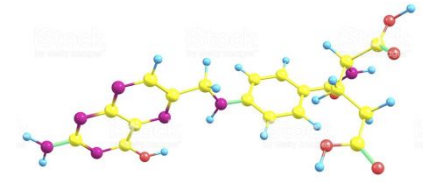
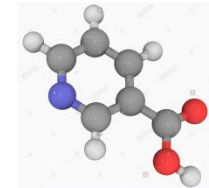
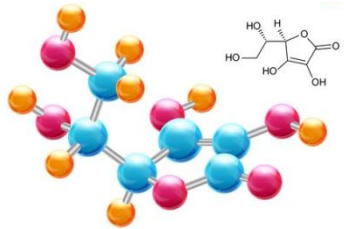


Progetto MilkBioActinCaps



# Risultati preliminari sulla qualità del latte



Silvia Vincenzetti, Paolo Polidori

## Scopo di questa unità operativa è di determinare:

- Qualità nutrizionale del latte prodotto da bovine alimentate con microincapsulati di composti bioattivi da scarti dell'industria alimentare (**Gruppo M**)
- I dati ottenuti vengono confrontati con un gruppo di controllo alimentato con dieta standard (**Gruppo C**).
- Qualità nutrizionale di formaggi prodotti con il suddetto latte (**esperimenti in corso**)

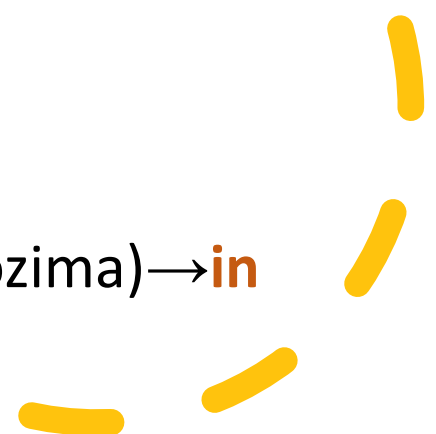


## CAMPIONI DI LATTE ANALIZZATI INDIVIDUALMENTE

T0	T27	T29	T35
10 M	10 M	10 M	10 M
10 C	10 C	10 C	10 C

## ANALISI EFFETTUATE

- ✓ Analisi vitamine idrosolubili
- ✓ Analisi vitamine liposolubili
- ✓ Attività lattoperossidasi
- ✓ Proprietà antiossidante
- ✓ Analisi HPLC proteine (lattoferrina,  $\alpha$ -lattalbumina,  $\beta$ -lattoglobulina, lisozima) → **in corso**



# Analisi vitamine idrosolubili

## Materiali & Metodi

- ✓ Le vitamine idrosolubili sono state analizzate mediante un metodo in HPLC. I campioni sono stati protetti dalla luce durante tutte le analisi.
- ✓ A 5,0 ml di ciascun campione di latte sono stati aggiunti 0,5 g di TCA. Miscelare per 10 minuti e centrifugare per 10 minuti a 1250xg per separare le due fasi.
- ✓ Recuperare il primo supernatante.
- ✓ Al precipitato sono stati aggiunti 1,5 ml di TCA al 4%, miscelare per 10 minuti e quindi centrifugati come prima. Recuperare il secondo supernatante
- ✓ I due estratti acidi sono stati combinati (volume finale circa 5 ml), centrifugati a 1000xg per 10 min, e filtrati attraverso un filtro da 0,45  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{l}$  iniettati in HPLC (1260 Infinity LC System, Agilent Technologies)
- ✓ Colonna: HiQsil C18HS, (5 $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm)
- ✓ Fase mobile: isocratica con acqua: metanolo (85:15) contenente 0,5% trietilammina, acido acetico glaciale 2,4% e acido ottansolfonico 5 mM (pH 3.6)
- ✓ Flusso 0,9 ml/min;  $\lambda = 254$  e 270 nm
- ✓ La vitamina C è stata determinata tramite un kit (L-Ascorbic Acid colorimetric method, Boehringer Mannheim)

# Analisi vitamine idrosolubili

## Equazione delle rette di calibrazione e tempi di ritenzione

La significatività delle differenze nei valori ottenuti in questo studio è stata determinata attraverso l'analisi della varianza utilizzando il software SAS (2001). Differenze significative tra le medie sono state indicate quando  $P < 0.05$ .

Hydrosoluble Vitamin standards	RT (min)	Equation	R <sup>2</sup>
Thiamine (vitamin B1)	24.2-24.6	$y=33.53x-3.8732$	0.992
Riboflavin (vitamin B2)	19.4-19.9	$y=121.82x-0.9437$	0.999
Nicotinic acid	4.27	$y=15.323-0.3843$	0.999
Nicotinamide	5.8-6.0	$y=10.343x+3.4316$	0.995
Pyridoxine (vitamin B6)	8.14	$y=11.605x-3.3578$	0.999
Folic acid	12.2-13.4	$Y=110.71x-15.488$	0.999



# Analisi vitamine idrosolubili

## RISULTATI

Dati grezzi, analisi individuali

Sample	Vitamin B3 (µM)				Nicotinamide (µM)				Vitamin B6 (µM)				Folic acid (µM)				Vitamin C (µM)			
	T0	T27	T29	T35	T0	T27	T29	T35	T0	T27	T29	T35	T0	T27	T29	T35	T0	T27	T29	T35
2568 C	32,36	25,75	20,29	26,93	2,21	7,08	8,59	5,00	1,69	0	1,63	0	2,23	2,01	2,07	2,06	60,01	86,56	61,59	46,60
2591 C	15,33	16,31	25,10	31,98	15,48	3,80	4,05	8,93	0	2,33	1,72	0	1,94	2,48	2,53	2,581	0	66,29	23,02	27,40
2586 C	78,89	21,19	19,75	23,45	2,86	7,38	8,22	5,77	0	2,71	1,71	0	1,19	1,85	2,13	2,23	ND	39,59	31,80	53,70
7563 C	20,09	33,39	12,29	5,68	8,10	9,47	8,59	4,26	2,96	1,87	1,77	1,79	1,72	2,29	2,01	1,89	10,73	65,58	58,82	20,79
4354 C	58,73	47,64	58,60	41,62	13,64	10,17	10,59	8,07	2,38	2,00	2,27	2,15	2,40	2,24	2,55	2,40	28,14	44,75	54,59	36,65
4357 C	45,85	63,52	36,64	78,89	10,95	4,43	2,21	6,38	3,36	3,60	2,10	2,45	2,72	3,37	3,00	3,053	62,32	57,31	59,13	33,57
6282 C	37,39	50,01	ND	22,06	3,53	6,70	ND	5,91	2,74	3,17	ND	2,22	2,42	2,62	ND	2,31	58,19	78,85	ND	41,88
2581 C	24,67	31,59	22,81	23,30	6,89	7,47	8,48	6,06	0	3,41	2,02	1,91	2,44	2,74	2,27	2,25	72,34	72,34	57,59	61,52
4349 C	33,49	28,41	30,22	25,37	8,65	6,64	5,48	4,82	2,03	0	2,01	1,77	2,36	2,25	2,06	2,20	40,94	93,24	31,95	44,04
2583 C	10,84	37,04	24,50	ND	13,26	10,74	9,53	ND	0	2,79	0	ND	2,52	2,94	2,92	ND	44,36	60,49	41,34	0
mean	35,77	35,49	27,80	31,03	8,56	7,39	7,31	6,13	2,53	2,73	1,90	1,37	2,19	2,48	2,39	2,33	47,13	66,5	46,7	36,6
SD	20,86	14,47	13,40	20,27	4,74	2,26	2,76	1,51	0,61	0,64	0,23	1,05	0,45	0,45	0,38	0,33	20,3	17,1	14,7	17,5
2573 M	26,54	57,42	53,28	15,83	7,16	6,54	2,13	5,17	2,05	3,07	1,70	0	3,07	3,38	2,88	3,21	33,95	ND	82,38	160,4
2574 M	26,87	28,73	ND	12,50	9,04	7,60	ND	4,69	1,78	1,78	ND	0	2,26	2,08	ND	2,11	19,55	43,42	ND	43,50
2582 M	19,67	11,92	11,87	0,0	7,83	1,69	1,64	3,79	1,76	1,83	0	1,51	2,87	2,41	1,60	2,72	0	19,02	0	12,16
2588 M	23,94	24,19	21,45	13,44	10,15	4,05	5,06	8,61	2,81	3,96	3,66	3,46	1,82	2,34	1,69	1,86	25,79	0	68,14	116,2
2589 M	29,41	32,46	25,48	4,51	5,90	8,57	6,45	2,57	2,46	3,75	3,35	0	1,66	1,75	1,58	1,64	26,79	88,54	81,92	80,23
2594 M	26,66	ND	ND	17,38	6,34	ND	ND	3,26	1,62	ND	ND	2,17	2,85	ND	ND	1,86	35,34	44,27	ND	0
4347 M	29,76	52,46	ND	7,34	9,04	2,07	ND	2,95	2,97	1,87	ND	0	2,81	2,65	ND	2,33	0	44,42	ND	102,9
4358 M	26,89	20,37	13,89	10,71	9,50	4,99	6,97	5,58	4,38	2,64	8,47	3,71	1,81	1,75	1,33	2,04	33,8	47,12	21,94	38,11
4658 M	37,91	38,23	37,24	0,0	4,45	5,91	2,45	2,52	1,52	0	0	0	2,25	2,05	2,26	2,51	23,17	82,38	113,1	43,73
4363 M	0,0	21,92	19,43	9,49	2,13	8,56	3,48	11,48	0	0	0	0	1,95	2,12	2,16	2,31	0	8,24	76,07	86,31
mean	27,52	31,97	26,09	11,40	7,16	5,55	4,03	5,06	2,37	2,70	2,45	1,08	2,33	2,28	1,92	2,26	28,34	47,2	63,4	68,35
SD	4,92	15,07	14,61	4,29	2,51	2,58	2,15	2,91	0,91	0,92	3,09	1,52	0,52	0,5	0,53	0,47	6,1	27,5	38,9	46,4



# Analisi vitamine idrosolubili

## RISULTATI

Le vitamine B1 e B2 non sono state rilevate in questi campioni di latte. I risultati degli effetti dei microincapsulati sul contenuto di vitamine idrosolubili del latte (media  $\pm$  SD), sono mostrati nella tabella .

	T <sub>0</sub> C Group	T <sub>0</sub> M Group	T <sub>27</sub> C Group	T <sub>27</sub> M Group	T <sub>29</sub> C Group	T <sub>29</sub> M Group	T <sub>35</sub> C Group	T <sub>35</sub> M group
Vitamin B <sub>3</sub> (μM)	35.8 $\pm$ 20.9 <sup>a</sup>	27.5 $\pm$ 4.92 <sup>a</sup>	35.5 $\pm$ 14.5 <sup>a</sup>	32.0 $\pm$ 15.0 <sup>a</sup>	27.8 $\pm$ 13.4 <sup>b</sup>	26.1 $\pm$ 14.6 <sup>b</sup>	31.0 $\pm$ 20.3 <sup>a</sup>	11.4 $\pm$ 4.30 <sup>c</sup>
Nicotinamide (μM)	8.60 $\pm$ 4.74 <sup>a</sup>	7.16 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>	7.39 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>	5.55 $\pm$ 2.60 <sup>b</sup>	7.31 $\pm$ 2.80 <sup>a</sup>	4.03 $\pm$ 2.15 <sup>B</sup>	6.13 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>	5.06 $\pm$ 2.91 <sup>B</sup>
Vitamin B <sub>6</sub> (μM)	2.53 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	2.37 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	2.73 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	2.70 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	1.90 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	2.45 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	1.37 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	1.08 $\pm$ 1.52 <sup>b</sup>
Vitamin B <sub>9</sub> (μM)	2.19 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	2.33 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	2.48 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	2.28 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	2.39 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	1.92 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	2.33 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	2.26 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>
Vitamin C (μM)	47.1 $\pm$ 20.3 <sup>a</sup>	28.3 $\pm$ 6.1 <sup>C</sup>	66.5 $\pm$ 17.1 <sup>B</sup>	47.2 $\pm$ 27.5 <sup>a</sup>	46.7 $\pm$ 14.7 <sup>a</sup>	63.4 $\pm$ 39.0 <sup>b</sup>	36.6 $\pm$ 17.5 <sup>C</sup>	68.4 $\pm$ 46.4 <sup>b</sup>

Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative:

b (P<0,05)

B (P<0,01)

C (P<0,001)

# Analisi vitamine idrosolubili

## RISULTATI

- ✓ Il contenuto di **vitamina B<sub>3</sub>** diminuisce significativamente ( $P < 0,001$ ) nel campione (T35) del gruppo M;
- ✓ Il contenuto di **nicotinammide** si riduce in maniera significativa nel gruppo trattato M ( $P < 0,01$ ) sia a T29 che a T35: Tale riduzione si osserva anche nel gruppo controllo (C), tuttavia essa è risultata meno significativa ( $P < 0,05$ );
- ✓ Il contenuto di **vitamina B<sub>6</sub>** ha mostrato una significativa riduzione sia nel gruppo di controllo (C) che nel gruppo trattato (M) nei campioni prelevati a fine trattamento (T35): tale effetto si potrebbe attribuire allo stadio di lattazione piuttosto che al trattamento M.
- ✓ Il contenuto della **vitamina B<sub>9</sub> (acido folico)** non è stato influenzato dal trattamento, non sono state registrate differenze significative
- ✓ Il contenuto di **vitamina C** nei campioni T29 e T35 del gruppo trattato (M) era significativamente ( $P < 0,01$ ) superiore rispetto agli stessi tempi del gruppo di controllo (C).
- ✓ **L'incremento di vitamina C nei T29 e T35 può essere attribuito agli effetti del trattamento**



# Analisi vitamine liposolubili

## Materiali & Metodi

- ✓ A 5 ml di latte in un pallone tarato aggiunti 0,1 g di acido ascorbico, 10 ml di etanolo assoluto e 2 ml di soluzione di idrossido di potassio al 60%.
- ✓ Il pallone tarato è stato chiuso ermeticamente e tenuto al buio, la miscela è stata incubata a 60 °C per 30 min sotto agitazione, raffreddata per 5 min in acqua fredda (acqua e ghiaccio)
- ✓ Aggiunta di 5 ml di n-esano seguito da agitando vigorosamente per un minuto. Il contenuto è stato trasferito in un imbuto separatore da 50 ml e la fase è stata lasciata separare per 5 minuti; questo passaggio è stato ripetuto tre volte.
- ✓ Tutte le fasi organiche raccolte vengono evaporate mediante speedvac.
- ✓ Le corse cromatografiche sono state eseguite utilizzando un sistema HPLC Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies).
- ✓ Colonna: C18 HiQSil HS, 5  $\mu$ m, 4,6 mm i.d, 250 mm (Kya Tech Corporation).
- ✓ Fase mobile metanolo e acqua (95: 5, v/v)
- ✓ >Flusso: 1 mL/min,  $\lambda$ =280 nm

# Analisi vitamine liposolubili

## Equazione delle rette di calibrazione e tempi di ritenzione

Fat-soluble Vitamin standards	RT (min)	Equation	R <sup>2</sup>
Vitamin A	4.20-4.30	$y = 1812x + 28,015$	0.98
Vitamin D3	7.60-8.10	$y = 1756,2x - 39,996$	0.99
Vitamin E	8.40-9.0	$y = 229,45x - 8,0551$	0.99
Vitamin K1	13.4-13.6	$y = 1330,7x - 140,23$	0.99

La significatività delle differenze nei valori ottenuti in questo studio è stata determinata attraverso l'analisi della varianza utilizzando il software SAS (2001). Differenze significative tra le medie sono state indicate quando  $P < 0.05$

# Analisi vitamine liposolubili

Dati grezzi, analisi individuali

RISULTATI

	Vitamin A (µM)				Vitamin D3 (µM)				Vitamin E (µM)				Vitamin K1 (µM)			
Sample	T0	T27	T29	T35	T0	T27	T29	T35	T0	T27	T29	T35	T0	T27	T29	T35
2568 C	0,511	0,653	0,59	0,70	0,0843	0,071	0,093	0,114	0,337	1,156	0,400	1,596	0	0	0,357	0
2591 C	0,213	0,514	0,71	0,68	0,116	0,092	0,0710	0,105	1,804	0,580	0,329	1,367	0	0	0,297	0
2586 C	ND	0,689	0,61	0,65	ND	0,144	0,088	0,126	ND	0,101	0,537	2,582	0	0	0,346	0
7563 C	1,018	0,751	0,72	0,72	0,099	0,121	0,085	0,085	8,795	0,823	0,473	0,473	0,543	0,343	0,365	0,365
4354 C	0,644	4,290	0,70	1,19	0,083	0,071	0,111	0,123	0,268	0,101	1,096	1,203	0	0	0,338	0,467
4357 C	1,189	1,891	0,17	0,66	0,106	0,071	0,087	0,112	0,722	1,094	0,365	0,815	0	0	0,364	0,341
6282 C	0,512	0,877	ND	0,31	0,071	0,113	ND	0,0710	0,263	1,370	ND	0,95	0	0	ND	0,359
2581 C	1,176	0,613	0,66	1,22	0,085	0,091	0,096	0,113	0,245	0,780	0,365	1,303	0,420	0,317	0,344	0,379
4349 C	0,834	0,008	0,54	0,64	0,083	0,080	0,083	0,105	0,262	0,264	0,269	1,105	0	0	0,334	0,335
2583 C	0,875	0,258	0,71	0,70	0,089	0,110	0,091	0,114	0,336	0,621	0,415	1,596	0	0	0	0
Mean	0,775	1,05	0,60	0,75	0,091	0,096	0,090	0,106	1,45	0,69	0,472	1,27			0,305	0,25
SD	0,331	0,24	0,17	0,28	0,014	0,025	0,011	0,018	0,80	0,44	0,25	0,59			0,116	0,19
2573 M	1,679	1,156	0,55	0,81	0,145	0,128	0,110	0,111	1,352	1,232	0,755	1,119	0,495	0,473	0,327	0,334
2574 M	1,411	0,860	ND	0,80	0,116	0,109	ND	0,096	0,543	0,968	ND	0,903	0,373	0,345	ND	0,380
2582 M	2,441	1,688	1,14	0,79	0,136	0,104	0,108	0,093	3,870	3,342	1,678	2,197	0,353	0,365	0,363	0,312
2588 M	0,609	1,263	0,59	1,05	0,119	0,131	0,110	0,104	0,729	0,972	1,189	1,146	0,559	0,707	0,331	0,364
2589 M	0,971	0,701	0,64	0,72	0,150	0,101	0,096	0,106	2,086	1,341	1,427	0,717	0,427	0,375	0,331	0,347
2594 M	2,108	ND	ND	0,76	0,138	ND	ND	0,101	0,754	ND	ND	0,781	ND	ND	ND	0,373
4347 M	1,466	0,787	ND	1,14	0,122	0,117	ND	0,129	2,400	0,327	ND	0,977	0,373	0,353	ND	0,390
4358 M	0,540	0,966	0,41	0,74	0,127	0,140	0,110	0,110	0,782	1,106	0,447	0,651	0	0,408	0,327	0,328
4658 M	0,313	0,824	0,97	0,65	0,106	0,100	0,098	0,093	0,516	0,918	0,586	0,662	0,327	0,316	0,334	0,342
4363 M	0,784	1,112	1,20	0,75	0,109	0,112	0,113	0,109	1,885	0,447	0,832	1,119	0	0,361	0,368	0,336
Mean	1,232	1,04	0,78	0,82	0,127	0,116	0,107	0,105	1,492	1,184	0,987	1,02	0,29	0,411	0,340	0,35



# Analisi vitamine liposolubili

## RISULTATI

I risultati degli effetti dei microincapsulati sul contenuto di vitamine liposolubili del latte (media  $\pm$  SD), sono mostrati nella tabella .

	T <sub>0</sub> C Group	T <sub>0</sub> M Group	T <sub>27</sub> C Group	T <sub>27</sub> M Group	T <sub>29</sub> C Group	T <sub>29</sub> M Group	T <sub>35</sub> C Group	T <sub>35</sub> M group
Vitamin A ( $\mu$ M)	0.78 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	1.23 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>	1.05 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	1.04 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	0.60 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.78 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	0.75 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>	0.82 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>
Vitamin D <sub>3</sub> ( $\mu$ M)	0.09 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01
Vitamin E ( $\mu$ M)	1.45 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.44 <sup>B</sup>	1.18 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	0.47 $\pm$ 0.25 <sup>B</sup>	0.99 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	1.27 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>
Vitamin K <sub>1</sub> ( $\mu$ M)	n.d.	0.29 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	n.d.	0.41 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.25 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	0.35 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>

Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative:

b (P<0,05)

B (P<0,01)

C (P<0,001)



# Analisi vitamine liposolubili

- ✓ Il contenuto di vitamina A diminuisce significativamente al T29 e T35 ( $P < 0,05$ ) sia nel gruppo C che nel gruppo M rispetto al T0;
- ✓ Il contenuto di vitamina D<sub>3</sub> rimane invariato sia nel gruppo trattato (M) che nel gruppo controllo (C), quindi non viene influenzato dal trattamento con microuncapsulati;
- ✓ Il contenuto di vitamina E ha mostrato una diminuzione significativa sia nel gruppo di controllo (C) che nel gruppo trattato (M) dopo 27 e 29 giorni di trattamento, con una diminuzione maggiore nel gruppo di controllo ( $P < 0,01$ ) rispetto al gruppo trattato ( $P < 0,05$ );
- ✓ Il contenuto di vitamina K ha mostrato un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nel gruppo trattato (M) dal T0 al T27, rimanendo poi stabile nei campioni successivi (T29 e T35).

# Attività della lattoperossidasi

## Materiali & Metodi

- ✓ Prima della determinazione dell'attività della lattoperossidasi, ciascun campione di latte è stato scremato mediante centrifugazione a 3000 g per 30 min a 15°C.
- ✓ L'attività della lattoperossidasi è stata determinata spettrofotometricamente su ciascun campione di latte scremato utilizzando come substrato il 2,2'-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Solfonic Acid) (ABTS, Sigma Chemical Co).
- ✓ La metodica si basa sulla reazione:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ABTS ridotto} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{ABTS ossidato}$ .
- ✓ Miscela di reazione: fosfato di potassio 100 mM pH 5,5; 23 mM ABST; 0,0008% (p/p) di perossido di idrogeno; 10µl di latte scremato.
- ✓  $\lambda = 436 \text{ nm}$
- ✓ Un'unità di lattoperossidasi è definita come la quantità dell'enzima che ossida 1,0 µmole di ABST al minuto a pH 5,5 e 25°C.

## RISULTATI

# Attività lattoperossidasi

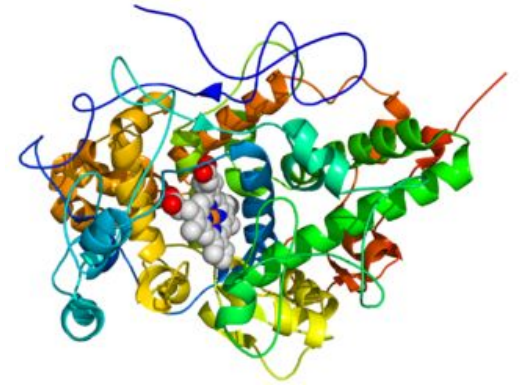
## Dati grezzi, analisi individuali

[illegible][illegible]

# Attività lattoperossidasi

## RISULTATI

	Group C (control)	Group M (treated)
T <sub>0</sub>	2.76±0.55 <sup>a</sup>	3.01±0.59 <sup>a</sup>
T <sub>27</sub>	3.95±1.91 <sup>a</sup>	3.20±0.88 <sup>a</sup>
T <sub>29</sub>	3.27±0.90 <sup>a</sup>	3.61±0.14 <sup>a</sup>
T <sub>35</sub>	3.26±1.35 <sup>a</sup>	6.34±3.13 <sup>C</sup>



Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative: b (P<0,05) B (P<0,01); C (P<0,001)

- ✓ Dai risultati è evidente che dopo 35 giorni di trattamento delle bovine con i microincapsulati si ha un **significativo aumento dell'attività della lattoperossidasi nel latte** rispetto ai controlli (P<0,001).
- ✓ La lattoperossidasi membro della superfamiglia delle perossidasi-cicloossigenasi e uno degli enzimi più abbondanti nel latte bovino, costituendo circa l'1% delle sieroproteine del latte.
- ✓ La lattoperossidasi è un enzima antiossidante, è un sistema antimicrobico naturale.



I risultati ottenuti indicano che:

- ✓ Il contenuto di vitamina C e l'attività della lattoperossidasi aumenta significativamente nel latte del gruppo M (trattati con microincapsulati) a T35 rispetto ai controlli

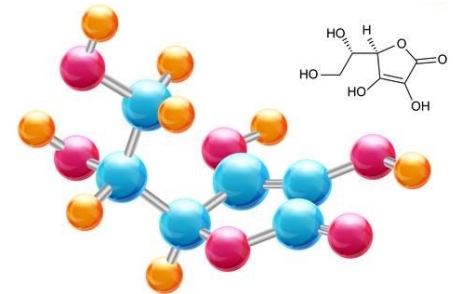
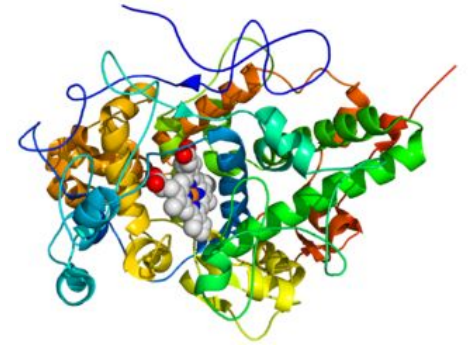
✓ **La lattoperossidasi e la vitamina C sono agenti antiossidanti:**

La lattoperossidasi catalizza l'ossidazione di diversi substrati inorganici e organici da parte del perossido di idrogeno. La lattoperossidasi insieme ai suoi substrati, al perossido di idrogeno e ai prodotti ossidati costituisce il «sistema lattoperossidasi».

I prodotti ossidati prodotti attraverso l'azione di questo enzima presentano attività battericide e antivirali

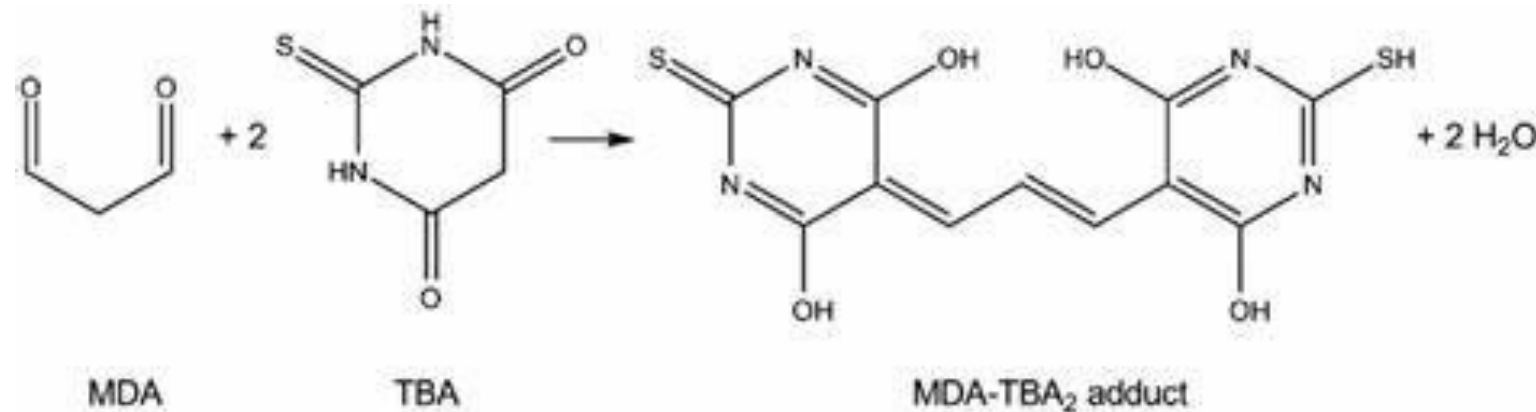
La vitamina C è un potente agente riducente ed antiossidante ed è essenziale in numerose reazioni enzimatiche e nella formazione del collagene.

Studi hanno dimostrato che l'assunzione di vitamina C dal latte può essere associata ad un ridotto rischio di dermatite atopica nei bambini.



# TBARS test (saggio di perossidazione lipidica)

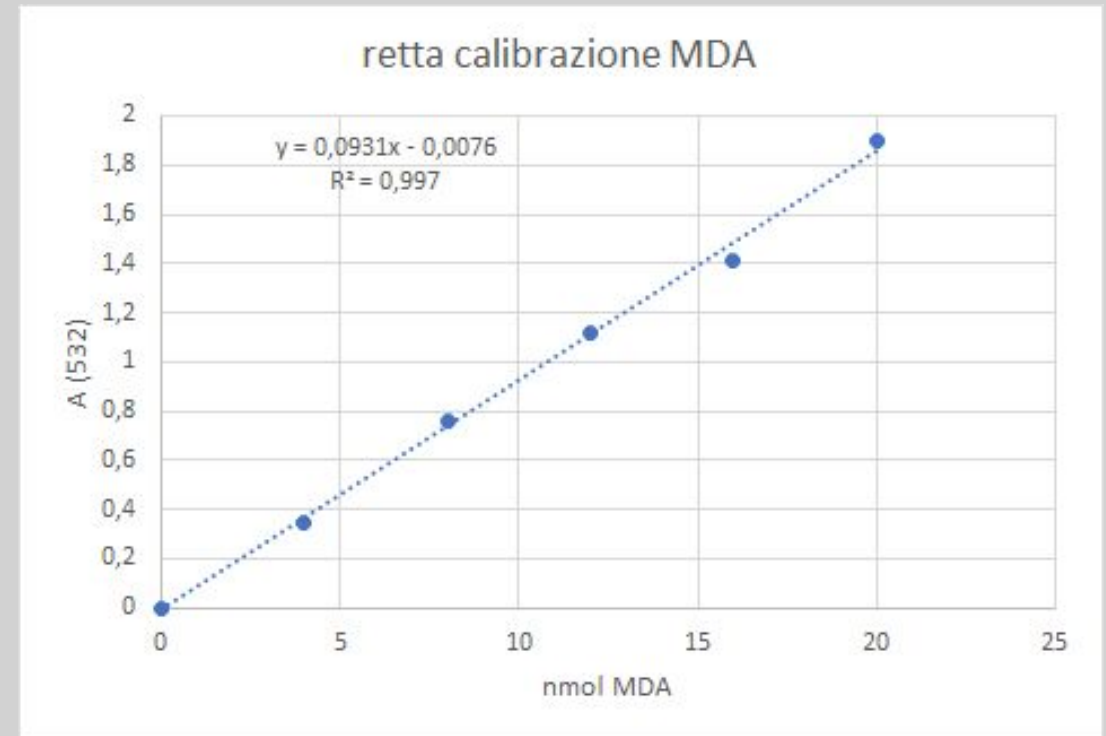
- Il TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) test consente di misurare in maniera pressoché istantanea lo stato di perossidazione lipidica come indice di stress ossidativo.
- Tra i prodotti di degradazione ossidativa che ne derivano viene adottato come marker rappresentativo la malondialdeide (MDA), che ha la capacità di legarsi chimicamente all'acido tiobarbiturico (TBA) aggiunto all'ambiente di reazione.
- In opportune condizioni di acidità e di temperatura, i substrati ossidati formano infatti un addotto cromogeno TBA-MDA-TBA, determinabile per via spettrofotometrica a  $\lambda=532$  nm



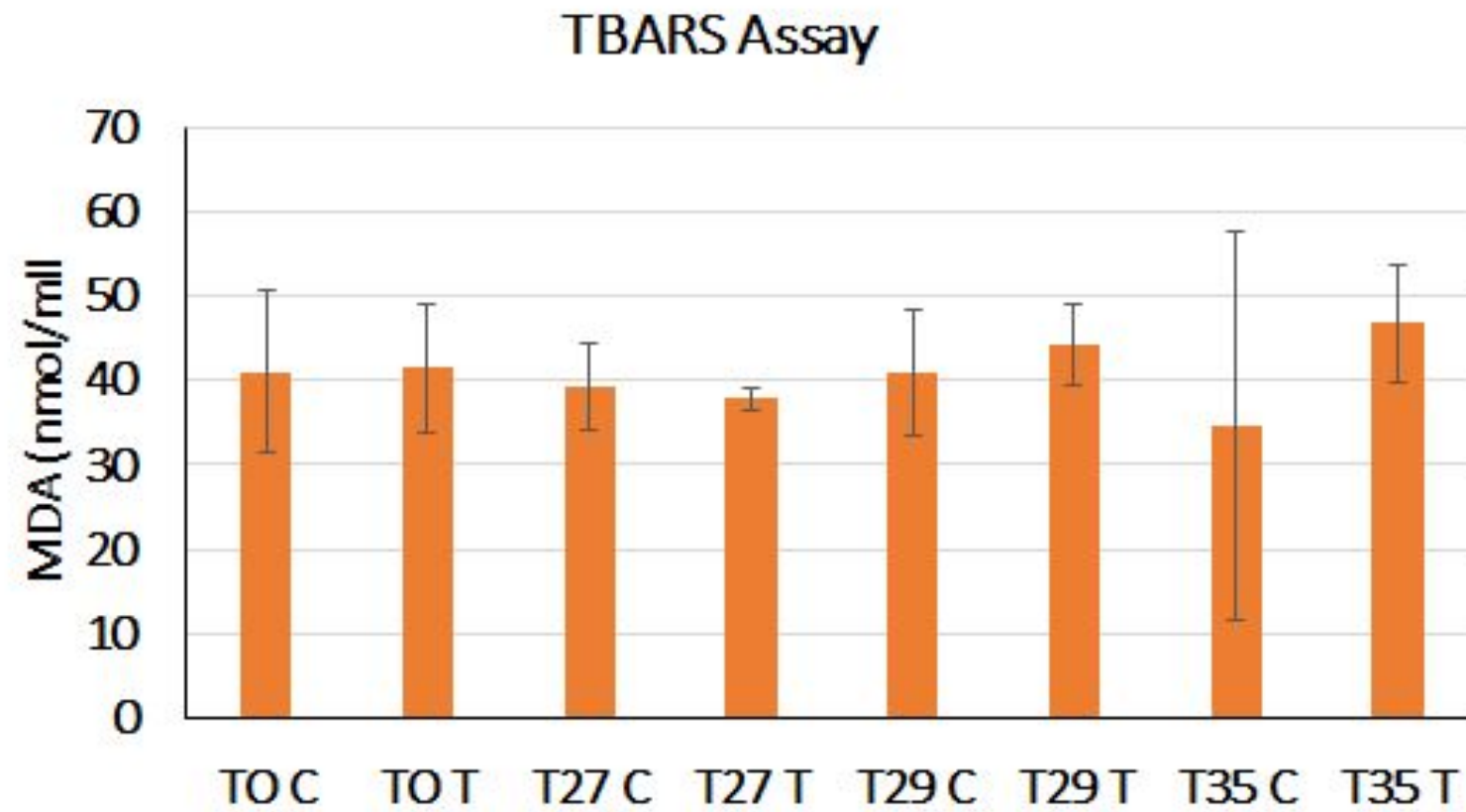
# TBARS test (saggio di perossidazione lipidica)

## Materiali & Metodi

La perossidazione lipidica è stata determinata attraverso il kit Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Sigma Aldrich, Catalog Number MAK085). Con questo kit la perossidazione lipidica è determinata dalla reazione di MDA con acido tiobarbiturico (TBA) per formare un prodotto colorato (532 nm), proporzionale alla MDA presente.



lipidica)



RISULTATI

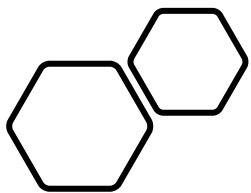


lipidica)

## RISULTATI

Dai risultati ottenuti, risulta evidente che non vi sono grandi differenze tra trattati e controlli tra il T0 fino al T35, indicando che il contenuto di MDA (prodotto della perossidazione lipidica) rimane pressochè costante pertanto anche la capacità antiossidante non viene influenzata dal trattamento.

- ✓ 300 µl di ciascun campione di latte scremato vengono addizionati a 600 µl di tampone chiarificatore (0,1M Bis-Tris, pH 8,0; 8M urea; 1,3% citrato trisodico; 0,3% DTT)
- ✓ 100 µl vengono iniettati in colonna (Jupiter 5µm C4 300 Å, LC column 150 x 4.6 mm, Phenomenex) collegata ad un sistema HPLC (1260 Infinity LC System, Agilent Technologies)
- ✓ La colonna è stata equilibrata in acido trifluoroacetico (TFA)/H<sub>2</sub>O 1:1000 v/v (tampone A) e l'eluizione è stata ottenuta mediante gradiente con TFA/H<sub>2</sub>O/acetonitrile 1:100:900 v/v (tampone B): %B = 0, tempo = 10 min; %B = 20, tempo = 10 min; %B = 40, tempo = 0,1 min; %B = 60, tempo = 40 min.
- ✓ Flusso= 1 ml/min;  $\lambda$ =280 nm.

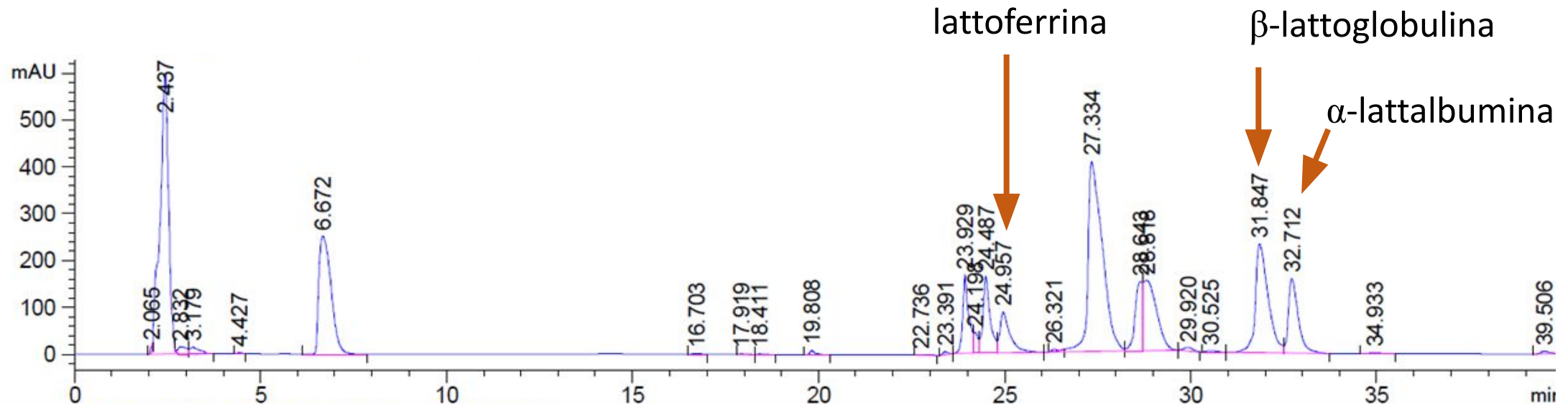


# ANALISI HPLC SIEROPROTEINE DEL LATTE

Risultati

Sieroproteina	R.T. (min)	Equazione	R <sup>2</sup>
$\alpha$ -lattalbumina	32,80	$y = 9859,4x - 479,17$	0,981
$\beta$ -lattoglobulina	31,99	$y = 3150,8x - 52,876$	0,992
Lisozima	24,60	$y = 11676x - 228,27$	0,994
Lattoferrina	25,00	$y = 5086.2x - 32.299$	0,985

T29 2588 T





- Ringraziamenti:
- Sig.ra Natalina Cammertoni
- Dott. Giuseppe Santini



**GRAZIE PER L'ATTENZIONE**

