

Profiling delle proteine in formulazioni nutraceutiche: Caratterizzazione dei componenti

Alessia Bellomaria ^{a, b, 1}, Ridvan Nepravishta ^{a, 1}, Mario Marchetti ^c, Maurizio Paci ^a

^a Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata. Via della Ricerca Scientifica 1, 00133 Roma, Italia

^b Cooperativa di Ricerca Finalizzata, Via della Ricerca Scientifica 1, 00133 Roma, Italia

^c Italfarmacia srl, Via Tor Sapienza, 7, Roma, Italia

¹ hanno contribuito a questo lavoro in egual misura

Abstract

Attualmente sono presenti sul mercato diversi preparati nutraceutici contenenti proteine, aminoacidi e altre piccole molecole. In questo lavoro proponiamo la spettroscopia NMR come ad esempio ¹H NMR, ¹H-¹H TOCSY e DOSY per la caratterizzazione dei loro componenti, per l'identificazione e per il profiling, confrontando questi risultati con quelli ottenuti con la tecnica elettroforetica come per esempio la spettroscopia SDS-PAGE. La ¹H NMR è stata applicata per le misurazioni degli aminoacidi e di altri composti aggiunti dal produttore. Inoltre la funzione di autocorrelazione ottenuta dall'unico spettro dimensionale è stata utilizzata senza l'assegnazione completa delle risonanze dello spettro NMR delle proteine per la valutazione di qualità e stabilità del ripiegamento. Infine è stata effettuata la tecnica DOSY NMR sui campioni per la caratterizzazione della gamma di peso molecolare medio delle proteine. Tutte queste caratteristiche considerate insieme creano un'importante raccolta di dati utili per la valutazione del profiling delle proteine e la caratterizzazione di tali formulazioni.

1. Introduzione

Le proteine sono una fonte importante di aminoacidi essenziali per la corretta crescita e per tutte le altre funzioni fisiologiche. È anche risaputo che le proteine non sono conservate in pool di riserva come di solito avviene per il glucosio o per i lipidi, a causa di questo è necessario che l'assunzione delle proteine sia costante e basata su un prodotto di buona qualità. Infatti un apporto insufficiente, particolarmente durante i periodi di crescita e di sviluppo, può causare gravi problemi che possono colpire tutti gli organi del corpo e in particolare il cervello, il cuore e il sistema immunitario (Ramani, Wijesinha-Bettoni, & Burlingame, 2010). Tra le fonti più importanti di proteine per la dieta umana il latte di mucca ha un ruolo centrale. Infatti il latte fornisce circa 32g/L di proteine. Il latte di mucca è mediamente composto dall'87% di acqua, 4-5% di lattosio, 3% di grassi e 0,1% di vitamine. Le proteine nel latte di mucca possono essere suddivise in proteine solubili e insolubili. La frazione di proteine solubili contiene proteine che sono comunemente denominate proteine del siero, mentre le proteine insolubili sono primariamente caseine. (Jennes 1979). Le proteine del siero rappresentano il 20% della frazione del latte mentre le caseine rappresentano il restante 80%. Entrambe le frazioni sono classificate come proteine di alta qualità in considerazione del fabbisogno umano di aminoacidi, di digeribilità e biodisponibilità. Infatti, le proteine del latte sono spesso valutate come la miglior fonte di proteine tenendo conto del valore degli aminoacidi corretto per la digeribilità delle proteine (PDCAAS) (Haug, Hastmark, & Harstad, 2007, Schaafsma, 2000, 20012). Inoltre, diversi peptidi bioattivi derivati dall'idrolisi di queste proteine hanno mostrato di avere moltissimi ruoli biologici che potrebbero esercitare un'azione protettiva nella salute umana. Questi ruoli biologici comprendono effetti antibatterici, antivirali, antifungini, antiossidanti, antiipertensivi, antimicrobici, antitrombotici, oppioidi e immunomodulatori. In aggiunta è stato anche dimostrato il loro ruolo nel migliorare l'assorbimento di altri nutrienti. (Mills, Ross, Hill, Fitzgerald, & Stanton, 2011). Nel latte, le due principali frazioni di proteine, le caseine e le proteine del siero, presentano una composizione diversa di aminoacidi. Le proteine del siero del latte, in particolare, sono composte principalmente da aminoacidi a catena ramificata, mentre le caseine sono composte principalmente da aminoacidi aromatici e contenenti zolfo come la istidina, la fenilalanina e la metionina (Tang, Moore, Kujbida, Tarnopolsky, & Phillips, 2009). Dal punto di vista dei componenti le proteine del siero del latte sono una classe eterogenea che differisce in composizione,

struttura e peso molecolare (MW). I componenti principali sono la β -lattoglobulina, la α -lattoalbumina, la sieralbumina, le immunoglobuline, la lattoferrina e altre frazioni minori di proteine del siero del latte. Le caseine sono raggruppate in quattro grandi classi : α 1-, α 2-, β -, e le k- caseine , e sono tutte proteine contenenti fosfato che appaiono come micelle nella forma nativa e, al contrario delle proteine del siero del latte, precipitano a pH acido (pH~4.0). Oltretutto, durante la digestione, il comportamento di queste caseine e proteine del siero del latte differisce notevolmente. Le proteine del siero del latte vengono rapidamente evacuate dallo stomaco, mentre le caseine coagulano o precipitano sotto il pH acido gastrico che ritarda il trasferimento degli aminoacidi al tratto intestinale. (Mahè, Roos, & Benamouzig, 1996). Le proteine del siero del latte rivelano un tasso maggiore per il loro svuotamento e assorbimento gastrico rispetto alle caseine, questo è dovuto alla loro composizione e alla loro solubilità. Per queste ragioni alcuni studi hanno ipotizzato che l'assunzione delle proteine del siero del latte favorisca aumenti più rilevanti dell'aminoacidemia post-prandiale rispetto alle caseine. (Boire et al. 1997), anche se questo è un punto che deve essere definito meglio. In realtà altri studi hanno riferito che la lenta digestione delle caseine ha un valore biologico maggiore rispetto alle proteine del siero del latte che vengono digerite rapidamente, a dimostrare che le proteine del siero del latte non sono in grado di sostenere la richiesta di aminoacidi post-prandiali anabolizzanti . (Lacroix et al.2006;Meisel &FitzGerald, 2003).

Sono stati già segnalati sulla salute umana svariati effetti delle proteine del siero del latte che hanno dimostrato un'attività antimicrobica per i componenti del siero del latte, come ad esempio isozima, lattoferrina, lattoperossidasi (Jenssen & Hanrock, 2009; Min, Harris, & Krochta, 2005) e un'azione di soppressione nello sviluppo di tumori a causa di lattoferrina, β - lattoglobulina e α -lattoalbumina (Parodi, 2007). È anche importante sottolineare che la β -lattoglobulina è un vettore del retinolo con proprietà antiossidanti, mentre la lattoferrina è un elemento fondamentale per l'assorbimento del ferro ed esercita effetti antiossidanti e anticancerogeni (Gonzalez-Chavez, Arevalo-Gallegos ,& Arevalo- Gallegos, & Rascon-Cruz, 2009).

In questo studio abbiamo analizzato alcune formulazioni nutraceutiche contenenti principalmente aminoacidi liberi e proteine del siero di latte. L'uso della spettroscopia ^1H NMR come metodo rapido e diretto per identificare gli aminoacidi e altre piccole molecole ha permesso di misurare il loro contenuto confrontandolo con la composizione dichiarata dal produttore. Inoltre l'applicazione della spettroscopia NMR ci ha permesso di caratterizzare le formulazioni in termini di contenuto di proteine e questi dati sono stati rapportati con gli esperimenti di elettroforesi eseguiti sui campioni. In aggiunta l'indagine di dispersione di risonanza(e) NMR negli spettri è stata utilizzata per provare la stabilità strutturale e il ripiegamento delle proteine (ad esempio, la presenza di strutture proteiche stabili) in soluzione. Questa è stata eseguita utilizzando l'analisi statistica come la funzione di autocorrelazione, anche in assenza di assegnazione individuale delle migrazioni chimiche ^1H delle proteine. Infatti in base ai dati sperimentali ottenuti sulle proteine ben strutturate e sulle proteine che si trovano in stato di globulo fuso o in uno stato elicoidale parzialmente ripiegato, esiste una soglia ben definita che può essere utilizzata come parametro caratteristico per la stabilità strutturale delle proteine in soluzione (ad esempio lo stato di ripiegamento) (Hoffmann,Eichmüller, Steinhauser & Konrat, 2005).

Inoltre i coefficienti di diffusione delle proteine nei campioni ottenuti dalla spettroscopia a diffusione regolata (DOSY) ha reso possibile un'ulteriore caratterizzazione dell'integrità delle proteine utilizzate nelle formulazioni.

2. Materiali e metodi

2.1.Campioni

I campioni utilizzati in questo studio sono stati gentilmente offerti da Italfarmacia Srl. Roma. Tutti i campioni erano composti da proteine del siero del latte con l'aggiunta da parte del produttore di isoleucina, triptofano, ornitina, taurina, citrullina e citrato. Isoleucina pura, triptofano, ornitina, taurina, citrullina e il citrato, utili per le assegnazioni di risonanze negli spettri NMR, sono stati comprati da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

2.2. Determinazione della concentrazione delle proteine totali

La concentrazione totale delle proteine è stata determinata colorimetricamente mediante il metodo di

Bradford (reagente Bradford, Sigma-Aldrich, B-6916, Stati Uniti d'America). La curva standard è stata preparata utilizzando una soluzione standard di sieralbumina bovina (BSA) a 2000 µg / ml (Pierce Chemical), è stata diluita in tampone di 50 mM sodio carbonato - sodio bicarbonato (pH 10,0) secondo le indicazioni del produttore. Le concentrazioni dei modelli standard sono stati 25, 125, 250, e 500 µg / ml. Le letture dell'assorbimento a 595 nm sono state determinate tramite uno spettrofotometro UV-VIS Lambda-Bio Jasco 600. Tutti i campioni sono stati diluiti nel tampone dell'analisi con la preparazione di soluzioni di 0,5 mg/ml e sono stati analizzati con il kit di Bradford per valutare le concentrazioni effettive. Le soluzioni usate per il test di Bradford sono state preparate facendo riferimento alle informazioni date sulla confezione. Le definizioni sono state ripetute almeno quattro volte per ogni preparazione (Bradford, 1976).

2.3. Elettroforesi

La composizione di proteine dei campioni è stata analizzata mediante SDS-PAGE, utilizzando un gel di separazione al 12% e un gel di impilamento al 4%. I campioni sono stati riscaldati per 5 minuti a 100 ° C in fiale chiuse con SDS di 1% (w/ v) in presenza di β-mercaptoetanolo. L'elettroforesi è stata eseguita in tampone Tris-HCl, 125 V, pH 8,3. Dopo l'elettroforesi le proteine nel gel di separazione sono state rese visibili dalla colorazione con Coomassie Brilliant Blue R-250. Gli standard con uni M.W. di 15, 25, 35, 50, 75, 100 e 150 kDa sono stati usati per realizzare un grafico log M.W. vs mobilità. La curva standard è stata poi utilizzata per la determinazione del peso molecolare delle proteine in ciascun campione.

2.4. Test di densità del gel SDS-PAGE

L'analisi densitometrica delle bande proteiche separate dal gel SDS PAGE è stata eseguita con il software ImageJ (Istituto Nazionale della Salute) misurando l'intensità (I) di ciascuna banda di proteine

2.5. Spettroscopia NMR

2.5.1. Preparazione dei campioni

Tutti i campioni sono stati preparati sciogliendo direttamente 0,05 g/ml di ciascun campione in H₂O presentando 10% D₂O per il segnale di blocco e sono stati trasferiti su tubi NMR di 5 mm per la misurazione, utilizzando DSS come riferimento:

2.5.2. Esperimenti NMR

Sono stati eseguiti sugli strumenti 400,13 e 700,13 MHz di Bruker Avance. Al fine di sopprimere il segnale dell'acqua a 4,7 ppm gli esperimenti ¹H NMR sono stati ottenuti con la sequenza di impulsi zgpr della library Bruker usando 32K punti accumulando 64 scans a 298 K.

2.5.3. Esperimenti NMR di correlazione scalare

Sono stati eseguiti esperimenti di correlazione scalare come la spettroscopia correlata totale (TOCSY), utilizzando la sequenza di impulsi Watergate per sopprimere il segnale dell'acqua (Braunschweiler & Ernst 1983 ; Davies & Bax, 1985). È stato utilizzato un tempo tipico di miscelazione di 150 ms per osservare sia la diretta connettività , oppure tutti e due, la diretta e la remota. Gli esperimenti NMR bidimensionali sono stati eseguiti nella modalità di fase sensibile utilizzando 2 K di memoria per 512 incrementi. La quantità di scansioni è stata ottimizzata per ottenere un rapporto segnale /rumore soddisfacente.

2.5.4. Misurazione di diffusione tramite esperimento DOSY

Gli spettri DOSY sono stati processati utilizzando la sequenza di impulsi ledbpgppr2s della library Bruker al fine di sopprimere il segnale dell' acqua a 4,7 ppm. Durante l'esperimento DOSY sono stati ottenuti 32 spettri monodimensionali con 64 scansioni in una progressione lineare crescente variabile da 5% a 95% con un delta di 70 ms e un delta di 2 ms. Gli spettri sono stati poi analizzati utilizzando il modulo DOSY implementato nel Software Broker TOPSIN 3.1.

2.5.5. Autocorrelazione

Per l'analisi statistica abbiamo usato la funzione di autocorrelazione degli spettri ¹H NMR delle proteine seguendo la procedura precedentemente riportata (Hoffmann et al. 2005) ,ottenuta con la sequenza di

impulsi zgpr per la saturazione del segnale dell'acqua. Gli spettri ^1H NMR sono stati elaborati con modulo binning in Mestre Nova a 0,01 ppm (ricerca Mestrelab, Spagna) e il calcolo della funzione di autocorrelazione è stato effettuato con il software Matlab (MathWorks, USA). Il segnale dell'acqua residua è stato escluso dal calcolo eliminando l'area spettrale 4,90-4,55 ppm come precedentemente riportato (Hoffmann et al. 2005). La funzione di autocorrelazione è stata ottenuta tramite la trasformata Fourier del prodotto tra il decadimento ad induzione libera e il suo complesso coniugato ed è quindi correlata, rispettivamente, alla funzione di distribuzione della frequenza e alle differenze del tasso di velocità di rilassamento (Hoffmann et al. 2005). Le funzioni di autocorrelazione ottenute $C(t)$ sono normalizzate al valore della differenza più piccola di frequenza disponibile (0,01 ppm) e numericamente arrotondate. I valori della funzione di autocorrelazione alla frequenza 0.5 ppm, $C(0,5)$ sono stati usati come misura di ripiegamento strutturale delle proteine (Hoffmann et al. 2005).

3. Risultati

Nel corso di questo studio sono stati esaminati sette formulazioni nutraceutiche commerciali contenenti proteine del siero del latte, aminoacidi e altre piccole molecole, oggi presenti sul mercato italiano.

3.1. Caratterizzazione SDS-PAGE

Il primo approccio è stato l'uso di elettroforesi SDS-PAGE, come riportato al punto 2. Al fine di normalizzare la quantità di proteine in tutti i campioni, le soluzioni sono state controllate dal Bradford test e dopo è stata calcolata la giusta quantità di proteine adatta da caricare per ogni linea sul SDS-PAGE. Per questo esperimento, i campioni sono stati trattati con β -mercaptoetanolo e bolliti prima di caricarli sul gel per rendere sicuro che le proteine siano state separate in assenza di ponti disolfuro intermolecolari che possano cambiare il loro comportamento elettroforetico. Gli esperimenti sono stati ripetuti con differenti concentrazioni dei campioni e con una percentuale diversa di acrilammide nel gel per ottenere la migliore separazione dei componenti. Come si può osservare nella Fig.1, che riporta la elettroforesi su SDS-PAGE di tutti i campioni, possono essere chiaramente identificate sette bande principali separate, etichettate con le lettere da a a f. Paragonato agli standard comuni delle proteine, le bande osservate sono state assegnate alle proteine con il peso molecolare seguente: banda a ~ 90 kDa; banda b-c ~ 69-60 kDa; banda d-d1 ~ 45 kDa; banda e ~ 30 kDa; banda f \leq 20 kDa. Il profiling di proteine per ogni linea, rispettivamente, è stata utilizzato per il confronto di questi risultati. Dai grafici nella Fig.1 può essere fatta un'osservazione interessante sul profilo delle frazioni proteiche in queste formulazioni. Per quanto riguarda la componente a notiamo che tale componente, anche se con le diverse concentrazioni, è presente in tutte le formulazioni ad eccezione del campione G. I componenti b e c sono presenti in tutte le formulazioni, ma specificamente in A, B ed E si può notare che il componente b mostra una concentrazione più alta rispetto al componente c, mentre in altri campioni sono quasi equivalenti. Il componente d è presente in tutti i campioni, mentre d₁ è stato trovato solo nei campioni E e G. Il componente e non è stato trovato nel campione F, mentre il componente f, derivante da proteine con peso molecolare relativamente basso, è stato trovato in tutti i campioni e con una concentrazione maggiore nei campioni F e D.

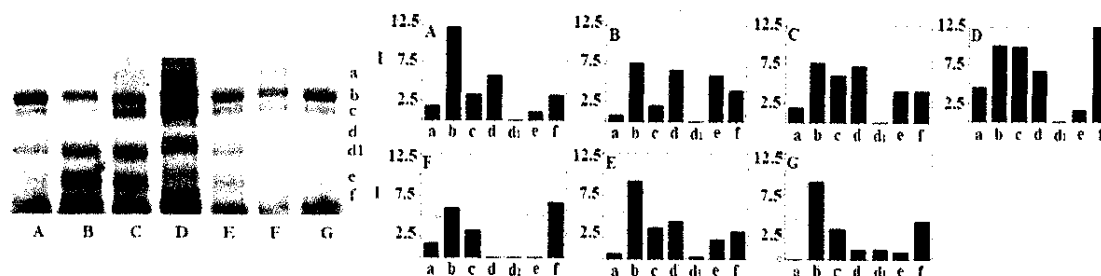


Fig.1. Analisi SDS-PAGE e analisi densitometrica delle sette bande presenti nel gel SDS-PAGE. I campioni caricati sono stati concentrati 0,5 mg / L per ciascuna formulazione nutraceutica commerciale

Riguardo alla tipologia delle proteine le bande con peso molecolare alto possono essere assegnate alla

lattoferrina, lattoalbumina; le bande intorno a 20-30kDa possono essere attribuite alla frazione solubile delle caseine nelle loro diverse isoforme che sono presenti nella materia prima utilizzata per la formulazione indicata dei campioni nutraceutici. Le bande con peso molecolare inferiore a 20kDa devono essere attribuite alle lattoglobuline. Tuttavia, le frazioni con basso peso molecolare possono essere anche attribuite ai frammenti causati dalla proteolisi o dalla scissione durante la lavorazione della materia prima. È importante notare che nei campioni analizzati non vi è un profilo comune di componenti proteici. Probabilmente tale variabilità potrebbe essere dovuta alla fonte di proteine utilizzata come materia prima dal produttore. In realtà ci sono diverse procedure utilizzate per ottenere proteine del siero del latte che vengono applicate dai produttori di materie prime e possono avere un forte impatto sul profilo delle proteine del siero del latte utilizzate per queste preparazioni.

3.2. Spettroscopia NMR

La tecnica elettroforetica si è rivelata ricca di informazioni per il profiling dei componenti proteici presenti in ciascuna formulazione ma non è risultata disponibile alcuna informazione su piccole molecole come gli aminoacidi e altre piccole molecole aggiunte da ciascun produttore alle formulazioni. Inoltre gli esperimenti SDS-PAGE sopra riportati non hanno dato informazioni sulla qualità delle proteine come per esempio lo stato di ripiegamento, che può essere un'altra caratteristica distintiva tra i campioni. In questo studio abbiamo applicato la spettroscopia NMR utilizzando le sequenze di impulsi standard per ^1H NMR, ^1H - ^1H TOCSY e la spettroscopia ^1H -DOSY per ottenere maggiori informazioni su questo punto. Un'attenta analisi degli spettri è stata effettuata al fine di:

- a. assegnare piccole molecole (aminoacidi) aggiunte dal produttore alle formulazioni e controllare la conformità tra le concentrazioni dichiarate e quelle reali.
- b. controllare lo stato di ripiegamento delle proteine come indicatore di un buon processo di produzione
- c. la valutazione del peso molecolare medio delle proteine nei campioni con la tecnica DOSY in comparazione ai risultati di SDS-PAGE

Questa procedura ora definita "profiling" è tutt'altro che una determinazione "quantitativa" che richiede l'assegnazione completa e la determinazione completa (come in Gowda Naga & Raftery, 2014) bensì è una procedura veloce per la caratterizzazione durante il processo di produzione dei nutraceutici di proteine.

3.2.1. Identificazione di piccole molecole e aminoacidi

Nella Fig.2, gli spettri ottenuti sul campione **A** e **B** sono riportati come esempi. Le risonanze degli spettri sono state assegnate e tramite l'integrazione della concentrazione tutti gli aminoacidi e le altre sostanze sono state valutate al fine di confrontare i loro valori con quelli dichiarati dai produttori. L'unica eccezione è stato il triptofano, a causa della sua concentrazione molto bassa. Le assegnazioni sono state eseguite aggiungendo ai campioni piccole quantità di aminoacidi e di altri componenti aggiunti alla preparazione di proteine dalle ditte come riferito (Fig.2). Quindi la concentrazione di questi pochi aminoacidi e di altre molecole aggiunte è stata misurata mediante l'utilizzo di una fonte esterna (DSS al 0,1%, dati non presentati). In questa fase la presenza delle risonanze delle proteine non è stata una presenza interferente a causa della loro bassa concentrazione, tuttavia sono stati usati impulsi NMR adatti per filtrare le risonanze delle proteine. Deve essere ribadito che le risonanze dalle proteine mostrano in generale migrazioni chimiche piuttosto disperse come verrà presentato più avanti. I risultati ottenuti dalla spettroscopia ^1H NMR delle concentrazioni misurate delle molecole precedentemente citate e aggiunte ai preparati, erano concordanti con le quantità dichiarate dal produttore (dati da non rivelare). Questo conferma che la spettroscopia NMR è uno strumento prezioso per controllare in modo rapido e diretto la formulazione di questo tipo di preparazioni.

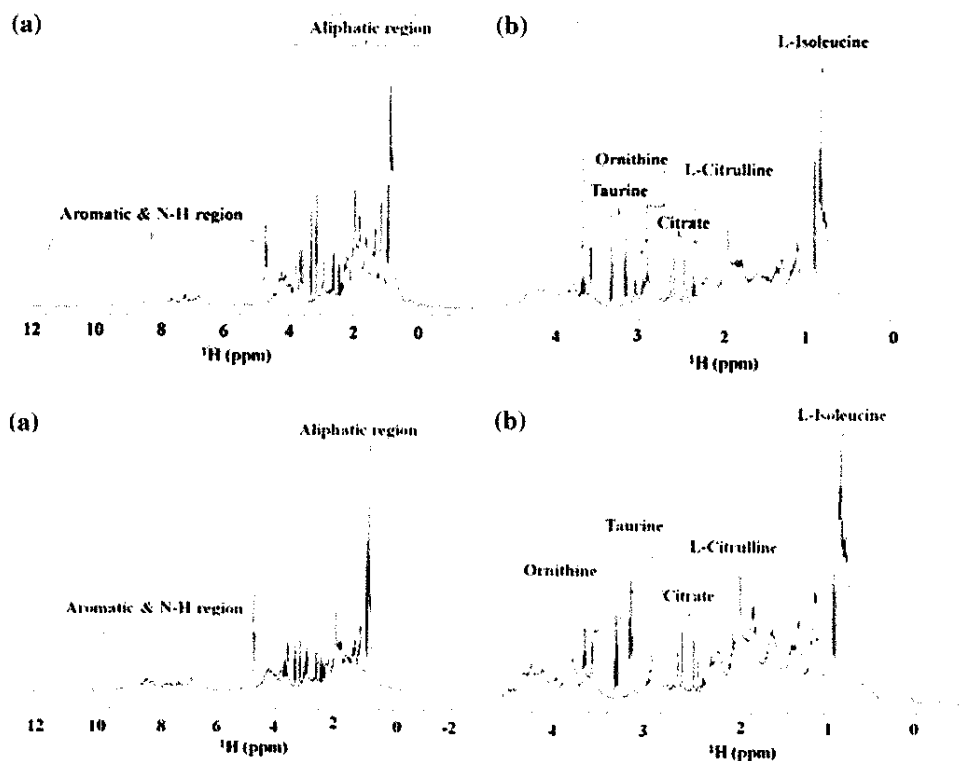


Fig.2. (a) spettro ^1H NMR totale e (b) ingrandimento della regione di spettro tra 0 e 4 ppm nello spettro del campione A (pannelli superiori) e del campione B (pannelli inferiori).

3.2.2. Valutazione del ripiegamento di proteine

La caratterizzazione del ripiegamento di proteine in questi campioni è stata valutata direttamente mediante la spettroscopia NMR dei campioni. Infatti gli spettri ottenuti dagli spettri ^1H NMR e ^1H - ^1H TOCSY hanno dato informazioni in tal senso. In questo caso l'analisi accurata delle regioni dello spettro TOCSY (Fig.3), in particolare nella regione delle impronte digitali, indica una grande diffusione di migrazioni chimiche delle risonanze rispetto alla semplice distribuzione prevista per un solo composto di 20 singoli aminoacidi. Tale dispersione può essere valutata mediante diretta estrazione delle frequenze dei picchi nella regione degli spettri 2D. Inoltre la dispersione delle risonanze nello spettro NMR delle proteine dovuta alle condizioni magnetiche prodotte dalla struttura terziaria parziale o completa può essere usata come indicatore di una struttura terziaria stabile. Infatti l'origine delle migrazioni chimiche ^1H NMR è regolato dalle specificità delle strutture di soluzione 3D delle proteine. Il microambiente magnetico dovuto alla struttura secondaria o terziaria delle proteine crea la dispersione delle risonanze visibile negli spettri NMR ad alta risoluzione. Esistono diversi dati sperimentali ^1H NMR (Seavey, Farr, Westler, & Markley, 1991), che vengono utilizzati principalmente come prerequisito per gli studi strutturali delle proteine. Al contrario si presume che una bassa dispersione delle risonanze sia tranquillamente un indicatore di una struttura mal ripiegata. Infatti le risonanze dei protoni degli aminoacidi comuni da soli o nelle proteine completamente mal ripiegate mostrano uno spettro molto semplice e presentano una dispersione quasi nulla.

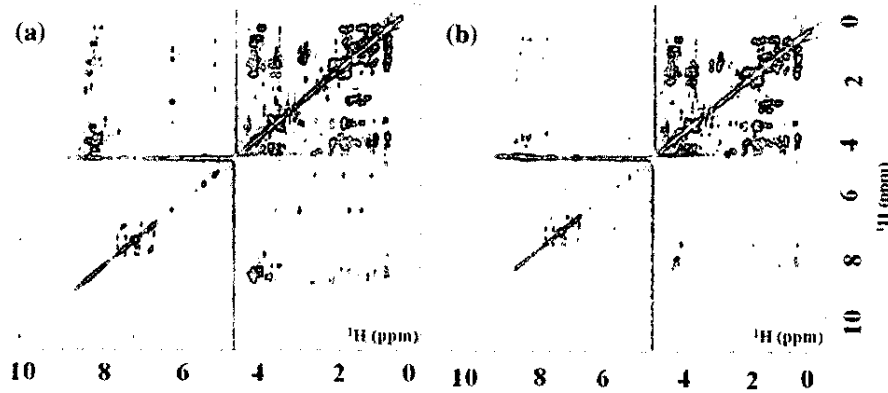


Fig.3 Esempio degli spettri TOCSY di 50 mg del campione **A** (a) e del campione **B** (b) ottenuti a 298 K con la tecnica Watergate per la riduzione del segnale dell'acqua utilizzata per una valutazione di ripiegamento preliminare

Inoltre la presenza di una serie di migrazioni di corrente ad anello nella regione metile, cioè di risonanze con migrazioni chimiche tra 1 e, particolarmente nell'area negativa inferiore a 0 ppm, sono anche indicatori diagnostici di carattere globulare delle proteine e buoni indicatori della loro stabilità (Perkins & Wüthrich, 1979). Un approccio a questa osservazione è stato effettuato con la valutazione delle risonanze degli spettri ^1H NMR mediante la funzione di autocorrelazione, anche in assenza di assegnazione individuale. Questo uso delle statistiche di distribuzione della migrazione chimica ^1H è stato proposto per sondare la stabilità strutturale delle proteine in soluzione (Hoffmann et al. 2005). Il metodo utilizza la funzione di autocorrelazione direttamente sugli spettri ^1H con la dimostrazione che esiste una correlazione significativa tra la funzione di autocorrelazione e la complessità topologica (espresso come ordine di contatto rispettivo) e la stabilità strutturale delle proteine. Lo studio sui diversi gruppi di proteine ripiegate con strutture native o con proteine parzialmente ripiegate ha indicato che il metodo può essere utilizzato in high-throughput (strumentazione ad alta efficienza) per lo screening della stabilità strutturale delle proteine. La valutazione di questa funzione è stata effettuata prendendo in considerazione il valore della funzione di autocorrelazione a 0,5 ppm $C(0.5)$. Il calcolo della funzione di autocorrelazione ottenuto come riportato in Materiali e Metodi ha dato i risultati riportati nella Fig. 4. La funzione di autocorrelazione sui valori di migrazione chimica ha indicato risultati differenti per le proteine dei campioni. Anche la diffusione dei picchi trasversali nello spettro TOCSY sia nella regione $\text{CH}\alpha$ che nella regione NH è stata considerata come un buon indicatore della presenza di una struttura tridimensionale. Nella Fig. 4 e Tabella 1 sia la funzione di autocorrelazione calcolata da ^1H NMR che la valutazione qualitativa del TOCSY sono riportati in allineamento tra loro. Infatti le proteine ripiegate in modo nativo visualizzano i valori $C(0.5) > 0.5$, mentre le proteine parzialmente ripiegate o malpiegate hanno valori di < 0.4 . In generale, sotto il profilo di ripiegamento si può osservare dalla Tabella 1 che il punteggio più alto (HS) è stato raggiunto dal campione **E**, seguito dal campione **A** e **C** con un punteggio alto intermedio (IHS). I campioni **B**, **F**, **G** hanno mostrato un punteggio basso intermedio (ILS), mentre **D** è stato classificato con un punteggio molto basso (VLS)

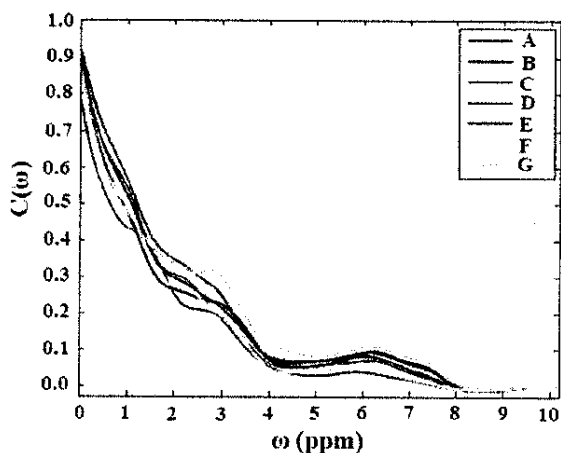


Fig.4. funzione di autocorrelazione degli spettri ^1H NMR della frazione proteica dei campioni A (rosso), B (blu), C (marrone), D (verde), E(rosa), F (giallo), G (arancione).

Tabella 1

Caratterizzazione delle frazioni di proteina dei campioni in quanto alla valutazione di ripiegamento C (0,5) e il peso molecolare medio valutato dagli spettri DOSY.

Campione	C(0,5)	valutazione ripiegamento ^a	peso molecolare medio ^a
A	0.65	+++	++++
B	0.61	++	++
C	0.65	+++	+++
D	0.53	+	++
E	0.70	++++	++++
F	0.59	++	++
G	0.59	++	++++

^a HS (++++), IHS (+++), ILS (++), VLS (+).

^b HMMV(++++), IMMV (+++), LMMV (++) vedi testo.

3.2.3. Valutazione media del peso molecolare della frazione proteica

Gli esperimenti di diffusione NMR (DOSY) che utilizzano un ambiente fisico circostante permanente, come ad esempio la viscosità, la temperatura, per ciascuna specie chimica in soluzione, forniscono un modo per separare i diversi composti in una miscela basata sulla traslazione di differenza nei coefficienti di diffusione (D) e offre uno strumento per acquisire le dimensioni e la forma della molecola. Nel nostro caso eravamo interessati alla valutazione del raggio idrodinamico che può essere collegato al peso molecolare medio delle proteine e di altre molecole nei campioni. È noto che nel caso delle proteine è molto difficile o quasi impossibile ottenere un diagramma di calibrazione generale dei dati di auto-diffusione sul raggio idrodinamico. In effetti le grandi differenze tra le strutture di proteine e la loro differenza nell'idrofilia rende questa misurazione suscettibile a grandi errori. Nei polimeri composti da monomeri uguali monomeri con il solo MW diverso, la diffusione è considerata uno strumento estremamente utile grazie alla curva di calibrazione ad alta affidabilità. Nel nostro caso solo il D di alcune proteine comuni come la lisozima e l'albumina di siero bovino sono state utilizzate come campioni di riferimento (non mostrato). Nei pannelli superiori della Fig. 5 possiamo osservare l'ingrandimento di due esperimenti DOSY come esempio. Gli esperimenti DOSY sono mostrati insieme nei pannelli inferiori e le linee sono una guida dell'occhio come indicazione della facciata di diffusione. Il coefficiente di diffusione (D) viene riportato come $\log D$ e riguarda il raggio delle specie molecolari mediante l'equazione Stokes-Einstein (Einstein, 1956). Poiché il raggio delle specie nella soluzione è solo approssimativamente collegato al loro MW, la misura di D nel nostro caso può fornire informazioni sul peso molecolare medio della frazione proteica del campione in esame (Auguin, Gostan, Delsuc, & Roumestand, 2004). Senza conoscere in anticipo il peso molecolare medio dei campioni possiamo solo classificarli sulla base del loro coefficiente di diffusione come campioni ad alto peso molecolare medio (HMMW) che presentano un basso coefficiente D

corrispondente ad una bassa diffusività, con un peso molecolare intermedio medio (IMMW), e un peso molecolare basso medio (LMMW), con un' elevata diffusività dinamica che mostra un valore D elevato. I risultati sono riassunti nella Tabella 1

4. Discussione

I risultati ottenuti indicano che la spettroscopia NMR rappresenta un protocollo utile, veloce, diretto e preciso per la caratterizzazione delle proteine, degli amminoacidi e delle altre piccole molecole nei preparati nutraceutici e, in generale, delle composizioni farmaceutiche di questo tipo. L'uso della tecnica elettroforetica ci ha permesso di fare una verifica incrociata dei risultati con quelli della spettroscopia NMR usata per il profiling delle proteine per la preparazione di formulazioni nutraceutiche. In questo tipo di analisi è risultato importante distinguere tra le proteine del siero del latte e le proteine idrofobiche, principalmente caseine. Nell'esame elettroforetico è stato anche messo in evidenza la presenza di una quantità significativa di caseina (bande a ~20kDa). Queste proteine hanno mostrato una elevata tendenza a coagulare in una dispersione micellare a causa della loro forte idrofobicità e del loro contenuto inferiore di amminoacidi a catena ramificata. Il coagulo delle caseine è in grado di fornire un rilascio lento e prolungato di amminoacidi nel flusso sanguigno che può durare anche per diverse ore. Questa caratteristica è considerata molto importante per mantenere uno stato anabolico e anti-catabolico sul tessuto muscolare per un periodo relativamente lungo in cui le proteine del siero stimolano una maggiore sintesi proteica ma non sono in grado di limitare il catabolismo proteico. D'altra parte la possibilità di rilevare eventuali specie dovute alla proteolisi del pool di proteine iniziale è un altro strumento efficace per la loro caratterizzazione nei prodotti finali. Questi frammenti possono evidenziare il (i) cambiamento (i) nel pool di proteine durante la fase iniziale della preparazione della formulazioni nutraceutica oppure durante la conservazione in deposito anche a seconda delle condizioni di conservazione e possono essere eventualmente utilizzati per la determinazione della validità del prodotto. Inoltre con l'uso della spettroscopia ^1H NMR è stato possibile individuare gli amminoacidi e altre piccole molecole aggiunte dal produttore alla formulazione e verificare la conformità dei risultati con i quantitativi dichiarati. Questo è molto importante per la valutazione della conformità del prodotto con riferimento al controllo di qualità. Infatti la spettroscopia NMR permette di analizzare direttamente il prodotto intatto in modo semplice e veloce. Un altro aspetto delle formulazioni che è stato considerato in questo studio è stata la valutazione del ripiegamento delle proteine e la valutazione del MW medio utilizzato come indicatore sia della qualità del prodotto sia della sua stabilità. Il ripiegamento è stato ottenuto da entrambi la spettroscopia TOCSY e la spettroscopia ^1H NMR, rispettivamente mediante la valutazione qualitativa. La valutazione del ripiegamento di proteine è stata effettuata dalla funzione di autocorrelazione applicata agli spettri ^1H NMR. Peraltro l'uso di DOSY NMR ci ha permesso di determinare il peso molecolare medio dei campioni. Questi risultati nell'insieme indicano che la spettroscopia NMR e l'applicazione di DOSY NMR sono in grado di caratterizzare il profilo delle proteine contenute nei prodotti nutraceutici in ottimo accordo con la tecnica elettroforetica. Queste caratteristiche sono strettamente legate al livello di qualità dei componenti del prodotto finale commerciale qui esaminato.

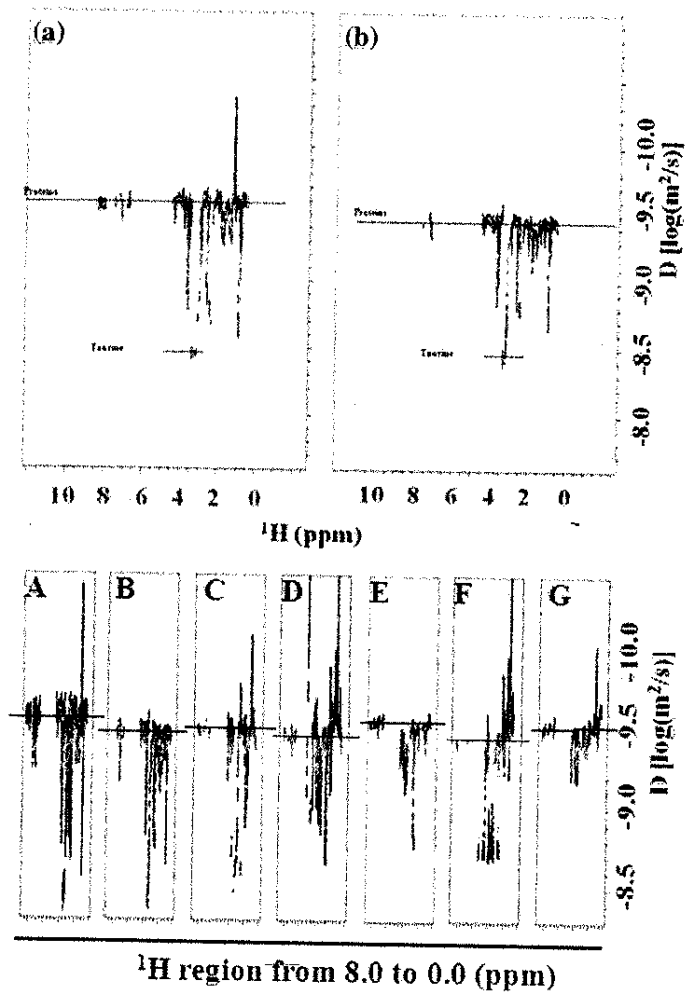


Fig.5. spettroscopia ^1H -DOSY NMR. Come da esempio i pannelli superiori (a e b) sono l'ingrandimento degli spettri ^1H -DOSY dei campioni A e B. Le risonanze dovute all'idrogeno delle proteine sono state usate per misurare il loro coefficiente di diffusione (D). Lo stesso esperimento è stato ripetuto per tutti i campioni (pannello inferiore)

La procedura suggerita può essere molto utile per l'analisi delle composizioni di formulazioni nutraceutiche che contengono proteine, amminoacidi e altre piccole molecole e può dare importanti informazioni sulla qualità delle materie prime utilizzate e/o sul prodotto finito e sulle sue particolari condizioni di conservazione.

5. Conclusioni

In questo lavoro abbiamo dimostrato l'utilizzo dell'elettroforesi e della spettroscopia NMR per la conformità con i quantitativi dichiarati dei componenti aggiunti e per il profiling della frazione proteica di alcuni prodotti nutraceutici. La tecnica elettroforetica è stata molto utile per il profiling della frazione proteica in qualità di strumento semplice ed economico per l'analisi di queste formulazioni. Infatti dai risultati dell'analisi SDS-page siamo stati in grado di osservare quali erano le principali differenze e le similarità tra i campioni. Inoltre, dagli esperimenti NMR qui proposti sono state ottenute informazioni utili sul ripiegamento delle proteine, sul MW medio presente in queste formulazioni. All'occorrenza i test descritti possono caratterizzare in modo rapido e semplice lo stato complessivo del prodotto e possono essere utilizzati come delle analisi preliminari di screening sul prodotto non lavorato oppure sul prodotto finito.

Ringraziamenti

Ringraziamo il signor Fabio Bertocchi per il supporto tecnico NMR nel corso di questo lavoro.

Bibliografia

- Auguin, D., Gostan, T., Delsuc, M. A., & Roumestand, C. (2004). *Détermination de l'état d'oligomérisation du domaine homologue à la pleckstrine de la protéine AKT2 par des techniques RMN. Comptes Rendus Chimie*, 7, 265–271.
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M. P., Maubois, J. L., & Beaufre, B. (1997). *Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 14930–14935.
- Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Braunschweiler, L., & Ernst, R. R. (1983). Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*, 5, 521–528.
- Davies, D. G., & Bax, A. (1985). *Assignment of complex 1H NMR spectra via two dimensional Hartmann-Hann spectroscopy. Journal of the American Chemical Society*, 107, 2820–2821.
- Einstein, A. (1956). *Investigation on the Theory of the Brownian Movement. New York: Dover.*
- Gonzalez-Chavez, S. A., Arevalo-Gallegos, S., & Rascon-Cruz, Q. (2009). *Lactoferrin: structure, function and applications. International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(301), e1–e8.
- Gowda Nagana, G. A., & Raftery, D. (2014). *Quantifying metabolites in protein precipitated serum using NMR spectroscopy. Analytical Chemistry*, 86, 5433–5440.
- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). *Bovine milk in human nutrition – A review. Lipids Health Diseases*, 6, 1–16.
- Hoffmann, B., Eichmüller, C., Steinhauser, O., & Konrat, R. (2005). *Rapid assessment of protein structural stability and fold validation via NMR. Methods in Enzymology*, 394, 142–175.
- Jenness, R. (1979). *Comparative aspects of milk proteins. Journal of Dairy Research*, 46, 197–210.
- Jenssen, H., & Hancock, R. E. W. (2009). *Antimicrobial properties of lactoferrin. Biochimie*, 91, 19–29.
- Lacroix, M., Bos, C., Léonil, J., Airinei, G., Luengo, C., Daré, S., ... Gaudichon, C. (2006). *Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 1070–1079.
- Mahé, S., Roos, N., & Benamouzig, R. (1996). *Gastrojejunal kinetics and the digestion of [15N]β-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. American Journal of Clinical Nutrition*, 63, 546–552.
- Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (2003). *Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. Current Pharmaceutical Design*, 9 (16), 1289–1295.
- Mills, S., Ross, R. P., Hill, C., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2011). *Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. International Dairy Journal*, 21, 377–401.
- Min, S., Harris, L. J., & Krochta, J. M. (2005). *Antimicrobial effects of lactoferrin, lysozyme, and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against Salmonella enterica and Escherichia coli O157:H7. Journal of Food Science*, 70, 332–338.
- Parodi, P. A. (2007). *Role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. Current Pharmaceutical Design Bentham Science Publishers*, 13, 813–828.
- Perkins, S. J., & Wüthrich, K. (1979). *Ring current effects in the conformation dependent NMR chemical shifts of aliphatic protons in the basic pancreatic trypsin inhibitor. Biochimica et Biophysica Acta*, 57, 409–423.
- Ramani, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2010). *Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. British Journal of Nutrition*, 108, S183–S211.
- Schaafsma, G. (2000). *The protein digestibility-corrected amino acid score. Journal of Nutrition*, 130(7), 1865S–1867S.
- Schaafsma, G. (2012). *Advantages and limitations of the protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) as a method for evaluating protein quality in human diets. British Journal of Nutrition*, 108(Suppl. 2), S333–S336.
- Seavey, B. R., Farr, E. A., Westler, W. M., & Markley, J. L. (1991). *A relational database for sequence-specific protein NMR data. Journal of Biomolecular NMR*, 1, 217–236.
- Tang, J. E., Moore, D. R., Kujbida, G. W., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2009). *Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. Journal of Applied Physiology*, 107, 987–992.