF rimangono soltanto i PB poiché la membrana da 30 kDa elimina completamente anche le frazioni di SP eventualmente non idrolizzate, che non passano nell'effluente permeato, come indicato dalla traccia rossa nel cromatogramma.

Prove successive, che per brevità non riportiamo, dimostrano che prolungando il tempo di idrolisi, la trasformazione delle SP in peptici bioattivi è quantitativa, al punto che il secondo passaggio in UF 30 kDa può essere evitato.

Tuttavia l'impiego della seconda UF 30 kDa garantisce l'eliminazione dal permeato, di molecole allergeniche (β -Lattoglobulina) sfuggite alla azione idrolitica dell'enzima. Alla luce di tali considerazioni il passaggio appare di estremo interesse in un'ottica di produzione di specialità per individui ipersensibili alla β -LG, in questi soggetti, infatti sono sufficienti tracce (1 ppb) di tale proteina per scatenare reazioni allergiche anche molto violente.

Inoltre il protocollo proposto funzionale alla produzione e separazione di PB su scala industriale.

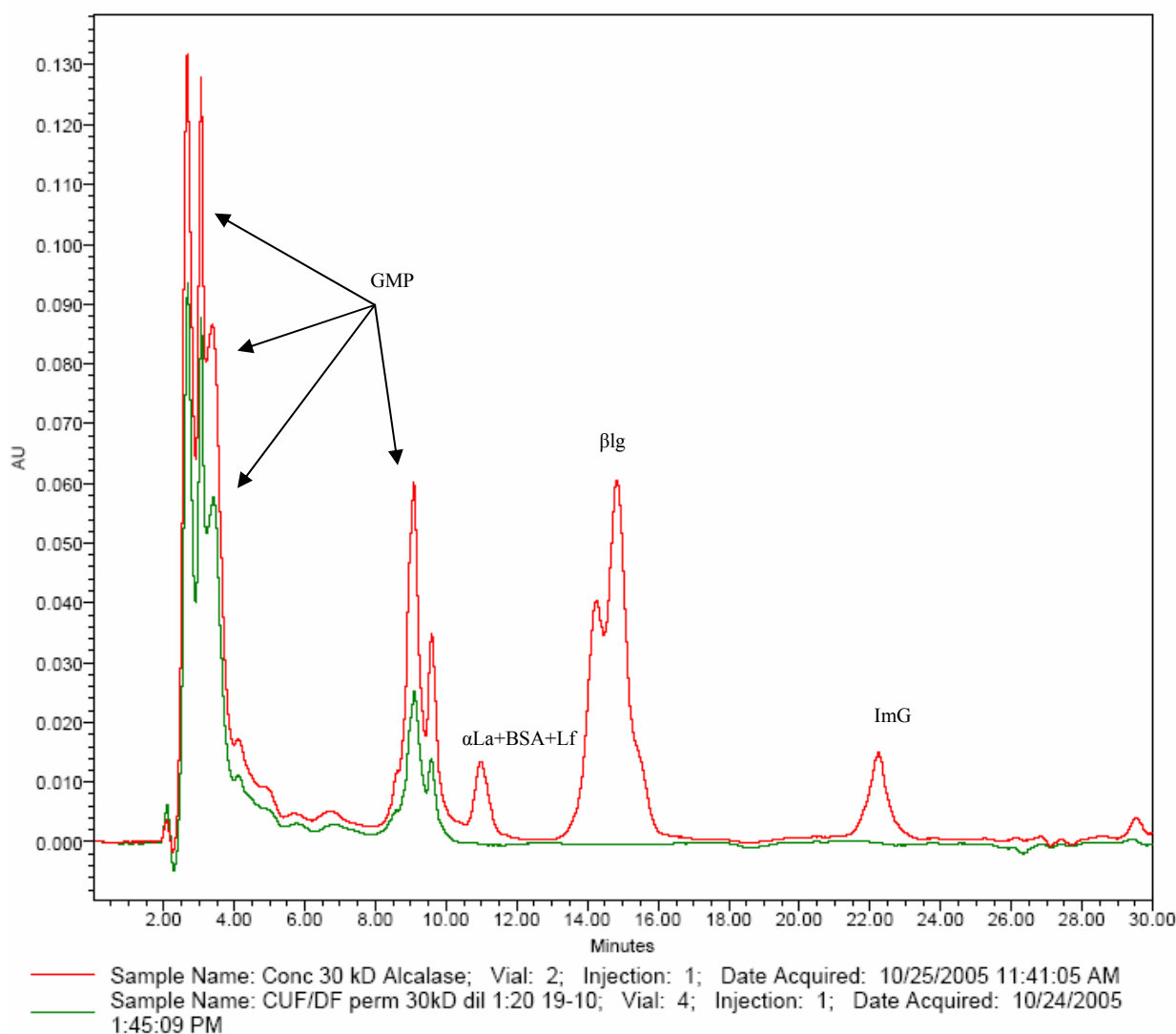


Figura 4.7
Peptidi bioattivi (traccia verde) rispetto alle sieroproteine parzialmente idrolizzate (traccia rossa)

Sul fronte della caratterizzazione chimica e biofunzionale dei peptidi bioattivi prodotti, sia dalle caseine che dalle sieroproteine, sono in corso studi specialistici per analizzare in dettaglio l'esatta natura chimica dei singoli frammenti proteici ottenuti.

A tal fine è in atto una collaborazione scientifica con l'Università di Cosenza, specializzata appunto nell'analisi di spettrometria di massa su questa matrice (prof. G. Sindona).

Nei grafici di figura 4.8 e 4.9 sono riportati gli spettri di massa MALDI delle analisi condotte rispettivamente sul concentrato di UF 10 kDa a seguito dell'idrolisi delle SP con Alcalase, e sul secondo permeato di UF 30 kDa. Sono riportate in ascissa la massa del frammento peptidico vs carica elettrica, dal valore del quale si può risalire al peso molecolare del peptide, in ordinata, l'intensità dell'assorbimento rispetto al picco più alto, cui viene assegnato il valore 100%. Tutti gli altri picchi sono normalizzati rispetto a questo valore in percentuale.

I valori in ordinata vanno correlati alla abbondanza relativa tra i composti in esame.

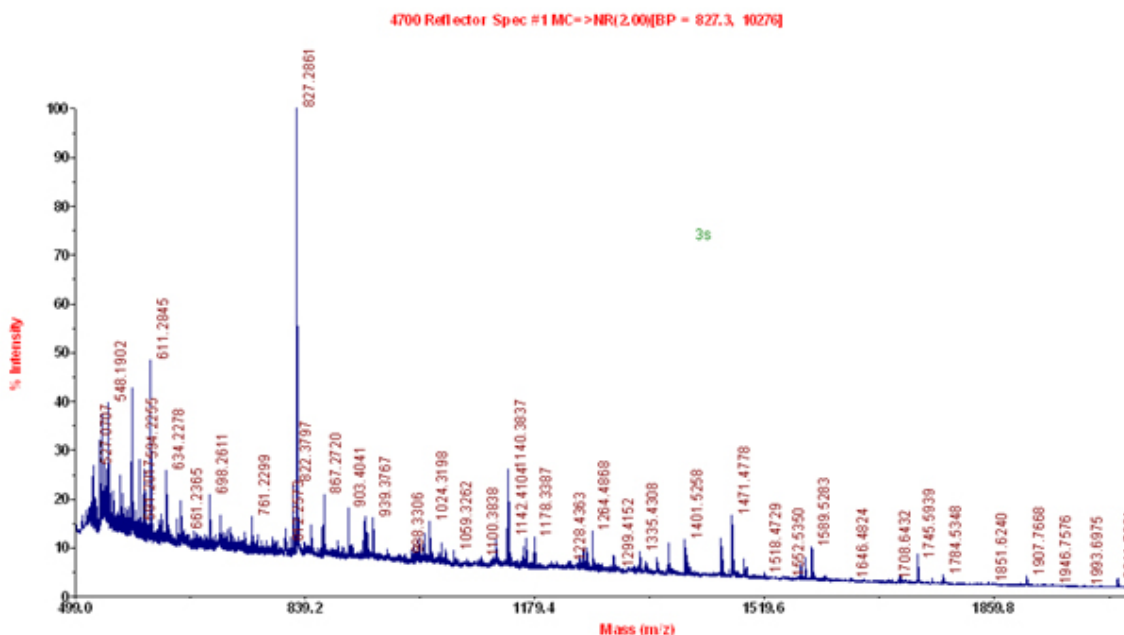


Figura 4.8
Spettro Massa Maldi del concentrato di ultrafiltrazione del siero,
dopo idrolisi enzimatica

I frammenti che si osservano spaziano in un intervallo di pesi molecolari che va da 527 a 2.131 Da. Questi valori non corrispondono direttamente ai PM dei peptidi veri e propri, ma ai frammenti che si generano sotto l'azione ionizzante del campo elettromagnetico.

Sulla base del confronto tra i frammenti rilevati nello spettro, e quelli disponibili in banca dati, è possibile risalire al peso molecolare nonché alla sequenza aminoacidica dei peptidi incogniti.

Nello spettro di figura 4.9 si evidenzia come i frammenti si ripartiscano fra 748 e 2.574 Da, sostanzialmente senza nessuna differenza con lo spettro precedente.

Per risalire alla struttura chimica reale dei peptidi generati nel nostro processo, sono in corso sperimentazioni basate sull'impiego di tripsina, questo enzima infatti attacca il substrato proteico in corrispondenza di siti specifici. Questa prerogativa consente pertanto di conoscere in anticipo i frammenti ottenuti per idrolisi, creando in tal modo un riferimento standard di pesi molecolari per caratterizzare più accuratamente i peptidi ottenuti a seguito dell'idrolisi con il nostro enzima.

Si tratta di un lavoro complesso che dovrebbe suggerire anche l'impiego dell'enzima specifico al fine di ottenere peptidi con le caratteristiche biomediche desiderate.

È doveroso segnalare inoltre che il frazionamento delle famiglie peptidiche fra loro, ad esempio per ottenere composti con proprietà biomediche omogenee (es. anti-ACE, oppioidi ecc.), richiede ancora un ulteriore sforzo di approfondimento.

Il problema pratico consiste nel separare le varie famiglie di PB fra loro, operazione di difficile realizzazione, tenendo conto che non è agevole discriminare pesi molecolari così simili (circa 6 kDa).

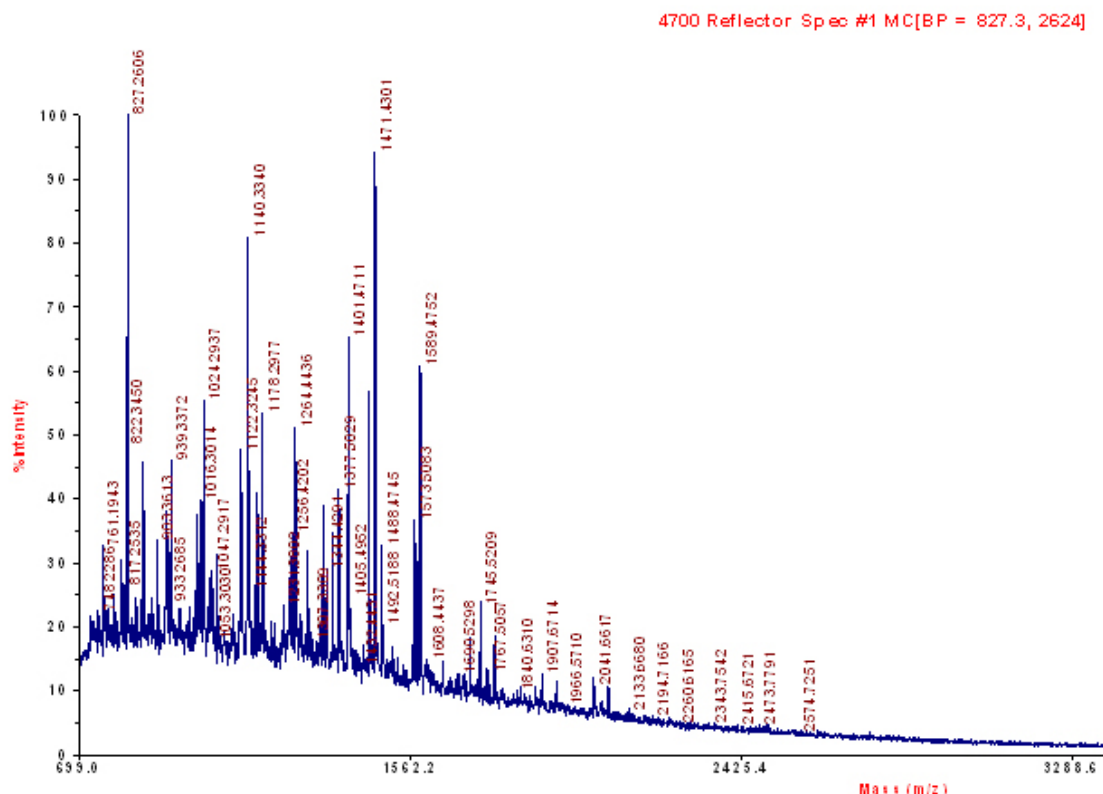


Figura 4.9
Spettro Massa Maldi del permeato della seconda ultrafiltrazione
del siero con 30 kDa

Le proprietà biomediche delle famiglie di PB, inoltre, non sono univocamente correlate alla struttura chimica del peptide in termini di peso molecolare ma cruciali in tal senso, sembrano essere i residui terminali e le catene laterali delle singole molecole.

In generale, le determinazioni analitiche dei PB si effettuano con tecniche cromatografiche di HPLC a fase inversa, con colonne C 18 (Nova-Pak ,9 mm i.d. x 150 mm, Waters, Milfora, MA).

L'eluente è costituito da acetonitrile e acqua e TFA con gradiente normale (60:40:0,1). Gauthier and Pouliot 2003).

Un'altra metodica analitica si basa sulla spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray (ESI-MS), che permette la determinazione delle singole molecole bioattive (Van Elsrijk).

4.4 Bibliografia

A.Pihlanto-Leppälä (2001). "Bioactive peptides derived from bovine whey proteins opioid and ace-inhibitory peptides." Trends in Food & Science Technology(11): 347-356.

Alais, C. (1995). Scienza del latte.

Brandsch, M., P. Brust, K. Neubert, and A. Ermisch (1994). β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments. VCH-Weinheim, Germany, V. Brantl and H. Teschemacher.

Brantl, V., H. Teschemacher, A. Hemschem, and F. Lottspeich (1979). "Novel opioid peptides derived from casein (β -casomorphins)." Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. **360**: 1211-1216.

Brody (2000). "Biological activities of bovine glycomacropeptide." British Journal of Nutrition **84** (Supp. I): S39-S46.

Chang, K. J., A. Killian, E. Hazum, and P. Cuatrecasas (1981). "Morphiceptin (NH₄-Tyr-Pro-Phe-Pro-CONH₂): A potent and specific agonist for the morphine (μ) receptors." Science **212**: 75-77.

Chiba, H., F. Tani, and M. Yoshikawa (1989). "Opioid antagonist peptides derived from κ -casein." J. Dairy Res. **56**: 363-366.

Clare H., E. S. (1999). "Bioactive peptides: a prospectus." J.Dairy Sci **83**: 1187-1195

Clemente, A. (2000). "Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition." Trends in Food & Science Technology **11**: 254-262.

Courthaudon, D., Girardet, J. M., Chapal, C., Lorient, D. and Linden, G. (1985). Surface activity and competitive adsorption of milk component 3 and porcine pancreatic lipase at the dodecane water interface. In Foods Macromolecules and Colloids. Cambridge, E. Dicknison and D. Lorient. Royal Society of Chemistry.

D.G. Schmidt, B. W. V. M. (1993). "Enzymatic hydrolysis of whey proteins." Neth.Milk Dairy J. **47**(15).

E. Lahove, D. E., E. Sofer (1971). "Properties of basic glycomacropeptides from cow milk protein by heat." Milchwissenschaft (26): 489-495.

Eisenstein (2002). "High-protein weight-loss diets. Are they safe and do they work? A review of experimental and epidemiologic data." Nutrition Reviews **60**(7): 189-200.

Elitsur, Y., and G. D. Luk. (1991). "Beta-casomorphin (BCM) and human colonic lamina propria lymphocyte proliferation." Clin.Exp. Immunol. **123**: 1068-1070.

Fiat, A. M., and P. Jolles (1989). "Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: structural and physiological aspects." Mol. Cell. Biochem. **87**: 5-30.

Fiat, A. M., D.Migliore-Samour, P. Jolles, L. Drouet, C. B. Sollier, and J. Caen (1993). "Biologically active peptides from milk with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities." J. Dairy Sci. **76**: 301-310.

Fiat, A. M., S. Levy-Toledano, J. P. Caen, and P. Jolles (1989). "Biologically active peptides of casein and lactotransferrin implicated in platelet function
" J. Dairy Res. **56**: 351-355.

FitzGerald, R. J., Meisel, H. (2000). "Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme." British J. Nutr. **84**: S33-37.

G. Iqbal, R. L.-F., X. Jorba, E.N. Vulfson (1996). "Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production." Enzyme and Microbial Technology **18**: 162-183.

Gauthier, Y., Paquin and S., Turgeon (1993). "Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins." J. Dairy Sci. **76**: 321-328.

Girardet, J. M. a. L., G. (1996). "PP3 component of bovine milk: a phosphorylated whey glycoprotein." Journal of Dairy Research **63**: 333-350.

H.Kayser, H. M. (1996). "Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins." FEBS Lett. **383**: 18-20.

Henschen, A., F. Lottspeich, V. Brantl, and H. Teschemacher (1979). "Novel opioid peptides derived from casein, β -casomorphins. II. Structure of active components from bovine casein peptone." Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. **360**: 1217-1224.

Holtt, V. (1983). "Multiple endogenous opioid peptides." Trends Neurosci. **6**: 24-26.

Jolles, P., F. Parker, F. Floch, D. Migliore, P. Alliel, A. Zerial, and G. H. Werner (1981). "Immunostimulating substances from human casein." J. Immunopharmacol. **3**: 363-369.

Jolles, P., S. Levy-Toledano, A. M. Fiat, C. Soria, D. Gillesen, Thomaidis, F. W. Dunn, and J. Caen (1986). "Analogy between fibrinogen and casein: effect of an undecapeptide isolated from κ -casein on platelet function." Eur. J. Biochem. **158**: 379-384.

K.Marshall "Therapeutic Applications of Whey Proteins." Alt. Med. Rev. **9**(2): 136-156.

Kayser and H., M. (1996). "Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins." FEBS Lett. **77**(383): 18-20.

Kitts, D. D., Y. V. Yuan, T. Nagasawa, and Y. Moriyama (1992). "Effect of casein, casein phosphopeptides, and calcium intake on ileal ⁴⁵Ca disappearance and temporal systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats." Br. J. Nutr. **68**: 765-781.

Koch, G., K. Wiedemann, and H. Teschemacher (1985). "Opioidactivities of human beta-casomorphins." Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. **331**: 351-354.

Lardy H., M. K. (1960). The Enzymes.

Maruyama, S., H. Mitachi, J. Awaya, M. Kurono, N. Tonizuka, and H. Suzuki (1987). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory.

Meisel, H. (1986). "Chemical characterization and opioid activity an exorphin isolated from in vivo digests of casein." FEBS Lett. **196**: 223-227

Meisel, H. (1993). Casokinins as bioactive peptides in the primary structure of casein in Food Proteins: StructureFunctionality. NY, Schwenke and R. Mothes.

Meisel, H. (1997). "Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications." Livestock Production Science **50**: 125-138.

Mierke, D. F., G. Nobner, P. W. Shiller, and M. Goodman (1990). "Morphiceptin analogs containing 2-aminocyclopentane carboxylicacid as a peptidomimetic for proline." Int. J. Peptide Res. **35**: 34-45

Migliore-Samour, D., F. Floch, and P. Jolles (1989). "Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation." J. Dairy Res. **56**: 357-362.

Miyauchi, H., S.Hashimoto, M. Nakajima, I. Shinoda,Y. Fukuwatari, and H. Hayasawa (1998). "Bovine lactoferrin stimulates the phagocytic activity of human neutrophils: identification of its active ".

Nakamura, Y., N. Yamamoto, K. Sakai, A. Okubo, S. Yamazaki, T. Takano. (1995). "Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk." J. Dairy Sci.(78): 777-783.

Nakamura, Y., N. Yamamoto, K. Sakai, T. Takano (1995). "Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated are inhibitors to angiotensin-converting enzyme." J. Dairy Sci.(78): 1253-1257.

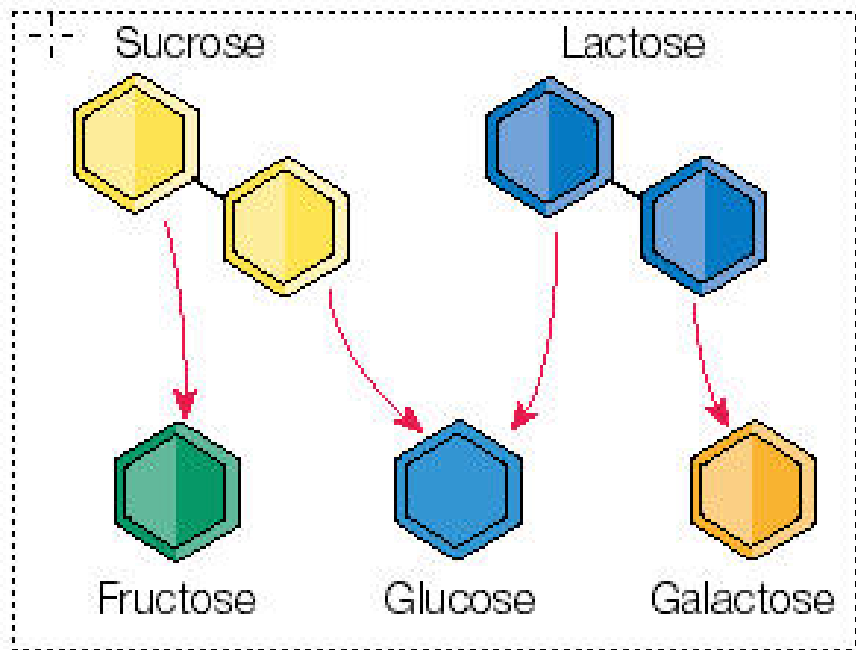
Panskeep, J., L. Normansell, S. Sivi, J. Rossi, and A. J. Zolovick (1984). "Casomorphins reduce separation distress in chicks." Peptides **4**: 829-831.

Paroli, E. (1988). "Opioid peptides from food (the exorphins)." World Rev. Nutr. Diet **55**: 58-97.

- S.F. Gauthier, Y. P. (2003). "Functional and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins." J. Dairy Sci.: 78-87.
- Sato, R., T. Naguchi, and H. Naito (1986). "Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestines." J. Nutr. Sci. Vitaminol. **32**: 67-76.
- Schulte-Frohlinde, E., R. Schimd, V. Brantl, and V. Schusdzarra (1994). β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments.
- Shimizu, M., Yamauchi, K. and Saito, M. (1989). "Emulsifying properties of the proteose-peptone fraction obtainedbovine milk." Milchwissenschaft **44**: 497-500.
- Svedberg, J., J. de Haas, G. Leimenstoll, F. Paul, and H. Teschemacher (1985). "Demonstration of β -casomorphins immunoreactive materials in "in vitro" digests of bovine milk and in the small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans."
- Tani, F., K. Iio, H. Chiba, and M. Yoshikawa (1990). "Isolation and characterization of opioid antagonist peptides derived from human lactoferrin." Agric. Biol. Chem. **54**: 1803-1810.
- Teschemacher, H., G. Koch, and V. Brantl (1994). β -Casomorphins andRelated Peptides: RecentDevelopments. VCH-Weinheim, Germany, V. Brantl and H. Teschemacher.
- Tome, D., A. Ben Mansour, M. Hautefeville, and J. F. Desjeux (1987). "Opiate activity and transepithelial passage of intact β -casomorphins in rabbit ileum
" Am. J. Physiol. **253**: 737-744.
- V.Bottazzi (2004). Latte-fermentati funzionali prebiotici. Milano, Ed. Elite Communication Srl.
- Yamamoto (1997). "Antihypertensive peptides derived from food proteins." Biopolymers **34**: 129-134.
- Yoshikawa, M., F. Tani, T. Yoshimura, and H. Chiba (1986). "Opioid peptides from milk proteins." Agric. Biol. Chem. **50**: 2419-2421.
- Yuan, Y. V., and D. D. Kitts (1991). "Conformation of calcium absorptionand femoral utilization in spontaneously hypertensive rats fed casein phosphopeptide supplemented diets." Nutr. Res. **11**: 1257-1272.
- Yuan, Y. V., and D. D. Kitts (1994). "Calcium absorption and bone utilization in spontaneously hypertensive rats fed on native and heat denatured casein and soya bean protein." Br. J. Nutr. **71**: 583-603.

CAPITOLO 5

LATTOSIO E GALATTOSO-OLIGO SACCARIDI



Schema dell'idrolisi di saccarosio e lattosio a monosaccaridi (fruttosio, glucosio e galattosio)

Indice dei paragrafi

5.1 Cristallizzazione del lattosio	106
5.2 Idrolisi enzimatica del lattosio	107
5.3 Cinetica di formazione dei galattoso-oligo-saccaridi	112
5.4 Bibliografia	115

L'utilizzo del siero del latte per recuperare sostanze ad alto valore aggiunto si basa sulle sieroproteine più o meno raffinate e sui peptidi bioattivi, come si è visto nel Capitolo 4, ma soprattutto sulla possibilità di trasformare il lattosio in galattoso-oligo-saccaridi (GOS) che svolgono importanti funzioni prebiotiche.

Il “soprattutto” è giustificato dal fatto che gli oligosaccaridi si possono ottenere in quantità rilevanti dal siero. Infatti il lattosio che dà origine ai GOS, è il soluto più importante del siero, poiché in media fra i mammiferi ruminanti, la sua concentrazione rimane compresa fra 40 e 47 g/L.

Il lattosio è un disaccaride importato per i suoi usi farmaceutici, basti pensare che costituisce il filler della maggior parte di pastigliati farmaceutici.

Il lattosio (4-o-β-D galattopiranosil-D-glucosio) è il carboidrato naturale presente nel latte e siero, in cui è presente sotto due forme cristalline. L'α-lattosio idrato con una molecola d'acqua, che si ottiene per cristallizzazione da una soluzione sovrasatura ad una temperatura inferiore a 95 °C. L'α-lattosio contiene un 5% di acqua di cristallizzazione.

La seconda forma di cristallizzazione del lattosio è il β-lattosio che si ottiene per cristallizzazione ad una temperatura superiore a 93,5 °C.

Le due forme di cristallizzazione sono in equilibrio chimico in funzione della temperatura, come mostra la tabella 5.1.

Temperatura (°C)	0	20	50	93,5	100
% latt. soluz. sat.	11	16	30	57	60
α-lattosio	4	6	11	21	22
β-lattosio	7	10	19	36	38

Tabella 5.1
Solubilità e forma cristallina del lattosio

Le proprietà chimico-fisiche del lattosio sono correlate direttamente alle sue applicazioni nel settore alimentare e farmaceutico.

Le principali proprietà funzionali del lattosio sono di seguito riportate:

- riduzione della dolcezza di alimenti, in particolare confetture, salse ecc.;
- aumento della consistenza (compattezza) di preparati alimentari;
- elevate proprietà di solubilità in preparati alimentari (gelati, snack, prodotti da forno);
- elevato adsorbimento di sostanze aromatiche o responsabili di aromi e sapori;
- previene l'effetto d'imbrunimento su farine alimentari, per cotture a microonde;
- effetto nutrizionale e calorico;
- fermentazione specifica;
- substrato farmaceutico per preparazione di pastiglie o specialità farmaceutiche;
- proprietà emulsionanti per prodotti da forno;
- stabilizzante delle strutture di proteine, in particolare della caseina del latte;

Queste proprietà dimostrano l'ampio spettro applicativo del lattosio, un prodotto di notevole interesse commerciale.

5.1 Cristallizzazione del lattosio

Il lattosio cristallino si può ottenere dal siero di latte, utilizzando le tecnologie di membrana come verrà illustrato nei Capitoli 6 e 7.

La fase di produzione del lattosio cristallino inizia dalla raccolta del permeato di ultrafiltrazione (UF), che viene successivamente inviato al processo di nanofiltrazione (NF).

Nello schema di figura 5.1 vengono illustrate le operazioni unitarie di processo che portano alla formazione del lattosio cristallino, a due livelli di purezza.

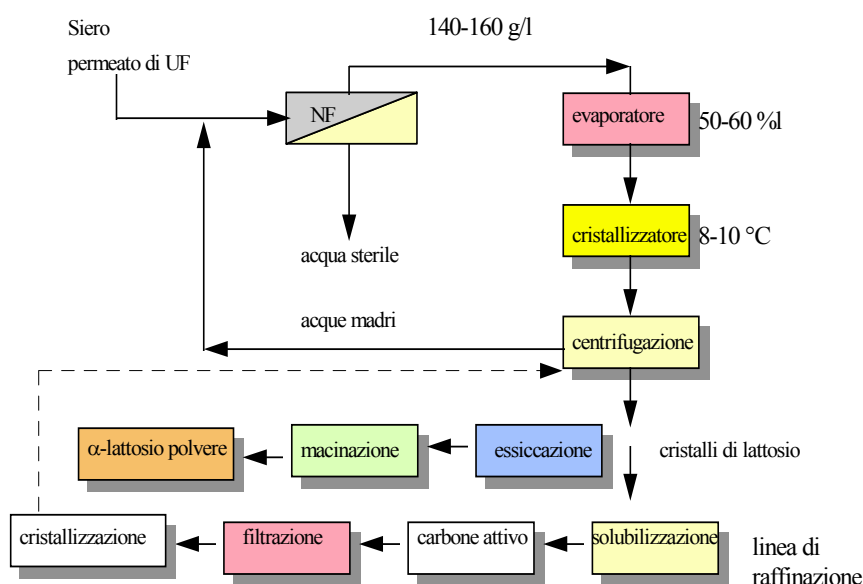


Figura 5.1
Schema complessivo del processo di produzione del lattosio cristallino

Lo schema indica che il processo di produzione del lattosio dal siero parte dal permeato di UF che viene concentrato nello stadio di nanofiltrazione.

In questo processo il lattosio può essere concentrato fino a circa 200 g/L, ma per procedere alla cristallizzazione deve raggiungere i 400-500 g/L. Per questa ragione il retentato di NF deve essere ulteriormente concentrato per evaporazione sotto vuoto.

La temperatura di evaporazione deve essere mantenuta al di sotto dei 90 °C per evitare la formazione dell'anomero beta (forma anidra), che precipita a partire da soluzioni concentrate a temperature superiori. Quando si raggiunge il 60% di materia secca nel concentrato, il prodotto ha una consistenza di sciroppo denso di colore giallo intenso per la presenza della riboflavina.

La purezza del lattosio dipende fortemente dagli stadi di trattamento precedenti, in particolare dal processo di UF.

Il concentrato di lattosio dell'evaporatore passa nel cristallizzatore, dove il graduale raffreddamento sotto lenta agitazione conduce alla formazione dei cristalli. Questo stadio è molto delicato perché si devono ottenere dei cristalli grandi (minor superficie sviluppata) che precipitino rapidamente senza assorbire impurità.

Dopo questa fase si separano per centrifugazione le acque madri, che vengono rinviate nell'unità di NF, come riportato in figura 5.1.

I cristalli di lattosio ottenuti dalla centrifuga possono seguire due strade: verso l'essiccatore, per ottenere una polvere di lattosio grezzo, o verso la linea di raffinazione per ottenere un prodotto purificato. In questa seconda linea i cristalli di lattosio si ridisciolgono in acqua calda, fino ad un 50-60% di concentrazione, e la soluzione ottenuta passa in uno scambiatore di calore fino a circa 105 °C, con aggiunta di carbone attivo o terre filtranti.

Questi chiarificanti vengono filtrati ad alta temperatura per evitare cristallizzazioni premature e si procede alla nuova cristallizzazione di questa soluzione purificata di lattosio, ripercorrendo il processo descritto precedentemente.

I cristalli di lattosio, siano essi *food grade* o *farmaceutical grade*, presentano un valore commerciale direttamente proporzionato alla loro purezza.

Dalla prima cristallizzazione si ottiene un lattosio al 97% con le caratteristiche di "food grade" destinato soprattutto all'industria dei gelati.

Dalla seconda cristallizzazione si ottiene un lattosio con una purezza del 99,9%, utilizzabile dall'industria farmaceutica. Il valore commerciale di questo prodotto si aggira sui 10 €/kg.

Tuttavia il processo di produzione del lattosio per cristallizzazione è ormai consolidato a livello industriale, mentre risulta molto più attraente trasformare il lattosio per produrre idrolizzati e soprattutto GOS.

5.2 Idrolisi enzimatica del lattosio

La scissione del lattosio consente di aumentare il valore aggiunto dei prodotti idrolizzati.

Questo processo si basa sull'idrolisi enzimatica del lattosio con un enzima specifico (β -galattosidasi) che trasforma il disaccaride in glucosio e galattosio. Questi ultimi sono due monosaccaridi facilmente digeribili, ipocalorici, molto solubili in acqua e con notevoli proprietà edulcoranti.

Come è noto, il lattosio è responsabile di una diffusa intolleranza alimentare, particolarmente diffusa nei paesi mediterranei, causata dalla perdita, da parte delle popolazioni, dell'attività β -glucosidica con lo sviluppo, quindi con l'età.

Questa intolleranza alimentare si scatena per l'inattivazione dell'enzima β -galattosidasi, che catalizza l'idrolisi del lattosio come indicato nella figura 5.2.

L'idrolisi è importante anche dal punto di vista industriale, perché i due monosaccaridi formati, hanno un potere edulcorante più elevato di quello del lattosio, come si vede dal grafico di figura 5.3.

La reazione di idrolisi deve avvenire ad una temperatura compresa fra 40 e 45 °C alla quale l'enzima rimane stabile per oltre 8 ore. In queste condizioni ad un pH di 6,5 (optimum per l'enzima in oggetto), si ottiene una resa idrolitica compresa fra il 60-90% in un tempo di reazione di circa 2-3 ore.

Il dosaggio ottimale dell'enzima, per avere il massimo di resa idrolitica, viene valutato intorno alle 3-5000 LAU/litro di siero. LAU (Unità Attività Lattasica) è definita come la quantità di enzima che produce una micromole di glucosio al minuto. A livello sperimentale l'idrolisi si realizza in batch, partendo dal concentrato di NF, per aggiunta dell'enzima Lactozym della Novo Nordisk, estratto da *Kluyveromyces fragilis*.

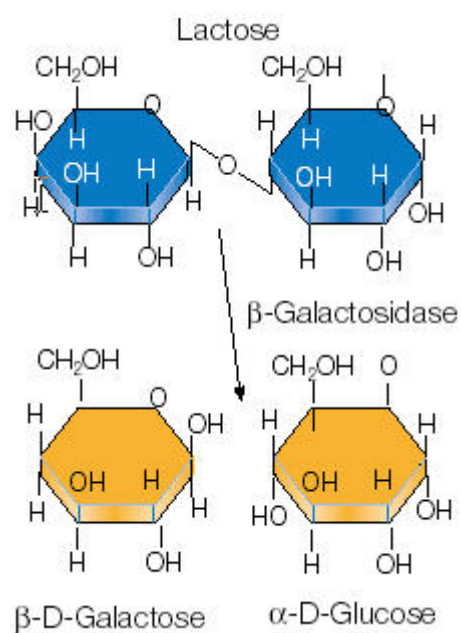


Figura 5.2
Meccanismo dell'idrolisi del lattosio

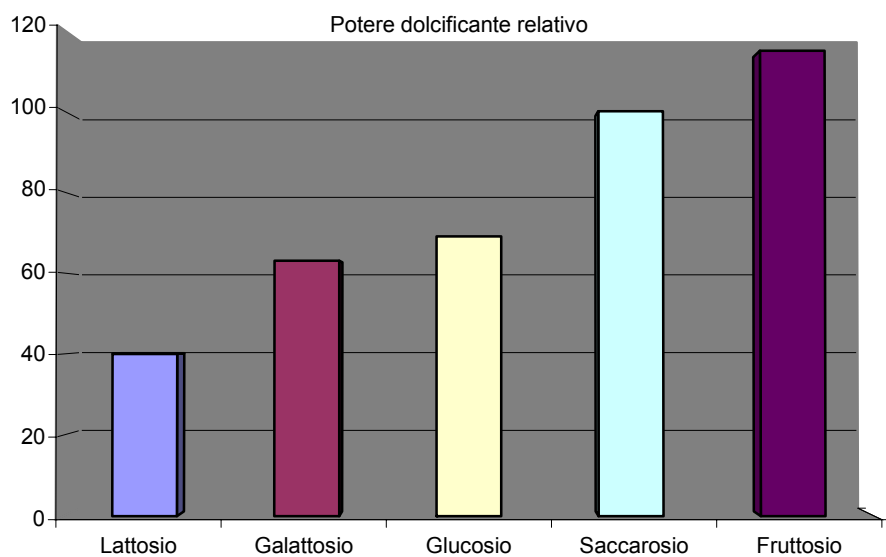


Figura 5.3
Potere edulcorante di alcuni zuccheri

Il Lactozym ha un'attività specifica di 3000 LAU/ml. Prove sperimentali sul concentrato di NF hanno consentito di dimostrare l'efficacia dell'enzima che ha fornito una resa idrolitica superiore al 90%.

La β -galattosidasi, secondo la nomenclatura IUPAC viene classificata come “ β -D-galattoside-galattoidrolasi”, appartenente cioè alla famiglia delle idrolasi. In particolare, tale enzima scinde il legame 1,4 beta-glicosidico tra gli isomeri D del galattosio e del glucosio. Il meccanismo di reazione è mostrato in figura 5.4.

Il primo passaggio della reazione riguarda la formazione del complesso enzima-galattosio e la simultanea liberazione del glucosio. Nel secondo passaggio il complesso enzima-galattosio è trasferito ad un accettore contenente un gruppo idrossilico.

Nel sito attivo della β -galattosidasi sono presenti un gruppo imidazolico ed un solfidrile. L'imidazolo agisce da centro nucleofilo e trasferisce il galattosio dal β -galattoside ad un accettore che contiene un gruppo idrossilico (J.P. Presnosil 1987; Zadow 1992; Zhou Q.Z.K. 2001).

Quando l'accettore è l'acqua si forma il galattosio, quando l'accettore è un altro zucchero presente in soluzione (lattosio, glucosio, galattosio) si formano oligosaccaridi. La percentuale di oligosaccaridi dipende dalla concentrazione iniziale di lattosio, dal grado di idrolisi e dal tipo di β -galattosidasi.

Il prodotto commerciale Maxilact LX 5000 della società Gist-Brocades. è altamente purificato, ottenuto dal ceppo batterico *Kluiveromyces lactis*. Si tratta di un prodotto “food grade” selezionato proprio per l'idrolisi del lattosio derivato dal siero di caseificazione. Il $V_{\max}$ misurato sul lattosio è di 77,6 μ mol prodotti al minuto per mg di lattosio. Il K_m è 12-37 mM.

Le condizioni ottimali per l'idrolisi del lattosio sono indicate dal produttore, ma sono state verificate sperimentalmente. Dal grafico di figura 5.5 si evidenzia un picco di massima attività intorno a 37-40 °C.

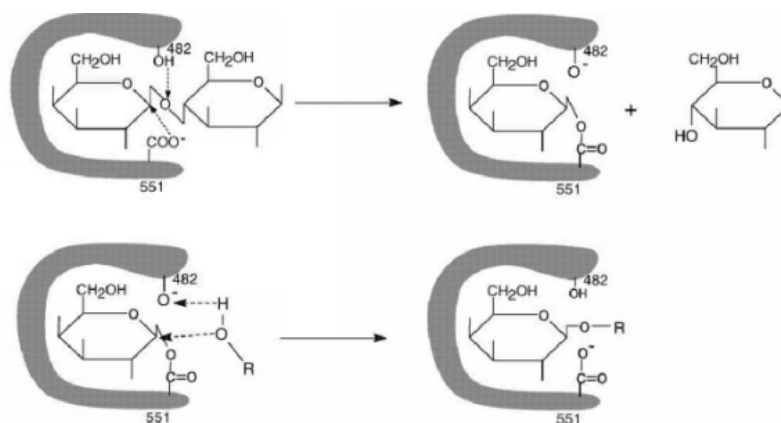


Figura 5.4
Meccanismo di reazione della β -galattosidasi

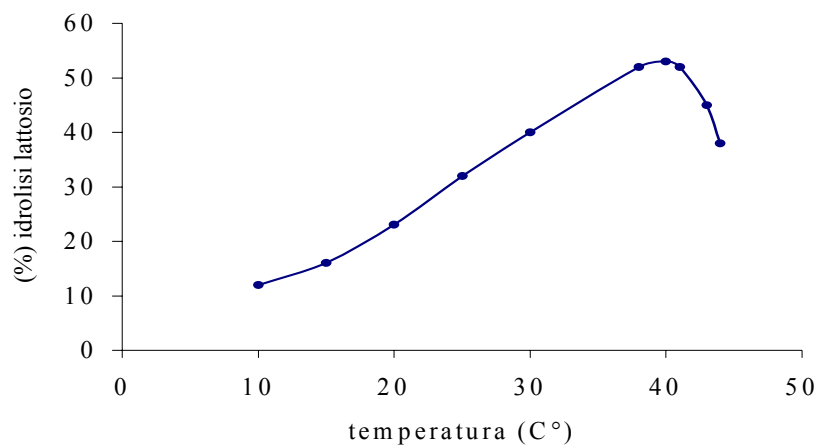


Figura 5.5
Effetto della temperatura sulla resa idrolitica
del Maxilact LX 5000

Oltre i 40 °C l'attività dell'enzima diminuisce per effetto della disattivazione termica. È interessante notare che anche a temperature più basse di quella ottimale, l'enzima mostra una buona attività enzimatica che si mantiene intorno al 30-40% della sua resa percentuale. Questa proprietà è importante ai fini dell'impiego pratico del prodotto. L'effetto del pH sulla resa idrolitica è riportato nel grafico di figura 5.6.

Nell'intervallo di pH fra 6,5 e 7,5 l'attività dell'enzima è massima.

La β -galattosidasi ha come siti attivi due gruppi carbossilici, uno protonato ed uno ionizzato. Questi gruppi carbossilici laterali sono debolmente acidi, ma possono esistere come COO^- (come nucleofilo), e come OH^- (come donatore di protoni) nello stesso tempo a pH neutro.

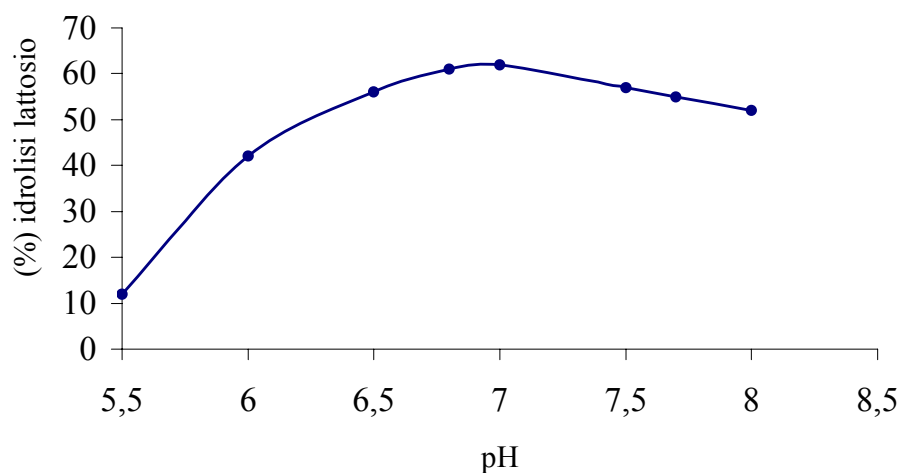


Figura 5.6
Effetto del pH sulla resa idrolitica del Maxilat LX 5000

La bassa attività dell'enzima a pH inferiori a 5,5 crea notevoli difficoltà e limiti al suo impiego perché spesso il siero di caseificazione, se lasciato in condizioni non controllate, tende ad acidificarsi per l'innesco delle fermentazioni lattiche. In questi casi, prima di eseguire l'idrolisi è necessario far salire il pH con aggiunta di soda.

A livello sperimentale è stata seguita la cinetica idrolitica del lattosio, i cui risultati sono riassunti in tabella 5.2, in cui sono riportate le concentrazioni, in g/L, di galattosio, glucosio, lattosio e la somma delle concentrazioni dei tre zuccheri al procedere dell'idrolisi.

In figura 5.7 è riportato l'andamento della cinetica enzimatica dell'idrolisi del lattosio.

Tempo (min)	Galattosio (g/L)	Glucosio (g/L)	Lattosio (g/L)	Totale (g/L)
0	0	0	47,54	47,54
15	9,5	8,36	29,26	47,12
30	12,47	10,71	23,57	46,75
45	14,09	11,83	20,96	46,88
60	14,46	12,55	19,78	46,79
120	16,65	13,97	16,48	46,79
180	17,06	14,54	14,55	46,12
240	17,51	14,72	13,99	46,22
300	18,31	15,72	12,13	46,16
360	18,45	15,72	11,49	45,66

Tabella 5.2
Concentrazione di galattosio, glucosio e lattosio
al procedere dell'idrolisi

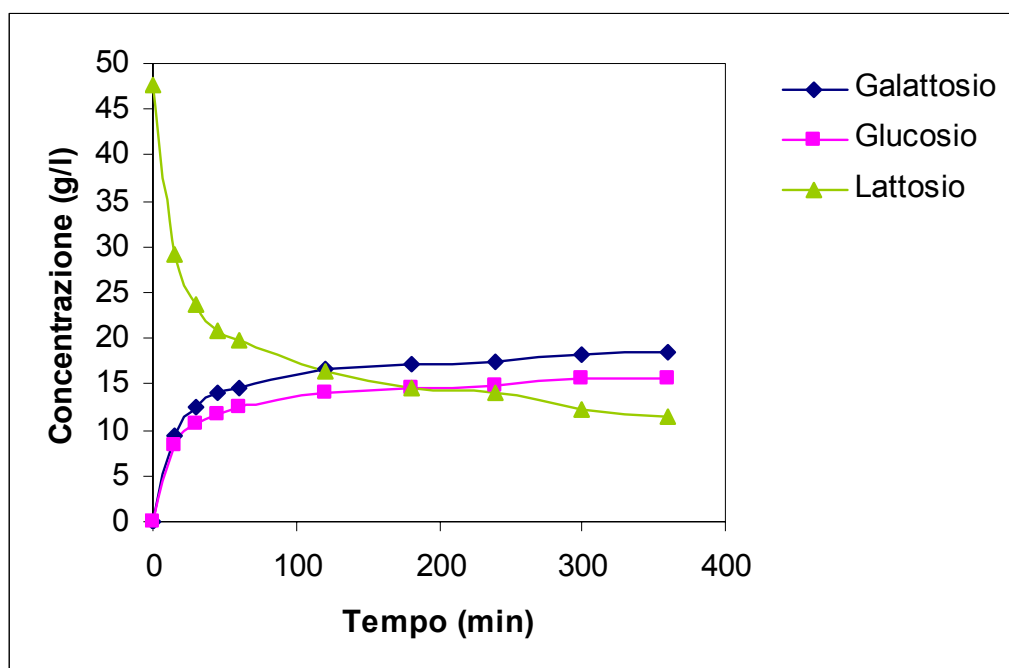


Figura 5.7
Cinetica dell'idrolisi enzimatica del lattosio

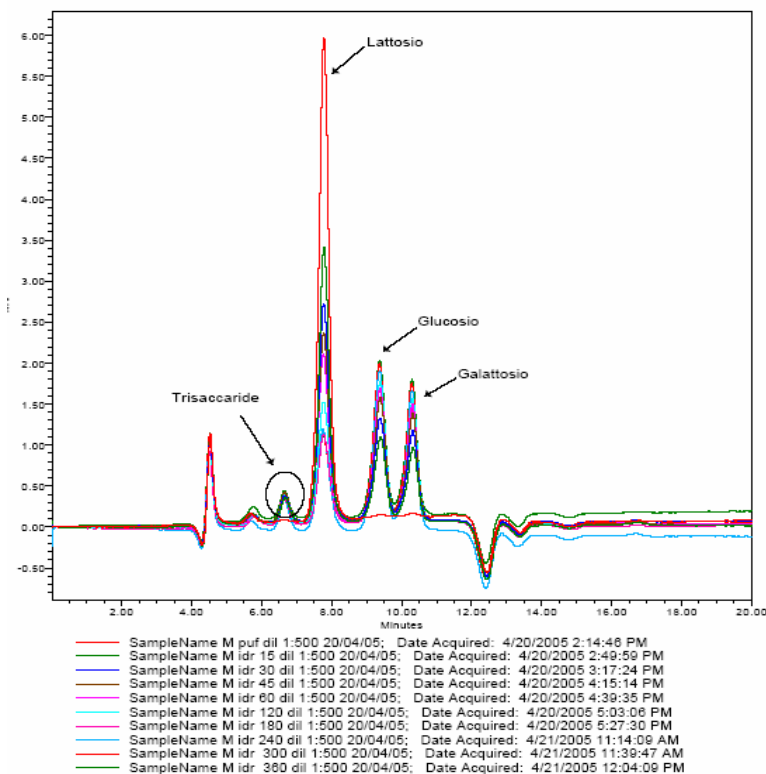


Figura 5.8
Cromatogrammi idrolizzati lattosio in HPLC con rivelatore
ad indice di rifrazione

La cinetica è stata studiata tramite analisi chimica HPLC utilizzando una colonna, la CarboPacTM PA10 (4 x 250 mm) della DIONEX. I picchi caratteristici sono riportati in figura 5.8, che evidenzia anche la presenza di GOS.

La cinetica idrolitica della β -galattosidasi è stata studiata da Fabiani e Pizzichini (C. Fabiani 1987), in condizioni di enzima immobilizzato su reattore a membrana. In tali condizioni si minimizza l'effetto inibitorio sulla cinetica da parte del galattosio, poiché l'idrolizzato si sottrae all'equilibrio chimico perché permea attraverso la membrana a fibre cave.

5.3 Cinetica di formazione dei galattoso-oligo-saccaridi

L'aspetto più nuovo e più importante dell'idrolisi del lattosio riguarda la formazione di aggregati glucidici, cioè i GOS, per le loro proprietà biomediche legate alla salute e al benessere dell'uomo.

I monosaccaridi idrolizzati (glucosio e galattosio), in presenza dell'enzima β -galattosidasi, si possono riaggregare fra loro, per dare origine a composti denominati galattosio-oligosaccaridi, formati da due a sei unità (Toba et al. 1984).

Dal punto di vista biomedico i GOS favoriscono la proliferazione dei bifidobatteri nell'intestino, con effetti positivi nell'assorbimento dei nutrienti e nell'azione antagonista verso batteri patogeni come *Escherichia coli* e la *Salmonella typhi* e lo *Staphylococcus aureus* (Gibson and X. 1994).

È stato riportato che i bifidobatteri posseggono attività anti-cancro (Yaeshima 1996).

I GOS sono indigeribili fino al tratto intestinale, quindi svolgono una funzione di spazzino del tratto intestinale allo stesso modo delle fibre cellulosiche, quindi riducono il colesterolo la pressione ed il contenuto di zuccheri nel sangue (Tomomatsu 1994).

La formazione dei GOS a partire dal lattosio è influenzata da una serie di fattori:

- il tipo di enzima impiegato
- il tempo di reazione che deve essere inferiore alle 2 ore
- la temperatura che deve rimanere intorno ai 37 °C
- il pH che deve rimanere nel campo della neutralità, vicino 7,0
- la concentrazione del lattosio che deve essere la più alta possibile (> di 150 g/L)
- la concentrazione salina che agisce da inibitore enzimatico.

Le prove sperimentali per determinare la cinetica di formazione dei GOS sono state eseguite impiegando sempre siero di latte ovino e vaccino.

Quindi, il substrato della reazione enzimatica è sempre stato costituito dal siero reale, in particolare dal siero concentrato direttamente con processo di crioseparazione, ma soprattutto utilizzando l'effluente che deriva dal trattamento del siero con tecnologie di membrana, cioè il concentrato di NF. Questa considerazione è molto importante perché anche nel retentato di NF, come vedremo nel Capitolo 6, sono presenti sali minerali, riboflavina, peptidi ecc. che non favoriscono la reazione di polimerizzazione dei monosaccaridi.

Infatti, in letteratura sono riportate esperienze di studio della cinetica idrofila partendo, nella maggior parte dei casi, da α -lattosio particolarmente purificato, che viene semplicemente sciolto in acqua per poi studiare la reazione idrolitica e la cinetica di formazione.

Sperimentalmente è stata studiata la cinetica di formazione dei GOS, operando in batch agitato contenente 2 l di substrato.

Nella figura 5.9 si riporta la cinetica di formazione del GOS in funzione del tempo di reazione, ed in presenza di un catalizzatore enzimatico minerale (linea blu). La linea rossa del grafico indica la cinetica di formazione dei GOS senza catalizzatore.

Il substrato utilizzato è il retentato di NF, con una concentrazione iniziale di lattosio di 170 g/L. La reazione è stata condotta in batch agitato, la temperatura è stata termostata a 37 °C, l'enzima impiegato è il Lactozym della Novo Nordisk.

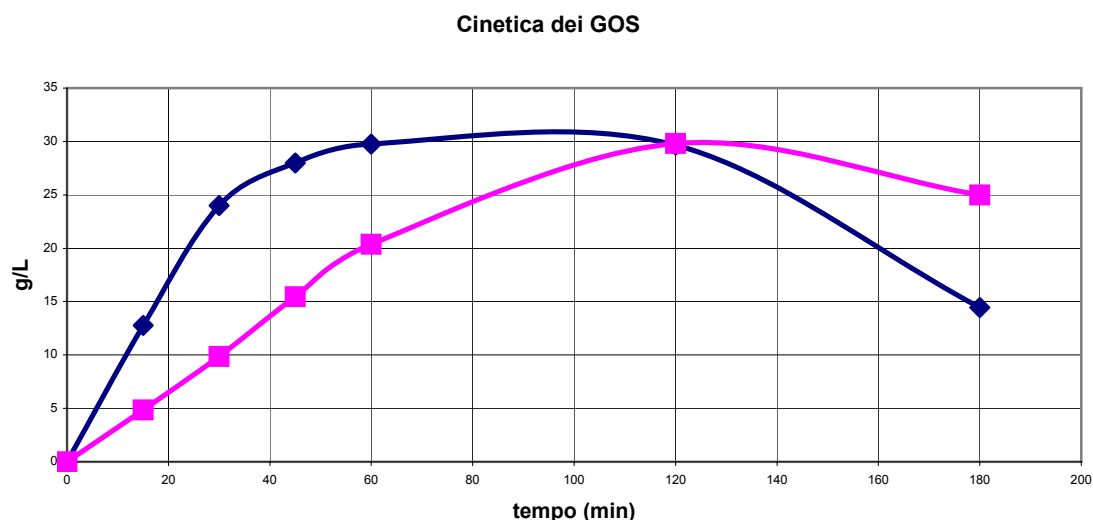


Figura 5.9
Cinetica di formazione dei GOS a partire dal ritentato di nanofiltrazione

Come si vede dal grafico, la massima produttività si ottiene fra i 50 ed i 120 minuti di reazione dell'enzima. Nelle sperimentazioni di laboratorio sono state raggiunte delle rese di conversione del 24%, perfettamente in linea con i dati di letteratura (Iwasaki 1996).

Il meccanismo idrolitico di formazione dei GOS è particolarmente studiato in letteratura, utilizzando diversi enzimi di origine microbica come il *Kluyveromyces fragilis* e l'*Aspergillus oryzae*, *L'Escherichia coli*, in diverse condizioni di idrolisi.

La presenza di elettroliti in soluzione è particolarmente critica per ottimizzare le rese idrolitiche (Sinnott 1978).

Dopo l'idrolisi del lattosio si ottiene una miscela di zuccheri dolci, molto più facilmente fermentabili, quindi utilizzabili nel settore delle fermentazioni industriali, e assorbibili direttamente dall'intestino umano (Rustom 1998).

I GOS sono pertanto particolarmente interessanti per la formulazione di preparati alimentari salutistici, in particolare per gli alimenti della prima infanzia, in cui spesso si verificano problemi di intolleranza alimentare al lattosio.

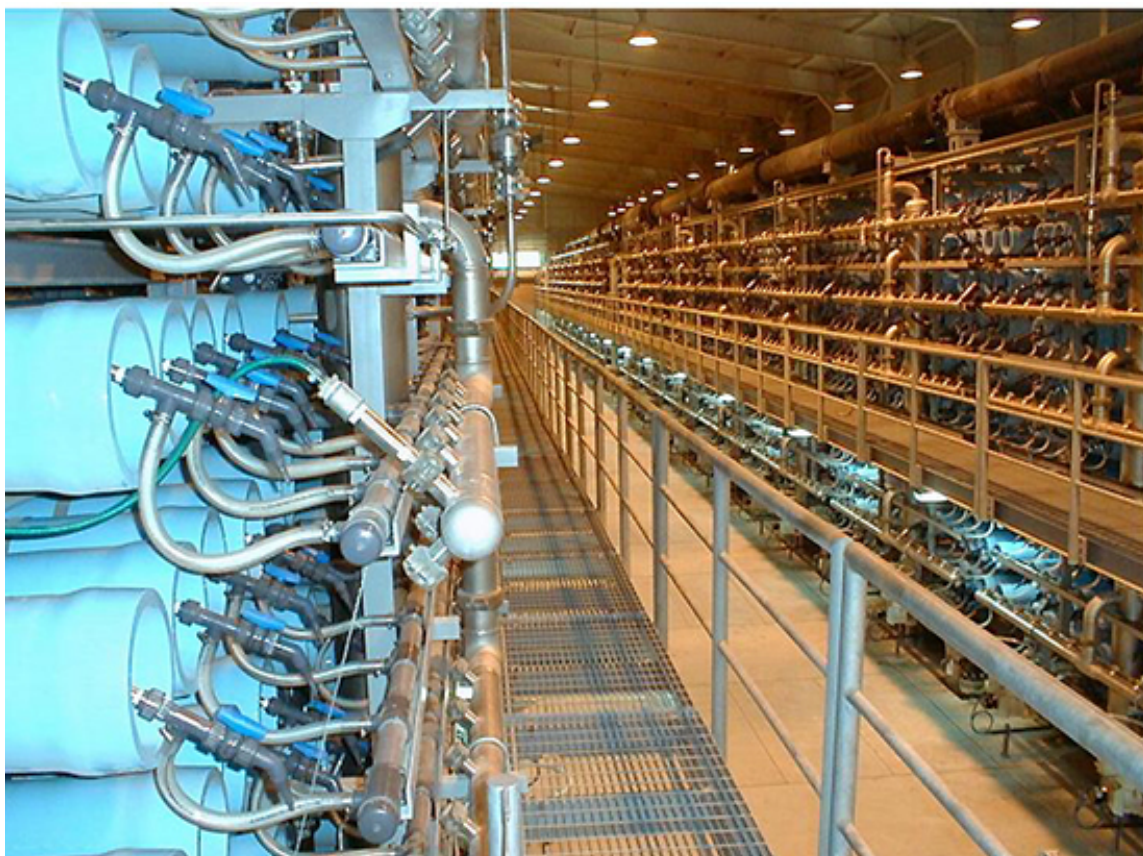
A livello sperimentale la determinazione dei GOS è stata effettuata per separazione HPLC e rivelatore ad indice di rifrazione. Queste determinazioni sono relativamente semplici ed ampiamente descritte in letteratura (Jeon and V.R. 1985).

5.4 Bibliografia

- C. Fabiani, G. G., M. Pizzichini, V. Violante (1987). "Steady state modelling of a hollow fiber enzymatic reactor." Bioch. Bioengineering **30**: 456.
- Gibson and X., W. (1994). "regulatory effects of bifidobacteria on the grow of other colonic bacteria." Journal of Applied Bacteriology **77**: 421-420.
- Iwasaki, M., Nakajima, and S. Nakao (1996). "Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymatic batch reaction using β -galactosidase." Process Biochemistry **31**: 69-76.
- J.P. Presnosil, E. S., J.R. Borne (1987). "Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis. Part I, State of art." Biotechnology and Bioengineering **30**: 1019-1025.
- Jeon and V.R., M. (1985). "HPLC analysys of oligosaccharides formed during β -galactosidase action on lactose." Journal of Dairy Science **68**: 581-588
- Mahoney (1998). "Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review." Food Chemistry **63**: 147-154.
- Rustom, M., I., Foda and M.,H., Lopez-Leiva (1998). "Formation of oligosaccharides from whey UF-permeate by enzymatic hydrolysis." Food Chem. **62**: 141-147.
- Sinnott (1978). "Ions, ion-pairs and catalysis by the lac Z β -galactosidase of Escherichia coli." FEBS letters **94**: 1-9.
- Tomomatsu (1994). "Health effects of oligosaccharides." Food Technology **48**: 61-65.
- Yaeshima (1996). "Benefits of bifidobacteria to human health." Bulletin of the International Dairy Federation **313**: 36-42.
- Zadow, J. G. (1992). Whey and lactose processing. London and New York, Elsevier Science Pub. LTD.
- Zhou Q.Z.K., X. D. C. (2001). "Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from Kluyveromices lactis." Biochemical Engineering Journal **9**: 33-40.

CAPITOLO 6

I PROCESSI SEPARATIVI A MEMBRANA



**Impianto produttivo di osmosi inversa per la dissalazione
dell'acqua di mare da 90.000 m³/giorno
finalizzato alla produzione di acqua potabile
nel Golfo Persico**

Indice dei paragrafi

6.1 Concetto di filtrazione tangenziale	119
6.2 Tecniche specifiche di filtrazione tangenziale	124
6.3 Classificazione e composizione delle membrane	126
6.3.1 Le membrane ceramiche	128
6.3.2 Le membrane polimeriche	131
6.4 Meccanismi di trasporto	134
6.4.1 Il modello del gel per la previsione del flusso di permeato	138
6.5 Idrodinamica dei sistemi a membrana	141
6.6 Consumo energetico	144
6.7 Lavaggi delle membrane	145
6.8 Principali applicazioni dei processi a membrana	147
6.9 Bibliografia	149

6.1 Concetto di filtrazione tangenziale

I processi a membrana si basano sull'impiego di filtri semipermeabili o iono-selettivi per mezzo dei quali è possibile ottenere la separazione a livello molecolare e ionico dei soluti organici ed inorganici e dei solventi in cui sono disciolti (Blatt 1970; Hwang 1975).

Le tecnologie di membrana (TM) sono classificate dalla EPA (l'Agenzia americana per la protezione dell'ambiente) come “tecniche pulite” di purificazione e concentrazione, con indubbi vantaggi economici in termini di consumi energetici, di semplificazione impiantistica (modularità della tecnologia) e di basso impatto ambientale (recupero di sostanze disperse, riduzione del carico inquinante).

L'operazione di filtrazione consiste in una separazione di due o più componenti da un fluido. Nell'uso convenzionale è riferita alla separazione di un solido da un liquido o da un gas. Il ruolo primario della membrana è quello di agire come barriera selettiva, che può permettere il passaggio di alcune componenti e trattenere le altre che compongono la miscela di partenza.

Le tecnologie di membrana consentono di separare soluti fra loro senza apporto di calore, cioè senza passare attraverso processi di evaporazione e condensazione.

La possibilità di effettuare separazioni di composti disciolti in acqua è particolarmente importante nel settore agro-alimentare, dove i trattamenti termici ad esempio di evaporazione del solvente, hanno effetti dannosi sulle sostanze nutrienti termolabili, come le vitamine idrosolubili.

Le particelle di soluto in acqua sono separate sulla base delle dimensioni e della struttura molecolare, sotto la spinta di una “driving force” che può essere: la pressione, il potenziale elettrico, la tensione di vapore, la concentrazione.

Una schematica rappresentazione di una separazione a membrana è riportata in figura 6.1. La fase 1 è costituita dall'alimento o “feed” e può essere composta da diverse specie molecolari, mentre la fase 2 è considerata permeato o “downstream”.

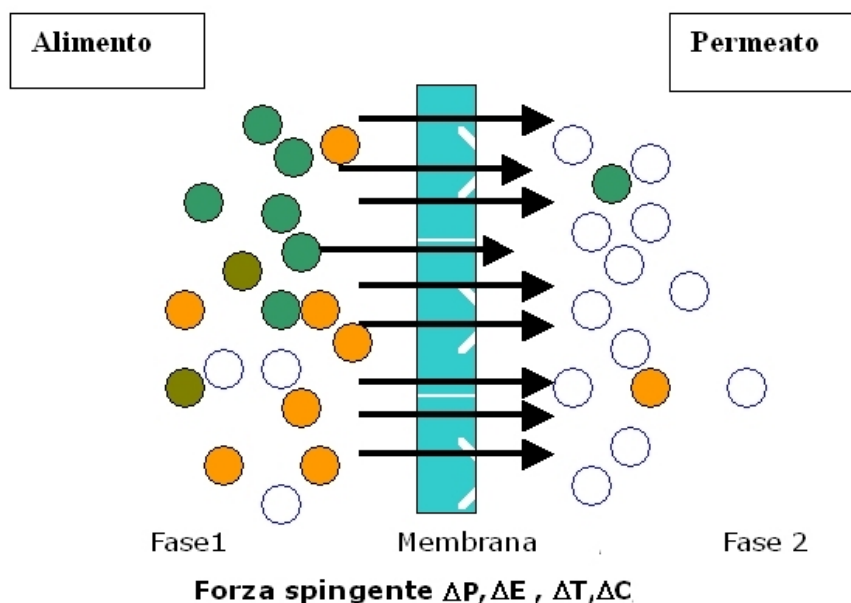


Figura 6.1
Rappresentazione di un sistema bifasico separato da una membrana

La separazione fra le molecole avviene perché la membrana ha la capacità di trasportare un componente dalla fase 1 alla fase 2, con una velocità superiore rispetto alle altre. La membrana non è una barriera ideale, ma è una barriera non perfetta, lascia passare anche molecole indesiderate (figura 6.1).

Nella tabella 6.1 si schematizzano i principali processi a membrane, le fasi coinvolte e la forza spingente (driving force).

Processo	Fase 1	Fase 2	Forza motrice
Microfiltrazione (MF)	L	L	ΔP
Ultrafiltrazione (UF)	L	L	ΔP
Osmosi Inversa (OI)	L	L	ΔP
Gas Separation (GS)	G	G	ΔP
Dialisi (DI)	L	L	ΔC
Elettrodialisi (ED)	L	L	ΔE
Pervaporazione (PV)	L	G	Δp
Termo-osmosi (TO)	L	L	$\Delta T/\Delta p$

Tabella 6.1
Forza spingente nei processi a membrana

Dove:

ΔP = pressione idraulica

ΔC = differenza di concentrazione

Δp = pressione parziale

ΔE = differenza di potenziale elettrico

ΔT = differenza di temperatura

L = liquida

G = gas

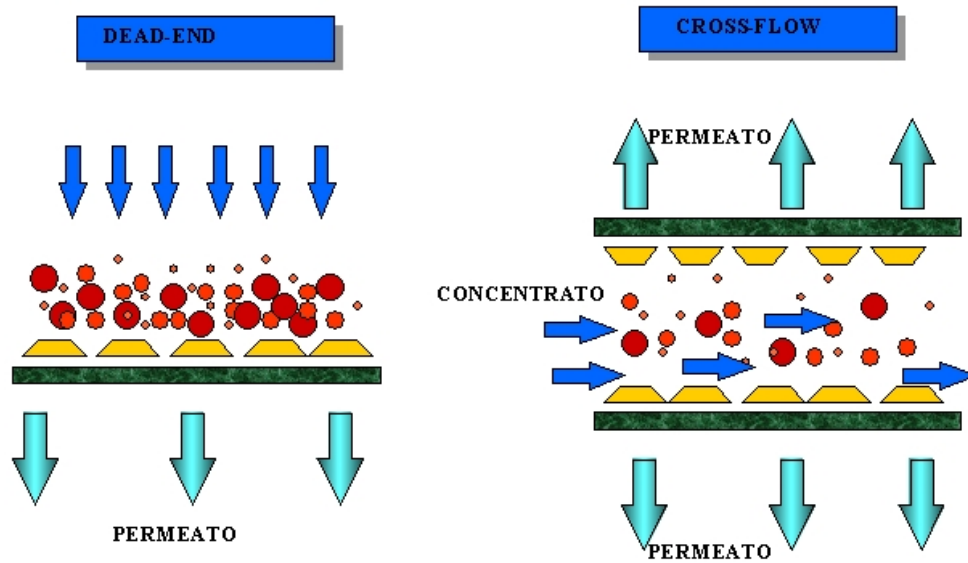
Le prestazioni di una membrana e la sua efficienza sono misurate da due parametri fondamentali: la *selettività* ed il *flusso di permeato*.

La selettività esprime la capacità della membrana di separare le molecole fra loro, mentre il flusso esprime la produzione, cioè il volume che passa attraverso una superficie unitaria di membrana per unità di tempo.

Per introdurre i fenomeni che regolano la permeazione attraverso le membrane è necessario anche definire e sottolineare gli aspetti salienti della tecnologia di *filtrazione tangenziale* per liquidi, controllata dalla pressione (tabella 6.1).

Essa è concettualmente differente dalla filtrazione tradizionale (dead end) che avviene perpendicolarmente al filtro. Questo processo genera un rapido intasamento dei pori, conseguentemente si registra una caduta di produttività del sistema separativo (schema di sinistra delle figure 6.2 e 6.3).

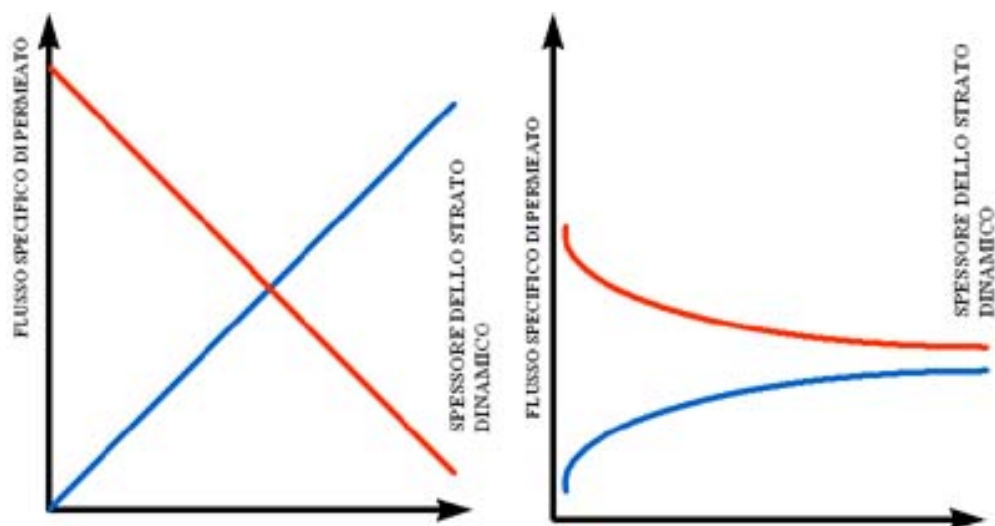
Nella filtrazione tangenziale il liquido trattenuto dal filtro viene spinto ad alta velocità di scorrimento da una pompa, che quindi rimuove in continuo il deposito che viene a formarsi sulla membrana. Il risultato di questa condizione si traduce in una produttività più alta della membrana (schema di destra delle figure 6.2 e 6.3).



Condizioni di rapido intasamento

In condizione tangenziale l'intasamento viene ridotto e la produttività aumentata

Figura 6.2
Confronto tra filtrazione tradizionale (dead end) e tangenziale (cross flow)



PRINCIPI DI FILTRAZIONE STATICA E DINAMICA

Figura 6.3
Flusso di permeato nella filtrazione statica e tangenziale

La filtrazione tangenziale offre quindi l'opportunità di operare in condizioni stazionarie, con un flusso di permeato piuttosto costante a parità di pressione idraulica applicata.

Ciò che distingue i processi a membrana, rispetto ad altre tecniche separative, è l'applicazione della pressione idraulica che aumenta la velocità di trasporto dei soluti e del solvente (Cheryan 1986; Mulder 1991). La natura della membrana e la sua conformazione strutturale influenzano, insieme ai parametri chimico-fisici, il meccanismo di trasporto dei soluti e quindi la selettività del processo.

Dalle figure precedenti si nota che in condizioni di flusso tangenziale la produttività si stabilizza dopo un certo periodo, mentre nella filtrazione tradizionale (dead end) il flusso diminuisce linearmente nel tempo a causa dell'intasamento del filtro.

In un separativo che opera in condizioni di flusso tangenziale, è possibile sempre distinguere le seguenti tre correnti di fluido:

- un *alimento* che viene pompato nel modulo a membrana;
- un *permeato*, che costituisce la corrente che fluisce attraverso il filtro;
- un *concentrato* o *retentato* formato da tutto ciò (soluzione e soluti) che è respinto dal filtro.

La figura 6.4 mostra uno schema di un processo separativo in cui entra un alimento e escono due correnti, rispettivamente permeato e concentrato.

Il processo a membrana consente quindi il recupero delle correnti di permeato e concentrato che possono costituire entrambe prodotti d'interesse pratico e commerciale. Gli impianti a membrana sono modulari, quindi facilmente dimensionabili per grandi impianti e si caratterizzano per un basso impatto ambientale. Infatti le membrane a fine ciclo d'uso possono essere lavate e rigenerate con acqua e soluzioni chimiche che costituiscono gli unici effluenti residui del processo.

Accorgimenti particolari consentono di minimizzare la produzione di effluenti liquidi, impiegando ad esempio correnti di fluido di processo (permeato) per il lavaggio dei moduli, oppure smaltendo gli effluenti con metodologie tradizionali (es. depurazione biologica).

Il filtro-membrana è assemblato in un sistema ingegnerizzato, detto modulo, che permette di sfruttare le proprietà perm-selettive della membrana stessa.

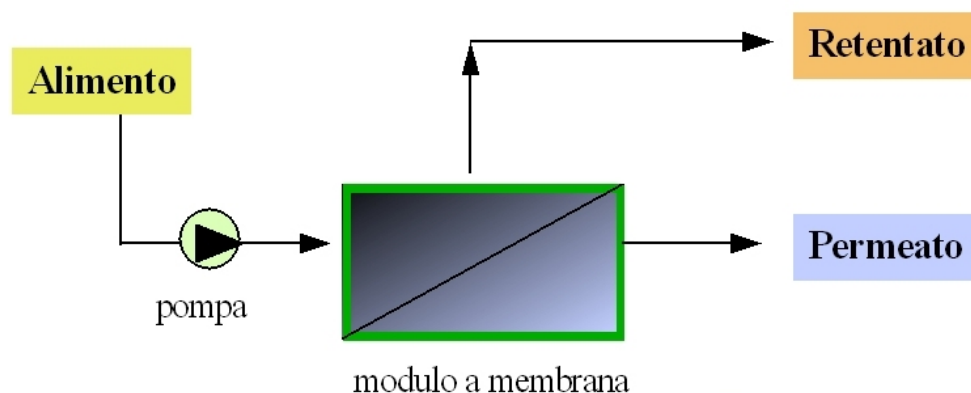


Figura 6.4
Schema di un processo separativo a membrana

A sua volta il modulo filtrante, cioè l'unità funzionale minima, può essere assemblato in contenitori a tubi opportuni (vessel) o in unità a cassetta (dipende dalla geometria di membrana) per formare sistemi filtranti di tipo industriale.

Il cut-off di una membrana indica il valore statistico della dimensione dei pori delle membrane, cioè il suo livello di confine separativo.

6.2 Tecniche specifiche di filtrazione tangenziale

La tecnica separativa mediante membrane fa uso di particolari filtri polimerici o ceramici, che operano in condizioni di flusso tangenziale in modo da minimizzare i fenomeni di intasamento.

La figura 6.5 indica gli intervalli dimensionali delle specie chimiche interessate ai processi separativi a membrana controllati dalla pressione idraulica.

Questi processi separativi saranno di seguito indicati sinteticamente come riportato in tabella 6.2.

Si può affermare che l'OI ritiene tutte le componenti chimiche escluso il solvente "acqua"; la NF ritiene i cationi bivalenti e i glucidi, l'UF ritiene le macromolecole o le particelle con dimensioni comprese fra 10 e 200 Å°. Il processo di MF si colloca nell'intervallo di ritenzione delle particelle con diametro dell'ordine dei micron, nell'intervallo 0,1-10 µm.

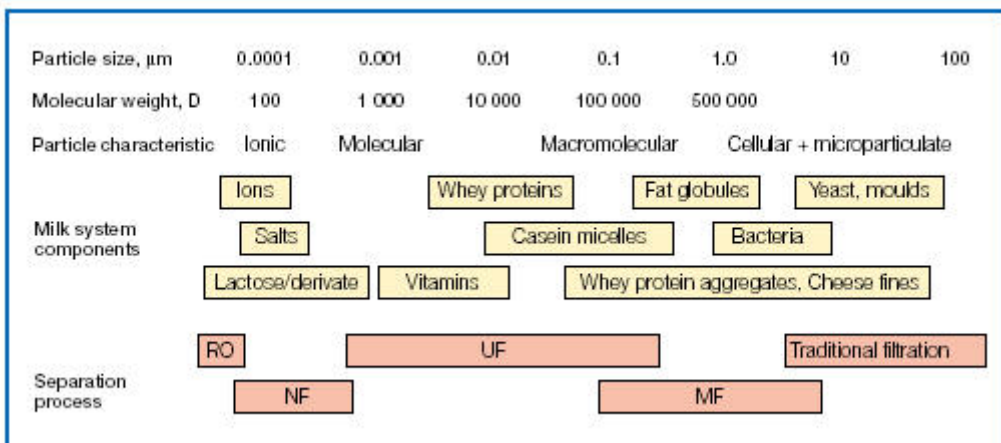


Figura 6.5
Spettro dimensionale delle particelle in relazione alle tecniche separative

Processo separativo	Nome	Intervallo di selettività (µm)
Osmosi Inversa	OI	$10^{-4} - 10^{-3}$
Nanofiltrazione	NF	$10^{-3} - 10^{-2}$
Ultrafiltrazione	UF	$10^{-2} - 10^{-1}$
Microfiltrazione	MF	$10^{-1} - 10^1$

Tabella 6.2
Legenda dei principali processi separativi

Le particelle più grandi dei 10 μm sono facilmente eliminabili attraverso filtrazioni convenzionali. Per questo motivo la maggior parte degli impianti di filtrazione tangenziale, compresi quelli di MF, sono accoppiati ad un prefiltro convenzionale che ha lo scopo di rimuovere le particelle e le impurezze di dimensioni maggiori per salvaguardare così anche l'integrità strutturale delle membrane.

La MF è un processo separativo che rimuove le particelle sospese rispetto alle sostanze disciolte in soluzione (Anderson 1997): quindi è una tecnica che permette di trasformare una sospensione in una soluzione.

In generale la filtrazione tradizionale consente la separazione di due o più componenti da un fluido di alimento, caratterizzato da una torbidità più o meno evidente. Nell'uso convenzionale la separazione è riferita a quella di un solido insolubile, da un liquido o da un gas. La filtrazione con membrane estende ulteriormente questo concetto includendo le separazioni dei soluti disciolti in soluzione.

La membrana permette il passaggio di alcuni componenti sciolti perfettamente in soluzione (soluzione limpida) e la ritenzione di altri contenuti nella miscela di alimentazione, con il risultato che entrambi i fluidi, separati e ritenuti, si sono arricchiti in uno o più componenti.

Per quello che riguarda il siero di latte, la figura 6.6 indica, in modo schematico, la tecnica separativa specifica per ritenere i soluti e le particelle come i coaguli di grassi ed i batteri.

Dallo schema si vede che per trattenere coaguli e grassi si deve utilizzare una tecnica di MF, per le proteine un processo di UF, per il lattosio la NF e per i sali minerali l'OI (M. Pizzichini 1997).

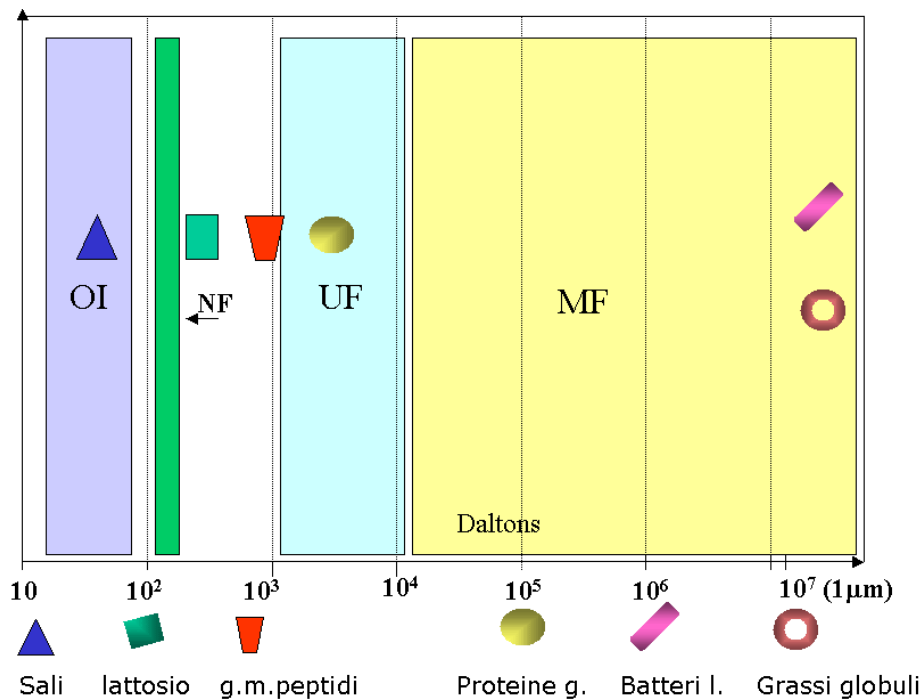


Figura 6.6
Dimensioni delle particelle e dei soluti del siero

Questi processi applicati al frazionamento del siero di latte verranno ulteriormente approfonditi nel capitolo 8.

Le membrane non devono intendersi come strutture filtranti inerti rispetto alle specie chimiche in soluzione, poiché possono essere chimicamente o fisicamente modificate per permettere il passaggio di corrente, di alcune specie chimiche con meccanismi di scambio ionico e di canale ionico preferenziale. Così le membrane possono essere passive o reattive, in funzione della loro proprietà di alterare la natura chimica delle specie permeanti.

6.3 Classificazione e composizione delle membrane

Nella tabella.6.3 si riportano a confronto le principali caratteristiche dei processi in fase liquida controllati dalla pressione, in particolare di MF, UF ed OI. La NF si può assimilare all'OI. Tale classificazione si basa sul processo separativo specifico.

La tabella 6.3 indica il tipo di struttura delle membrane, la pressione di esercizio e il meccanismo separativo, che è del tipo esclusione molecolare per MF e UF, ed è del tipo solubilizzazione-diffusione per l'OI e la NF. Per compiere le specifiche separazioni le membrane di MF e UF devono avere dei pori con certe dimensioni geometriche e caratteristiche conformazionali che conferiscono la selettività al processo.

Nell'OI la separazione avviene con un meccanismo più complesso che prevede una certa compatibilità fra soluto e il materiale costituente la membrana (solubilità). La selettività è la capacità della membrana di discriminare (separare) soluti a diverso peso molecolare o a diversa conformazione strutturale.

In alcuni casi particolari (per es. membrane polimeriche) la permeazione avviene con un meccanismo di solubilità del soluto nella matrice del polimero del film, accompagnato anche dal fenomeno di diffusione nella matrice del film, a fronte di un gradiente di concentrazione sulle due facce della membrana (Hwang 1975).

Microfiltrazione	Ultrafiltrazione	Nanofiltrazione	Osmosi Inversa
Separa particelle (batteri, lieviti, S.S.)	Separa macromolecole (proteine)	Separa sali minerali bivalenti e soluti con PM > di 200 D	Separa soluti a bassi PM (sali, zuccheri)
Pressione osmotica trascurabile	Pressione osmotica trascurabile	Pressione osmotica Indipendente da NaCl	Pressione osmotica alta (7-30 bar)
Pressione applicata (< 2 ba)	Pressione applicata (1-10 bar)	Pressione applicata (10-20 bar)	Pressione applicata (10-70 bar)
Membrana simmetrica (non sempre)	Membrana simmetrica	Membrana simmetrica	Membrana asimmetrica
Spessore attivo (10-150 μm)	Spessore attivo (0,1-1,0 μm)	Spessore attivo (0,1-1,0 μm)	Spessore attivo (0,1-1,0 μm)
Separazione per esclusione	Separazione per esclusione	Separazione per solubilizzazione-diffusione	Separazione per solubilizzazione-diffusione

Tabella 6.3
Caratteristiche costruttive e operative delle tecniche di membrana

Le membrane possono essere ulteriormente classificate in base alla loro composizione e alla loro organizzazione strutturale. Infatti si dividono in base all'origine in sintetiche (polimeriche) e naturali (acetato di cellulosa). In base alla struttura conformazionale si classificano in porose, compatte, composite ecc. (Cheryan 1986; Mulder 1991)

Un'altra classificazione riguarda la natura chimica della membrana solida che può essere costituita:

- polimeri naturali o da sostanze polimeriche;
- da materiali ceramici e metallici.

Un'ulteriore classificazione dipende dalla struttura intima della membrana, che può essere simmetrica, asimmetrica, liquida.

DI = dialisi

GP= gas permeazione

PV = pervaporazione

ED = elettrodialisi

La composizione del polimero che costituisce la membrana deve essere compatibile con la chimica del processo considerato e con le condizioni dei lavaggi, con cui si rigenera la produttività dei filtri, dopo un periodo di funzionamento.

Bisogna considerare che la composizione chimica del polimero che compone la membrana non è indifferente al processo separativo considerato, poiché la stessa polarità della membrana diventa determinante per i fenomeni di trasporto dei soluti o dell'acqua.

Per brevità di trattazione si accenna soltanto alla composizione delle membrane impiegate nel presente studio, che sono polimeriche di MF di OI e ceramiche di MF.

La differenza fra le due categorie di membrana riguarda principalmente il materiale costruttivo, rispettivamente polimerico e ceramico, ma anche la microconformazione strutturale. Ad esempio, le membrane polimeriche presentano una porosità strutturale, ottenuta nel processo di polimerizzazione, che porta alla formazione di micropori con certe dimensioni statistiche (cut-off). Nelle membrane ceramiche la porosità si ottiene dalla compattazione di granuli di materiale ceramico, generalmente allumina. La porosità è quella che si ottiene dagli spazi liberi lasciati dall'interposizione di granuli a diversa dimensione strutturale.

Nelle figure 6.7 e 6.8 si riportano le foto al SEM (Scan Electron Microscopi) delle sezioni di due membrane, polimerica (UF) e ceramica (Bhave 1996), per mostrarne la differente conformazione strutturale.

La foto mostra l'interposizione dei granuli di allumina che sono più grandi verso l'esterno e sempre più ridotti verso il lume della membrana.

Gli interstizi che si formano sullo strato denso della membrana, quello costituito da allumina microgranulare, costituiscono e determinano il taglio molecolare del monolite, cioè il cut-off.

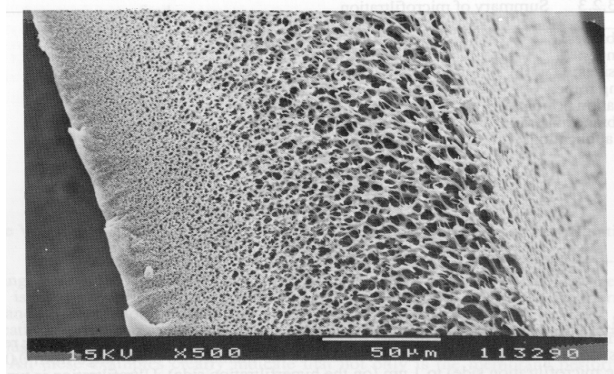


Figura 6.7

Fotografia al SEM di una seziona di membrana in polisulfone da UF

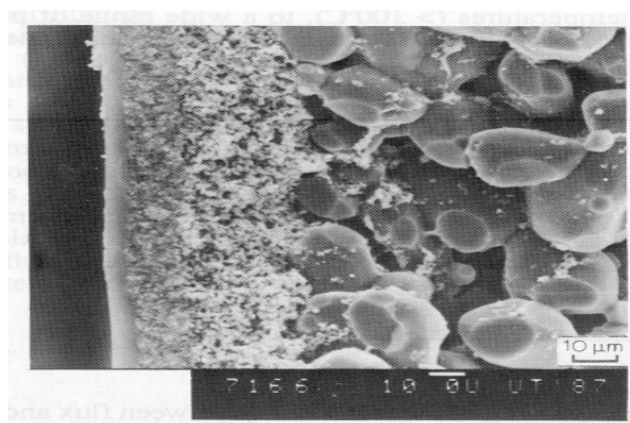


Figura 6.8

Fotografia al SEM di una seziona di una membrana ceramica di Al_2O_3

6.3.1 Le membrane ceramiche

Le membrane ceramiche rientrano nella classe di membrane costituite da materiali inorganici (Bhave 1996). Sono principalmente costituite da una combinazione di metalli (Alluminio, titanio, zirconio ecc.) con un non-metallo (ossigeno, azoto, carbonio ecc.) in forma di ossido, nitrato o carburo. Sono preparate generalmente tramite sinterizzazione o con la tecnica sol-gel (Larbot 1989); le più importanti sono quelle preparate con allumina ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) e ossido di zirconio o zirconia (ZrO_2).

In genere questi materiali inorganici conferiscono a tali tipi di membrane stabilità termica e chimica superiori rispetto a quelle polimeriche. I materiali polimerici hanno un *range* di temperature di utilizzo che varia dai 25 °C ai 300 °C, mentre con materiali ceramici si possono raggiungere temperature di processo anche di 800 °C. Si possono avere così applicazioni nella separazione di gas ad alte temperature, specialmente in presenza di reazioni chimiche dove la membrana funziona anche da catalizzatore oltre che da barriera selettiva per escludere quello che non interessa fra i componenti che si sono formati. Allo stesso modo la stabilità chimica di tali materiali è notevole e ne permette l'utilizzo in ogni *range* di pH e con la maggior parte dei solventi organici (al contrario, i materiali polimerici sono limitati da questi fattori).

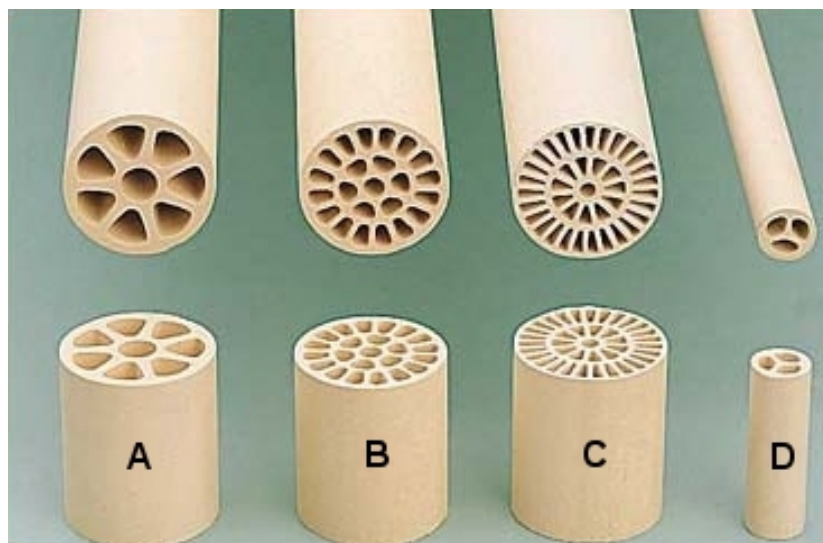


Figura 6.9
Sezione trasversale di monoliti Tamì a diversa conformazione:
A - Margherita; B -Girasole; C – Dalia

Da ciò consegue anche che, in caso di applicazioni che portano a un alto grado di *fouling* (intasamento), che provoca una drastica diminuzione del flusso trans-membrana (che interessa particolarmente la MF e UF), adottando membrane ceramiche si possano utilizzare tutti i vari tipi di soluzioni detergenti, anche acidi forti o soluzioni fortemente alcaline. Di conseguenza generalmente la vita media di una membrana ceramica è di gran lunga superiore a quella di una membrana polimerica. La stabilità meccanica è un parametro di poca rilevanza a meno che non si lavori ad elevate pressioni o con materiali particolari (self-supported).

In figura 6.9 sono riportate le sezioni di quattro tipi di membrana ceramica, a differenti superfici filtranti, prodotte dalla Tamì Industries (uno dei principali produttori mondiali). La tipologia B corrisponde a quella impiegata sia nei processi di MF che di UF del siero.

La soluzione da filtrare (alimento) in pressione viene spinta sulla testa del modulo: per effetto della componente radiale della pressione, parte del liquido permea attraverso la membrana. Invece per effetto della componente tangenziale il liquido non permeato viene spinto verso l'uscita raccogliendo le particelle troppo grosse per essere filtrate. La componente tangenziale effettua anche il rivolgimento della stessa membrana.

In figura 6.10 sono mostrate le caratteristiche costruttive di diverse tipologie di membrana "CERAM INSIDE" della Tamì Industries, impiegati nella ricerca in oggetto. Esse sono costruite con i materiali più puri e sono disponibili in un campo di porosità che spazia dalla NF stretta alla MF larga.

Queste membrane ceramiche tubolari possono essere utilizzate in condizioni estremamente aggressive per acidi, basi forti e anche per solventi organici:

- pH <14
- temperatura massima = 350 °C
- resistenza ai solventi: totale
- pressione massima = 10 bar
- lavaggio con NaOH (pH = 14) a 85 °C

- lavaggio con HNO_3 (pH = 0) a 50 °C
- lavaggio con NaOCl (300 ppm)
- sterilizzazione a caldo (acqua o vapore).

Le configurazioni disponibili sono molteplici, con possibilità di variare numero e diametro dei canali e lunghezza dell'elemento.

La figura 6.10 riassume le configurazioni standard.

Uno dei problemi di processo tipici della MF tangenziale è costituito dall'elevata perdita di carico nel canale, in relazione alla pressione operativa (dovuta alla presenza dello strato limite e a fenomeni di sporcamento); a causa di ciò la pressione in ingresso può essere molto diversa dalla pressione in uscita. La forza motrice del processo è quindi la permeazione varia molto dalla sezione di ingresso a quella di uscita.

Tami Industries ha sviluppato e brevettato la membrana ceramica "ISOFLUX" che risolve in buona misura tale difficoltà (figura 6.11).

Lo spessore dello strato attivo è maggiore nella sezione di ingresso e via via decrescente verso la sezione di uscita; in questo modo si può ottenere una permeabilità costante, senza ricorrere a sofisticati e poco affidabili sistemi di controllo esterni.



Name	1 ch*	Clover*	7 ch*	1 ch	2 ch	5 ch	13 ch	32 ch	Daisy*	Sunflower*	Dahlia*	25 ch
External diameter (mm)	10	10	10	20	20	20	20	20	25	25	25	41
Number of channel	1	3	7	3	2	5	13	32	8	23	39	25
Channel diameter (mm)	6	3.5	2	14	10	6	3.5	2	6	3.6	2.5	6
Surface (m ²)	0.02	0.04	0.08	0.05	0.09	0.13	0.21	0.33	0.2	0.35	0.5	0.63

Figura 6.10
Caratteristiche costruttive di membrane ceramiche Tami

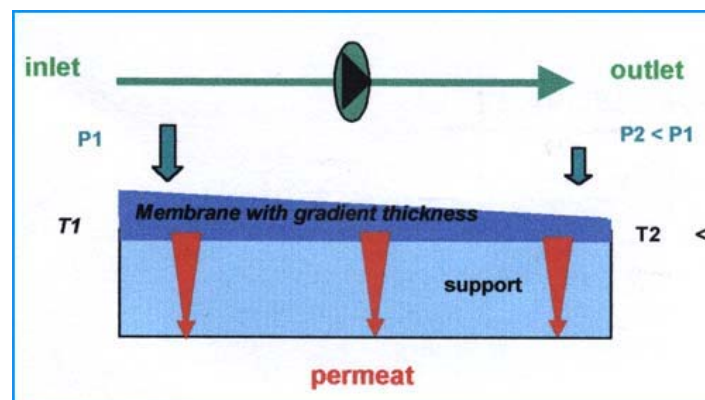


Figura 6.11
Principio di funzionamento della membrana ceramica "ISOFLUX"



Figura 6.12
Housing per membrane ceramiche da 1 a 49 monoliti

A livello applicativo il filtro-membrana è assemblato in un sistema ingegnerizzato, detto ‘*modulo*’, che permette di sfruttare le proprietà perm-selettive della membrana stessa. In commercio sono disponibili moduli predisposti ad accettare un numero di membrane fino a 99 elementi

A sua volta il modulo filtrante, cioè l’unità funzionale minima, può essere assemblato in appositi contenitori (vessel) o in unità a cassetta (dipende dalla geometria di membrana) per formare sistemi filtranti di tipo industriale. Tali contenitori, detti Housing, sono rappresentati in figura 6.12.

6.3.2 Le membrane polimeriche

Teoricamente i polimeri che possono essere utilizzati come barriera o materiale di membrana sono numerosi, ma in pratica il loro numero è limitato perché devono conferire al film polimerico proprietà meccaniche, di resistenza chimica e di calibrazione della porosità.

Una prima caratteristica di questi polimeri riguarda la loro natura e l’entità della porosità che essi hanno (quindi si configurano come membrane porose o compatte).

Struttura della membrana	Materiale
Polimerica idrofobica	Politetrafluoroetilene (teflon)
	Polivinilidenfluoruro (PVDF)
	Polipropilene (PP)
Polimerica idrofilica	Estere di cellulosa
	Policarbonato (PC)
	Polisulfone e Polietersulfone
	Poliimmide e Polieterimmide (PI/PEI)
	Poliammide (PA)

Tabella 6.4
Principali materiali polimerici delle membrane di microfiltrazione

La categoria delle membrane porose si applica soprattutto in MF/UF/NF, mentre le porose dense, o elastomeri, sono utilizzate nella separazione di composti in fase gassosa e le relative tecniche di membrana si chiamano pervaporazione e separazioni in fase gassosa (GS). Nelle membrane porose i fattori significativi che determinano le caratteristiche di separazione sono la distribuzione e le dimensioni dei pori, la stabilità termica e chimica del materiale costituente; nella seconda classe di membrane, invece, la scelta del materiale è ciò che determina le *performance* (selettività e flusso).

Queste membrane sono prodotte con pori di dimensioni fisse (entro un range che va da 0,1 a 10 µm per MF). Alcune caratteristiche chimico-fisiche delle membrane di MF polimeriche, in rapporto alla loro composizione chimica sono riportate nella tabella 6.4.

I materiali polimerici impiegati nella produzione di membrane, sono principalmente acetato di cellulosa, triacetato di cellulosa, poliammidi aromatiche, diacetato di cellulosa, esteri di cellulosa, poliacrilonitrile, polibenzoimidazolo.

Le membrane attualmente più utilizzate sono quelle a base di poliammide (PA) composita, ma sono strutturalmente complesse e protette da brevetto specifico.

Le membrane utilizzate per l'osmosi inversa, invece, appartengono alla famiglia delle "non ioniche", cioè vengono preparate a partire da polimeri nei quali non è necessaria la presenza di gruppi funzionali ionizzabili. La struttura chimica del polimero, come già sottolineato, è un parametro molto importante perché da esso dipendono le proprietà della membrana, cioè selettività, produttività, durata, lavaggio. Il polimero deve consentire una certa permeabilità all'acqua per ottenere portate significative, deve essere chimicamente resistente per evitare fenomeni di degradazione o fenomeni di assorbimento e non deve interagire con gli agenti chimici usati per i lavaggi (detergenti o complessanti).

Sono due le strutture chimiche più frequenti di questo tipo di membrane:

- *strutture dense omogenee*, costituite da un film denso ed omogeneo con un contenuto d'acqua inferiore al 30% e che non presentano porosità. Questa struttura presenta un basso flusso di permeato inversamente proporzionale al suo spessore;
- *strutture anisotrope*, costituite da un film di polimero gelificato con un contenuto d'acqua tra il 40-80% costituito da una faccia dissalante molto più densa rispetto all'altra faccia del film.

La forma delle membrane è generalmente legata alla geometria del modulo (figura 6.13) su cui vengono montate e possono essere quindi di forma *piana*, *tubolare*, a *fibra cava* ed a *spirale avvolta* (la più utilizzata data la sua semplice preparazione). Quest'ultima è la forma utilizzata nella sperimentazione in oggetto. La configurazione a spirale avvolta è scelta per la sua efficienza ed economia ed è composta da una busta formata da fogli di membrana e da particolari reti di spaziatrice, il tutto arrotolato su di un tubo plastico forato (tubo permeato).

La membrana è protetta da una ricopertura esterna in vetroresina. Sulle testate del modulo è trattenuta da particolari dispositivi (ATD), che servono ad impedire la telescopizzazione durante il funzionamento, cioè l'apertura del modulo.

In figura 6.13 è presentata la sovrapposizione di 4 film diversi che vengono arrotolati intorno ad un tubo centrale, su cui sono saldati i tre fogli principali (membrana, spaziatore a rete, collettore del permeato). Il quarto foglio avvolge esternamente il modulo cilindrico.

Partendo dalla rete di spaziatrice, su cui viene inviata la soluzione da filtrare (alimento) in pressione, si possono vedere i tre diversi strati sovrapposti. Sotto la rete si colloca la membrana selettiva vera e propria, che lascia passare una corrente di permeato, raccolta da una membrana impermeabile che convoglia il flusso nell'asse centrale del modulo. Le scelte delle caratteristiche chimiche dei materiali, nonché la costruzione meccanica delle membrane, permettono di lavorare anche ad elevate temperature di esercizio (80 °C) (meno delle ceramiche) e sono resistenti all'attacco di molti solventi come alcoli, chetoni, esteri ed acque contenenti specie aggressive (acido solforico, soda, nitrato ferrico, formaldeide ecc.), ad alto/basso pH.

La resistenza delle membrane alla temperatura è un dato importante poiché permette di utilizzare il polimero giusto nell'intervallo di temperatura specifico per ogni tipo di materiale polimerico.

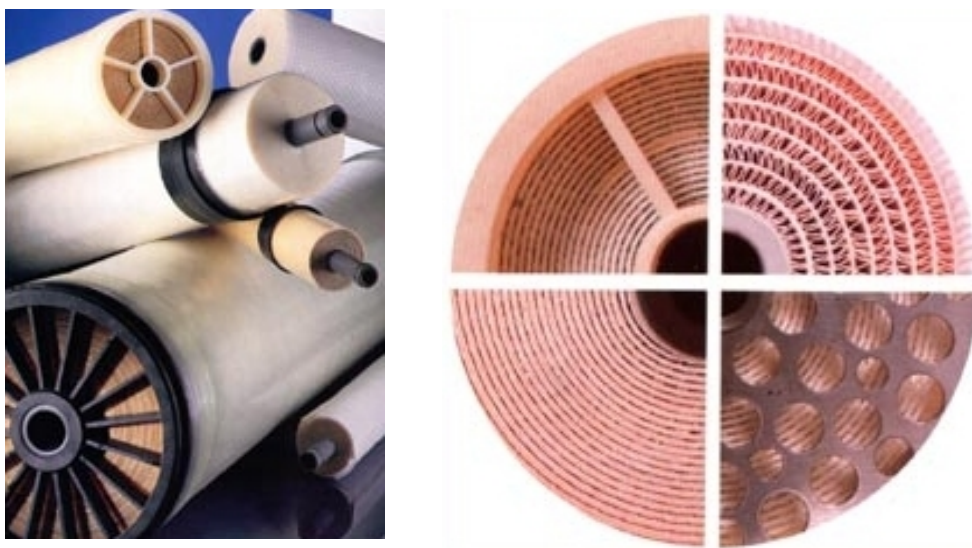


Figura 6.13
Struttura dei moduli di membrane a spirale avvolta

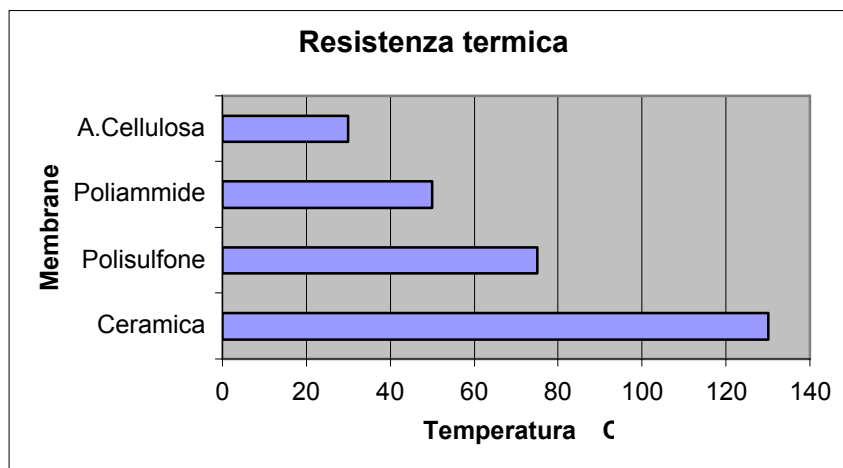


Figura 6.14
Resistenza termica dei materiali costituenti le membrane polimeriche e ceramiche

Nella figura 6.14 si riporta la compatibilità termica delle principali, cioè delle più usate membrane polimeriche e di quelle ceramiche.

Le membrane ceramiche in allumina o zirconia possono resistere anche a temperature superiori ai 130 °C, ma si consiglia di utilizzarle nell'intervallo 0-130 °C per evitare possibili modificazioni strutturali.

6.4 Meccanismi di trasporto attraverso membrane

Per analizzare il meccanismo di trasporto attraverso una membrana porosa è necessario introdurre alcune considerazioni generali che riguardano:

- la dimensione dei pori (generalmente il diametro dei pori);
- la densità dei pori (numero di pori per unità di superficie delle membrane);
- la porosità della membrana (volume di vuoto rispetto al peso complessivo).

Una membrana semipermeabile porosa può contenere un certo numero di pori per unità di superficie, ma questi canali possono avere dimensioni diverse, il che condiziona fortemente le prestazioni separative del filtro.

In una situazione ideale, il flusso attraverso le membrane può essere descritto dalla legge di Darcy dove esso risulta direttamente proporzionale alla pressione applicata:

$$J_p = -L_p \cdot \frac{dP}{dx} \quad \Rightarrow \quad J = K \cdot \Delta P \quad 6.1$$

L_p è il coefficiente di permeabilità del solvente e K è la costante di permeabilità della membrana che include le sue caratteristiche strutturali e di composizione, numero dei pori, spessore del film, viscosità della soluzione ecc. Approssimando la conformazione dei pori della membrana a capillari rettilinei, si può applicare la legge di Hagen-Poiseuille:

$$J = \frac{\varepsilon r^2 \Delta P}{8 \eta \Delta x} \quad \Rightarrow \quad K = \frac{\varepsilon r^2}{8 \eta \Delta x} \cong \frac{1}{R_t} \quad 6.2$$

Sulla costante di permeabilità si gioca il mercato mondiale delle membrane.

Nella relazione di Hagen-Poiseuille i parametri sono:

ε = superficie porosa libera

Δx = spessore della fibra

r = raggio medio del poro

η = viscosità della soluzione

$\Delta P = (P_{in} - P_{out}) - (\pi_{in} - \pi_{out})$

π = pressione osmotica, generalmente trascurabile nei processi di UF e MF, meno trascurabile in quelli di NF e non trascurabile in quelli di OI.

La costante di permeabilità K risulta inversamente proporzionale alla resistenza totale al flusso di permeato (R_t) che può essere espressa come somma di tutte le resistenze al flusso generate da vari fenomeni (Bird 1960; Cheryan 1986):

$$R_t = R_m + R_c + R_f + R_{cp} + R_g$$

I vari termini della somma indicano tutte le possibili resistenze che si possono formare quando una soluzione fluisce attraverso una membrana: R_c è la resistenza dovuta alla formazione del *cake* sulla superficie della membrana; R_f è la resistenza dovuta all'intasamento dei pori della membrana; R_{cp} è dovuta alla concentrazione per polarizzazione, cioè alla formazione di uno strato molto concentrato di soluti adiacente alla membrana; R_g è dovuta alla formazione dello strato di gel (gel layer); infine R_m è la resistenza intrinseca della membrana valutabile, fissati i valori di T e ΔP , attraverso una prova di filtrazione con acqua pura tramite la relazione :

$$R_m = \frac{(\Delta P)_T}{\eta J_0} \quad 6.3$$

dove J_0 è il flusso di start up della prova.

Quindi il flusso di permeato, cioè la produttività della membrana, dipende dalle sue caratteristiche costruttive (K), dalla pressione applicata $(\Delta P)_T$, ed è inversamente proporzionale alla resistenza idraulica da parte della membrana rispetto alla viscosità della soluzione.

La selettività del filtro dipende dalla distribuzione statistica del diametro dei pori, correlabile in qualche modo al cut-off o taglio molecolare della membrana. Il cut-off esprime la dimensione statistica del diametro dei pori della membrana, espressa in Dalton (unità di misura del peso atomico: 1/12 della massa del C_{12}).

Nella figura 6.15 si riporta la distribuzione statistica del diametro dei pori di una membrana di UF.

Più la gaussiana è stretta, più alta è la selettività della membrana, più è larga, minore è la selettività del filtro. Teoricamente la selettività più alta si ottiene con membrane che hanno tutti i pori con le stesse dimensioni, ma questo è molto difficile per le polimeriche ed impossibile per quelle ceramiche.

Il mercato mondiale delle membrane dipende proprio da queste caratteristiche strutturali e di composizione chimica.

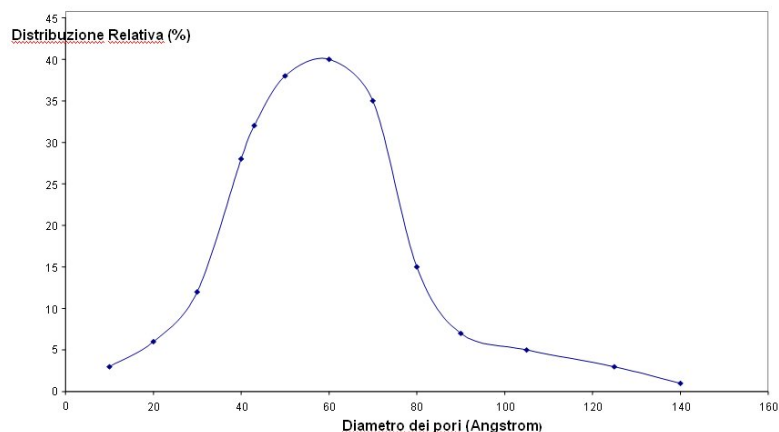


Figura 6.15
Andamento statistico della dimensione dei pori di una membrana

Le membrane migliori sono quelle che mostrano la più alta selettività verso i soluti (gaussiana stretta), elevato numero di canali per unità di superficie filtrante, minimo spessore del film, elevata resistenza meccanica, stabilità del polimero o del materiale costruttivo della membrana, standardizzazione della produzione; il filtro deve avere le stesse caratteristiche strutturali in grandi produzioni di manufatti, siano essi in forma piana, tubolare che di fibre cave.

La riduzione del flusso del permeato nel tempo, come si osserva ad esempio nella prova di UF di figura 6.16, può essere causato da più fenomeni, tra cui i principali sono:

- il *fouling* (intasamento dei pori della membrana dovuto anche a fenomeni di adsorbimento di particelle sulla superficie),
- la concentrazione di polarizzazione (formazione di uno strato molto concentrato di soluto vicino alla membrana),

che non sono completamente indipendenti l'uno dall'altro visto che il fouling può essere generato da fenomeni di polarizzazione.

Tutti questi fattori inducono resistenze aggiuntive al trasporto attraverso la membrana. Come visto in precedenza il flusso è dato da

$$\text{Flusso} = \frac{\text{driving force}}{\text{resistenza totale}}$$

Per cui è evidente che il flusso diminuisce all'aumentare della resistenza generata. Un discorso leggermente diverso va fatto nel caso dell'osmosi inversa.

L'osmosi inversa (OI) è un processo di filtrazione selettiva dell'acqua, che si ottiene applicando una differenza di pressione superiore a quella osmotica della soluzione da purificare.

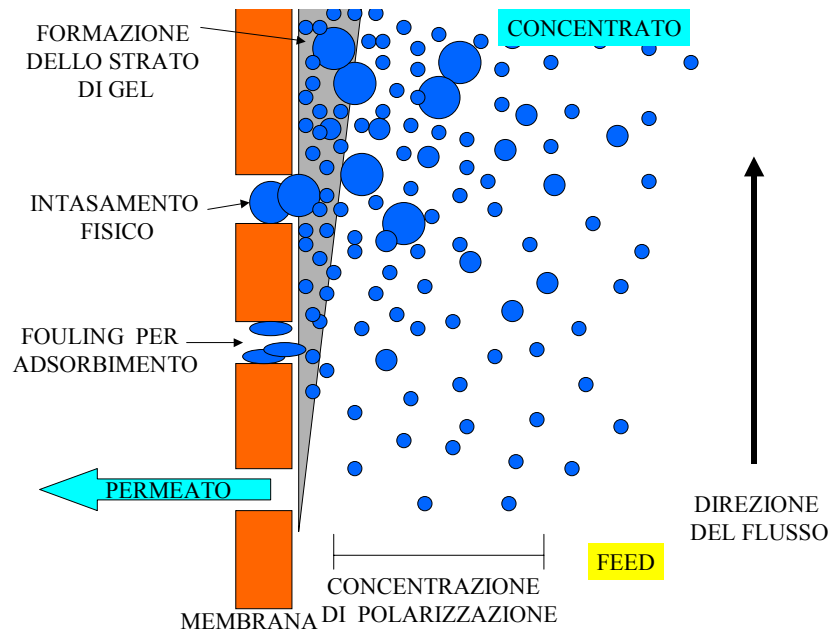


Figura 6.16
Schematizzazione dei vari fenomeni di intasamento

In tal modo si ottiene un flusso di solvente (acqua) che è proporzionale alla differenza fra la pressione applicata e quella osmotica. L'OI è una tecnica utilizzabile per la separazione o la concentrazione di soluti sciolti in soluzioni acquose.

Fu sviluppata intorno agli anni 50 e da allora si è diffusa in molti settori, tra i quali il più coinvolto è sicuramente quello della dissalazione dell'acqua di mare. Essa necessita di una spinta idraulica che deve vincere la pressione osmotica e le resistenze di membrana per produrre un flusso di solvente.

Le resistenze che si oppongono a questo fenomeno sono:

- il valore di pressione osmotica della soluzione, ricavabile dall'equazione di Van't Hoff

$$\pi = \frac{cjRT}{M}$$

6.4

dove ***cj*** indica la concentrazione del soluto (g), ***M*** il peso molecolare del soluto (g/mol), ***R*** la costante dei gas (0,0821 l atm/K moli)

- la resistenza idraulica opposta dalla membrana al passaggio dell'acqua (R_m),
- la spinta idraulica per ottenere un flusso significativo di acqua pura, come prodotto utile del processo di OI.

Le membrane per osmosi inversa hanno la caratteristica di una porosità molto bassa, < 1 nm, per cui vengono trattenuti soluti con pesi molecolari inferiori ai 200 Da.

Le molecole d'acqua, avendo un diametro di circa 0,2 nm possono passare liberamente seguendo un modello solubilizzazione/diffusione usando ad esempio una membrana di acetato di cellulosa.

La *driving force* è costituita da una differenza di pressione, che può variare dai 10-25 bar per acque salmastre ai 40-60 bar per l'acqua di mare.

6.4.1 Modello del gel per la previsione del flusso di permeato

Quando la soluzione da filtrare con membrane è costituita oltre che da sali minerali anche da sostanze colloidali come proteine, colloidali, grassi, particelle ecc., durante il processo ad esempio di MF o di UF si può formare sulla superficie di membrana uno strato di materiale colloidale come riportato nella figura 6.17.

Le molecole organiche formano in questo caso un deposito sulla membrana, detto comunemente membrana dinamica (in giallo nella figura). Anche in questo caso valgono le considerazioni fatte per lo strato limite, con la differenza che la diffusione interessa una sostanza organica che ha generalmente una concentrazione in cui gelifica. La sostanza diviene insolubile (proprietà di molte proteine all'aumento della concentrazione), quindi si forma sulla superficie della membrana vera e propria uno strato semisolido che si oppone al passaggio del solvente, nella direzione di flusso convettivo.

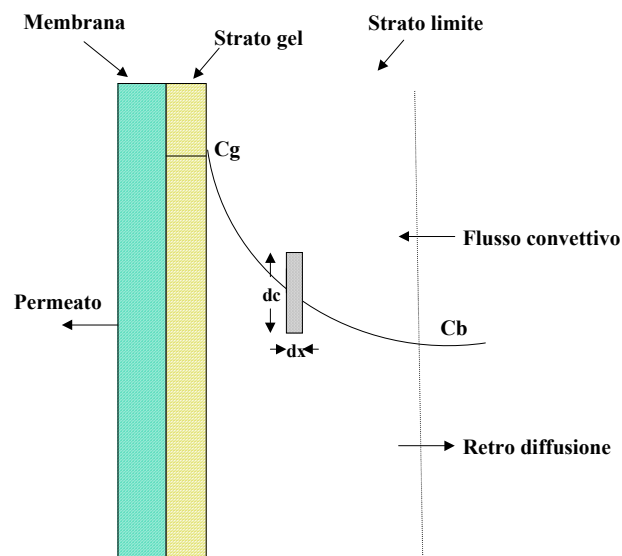


Figura 6.17
Modello di polarizzazione per deposito di gel

Se consideriamo un volume unitario di soluzione nello strato limite, caratterizzato da due grandezze, concentrazione (verticale) e spessore del volumetto (orizzontale), si possono applicare le seguenti espressioni che esprimono rispettivamente il flusso convettivo e quello diffusivo, con direzioni opposte di flusso.

Il flusso convettivo è dato dall'espressione:

$$J_s = J C_b \quad 6.5$$

Dove J_s è il flusso di soluto

J è il flusso di solvente (volume/tempo)

C_b è la concentrazione del soluto nel bulk della soluzione.

La velocità di retrodiffusione del soluto è data dalla legge di Fick

$$J_s = \frac{dc}{dx} D \quad 6.6$$

Dove D è il coefficiente di diffusione del soluto, es. proteina.

dc/dx è il gradiente di concentrazione nello strato limite, considerato lineare in tutto l'intervallo C_b, C_g . Allo stato stazionario, quando il flusso di solvente è uguale a zero, i due flussi di soluto (convettivo e diffusivo) si equivalgono, quindi si possono integrare su tutto lo spessore dello strato limite, da cui si ottiene l'espressione:

$$J = \frac{D}{g} \ln \frac{C_g}{C_b} = k \ln \frac{C_g}{C_b} \quad 6.7$$

Dove k è il coefficiente di trasferimento di massa ed ha le stesse dimensioni del flusso, e g è lo spessore dello strato limite che determina il gradiente di concentrazione ($C_b - C_g$).

In questa espressione non compaiono termini legati alla pressione, che quindi non ha influenza sul flusso di permeato.

I valori di C_b e di C_g dipendono unicamente dalla natura della soluzione da filtrare, quindi dalla chimico-fisica dei soluti contenuti nella soluzione da filtrare (es. latte).

Nell'espressione (6.7) il flusso di permeato dipende soltanto da k , che a sua volta dipende da D (che è una grandezza definita in base alla natura chimica del soluto), e dallo spessore dello strato limite g .

In questo modello si vede che l'unico modo per aumentare il flusso di permeato consiste nel ridurre lo spessore dello strato limite, quindi aumentare la velocità di scorrimento del fluido sulla superficie di membrana. L'espressione (6.7) indica anche che in condizioni particolari, cioè quando la concentrazione di C_b coincide con C_g (cioè si realizza ad alti fattori di concentrazione volumetrici), il rapporto di C_g/C_b è 1, il logaritmo naturale è zero, quindi non si ottiene nessun flusso di permeato attraverso la membrana. Si tratta di una condizione limite particolarmente sfavorevole dal punto di vista del processo, perché significa che la membrana è completamente intasata e quindi la produttività è zero (flusso di permeato $J=0$).

Nella tabella 6.5 si riportano alcuni valori di C_g relativi a proteine di interesse biomedico e industriale.

Sostanza	Cg* (%)
Latte scremato	22 proteine
Siero di latte acido	30 proteine
Siero di latte dolce	25 proteine
Soia estratto acquoso	10 proteine
Gelatina	20-30 proteine'
Albumina serica umana	30
Eritrociti di suino	45 proteine
Plasma umano	28-60 proteine
Bianco d'uovo	40 proteine

*(concentrazione di gelificazione)

Tabella 6.5
Concentrazione di gelificazione di alcuni matrici naturali

Nella tabella 6.6 si riportano i valori del coefficiente di diffusione di alcune proteine campione.

È da notare che i valori di D riportati in tabella sono quelli classici, ottenuti misurando la diffusione delle molecole considerate in condizioni stazionarie, cioè diluizione elevata, presenza di una sola specie chimica, assenza di passaggio di fase e/o di forze convettive.

Le condizioni di diffusione sono molto diverse nel sistema complesso costituito dalle condizioni chimico-fisiche di filtrazione tangenziale. In altri termini, nell'espressione 6.6 dovremmo avere un valore di D reale, eventualmente corretto per rispettare meglio le condizioni di processo.

Alimento	Peso molecolare	Temperatura (°C)	Diffusività x 10 ⁻⁷ (cm ² /s)
Albumina umana (HSA)	69.000	20	6,43
α-Lattalbumina	16.000	25	7,4
β-Lattoglobulina	18.000	25	6,4
BSA	66.500	20	6,3
Caseina	24.000	25	1,9
Immunoglobulina G (umana)	153.000	20	4,11
Insulina	5.800	20	11,68
Ovoalbumina	43.500	25	7,6

Tabella 6.6
Coefficienti di diffusione di alcune proteine campione

Il modello del gel, indica che sicuramente un parametro che può migliorare la produttività della membrana è costituito dalla velocità di scorrimento del fluido sulla superficie della membrana stessa, poiché in tal modo si aumenta il valore della costante k .

Impiegando i dati di processo illustrati nel successivo capitolo 7 è stato possibile per il processo di UF verificare la validità del modello ipotizzato.

Utilizzando il valore del k_{bl} ricavato nel successivo paragrafo si ottiene per lo spessore dello strato limite un valore di 8,98 micron coerente con i dati di letteratura.

6.5 Idrodinamica dei sistemi a membrana

Da quanto enunciato si comprende l'importanza delle condizioni idrodinamiche per il buon funzionamento del sistema membrana.

La turbolenza del fluido sulla superficie di membrana viene calcolata con la espressione del numero di Reynolds (Re), che indica il livello di turbolenza idraulica, opportunamente adattata al sistema di filtrazione tangenziale.

per flussi laminari $Re < 1800$

per flussi turbolenti-laminari $Re = 2000-10000$

per flussi turbolenti > 10000

$$Re = \frac{d_h v \rho}{\eta} \quad 6,8$$

dove

ρ densità g/cm^3

η viscosità in poise (per l'acqua $1 \text{ cp} = 10^{-2}$ poise)

v velocità fluido cm/s

d_h diametro idraulico in cm .

Il diametro idraulico coincide con quello geometrico in membrane a sezione circolare (geometria tubolare e a fibre cave), in particolare con quello interno delle membrane. Nel caso di membrane piane il diametro idraulico è dato dalla superficie di passaggio del fluido rappresentato da un rettangolo di altezza b e di larghezza a . Per le membrane spiralate, in cui la sezione idraulica è assimilabile allo spessore dello spaziatore per la lunghezza del medesimo, si osserva una sproporzione numerica tra a e b . Ad esempio $a = 6m$; $b = 1 \text{ mm}$. In questi casi, il diametro idraulico è assimilabile al valore $2b$, cioè il doppio dello spessore dello spaziatore.

Un altro fattore che influenza sensibilmente la turbolenza idraulica è costituito dal sistema spaziatore. Come riportato nella figura 6.17, la membrana spiralata è costituita dalla sovrapposizione di almeno 5 strati di membrane, fra cui una rete a maglie larghe detta spaziatore. Dello spessore e lunghezza dello spaziatore si è già detto a proposito del diametro idraulico, ma è da osservare che la forma e le dimensioni delle maglie della rete contribuiscono ulteriormente ad incrementare la turbolenza del mezzo. Nello scorrimento del fluido da filtrare (alimento) fra le maglie dello spaziatore di membrane spiralate, si genera turbolenza idraulica che influenza lo spessore dello strato limite e quindi anche la produttività del modulo.

Anche la polarizzazione per concentrazione e la formazione del deposito sulle membrane possono ridurre la produttività.

L'effetto della polarizzazione per concentrazione sulla performance dei processi per il trattamento del siero è assai elevato per la presenza di sali minerali; ciò spiega perché il trasporto di materia è controllato esclusivamente dallo stadio di diffusione attraverso lo strato limite in prossimità della superficie della membrana.

Si è così studiato l'effetto dello strato limite sulla diffusione per progettare sistemi in grado di minimizzare il fenomeno della polarizzazione per concentrazione.

Per moduli a membrane piane il coefficiente di trasporto di materia nello strato liquido limite (k_{bl}) è direttamente proporzionale al valore della velocità della massa liquida (u), cioè al numero di Reynolds.

In presenza di flusso laminare, in sistemi a fibra cava e nelle sezioni libere dei sistemi a membrane piane, la correlazione di Leveque ci fornisce valori realistici per il k_{bl} (Vane 1999):

$$k_{bl} = 1.6 \frac{D}{d_h} Re^{1/3} Sc^{1/3} \left(\frac{d_h}{L} \right)^{1/3} = 1.6 \left(\frac{uD^2}{d_h L} \right)^{1/3} \quad 6.9$$

con Reynolds e Schmidt definiti come

$$Re = \frac{u \rho d_h}{\eta}, \quad Sc = \frac{\eta}{\rho D}, \quad 6.10$$

dove D =coefficiente di diffusività ; ρ =densità ; μ =viscosità sono proprietà fisiche del fluido, u è la velocità di scorrimento superficiale del fluido nel canale di alimentazione; d_h ed L sono rispettivamente: il diametro idraulico e la lunghezza del modulo.

Attraverso la scelta delle caratteristiche costruttive delle membrane (in particolare del tipo di spaziatore per le membrane a spirale avvolta) si può predeterminare la condizione di turbolenza ottimale, in grado di fornire un sensibile aumento del k_{bl} .

Come abbiamo già visto spaziatori di flusso vengono aggiunti come generatori di turbolenza per incrementare il coefficiente di trasporto di materia: in sistemi con tali spaziatori k_{bl} diventa ancor più dipendente da u rispetto alle configurazioni a sezione libera:

$$k_{bl} \cong 0.5 \frac{D}{d_h} Re^{0.4} Sc^{1/3} = 0.5 \frac{D}{d_h} \left(\frac{d_h u \rho}{\eta} \right)^{0.4} \left(\frac{\eta}{D \rho} \right)^{1/3}, \quad 6.11$$

dove d_h è lo spessore dello spaziatore e u è la velocità media in caso di spaziatore sostituito da una sezione libera di passaggio di spessore d_h .

Nella tabella 6.7 sono riportati i parametri operativi per diversi tipi di moduli a membrana di uso comune e per questi sono calcolati i rispettivi k_{bl}

Tipo di modulo	Equazione	Diametro idraulico (cm)	Velocità u (cm/s)	Coefficiente di trasporto di materia k (cm/s)
Piane: sezione libera, 20 sezioni di passaggio in parallelo da 1/16 in., 8 in. Di larghezza, 30 in di lunghezza	6,9	0,159	1,95	$3,8 * 10^{-4}$
Fibre cave: flusso laminare, 10000 fibre, 250 micron ID, 30 in. lunghezza	6,9	0,025	25,7	$1,7 * 10^{-3}$
Spirali avvolte: spessore dello spaziatore 1 mm, 30 in.	6,11	0,1	16,7	$3,6 * 10^{-3}$
Assenza di strato liquido limite: resistenza di membrana per membrane a silicone da 127 micron	$k_m = P^M/T$	-	-	Stima $2 * 10^{-2}$

Tabella 6.7
Parametri operativi di diversi moduli a membrana

Si noti come i sistemi a sezione libera tendono ad avere il più basso valore di k_{bl} mentre i sistemi a spirale avvolta possono essere più facilmente progettati e modificati per avere un valore maggiore del k_{bl} che più si avvicini al k_M (coefficiente di trasporto della materia in condizioni ideali).

Temperature più alte incrementerebbero di poco i coefficienti di trasporto di materia; in ogni caso bisogna agire sulla velocità del liquido per variare il k_{bl} .

Dalle nostre esperienze di laboratorio, trattando il siero di latte con un sistema a spirali avvolte con spaziatori di flusso e prendendo come coefficiente di diffusione un valore medio pari a $6,4 * 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, abbiamo ottenuto:

$$k_{bl}=7,13 * 10^{-4} \quad \text{e} \quad Re=293,3$$

Se avessimo trattato la stessa alimentazione con un sistema a membrane piane in assenza di spaziatori di flusso avremmo ottenuto invece

$$k_{bl}=5,90 * 10^{-5} \quad \text{e} \quad Re=212,4$$

Il passaggio dalla configurazione a membrane piane senza spaziatori a quella a membrane a spirali avvolte con spaziatori ha permesso di incrementare il coefficiente di trasporto di materia di circa 12 volte.

In figura 6.18 è schematizzata la sovrapposizione di 4 film diversi che vengono arrotolati intorno ad un tubo centrale, su cui sono saldati i tre fogli principali (membrana, spaziatore a rete, collettore del permeato). Il quarto foglio avvolge esternamente il modulo cilindrico.

Partendo dalla rete spaziatore, su cui viene inviata la soluzione da filtrare (alimento), si possono vedere i tre diversi strati sovrapposti. Sotto la rete si colloca la membrana selettiva vera e propria, che lascia passare una corrente di permeato, raccolta da una membrana impermeabile che convoglia il flusso nell'asse centrale del modulo, vedi frecce di flusso nella figura 6.18.

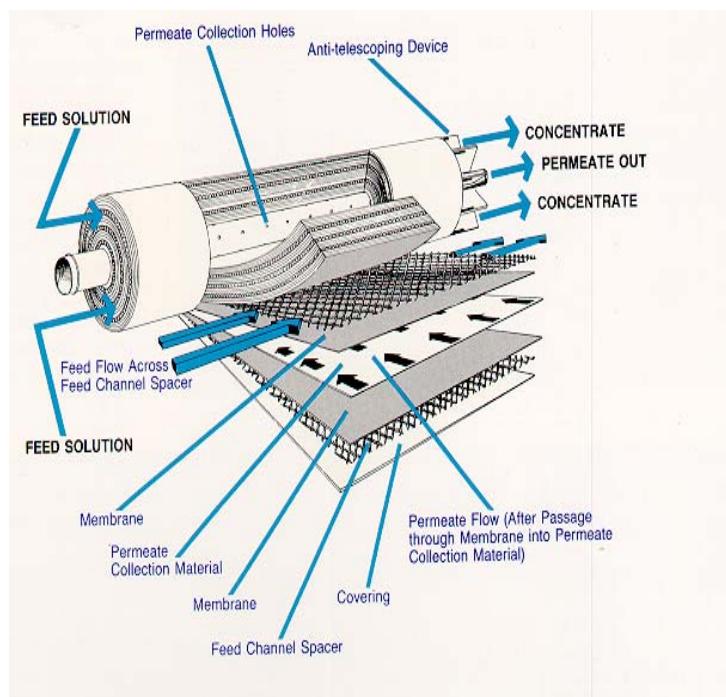


Figura 6.18
Schema della struttura interna di una membrana Osmonics
a spirale avvolta (da Osmonics)

La soluzione da filtrare (alimento) viene spinta sulla testa del modulo in cui incontra la rete di spaziatura su cui è forzata a scorrere longitudinalmente, essendo saldati gli altri due fogli di membrana (una attiva e l'altra impermeabile al permeato).

L'alimento attraversa l'intera lunghezza del modulo, per raccogliersi sul lato opposto come corrente di concentrato. Il permeato viene invece raccolto nell'asse del modulo, che infatti presenta una via di entrata e due vie di uscita (permeato e concentrato).

Questo sistema apparentemente complicato è molto efficace perché consente di raggiungere grandi superfici filtranti in piccoli volumi d'ingombro. Le membrane a spirale avvolta sono largamente impiegate nell'industria, come moduli di MF, UF, NF ed OI. Per correttezza è necessario anche precisare che i fogli di membrana che compongono mediamente un modulo spiralato sono almeno 6, e che la procedura di avvolgimento e produzione industriali presenta ancora oggi carattere di artigianale.

6.6 Consumo energetico

Il consumo energetico dei processi a membrana dipende dalla pressione di esercizio, quindi varia sensibilmente passando dal processo di MF a quello di OI.

La pressione di esercizio è un parametro fondamentale nei processi di filtrazione tangenziale poiché condiziona la produttività dei moduli a membrana.

L'espressione che lega il consumo energetico con la pressione è la seguente:

$$Eq = 0,027 (1/\omega) PQ/J_m S \quad 6.12$$

dove:

Eq = consumo energetico per m³ di permeato prodotto (kWh/m³);
 ω = efficienza della pompa (0,7);
P = pressione di esercizio (bar);
Q = portata di ricircolo del processo di UF (m³/h);
J_m = flusso di permeato medio; = J_f + 0,33 (J_i-J_f) (m³/m².h);
J_f = flusso finale di permeato;
J_i = flusso iniziale di permeato;
S = superficie di membrana (m²).

Nell'UF del siero, impiegando membrane a spirale avvolta, si ottengono dei consumi energetici che dipendono dal *range* 3-5 bar, con cui si opera normalmente. In NF di solito la pressione di esercizio è di 15 bar, mentre in OI la pressione è sempre superiore a 20 bar. In OI l'intasamento delle membrane è praticamente trascurabile, ciò contribuisce a ridurre il consumo energetico nonostante si operi a pressioni elevate. Nella tabella 6.8 si riportano i consumi energetici relativi ai processi di MF, UF, NF ed OI relativi al trattamento del siero di latte.

Processo	Pressione (bar)	kW/h	Costo (€)/m ³ kW=0,08 €
MF	2-3	1,8	0,144
UF	3-5	2,5	0,200
NF	15	3,5	0,280
OI	30	4,0	0,320

Tabella 6.8
Consumi energetici indicativi e costo dei processi per m³
di permeato prodotto

I valori di consumo energetico sono quelli calcolati sugli impianti pilota della Società Sieroproteine, quindi su quantitativi di siero trattato dell'ordine dei 600 litri. I consumi energetici reali di un processo industriale, ad esempio dimensionato per trattare 50 m³/giorno di siero sono inferiori a quelli riportati in tabella, anche di 1/2. Le condizioni di esercizio del processo, in ogni singola sezione di trattamento, sono estremamente importanti per determinare la produttività delle membrane e conseguentemente il consumo energetico del processo.

6.7 Lavaggi delle membrane

Dopo il loro ciclo di utilizzo le membrane si possono ricondizionare con opportuni lavaggi al fine di ripristinare la loro produttività iniziale.

Per ristabilire il flusso di permeato iniziale, cioè a membrana nuova, si devono utilizzare dei detergenti appositi che eliminino i depositi formatosi, senza danneggiare la struttura meccanica e funzionale.

Il ciclo di lavaggio, tuttavia per quanto condotto con modalità messe a punto, consente solo in rari casi il ripristino integrale della sua produttività.

Il lavaggio delle membrane costituisce uno step importante nel mantenimento e nella selettività del processo di filtrazione tangenziale.

La scelta delle procedure di lavaggio dipende dalla configurazione dei moduli, dalla resistenza chimica e fisica della membrana e dalla natura del *fouling*.

Le procedure standard di lavaggio prevedono una serie di cicli di lavaggio alcalini/acidi a seconda dell'alimento trattato e del materiale della membrana.

In generale, per ottimizzare l'efficienza dello stadio di lavaggio (minimizzare il consumo di acqua e di reattivi) il processo può essere diviso in due step principali: il risciacquo con acqua ed il lavaggio chimico vero e proprio (il risciacquo con acqua viene eseguito subito dopo la fine del ciclo operativo). Lo scopo di questo stadio iniziale è duplice: recuperare l'alimento contenuto nei tubi dell'impianto e rimuovere il grosso del deposito sulla superficie della membrana per facilitare i successivi di lavaggi chimici.

La fase di lavaggio con acqua si effettua con un singolo passaggio a perdere (senza ricircolo). L'effetto pulente del risciacquo è dovuto all'azione meccanica e al potere solvente dell'acqua. Così il risciacquo è considerato uno stadio necessario per ridurre il consumo dei reagenti ed assicurare il ripristino del flusso di permeato.

L'importanza del risciacquo con acqua diviene evidente se si pensa che fino al 98% degli strati depositati possono essere rimossi durante questa fase, in funzione della velocità tangenziale del flusso d'acqua. Un parametro importante per l'efficienza del risciacquo è la qualità dell'acqua usata. In particolare devono essere controllate la durezza e l'indice di *fouling*. In genere il valore massimo di durezza dell'acqua di lavaggio dovrebbe essere intorno a 3,5 mmoli (350 ppm CaCO_3) e l'indice di *fouling* minore di 3, valori superiori possono causare problemi.

Dopo il risciacquo con acqua le procedure di lavaggio prevedono il trattamento chimico e/o con tensioattivi (scelti in relazione al materiale di costruzione della membrana), seguiti da un'altra fase di lavaggio con acqua ed eventualmente un trattamento con liquido di mantenimento sanitario (es. bisolfito di sodio). Il trattamento con soluzioni acide e basiche o con tensioattivi avviene in condizioni di ricircolo totale del retentato.

Nella figura 6.19 si riporta l'andamento del flusso di permeato in un ciclo di lavoro di una membrana spiralata impiegata nell'UF del siero di latte.

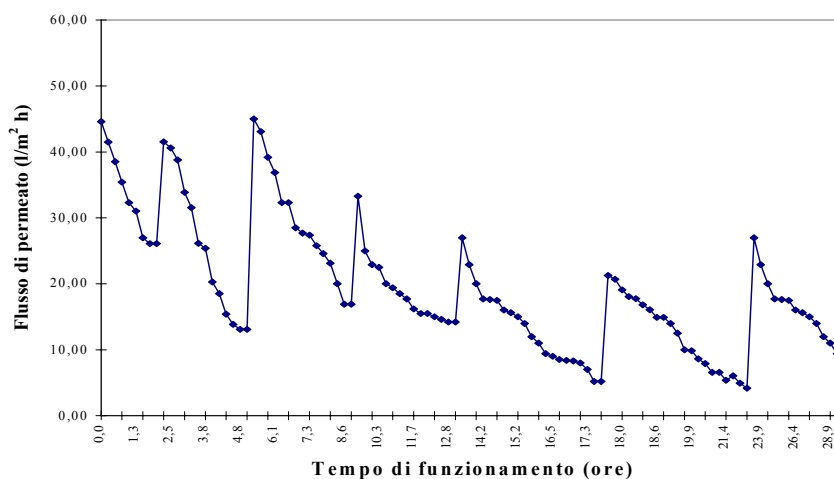


Figura 6.19
Cicli operativi del modulo con lavaggi delle membrane

Si osserva che il lavaggio completo ripristina in buona sostanza le caratteristiche di permeabilità del modulo, che tuttavia non riacquista mai la produttività della membrana nuova.

Nelle procedure di lavaggio delle membrane è importante sottolineare i seguenti punti:

- il risciacquo con acqua, anche nelle migliori condizioni, non è in grado di pulire la membrana in modo soddisfacente, ma può ripristinare la maggior parte della capacità originaria della membrana;
- l'efficienza più elevata si ottiene quando il lavaggio viene effettuato senza il ricircolo del ritentato;
- l'aumento di temperatura ha un'influenza positiva sulla velocità di rimozione dello strato di deposito. La massima riduzione della resistenza di membrana rispetto a temperatura ambiente si ha a 50 °C;
- la variabile più importante che influenza l'efficienza di lavaggio è la pressione di transmembrana;
- l'efficienza di lavaggio tra i 2 ed i 6 m/s è indipendente dalla velocità di flusso, quindi in termini di economicità del processo è meglio lavare con velocità di flusso tangenziale più basse;
- soda e acido nitrico sono soluzioni chimiche di lavaggio che possono essere impiegate anche a caldo, con ricircolo delle soluzioni, senza però superare la temperatura di danneggiamento della membrana (60-90 °C, dipende dalla natura del polimero);
- alla fine delle operazioni di *cleaning* e ricondizionamento le membrane devono essere mantenute sotto liquido batteriostatico, come sodioazide, metabisolfito, aldeide formica ecc.

6.8 Principali applicazione dei processi a membrana

Le tecnologie di membrana hanno avuto negli ultimi 10 anni un vertiginoso incremento applicativo nei settori industriali più disparati che vanno dal biomedico (dialisi renale) all'industria agro-alimentare, al trattamento delle acque alla produzione di acqua potabile, alle applicazioni nell'industria metalmeccanica alla produzione di acqua potabile da quella marina.

La tabella 6.9 riassume le principali applicazioni sulle quali è stata già dimostrata la fattibilità tecnica e il tornaconto economico; le applicazioni dell'OI sono estremamente più diffuse, anche in settori particolari, come il farmaceutico, dove vengono impegnate unità di scala medio piccola.

Nella dissalazione e nella potabilizzazione, invece, le taglie impiantistiche sono molto alte (migliaia di m² di membrane applicate). I limiti applicativi della tecnica dipendono soprattutto dai costi di processo e di investimento.

Settore Produttivo	Tipo di applicazione	Tecnica
Latte	Concentrazione di latte intero e scremato	UF, OI
	Frazionamento del latte e del siero	UF, NF, OI
	Separazione di batteri	MF
	Rimozione di caseine, grassi e lattosio	MF, UF, NF
	Idrolisi del lattosio	MR
Succhi di frutta	Chiarifica di succhi di mela e agrumi	MF, UF
	Deacidificazione	UF
	Concentrazione	OI
	Sterilizzazione prima dell'imbottigliamento	MF, UF
	Recupero di pectine nel ciclo di canditura	UF, OI
Vino	Recupero del succo o del vino da residui (fecce)	MF
	Sterilizzazione del mosto prima della fermentazione	MF
	Dealcolizzazione del vino	OI
	Chiarifica dell'aceto	MF, UF
Zucchero	Trattamento del melasso (colore ed esosi)	OI
	Concentrazione del succo di canna	OI
	Desalinizzazione del melasso	OI, ED
Proteine	Concentrazione dell'albume d'uovo	UF
	Concentrazione di proteine della soia e delle emulsioni	UF
	Rimozione degli odori dal latte di soia	UF, OI
	Purificazione delle proteine dalla soia	UF
	Concentrazione di gelatine	UF
	Recupero di acqua da waste di processi alimentari	UF, OI
Caffè, tè	Estrazione, concentrazione, decaffeinizzazione	OI
Pomodoro	Concentrazione di succhi e passate	MF + OI
	Trattamento acque di lavaggio del pomodoro	UF+OI

Tabella 6.9
Principali applicazioni delle Tecnologie a membrana
nel settore agro-alimentare

In letteratura sono riportati esempi di applicazioni specifiche, fra cui quelle nell'industria conciaria (M. Pizzichini 1996; M. Pizzichini 1997), nell'industria tessile (M. Pizzichini 1995; M. Pizzichini 1996; G. Ciardelli 2000), in campo alimentare (M. Pizzichini 1995; V. Mavrov 2000), nella depurazione degli effluenti (M. Pizzichini 1998), nell'industria della carta (M. Pizzichini 2005) e nella dissalazione dell'acqua di mare (M. Pizzichini 2002).

6.9 Bibliografia

- Anderson, A.-M. a. G. K. (1997). "Use of crossflow microfiltration in Wastewater treatment." Wat. Res. **31**(12): 3064-3072.
- Bhave, R., R., Ph. D (1996). Inorganic Membrane Syntesis, Characteristics and Applications. NY, London, Chapman and Hall.
- Bird, R. B., Stewart, W.E., and Lightfoot, E.N. (1960). Transport Phenomena. NY, Jophon Wiley.
- Blatt, W. F., David, A., Michaels A.S. and Nelson L., J.E. Flynn (1970). In Membrane Science and Technology. NY, Plenum Press.
- Cheryan (1986). Ultrafiltration Handbook, Technomic Publishing Comp. Inc.
- G. Ciardelli, L. C., M. Marcucci (2000). Membrane separation for wastewater reuse in the textile industry; Resources, Conservation and Recycling
- Hwang, S. T., Kammermeyer, K. (1975). Membranes in Separation. New York, John Wiley and Sons.
- Larbot, A., Juble, A., Guizard, C., and Cot, L. (1989). "Silica Membranes by Sol_gel Process." J. of Membrane Science **44**: 289-303.
- M. Pizzichini (1995). Membrane application in food industry, A. Caetano Edit.
- M. Pizzichini, A., Iasonna, M., Rosi, F. Ruscio (1997). "Innovazione tecnologica nell'industria lattiero casearia, Energia Ambiente e Innovazione." **1**: 43-57.
- M. Pizzichini, C., Russo (2002). "Confronto fra le tecnologie dissalative dell'acqua di mare (ENEA)." Acqua & Aria **4**: 77-83.
- M. Pizzichini, C. F., M. Spadoni, G. Zeddita (1995). "Treatment of waste from silk degumming processes for protein recovery and water reuse." Desalination **105**: 1.-9.
- M. Pizzichini, C. F., M. Spadoni, M. Zeddita, F. Ruscio (1996). Sericin and water reuse by means of a hybrid membrane process 7th Worl Filtration Congress, Budapest.
- M. Pizzichini, M. S., F. Ruscio, C. Fabiani (1996). "Chromium salts recovery process from tannery wastewaters." Desalination **108**: 183-191.
- M. Pizzichini, C. F., R. Montani, M. Rosi, F. Ruscio, M. Spadoni (1997). "Tecnologie per ridurre l'impatto ambientale dell'industria conciaria." Energia Ambiente e Innovazione **5**: 47-64.
- M. Pizzichini, C. R., C.Di Meo (2005). "Purification of pulp and paper wastewater, with membrane technology, for water reuse in a close loop." Desalination **178**: 351-359.

M. Pizzichini, R. M., M. Rosi, F. Ruscio, M. Spadoni, A. Senatore (1998). “Le tecnologie di membrana nel trattamento finale delle acque di depurazione” “Energia Ambiente e Innovazione” **2**: 48-62.

Mulder, M. (1991). Basic Principles of Membrane Technology, Kluwer Academic Publishers. **chap. 1 , 2.**

V. Mavrov, E. B. (2000). “Reduction of water consumption and wastewater quantities in the food industry by water recycling using membrane processes” Desalination **131** 75-86.

Vane, A., Giroux (1999). “Reduction of concentration polarization in pervaporation using vibrating membrane module.” Journal of Membrane Science **153**: 233-241.

CAPITOLO 7

PROCESSI DI TRATTAMENTO DEL SIERO DI LATTE



Impianti pilota a membrana per il frazionamento del siero di latte

Indice dei paragrafi

7.1 Processi tradizionali di trattamento del siero	153
7.2 Le tecnologie di membrana nel frazionamento del siero	155
7.2.1 La microfiltrazione del latte	163
7.2.2 La microfiltrazione del siero di latte	164
7.2.2.1 Siero ovino	164
7.2.2.2 Siero caprino	168
7.2.3 L'ultrafiltrazione del siero: confronto fra prove diverse	173
7.2.4 Nanofiltrazione del siero: confronto fra prove diverse	178
7.2.5 Processo di osmosi inversa	181
7.2.6 Ottimizzazione dei parametri di processo	185
7.3 Bibliografia	187

In Italia gli impianti di trattamento del siero di tipo tradizionale, che dovrebbero risolvere il problema dello smaltimento ambientale, sono molto pochi.

Il presente lavoro si propone di indicare, dal punto di vista tecnico, quali sono le tecnologie utilizzate nella pratica casearia.

Il siero di latte è un effluente difficile da bonificare biologicamente per ridurre il suo carico inquinante, poiché la presenza del lattosio inibisce i processi di depurazione biologici a fanghi attivi. Infatti, la flora batterica, comunemente presente nei depuratori biologici tradizionali, è refrattaria all'assimilazione del lattosio. Nelle industrie casearie soltanto i lavaggi delle cisterne e degli impianti possono essere trattati nel depuratore biologico, ma non certo il siero e la scotta di caseificazione.

Dal punto di vista della massimizzazione delle sostanze recuperabili dal siero, le tecnologie di membrana si sono dimostrate le più adatte e garantiscono l'eliminazione definitiva del carico inquinante.

Il siero di latte rientrava nella più generale categoria dei “*mercuriali*”, in quanto compreso nell'allegato 1 al DM 5 settembre 1994 emanato dal Ministero dell'Ambiente. Come tale era un “non rifiuto”. Successivamente, in virtù dell'articolo 57, comma 5, DLgs 22/1997 (“decreto Ronchi”), come modificato dall'articolo 49, comma 2, legge 23 dicembre 1998, n. 448, tale regime di favore è cessato a decorrere dal 1° luglio 1999. Da quella data, pertanto, tutte le attività inerenti i materiali compresi nell'elenco dei cd. “*mercuriali*” (allegato 1 al DM 5 settembre 1994) si sono dovute adeguare alla legislazione sui rifiuti rappresentata dal citato DLgs 22/1997, ivi comprese quelle relative al siero di latte. Tale materiale, infatti, dal 1° luglio 1999, è considerato rifiuto a tutti gli effetti.

Per meglio comprendere il significato e l'efficacia dei processi di trattamento è necessario approfondire la chimica e la microbiologia della matrice siero.

7.1 Processi tradizionali di trattamento del siero

I processi di trattamento del siero grezzo di caseificazione impiegano tecnologie di precipitazione e complessazione, metodi chimico-fisici e processi a membrana.

I processi di precipitazione si basano sulla formazione di complessi di sole proteine nel caso di una forte acidificazione, oppure di complessi formati dalla complessazione delle sieroproteine con polielettroliti: sali di ferro, polialluminati, tannini, carbossimetilcellulosa, chiosano ecc.

Con la complessazione è possibile recuperare SP non denaturate, ma l'inconveniente principale consiste nella contaminazione del prodotto con metalli pesanti.

Le tecniche di concentrazione termica del siero, seguita dallo stadio di essiccamento, sono quelle più impiegate a livello industriale. Il processo consiste nel portare a secco il siero tal quale, al fine di ottenere una polvere che trova normalmente un impiego nel settore zootecnico. Questo processo si realizza con tecniche di evaporazione sotto vuoto, seguite da uno stadio di essiccamento con spray dryer (Nielsen).

Si tratta di un processo obsoleto, che impiega tecnologie tradizionali e che genera un prodotto di basso valore commerciale, poiché la polvere è ricca di lattosio e povera di SP.

In questo trattamento, molto spesso si superano le temperature di denaturazione delle SP, sia in fase di evaporazione che di atomizzazione, con il risultato di dequalificare la polvere finale.

Inoltre, questo processo non risolve completamente il problema ambientale, poiché l'evaporato del siero, successivamente condensato, ha un COD dell'ordine di 1.000-2.000 ppm di O₂. Quindi, se si volessero rispettare le normative ambientali, tali distillati dovrebbero essere ulteriormente depurati, aumentando ancor di più i costi di trattamento.

Sono impiegate anche tecniche di adsorbimento selettivo delle SP con resine a scambio ionico, che tuttavia sono complicate dalla necessità di rimuovere le SP dal supporto; ciò comporta anche una diluizione del prodotto, il quale successivamente dovrà comunque essere essiccato.

I processi di gel filtrazione si basano sulla separazione delle SP rispetto ai soluti a basso peso molecolare come il lattosio e i sali. Le resine di adsorbimento sono costituite generalmente da destrani più o meno reticolati che adsorbono le SP per poi rilasciarle con l'impiego di opportune sostanze tampone, addizionate da NaCl a diverse concentrazioni.

Anche questo processo è interessante per separare le SP fra loro, ma non è proponibile direttamente per il trattamento del siero grezzo. Esso presenta dei costi elevati ed è complicato dalla produzione di ingenti quantitativi di effluenti liquidi.

Nel Capitolo 8 sono trattate le tecniche di separazione delle SP, le tecnologie di scambio ionico e di adsorbimento su resine.

Un altro metodo per separare la SP dal siero di latte consiste nella precipitazione selettiva in funzione del pH e della forza ionica, giocando sul punto isoelettrico delle diverse famiglie sieroproteiche. Ad esempio, con il metodo utilizzato da Parche aggiusta il pH del siero al valore 4,2 e riscalda la soluzione fino a 65 °C in modo da favorire la denaturazione dell' α -lattalbumina, che quindi precipita.

Amundson et al. (Amundson 1982) demineralizzano il siero per elettrodialisi a pH 4,65: ciò porta alla precipitazione della β -lattoglobulina, che quindi si può rimuovere dalla soluzione. Attraverso precipitazioni successive si ottiene una soluzione impoverita di SP ed un precipitato molto diluito in cui rimangono le altre famiglie sieroproteiche.

Elettrodialisi

La tecnica di elettrodialisi è applicata al siero di latte allo scopo di ridurre il contenuto in ceneri del prodotto finito in polvere; certamente da sola questa tecnica non risolve il problema della contaminazione ambientale. È una tecnica che rimuove la maggior parte dei sali minerali, utilizzando membrane a scambio ionico che sono localizzate fra un campo elettrico (Batchelder 1986). Lo schema del processo è rappresentato in figura 7.1.

Il siero, in colore azzurro, fluisce fra due membrane cariche, mentre l'acqua, in colore verde, scorre in appositi comparti fra le membrane. Il campo elettrico a corrente continua permette la migrazione degli ioni, come è indicata nello schema. Dopo il passaggio attraverso il pacco membrane, il siero si impoverisce di sali minerali che si accumulano nella corrente acquosa.

Il processo di elettrodialisi è largamente impiegato dalle industrie che producono polveri di siero ed anche polveri di latte, per la prima infanzia, come le Società Ionics, GEA, APV ecc. Il processo ha un consumo energetico elevato, circa 20-28 kWh/kg di polvere prodotta.

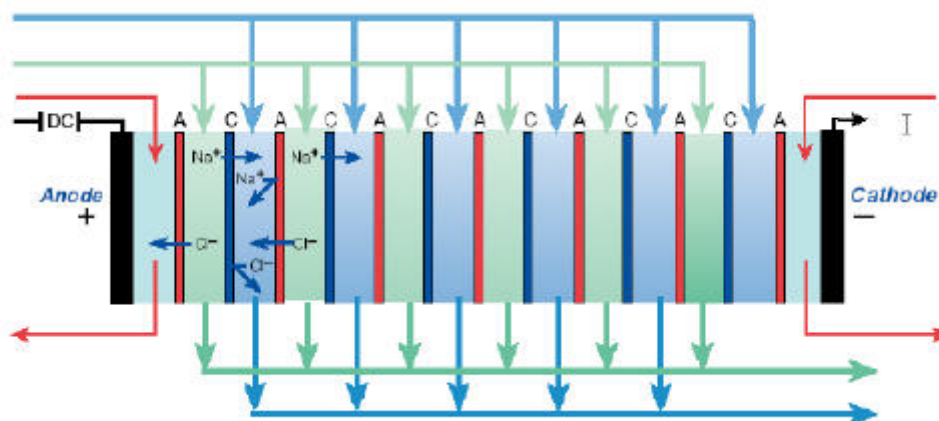


Figura 7.1
Schema del processo di elettrodialisi del siero

Processo anaerobico

Questo processo consiste nella fermentazione del siero in assenza di ossigeno, all'interno di fermentatori speciali denominati UASB (upflow anaerobic sludge blanket). Da questa digestione anaerobica si produce biogas, quindi metano a basso potere calorifico perché diluito con l'anidride carbonica. Nelle condizioni ottimali di processo è possibile produrre circa 23 L di metano da 1 L di siero grezzo (T.H. Erguder 2001).

Questo processo si basa soprattutto sulla trasformazione del lattosio, non delle SP. Si tratta, anche in questo caso, di una tecnologia non certo innovativa, che richiede costi impiantistici e di gestione piuttosto elevati. Mediante l'abbattimento del COD derivante dal processo anaerobico si attesta sul 90%, ma dipende dall'efficienza del fermentatore. A fine ciclo di trattamento, i fanghi residui possono essere impiegati come ammendante agricolo.

Tuttavia, utilizzare il siero per produrre il biogas, cioè un combustibile povero a basso potere calorifico, che comunque si può ottenere anche dalle deiezioni animali o dai residui di lavorazione industriale, non appare la soluzione ottimale per una reale valorizzazione della matrice.

7.2 Le tecnologie di membrana nel frazionamento del siero

Il trattamento del siero incomincia con il recupero delle SP, che hanno diverso peso molecolare, punto isoelettrico e concentrazioni variabili nel siero di latte.

I processi separativi per il recupero delle SP devono necessariamente tener conto delle caratteristiche molecolari, per massimizzarne i rendimenti di processo.

I processi industriali di frazionamento delle proteine del siero rientrano in tre categorie: precipitazioni selettive, processi a membrana e processi di scambio ionico o adsorbimento selettivo e successiva eluizione (Etzel 2004).

Mentre le tecnologie di membrana sono indicate per la concentrazione delle SP e degli altri soluti, quelle di adsorbimento su resine hanno la funzione specifica di separare fra loro le molecole, ma la funzione di concentrazione è meno evidente.

Se si desidera produrre SP purificate, a partire dal siero di latte, le tecniche di trattamento con tecnologie di membrana sono attualmente, oltre che le più diffuse nel mondo, anche le più interessanti dal punto di vista economico e del rispetto dell'ambiente (M. Pizzichini 2001). Il nostro paese risulta molto indietro rispetto al resto del mondo per quanto attiene l'utilizzo di processi di filtrazione tangenziale a membrana, in particolare per il trattamento dei reflui dell'industria lattiero-casearia.

Proprio per questo scopo, in particolare per il siero di latte, sono state sviluppate, a livello mondiale, membrane costruite ad hoc, come quelle di UF e NF, per la cui commercializzazione si registra una battaglia fra i principali produttori come la De Sal, Ionics, la Dow Chemical, la Koch ecc.

L'ENEA ha a lungo studiato e sviluppato un processo industriale di recupero di tutte le componenti del siero, in particolare delle SP, impiegando queste tecnologie separative (M. Pizzichini 1995; M. Pizzichini 1997; M. Pizzichini 2003).

Nel dettaglio la metodica di processamento del siero tramite membrane si articola in:

- una fase di microfiltrazione (MF) per eliminare residui grassi e carica microbica
- una fase di ultrafiltrazione (UF) per raccogliere in modo quantitativo tutte le famiglie sieroproteiche
- una fase di nanofiltrazione (NF) per concentrare il lattosio
- una fase di osmosi inversa (OI) per produrre un'acqua demineralizzata con carico inquinante inferiore ad un COD 150 ppm di O₂.

In figura 7.2 si riporta lo schema del processo di frazionamento del siero mediante tecnologie di membrana.

Questo schema consente di recuperare tutte le componenti chimiche del siero, compresa l'acqua, che se opportunamente valorizzata potrebbe generare un importantissimo ritorno economico.

Il processo prevede, come mostra lo schema, l'utilizzo di diverse tecniche di filtrazione poste in sequenza, che impiegano membrane con dimensione dei pori filtranti sempre più stretti, che vanno dalla MF all'OI.

Il processo di frazionamento del siero con tecnologie di membrana è applicabile vantaggiosamente quando la matrice non ha subito processi di fermentazione, come si può vedere dal pH del siero, i cui valori devono rimanere compresi nell'intervallo 4,5-7. Per garantire questa condizione è necessario utilizzare il siero appena prodotto dal caseificio, raffreddarlo per eventuali trasporti in cisterna, evitando il più possibile i fenomeni di fermentazione batterica che portano alla formazione di acido lattico ed anche all'idrolisi delle stesse SP.

Per applicare efficacemente tale processo il siero grezzo deve essere prima depurato della componente grassa, tramite centrifugazione e successivamente sottoposto a microfiltrazione (MF) su membrane ceramiche, per rimuovere la carica batterica e le frazioni microdisperse di grasso.

Lo schema di figura 7.3 indica il meccanismo di separazione a setaccio, che si realizza nel processo di MF, in cui le particelle di grasso, i batteri ed i soluti del siero sono rappresentati con forme geometriche diverse.

Processo di frazionamento e up grading dei soluti

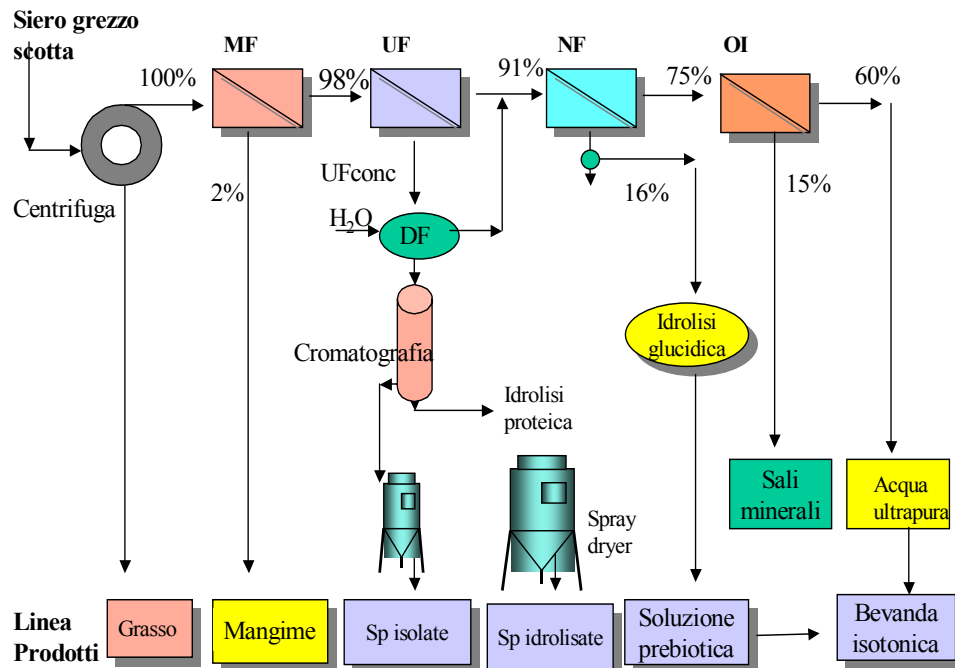


Figura 7.2
Schema complessivo del processo di frazionamento del siero

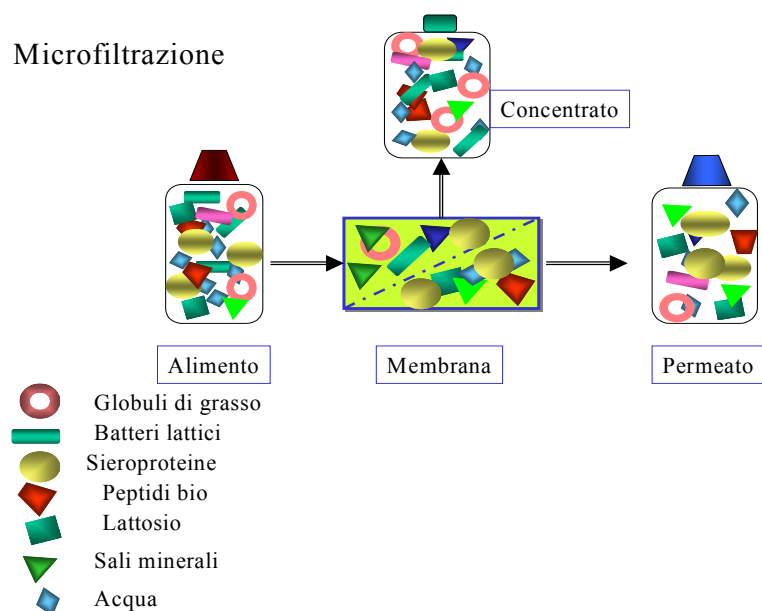


Figura 7.3
Schema grafico di microfiltrazione del siero

Il retentato di MF può essere utilizzato come mangime per animali, mentre il retentato di UF deve contenere la maggior parte delle SP, oltre il 97%, peptidi bioattivi (PB) e una concentrazione di lattosio superiore a quella che si ottiene nel permeato di UF.

Nella tabella 7.1 si riportano i dati sperimentali con impianto pilota ceramico, relativi al trattamento di 520 L di siero bovino.

Le colonne indicano rispettivamente il tempo (minuti), la temperatura, la pressione di ingresso e uscita dal modulo a membrana, la pressione efficace (0,8-1,2 bar) il flusso di permeato, ed il flusso per unità di superficie.

La pompa di alimentazione è stata mantenuta costante ad una portata di 5.000 L/h, mentre quella di ricircolo a 15.000 L/h. Per capire il senso delle due pompe, una di alimentazione vera e propria e l'altra di ricircolazione forzata, si osservi la figura 7.5.

La presenza di materia grassa è la causa principale della diminuzione del flusso di permeato nel tempo.

Una volta privato di grasso e carica batterica, il siero può essere ultrafiltrato, con membrane polimeriche a taglio molecolare compreso fra 30 e 5 kDa, per ottenere un permeato costituito prevalentemente da lattosio a 45-50 g/L, sali minerali e riboflavina.

Lo schema di figura 7.4. indica il meccanismo di separazione delle molecole nel processo di UF.

Tempo	T	P_i	P_u	P_p	P_{trans}	Q perm.	J perm.
(min)	(°C)	(bar)	(bar)	(bar)	(bar)	(L/ora)	(L/m ² ora)
0	32	4,8	2,4	0,8	2,8	225	214,29
2	30	4,8	2,4	0,8	2,8	225	214,29
10	28	4,8	2,4	0,8	2,8	225	214,29
30	25	4,8	2,4	0,8	2,8	190	180,95
40	23	4,8	2,4	0,8	2,8	175	166,67
50	21	4,8	2,4	0,8	2,8	160	152,38
60	19	4,8	2,4	0,8	2,8	140	133,33
70	18	4,8	2,4	0,8	2,8	125	119,05
80	17	4,8	2,4	0,8	2,8	125	119,05
90	19	4,8	2,4	0,8	2,8	135	128,57
110	19	4,8	2,4	0,8	2,8	130	123,81
120	18	4,8	2,4	0,8	2,8	150	142,86
157	17	4,8	2,4	0,8	2,8	175	166,67
159	17	4,8	2,4	0,8	2,8	145	138,10
177	17	4,8	2,4	0,8	2,8	140	133,33
187	17	4,8	2,4	0,8	2,8	130	123,81
210	18	5,8	3,4	1,2	3,4	170	161,90
220	18	5,8	3,4	1,2	3,4	160	152,38
231	20	5,8	3,4	1,2	3,4	165	157,14
232	19	5,8	3,4	1,2	3,4	160	152,38

Tabella 7.1
Microfiltrazione su membrane ceramiche da 1,4 µm
su 520 litri di siero bovino

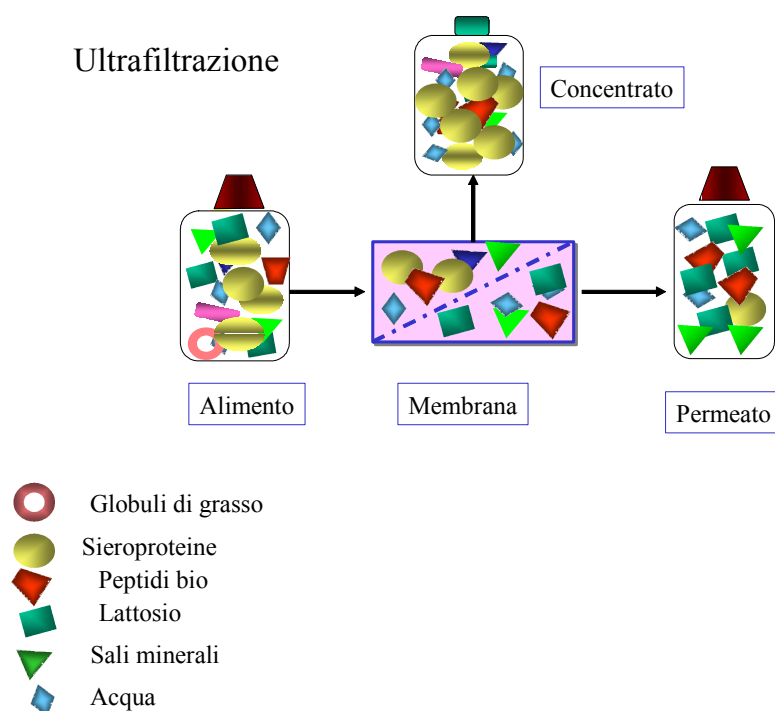


Figura 7.4
Schema della separazione con ultrafiltrazione

Da punto di vista chimico il retentato di UF contiene la quantità totale delle SP, almeno il 97% di quelle presenti nell'alimento, ed anche frazioni di caseinomacropeptidi (CMP) ed eventualmente di altri PB. Nella figura 7.5 si riporta un prospetto tridimensionale di impianto di UF, in cui è possibile vedere tutte le sue componenti costruttive ed il percorso del liquido dal serbatoio ai vessel di filtrazione.

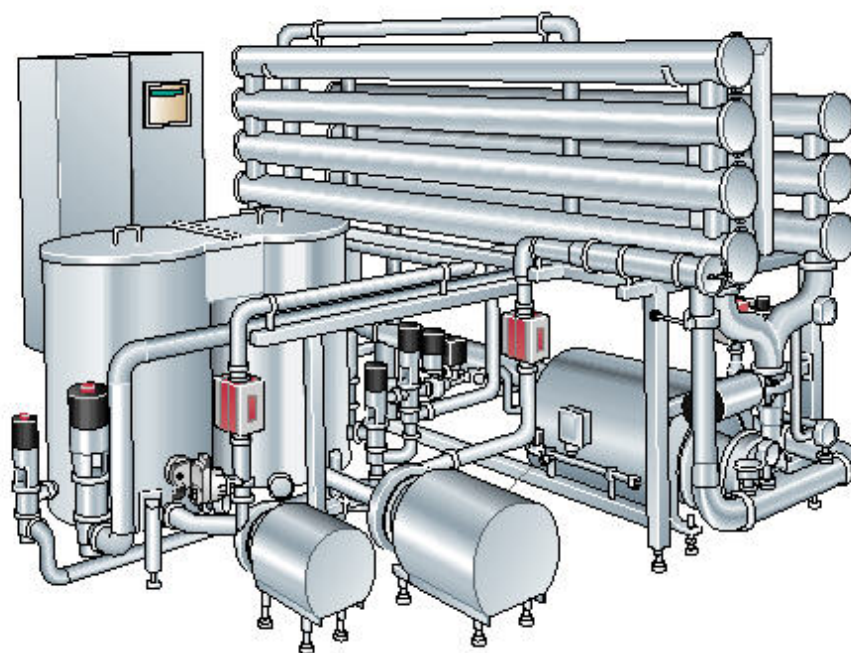


Figura 7.5
Lay out di un generico impianto di microfiltrazione-ultrafiltrazione

Come appare dalla figura 7.5, l'impianto è dotato di tre pompe, una di lavaggio delle membrane, la seconda di alimentazione vera e propria, la terza (più grande) di ricircolazione forzata dell'alimento. Per l'ulteriore fase di arricchimento delle SP, sul retentato di UF è stato messo a punto un processo di diafiltrazione (DF), che consiste nell'aggiungere acqua al retentato di UF. Dopo tale diluizione si riavvia la fase di filtrazione, utilizzando la stessa membrana usata nell'operazione di UF e lo stesso impianto del modello indicato in figura 7.5.

Lo schema della separazione in DF è riportato in figura 7.6.

Con la DF vengono portati via nel permeato il lattosio ed i sali minerali, che passano facilmente la membrana di UF. Questa operazione permette di incrementare il tenore proteico percentuale della polvere, di ridurre il contenuto salino e conseguentemente di aumentare il suo valore commerciale.

Dal concentrato di DF, tramite spray dryer, si ottiene una polvere concentrata di SP; qualora si volessero isolare le singole famiglie sieroproteiche, è possibile effettuare un passaggio di cromatografia a scambio ionico su resina.

Anche i permeati di DF vengono aggiunti al permeato di UF e trattati in NF, dove si concentrano gli zuccheri, cioè il lattosio fino al valore di circa 150-200 g/L.

Nello schema grafico di figura 7.7, mostrato nella pagina a fianco, è rappresentato il meccanismo separativo della nanofiltrazione.

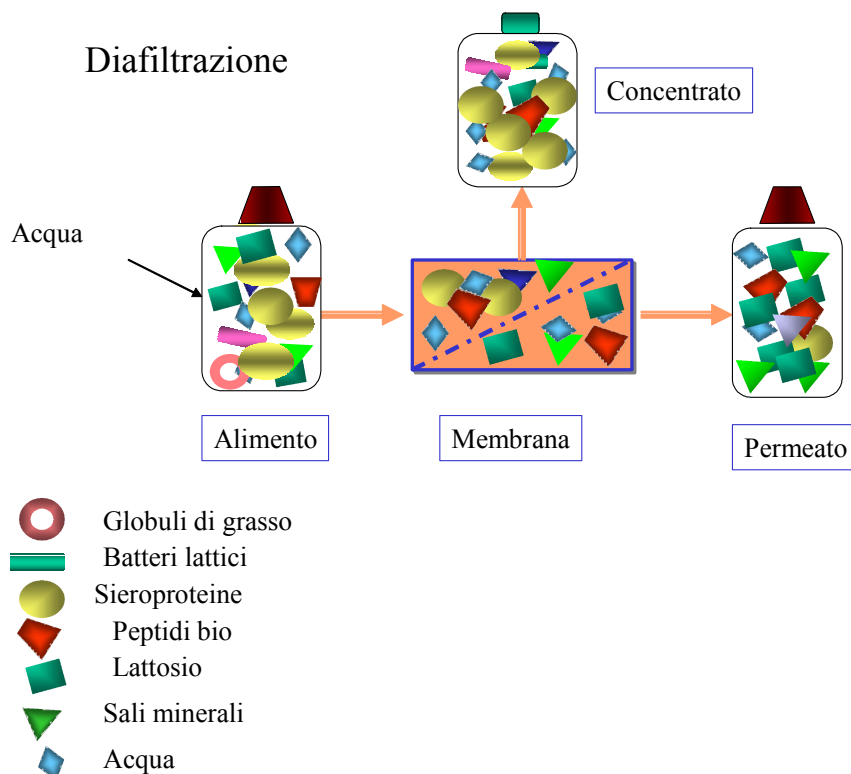


Figura 7.6
Schema della separazione in diafiltrazione

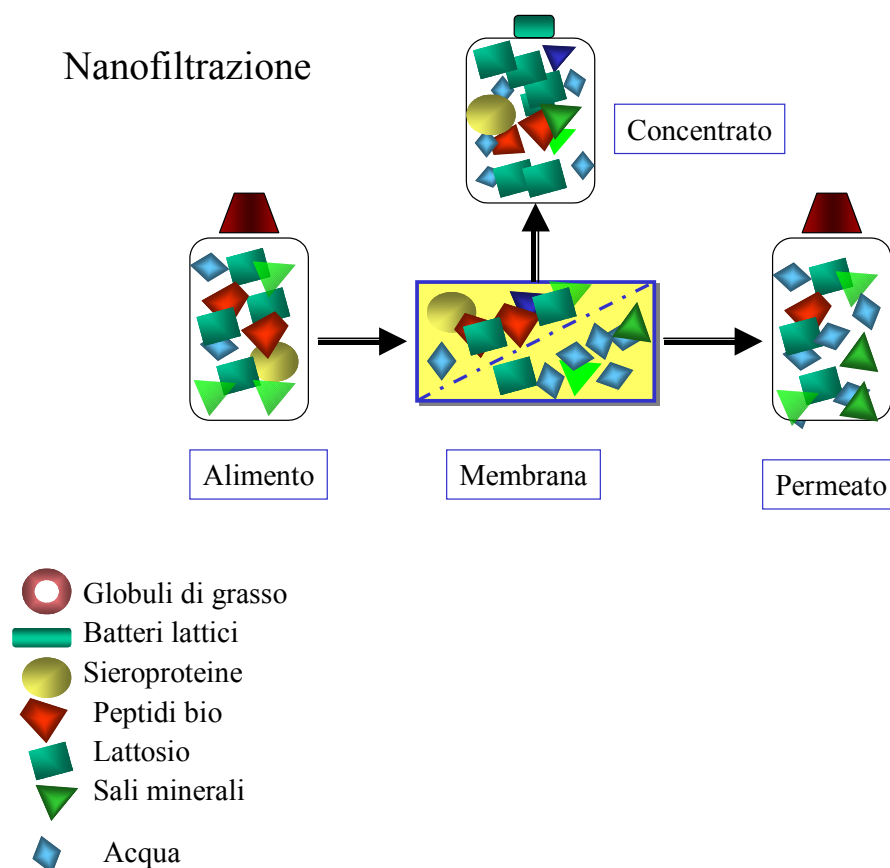


Figura 7.7
Schema grafico della separazione in nanofiltrazione

Come si vede dallo schema di NF, questa tecnica consente di concentrare il lattosio, la riboflavina e tutte le frazioni proteiche a basso peso molecolare che sono sfuggite al processo di UF. Si tratta in particolare di peptidi, alcuni dei quali con particolari proprietà biologiche, come trattato nel capitolo 4.

Il permeato di NF contiene quindi soprattutto sali minerali e tracce di lattosio. Questa corrente viene infine filtrata tramite osmosi inversa, per l'allontanamento della componente ionica, cioè la maggior parte dei sali minerali, e per il recupero di acqua ultrapura, cioè del permeato di OI.

L'OI opera ad una pressione di circa 20-30 bar, quindi richiede una dotazione impiantistica dedicata.

Il permeato di OI è costituito sostanzialmente da acqua quasi distillata che contiene solamente tracce di lattosio e di piccoli frammenti aminoacidici.

In media il COD del permeato di OI si attesta fra 60 e 150 ppm di O₂.

Nella figura 7.8 si riporta uno schema del processo di OI applicato sul permeato di NF.

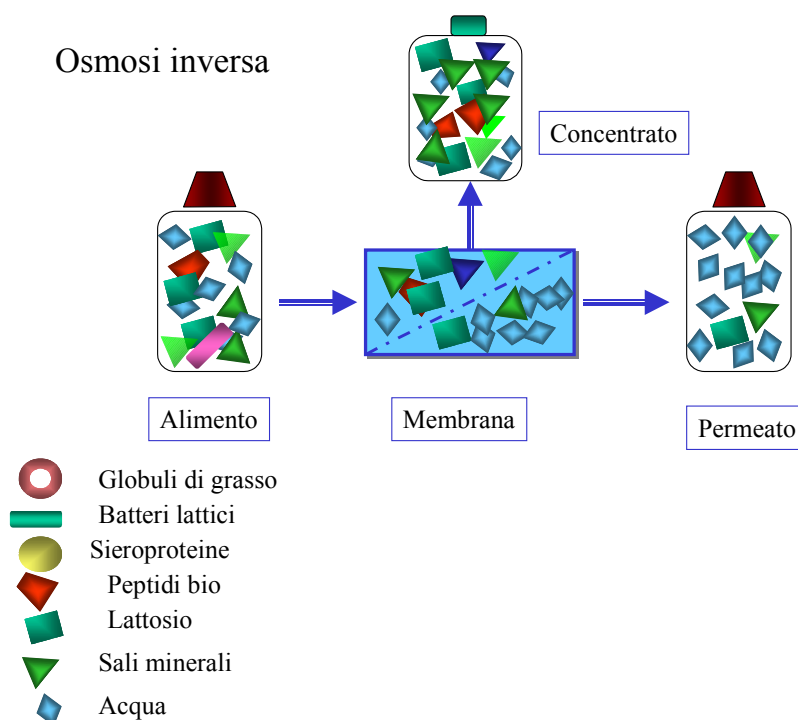


Figura 7.8
Schema della separazione in osmosi inversa

Il concentrato di OI è costituito da una soluzione limpida con un contenuto salino che può raggiungere i 6 g/L. Tale corrente liquida presenta un COD di circa 1.800 ppm di ossigeno, quindi non può essere scaricata nei corpi idrici di superficie (fiumi) come prevede la normativa ambientale MD 125/90.

Nella tabella 7.2 si riportano le concentrazioni di alcuni cationi del siero, nelle diverse frazioni ottenute dal trattamento di NF e OI del siero bovino.

È interessante notare che nel permeato di OI la concentrazione salina del potassio è circa 3 volte superiore a quella del sodio, quindi questo effluente è di particolare interesse per la produzione di bevande, previa aggiunta di altre componenti saline, come calcio e magnesio, ed aromi di varia natura.

Concentrazioni (mg/L)	Permeato NF	Concentrato OI	Permeato OI	Reiezione (%)
Na⁺	378,792	421,30	4,516	98,9
NH₄⁺	68,556	93,317	1,131	98,8
K⁺	1471,634	1418,980	13,369	99
Mg²⁺	47,251	47,251	zero	99,9

Tabella 7.2
Cromatografia ionica dei cationi presenti nelle frazioni di siero

7.2.1 La microfiltrazione del latte

La MF è un processo separativo a membrane che meglio degli altri rappresenta i canoni classici della filtrazione tradizionale. La MF è caratterizzata da un ampio spettro di membrane filtranti, costituite rispettivamente da materiali organici (polimerici) o da materiali ceramici. Entrambi i tipi di membrana sono caratterizzati da un'asimmetria strutturale derivante da uno strato denso interno, attivo ai fini della selezione dei soluti e particellati, e da uno più poroso, che generalmente si colloca nella superficie esterna del filtro. La variabilità dei materiali disponibili per le membrane di MF, fra cui quelli inorganici (metalli, ossidi materiali ceramici), consente di operare con sostanze corrosive, aggressive o ad alte temperature. Ciò permette l'impiego della MF anche in settori particolari come nell'industria chimica, metalmeccanica e in alcune applicazioni in campo nucleare (nel riprocessamento di combustibili esausti ecc.).

Il grasso del siero, oltre ad essere un materiale che intasa facilmente i pori delle membrane, impedisce anche il passaggio delle molecole proteiche e glucidiche presenti nel latte, formando membrane dinamiche sulla superficie del filtro.

Nel grafico di figura 7.9 si riportano le dimensioni delle particelle di grasso, delle caseine e quelle dei batteri lattici presenti nel latte.

Come si vede dal grafico, il diametro dei batteri lattici coincide con il massimo della gaussiana che indica le dimensioni dei globuli di grasso. Per eliminare i batteri lattici è necessario sottoporre il latte ad un trattamento di omogeneizzazione in modo da frammentare i globuli di grasso.

A livello sperimentale la MF viene condotta impiegando un modulo di filtrazione con taglio molecolare di $1,4\ \mu\text{m}$, del tipo riportato in figura (Persson 2001; Mucchetti 2002).

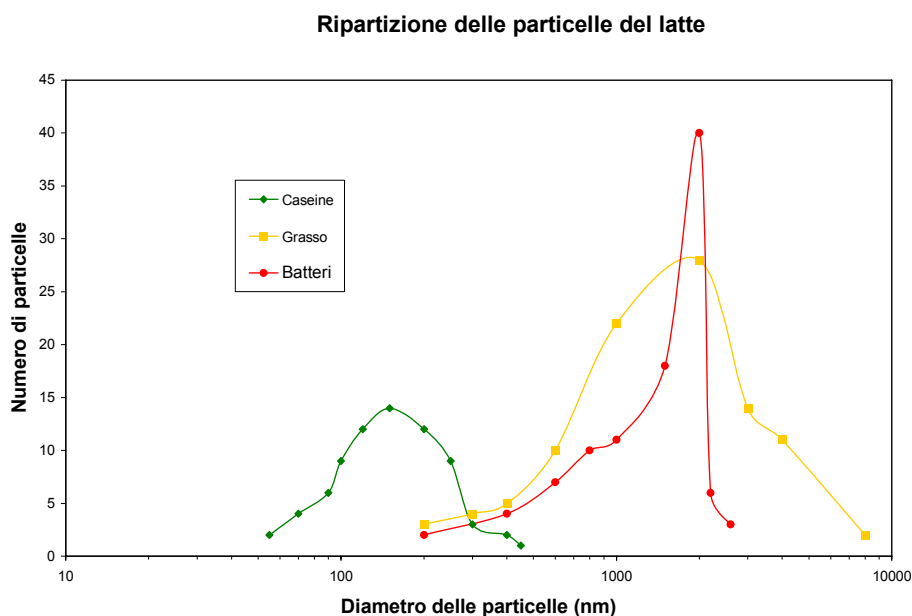


Figura 7.9
Diagramma di distribuzione delle particelle del latte

Quindi, la MF del latte intero richiede una fase di omogeneizzazione del latte stesso in modo da disaggregare i globuli di grasso. Solo dopo questo passaggio ha senso procedere alla microfiltrazione tangenziale, allo scopo di rimuovere quantitativamente la carica microbica.

7.2.2 La microfiltrazione del siero di latte

Nel siero il recupero delle sostanze ad alto valore aggiunto, come le sieroproteine, richiede la rimozione della carica batterica, invece del grasso, come abbiamo visto nel paragrafo precedente.

Tale carica batterica, in molti casi raggiunge il valore di 6 milioni di organismi (ufc) per ml. Il problema tecnico è quello di rimuovere la carica batterica, in modo da valorizzare le componenti organiche, senza rimuovere le SP.

Sono state eseguite prove di microfiltrazione del siero ovino e di quello caprino che si caratterizzano anche per un diverso contenuto e composizione chimica della materia grassa. Questo aspetto influenza anche le prestazioni separative delle membrane di microfiltrazione.

7.2.2.1 Siero ovino

La materia prima siero è costituita da siero ovino particolarmente ricco di materia grassa, come riportato in seguito.

Prima di eseguire la MF è stata effettuata una operazione di rimozione del grasso presente nel siero ovino, tramite l'impiego di un separatore centrifugo.

È stato impiegato il separatore centrifugo ermetico FROLL (mod. SN 10-S1) che è in grado di trattare quantità di materia prima dell'ordine di 1000 L/h. Si tratta quindi di un'apparecchiatura semi-industriale, già impiegata in particolari operazioni separative nel settore caseario.

Sono stati trattati circa 500 L di siero ovino grezzo. La centrifuga opera ad una velocità di rotazione di 9000 rpm, a temperatura ambiente. Dopo la centrifugazione si recuperano circa 30 litri di crema contenute tutto il grasso del siero, compresa una frazione di cellule somatiche e di carica batterica del siero stesso.

Nella figura 7.10, nella pagina a fianco, si riporta l'immagine della centrifuga utilizzata per la scrematura del siero.

Dal processo di scrematura centrifuga si ottengono 470 litri di siero ovino scremato, operando alla temperatura di 30 °C. Da 4,3 g/L di grassi contenuti nel siero grezzo, si è passati a 0,2 g/L contenuti nel prodotto permeato.

Si noti il contenuto molto elevato di grasso presente in questo siero ovino, che costituisce una caratteristica costante del siero calabrese. Sieri con questo tenore in grassi non possono essere inviati al processo di MF, poiché si bloccherebbero subito i pori delle membrane.

Nel siero bovino tale contenuto in grasso è inferiore, in particolare esso risulta compreso fra 2,0 e 2,6%.

Nella sperimentazione eseguita sul siero ovino, la resa estrattiva della materia grassa per centrifugazione è del 95,34%, quindi si può considerare soddisfacente.



Figura 7.10
Centrifuga scrematrice del siero da 1.000 L/ora

La prova è molto rappresentativa poiché il contenuto di grasso della matrice è il più alto fra tutte le tipologie di sieri possibile. Quindi i dati raccolti sono estrapolabili a tutte le tipologie di materia prima. Il siero scremato per centrifugazione è stato trattato successivamente in microfiltrazione, con membrane ceramiche, per rimuovere le tracce di grasso e, con esso la carica microbica.

Se questa operazione non venisse eseguita, la carica microbica del siero verrebbe a contaminare la componente proteica del siero, che si recupera con l'ultrafiltrazione.

Il processo di microfiltrazione del siero ovino viene realizzato con membrana ceramica da $1,4\ \mu\text{m}$ di cut-off, ad una pressione di circa 2-4 bar, e ad una temperatura compresa fra 25 e 30 °C.

Per questa operazione è stato utilizzato il pilota di MF della Società Sieroproteine, equipaggiato con membrane ceramiche in allumina, che hanno una superficie di membrana di $1\ \text{m}^2$.

Entrambe le pompe di alimentazione dell'impianto pilota sono state alimentate a 45 Hz, corrispondenti a $13\ \text{m}^3/\text{h}$ di portate, ad una pressione di 4 bar. I parametri della prova sono riportati nella tabella 7.3.

$V_{\text{alim}}\ (\text{L})$	$V_{\text{perm}}\ (\text{L})$	$V_{\text{conc}}\ (\text{L})$	VCR	$Q_{\text{loop}}\ (\text{m}^3/\text{h})$	$Q_{\text{ric}}\ (\text{L/h})$
440	408	32	13,8	13	3,5-4,0

Tabella 7.3
Parametri di esercizio della prova di microfiltrazione ceramica

L'unità di MF è dotata di un sistema di back pulse o di back wash, che consiste nell'applicare una contropressione sul lato permeato, al fine di ripulire (stappare) i pori delle membrane. Il back pulse è regolabile nel tempo: nel caso specifico tale controflusso è stato impostato ogni 30 secondi di filtrazione.

Nella tabella 7.4 si riportano i dettagli tecnici della prova, in particolare la produttività della membrana in funzione del tempo di filtrazione (J. vs. tempo).

Time	T	P_i	P_u	P_p	J_{perm}
(min)	(°C)	(bar)	(bar)	(bar)	(L/m ² ora)
0	25	5	3	1,8	190,5
2	25	5	3	1,7	185,7
5	25	5	3	1,6	176,2
10	25	5	3	1,6	171,5
15	25	5	3	1,6	166,7
20	25	5	3	1,6	166,67
21,5	25	5	3	B.W	
26,5	25	5	3	1,6	190,5
30	25	5	3	1,6	176,2
35	25	5	3	1,6	176,2
40	25	5	3	1,6	171,5
45	25	5	3	1,6	171,4
50	25	5	3	1,6	169,5
51,5	25	5	3	B.W	
56,5	25	5	3	1,5	195,3
58	25	5	3	1,5	185,7
60	25	5	3	1,6	180,9
65	25	5	3	1,6	176,3
70	25	5	3	1,6	176,2
80	25	5	3	1,6	176,2
82	25	5	3	B.W	
87,5	25	5	3	1,5	190,5
88	25	5	3	1,5	188,6
90	25	5	3	1,6	188,6
95	25	5	3	1,6	188,6
100	25	5	3	1,6	188,6
110	25	5	3	1,6	185,7
111,5	25	5	3	B.W	
116,5	25	5	3	1,5	195,2
117	25	5	3	1,6	190,5
120	25	5	3	1,6	190,5
130	25	5	3	1,6	185,7
140	25	5	3	1,6	176,2
141,5	25	5	3	B.W	
146,5	25	5	3	1,4	185,7
150	25	5	3	1,4	171,4
153	25	5	3	1,4	162,00

Tabella 7.4
Parametri della prova di MF in funzione del tempo

Nella tabella la sigla B.W. indica l'operazione di *back washing* che serve a rimuovere il deposito che si forma sulle membrane. Tale operazione è stata programmata ad intervalli di circa 21-25 minuti durante il tempo di filtrazione.

Nel grafico di figura 7.11 si riportano i valori del flusso di permeato di MF, vs. il tempo. Nei 150 minuti di prova il flusso di permeato si mantiene molto stabile, intorno ad un valore medio di circa 180 (L/m²/h). Praticamente nella prova in oggetto non si osserva una perdita di produttività della membrana, il che dimostra che le condizioni di processo sono ottimizzate. Le analisi chimiche delle frazioni separate in MF sono riportate nella tabella 7.5.

I bilanci di materia indicano che partendo da 4,7 kg di sieroproteine ne ritroviamo 4,2 kg nel permeato e 0,34 kg nel concentrato; la perdita in proteine durante questo processo (ossia quelle rimaste sulle membrane) è di 0,29 kg ossia del 4,5%.

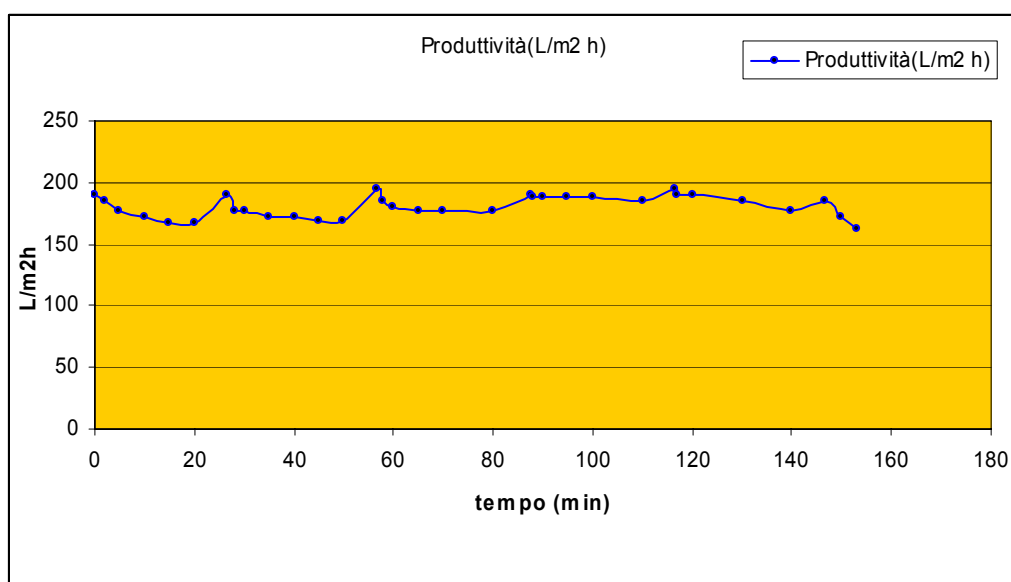


Figura 7.11
Produttività del processo di microfiltrazione sul siero scremato

	Perm. di MF	Conc. di MF
Tot. proteine	10,3	10,5
Tot. zuccheri	46,01	48,1
Ac. lattico	5,9	6,74
pH	4,8	4,3

Tabella 7.5
Analisi delle frazioni separate in microfiltrazione

Dal punto di vista dell'abbattimento della carica microbica, partendo da un alimento (siero di pecora) contenente 260.679 ufc/ml, con un contenuto di coliformi totali di 8.700 ufc/ml, e di stafilococchi coagulati di 99.180 ufc/ml, si ottiene un permeato dalla MF ceramica 1,4 μ m di circa 8.200 ufc/ml, di cui i coliformi sono inferiori a 10 ufc/ml e gli stafilococchi sono assenti. In questo siero erano assenti salmonella e listeria SPP.

Quindi, l'abbattimento totale della carica microbica del siero è del 97%, che è considerato buono se si considera che la MF è stata effettuata a temperatura di 25 °C.

Tuttavia, bisogna considerare che il permeato di MF deve essere subito raffreddato oppure trattato in UF, altrimenti la carica microbica sale di nuovo, poiché i batteri si riproducono rapidamente nella matrice siero.

Questa operazione di bonifica microbica a freddo ha il vantaggio, rispetto alla pastorizzazione, di eliminare dal siero anche le cellule batteriche morte, quindi migliora la qualità della polvere sieroproteica che si ottiene a fine ciclo di lavorazione.

La polvere sieroproteica risultante deriva infatti sostanzialmente dalle SP, e non dalle proteine di origine microbica.

7.2.2.2 Siero caprino

Il siero di capra è stato prelevato presso il Caseificio Formaggi Boccea di Roma, e subito trattato con processi a membrana presso il Centro Ricerche Casaccia dell'ENEA. All'origine il siero aveva una temperatura di 37 °C.

Nella figura 7.12 si riporta la fotografia del siero di capra utilizzato nella prova sperimentale in oggetto.

Le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche del siero di capra sono riportate nella tabella 7.6.



Figura 7.12

Aspetto del siero di capra prelevato prima del trattamento termico per la produzione della ricotta

Siero caprino tal quale		
	Conducibilità (mS/cm)	8,46
	°SH	2,6
	pH	6,9
	°Brix	6,2
Concentrazioni e Zuccheri (g/L)	Lattosio	39,40
	Glucosio	4,03
	Galattosio	3,45
	Totale	46,88
Sieroproteine (g/L)	a-Lattalbumina (a-Lc)	1,439
	Lattoferrina (Lf)	0,296
	Albumina Serico Bovina (BSA)	--
	b-Lattoglobulina (b-Lg)	3,154
	Lattoperossidasi (Lp)	0,449
	Immunoglobuline (ImG)	0,839
	Totale	6,117
	Azoto totale	8,93
	Azoto Non Proteico (NPN)	2,54
Grassi (g/L)	Materia grassa	7,096

Tabella 7.6
Caratteristiche del siero di capra impiegato nella prova

Le sieroproteine sono presenti nell'alimento (permeato di MF) al 14,85% rispetto agli altri soluti, grassi esclusi. Le analisi sulla composizione degli acidi grassi del siero sono riportate nella tabella 7.7.

Acido grasso	%
C ₄ butirrico	3,0
C ₆ caproico	3,6
C ₈ caprilico	3,8
C ₁₀ caprico	10,8
C ₁₂ laurico	4,7
C ₁₄ miristico	9,8
C _{14:1} miristoleico	0,1
C ₁₅ pentadecanoico	0,7
C ₁₆ palmitico	26,4
C _{16:1} palmitoleico	1,0
C ₁₇ eptadecanoico	0,5
C _{17:1} eptadecenoico	0,3
C ₁₈ stearico	8,9
C _{18:1} oleico	23,5
C _{18:2} linoleico	2,5
C _{18:3} linolenico	0,3
C ₂₀ arachico	0,2

Tabella 7.7
Composizioni degli acidi grassi del siero di capra

Le prove di microfiltrazione sono state eseguite senza scrematura del siero di capra. Lo scopo di queste prove consiste nella rimozione della componente grassa e di quella microbica senza ridurre sensibilmente il contenuto sieroproteico. Le specifiche della prova di microfiltrazione tangenziale sono riportate nella tabella 7.8. La produttività della membrana, cioè il flusso di permeato, nel tempo è riportata nel grafico di figura 7.13.

Da notare che la produttività della membrana si attesta sopra i 200 L/m²h, dopo 70 minuti di prova a concentrare. Il valore ottenuto a 86 minuti è viziato dalle condizioni di processo poiché la pompa aspira aria dal recipiente del ritentato.

Nella tabella 7.9 si riportano i valori di concentrazione della sostanza grassa del siero nel permeato e ritentato di MF.

Vol. alim. (L)	Vol. perm.(L)	Vol. reten. (L)	VCR	(Pin+Pus)/2 (bar)	Cond. (mS/cm)	T (°C)
195	172	23	8,5	2,7	8,0	35

Tabella 7.8
Parametri di esercizio della prova di microfiltrazione ceramica

MF 1,14µm siero Capra

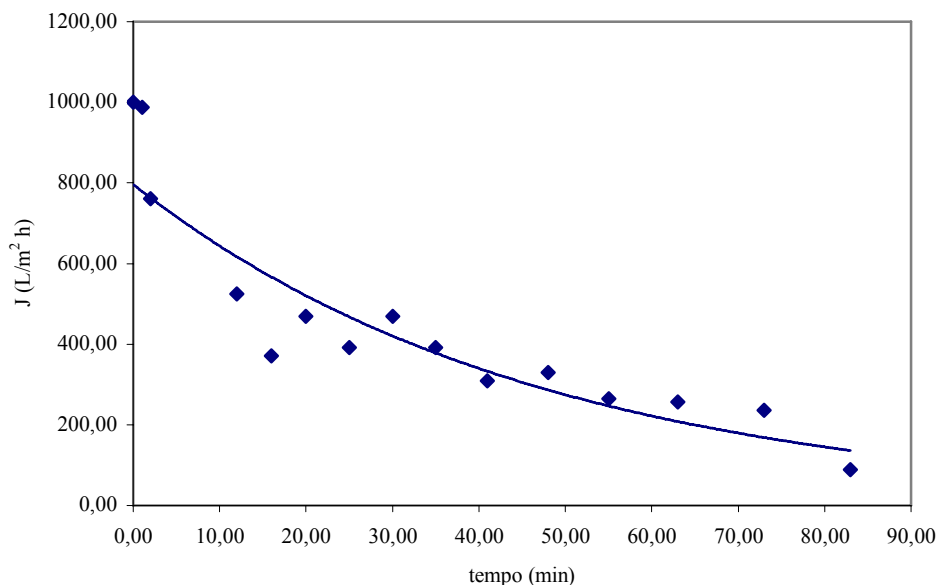


Figura 7.13
Produttività del processo di microfiltrazione sul siero tal quale

Frazioni separate	Conc. acidi grassi totali (g/L)
Siero tal quale	7,096
Concentrato di MF 1,14 µm	36,91
Permeato di MF 1,14 µm	0,08
Concentrato di UF 6 kDa	0,178

Tabella 7.9
Grassi presenti nel tal quale e nelle frazioni separate in microfiltrazione

La reiezione ai grassi della membrana da MF 1,14 µm è del 99,78%. Si tratta di una capacità antisgrassante molto più alta di quella ottenibile per semplice centrifugazione, ma rimane il problema che la membrana si intasa con il grasso.

Nella tabella 7.10 si riportano i valori di concentrazione delle specie chimiche presenti negli effluenti permeati e concentrati del processo di MF. Il bilancio di materia, materia che entra e che esce dalla membrana, si chiude con un valore di 98,6% per le sieroproteine e del 93,6% per gli zuccheri (molto buono).

La MF 1,14 µm ha un debole effetto di ritenzione delle sieroproteine in termini di quantità sottratta alla materia prima. Questo aspetto è negativo perché fa perdere prodotto di interesse commerciale. Nella sperimentazione in oggetto è stato calcolato l'indice di sporcamento della membrana, il cui grafico è riportato in figura 7.14.

Famiglie di soluti	Composti chimici	Retentato	Permeato
	Conducibilità (mS/cm)	6.114	6.227
	pH	6,1	6,36
	°Brix	6,6	6,4
Glucidi (g/L)	Lattosio	33,02	35,06
	Glucosio	4,46	4,87
	Galattosio	3,83	4,31
	Totale	41,31	44,24
Sieroproteine (g/L)	α-Lattalbumina	1,557	1,369
	Lattoferrina	0,439	0,264
	BSA	--	--
	β-Lattoglobulina	3,148	3,098
	Lattoperossidasi	0,686	0,383
	Im.globuline	1,207	0,780
	Totale	7,038	5,892
	Azoto totale	9,604	8,708
Materia grassa (g/L)	Azoto non proteico	2,640	2,460
	Acidi grassi totali	36,91	0,08

Tabella 7.10
Composizione delle frazioni permeate e concentrate in microfiltrazione

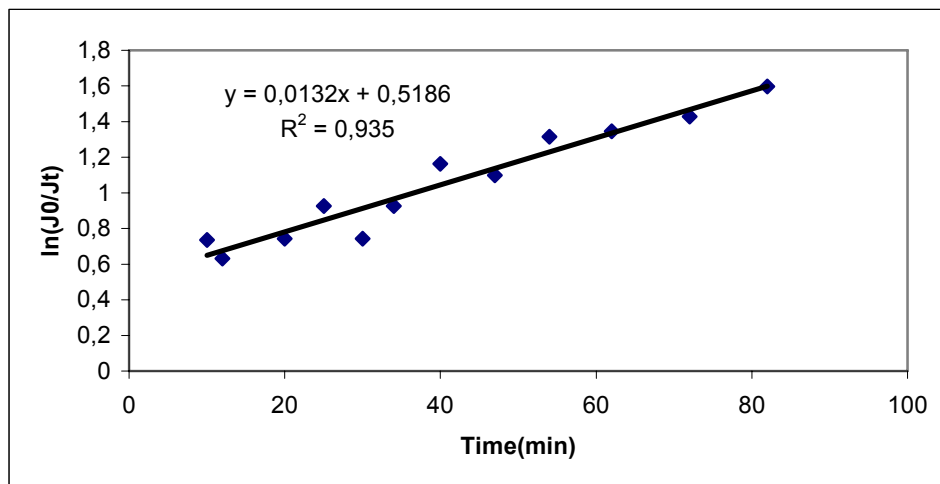


Figura 7.14
Indice di *fouling* della prova di microfiltrazione sul siero di capra

Famiglie di soluti	Composti chimici	Retentato	Permeato
	Conducibilità (μS/cm)	6.114	6.227
	pH	6,1	6,36
Glucidi (g/L)	Lattosio	33,02	35,06
	Glucosio	4,46	4,87
	Galattosio	3,83	4,31
	Totale	41,31	44,24
Sieroproteine (g/L)	α-Lattalbumina	1,557	1,369
	Lattoferrina	0,439	0,264
	BSA	--	--
	β-Lattoglobulina	3,148	3,098
	Lattoperossidasi	0,686	0,383
	Im.globuline	1,207	0,780
	Totale	7,038	5,892
	Azoto proteico	9,604	8,708
	Azoto non proteico	2,640	2,460
Materia grassa (g/L)	Acidi grassi totali	36,91	0,08

Tabella 7.11
Composizioni chimiche delle correnti separate in microfiltrazione

Nella tabella 7.11 si riportano le composizioni chimiche delle frazioni separate in MF, rimarcando le categorie di composti fra permeato concentrato. Dalla tabella è molto evidente che la MF trattiene nel solido la materia grassa (retentato), e con essa le componenti microbiche (viste sul siero ovino). Tutti gli altri soluti, proteine comprese, permeano attraverso i pori della membrana.

7.2.3 L'ultrafiltrazione del siero: confronto fra prove diverse

L'ultrafiltrazione è la tecnica selettiva usata per recuperare le sieroproteine presenti nel siero di latte. Questa tecnica è impiegata da 40 anni proprio a questo scopo, per questo motivo sono presenti sul mercato membrane costruite proprio per recuperare le SP dal siero.

Questa tecnica è fortemente condizionata dai problemi di fouling delle membrane, che sono causati dalla formazione di un film proteico sulla superficie delle membrane stesse ed in misura minore dalla presenza di ioni calcio che tendono a formare fosfati di calcio (idrossiapatite), anche essi responsabili dell'intasamento delle membrane.

Attualmente per l'UF del siero si utilizzano principalmente membrane polimeriche a spirale avvolta, con taglio molecolare compreso fra 50 e 6 kDa.

Nella figura 7.15 si riporta un sistema di UF del siero in scala laboratorio (Millipore) che impiega membrane piane di natura polimerica.



Figura 7.15
Apparato di ultrafiltrazione del siero in scala laboratorio, sistema Pellicon-Millipore, con membrane piane

Di seguito si riportano i risultati sperimentali ottenuti sul siero di capra, precedentemente microfiltrato per rimuovere grassi e batteri.

È evidente che la rimozione dei grassi e dei batteri facilita il processo di UF del siero, ma rimane il problema delle sieroproteine e dei sali di calcio, che svolgono una funzione di intasamento dei pori (fouling).

La prova sperimentale di UF è stata condotta impiegando una membrana a spirale avvolta da 6 kDa, le cui caratteristiche di permeabilità all'acqua sono state precedentemente testate, sia in funzione della pressione che della temperatura. La scelta di un cut-off così basso deriva dalla volontà di recuperare non soltanto le SP ma anche le frazioni peptidiche presenti nel siero, in particolare i caseino-macropetidi (CMP).

Prima di eseguire l'UF è necessario caratterizzare la membrana in termini di produttività in funzione della pressione e della temperatura.

Nella figura 7.16 si riporta il flusso di permeato all'acqua in funzione della pressione. Dalla retta del grafico si può vedere che, operando a 4 bar, si dovrebbe ottenere un flusso di permeato, con l'acqua, dell'ordine dei 120 (L/m²h).

Nella figura 7.17 si riporta l'andamento del flusso in funzione della temperatura.

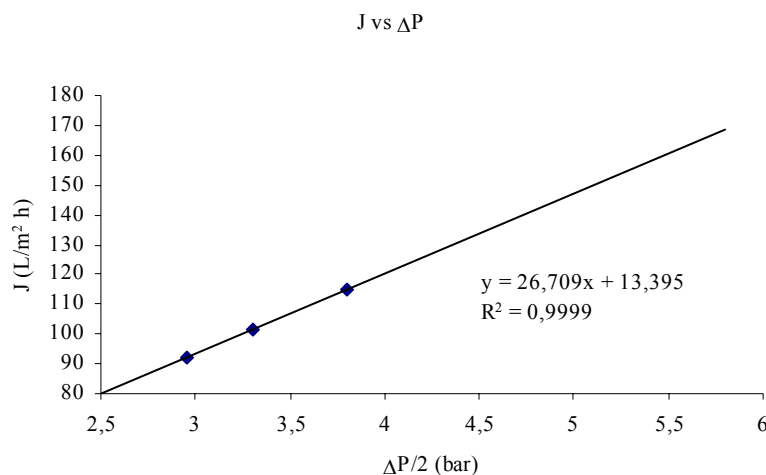


Figura 7.16
Retta di permeabilità della membrana di ultrafiltrazione da 6 kDa
in funzione della pressione

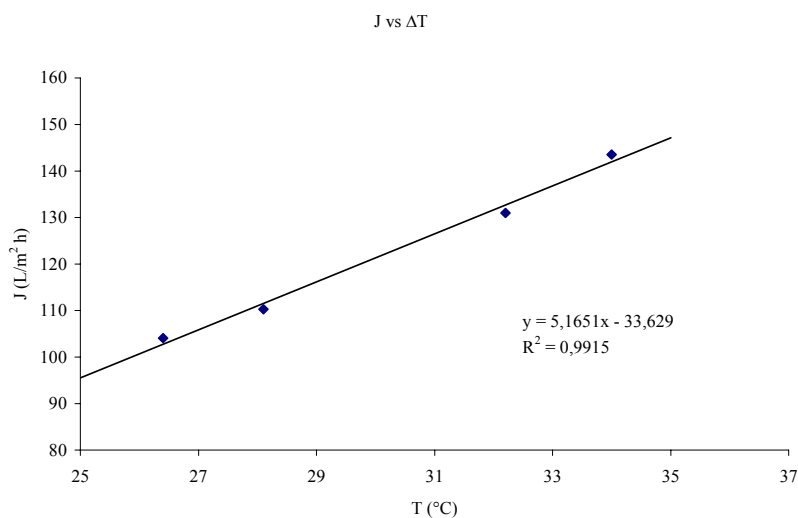


Figura 7.17
Flusso di permeato della membrana di ultrafiltrazione da 6 kDa
in funzione della temperatura

Per valutare l'effetto della temperatura sul flusso di permeato è stata condotta una prova con acqua sempre sulla membrana con cut-off 6 kDa.

Dal grafico si ricava un incremento di produttività di circa 5,0 (L/m²h) per °C di aumento della temperatura nell'intervallo sperimentale considerato (25-34 °C).

La prova di UF è stata eseguita partendo da circa 180 L di siero microfiltrato, le specifiche della prova sono riportate nella tabella 7.12.

La produttività del modulo a spirale avvolta di UF, in funzione del tempo di lavoro, è riportata nel grafico di figura 7.18.

Nei primi 15 minuti la prova è stata eseguita ad una pressione di esercizio di circa 2,5 bar, successivamente la pressione è stata aumentata a 4,2 bar per valutare l'effetto sulla produttività. Nel primo tratto della curva il flusso di permeato si stabilizza sui 28 (L/m²h), mentre alla pressione di trans-membrana di 4,2 la produttività sale al valore 32 (L/m²h).

In queste seconde condizioni la produttività sale, nonostante sia salito anche il rapporto volumetrico di concentrazione (VCR). Al termine della prova il VCR si attesta intorno al valore 10,5.

Vol. alim. (L)	Vol. perm. (L)	Vol. reten. (L)	VCR	(Pin+Pus)/2 (bar)	Cond. (mS/cm)	T (°C)
179,0	162	17,5--20	10,2	3-3,5	6,22	29,5

Tabella 7.12
Parametri di esercizio della prova di ultrafiltrazione

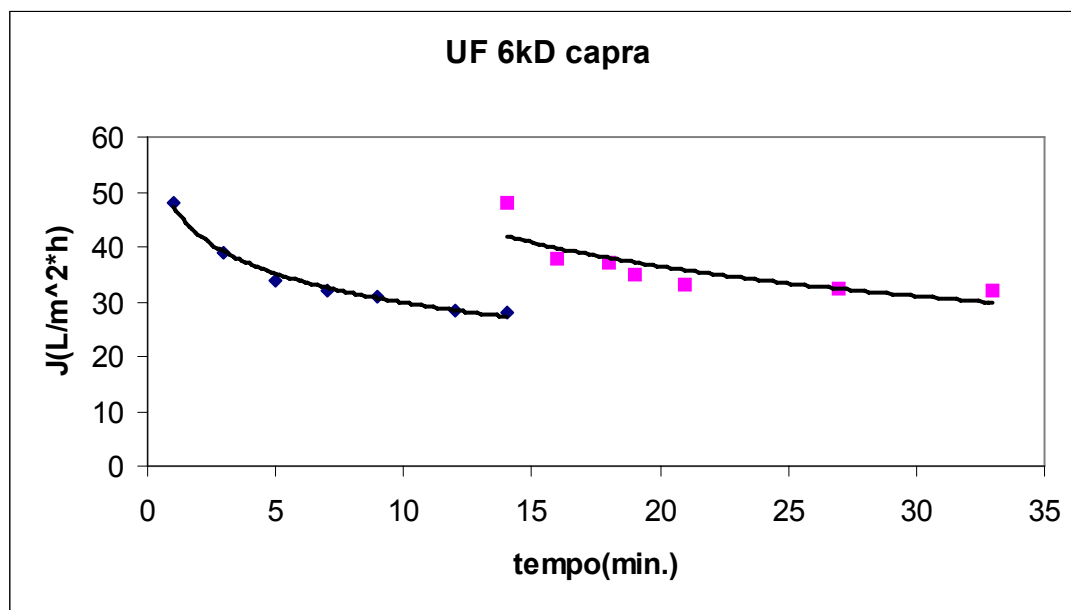


Figura 7.18
Produttività verso il tempo della prova di ultrafiltrazione

Famiglie di soluti	Composti chimici	Retentato	Permeato
	Conducibilità ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	5,648	5,838
	pH	6,65	6,73
Glucidi (g/L)	Lattosio	33,82	40,48
	Glucosio	8,66	3,37
	Galattosio	5,89	3,12
	Totale	48,38	46,97
	α -Lattalbumina	7,678	--
Sieroproteine (g/L)	Lattoferrina	1,477	--
	BSA	--	--
	β -Lattoglobulina	17,726	--
	Lattoperossidasi	2,144	--
	Im.globuline	4,432	--
	Azoto Proteico	37,363	1,964
	Azoto Non Proteico	4,350	1,883

Tabella 7.13
Composizione delle frazioni separate in ultrafiltrazione

Nella tabella 7.13 si riportano le concentrazioni dei soluti determinate nel permeato e concentrato di UF. Si osserva che mediamente il flusso di permeato risulta 4 volte inferiore al flusso d'acqua alla temperatura di esercizio sperimentale.

Il permeato medio di UF ha una concentrazione di lattosio di 46,96 g/L, mentre quella del retentato è di 48,38 g/L. Ciò si spiega con il fenomeno di aggregazione del lattosio con le proteine.

Queste ultime hanno una concentrazione sul retentato di circa 37,3 g/L e sul permeato di circa 1,9 g/L, ma si tratta di peptidi e non di proteine intere.

Le proteine vengono completamente trattenute dalla membrana da 6 kDa, quello che rimane (1,964 g/L) è costituito unicamente da frazioni peptidiche, con peso molecolare inferiore a 6 kDa.

Nel retentato di UF la quota percentuale di proteine rispetto ai soluti è del 38,69%, rispetto al 14,85% dell'alimento (permeato di MF). La parte minerale del siero e del retentato di UF viene stimata in circa 4,6 g/L.

Bisogna considerare che nella matrice siero sono presenti batteri lattici con attività idrolitica sul lattosio. Ciò significa che il processo idrolitico del lattosio può procedere spontaneamente anche durante la fase di UF.

Nella figura 7.19 si riportano le foto del siero di capra tal quale, del permeato di MF e del permeato di UF 6 kDa.



Figura 7.19
Aspetto dell'alimento del permeato di MF e di UF

Il permeato di MF è ancora torbido per la presenza di SP mentre il permeato di UF è perfettamente limpido, con una colorazione giallina dovuta alla presenza della riboflavina.

Il permeato di UF verrà successivamente concentrato con tecniche di nanofiltrazione in modo da recuperare completamente il lattosio e la riboflavina.

Si riporta l'andamento di una prova di UF del siero bovino che è stata protratta per 260 minuti ed è stata accoppiata ad uno stadio di diafiltrazione per rimuovere il lattosio ed i sali minerali. L'andamento del flusso di permeato di UF da 10 kDa e quella successiva di DF è riportata nel grafico di figura 7.20.

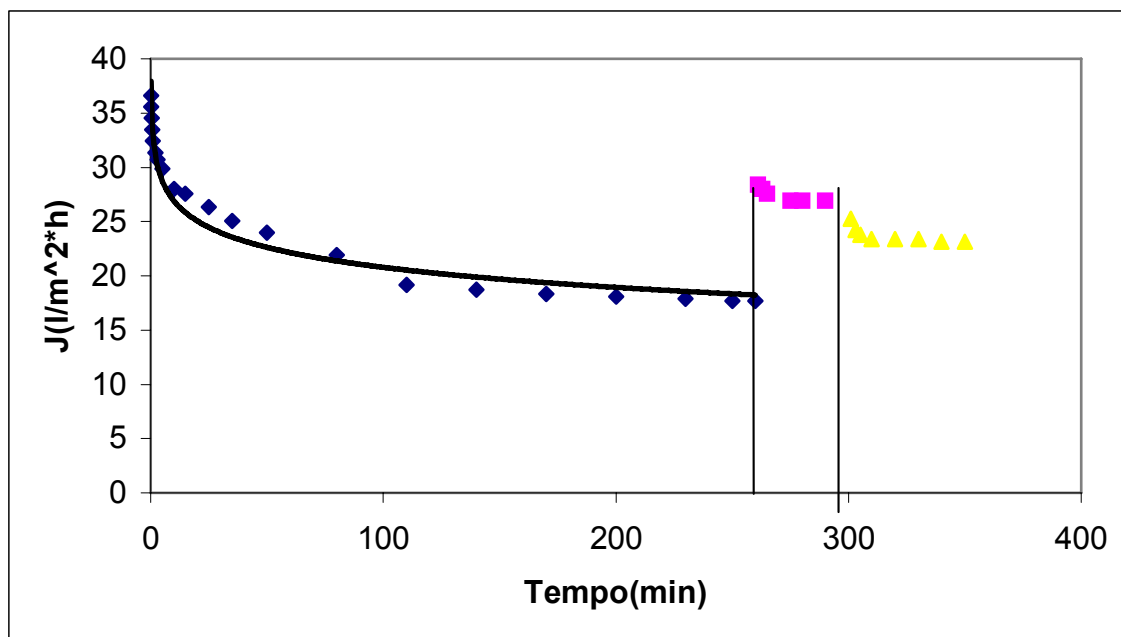


Figura 7.20
Produttività della prova di ultrafiltrazione e diafiltrazione da 10 kDa

In questa prova la produttività della membrana scende a fine prova sotto i 10 L/m²h, ma ciò è giustificato dal fatto che si è raggiunto un VCR di circa 12.

In queste prove il retentato di UF è stato sempre ricircolato durante il processo, quindi la membrana si trova a trattare un alimento che incrementa la sua concentrazione di SP nel tempo. È da notare che nella fase di DF, cioè quando si aggiunge acqua distillata al concentrato di UF, il flusso di permeato risale, come si vede dal grafico di figura 7.20. In figura 7.21 è riportato il grafico relativo all'indice di *fouling* della membrana di UF da 10 kDa, dopo 260 minuti di prova.

Al termine delle prove di UF e di DF il concentrato viene trasformato in polvere attraverso lo spray dryer, mentre il permeato di UF addizionato del permeato di DF viene trattato in NF per concentrare il lattosio.

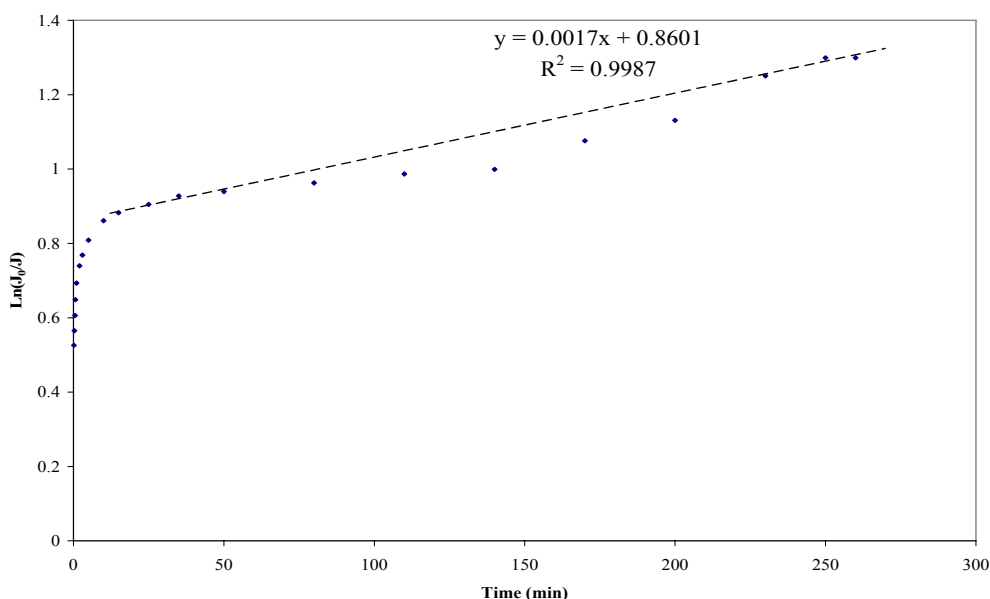


Figura 7.21
Indice di *fouling* della prova di ultrafiltrazione polimerica da 10 kDa

7.2.4 Nanofiltrazione del siero: confronto fra prove diverse

La nanofiltrazione (NF) è una tecnica separativa che utilizza membrane polimeriche con taglio molecolare di circa 200 D. Nella sperimentazione effettuata si utilizza come alimento della NF il permeato dell'UF, come indicato nello schema di figura 7.2.

Le caratteristiche di permeabilità all'acqua, della membrana di NF, in funzione della pressione di esercizio sono riportate nel grafico di figura 7.22, mentre in figura 7.23 si riporta il flusso di permeato in funzione della temperatura di esercizio.

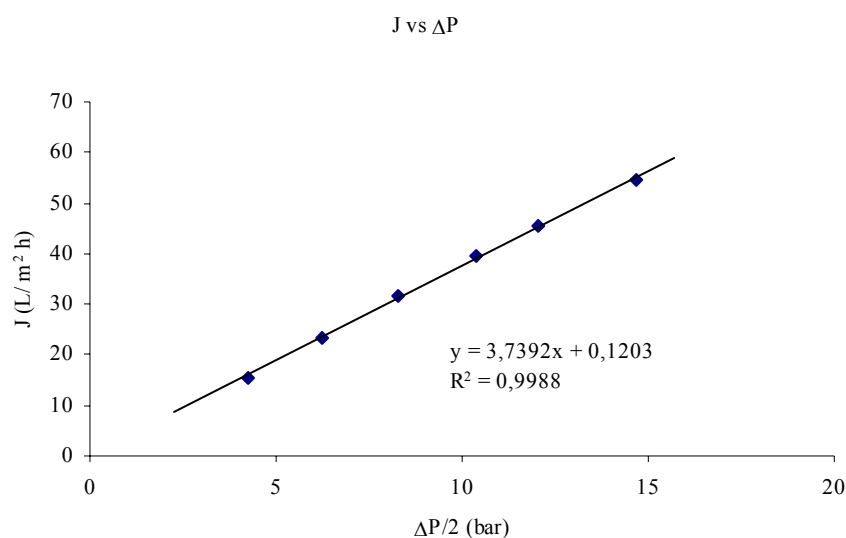


Figura 7. 22
Permeabilità della membrana di nanofiltrazione in funzione della pressione

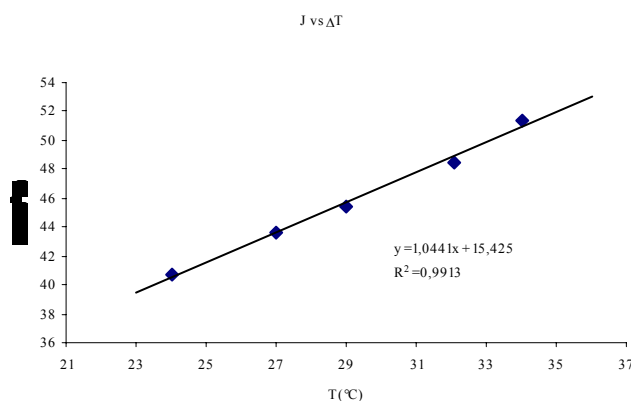


Figura 7.23
Permeabilità della membrana di NF in funzione della temperatura

L'aumento di 1 °C di temperatura si traduce in un incremento di flusso di 1 L/m²*h come indica il coefficiente angolare della retta.

Stabilite le caratteristiche di permeabilità del modulo di NF si procede al trattamento del permeato di UF del siero di capra, considerando i volumi ottenuti dal permeato di UF e quelli ottenuti dalla DF. In totale si trattano 233 L di soluzione. I parametri della prova sono riportati nella tabella 7.14.

Vol. alim. (L)	Vol. perm. (L)	Vol reten. (L)	VCR	(Pin+Pus)/2 (bar)	T (°C)
233	163,9	69,1	3,4	15,7	27,5

Tabella 7.14
Parametri di esercizio della prova di NF (condizioni di ricircolo totale)

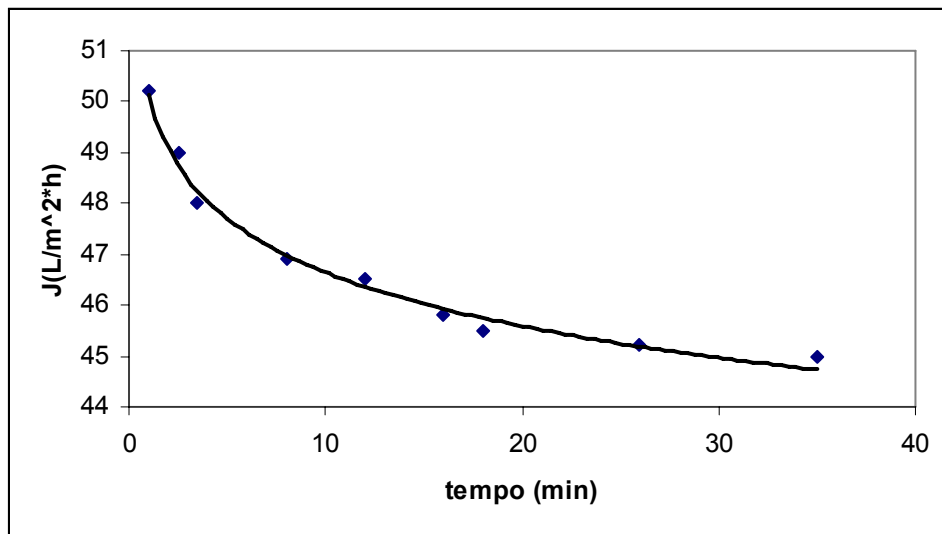


Figura 7.24
Produttività del modulo di nanofiltrazione a spirale avvolta
(condizioni di ricircolo totale)

Nel grafico di figura 7.24. si riporta l'andamento del flusso di permeati in funzione del tempo di NF, in condizioni di ricircolo totale, cioè quando permeato e concentrato sono continuamente rimescolati fra loro.

Dopo la fase di ricircolo totale si è operato in condizioni di concentrazione raggiungendo un VCR di 6,6. Dalla sperimentazione emerge un dato interessante che si ottiene dal flusso di permeato al termine degli 85 minuti di prova, condotta in condizioni di ricircolo totale e di concentrazione. Tale dato a fronte di un VCR di NF di 6,65 è di circa 20 L/m²h.

Nella tabella 7.15 si riporta la concentrazione del concentrato di NF. Nel retentato di NF si registra una presenza di proteine che si attesta intorno a 3,4 g/L, si tratta più precisamente di peptidi e non di proteine intere, come si è visto nel Capitolo 4.

La concentrazione degli zuccheri è inferiore a quella desiderata (190 g/L).

Retentato di nanofiltrazione		
Chimico-fisici	Conducibilità (µS/cm)	6.588,0
	pH	6,57
Zuccheri (g/L)	Lattosio	180
	Glucosio	150
	Galattosio	12
Azoto	Azoto proteico (NP)	3,38 g/L
	Azoto non proteico	2,14 g/L

Tabella 7.15
Concentrazione del retentato di nanofiltrazione

Si riportano i dati di una nuova sperimentazione di NF condotta su siero bovino. Nel grafico di figura 7.25 si riporta l'andamento del flusso di permeato in una prova di NF del siero bovino, seguita da una fase di diafiltrazione. In questa prova il VCR è stato di 5. La DF fa risalire inizialmente il flusso per effetto della diluizione dell'alimento, ma successivamente ritorna ai valori iniziali.

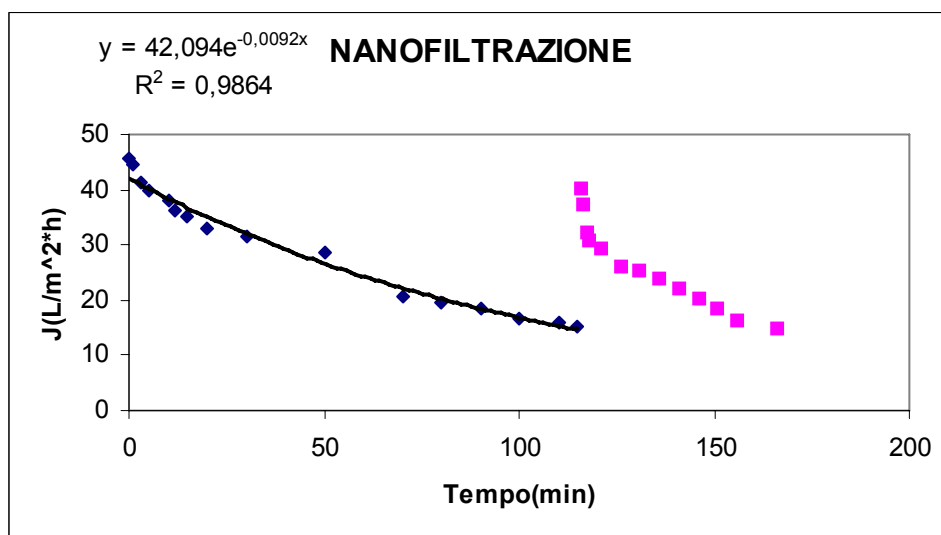


Figura 7.25
Andamento del flusso di permeato nel processo di NF + DF

7.2.5 Processo di osmosi inversa

L'osmosi inversa (OI) è un processo di filtrazione selettiva dell'acqua, che si ottiene applicando una differenza di pressione superiore a quella osmotica della soluzione da purificare.

In tal modo si ottiene un flusso di solvente (acqua) che è proporzionale alla differenza fra la pressione applicata e quella osmotica. L'OI è una tecnica utilizzabile per la separazione o la concentrazione di soluti sciolti in soluzioni acquose.

Questa tecnica è particolarmente indicata per rimuovere sali minerali, e viene largamente impiegata nella dissalazione dell'acqua, compresa quella di mare (Pizzichini ENEA e Pizzichini RES).

Nel trattamento del siero di latte ha la funzione di rimuovere i sali minerali e di abbassare, conseguentemente il COD dell'effluente permeato.

Nel caso specifico del trattamento del siero, l'OI viene applicata sul permeato di NF al fine di concentrare i sali minerali e generare un'acqua a basso contenuto salino, in modo da scaricarla secondo le normative vigenti, in particolare sui corpi idrici recettori.

In questo lavoro sono state eseguite diverse prove di OI, impiegando sieri di natura diversa e operando con impianti pilota dell'ENEA e della Società Sieroproteine. Tutte queste prove sono state eseguite con membrane a spirale avvolta ad alta reiezione salina. Gli impianti utilizzano sia pompe a pistoncini, sia pompe ad ingranaggi, ma questo non modifica i rendimenti di produzione del processo.

Tutti i pilota utilizzati impiegano un prefiltro dell'alimento, di solito avente una dimensione di circa 50-100 μm e una pompa di prealimentazione, seguita da una pompa centrifuga special, generalmente della Soc. Grunfus, in grado di operare fino a 40 bar. Il pilota della Soc. Sieroproteine è dotato di un inverter per aumentare la pressione di esercizio.

Nella figura 7.23 si riporta il flusso di permeato ottenuto alimentando l'impianto con acqua di rete, in funzione della pressione applicata.

La prova di OI è stata eseguita su un permeato di 199 L, ottenuto dalla NF, in condizioni idrauliche a concentrare. Le specifiche della prova sono riportate in tabella 7.16.

L'andamento del flusso di permeato in funzione del tempo è riportato nel grafico di figura 7.26.

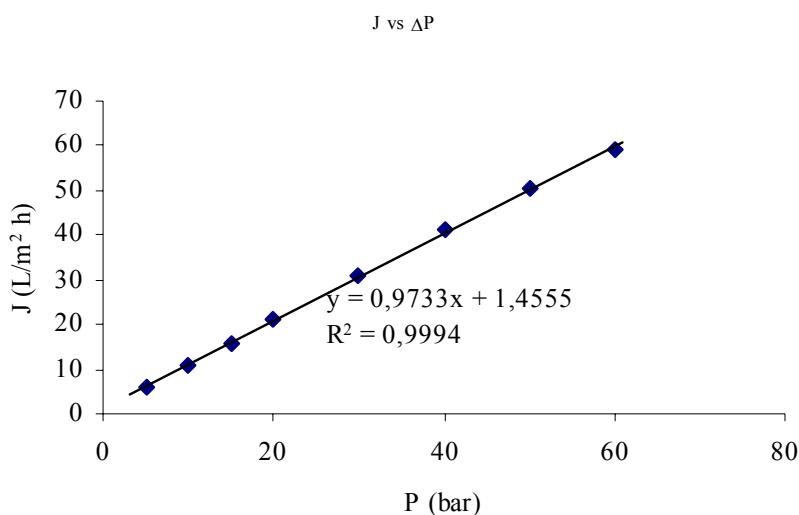


Figura 7.26
Flusso della membrana di osmosi inversa in funzione della pressione di esercizio

Vol. alim. (L)	Vol. perm. (L)	Vol reten. (L)	VCR	T (°C)	P (bar)
198,9	145,2	53,7	3,7	29,4	20

Tabella 7.16
Parametri di esercizio della prova di osmosi inversa

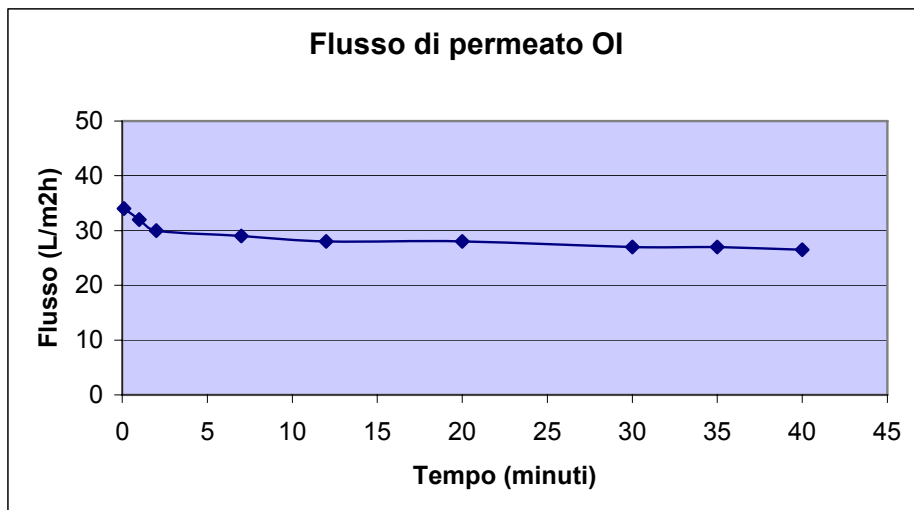


Figura 7.27
Produttività (J) della membrana di osmosi inversa in funzione del tempo

La produttività della membrana è risultata costante e pari a 29-30 L/m² h per la durata della prova. Anche in prove successive condotte per oltre 2,5 ore il flusso di permeato rimane stabile al valore 30 (L/m²h). Quindi il Processo di OI non crea nessun tipo di problemi di intasamento della membrana, per lo meno nelle condizioni sperimentali della prova in oggetto.

Per valutare gli effetti di fouling è necessario operare con volumi molto più elevati, dell'ordine dei metri cubi.

Nella figura 7.28 si mostrano le diverse frazioni liquide ottenute con le filtrazioni a membrana del siero di capra. Dalla figura si può osservare come il permeato di OI sia perfettamente limpido e incolore, esso tuttavia presenta un COD che dipende dal VCR che si è raggiunto.



Figura 7.28
Campioni delle frazionamento liquide separate dal siero di capra

Operando con $VCR > 4$, come da schema di processo, il permeato di OI presenta un COD medio di circa 190-200 ppm di O_2 .

Per rispettare i valori limite di scarico tale COD ha un valore troppo alto, visto che il dato tabellare (legge 125/99) è di 160 ppm di ossigeno.

Per rientrare nei limiti di rilascio, cioè al di sotto di 160 ppm, è stato messo a punto il seguente protocollo sperimentale:

- 1 procedere in OI fino ad un $VCR=2$ e raccogliere il permeato che presenta un COD medio di circa 100 ppm
- 2 continuare l'OI fino a $VCR=5$
- 3 smaltire il concentrato di OI (ad esempio nel depuratore biologico di stabilimento)
- 4 ritrattare nuovamente in OI il precedente permeato raccolto nel punto 2
- 5 aggiungere il primo permeato di OI con il secondo ottenuto al punto 4.

Questi permeati riuniti presentano un COD medio di 120 ppm di O_2 , quindi perfettamente a norma.

Tali informazioni non riguardano direttamente lo scopo del presente studio, poiché il permeato di OI è un effluente troppo importante per essere scaricato indipendentemente dal suo carico inquinante, che è dato sostanzialmente dalla presenza di tracce di lattosio e aminoacidi derivanti dalle proteine.

Il COD del permeato di OI è infatti perfettamente compatibile per un impiego alimentare del prodotto, per questo tale permeato viene studiato con attenzione per costituire una base di prodotto da utilizzare nell'industria delle bevande.

Nella tabella 7.17 si riportano le composizioni chimiche del ritentato e del permeato di OI, ottenuto dal trattamento del siero di capra.

Nel permeato le concentrazioni saline sono estremamente basse, perché la membrana ha trattenuto tutti i soluti, ma il rapporto sodio/potassio è inferiore a 0,40. Pur nelle condizioni di diluizione dei sali, si mantiene piuttosto inalterato il rapporto Na/K rispetto alla composizione del latte e del siero di provenienza.

Il permeato di OI è un prodotto che potremmo definire un'acqua iposalina, sterile all'origine, di origine biologica perché deriva dal latte.

Parametri	Concentrato OI	Permeato OI
Materia grassa	Assente	Assente
Carica batterica	6 mil ufc /g	400 ufc/g
pH	5,5	5,3
Conducibilità	450 mS/cm	25 µS/cm
COD	3.000 mg/L	190 mg/L
Azoto totale	0,023%	0,010%
Nitrati	18 mg/L	3,5 mg/L
Ammoniaca	5-7 mg/L	1,5 mg/L
Lattosio	0,25%	< 0,03%
Fosforo totale	0,4 mg/L	<0,1 mg/L,
Fosfati (PO ₄)	236 mg/L	0,85 mg/L
Solfati	48 mg/L	< 5 mg/L
Cloruri	2.553 mg/L	36 mg/L
Calcio	90 mg/L	0,32 mg/L
Potassio	1.650 mg/L	21 mg/L
Magnesio	700 mg/L	0,22 mg/L
Sodio	730 mg/L	7,9 mg/L
Residuo secco	0,75%	< 0,02%

Tabella 7.17
Composizione chimica del concentrato e del e del permeato
di osmosi inversa del siero di capra

7.2.6 Ottimizzazione dei parametri di processo

Per mettere a punto tutte le fasi di processo in cui sono implicate le operazioni a membrana è necessario scegliere il tipo di membrana più adatto (materiale, geometria, tipo di modulo), regolare le condizioni ed i parametri di esercizio (temperatura, pressione, flussi, idrodinamica del sistema) e definire alcune specifiche di processo, come il VCR.

In ogni stadio di filtrazione è necessario impiegare la membrana più adatta, cioè quella che assicura un'elevata reiezione ai soluti nel caso dell'UF, della NF e dell'OI.

Tutta la fase di messa a punto dei singoli processi deve consentire di minimizzare i fenomeni di fouling, cioè di intasamento delle membrane impiegate. Questi fenomeni, sempre presenti in tutte le operazioni unitarie, sono molto forti e critici in MF e UF, meno nella sezione di NF e praticamente trascurabili in quella di OI.

Nella tabella 7.14 si riassumono le specifiche delle membrane impiegate e le prestazioni sperimentali ottenute dalle prove di frazionamento del siero di latte, nei 5 stadi di filtrazione del processo: si riportano i valori medi ottenuti in diverse prove di trattamento con membrane.

Tecnica	Membrana	Geometria	Pressione (bar)	Velocità di flusso (m/s)	Produttività (L/m²h)
MF	Ceramica allumina	Tubolare	1-3	4-7	180-200
UF	Polimerica (PES)	Spirale	2-5	1-2	10-25
DF	Polimerica (pes)	Spirale	2-5	1-2	15-25
NF	Polimerica (pa)	Spirale	10-18	0,5-1,2	15- 25
OI	Polimerica (PAC)	Spirale	20-40	0,3-0,5	20-40

Tabella 7.18
Parametri medi di esercizio delle singole tecnologie di membrana

Per questo scopo si devono scegliere le condizioni migliori di processo e bilanciare una serie di grandezze e parametri operativi fra loro.

Ad esempio, l'innalzamento della pressione di esercizio ha come effetto positivo l'aumento della produttività della membrana, ma può comportare un'accelerazione del fenomeno di *fouling*. Inoltre, la pressione più alta comporta un maggiore consumo energetico.

Occorre, proprio per ridurre il *fouling*, regolare la fluidodinamica del sistema, in particolare la velocità di scorrimento del fluido (alimento) sulla superficie di membrana. Bisogna inoltre scegliere un ragionevole compromesso fra il flusso di permeato (produttività della membrana), ed il VCR. In altre parole, questo significa non spingere eccessivamente il rapporto volumetrico di concentrazione se questo parametro riduce sensibilmente la produttività della membrana.

Infine, bisogna considerare con molta attenzione le operazioni di lavaggio delle membrane che devono essere condotte in condizioni ottimali per tipologia di detergente impiegato, esempio soda o acido, e per tempi di lavaggio.

Le condizioni di lavaggio delle membrane sono molto delicate perché condizionano sia la loro produttività a regime (cioè dopo lunghi periodi di lavoro, che la loro durata nel tempo, quindi la vita della membrana. Ciò riguarda soprattutto le membrane polimeriche poiché quelle ceramiche sono molto resistenti agli agenti chimici ma anche più fragili e soprattutto più costose.

7.3 Bibliografia

Amundson., S. W. (1982). "Production of enriched protein fractions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin from cheese whey." J. Food Proc. Preserv. **6**: 55-71.

Batchelder, B. T. (1986). Electrodialysis applications in whey processing. Int. whey Conference, Chicago, Illinois.

Etzel (2004). "Manufacture and use of dairy protein fractions." American society for nutritional sciences.

M. Pizzichini, G. Z., F.J. Comendator and all (1995). "Recupero di sieroproteine e acqua depurata dalla scotta ovina con tecnologie di membrana." Scienza lattiero Casearia **46**: 361-379

M. Pizzichini, R. M., C. Russo (2001). "Il siero di latte: da rifiuto zootecnico a materia prima per prodotti alimentari e farmaceutici." L'Informatore Agrario **16**: 49-53.

M. Pizzichini, A., Iasonna, M., Rosi, F. Ruscio (1997). "Innovazione tecnologica nell'industria lattiero casearia." Energia Ambiente Innovazione Ed. ENEA **1**: 43-57.

M. Pizzichini, C. R., P. Feliziani (2003). "Prodotti ad alto valore biologico dal siero di caseificazione." AGRIculture **3**: 15-19.

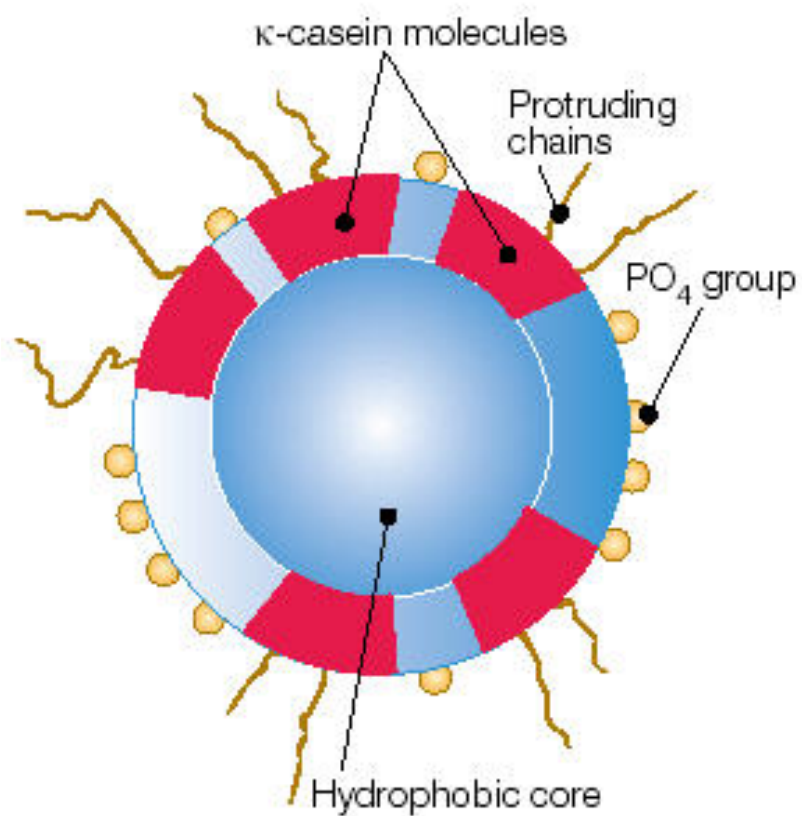
Mucchetti, G. (2002). "Opinioni sul latte alimentare fresco." Il Latte **27**(10): 46-58.

Persson, J., Zacchi (2001). "Separation of lactic-acid-producing bacteria from fermentation broth using a ceramic microfiltration membrane with constant permeate flow." Biotechnology and bioengineering **72**(3).

T.H. Erguder, U., Tezel, E., Guven and G. Demirer (2001). "Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors." Waste Manag. **21**(7): 643-650.

CAPITOLO 8

SEPARAZIONE DELLE SIEROPROTEINE CON TECNICHE DI CROMATOGRAFIA



Indice dei paragrafi

8.1 Principi teorici della cromatografia a scambio ionico	191
8.2 Resine a scambio ionico e capacità legante	195
8.3 Frazionamento selettivo delle sieroproteine con cromatografia a scambio ionico	197
8.4 Bibliografia	207

Le tecniche separative mediante resine a scambio ionico o di affinità sono, per molti aspetti, competitive con quelle di membrana.

Mentre le tecnologie di membrana svolgono una funzione principale che è quella di concentrare sia sieroproteine che altri soluti, quelle di adsorbimento svolgono la funzione preminente di separare, in particolare, le singole molecole proteiche fra loro. Questa affermazione ha un carattere generale, poiché sia i processi separativi a membrana, che le tecniche cromatografiche possono anche svolgere funzioni rispettivamente separative e di concentrazione, ma questi sono casi particolari.

8.1 Principi teorici della cromatografia a scambio ionico

Le molecole biologiche possono essere separate o purificate con tecniche cromatografiche che consentono di ottenere delle separazioni anche quantitative, sfruttando alcune caratteristiche chimiche che governano sia la fase di riconoscimento selettivo che quella di estrazione dal supporto stazionario, cioè dalla resina.

Il riconoscimento e quindi il legame fra resine e macromolecole può avvenire in base alle dimensioni molecolari, alla carica elettrica oppure al carattere di idrofobicità della molecola stessa, come riportato nella tabella che precede la figura 8.1.

La figura schematizza in forma grafica il tipo di interazione fra il supporto e la macromolecola, nel caso specifico le SP.

Proprietà	Tecnica cromatografica
Carica superficiale	Cromatografia ionica Cromatofocusing
Dimensione	Filtrazione su gel
Idrofobicità	Cromatografia per interazione idrofobia Cromatografia in fase inversa
Specifici leganti	Cromatografia per affinità

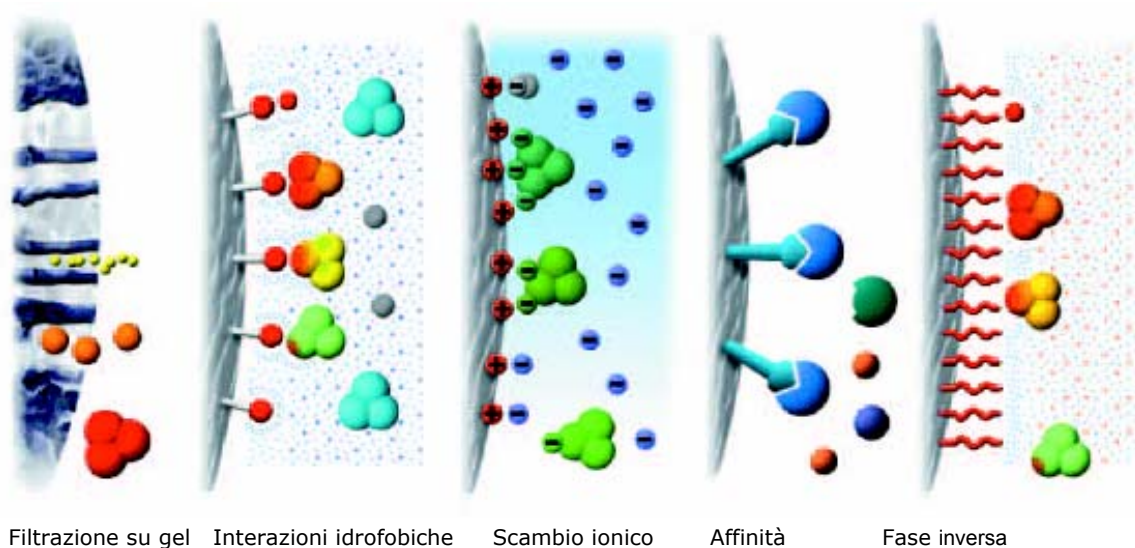


Figura 8.1
Principi di separazione nelle separazioni cromatografiche

In particolare la cromatografia a scambio ionico separa le molecole in base alla differenza della loro carica superficiale. Le biomolecole possono cambiare considerevolmente la propria carica superficiale in base alla loro struttura e al microambiente chimico in cui si trovano, mostrando differenti gradi di interazione con la resina cromatografia carica in base alla differenza della loro carica totale, della densità di carica e della distribuzione di carica superficiale.

La carica superficiale delle biomolecole è dipendente soprattutto dal pH. Nel caso delle proteine, che sono costituite da aminoacidi con gruppi di acidi deboli e gruppi basici, la loro carica superficiale cambierà gradualmente con il variare del pH del microambiente circostante.

La cromatografia a scambio ionico, sfruttando la singola relazione tra carica superficiale della specifica proteina e pH, è una delle tecniche più usate per la purificazione di proteine, peptici, acidi nucleici ed altre biomolecole cariche, offrendo ottime risoluzioni separative delle singole molecole. La tecnica è capace di separare specie molecolari con una minima differenza della loro carica superficiale, per esempio due proteine con un diverso aminoacido carico.

Una proteina al suo punto isoelettrico non mostra cariche superficiali e non interagisce con la resina carica; ad un pH superiore al suo punto isoelettrico, la proteina mostra una carica negativa e si lega ad una resina carica positivamente (resina a scambio anionico); ad un pH inferiore al suo punto isoelettrico, la proteina è carica positivamente e si lega ad una resina carica negativamente (resina a scambio cationico).

Oltre alle interazioni di scambio ionico, possono esserci altri tipi di interazioni, dovuti alle forze di van der Waals ed alle interazioni non-polari, con effetto però trascurabile.

Una resina a scambio ionico è costituita da una matrice di particelle sferiche sostituite con gruppi carichi positivamente o negativamente. La matrice è generalmente porosa per aumentare la superficie di scambio ionico ed ottimizzare quindi la risoluzione.

La resina attiva può essere utilizzata praticamente per semplice dispersione nella soluzione da trattare, cioè in batch, oppure in colonne impaccate, il che rende molto più agevole il suo impiego soprattutto in applicazioni produttive.

L'uso della colonna riempita di resine attive prevede generalmente una discreta dimensione del diametro della colonna ed un'altezza spesso inferiore al diametro stesso. Ciò al fine di favorire il flusso attraverso la resina attiva, quindi accelerare i tempi di passaggio della soluzione proteica all'interno della fase stazionaria.

È evidente che il tempo di contatto fra le SP e le resine deve essere più lungo di quello necessario alla cinetica di scambio, che comunque è relativamente breve (1-2 minuti.).

L'uso in batch delle resine in generale si effettua a livello di laboratorio per mettere a punto il processo separativo.

La resina è condizionata con soluzioni tampone ad hoc in funzione del tipo di molecole da separare e della natura chimica del supporto. Caricato il campione ed avvenuta l'interazione specifica tra molecola e resina, il rilascio può avvenire variando il pH o la molarità della soluzione tampone.

La figura 8.2 schematizza le tre fasi necessarie ad ottenere una separazione con resine a scambio ionico: nella prima fase la resina viene caricata in una apposita colonna in cui viene idratata e lavata con la soluzione tampone. Nella fase 2 si immette nella colonna la soluzione contenente le sostanze da separare, nel caso specifico una miscela di sieroproteine. Il flusso di alimento deve essere studiato per garantire il necessario tempo di reazione fra supporto, detto fase stazionaria, e la soluzione proteica, detta fase mobile.

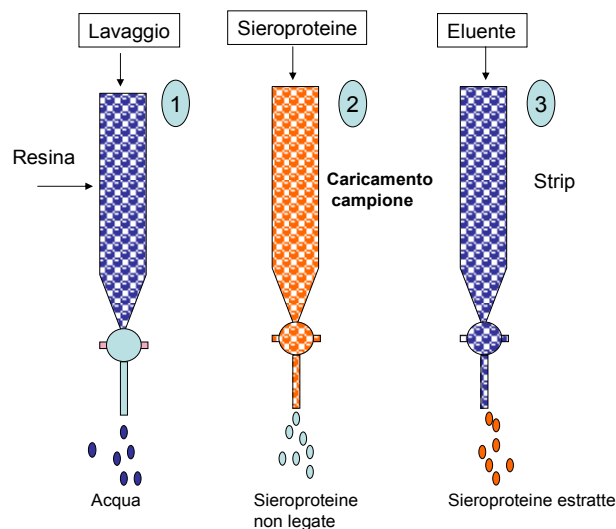


Figura 8.2
Schema delle operazioni di caricamento ed estrazione delle SP su resina

Le sieroproteine che non si legano alla fase stazionaria eluiscono insieme alla soluzione tampone. Nella fase 3, le SP legate alla fase stazionaria sono estratte con soluzioni tampone a determinati pH e/o molarità.

Le condizioni del campione caricato sono importanti al fine di ottenere alta capacità risolutiva, buona separazione delle molecole e la massima capacità di caricamento.

Teoricamente il campione deve essere nelle stesse condizioni della soluzione tampone iniziale con la quale si condiziona la resina.

Caricato tutto il campione e lavata la resina al fine di far uscire con la corrente liquida tutte le molecole non legate alla resina, si alterano le condizioni della soluzione tampone (pH e/o molarità) per estrarre selettivamente soltanto le molecole legate chimicamente alla resina, nel caso dello scambio ionico, oppure adsorbite.

Quando aumenta la forza ionica della soluzione tampone, gli ioni, generalmente Na^+ o Cl^- , competono con la componente legata permettendone l'eluizione. Le proteine con la minore carica superficiale al determinato pH sono le prime ad eluire; quelle più cariche necessitano una maggiore forza ionica della soluzione tampone per essere staccate dal supporto stazionario.

Controllando i cambiamenti della forza ionica della soluzione tampone utilizzando un gradiente specifico, le proteine eluiscono separatamente purificate e concentrate.

Dopo l'eluizione con la soluzione tampone con la più alta forza ionica, la resina è riequilibrata con la soluzione tampone iniziale prima di caricare un nuovo campione.

Alternativamente si può operare massimizzando il legame dei contaminanti e facilitando l'eluizione delle molecole d'interesse.

Nella figura 8.3 si riporta uno schema grafico che intende illustrare le varie fasi di funzionamento della resina nella fase di preparazione, legame selettivo con l'analita e rilascio della componente sequestrata.

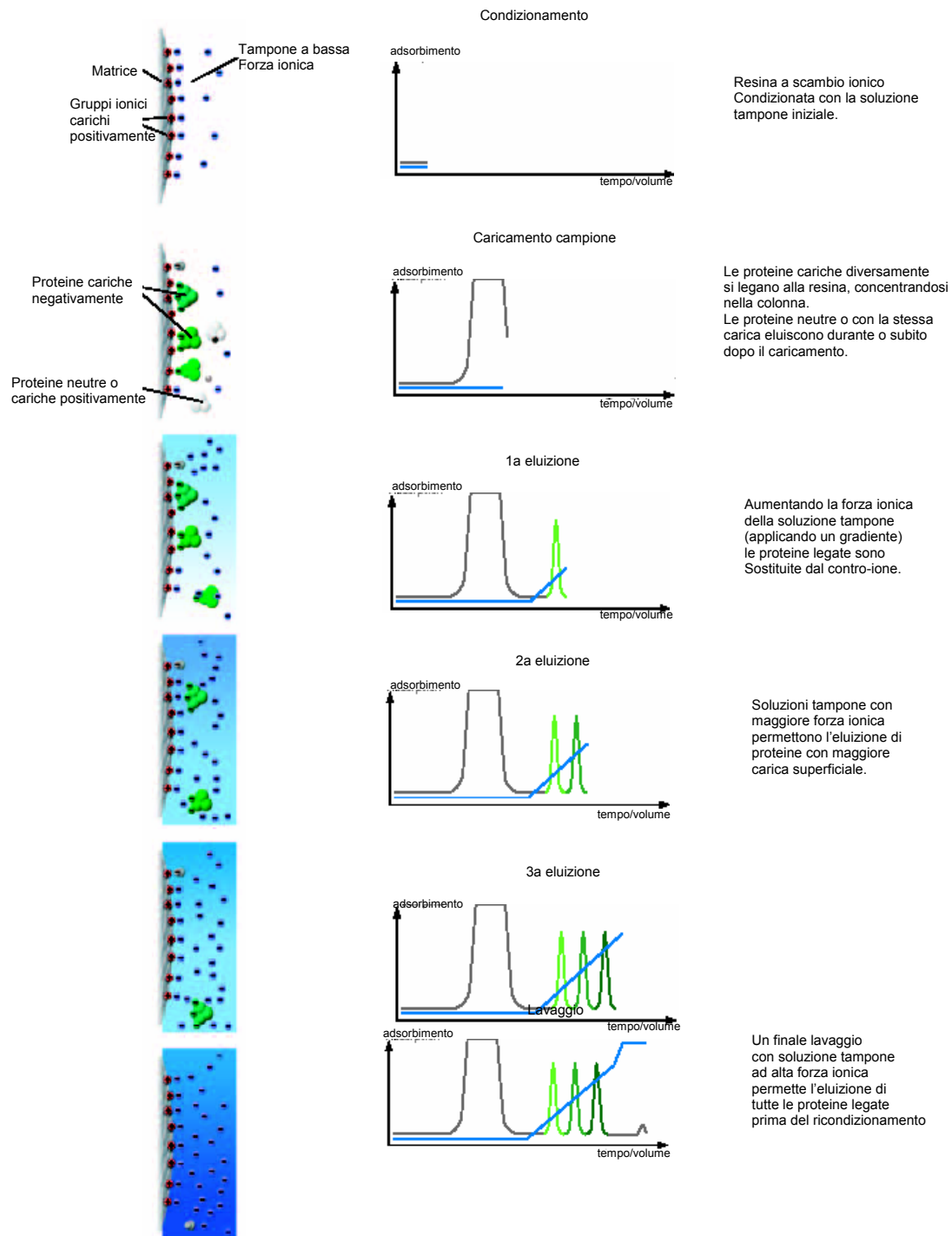


Figura 8.3
Schema di separazione con resina a scambio anionico

La selettività è fortemente dipendente dal pH di lavoro. Una buona selettività è ottenibile operando al pH che massimizza la differenza di carica superficiale delle proteine d'interesse.

L'effetto del pH sulla selettività delle proteine è rappresentato in figura 8.4.

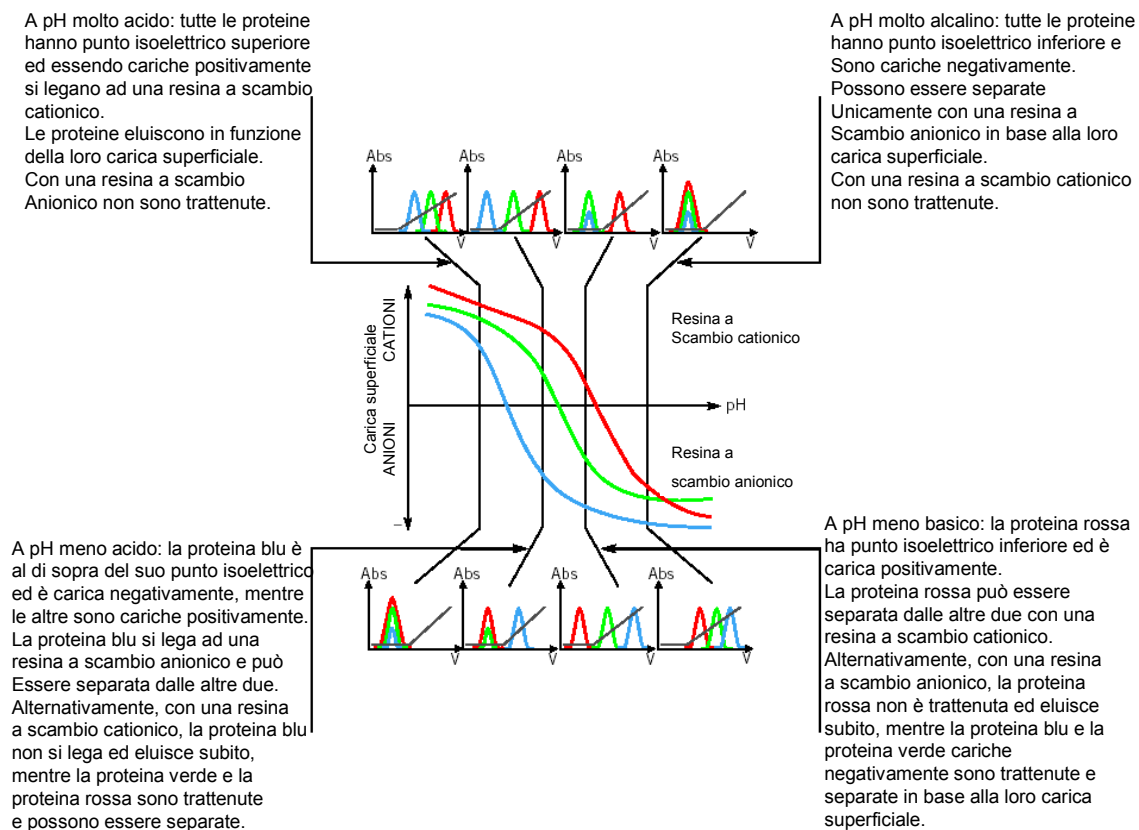


Figura 8.4
Effetto del pH sull'interazione resina-proteina e sul profilo di eluizione

8.2 Resine a scambio ionico e capacità legante

Le resine per cromatografia a scambio ionico sono costituite da matrici porose o non-porose scelte in funzione della loro stabilità fisica, resistenza chimica alle condizioni di lavaggio e di ricondizionamento e al loro grado di interazioni specifiche e non-specifiche. Le matrici sono sostituite con gruppi funzionali che determinano l'effettiva carica della resina.

Un'alta porosità offre una grande superficie di carica permettendo un'elevata capacità legante. Un'alta porosità è vantaggiosa quando si devono separare grandi biomolecole.

Matrici non-porose sono preferibili per ottenere separazioni con elevatissime risoluzioni e quando devono essere evitati processi di diffusione.

Una matrice inerte minimizza le interazioni non-specifiche con componenti del campione.

Un'elevata stabilità fisica evita cambiamenti del volume della resina al variare della forza ionica o pH delle soluzioni tampone migliorando la riproducibilità e permettendo elevati flussi d'eluato soprattutto durante le fasi di lavaggio e ricondizionamento.

Un'elevata stabilità chimica permette lavaggi con reagenti chimici forti (acidi o basici).

Le resine a scambio ionico usano matrici polimeriche o in agarosio.

I gruppi funzionali sostituiti sulla matrice cromatografia determinano la carica sul mezzo cromatografico: uno scambiatore anionico carico positivamente o uno scambiatore cationico carico negativamente.

Il termine “forte o debole” dello scambiatore ionico non si riferisce alla forza del legame tra gruppo funzionale e proteina, ma allo stato di ionizzazione dei gruppi funzionali, al variare del pH. Scambiatori ionici forti non mostrano variazioni nella capacità di scambio ionico al variare del pH. Questi scambiatori non lasciano o prendono protoni al variare del pH e non mostrano quindi capacità tamponante, rimanendo carichi in un largo range di pH.

Un vantaggio degli scambiatori ionici deboli è dovuto ad una differente selettività rispetto gli scambiatori ionici forti. Uno svantaggio deriva invece dal fatto che gli scambiatori ionici deboli possono lasciare o prendere protoni al variare del pH, quindi si registra una differente capacità legante in funzione del pH.

Nella figura 8.5 si riportano alcune matrici e gruppi funzionali di resine a scambio ionico, che caratterizzano i principali prodotti sul mercato.

La *capacità* di una resina a scambio ionico è la misura quantitativa dei contro-ioni legati (proteine o molecole cariche). La *capacità ionica totale* dipende dal numero di gruppi funzionali carichi per ml di resina, che è una caratteristica specifica del tipo di resina considerato.

Alcuni tipi di scambiatori ionici più diffusi

Tipo	Matrici	Gruppi funzionali	Nome del gruppo funzionale
Acido debole (scambiatore cationico)	Agarosio	$-\text{COO}^-$	Carbossile
	Cellulosa	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	Carbossimetile
	Destrano		
	Poliacrilato		
Acido forte (scambiatore cationico)	Cellulosa	$-\text{SO}_3^-$	Solfo
	Destrano	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Solfometile
	Polistirene	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	Solfopropile
Basico debole (scambiatore anionico)	Agarosio	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	Amminoetile
	Cellulosa	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	Dietilamminoetile
	Destrano		
	Polistirene		
Basico forte (scambiatore anionico)	Cellulosa	$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$	Trimetilamminometile
	Destrano	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$	Trietilamminometile
	Polistirene	$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Dimetil-2-
		$\begin{array}{c} \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	idrossietilamminometile
		$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	Dietil-2-
		$\begin{array}{c} \\ \text{CH}_2\text{CHCH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	idrossipropilamminoetile

Figura 8.5
Principali matrici e gruppi funzionali delle resine a scambio ionico

Di maggiore rilevanza pratica è la quantità di proteine che si può legare alla resina in determinate condizioni operative. Questo valore viene definito come *capacità disponibile* della resina per ogni specifica proteina. Se le condizioni definite comprendono il flusso operativo, la quantità legata è definita come *capacità dinamica*. La capacità disponibile e la capacità dinamica dipendono dalle proprietà delle proteine, dalla natura chimica della resina e dalle condizioni di processo (pH, forza ionica, contro-ione, flusso, temperatura). Le capacità di una resina cambiano in base alle dimensioni molecolari delle proteine (capacità di entrare in tutti i pori della matrice) ed alla loro relazione carica/pH (ad un determinato valore di pH, la proteina deve mostrare la corretta carica superficiale con adeguata densità di carica).

8.3 Frazionamento selettivo delle sieroproteine con cromatografia a scambio cationico

Molti processi sono stati studiati e realizzati su scala commerciale per la produzione di frazioni proteiche del siero di latte. Principalmente i processi separativi possono essere inclusi in tre grandi categorie: la precipitazione selettiva indotta dal cambiamento delle proprietà fisiche della matrice (Amundson 1982; Pearce 1983; Outinen 1996); i processi separativi con tecnologie di filtrazione tangenziale a membrana e con membrane a scambio cationico (Clovis 1997; Zydney 1998); l'adsorbimento selettivo (Hahn 1998; Gurgel 2000; Xiuyun Ye 2000; Shireen 2004).

La precipitazione selettiva delle proteine del siero è un processo fortemente dipendente dal volume per cui la capacità degli impianti ed i costi industriali sono proporzionali al volume da trattare e non alla quantità del prodotto ottenuto.

Le tecnologie di filtrazione a membrana sono uno strumento eccezionale per il frazionamento del siero di latte, seppur la separazione selettiva delle singole proteine risulta difficile sia per le numerose interazioni tra proteine, zuccheri e grassi e tra proteine stesse, sia per la notevole influenza del pH e della forza ionica della matrice.

I processi cromatografici sono particolarmente selettivi nei confronti delle singole famiglie proteiche. In particolare, essendo le proteine biomolecole generalmente cariche, la cromatografia a scambio ionico si presta in maniera ottimale alla separazione selettiva e purificazione delle singole proteine.

Nel processo di trattamento del siero di latte proposto in questo lavoro, si applica la cromatografia a scambio ionico sulla frazione di siero concentrata in ultrafiltrazione, al fine di recuperare lattoferrina (Lf) e lattoperossidasi (Lp) purificate ed ulteriormente concentrate.

Lf e Lp sono presenti nel siero con concentrazioni di circa 30-200 mg/L e 10-50 mg/L. I punti isoelettrici di Lf e Lp sono rispettivamente 7,8-8 e 9,0-9,5. A valori di pH 6,5-7,5, Lf e Lp sono cariche positivamente, mentre tutte le altre proteine del siero sono cariche negativamente o neutre, e possono quindi essere trattenute e purificate da resine cromatografiche a scambio cationico.

In particolare è stata impiegata una resina scambio cationico debole della Pharmacia con gruppi funzionali carbossi-metil.

La prova è stata realizzata in batch, sia su siero di capra che su siero di pecora, entrambi centrifugati per 15' a 5000 giri/minuto e portati a pH 7 con soluzione di soda concentrata al 32%.

La conducibilità del siero di capra e del siero di pecora è rispettivamente 5,52 mS/cm e 4,74 mS/cm.

A 500 ml di entrambi i tipi di siero è stato aggiunto 1 g di resina secca che è stata lasciata in agitazione per circa 1 ora a 4 °C.

La resina in forma di gel è stata in seguito lasciata depositare ed è stato prelevato il siero surnatante, sul quale è stato aggiunto un altro grammo di resina secca per un secondo trattamento di circa un'ora sempre a freddo (5 °C) ed in condizione di agitazione con ancorotta magnetica.

La resina depositata nelle due prove successive è stata unita e lavata tre volte con aggiunta di 200 ml di tampone fosfato 20 mM pH 7,2 (start buffer SB).

Il rilascio di Lf e Lp è stato ottenuto con un tampone fosfato 20mM pH 7,2 con aggiunta di sale, 0,25M NaCl (eluent buffer EB).

Nella figura 8.6 sono riportati i cromatogrammi ottenuti all'HPLC del siero di capra e del primo surnatante.

Le figure 8.7 e 8.8 sono degli ingrandimenti del cromatogramma 8.6, in particolare dei picchi relativi alla Lf ed alla Lp.

Nella figura 8.9 sono riportati i cromatogrammi relativi alla prova cromatografia con siero di pecora, con i relativi ingrandimenti delle figure 8.10 e 8.11.

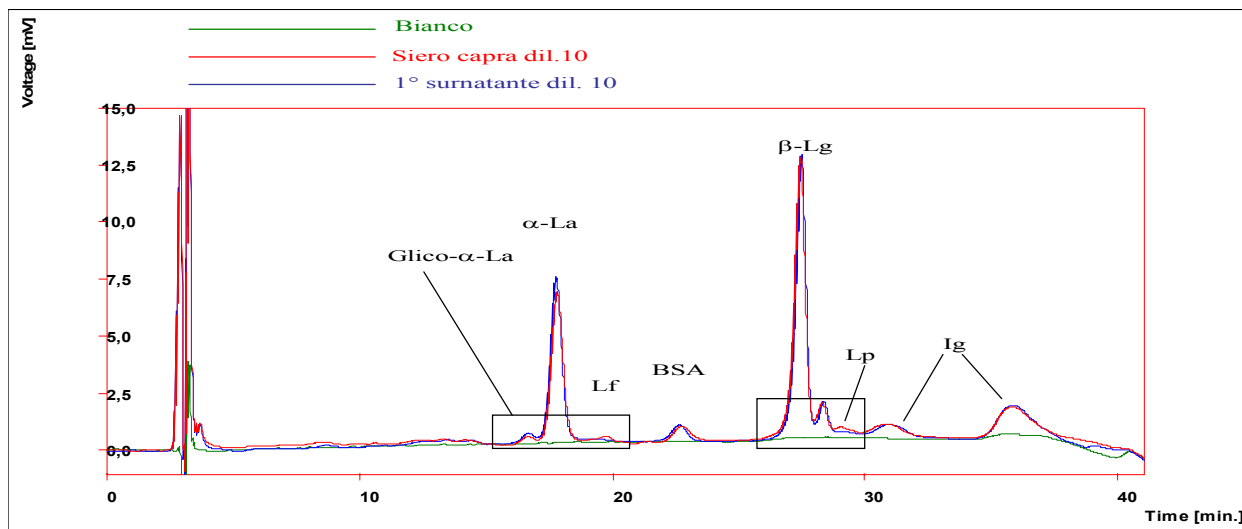


Figura 8.6
Cromatogramma HPLC del siero di capra e del surnatante dopo trattamento con resina a scambio cationico debole

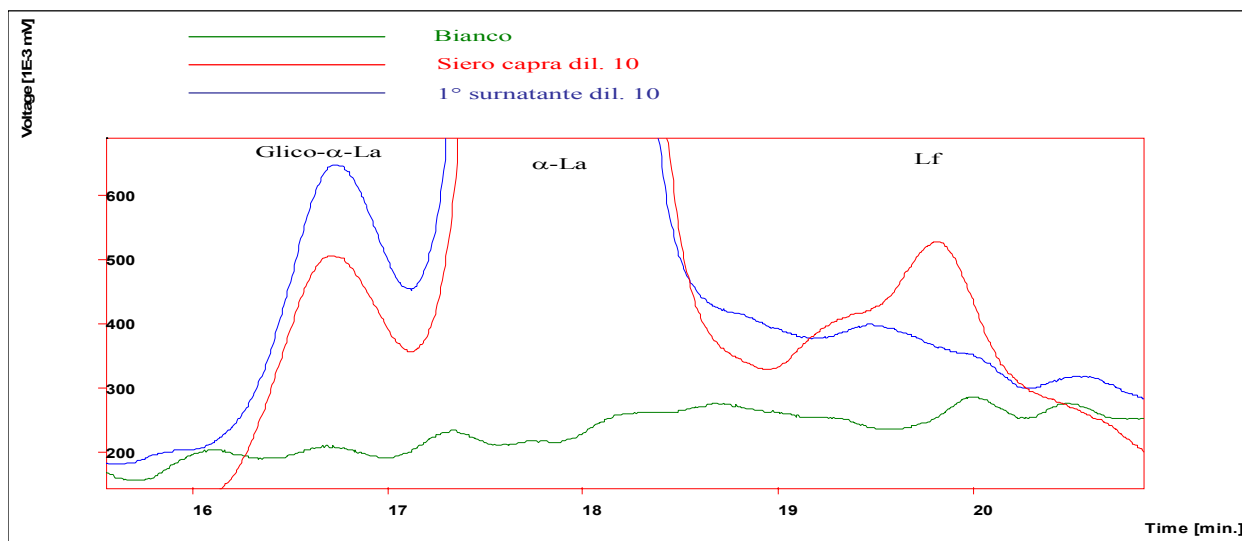


Figura 8.7
1° ingrandimento del cromatogramma HPLC del siero di capra e del surnatante dopo trattamento con resina a scambio cationico debole

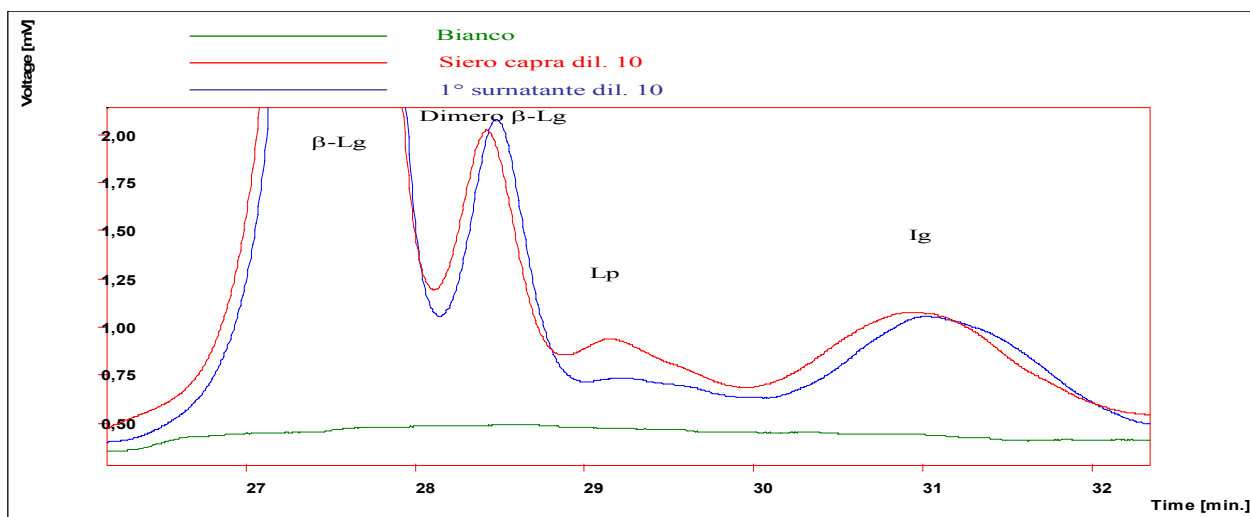


Figura 8.8
2° ingrandimento del cromatogramma HPLC del siero di capra e del surnatante dopo trattamento con resina a scambio cationico debole

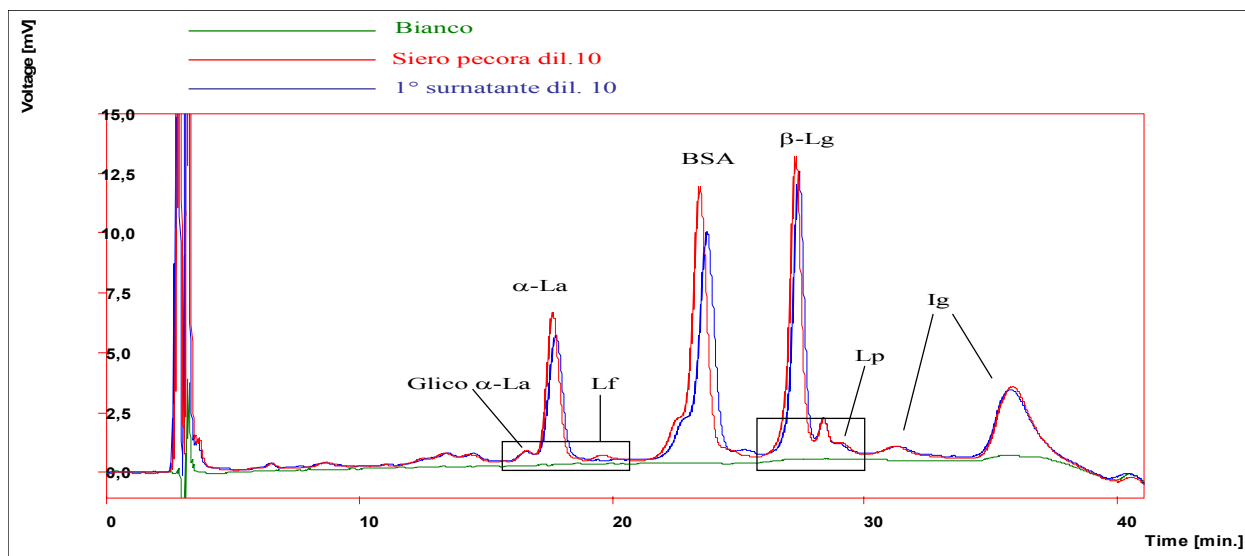


Figura 8.9
Cromatogramma HPLC del siero di pecora e del surnatante dopo
trattamento con resina a scambio cationico debole

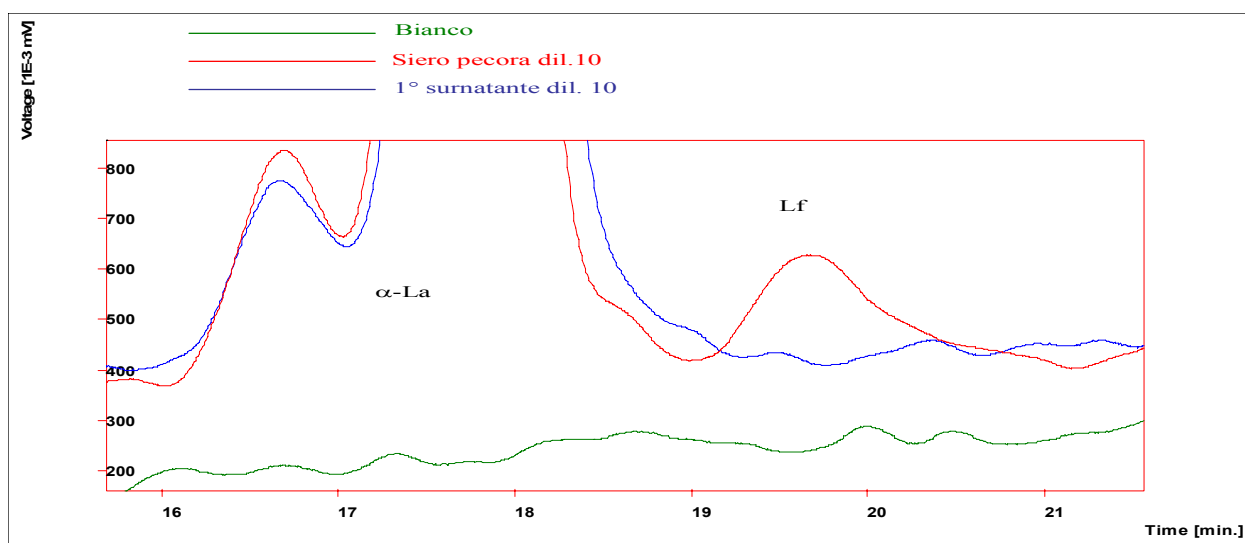


Figura 8.10
1° ingrandimento del cromatogramma HPLC del siero di pecora e del
surnatante dopo trattamento con resina a scambio cationico debole

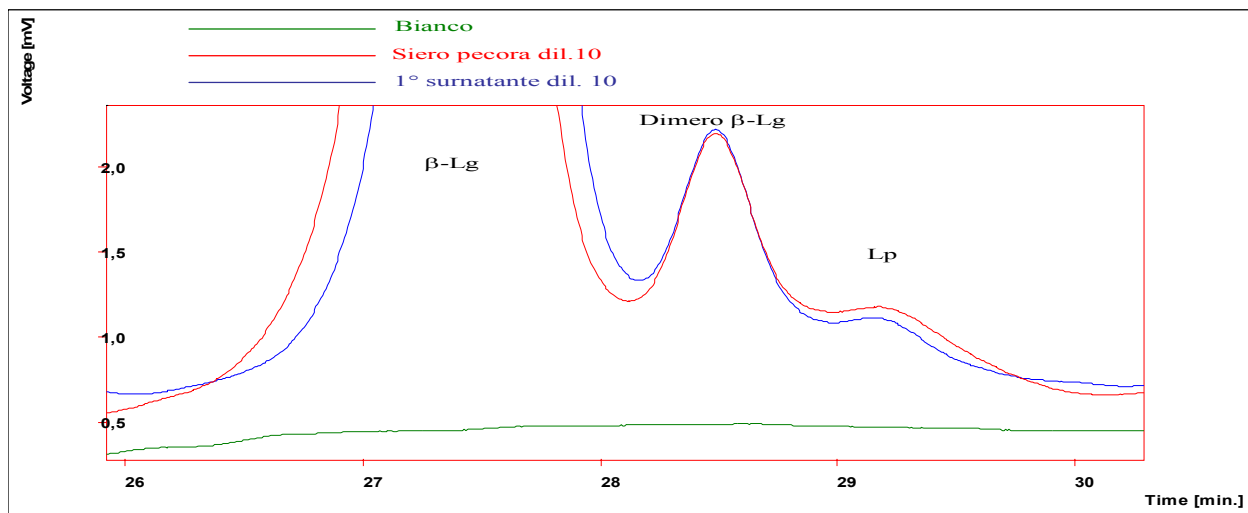


Figura 8.11
2° ingrandimento del cromatogramma HPLC del siero di pecora e del surnatante dopo trattamento con resina a scambio cationico debole

Come si nota dai cromatogrammi riportati nelle figure precedenti, la resina a scambio cationico debole, a pH 7, risulta essere particolarmente selettiva nei confronti della Lf e della Lp, anche se l'assorbimento inico fra SP e supporto non è stato mai quantitativo.

A pH 7, infatti, α -La, β -Lg, BSA sono cariche negativamente, le Ig sono principalmente neutre o cariche negativamente, mentre Lf e Lp sono le uniche a mostrare carica superficiale positiva.

Le figure 8.12 e 8.13 mostrano i cromatogrammi della frazione eluita (EB) purificata ed arricchita di Lf e Lp, rispettivamente nella prova cromatografica con siero di capra e di pecora.

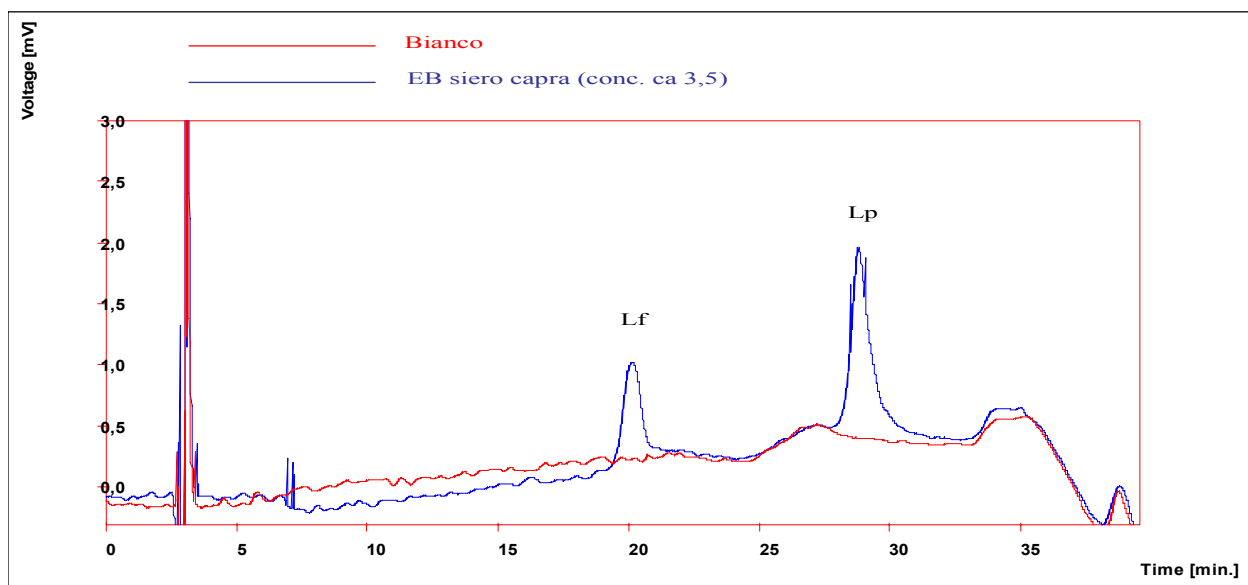


Figura 8.12
Cromatogramma HPLC della frazione purificata e concentrata nella prova cromatografica con siero di capra (EB)

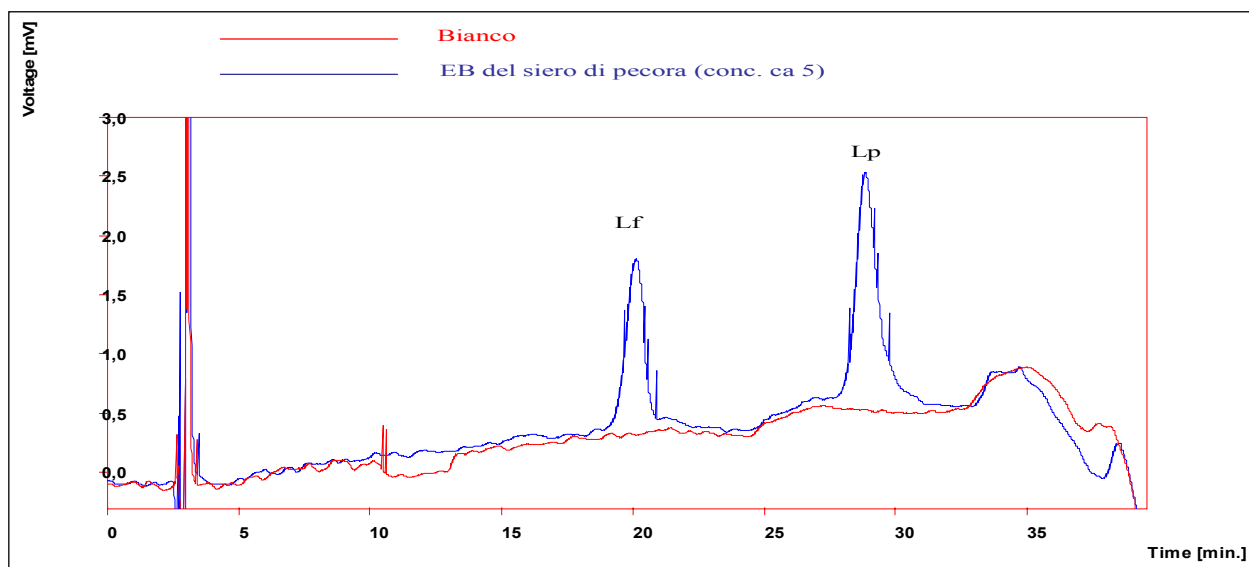


Figura 8.13
Cromatogramma HPLC della frazione purificata e concentrata
nella prova cromatografia con siero di pecora (EB)

I cromatogrammi delle figure 8.12 e 8.13 confermano la facilità di rilascio delle proteine trattenute dalla resina a scambio cationico debole con lo stesso tampone di condizionamento per aggiunta di sale. All'aumentare della forza ionica del tampone il controione, in questo caso il Na^+ , si lega alla resina permettendo il rilascio delle proteine legate.

Infine, le figure 8.14 e 8.15 rappresentano l'elettroforesi SDS-PAGE su gel di acrilammide/bis-acrilammide ottenuta sulle frazioni separate nelle prove cromatografiche con siero di capra e pecora.

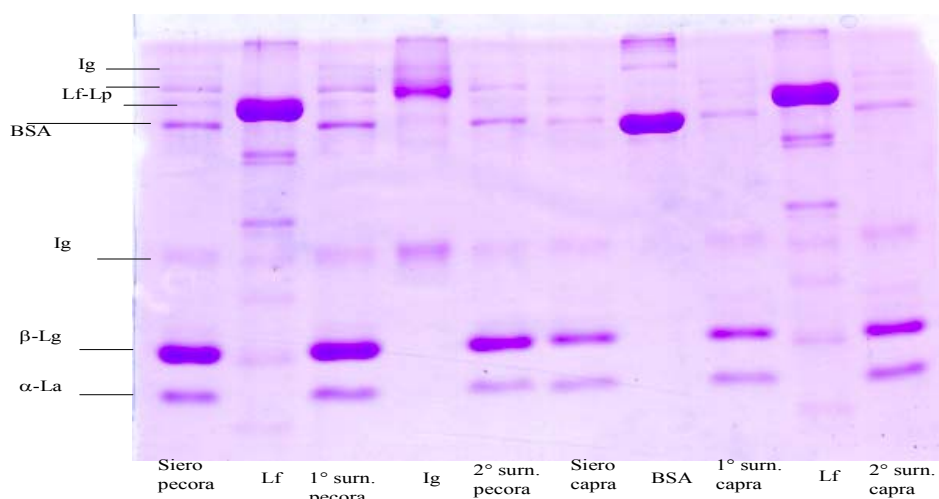


Figura 8.14
1° elettroforesi SDS-PAGE delle frazioni separate nella prova
cromatografica a scambio cationico debole con siero di capra e di pecora

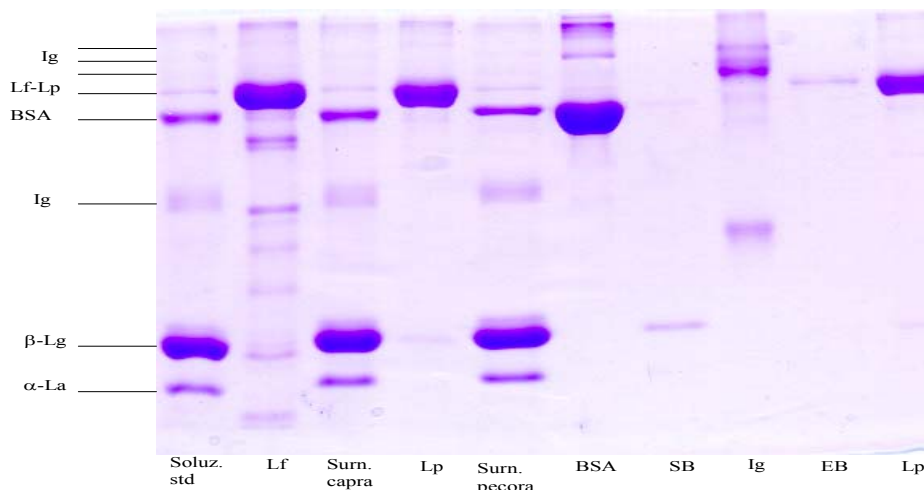


Figura 8.15

2° elettroforesi SDS-PAGE delle frazioni separate nella prova cromatografica a scambio cationico debole con siero di capra e di pecora

L'elettroforesi delle figure 8.14 e 8.15 confermano ulteriormente la selettività della resina a scambio cationico debole nei confronti di Lf e Lp e la purificazione di Lf e Lp ottenuta nella frazione eluita con tampone fosfato 20 mM pH 7,2 0,25 M in NaCl (eluent buffer).

Nella frazione SB (eluente tampone) la resina è lavata con tampone fosfato 20 mM pH 7,2 da tutte le proteine e molecole non legate. Nella corsa elettroforetica si individuano tracce di β -Lg, BSA e α -La.

D'altra parte, come già evidente dai cromatogrammi HPLC, l'elettroforesi mostra una estrazione non quantitativa di Lf e Lp. Nelle corse elettroforetiche relative al 1° surnatante sono ancora ben evidenti le bande di Lf e Lp che non sono state trattenute dalla resina e quindi rimaste in soluzione.

Le bande di Lf e Lp permangono anche nella frazione surnatante dopo il secondo trattamento con resina, facendo supporre che l'incapacità della resina di legare Lf e Lp quantitativamente dipenda dalla forza ionica troppo elevata della matrice siero e quindi dalla competizione di contro-ioni al legame sieroproteine-gruppi funzionali della resina (la conducibilità elettrica del siero di capra e di pecora è rispettivamente 5,52 mS/cm e 4,74 mS/cm).

Questa frazione non estratta è stimata in circa il 5% del totale Lf + Lp.

Bisogna ricordare che le prove sono state eseguite con la matrice reale di siero che ha un contenuto salino importante come mostrano i dati di conducibilità.

Per giungere ad una estrazione quantitativa da parte della resina è necessario operare in DF, dopo l'UF del siero, al fine di rimuovere il più possibile il contenuto salino.

A tal fine è stata condotta una prova con siero di capra diafiltrato in batch.

Al siero concentrato e diafiltrato con una conducibilità elettrica di 1,081 mS/cm, a pH 7,27 è stata aggiunta la resina lasciando in agitazione la sospensione per 2 ore. Dopo la sedimentazione della resina è stato raccolto il surnatante, quindi è stato aggiunto la start buffer (tampone fosfato 20 mM pH 7,2) per lavare la resina da tutte le impurità non legate.

Il rilascio delle proteine è stato ottenuto con eluent buffer 0,25 M NaCl e 0,5 M NaCl. I cromatogrammi HPLC delle frazioni separate, sono riportati nelle figure 8.16 e 8.17.

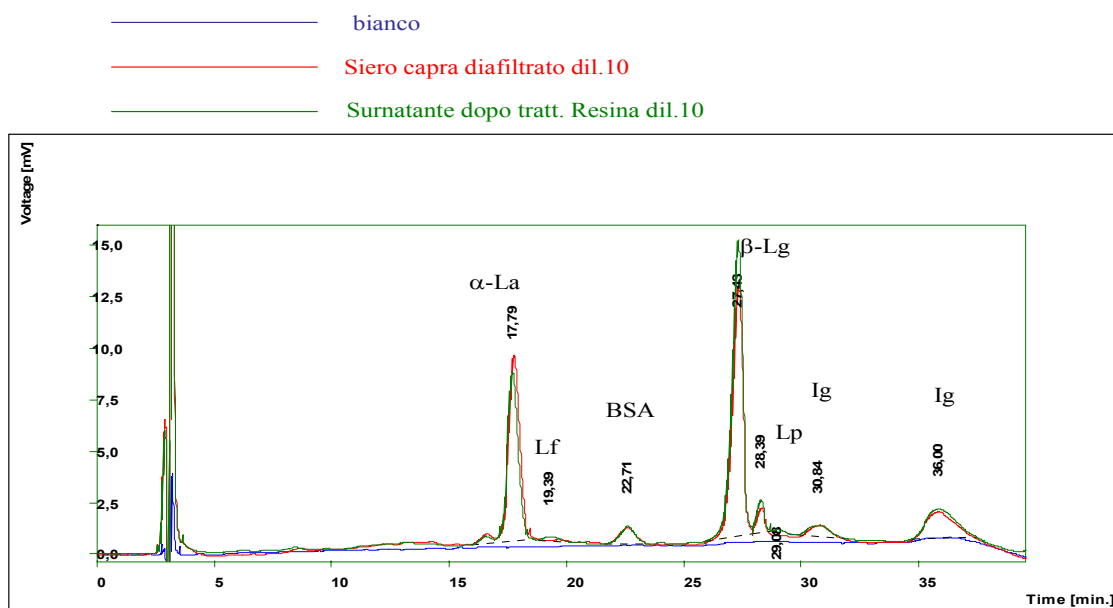


Figura 8.16
Cromatogrammi del siero di capra diafiltrato e del surnatante dopo trattamento con resina

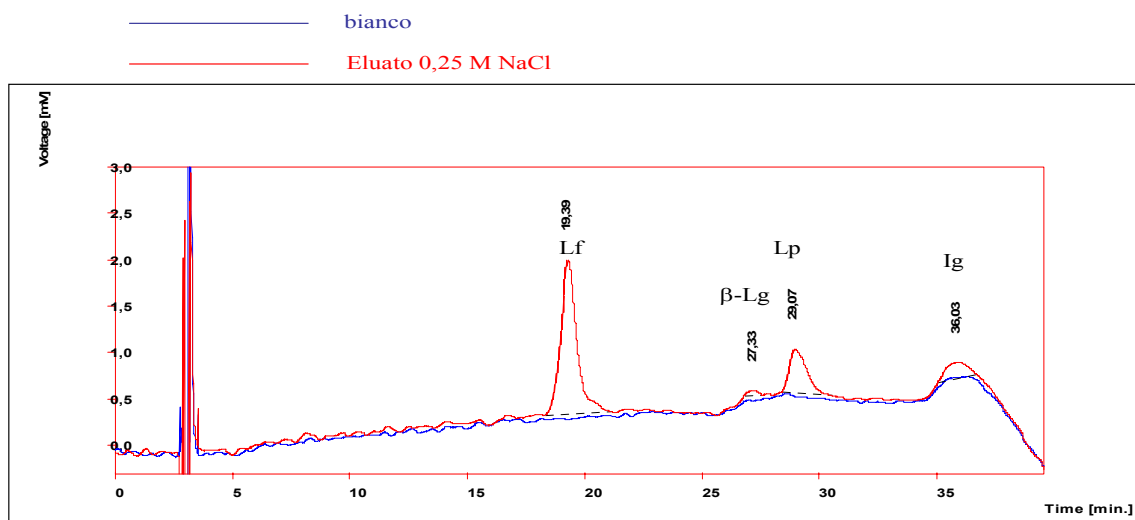


Figura 8.17
HPLC del surnatante con eluent buffer 0,25 M NaCl

I risultati analitici, espressi in ppm ed mg, sono riportati nelle tabelle 8.1 e 8.2.
L'elettroforesi delle frazioni separate nella prova è stata effettuata su gel di acrilammide/bis-acrilammide operando ad una differenza di potenziale di 50V per 20 minuti e a 110 V per 75 minuti. Il gel ottenuto è riportato in figura 8.18.

Frazione	α-La (ppm)	β-Lg (ppm)	BSA (ppm)	Lf (ppm)	Lp (ppm)	Ig (ppm)
Siero capra diafiltrato	1.278,62	4.173,41	239,69	65,20	35,24	799,40
Surnatante dopo trattamento resina	1.265,23	3.703,09	237,33	18,81	1,96	720,73
Eluato con tampone 0,25M NaCl	-	8,58	-	107,55	117,41	119,10
Eluato con tampone 0,5M NaCl	-	1,30	-	43,24	23,32	13,31

Tabella 8.1
Risultati analitici in ppm della prova di separazione con resina

Frazione	α-La (mg)	β-Lg (mg)	BSA (mg)	Lf (mg)	Lp (mg)	Ig (mg)
Siero capra diafiltrato	255,72	834,68	47,94	13,04	7,05	159,88
Surnatante dopo trattamento resina	222,64	651,74	41,71	2,81	0,34	144,15
Eluato con tampone 0,25M NaCl	-	0,51	-	6,34	5,93	7,03
Eluato con tampone 0,5M NaCl	-	0,06	-	2,16	1,17	0,66

Tabella 8.2
Risultati analitici in mg della prova di separazione con resina

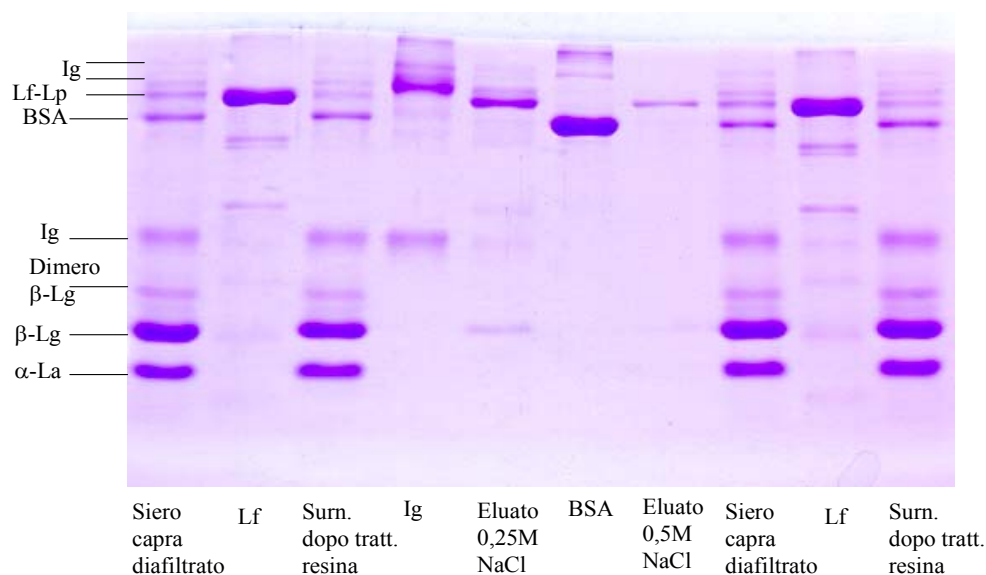


Figura 8.18
Elettroforesi della prova di separazione in resina del 3 novembre 2005

Come si nota dall'elettroforesi delle frazioni separate, la resina non ha legato quantitativamente Lf e Lp. Bande relative a Lf e Lp sono ancora presenti nella corsa relativa al surnatante dopo il trattamento con resina.

In base ai risultati analitici si conclude che l'estrazione delle due sieroproteine d'interesse (Lf e Lp) presenta un rendimento del 75% quando viene trattato il siero tal quale, mentre la resa estrattiva aumenta all'85% con il siero diafiltrato. Operando con siero diafiltrato sono estratte anche tracce di β -Lg ed Ig.

La capacità legante rispetto Lf e Lp è, in queste condizioni di 42,37 mg/g di resina secca.

8.4 Bibliografia

Amundson, C. H., Watanawanichakorn, S., Hill, C.G. (1982). "Production of enriched protein fractions of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cheese whey." J Food Proc Preserv 6: 55-71.

Clovis, K., Etzel, C.R., Etzel, M.R. (1997). "Fractionation of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane." J Food Science 62: 996-1000.

Gurgel, P. V., Carbonel, R.G., Swaisgood, H.E. (2000). "Fractionation of whey proteins with a hexapeptide ligand affinity resin." Bioseparation 9: 385-392.

Hahn, R., Schulz, P.M., Schaupp, C., Jungbauer, A. (1998). "Bovine whey fractionation based on cation-exchange chromatography." J Chrom A 795: 277-287.

Outinen, M., Tossavainen, O., Tupasela, T., Koskela, P., Koskinen, H., rantamaki, P., et al. (1996). "Fractionation of proteins from whey with different pilot scale processes." Lebensm-Wiss u-Technol, 29: 411-417.

Pearce, R. J. A. (1983). "Thermal separation of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin in bovine Cheddar cheese whey." J Dairy Technol 38: 144-149.

Shireen, D., Nazan Turhan, K., Etzel, m.R. (2004). "Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography." Process biochemistry 39: 1737-1743

Xiuyun Ye, S. Y., T.B. Ng, (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.

Zydney, A. L. (1998). "Protein separation using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation." Int Dairy J 8: 243-250.

CAPITOLO 9

FORMULATI COMMERCIALI DI SIERO IN POLVERE



Indice dei paragrafi

9.1 Le polveri commerciali a base di siero di latte	211
9.2 Analisi chimica delle nostre polveri e di quelle commerciali	216
9.3 Bibliografia web	220

La polvere è la formulazione ottimale per tutti prodotti ottenuti dal siero di latte, indipendentemente dal suo livello di purezza e dal suo impiego commerciale.

Infatti sia l'industria alimentare che quella degli integratori alimentari utilizzano prodotti in polvere essiccata.

Nella grande categoria degli integratori sportivi un posto particolare è dedicato alle proteine del siero di latte.

Generalmente le grandi industrie produttrici pongono sul mercato quantitativi molto rilevanti di prodotto caratterizzati da un contenuto percentuale di sieroproteine (SP) che oscilla dal 10 al 90%.

Le materie prime in polvere essiccata hanno mediamente un contenuto in umidità inferiore al 4%. In questo modo il prodotto si conserva per lunghi tempi e rimane chimicamente stabile. Tuttavia anche questi formulati hanno una scadenza d'uso poiché si tratta di materiale comunque soggetto a degradazioni, soprattutto se contiene frazioni di materia grassa che si ossidano facilmente.

Le polveri sono facilmente utilizzabili per produrre integratori alimentari, di solito con l'aggiunta di altre sostanze come vitamine, sali minerali, creatina, glutazione ecc.

Le SP in forma liquida, come quelle che si ottengono dal concentrato di ultrafiltrazione, oppure dal diafiltrato, possono essere ulteriormente purificate per essere immesse sul mercato, come prodotto finito che comunque finisce in forma di polvere.

Le purificazioni riguardano sostanzialmente l'eliminazione ulteriore del lattosio, dei grassi e dei sali minerali, ma anche la separazione delle SP fra loro, in modo da ottenere le così dette WPI (Whey Protein Isolated) che hanno un prezzo di vendita più elevato.

Ad esempio, è molto interessante estrarre dalle SP la lattoferrina, la lattoperoxidasi e le immunoglobuline per le loro spiccate proprietà biologiche.

Le tecniche utilizzate per separare le SP fra loro si basano sostanzialmente sull'impiego di tecniche di cromatografia, come è stato discusso nel capitolo 8 del presente lavoro.

9.1 Le polveri commerciali a base di siero di latte

Sul mercato internazionale sono presenti molti produttori di polveri sieroproteiche e di derivati del lattosio commercializzati in forme diverse.

Nella tabella 9.1 si riportano le più importanti società internazionali produttrici di polveri sieroproteiche e derivati, ottenuti in massima parte dal siero e parzialmente dal latte.

A livello di mercato le WPC si producono a diversa composizione, in particolare ci sono le WPC 35, 50, 65 e 80% in proteine vere. Infatti l'azoto totale delle polveri è sempre più alto delle proteine vere poiché viene determinato anche il contenuto di frammenti proteici ed anche di composti azotati non proteici, come l'urea, e peptidi a diverso peso molecolare.

Nella tabella 9.2 si riportano le composizioni percentuali medie di polveri standard di siero.

Ricavare informazioni precise sul mercato internazionale dei prodotti ricavati dal siero è un'impresa praticamente impossibile, vista la vastità e la tipologia di prodotto commercializzato in scala mondiale. Possiamo però fornire alcuni esempi anche per avere un quadro sulle specifiche chimiche e sul prezzo di questi formulati, in gran parte disponibili sul web.

Aziende	Paese
Armor Proteines	Francia
Bayerische Milchindustriei	Germania
Borculo Whey Product's	Olanda
Briner Bridel	Francia
Dairy Gold	Irlanda
DMV	Danimarca
MILEI	Germania
Eurial	Francia
Ingredia	Francia
Irish Dairy Board	Irlanda
Lacto Serum France	Francia
Meggle	Germania
New Zealand Limit. Corp.	Nuova Zelanda
Valio International	Finlandia
Whey Systems Inc.	USA
Davisco	USA

Tabella 9.1
Principali aziende mondiali produttrici di sieroproteine e lattosio

Composizione (%)	Polvere 35	Polvere 50	Polvere 65	Polvere 80
Umidità	4,6	4,3	4,2	4,0
Proteine vere	29,7	40,9	59,4	75,0
Azoto totale	36,2	52,1	63,0	81,0
Lattosio	46,5	31,0	21,1	3,5
Grassi	2,1	3,7	5,6	7,2
Ceneri	7,8	6,4	3,9	3,1
Acido lattico	2,8	2,6	2,2	1,2

Tabella 9.2
Composizione media dei principali formulati commerciali

Paese	Proteine (%)	Lattosio (%)	Prezzo (€/kg)
Grecia	35	64	3,7
Polonia	65	30	3,0
Canada	80	15	4,25
Grecia	80	14	4,85
Canada	14	80	3,25

Tabella 9.3
Prezzi all'ingrosso di polveri sieroproteiche per l'industria alimentare

Nella tabella 9.3 si riporta la composizione chimica di diverse polveri proteiche (WPC) non estremamente purificate con il relativo prezzo di vendita all'ingrosso. Si tratta di produzioni destinate all'industria alimentare.

Dalla tabella si vede che il prezzo della polvere dipende dal contenuto percentuale di SP della polvere. Sono riportate le specifiche di un altro prodotto commerciale in polvere, denominato Amino Mass. Di seguito si riportano testualmente le indicazioni fornite dal produttore.

Integratore di peptidi del siero di latte derivati dalla predigestione enzimatica delle proteine del siero di latte isolate ed arricchito con vitamina B6.

Le sieroproteine sono la fonte proteica con più elevato valore biologico, ed hanno un elevato contenuto di aminoacidi a catena ramificata. L'avanzatissimo processo di predigestione utilizzato in AMINO MASS produce peptidi a basso peso molecolare (peptidi a corta e media catena). I peptidi a basso peso molecolare sono assorbiti più rapidamente ed efficacemente rispetto alle proteine intere e agli aminoacidi in forma libera. I peptidi contenuti in AMINO MASS aiutano attivamente a mantenere un bilancio azotato positivo.

AMINO MASS è disponibile esclusivamente in tavolette deglutibili. Infatti i peptidi a basso e a bassissimo peso molecolare risultano estremamente amari e sono quindi sgradevoli al palato se utilizzati in polvere e miscelati in acqua o latte.

Distribuzione tipica dei pesi molecolari dei peptidi contenuti in AMINO MASS espressi in percento: più di 10.000: 4%, da 10.000 a 5.000: 26,5%, da 5.000 a 2.000: 14,5%, da 2.000 a 1.000: 29,5%, meno di 1.000: 25,5% AMINO MASS è disponibile in confezioni da 250, 625 e 1250 tavolette

INGREDIENTI: proteine del siero di latte idrolizzate; stabilizzante: E1201, aromi, vitamina B6. Costo della confezione 260 g; 17.83 €

Da quanto enunciato si vede che il prodotto per *body-building* ha un costo dell'ordine dei 60 €/kg, rispetto ai 4,5 €/kg del prodotto destinato all'industria alimentare.

Si riportano le specifiche dichiarate dal prodotto di un preparato denominato PRO TIME

Proteine del siero di latte (44,5%), caseine (44,4%) e proteine del bianco d'uovo (6%).

Di seguito si riportano le specifiche del prodotto dichiarate dal produttore.

*Elevato VALORE BIOLOGICO ed EFFICIENZA PROTEICA**

Rilascio GRADUALE degli aminoacidi: le proteine contenute in PRO TIME hanno tempi di digestione differenziati, perciò forniscono aminoacidi in modo più costante rispetto a una proteina da una singola fonte 83% di PROTEINE sul secco e solo lo 0,4% di GRASSI (per il gusto vaniglia)* Apporto di aminoacidi più bilanciato rispetto ad un'unica fonte di proteine* Con vitamine. Solubilità istantanea ed ottimo gusto. 30 g si sciolgono in 150 ml di acqua circa.*

Proteine del siero di latte (44,5%), caseine (44,4%) e proteine del bianco d'uovo (6%) Elevato VALORE BIOLOGICO ed EFFICIENZA PROTEICA digestione differenziati, perciò forniscono aminoacidi in modo più costante rispetto a una proteina da una singola fonte :83% di PROTEINE sul secco e solo lo 0,4% di GRASSI (per il gusto vaniglia) Apporto di aminoacidi Più BILANCIATO rispetto ad un'unica fonte di proteine.

Con vitamine. Solubilità istantanea ed ottimo gusto. 30 g si sciolgono in 150 ml di acqua circa. Disponibile in confezioni da 700 g nei gusti cacao, vaniglia, banana, cocco, caffè, melone, ciliegia, frutti di bosco, pesca, tropicale e da 2,4 kg nei gusti cacao, vaniglia, caffè. PRO TIME è un integratore dietetico ad elevato apporto proteico formulato per garantirti un apporto ottimale di aminoacidi ed il loro rilascio graduale.

PRO TIME fornisce proteine del siero di latte microfiltrate e albumina d'uovo, di veloce assimilazione e caseine, di assimilazione più lenta. PRO TIME perciò ti permette di avere un livello di aminoacidi più costante rispetto ad un integratore proteico contenente una singola fonte di proteine. Ogni proteina contenuta in PRO TIME ha peculiari proprietà, e la formula di PRO TIME garantisce i benefici sommati delle proteine che lo costituiscono. PRO TIME ha un'aromatizzazione particolarmente curata ed offre un integratore proteico dal gusto di un frapp, anche se preparato in acqua. Finalmente assumere un integratore proteico non sarà più un dovere ma un piacere per il palato. Naturalmente l'ottimo gusto non è andato a discapito della qualità: PRO TIME non contiene zuccheri ad alto indice glicemico, come saccarosio o destrosio, i vari sciroppi zuccherini e le proteine contenute sono della massima qualità, come al solito per i prodotti Eurosup



Figura 9.1
Integratore di proteine a rilascio aminoacidico graduale

Nella tabella 9.4 si riportano alcune tipologie di prodotti per body building con relative specifiche chimiche, casa produttrice e costo di mercato.



[Anderson - Whey protein \(confezione da 750g\)](#)

100% proteine del siero del latte ultrafiltrate senza sodio e zuccheri, a basso contenuto di lattosio.in polvere solubile gusto neutro

Sport: Fitness - integratori

Spese: € 5,84 - Categoria: [Sport](#)

€ 30,59 

Da New Vitality



[Optimum - 100% whey protein 2272gr](#)

100% whey, come dice il nome è un integratore di proteine interamente derivate dal siero di latte

Sport: Fitness - integratori

Spese: € 10,00 - Categoria: [Sport](#)

€ 70,20 

Da Energy Fitness



[Eas - Simply protein 908 gr](#)

Simply protein è un integratore di 100% proteine del siero di latte, contiene sia proteine concentrate del siero di latte (wpc) per il loro alto contenuto di microfrazioni ...

Sport: Fitness - integratori

Spese: € 5,84 - Categoria: [Sport](#)

€ 40,80 

Da New Vitality



[Designer - Whey protein 906gr](#)

€ 34,20 [Vai!](#)

Da Energy Fitness

Designer protein è stato il primo integratore di proteine del siero di latte presente sul mercato ed è ancora oggi l'integratore proteico più venduto negli usa

Sport: Fitness - integratori

Spese: € 10,00 - Categoria: [Sport](#)



[Eas - Simply protein kg 2,27](#)

€ 80,00 [Vai!](#)

Da New Vitality

Simply protein è un integratore di 100% proteine del siero di latte, contiene sia proteine concentrate del siero di latte (wpc) per il loro alto contenuto di microfrazioni ...

Sport: Fitness - integratori

Spese: € 24,41 - Categoria: [Sport](#)



[Enervit - Big protein 90% 900 gr](#)

€ 34,40 [Vai!](#)

Da New Vitality

Proteine isolate del siero del latte ottenute per micro ultra filtrazione. proteine complete del latte del siero del latte e dell'albumine. stimolano la sintesi proteica ...

Sport: Fitness - integratori

Spese: € 5,84 - Categoria: [Sport](#)



[Pro action - Amino poll forte](#)

€ 27,50 [Vai!](#)

Da Oliviero.it

Integratore di aminoacidi e peptidi del siero del latte amino pool forte è un integratore dietetico in compresse a base di peptidi ottenuti da proteine del siero.

Sport: Fitness - integratori

Spese: € 7,74 - Categoria: [Sport](#)

Tabella 9.4
Esempi di formulati ad uso integratori sportivi

9.2 Analisi chimica delle nostre polveri e di quelle commerciali

Sono state studiate le composizioni di alcune polveri commerciali per valutare il vero contenuto di sieroproteine e controllare così le specifiche fornite dal produttore.

Lo studio è stato eseguito confrontando i diversi profili sieroproteici delle polveri commerciali con quelle ottenute sperimentalmente presso i laboratori della Soc. Sieroproteine.

Nelle figure 9.2-9.6 si riportano le fotografie di alcuni preparati in polvere prodotti dalla Società Sieroproteine. Si tratta di campioni ottenuti da siero caprino, ovino e bovino, come indicato nelle didascalie sottole figure.

Le polveri sono state ottenute con spray dryer pilota.



Figura 9.2
Polvere sieroproteica al 35% da siero caprino



Figura 9.3
Polvere sieroproteica al 75% da siero ovino



Figura 9.4
Polvere sieroproteica all'80% da siero ovino dopo diafiltrazione



Figura 9.5
Sieroproteine da siero ovino al 92% demineralizzato
(ultrafiltrazione+diafiltrazione)

I risultati analitici di alcuni campioni di polvere sono riportati nei cromatogrammi di figura 9.6.

Dal confronto analitico dei prodotti sul mercato con quelli prodotti dalla Soc. Sieroproteine, appare evidente la maggiore purezza del prodotto italiano, che non risulta contaminato dalla polvere di latte o da altre sostanze.

Ciò appare dalla caratteristica dei picchi cromatografici che, nel caso dei prodotti Sieroproteine, risultano coincidenti con gli standard analitici. Anche la netta separazione dei picchi cromatografici del prodotto italiano dimostra la migliore qualità delle polveri Sieroproteine.

La ricerca condotta fino ad ora dalla Società è stata focalizzata alla produzione della materia sieroproteica di base che è stata qualificata sotto il profilo della minima presenza di sali minerali e con un alto contenuto di sieproteine vere, prive anche di quelle che possono derivare dalla presenza di batteri lattici nella matrice.

Come si è affermato nel corso della trattazione, l'impiego della microfiltrazione tangenziale elimina sostanzialmente la possibilità che la polvere finale possa contenere proteine di origine microbica.

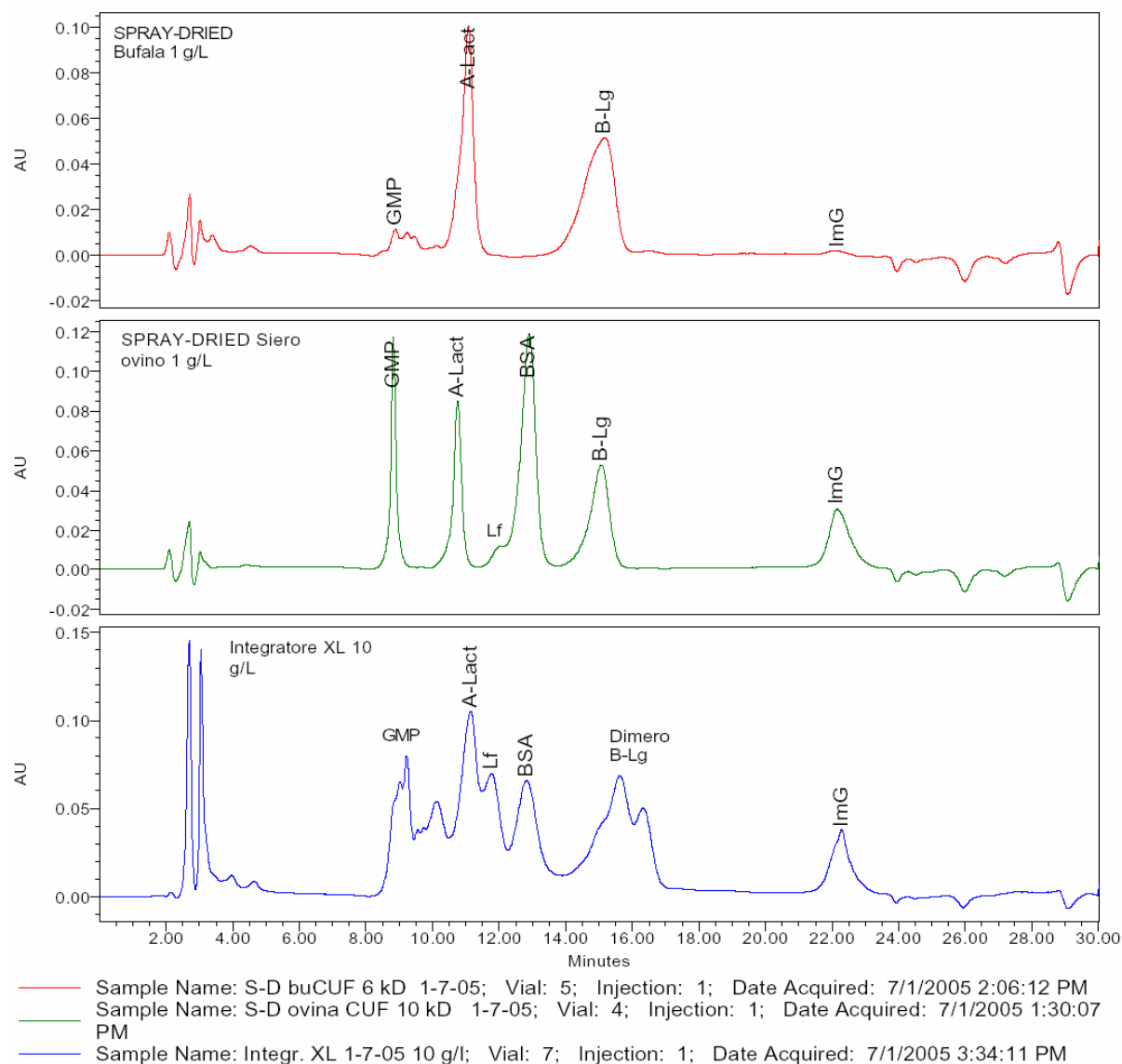


Figura 9.6
Composizione chimica dei preparati in polvere

Per correttezza scientifica questo rischio non viene del tutto eliminato, poiché anche nel processo di frazionamento del siero, descritto al Capitolo 7, si possono ricontaminare le soluzioni a causa delle ricrescita microbica nel mezzo liquido di lavoro, a seguito di contaminazioni derivanti dall'ambiente di lavoro.

Disponendo di una materia prima di qualità e con basso contenuto di umidità (inferiore al 4%) è assicurata la conservazione del prodotto per almeno due anni, anche in condizioni normali, senza ricorrere alla catena del freddo.

Non è stata ancora preso in considerazione il processo di raffinazione e di perfezionamento della formula della polvere, per essere maggiormente accettata dal mercato.

Probabilmente si dovrà infatti integrare il prodotto con l'aggiunta di altre sostanze in grado di aumentarne le proprietà nutrizionali o di renderle più gradevoli al consumatore, come integratori minerali, vitamine di vario genere, aromi e gusti particolari, come viene fatto dalle società presenti sul mercato.

Infatti, senza introdurre specificità tipiche del nostro paese, che si aggiungono al fatto che le polveri sono ottenute da sieri nostrani di capra e pecora, con un processo innovativo che valorizza le componenti biochimiche della matrice, è molto difficile poter essere competitivi con le multinazionali che attualmente sono padrone del mercato di questi prodotti (vedi tabella 9.1).

Nella bibliografia seguente si riportano link web che permettono di esplorare maggiormente l'universo della produzione di integratori alimentari a base di sieroproteine ed anche di GOS.

9.3 Bibliografia web

<http://www.americandairyproducts.com>

[American Dairy Products Inst.](http://www.americandairyproducts.com) promote the acceptance and utilization of dairy products both nationally and internationally, to maintain liaison and represent the industry in dealings with government agencies and regulatory bodies, to support technical and marketing research, and to assemble and disseminate statistics and other information about dairy products.

<http://www.adsa.org/>

[American Dairy Science Association](http://www.adsa.org/) is an international organization of educators, scientists, and industrialists who are committed to advancing the dairy industry. This page gives information regarding the Association activities.

<http://www.dairy.com.au/>

[Australian Dairy Corporation](http://www.dairy.com.au/) overall objective is to improve the profitability of the Australian dairy industry. The Corporation was established by the Dairy Produce Act. Has information regarding the domestic and international activities. Has publications, information, and links.

<http://babcock.cals.wisc.edu/>

[The Babcock Institute](http://babcock.cals.wisc.edu/) links the US dairy industry with the rest of the world through training, continuing education, technology transfer, adaptive research, scientific collaboration, and market analysis.

<http://www.beckflavors.com/>

[Beck Flavors](http://www.beckflavors.com/) is a flavor manufacturing company with over 80 years experience in the flavor industry. Beck Flavors specializes in botanical extracts, primarily vanilla, and our Beck Café line of gourmet coffee flavors. Beck Flavors products includes flavors for the bakery, beverage, coffee, confectionary, and dairy industries.

<http://www.benjerry.com/>

[Ben and Jerry's](http://www.benjerry.com/) is the ice cream site with company information. Also, has information regarding old and new flavors and product packaging design. Activities included.

<http://www.cdhia.org/>

[California Dairy Herd Improvement Association](http://www.cdhia.org/) provides quality assurance, summary statistics, communications, and leadership for a federation of local dairy herd improvement associations located in the Western United States. These associations produce herd and cow records for dairy producers for dairy herd management, genetic evaluations, and pedigree purposes.

<http://www.cheesepowder.com/>

[Commercial Creamery](http://www.cheesepowder.com/) has product lines, sample requests, and contact information for various cheese powders, dairy powders, snack seasonings, flavors, fat replacers, shortenings, creamers, nutraceuticals and specialty powders.

<http://dairy.com/>

dairy.com is the first and only business-to-business online vertical exchange focused specifically on serving the entire U.S. dairy industry. Dairy.com is an independent, neutral e-market whose services and tools are open to all dairy industry participants - agricultural and manufacturing suppliers, producers, cooperatives, milk, ice cream, yogurt, and cheese manufacturers.

<http://www.dairycouncilofca.org/>

[Dairy Council of California](http://www.dairycouncilofca.org/) is a site for educators & health professionals. Includes healthy information and fun and educational information.

<http://www.dairyeng.com/>

[Dairy Engineering Company](http://www.dairyeng.com/) provides, stocks, and services equipment from most of the major vendors.

<http://www.milk.org/>

[Dairy Farmers of Ontario](http://www.milk.org/)

<http://cherokee.agecon.clemson.edu/dairy.htm>

[Dairy Information](http://cherokee.agecon.clemson.edu/dairy.htm) from Clemson Extension contains various resources, market reports, dairy reports and other information regarding dairy information.

<http://www.dairyinfo.com/>

[Dairy Management Inc.](http://www.dairyinfo.com/) [DMI] manages the efforts and resources of the National Dairy Council and the American Dairy Association. Our job is to make check off dollars work for dairy farmers by increasing demand for dairy products. The site contains information regarding dairy products, research and technology, news and other valuable information and links.

<http://www.restaurants.co.uk/>

[Dairy Marketing](#) from the University of Maryland. Includes Dairy Futures Prices, Dairy Charts, Grain Futures Prices, Grains charts.

<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html>

[Dairy Science and Technology Education Series](#) includes milk production and biosynthesis, milk grading and defects, dairy chemistry and physics, dairy microbiology, dairy microbiology, and dairy products.

<http://www.darigold.com>

[Darigold](#) has annual report and information regarding Darigold Farms.

<http://www.dairyscience.info>

[Dairy Science and Technology. Starters, Probiotics, Cheese and Antimicrobial Systems](#) for information on lactic acid bacteria, their bacteriophages, antimicrobial systems in milk, and factors influencing the quality and yield of cheese.

<http://www.daviscofoods.com>

[Davisco](#) sells nutritional and functional fractionated whey. Has a variety of products and fun milk facts.

<http://www.deanfoods.com>

[Dean Foods Co.](#) has an annual report, for dairy products.

<http://www.mit.edu/afs/athena/user/k/e/kevles/www/nomilk.html>

[Eating Without Casein](#) has links and information on casein allergy.

<http://www.eriefoods.com>

[Erie Foods International Inc.](#) emphasizes the milk products, fluid, whey, caseinates. Custom processing is possible.

<http://www.extraordinarydairy.com/>

[Extraordinary Dairy Resources](#) has nutrition, innovation challenge, technical support, dairy research, program resources, library, industry resources, technology spotlight.

<http://www.greatlakescheese.com/>

[GREAT LAKES CHEESE](#) products are cheeses.

<http://www.igf-1-and-milk.com/>

[IGF-1, Milk and Cancer](#) Misleading Claims from the Fear Profiteers is a written summation.

<http://www.internet-grocer.com/>

[Internet Gourmet](#) includes dehydrated foods, freeze-dried food, TVP, grains, beans, legumes, dairy products, meat substitutes and a variety of other survival and "regular" foods

<http://www.iddanet.org/>

[International Dairy-Deli-Bakery Association](http://www.iddanet.org/) has a mission to expand our leadership role in promoting the growth and development of dairy, deli, and bakery sales in the retail food industry. Has a variety of activities and resources.

<http://www.oregondairycouncil.org/>

[Oregon Dairy Council](http://www.oregondairycouncil.org/) has the Nutrition Education Services which includes what's hot, recipes, resources, links and contact information.

<http://www.bright.net/~fwo/index.html>

[Owenlea Holsteins](http://www.bright.net/~fwo/index.html) is an extensive site with many pages and links related to dairy farm life. An interesting excellent site.

<http://www.kraftfoods.com/>

[Philadelphia Cream Cheese](http://www.kraftfoods.com/)

<http://www.prairiefarms.com/>

[PRAIRIE FARMS DAIRY INC.](http://www.prairiefarms.com/) this Is an informative web page a little marketing of product is done.

<http://www.strausmilk.com>

[Straus Creamery](http://www.strausmilk.com) operates the only certified organic dairies and creamery in California. They use no sprays, pesticides or chemical fertilizers on our fields. Our cows are fed 100% organically grown feed and are never treated with growth hormones or antibiotics. Our cows are treated instead with homeopathic remedies and aspirin when necessary. The site contains product information, organic information, a newsletter, and favorite recipes.

<http://www.dfrc.wisc.edu/>

[U.S. Dairy Forage Research Center](http://www.dfrc.wisc.edu/) has information related to dairy work.

<http://www.webbersmith.com/>

[Wade Palmer & Associates](http://www.webbersmith.com/) are engineers and architects for food processing and distribution, full-service design, capabilities for meat, dairy, and bakery facilities, utilities, process, instrumentation and controls, and material handling systems, planning, studies, and consulting for bakery and snack foods, process safety management, distribution, dairy, meat and poultry, instrumentation and controls

<http://www.wsu.edu/creamery/>

CAPITOLO 10

LA SOCIETÀ SIEROPROTEINE SRL



sieroproteine

**Development
of nutraceutical
components**

Sieroproteine S.r.l.
C.da Cocozze, snc
89050 Belcastro (CZ)
Italy

Tel. Uff. +39 0961 932930
Tel. Lab +39 0961 932931
Fax +39 0961 932928
www.sieroproteine.com



Indice dei paragrafi

10.1 La hall tecnologica	228
10.1.1 Gli impianti pilota a membrane	228
10.1.2. unità pilota a membrane polimeriche	228
10.1.3 Unità pilota a membrane ceramiche	229
10.1.4 Unità pilota di osmosi inversa	230
10.2. Atomizzatori Spray Dryer	231
10.3 Il Gruppo di ricerca	233

La Società Sieroproteine Srl nasce nel 2003 nel Comune di Belcastro, in provincia di Catanzaro, con l'intento di sviluppare un nuovo processo di produzione delle SP di origine ovi-caprina allo scopo di formulare prodotti purificati e idrolizzati da immettere sul mercato nel comparto alimentare e soprattutto farmaceutico.

In questo sforzo imprenditoriale la Società si avvale della collaborazione scientifica dell'ENEA, che ha maturato nel settore specifico una lunga esperienza di ricerca tecnologica, centrata soprattutto sull'impiego delle tecnologie di membrana.

Attualmente la Società Sieroproteine dispone di un modernissimo laboratorio analitico dedicato alle caratterizzazioni chimiche delle sieroproteine e dei composti glucidici del siero, di una hall tecnologica attrezzata con impianti pilota per eseguire sperimentazioni sul trattamento del siero di latte per quantitativi dell'ordine delle centinaia di litri/giorno, e di un gruppo di giovani ricercatori il cui *training* formativo è stato condotto presso ENEA. Il gruppo attualmente ha maturato l'esperienza per portare avanti un programma di ricerca all'avanguardia nel settore specifico.

Si tratta di una realtà industriale ricca di beni strumentali e di risorse umane, costituite da competenze tecnico-scientifiche uniche nel nostro paese, in grado di competere presto sul piano scientifico con gli istituti specializzati di tutto il mondo.

Nella figura 10.1 si riportano alcune dotazioni strumentali del laboratorio analitico della Società, tutte focalizzate alle analisi chimiche delle componenti del siero di latte. Nel capitolo 2 vengono descritte le principali metodologie analitiche sviluppate dalla Società Sieroproteine.



Figura 10.1
Sistema analitico HPLC per sieroproteine e
rivelatore per glucidi ad infrarosso

10.1 La hall tecnologica

La hall è costituita principalmente dagli impianti pilota di trattamento del siero che comprendono la centrifuga continua, il sistema di refrigerazione, i serbatoi di stoccaggio del siero, gli impianti a membrana, gli spray dryer e le camere frigorifere.

Per semplicità di esposizione sono illustrate di seguito soltanto le apparecchiature più significative.

10.1.1 *Gli impianti pilota a membrane*

La Società Sieroproteine dispone di tre impianti pilota a membrana opportunamente dimensionati per il trattamento di quantità di siero grezzo di circa 1.000 L/giorno.

Di seguito vengono descritte le caratteristiche tecniche di base delle unità pilota, integrate da una documentazione fotografica.

Tutti i pilota sono stati progettati dall'ENEA, sulla base di sperimentazioni condotte in scala laboratorio e realizzati da costruttori specializzati, mentre le membrane sono di produzione USA.

10.1.2 *Unità pilota a membrane polimeriche*

Questa unità sperimentale è stata progettata dall'ENEA e realizzata dalla Torchiani Impianti di Brescia. L'impianto è particolarmente versatile e compatto.

Esso è costituito da un unico telaio di supporto in cui sono montati tre diversi moduli a membrana, rispettivamente di microfiltrazione-ultrafiltrazione (MF-UF); di noanofiltrazione (NF) e di osmosi inversa (OI), le camere di alloggiamento (vessel o pressure vessel) hanno le dimensioni di 4" x 40 ". Tutti i *pressure vessel* sono in AISI 316, in grado di operare fra 10 e 40 bar.

L'impianto può operare solo con un tipo di membrana, non si possono utilizzare i tre moduli contemporaneamente. L'impianto è equipaggiato con tre pompe diverse, una per i lavaggi, una di UF ed una di OI regolata con inverter in grado di operare fino a raggiungere i 40 bar di pressione.

L'unità è completamente refrigerata, gestita da software dedicato; è stata costruita in esecuzione alimentare, in particolare risponde alle normative ISO 14.000 a norma CE.

In figura 10.2 si riporta la fotografia dell'impianto pilota sperimentale a membrane polimeriche in conformazione a spirale avvolta.



Figura 10.2
Unità pilota a membrane: in alto il modulo di ultrafiltrazione, in mezzo il modulo di nanofiltrazione, in basso il modulo di osmosi inversa

10.1.3 Unità pilota a membrane ceramiche

L'unità di MF e UF impiega due moduli a membrane ceramiche in parallelo, in grado di operare in continuità di processo ma non contemporaneamente.

L'unità è compatta ed operativamente molto versatile, essa è montata su un unico telaio con due serbatoi fissi e la possibilità di collegamento con serbatoi mobili refrigerati.

L'unità è fornita di un sistema di contro-lavaggio delle membrane ceramiche a regolazione pulsata (back pulse).

Si tratta, più precisamente di un sistema impiantistico che pressurizza a tempo il permeato per rimuovere il deposito (cake) che si forma sulla superficie attiva della membrana, dei due moduli di MF ed UF ognuno dei quali presenta una superficie filtrante di 1 m².

L'impianto è equipaggiato con tre pompe diverse, una per l'alimentazione dei lavaggi, una di prealimentazione ed una di ricircolo dimensionata per portate di 16 m³/h.

L'unità è completamente refrigerata, gestita da software dedicato, e costruita in esecuzione alimentare, in particolare risponde alle normative ISO 14.000 a norma CE.

In figura 10.3 si riporta l'unità pilota a membrane ceramiche di nuova generazione, pronto a trattare il siero di capra.



Figura10.3
Unità pilota che monta membrane ceramiche da microfiltrazione e ultrafiltrazione

10.1.4 Unità pilota di osmosi inversa

Questa unità pilota è di sola osmosi inversa ma è in grado di operare con soluzioni particolarmente salate, come spesso avviene sul siero dopo aggiunta di sale da parte del caseificio. Si tratta di un impianto pilota di OI che monta due moduli a spirale avvolta in serie.

La pompa a pistoni è in grado di raggiungere i 60 bar di pressione in modo da produrre un'acqua permeata di elevata purezza. È noto che più alta è la pressione di esercizio, inferiore è la salinità dell'acqua prodotta come permeato.

L'impianto è munito di refrigerante a piastre e di un sistema di regolazione automatico per la sicurezza degli operatori e la salvaguardia delle membrane e delle pompe.

Sulla linea permeato è montato un misuratore di conducibilità in linea (conduttimetro) per misurare il contenuto salino dell'effluente raffinato. L'unità dispone di due serbatoi, uno di alimentazione e l'altro per i lavaggi delle membrane.

L'impianto è in grado di produrre circa 300 L/h di acqua demineralizzata partendo dall'acqua di rete o dal siero di latte, in particolare dal permeato di NF.



Figura10.4
Unità di osmosi inversa con due moduli da 4"x 40 "

10.2 Atomizzatori Spray Dryer

La Soc. Sieroproteine dispone di uno spray dryer in scala laboratorio, modello ICF, che ha una capacità evaporativa di 500 mL/h (figura 10.5), e di un atomizzatore pilota prodotto dalla APV con capacità evaporativi di 7,5 L/h (figura 10.6).



Figura 10.5
Atomizzatore da laboratorio ICF



Figura 10.6
Atomizzatore pilota APV

Capacità evaporativa max.	7,5 kg/h
Pressione aria max.	4 bar
Consumo aria compressa max.	120 L/min.
Temperatura max.	300 °C
Consumo energia elettrica max.	9 kW
Peso	250 kg

Tabella 10.1
Specifiche tecniche dello Spray Dryer APV Anhidro Laboratory

L'atomizzatore APV, modello Anhidro Laboratory è quello maggiormente impiegato per produrre polveri di siero, le sue caratteristiche tecniche sono riportate nella tabella 10.1.

La soluzione o la sospensione di alimento, nel caso specifico di un concentrato di SP (concentrato di UF), viene pompata all'interno della camera di atomizzazione tramite una pompa peristaltica.

Nel processo la portata della pompa peristaltica viene regolata sui 20-35 mL/minuto e la temperatura della camera di nebulizzazione viene regolata sui 180 °C. Operando a queste temperature la polvere di SP subisce un riscaldamento di circa 60 °C, inferiore a quello di denaturazione delle SP, che si attesta fra 70 e 90 °C.

All'interno della camera dello spray dryer la sospensione di SP. incontra in controcorrente l'aria compressa, precedentemente purificata e deumidificata. Nel mezzo della camera di essiccamento a forma tronco-conica, come si vede dalla figura 10.6, è

posto un ugello speciale che permette la nebulizzazione della matrice siero; infatti, dall'incontro della corrente liquida e dall'aria, si forma una nube finemente dispersa diretta verso l'alto della camera di atomizzazione, dove viene investita da una corrente d'aria calda, prodotta da un ventilatore e riscaldata da una resistenza elettrica.

In tal modo, si provoca istantaneamente l'evaporazione dell'acqua e la formazione delle particelle di polvere. Queste, attraverso l'apertura posta sul fondo della camera, si dirigono verso il ciclone separatore dove la polvere è raccolta in un serbatoio-contenitore e l'aria convogliata all'esterno.

10.3 Il gruppo di ricerca

La Società Sieroproteine ha effettuato una selezione tecnica del personale, prevalentemente residente in Calabria, e successivamente ha condotto, con il supporto dell'ENEA, un periodo di formazione specializzata sulle tecnologie di membrana, sullo studio della chimica del siero e sul processo di trattamento del siero.

Attualmente le risorse umane sono costituite da 10 giovani laureati in discipline scientifiche, in particolare: 3 laureati in Chimica; 3 laureati in CTF, 3 laureati in Scienze Biologiche ed 1 Laureato in Scienze Agrarie.

In figura 10.7 si riporta lo staff tecnico della Sieroproteine, coordinato dal prof. Massimo Pizzichini dell'ENEA.



Figura 10.7
Il gruppo di ricerca Sieroproteine-ENEA

Riferimenti: Società Sieroproteine Srl, Belcastro, Catanzaro.
www.sieroproteine.com
Tel. +39 0961 932930

Referente tecnico: Dr. Felice Monterossi, mobile: 338 1205255

CAPITOLO 11

VALUTAZIONI TECNICO-ECONOMICHE E DISCUSSIONE



Analisi chimica del permeato di ultrafiltrazione

Indice dei paragrafi

11.1	Valutazioni per un impianto di trattamento di 100.000 litri/giorno di siero	237
11.1.1	Il mercato internazionale dei prodotti siero-derivati	237
11.1.2	Strategie di produzione	238
11.1.3	Impianti di trasformazione	238
11.1.4	Dati di input della proposta progettuale	238
11.1.5	Quantitativi di prodotti grezzi recuperati dal processo	239
11.1.6	Ricavi lordi	239
11.1.7	Costi dell'impianto di trattamento	240
11.1.8	Utili lordi del processo	242
11.2	Discussione	242

11.1 Valutazioni per un impianto di trattamento di 100.000 litri/giorno di siero di latte

In questo capitolo vengono valutati costi e ricavi derivanti da un processo di trattamento del siero di latte bovino, che parte da un quantitativo giornaliero di 100 m³ di siero grezzo.

Queste stime si riferiscono ad un impianto da realizzarsi in Italia, quindi tiene conto sia della qualità della materia prima che delle difficoltà oggettive che derivano dalla commercializzazione di prodotti raffinati che attualmente sono prodotti solo all'estero.

E' quindi evidente che sia i costi degli impianti, che soprattutto il valore commerciale dei prodotti raffinati, risentano di tale condizione generale.

Qualora si dovesse costruire non il primo impianto, ma il 10°, anche i costi di tale struttura sarebbero inferiori a quelli che vengono indicati per il primo.

Tuttavia in Italia esistono tutte le competenze e le attrezzature necessarie alla realizzazione dell'impianto di trattamento del siero, infatti sia gli impianti a membrana che quelli necessari alla finitura dei semilavorati, come fermentatori, evaporatori, atomizzatori, pastorizzatori, etc. sono largamente impiegati sia nella stessa industria lattiero-casearia, che nel settore farmaceutico.

Prima di passare alle stime dei costi e dei ricavi, è opportuno riconsiderare alcune condizioni generali al contorno, che condizionano il business dei sieroderivati in Italia.

11.1.1 Il mercato internazionale dei prodotti siero-derivati

I prodotti ricavati dal siero di latte hanno subito negli ultimi 3 anni un forte incremento di valore commerciale e le previsioni indicano un ulteriore apprezzamento nei prossimi anni.

È noto che l'Italia è un territorio di conquista delle multinazionali del siero, in particolare della Lactoserum France, ma anche Meggle, Dairy Gold, Milai.

Queste società, il particolare la Lactoserum del Gruppo Besnier, prelevano il siero nel nostro paese, lo lavorano all'estero e producono specialità ad altissimo valore aggiunto, che poi ricollocano sul mercato con marchi diversi.

Tali specialità a base di siero, per uso alimentare e per uso sportivo (integratori per *body building*) vengono rivenduti al dettaglio al prezzo di 20-40 €/kg. con profitti elevatissimi.

I grandi produttori di sieroproteine in polvere pongono sul mercato semilavorati industriali con diverse composizioni chimiche. In generale si stima il contenuto in sieroproteine sul prodotto in polvere. Si possono indicare tre categorie di prodotti al 30%; 65% e 90% in sieroproteine.

Queste materie prime, nel passaggio dalla produzione industriale al dettaglio subiscono un incremento di prezzi di un fattore compreso fra 10 e 15.

Per avere un quadro sommario delle aziende che attualmente sono sul mercato degli integratori è sufficiente consultare su internet i siti dedicati agli integratori alimentari e al *body building*.

Questo studio tecnico-economico segue lo schema di frazionamento del siero di latte riportato nella figura 7.2, mentre la tipologia di prodotti è riportata di seguito.

11.1.2 Strategie di produzione

Per essere sicuri di commercializzare i prodotti siero-derivati è necessario avere un acquirente affidabile, ma soprattutto bisogna essere in grado di diversificare la produzione in modo da potersi allineare alle esigenze moderne del mercato.

Ciò significa realizzare un impianto flessibile in grado di mettere sul mercato diverse tipologie di prodotti ricavati dal siero di latte.

Ha senso puntare su prodotti ad alto valore aggiunto, con proprietà nutraceutiche, piuttosto che su polveri di sieroproteine tal quali e lattosio, ad esempio cristallino, che ha un valore commerciale molto basso (1-2 €/kg).

Per essere competitivi sul mercato è necessario dotarsi di un laboratorio di analisi e controllo, seguito da un consulente tecnico-scientifico di grande esperienza e collaudata affidabilità.

Disponendo di quantitativi importanti di questi prodotti si può mettere in piedi una rete autonoma di commercializzazione utilizzando alcuni canali della distribuzione classica, tipo: GS, COOP, Parmalat. Enervit, Misura ecc.

11.1.3 Impianti di trasformazione

Gli impianti necessari alla valorizzazione del siero di latte sono specifici per il tipo di prodotti che si desiderano ottenere.

È stato calcolato che il costo degli impianti non aumenta di pari passo con la raffinazione dei prodotti finiti. I costi degli impianti comprendono: l'acquisto e l'installazione delle macchine, del *piping* e dei serbatoi, del depuratore finale degli scarti, e delle “facilities” come la produzione del vapore, del freddo, dell'energia elettrica, dell'acqua ecc.

I costi di produzione comprendono il consumo di reattivi chimici, l'eventuale cambio delle membrane (ogni 3,5 anni) i consumi di energia, il costo della materia prima, quelli di personale, di manutenzione ordinaria e straordinaria, le spese generali ecc.

La scelta degli impianti deve essere effettuata tenendo conto delle opportunità che questi offrono di risolvere i gravi problemi ambientali, relativi allo smaltimento completo degli effluenti di lavorazione del siero. Se gli aspetti di natura ambientale non sono completamente garantiti (smaltimento effluenti) si corre il rischio del sequestro degli impianti, di sanzioni economiche ed anche penali. È evidente che gli impianti devono essere costruiti nel rispetto delle normative vigenti riguardanti la produzione di specialità alimentari e farmaceutiche.

11.1.4 Dati di input dell'impianto industriale

Questo studio si basa su una disponibilità di siero di grana padano di circa 100.000 l/giorno. Si considera come materia prima il siero e non la scotta, cioè il liquido che rimane dopo la formazione della ricotta. Prendiamo come riferimento un siero vaccino medio nazionale, ad esempio quello del Grana Padano.

Per questo siero, che deve essere analizzato chimicamente in dettaglio, si indica la seguente composizione chimica:

- lattosio 45 g/L
- sieroproteine e peptidi 12,0 g/L
- azoto non proteico 2 g/L,
- contenuto salino di 5 g/L.

Prima di intraprendere qualsiasi iniziativa di trattamento siero è necessario analizzare in dettaglio la composizione chimica del siero da utilizzare come materia prima.

L'ENEA è attrezzato per eseguire analisi chimiche specialistiche sul siero di latte, che tuttavia possono essere eseguite anche da altri istituti nazionali, oppure dalla stessa Società Sieroproteine.

È noto che la composizione chimica del siero può cambiare sensibilmente anche in ragione del suo stato di conservazione, oltre che altri parametri, come ampiamente discusso nel Capitolo 2.

11.1.5 Quantitativi di prodotti grezzi recuperati dal processo

Dal trattamento di 100 m³/giorno è ragionevole ipotizzare il recupero delle seguenti materie prime:

- sieroproteine all'80% in peso sulla polvere 1.200 kg/giorno
- acqua osmotizzata 65 m³/giorno
- zuccheri totali (lattosio 4.500 kg/giorno).

Le sieroproteine (WPC = proteine concentrate) in polvere possono essere commercializzate come integratore alimentare ad un prezzo medio venduto all'ingrosso di circa 4,0 €/kg.

Gli zuccheri possono essere idrolizzati per produrre monosaccaridi e GOS e produrre una specialità di interesse farmaceutico, i GOS, che valgono cifre dell'ordine dei 14 €/kg.

Dal mescolamento dell'acqua osmotizzata con gli zuccheri idrolizzati si può ottenere una base per bevanda speciale con spiccate caratteristiche nutraceutiche, per un quantitativo di circa di circa 160 m³/giorno. Il prodotto di riferimento è la Rivella, una bevanda dolce, tipo aranciata, prodotta in Svizzera che contiene il 23% di siero, che viene venduta in tutti il mondo, Italia esclusa (www.rivella.com).

11.1.6 Ricavi lordi

Dalla commercializzazione delle sieroproteine si possono ottenere i seguenti ricavi:
1.200 x 4 € = 5.000 €/giorno.

Dalla bevanda (zuccheri idrolizzati + acqua osmotizzata), che si valuta ad un costo di fabbrica di circa 0,4 €/L, corrispondente a quello di un'acqua minerale, si ottengono 32.000 €/giorno.

Totale ricavi lordi 37.000 €/giorno.

11.1.7 Costi dell'impianto di trattamento

L'impianto sarà costituito dall'assemblaggio di apparecchiature commerciali e dalla realizzazione di apparecchiature progettate ad hoc.

L'impianto è diviso in 5 sezioni distinte in funzione delle operazioni unitarie e della categoria di prodotto finale, come riportato di seguito:

1. Ricevimento e stoccaggio siero (RS)
2. Pretrattamento (PT)
3. Unità di processi a membrana (MB)
4. Sezione di raffinazione prodotti: sieroproteine (SP)
5. Sezione di raffinazione prodotti: lattosio e bevanda nutraceutica (LAT)
6. Utilities di stabilimento (UT)
7. CIP lavaggio serbatoi e impianti (CIP)
8. Sistemi di connessione idraulica fra le unità (PIP).

Per ognuna delle sezioni previste sono riportate di seguito, in figura 11.1 le apparecchiature necessarie e le voci di costo unitarie e totale dell'impianto (vedi gli acronimi citati sopra per la tabella a fianco).

Per impianti di raffinazione si intendono i fermentatori per l'idrolisi del lattosio, gli evaporatori delle sieroproteine concentrate in UF, lo spray dryer per l'ottenimento delle polveri ed il sistema di imbottigliamento per la soluzione base di bevanda.

I costi sono al netto dell'IVA e non comprendono le opere murarie necessarie alla costruzione dello stabilimento di trattamento del siero.

IMPIANTO INDUSTRIALE SIERO 100 m ³ /g						
Apparecchiatura	Specifiche	Utilizzo	Numero	Sezione di Impianto	Costo un. (k€)	Costo tot.(k€)
Serbatoio	Inox 304 vol.30 m ³ semplice	Raccolta primaria siero	1	RS		200
Serbatoio	Inox 304 vol. 50 m ³ coib.	Raccolta siero pretr.	2	PT		
Serbatoio	Inox 304 vol. 50 m ³ semplice	Raccolta siero pretr.	1	PT		
Serbatoio	Inox 304 vol. 10 m ³ semplice	Conc. UF e conc.NF	2	MB		
Serbatoio	Inox 304 vol. 6 m ³ standard	Raccolta perm. Uf	1	MB		
Serbatoio	Inox 304 vol. 20 m ³ standard	Perm. NF conc MF,OI	3	MB		
Serbatoio	Inox 304 vol. 30 m ³ standard	Raccolta perm. OI	1	MB		
Serbatoio	Inox 304 vol. 20 m ³ standard	P.OI con latt. Idroliz..	1	LAT		
Stazione di analisi	pH, carica batterica	Analisi siero in entrata	1	PT	9	9
Centrifuga	Inox 316 10000 L/h	Scrematura siero	1	PT	45	45
Pastorizzatore siero	Inox 316 9000 L/h	Pastorizzazione siero	1	PT	35	35
Impianto membrane	MF ceramiche 3 rampe	Rim.batteri e grasso	1	MB	200	200
	UF polimeriche 237 m ²	Conc. sieroproteine	1	MB	180	180
	NF polimeriche 230 m ²	Conc. lattosio	1	MB	160	160
	OI poli. alta reizione salina	Conc. sali	1	MB	70	70
Fermentatore SP	inox 316, vol. 2,5 m ³	Idrolisi sieroproteine	2	SP	35	70
Spray Dryer	T 90-160°C, 150-200 L/h	Polvere sieroproteica	1	SP	240	240
Fermentatore Lattosio	Inox 316, vol. 2,5 m ³	Idrolisi lattosio	2	LAT	35	70
Evaporatore SP/LAT	Film cadente, 75 °C, 600-700 L/h	Concentraz SP/LAT	1	SP/LAT	40	40
Pastorizzatore bevanda	Inox 316 2000 L/h	Bonifica bevanda	1	LAT	20	20
unità MF bevanda	Modulo ceramico 0,25 µm	Bonifica bevanda	1	LAT	30	30
Caldaia	Vapore 180 °C, Calorie 860.000 kcal	Utilities pastorizzatori,	1	UT	40	40
Gruppo refrigerante	Glicol etilenico 30.000 frigorie	Refrigerazione impianti	1	UT	50	50
Collegamenti elettrici	Da centrale a singola utenza	Utilities	1	UT	20	20
Allacci idrici, aria comp.	Linee di collegamento interne	Utilities	1	UT	5	5
Software & hardware	Gestione e controllo da console	Utilities	1	UT	40	40
Piping	Inox 316, lunghezza 120 m	Collegamento impianti	1	PIP	25	25
CIP	Per singola utenza e serbatoio	Lavaggio sanitario	1	CIP	60	60
					TOTALE	1839

Totale costi dell'impianto di trattamento del siero, escluso opere murarie, **1.839.000 €**.

I costi di produzione, comprendono le seguenti voci:

- energia elettrica
- reattivi chimici
- manutenzione impianti
- sostituzione membrane
- mano d'opera
- spese generali

Complessivamente tali costi di produzione sono valutati in circa *19.000 €/giorno*

Si valuta che l'impianto operi 24 ore/24 e sia produttivo per 300 giorni/anno.

11.1.8 Utili lordi del processo

Gli utili lordi del processo ammontano a $18.000 \text{ €/giorno} \times 300 \text{ gg} = 5.400.000 \text{ €/anno}$

Il Pay Back impianto, escluso le opere murarie, è inferiore a 70 giorni.

In queste valutazioni l'incertezza maggiore riguarda la difficoltà di commercializzare una bevanda speciale come quella indicata, ma i ritorni economici sono molto interessanti anche rispetto al basso valore indicato.

Bisogna inoltre considerare che in questa valutazione non abbiamo considerato la possibilità di produrre peptidi bioattivi poiché queste specialità non troverebbero ancora uno sbocco commerciale, in quanto si tratta di composti molto innovativi per i quali sono ancora in corso le ricerche in biomediche.

Tuttavia, nel caso che tali prodotti fossero commercializzati, i ritorni economici del processo potrebbero esse moltiplicati per un fattore compreso fra 3 e 10, rispetto a quelli riportati in questo studio.

11.2 Discussione

Per il nostro paese, in particolare per l'industria casearia, il siero di latte è considerato un rifiuto industriale, ma contiene sostanze naturali di straordinaria valenza salutistica, che già contribuiscono nel mondo ad aumentare il benessere dei consumatori ed anche a prevenire e curare malattie importanti come il cancro, l'infarto, l'ipertensione, ed anche a potenziare le nostre difese immunitarie contro batteri e virus, compreso quello dell'HIV.

Solo recentemente la ricerca ha potuto mettere in evidenza le straordinarie proprietà biomediche delle sieroproteine, dei peptidi bioattivi e dei glucidi derivanti dall'idrolisi del lattosio.

Le SP sono dei prodotti di grande interesse commerciale in ragione delle peculiari proprietà nutrizionali e biomediche. Infatti, esse costituiscono una famiglia ben definita di proteine globulari con alcune peculiari funzioni biologiche, come abbiamo visto nel Capitolo 3.

A queste molecole, come l' α -lattalbumina, la β -lattoglobulina, le sieralbumine, la lattoferrina, la lattoperossidasi, le immunoglobuline ed i glicomacropetidi (GMP), sono state associate numerose proprietà: antiossidanti, anti-ipertensive, antitumorali, ipolipidemiche, antivirali e antibatteriche.

In ragione di una forte presenza di aminoacidi ramificati, promotori della costituzione del muscolo striato, le SP rappresentano oggi uno dei principali integratori alimentari per chi pratica culturismo, e per gli sportivi in generale.

Lo studio in oggetto è stato eseguito per valorizzare non solo le SP, ma anche i frammenti di proteine (peptidi bioattivi), il lattosio e tutte le sostanze presenti nel siero ovino e ovi-caprino, particolarmente abbondante nelle produzioni casearie della provincia di Catanzaro.

In questi sieri la presenza di SP è più elevata di quelli bovini, quindi l'opportunità pratica di recuperare e valorizzare le SP ed i peptidi diventa ancora più interessante, anche dal punto commerciale.

È stato ampiamente illustrato, in tutte le delicate fasi di lavorazione, il processo di recupero dei soluti del siero, impiegando tecnologie separative a membrana in modo mirato, al fine di massimizzarne il recupero e la valorizzazione biochimica delle proteine, dei peptici e dei composti glucidici.

Le SP sono state recuperate con tecniche di ultrafiltrazione precedute da una fase di rimozione della materia grassa e della carica microbica (batteri lattici), effettuata con tecnologie di microfiltrazione tangenziale. Tale procedura ha consentito di eliminare i grassi e la carica microbica dei sieri, con un'efficienza del 97%, contribuendo in tal modo a qualificare la produzione sieroproteica, che in questo caso risulta priva di proteine di origine microbica (citoplasma e membrane dei batteri lattici interi o bonificati dalla pastorizzazione).

Il siero purificato da grassi e batteri (vivi e morti) è stato trattato in UF allo scopo di recuperare principalmente sieroproteine con una resa del 98% circa, e con esse anche e le importanti frazioni polipeptidiche.

In media, da un siero che contiene circa 9,0 g/L di sieroproteine, si genera un concentrato di UF con una concentrazione compresa fra 90 e 120 g/L. Il limite alla concentrazione delle SP è costituito dal flusso di permeato, che si riduce sensibilmente quando aumenta la concentrazione del retentato di UF.

Il controllo rigoroso dei parametri di processo e delle condizioni operative è fondamentale sia per migliorare le rese produttive del processo, che per qualificare i prodotti recuperati. Ad esempio eccessivi stress meccanici, chimici, o termici possono modificare la struttura molecolare delle SP, con effetti di denaturazione delle proteine stesse, che in questa eventualità perderebbero alcune funzioni biologiche peculiari.

La tecnica di diafiltrazione è stata applicata sia su retentati di UF che di NF, rispettivamente con lo scopo di ridurre il contenuto di lattosio e di sali minerali delle WPC (*whey protein concentrate*), e di ridurre le concentrazioni saline (principalmente sali di potassio) dal concentrato di lattosio.

La stessa tecnica di DF si è dimostrata poco efficace per separare fra loro le diverse molecole sieroproteiche, anche con l'impiego di membrane a taglio molecolare più elevato (100, 200 kDa).

Ciò dipende dall'elevato grado di aggregazione delle molecole sieroproteiche a struttura globulare, con legami di natura liofila, dovuti alla presenza di aminoacidi idrofobici presenti soprattutto sulle catene laterali della struttura molecolare.

I peptidi biologicamente attivi, frammenti proteici derivanti dalla rottura di α -, β -, κ -caseine e di alcune SP, in particolare la β -lattoglobulina e la α -lattalbumina, sono stati identificati in tutti i sieri studiati, e soprattutto sono stati rilevati in concentrazioni interessanti nel retentato di NF.

Essi hanno caratteristiche biochimiche molto diversificate tra loro per quanto attiene a struttura primaria, punto isoelettrico, peso molecolare; quest'ultimo in media rimane compreso fra 200 e 1.900 Da. A seconda della loro specifica composizione aminoacidica presentano proprietà biomediche diverse.

Queste molecole passano interamente la barriera filtrante della MF, vengono parzialmente trattenuti dall'UF, perchè si trovano in parte aggregati con le SP ed i glucidi, ma si trovano nel permeato di UF, e quindi si concentrano nel retentato di NF.

Per aumentare la produzione di peptici bioattivi a partire dal siero di latte è stato messo a punto un protocollo sperimentale che prevede i seguenti passaggi:

- ultrafiltrazione del siero
- idrolisi enzimatica del retentato di UF
- nuova UF sull'idrolizzato proteico, nel cui permeato sono presenti soltanto peptidi bioattivi.

Questo studio ha dimostrato che si possono trasformare tutte le SP, ottenute dal retentato di UF, in peptidi bioattivi, con una resa dell'87%.

L'impiego di una seconda ultrafiltrazione dopo l'idrolisi consente di produrre peptidi riattivi di interesse alimentare per i soggetti (neonati) intolleranti alle proteine del latte perché scompaiono del tutto la β -Lattoglobulina.

Tali peptidi hanno effetti anti ACE, come è stato dimostrato in esperimenti con animali condotti dall'Università di Piacenza (prof. Luigi Scolari).

Sicuramente avranno le altre funzioni specifiche di queste molecole, come descritto nel Capitolo 4, perché derivano dall'idrolisi delle caseine e delle SP, ma la caratterizzazione molecolare di questi idrolizzati richiede ancora degli approfondimenti.

Sul tema della caratterizzazione chimica delle singole molecole di peptici è in corso una ricerca ad hoc, condotta in collaborazione con l'Università di Cosenza, specializzata in analisi con Spettrometria di Massa (prof. G. Sindona).

Quando la ricerca sarà conclusa si potranno specificare le tipologie chimiche dei peptidi, disporre di un'analisi quantitativa e successivamente identificare le funzioni biomediche delle famiglie.

Altri prodotti di grande interesse biomedico sono stati ricavati dall'idrolisi del lattosio. Questo disaccaride abbondante nel siero e nella scotta, è stato idrolizzato per produrre monosaccaridi a più alto potere edulcorante e soprattutto per generare i galattosio-oligosaccaridi (GOS), aggregati di 3 o più molecole di monosaccaridi. Questi oligosaccaridi si formano per azione dell'enzima β -galattosidasi, con una cinetica che è stata studiata e messa a punto sperimentalmente.

Dal punto di vista biomedico i GOS favoriscono la proliferazione dei bifidobatteri nell'intestino, con effetti positivi nell'assorbimento dei nutrienti e nell'azione antagonista verso batteri patogeni come *l'Escherichia coli*, la *Salmonella typhi* e lo *Staphylococcus aureus*.

È stato riportato che i bifidobatteri svolgono attività anti-tumorali. I GOS sono indigeribili fino al tratto intestinale, quindi svolgono una funzione di spazzino del tratto intestinale allo stesso modo delle fibre cellulosiche, quindi riducono il colesterolo la pressione ed il contenuto di zuccheri nel sangue.

Lo sviluppo di specifiche tecniche analitiche, in particolare basate sull'impiego dell'HPLC e dell'elettroforesi ha consentito di valutare con accuratezza le fasi di pretrattamento e di recupero delle SP dalla matrice siero, in particolare nello stadio di MF, di UF, e di DF.

Tali tecniche hanno permesso di valutare la composizione delle polveri sieroproteiche ottenute, il che ha consentito di confrontare la qualità dei nostri prodotti con alcune tipologie di WPC che si trovano sul mercato internazionale in forma di integratori per *body building*.

Sulle polveri sieroproteiche sono state eseguite caratterizzazioni specifiche che hanno potuto dimostrare il basso livello di denaturazione, e l'assenza pressoché totale di proteine di origine microbica, poiché i nostri sieri sono stati tutti trattati in MF che ha rimosso grassi e batteri lattici.

Per evitare la denaturazione delle nostre polveri è stata posta particolare attenzione per la messa a punto del processo di spray dryer. In particolare si è operato a temperature di atomizzazione intorno agli 85 °C, proprio per minimizzare i fenomeni di denaturazione termica.

Sono state prodotte quantità di polveri considerevoli, relative alle diverse prove di frazionamento del siero, utilizzando sieri caprini, ovini ed anche bovini.

Si è cercato di aumentare il contenuto proteico della polvere fino al 93% e di rimuovere il contenuto salino, in modo da qualificare la polvere sotto il profilo commerciale.

In media, il nostro prodotto in polvere presenta una solubilità istantanea in acqua di oltre il 90%, ed un contenuto di lattosio variabile nei diversi preparati, ma sempre inferiore al 20%, ed un tenore in umidità compreso fra 3 e 5%.

In conclusione, la sperimentazione ha permesso di valorizzare le componenti chimiche del siero per giungere a prodotti che necessariamente devono trovare una collocazione in campo biomedico, dopo i necessari test clinici.

L'impegno dell'ENEA e soprattutto della Società Sieroproteine è ora quello di trasferire la grande mole di ricerca fino ad ora eseguita, a livello di produzione industriale.

A tale proposito sono state definite le specifiche tecniche, il layout impiantistico e la progettazione complessiva dello stabilimento di trattamento del siero che verrà realizzato entro il 2006, dimensionato a trattare 100 m³/giorno di siero grezzo.

Parallelamente sono in corso studi di marketing per favorire la collocazione dei nuovi prodotti sul mercato nazionale ed europeo.

CAPITOLO 12

CONCLUSIONI



Il decollo dell'iniziativa

In questo studio particolarmente tecnico, quindi di non facile lettura per i non addetti ai lavori, dovrebbe però emergere un dato incontrovertibile: il siero di latte, oggi più che mai, è una fonte straordinaria di ricchezza reale, certamente non un rifiuto.

Abbiamo cercato di dimostrare che il recupero delle sostanze preziose del siero richiede l'impiego di tecnologie non molto diffuse, come quelle di membrana, ma è ormai dimostrato che queste sono utilizzate in tutto il mondo e parzialmente anche in Italia, ma non nella sequenza indicata in questo lavoro.

Nel nostro paese sono operative diverse società specializzate nella realizzazione di impianti affidabili, che promuovono la vendita di membrane ed impianti completi, dedicati ad altre applicazioni, diverse dal trattamento del siero.

Tali società sono in grado di costruire a regola d'arte impianti per il trattamento del siero di latte, anche a costi più convenienti rispetto alla concorrenza estera, in particolare americana.

Abbiamo cercato di mettere in luce le proprietà biomediche delle sostanze presenti nel siero, di quelle che si possono ottenere per idrolisi delle sieroproteine e del lattosio, attraverso un approfondito studio bibliografico, basato sulla consultazione di lavori scientifici recenti, in riviste specializzate come: *Journal of Dairy Science*, *Journal of Food Nutrition*, tanto per citarne alcune.

Anche il lettore più scettico si dovrebbe convincere che le proprietà biomediche di SP, peptidi bioattivi e GOS potrebbero sostituire in meglio gran parte dei prodotti farmaceutici tradizionali, poiché sono sostanze naturali, quindi non presentano nessuna controindicazioni clinica.

Abbiamo voluto indicare in che modo le tecnologie devono essere impiegate per ottenere prodotti ad alto valore aggiunto, come sieroproteine, peptidi bioattivi, GOS, acqua ultrapura ecc.

Tutto questo dovrebbe servire a far *decollare* un'iniziativa nazionale (vedi foto nella pagina accanto) per la produzione delle specialità di cui sopra, attualmente importate nel nostro paese, con il target di integratori alimentari, che molto presto, saranno sul mercato come farmaci veri e propri.

In Italia ci sono ingenti produzioni di siero, società che possono costruire impianti dedicati, ricercatori esperti nella qualificazione dei prodotti, un mercato di consumatori in fortissima crescita (*body builder*).

Apparentemente, sembra che sussistano tutte le condizioni favorevoli per sviluppare iniziative nazionali, ma di fatto in Italia non si produce 1 g di polvere di siero.

Attualmente il nostro mercato dei prodotti lattiero-caseari è in forte stagnazione, ma gli imprenditori rispondono alla crisi cercando di migliorare l'immagine del prodotto, si preoccupano del colore del vasetto, di grattugiare il formaggio, di fare delle mini-confezioni, di migliorare il *packaging* con l'aggiunta di plastica, fogli di alluminio, doppia scatola e altre trovate che contribuiscono solo ad aumentare il volume dei rifiuti domestici.

Questi 2.600 imprenditori trovano assolutamente normale gettare via migliaia di tonnellate di siero ogni giorno. Essi considerano il siero un rifiuto storico e non si vogliono convincere che il vero prodotto importante del latte è il siero, non il formaggio.

Purtroppo, i caseari associano al siero il concetto di illegalità, a causa delle frequenti denunce per lo smaltimento del siero in modo non conforme alle direttive ambientali.

Per tutte queste ragioni, non crediamo che un'industria casearia nazionale, per quanto grande, svilupperà a breve un settore come quello dei sieroderivati.

Per il raggiungimento di questo obiettivo ci vuole la sensibilità e la cultura di altri imprenditori, come quelli del settore farmaceutico.

Il curatore del volume si occupa della ricerca nel settore siero-membrane da oltre 30 anni, nei quali ha sempre cercato di informare sul tema specifico con i mezzi classici a disposizione: seminari, pubblicazioni, congressi nazionali, corsi di formazione, tesi di laurea, brevetti ecc.; tuttavia la situazione nazionale non è cambiata.

In Italia nessuno impiega tecnologie di membrana in sequenza per ottenere i prodotti indicati in questo lavoro. Anche a livello pubblico, si continuano a costruire infrastrutture e impianti di trattamento del siero inadeguati, obsoleti prima di entrare in funzione, comunque legati alla logica dello smaltimento e non del recupero.

Oggi, dal trattamento di 1 m³ di siero è possibile ottenere un utile commerciale che può variare fra 500 e 1.200 €. Per ottenere questi guadagni bisogna produrre, prima le specialità indicate in questo lavoro, poi è necessario collocarle sul mercato. E' evidente che questi due percorsi devono procedere in contemporanea.

Secondo nostre valutazioni economiche, uno stabilimento di trattamento del siero di latte con le tecnologie di membrana, come descritto nel Capitolo 7, dimensionato a trattare 600 m³/giorno di siero, ripaga (pay back) in tre mesi l'impianto del costo di 8,5 milioni di €.

Sicuramente la vendita dei prodotti non è un'operazione banale e scontata in un mercato, come quello degli integratori alimentari, già ampiamente controllato dai produttori esteri che vanno dai greci, ai polacchi, agli olandesi, francesi, tedeschi, ma costituiti soprattutto da americani ed ora anche cinesi.

Questo mercato potrebbe essere attaccato e messo in sofferenza con produzioni nazionali di qualità, legate a specifiche produzioni casearie. Ad esempio, si potrebbero produrre sieroproteine altamente purificate e peptidi bioattivi ottenuti dal siero di parmigiano.

Come è noto, per far decollare un mercato di sieroderivati, occorrono quantitativi di prodotti importanti ed una forte spinta di marketing e pubblicità, altrimenti le nuove specialità rimangono invendute, anche se hanno specifiche e caratteristiche biochimiche migliori della concorrenza.

Anche sul versante della ricerca pubblica si dovrebbe promuovere una maggiore sintonia fra Università ed Enti pubblici per finalizzare i risultati alla costruzione di grossi impianti, nelle zone di maggiore produzione del siero, penso alla Lombardia, all'Emilia Romagna, alla Puglia, alla Campania, alla Sardegna.

Il nostro studio è stato eseguito tramite un Progetto PIA del Ministero Attività Produttive, presentato dalla Società Sieroproteine con il supporto scientifico dell'ENEA. Questo strumento progettuale si è rivelato molto interessante e particolarmente finalizzato, ma è nato da un'iniziativa isolata, senza un coinvolgimento più ampio a livello nazionale, come meriterebbe l'argomento.

Ci auguriamo che questo studio impegnativo e i finanziamenti pubblici erogati alla Società Sieroproteine possano servire a realizzare un impianto industriale, e che da questo esempio possano sorgere presto iniziative imprenditoriali concrete da parte di altri imprenditori. Il Paese ha bisogno di innovazione tecnologica vera, ed il settore siero offre questa opportunità, compresa quella di formare nuove figure professionali specializzate nella chimica fine e nelle tecnologie di produzione, cui garantire un'occupazione dignitosa.

Sprecare ogni giorno migliaia di tonnellate di siero, come avviene oggi in Italia, è un'operazione che non possiamo accettare, è contro la logica, il buon senso e la morale.

Tabella di conversione delle unità di misura

SUPERFICIE		
1ft ²	0,0929 m ²	929 cm ²
1m ²	10 ⁴ cm ²	10,764 ft ²
1 cm ²	0,0011 ft ²	0,1550 in ²
DENSITÀ		
1lb (mass)/ft ³	16,0185 g/L	
DIFFUSIONE		
1 ft ² /h	2,581 x 10 ⁻⁵ m ² /s	
1 m ² /s	3,875 x 10 ⁴ ft ² /h	
FLUSSO		
1 gallone/ft ² /giorno	1,7 litri/m ² /h	
FORZA E PRESSIONE		
1 dine	1 g cm/s ²	
1 Kg m/s ²	1 Newton (N)	
1 bar	10 ⁵ pascal (Pa)	10 ⁵ N/m ²
1 psia	6,89476 x 10 ⁴ g/cm sec ²	6,89476 x 10 ⁴ dine/cm ²
1 atm. = 1,01325 bar	14,696 psia	101,3251 kPa
1 dine/cm ²	2,0886 x 10 ⁻³ lb/ft ²	
1 kPa	0,1450383 psi	
1 Kg /cm ²	14,2234 psi	
LUNGHEZZA		
1 ft	0,3048 m	
1 inch	2,540 cm	
1 m	39,37 inches	
1 micron (μ)	10 ⁻⁶ m	10 ⁻⁴ cm
1 Angstrom (A°)	10 ⁻¹⁰ m	10 ⁻⁴ μ = 10 nm
1 nm	0,1 A°	10 ⁻⁹ m
MASSA E COEFFICIENTI DI TRASFERIMENTO MASSA		
1 libbra (lb)	16 once	453,59 g
1 Kg	2,2046 lb	
1 ton.	1000 kg	
1 cm/s	0,01 m/s	
1 ft/h	8,4668 x 10 ⁻⁵ m/s	
POTENZA; LAVORO E ENERGIA		
1 cavallo vapore (HP)	0,74570 KW = 550 ft lb/s	0,7068 BTU/s
1 watt (W)	14,30 cal/min	1 J/s
1 BTU	1055,06 J	
1 kcal	4,1840 kJ	
1 HP-ora	0,7457 kW-ora	2544 BTU
TEMPERATURA		
T (°F)	[T (°C) x 1,8] + 32	
T (°C)	[T (°F) -32]/1,8	
VELOCITÀ, VISCOSITÀ E VOLUME		
1 m/s	3,281 ft/s	
1 centipoise (cp)= 0,01 poise	10 ⁻³ Pa s = 10 ⁻³ kg/m s	10 ⁻³ N s/m ²
1 lb/ft s	1488,16 cp	
1 cp	2,4191 lb/ft h	6,72 x 10 ⁻⁴ lb/ft s
1 gallone (USA)	3,78541 litri (l)	
1 l	1000 cm ³	
1 m ³	1000 l	264,17 galloni (USA)
1 in ³	16,387 cm ³	
1 ft ³	28,317 l	

Ringraziamenti



Questo lavoro ha potuto vedere la luce grazie al contributo di 13 giovani ricercatori che hanno collaborato con entusiasmo e competenza alla realizzazione dell'opera.

Ringrazio in particolare tutto il gruppo della Società Sieroproteine, incominciando dal dr. Felice Monterossi, agronomo, direttore generale della Società Sieroproteine.

Ringrazio in particolare il dr. Enrico Ballista, chimico industriale, responsabile della hall tecnologica della Società, che si è sobbarcato un lavoro durissimo di circa 2 anni, per l'esecuzione delle prove sperimentali con gli impianti pilota, riportate nel Capitolo 7.

Ringrazio la dr.ssa Eugenia Magarò, chimica pura, responsabile del laboratorio analitico della Società Sieroproteine e con essa i suoi collaboratori.

Questo gruppo, costituito dal dr. Fabio Aiello, chimico, dalla dr.ssa Isabella Pisani, CTF, e dalla dr.ssa Mariangela Frangella, biologa, con specializzazione in microbiologia, oltre a mettere a punto le metodologie analitiche su tutti composti del siero, ha studiato la cinetica di formazione dei GOS, riportata nel Capitolo 5.

Ringrazio il dr. Domenico Caponio, laurea in CTF, che ha contribuito in maniera magistrale alla preparazione delle polveri sieroproteiche con tecniche di spray dryer, riportate nel Capitolo 9.

Ringrazio il dr. Daniele Pizzichini, biologo molecolare, che ha contribuito alla stesura e alla impostazione concettuale del libro ed ha sviluppato un'approfondita ricerca bibliografica, specialmente sulle tematiche trattate nei Capitoli 3 e 4.

Ringrazio l'ing. Pietro Tasselli, stagista ENEA, che ha contribuito alla elaborazione dei modelli matematici relativi al funzionamento dei processi a membrana, nei Capitoli 6 e 7. L'ingegnere è l'unico collaboratore ad aver lavorato gratis.

Desidero ringraziare il dr. Claudio Russo, laureato in Scienze Ambientali, che ha eseguito magistralmente tutte le sperimentazioni di laboratorio condotte in ENEA, svolgendo in particolare la ricerca del Capitolo 8.

Ringrazio la Società Formaggi Boccea, nella persona del dr. Emanuele Marella, che ha gentilmente fornito il siero di latte utilizzato per tutte le sperimentazioni condotte presso il Centro Ricerche Casaccia dell'ENEA.

Ringrazio la società Torchiani Impianti per l'implementazione della progettazione ENEA e per la costruzione magistrale delle unità pilota a membrana utilizzate dalla Società Sieroproteine, riportate nel Capitolo 10.

Ringrazio il dott. Giuliano Ghisu dell'ENEA per il contributo alla revisione e alla messa a punto editoriale del volume.

Edito dall'ENEA
Unità Comunicazione
Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma
www.enea.it

Edizione del volume: Giuliano Ghisu
Stampa: Primaprint (Viterbo)
Finito di stampare nel mese di giugno 2006