

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI  
CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA IN  
TECNOLOGIE ALIMENTARI

# **“Le proteine del siero: un sottoprodotto dalle grandi potenzialità salutistiche”**

Tesi in

28840 TECNOLOGIE ALIMENTARI (C.I.) - 11634 TECNOLOGIE ALIMENTARI

Relatore: Prof.ssa Maria Fiorenza Caboni

Candidata: Elisa Gadani

Correlatore: Dott.ssa Federica Pasini

Matricola N° 789132

Dott.ssa Silvia Marzocchi

Anno Accademico 2018/2019

Sessione I

## INDICE

<b>INDICE</b> .....	<b>2</b>
<b>Capitolo 1: INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Premessa</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Scopo</b> .....	<b>2</b>
<b>Capitolo 2: IL SIERO DI LATTE</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Storia, produzione e uso del siero</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Composizione</b> .....	<b>5</b>
2.2.1 Le proteine del siero .....	6
2.2.2 Effetto della temperatura sulle proteine del siero .....	7
<b>2.3 Regolamenti e ISO per le analisi del siero</b> .....	<b>8</b>
2.3.1 Metalli con effetti tossici nel latte .....	9
<b>Capitolo 3: PROCESSI INDUSTRIALI DI OTTENIMENTO DELLE PROTEINE DEL SIERO</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Processi chimici</b> .....	<b>10</b>
3.1.1 Salatura.....	11
3.1.2 Salatura in tecnica .....	11
3.1.3 Concentrazione isoelettrica .....	12
3.1.4 Precipitazione con temperatura .....	12
3.1.5 Frazionamento con solvente .....	12
<b>3.2 Processi fisici</b> .....	<b>13</b>
3.2.1 Separazione su membrana .....	13
3.2.2 Microfiltrazione (MF) .....	16
3.2.3 Ultrafiltrazione (UF) .....	16
3.2.4 Nanofiltrazione (NF) .....	16
3.2.5 Osmosi inversa (OR).....	17
<b>3.3 Prodotti e utilizzi del siero</b> .....	<b>18</b>
3.3.1 Aspetti commerciali e normativi .....	18
<b>3.4 Impieghi industriali delle frazioni di siero di latte</b> .....	<b>20</b>
<b>Capitolo 4: PROTEINE DEL SIERO DI LATTE - WHEY PROTEIN</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1 Introduzione e storia</b> .....	<b>22</b>

<b>4.2 Classificazione WP</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3 Analisi di mercato e statistiche di consumo</b> .....	<b>24</b>
4.3.1 Mercato globale e europeo .....	24
4.3.2 Mercato delle WP in quello degli integratori .....	25
4.3.3 Mercato italiano .....	26
<b>4.4 Processo estrattivo/isolamento</b> .....	<b>26</b>
<b>4.5 Prodotti whey protein</b> .....	<b>28</b>
4.5.1 Whey protein concentrate (WPC) .....	28
4.5.2 Whey protein concentrate 34 .....	29
4.5.3 Whey protein concentrate 80 .....	29
4.5.4 Whey protein isolate .....	31
4.5.5 Whey protein hydrolyzated .....	33
<b>4.6 Analisi del reale contenuto di proteine in vari brand di whey protein</b> .....	<b>35</b>
 <b>Capitolo 5: LE PROTEINE DEL SIERO DI LATTE COME COMPONENTE CHIAVE NEI SISTEMI ALIMENTARI: PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE, TECNOLOGIE DI PRODUZIONE E APPLICAZIONI</b> .....	
	<b>37</b>
<b>5.1 Proprietà funzionali delle principali WP</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2 Peptidi bioattivi</b> .....	<b>37</b>
<b>5.3 Microincapsulazione con proteine del siero per omogeneità dei prodotti</b> .....	<b>38</b>
<b>5.3.1 Tecniche per la microincapsulazione utilizzando WP</b> .....	<b>39</b>
5.3.2 Studi per una migliore interazione fra microrganismi e WP .....	40
<b>5.4 WP utilizzate in emulsioni</b> .....	<b>41</b>
5.4.1 Meccanismi della stabilizzazione delle emulsioni .....	41
5.4.2 Perdita di solubilità .....	42
5.4.3 Interazione fra proteina e biopolimero .....	42
<b>5.5 Film commestibili, rivestimenti, idrogel e nanoparticelle di proteine del siero di latte</b> .....	<b>43</b>
5.5.1 Pellicole o film e rivestimenti .....	43
5.5.2 Miscelazione di additivi e ingredienti con WP per migliorare le proprietà meccaniche .....	43
5.5.3 Incorporazione di antimicrobici nei film di WP .....	44
5.5.4 Microparticelle di gel di WP .....	45
 <b>Capitolo 6: TECNOLOGIE EMERGENTI APPLICATE ALLA MODIFICA DELLE PROPRIETÀ STRUTTURALI E FUNZIONALI DELLE PROTEINE DEL SIERO DI LATTE</b> .....	
	<b>46</b>

<b>6.1 Tecnologie non termiche per le WP .....</b>	<b>46</b>
6.1.1 Alte pressioni idrostatiche (HPH) .....	46
6.1.2 Campi elettrici pulsati (PEF).....	46
6.1.3 Ultrasuoni US.....	47
6.1.4 Ozono (O <sub>3</sub> ) .....	47
6.1.5 Gas plasma .....	48
6.1.6 Raggi UV .....	48
<b>Capitolo 7: CONCLUSIONI.....</b>	<b>49</b>
<b>Capitolo 8: BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>50</b>
<b>Capitolo 9: SITOGRAFIA E DECRETI LEGISLATIVI.....</b>	<b>62</b>

## Capitolo 1: INTRODUZIONE

### 1.1 Premessa

Al giorno d'oggi il siero di latte è un sottoprodotto presente in elevate quantità e, grazie alle sue proprietà nutrizionali, è sfruttato in molti ambiti del settore agro-alimentare, dalla mangimistica in cui è utilizzato come tale, fino all'ottenimento delle proteine mediante processi di vario tipo. Il siero di latte, prima di essere utilizzato nel settore agro-alimentare, deve essere sottoposto a varie analisi che ne decretino l'idoneità in ottemperanza alle normative nazionali ed europee e, in funzione delle sue caratteristiche, viene classificato nelle varie categorie merceologiche e, fra queste, una delle più importanti è quella delle proteine del siero di latte.

Le proteine del siero di latte sono proteine ad alto valore nutrizionale che apportano benefici alla salute del consumatore e sono sempre più utilizzate da tutte le fasce della popolazione.

Le proteine del siero (whey protein o WP), sono uno dei tanti prodotti derivanti dalle sieroproteine e sono utilizzate soprattutto da sportivi per coprire il fabbisogno proteico giornaliero, cercando di assumere proteine ad alto valore biologico per facilitare la sintesi e il recupero muscolare.

Le WP possono avere diversi gradi purezza in base al metodo di estrazione, al contenuto di proteine e anche di altri componenti come lattosio e lipidi; di conseguenza, queste differenze, che nascono dalle diverse tecniche di preparazione, consentono di ottenere prodotti differenti per valore economico e per fascia di mercato. In Europa il mercato delle WP ha un trend positivo anche per il largo utilizzo sia nel settore del fitness che nel settore medico, che hanno portato ad avere un giro di affari di quasi 2 miliardi di euro. In Italia, ugualmente, le WP sono un prodotto in crescita che produce un guadagno di oltre 1.000.000 di euro. Nel resto del mondo, la situazione è analoga a quella europea e nazionale e, per quanto riguarda i paesi in via di sviluppo, sta permettendo un miglioramento del reddito e un ampliamento dei plessi industriali.

Negli ultimi anni, le proteine del siero di latte si sono affermate come ingrediente chiave per molte preparazioni alimentari come sostituenti di additivi, grassi e carboidrati, fino a costituire la base per il nuovo ambito del packaging degli alimenti; gli utilizzi maggiori prevedono l'emulsione delle sieroproteine con lipidi per una maggiore stabilità del prodotto

finale, oppure sono utilizzate per formare film commestibili, rivestimenti, idrogel, nanoparticelle e microcapsule, in combinazione con polisaccaridi, glicerolo e sorbitolo.

Negli ultimi studi sperimentali si stanno creando anche rivestimenti per alimenti contenenti antimicrobici e le proteine del siero di latte sono fondamentali per una migliore efficacia di questi prodotti.

Per quanto riguarda l'interazione fra microrganismi e sieroproteine si può notare una sinergia fra quest'ultimi, che permette ai probiotici di resistere maggiormente alle condizioni di conservazione e quelle presenti nel corpo umano prima di raggiungere il luogo d'azione, cioè quello intestinale.

Per quanto riguarda l'evoluzione delle tecnologie di processo non termico, sono state utilizzate per migliorare le proprietà funzionali, strutturali e meccaniche delle sieroproteine, rendendole un ingrediente sempre più versatile e adatto nelle varie preparazioni alimentari.

## **1.2 Scopo**

Lo scopo di questo elaborato è di passare in rassegna le caratteristiche nutrizionali e compositive del siero di latte, le norme e i processi industriali a cui è sottoposto per poi focalizzarsi sulle proteine del siero. Le proteine del siero sono descritte come un componente eclettico che può essere utilizzato nella sua forma più semplice e consumato quasi come tale, dopo aver subito processi di disidratazione, fino ad un impiego più tecnologico. Non sono nemmeno ignorati gli aspetti economici e i vantaggi che il prodotto può dare grazie al suo consumo.

## Capitolo 2: IL SIERO DI LATTE

### 2.1 Storia, produzione e uso del siero

Il siero di latte è un sottoprodotto del processo di caseificazione; è un liquido di colore giallo/verdognolo che residua dalla coagulazione del latte dopo la separazione della cagliata (Alais, 2000), si possono ottenere fino a 9 L di prodotto per ogni kg di formaggio (Smithers, 2008). La parola siero deriva dalla lingua latina “seracei”, “seras” che significa sottoprodotto ed era considerato un ottimo alimento sia dai contadini che dalla classe feudale durante il tardo medioevo quando, dopo la produzione di formaggio, si facevano coagulare le proteine del siero con il calore del fuoco, ottenendo la ricotta che veniva compressa in pani quadrangolari (Montuoro, 2006).

Con il passare degli anni, fino ad arrivare al giorno d’oggi, anche nel panorama italiano (come mostrato nelle tabelle 1-2), il quantitativo di siero proveniente dall’industria lattiero-casearia è aumentato e il principale utilizzo conosciuto è ancora quello della produzione di ricotta (Alais, 2000).

In Italia su tutto il territorio sono sparsi più di 2500 caseifici e si producono milioni di tonnellate/anno di siero, come mostrato nella tabella 2 (ISTAT 2013/2017).

**Tabella 1: kg di siero ricavati dai vari tipi di formaggi in Italia**

Prodotto	Resa in formaggio da 100 kg di latte intero	Kg di siero ricavati da 100 kg di latte intero	Kg di polvere di siero ricavati da 100 kg di siero liquido
Formaggi freschi	14,67	85	6,3
Formaggi molli	13,66	85	6,3
Formaggi semiduri	10,37	85	6,3
Formaggi duri	7,63	85	6,3

(Fonte: Elaborazione CLAL; 2009).

**Tabella 2: Quantità di Siero (Tonnellate) ricavabile da tutti i formaggi**

Area geografica	Formaggio prodotto	Milk Equivalent	Siero ricavabile	Polvere di siero
Nord	845.226	8.203.182	6.972.705	439.280
Centro	91.136	760.147	646.125	40.706
Sud	241.161	2.020.657	1.717.559	108.206
Totale Italia	1.177.523	10.983.987	9.336.389	588.192

(Fonte: Elaborazione CLAL su dati ISTAT relativi alla produzione di formaggi; 2009).

**Tabella 3: Utilizzi del siero di latte in quintali in Italia**

	2013	2017
Siero di latte utilizzato per la produzione di ricotta	7.958.016	7.946.706
Siero di latte utilizzato sotto forma liquida per l'alimentazione del bestiame in quintali	21.579.686	22.494.001
Siero di latte utilizzato sotto forma concentrata in quintali	11.164.349	12.616.211
Siero di latte in polvere e in pezzi in quintali	7.213.537	7.658.811

(Fonte: ISTAT 2013/2017)

Come indicato nella tabella 3, dall'anno 2013 al 2017 non ci sono particolari variazioni nella produzione di siero. In Italia sono stati utilizzati circa 7.000.000 di quintali/anno di siero per la produzione di ricotta o per la sua conversione in polvere e, aggiungendo quello impiegato nel settore della mangimistica si arriva a 21.000.000 di quintali/anno, che rappresenta all'incirca il 66% di quello prodotto. Oltre agli utilizzi indicati, purtroppo, esiste anche una quota di siero che è smaltito illegalmente nei corsi d'acqua, nel mare e nei suoli (Magarò, 2012). Il siero può essere considerato sottoprodotto o rifiuto in base al suo utilizzo. Se lo si considera un rifiuto è perché contiene una carica batterica totale (CBT) piuttosto alta, se invece la CBT è bassa lo si considera come un sottoprodotto. Prima del 1970 era considerato un rifiuto e il suo smaltimento causava un forte inquinamento dell'ambiente, infatti secondo il Codice CER 020203 fa parte degli "scarti inutilizzabili per il consumo e la trasformazione" (Dlgs 152/06). Per evitare che il siero con CBT bassa fosse smaltito inutilmente, le aziende iniziarono a raffinarlo, purificarlo e quindi lo resero idoneo per l'alimentazione umana.



Il siero ha un'alta richiesta biochimica di ossigeno (BOD) da 40.000 a 60.000 ppm e chimica di ossigeno (COD) da 50.000 a 80.000 ppm a causa dell'elevata percentuale di lattosio (Ryan *et al*, 2016).

Nei valori sopra riportati, si nota che l'inquinamento dato dal siero supera i limiti indicati nella legge Merli 319/72 (abrogata poi successivamente dal Dlgs 152/06) che sono rispettivamente 40-80 mg/l per il BOD e 160 mg/l per il COD: quindi il siero per essere smaltito nel sistema fognario deve essere prima bonificato.

## **2.2 Composizione**

Il siero di latte è circa il 85-95% del volume del latte ed è una miscela acquosa formata da acqua per il 93%, il restante 7% è rappresentato da componenti in soluzione o soluzione colloidale, sospensione ed emulsione: 5-12% di proteine, 77-80% di lattosio, 8% di sali minerali (calcio, potassio, sodio e magnesio), 0,5% di grasso e 3% di acido lattico variabile in funzione del tipo di caseificazione (vedi tabella 4) (Depuydt, 2008); la composizione può variare in base al tipo di latte e alla tecnica utilizzata per produrre il formaggio (Ryan P. e Walsh G., 2016).

Il lattosio è uno dei componenti più importanti del siero, è formato da una molecola di galattosio e una di glucosio e può essere recuperato dal siero tramite cristallizzazione (Paterson, 2009). E' utilizzato come ingrediente nelle preparazioni dolciarie per promuovere la reazione di Maillard, come substrato o come ingrediente nell'industria farmaceutica (Paterson, 2009) e per l'umanizzazione dei latti per l'infanzia.

**Tabella 4: Costituenti chimici del siero di latte**

	siero dolce		siero acido	
	g/L	% su secco	g/L	% su secco
Sostanza secca	62	100	57	100
Proteine	7,5	12,1	3	5,3
Lattosio	48	77,4	46	80,7
Ceneri	6	9,7	8	14,0
Grasso	0,5	0,8	-	-
pH	6,1		4,6	

(Fonte: Depuydt, 2008)

### 2.2.1 Le proteine del siero

Le proteine del siero di latte hanno un alto valore biologico, funzionale e nutrizionale. Le principali sono  $\alpha$ -lattoalbumina, sieralbumina,  $\beta$ -lattoglobulina, lattoferrina, immunoglobuline e glicomacropeptidi (Marella, 2009; Magarò, 2012).

Queste proteine sono tutte presenti nel siero essiccato senza frazionamenti preliminari, e vengono utilizzate nei prodotti per sportivi.

La  $\beta$ -lattoglobulina (50-55%), è una buona fonte di aminoacidi ramificati e ha la capacità di legare le vitamine liposolubili (A e E), gli acidi grassi e i minerali come lo zinco e il calcio, rendendoli più disponibili per l'organismo (Marella, 2009; Magarò, 2012).

La  $\alpha$ -lattoalbumina (20-25%) è ricca di triptofano ed è molto importante per la biosintesi del lattosio nelle ghiandole mammarie, contiene il 6% di triptofano, il 5% di cisteina e lo 0,9% di metionina (Heine *et al.*, 1990). E' fonte di aminoacidi ramificati e ha proprietà antitumorali e antimicrobiche, è usata nelle formulazioni di alimenti neonatali perché è la proteina più presente nel latte umano ed aumenta la produzione di serotonina nel cervello migliorando l'umore (Marella, 2009; Magarò, 2012).

La sieralbumina (5-10%) è una proteina globulare di grandi dimensioni formata da 582 amminoacidi capace, in vivo, di catturare gli acidi grassi per produrre glutazione (alto

contenuto di cisteina), per questo è una fonte di aminoacidi ramificati. E' utilizzata anche contro le infezioni per le sue proprietà antiossidanti e nelle formulazioni nutrizionali (Marella, 2009; Magarò, 2012).

Le immunoglobuline (10-15%) sono formate da IgM e IgA; sono le proteine più presenti nel colostro: sono glicoproteine formate da due catene leggere e da due pesanti (Marella, 2009; Magarò, 2012).

La lattoferrina LF (0,5%) si lega alle glicoproteine (famiglia delle transferrine, con la capacità di legare il ferro che se libero potrebbe portare alla formazione di radicali), è un potente antimicrobico, antibatterico e antinfiammatorio, è utilizzata anche nelle formulazioni nutrizionali. (Marella, 2009; Magarò, 2012).

La lattoperossidasi LP (0,2%) è prodotta dalle cellule epiteliali, è un enzima ed una glicoproteina con azione antimicrobica. E' utilizzata come stabilizzante nello yogurt e dall'industria farmaceutica (Marella, 2009; Magarò, 2012).

Il glicomacropetide (GMP) è una piccola proteina con una massa molto ridotta; è formato da k-caseina che proviene dalle micelle caseiniche e si rimuove tramite membrane di filtrazione. Il prodotto dopo la filtrazione è di colore chiaro, omogeneo e senza odori (Abd-El-Salam, 1996; Marella, 2009; Magarò, 2012).

### *2.2.2 Effetto della temperatura sulle proteine del siero*

Le alte temperature, caratteristiche dei trattamenti termici per il risanamento e per la produzione di prodotti in polvere (Macèj *et al.*, 2002), inducono cambiamenti nei costituenti del latte anche in base al tipo di tecnologia utilizzata e, le modificazioni più evidenti si verificano a carico delle sieroproteine del latte: il riscaldamento del latte, infatti, provoca un aumento dell'acidità, la precipitazione del fosfato di calcio solubile, la denaturazione e la coagulazione delle proteine del siero di latte. Di conseguenza sono alterate anche le proprietà tecnologiche del latte e le proprietà nutrizionali (Macèj *et al.*, 2002). Inoltre, il contenuto in sieroproteine rappresenta un indice significativo della valutazione dei trattamenti termici sul latte insieme ad altri parametri chimici, fisici e biologici (fosfatasi alcalina e lattoperossidasi, furosina e lattulosio) (Montuoro, 2006).

## 2.3 Regolamenti e ISO per le analisi del siero

Affinché il siero possa essere considerato sottoprodotto e utilizzato quale fonte di nutrienti, oltre a non contenere sostanze tossiche derivanti da qualsivoglia origine, deve rispondere a requisiti di qualità definiti per legge e le cui determinazioni analitiche sono normate anche in termini di metodologie.

La Gazzetta ufficiale dell'unione europea nel “*REGOLAMENTO (CE) N. 273/2008 DELLA COMMISSIONE del 5 marzo 2008 (che stabilisce le modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 1255/1999 del Consiglio Europeo per quanto riguarda i metodi di analisi e la valutazione qualitativa del latte e dei prodotti lattiero-caseari)*” stabilisce linee guida per la valutazione delle analisi e il rispetto dei parametri dei prodotti lattiero-caseari.

L'articolo di maggior interesse per l'analisi del siero di latte è l'articolo 9, in cui è spiegata la ricerca di siero di latte presamico. Come citato nell'articolo:

*“1. Per la ricerca di siero di latte presamico nel latte scremato in polvere destinato all'ammasso pubblico si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XII.*

*2. Per la ricerca di siero di latte presamico nel latte scremato in polvere e nelle miscele destinati all'alimentazione animale si applica il metodo di riferimento descritto nell'allegato XII. Se si riscontra la presenza di siero di latte presamico si applica l'allegato XIII.”*

Nell'allegato XII e XIII sono presenti i metodi analitici, compresi di descrizioni del procedimento e delle ISO di riferimento, che sono le seguenti:

- ISO 1736:2000|FIL 9C:1987
- ISO 2450:1999|FIL 16C:1987
- ISO 7208:1999|FIL 22B:1987

### *2.3.1 Metalli con effetti tossici nel latte*

Le analisi del siero sono utili per trovare la presenza di metalli tossici nel latte che possono causare patologie poiché hanno un effetto di tossicità cronica.

Il piombo è un metallo tossico e gli inquinamenti avvengono sul foraggio predisposto alla coltivazione (Alais, 2000). Il cadmio si ritrova quasi del tutto legato alle proteine del siero perché ha molta affinità con i gruppi -SH. Il mercurio a sua volta si lega alle proteine del latte, ma ha anche buona affinità ai globuli di grasso. Sono presenti anche l'alluminio, il cromo e il molibdeno. Il ferro, il rame e il manganese sono oligoelementi indispensabili, ma possono dare problemi a livello tecnologico nei prodotti grassi se sono presenti in quantità molto elevate.

## **Capitolo 3: PROCESSI INDUSTRIALI DI OTTENIMENTO DELLE PROTEINE DEL SIERO**

Il siero può essere siero acido o dolce a seconda delle condizioni di caseificazione (acida o presamica): questo comporta differenze nella composizione e nella destinazione d'uso del siero stesso. L'essiccamento del siero rappresenta un processo di elezione per poterlo conservare e stoccare vantaggiosamente; il processo attualmente più utilizzato per la produzione di polvere di siero è lo spray-drying.

La separazione delle proteine del siero nelle varie classi per ottenere prodotti ad alto valore aggiunto può avvenire per via chimica o fisica o per combinazione di entrambe e, generalmente avviene a monte dell'essiccamento. La via fisica riscuote ora ampi consensi sia per la disponibilità di tecnologie avanzate che per il mancato utilizzo di solventi o reattivi, che consentono di avere prodotti più green, anche se non necessariamente più sostenibili in termini di dispendio energetico.

### **3.1 Processi chimici**

I trattamenti chimici sono fondamentalmente riferibili alla precipitazione isoelettrica o termica delle proteine, e quindi alla separazione attraverso membrana. La precipitazione delle proteine del siero può essere effettuata ad elevata temperatura; se si abbassa la temperatura o si hanno pH più bassi si deve fare utilizzo di calcio per far arrivare le proteine al punto isoelettrico e quindi avere una successiva precipitazione. In alternativa, per la precipitazione delle proteine, si realizza una concentrazione tramite centrifugazione o filtrazione (Prazeres *et al.*, 2012). Queste operazioni unitarie sono in grado di concentrare, frazionare e convertire le componenti del siero in altri costituenti ad alto valore biologico e ad alto costo (Donnelly W. J. e Mehra R. K., 1993).

La precipitazione prima della separazione permette una maggiore resa nel recupero di sostanze utili e anche una riduzione di quelle inquinanti. In alcuni dei processi chimici sono impiegati sali, infatti, sono sfruttate le strutture delle proteine poiché contengono aminoacidi idrofilici, che attraggono l'acqua sulla loro superficie e questo provoca un'interazione rendendo le proteine solubili in acqua. (Marella, 2009).

### *3.1.1 Salatura*

Il processo di salatura fa sì che proteine in soluzione si disidratino poiché tutta l'acqua presente si lega ad un sale e la concentrazione salina della soluzione supera il limite critico. I sali più comunemente utilizzati sono il solfato di ammonio, il cloruro di sodio e il cloruro di potassio (Marella, 2009).

Il processo di salatura si svolge in due fasi: nella prima fase la concentrazione del sale viene regolata appena sotto la concentrazione critica affinché avvenga la precipitazione delle proteine; nella seconda, invece, la miscela proteica è centrifugata per rimuovere le proteine che sono precipitate nella prima fase. In questo stadio il limite critico della concentrazione del sale deve essere superiore a quello necessario per la precipitazione proteica, in modo tale da far precipitare tutte le proteine e lasciare in soluzione solo quelle più solubili. La suddetta tecnica ha però una limitazione: la proteina alla fine del processo conterrà una grande concentrazione di sale e lo stadio di purificazione sarà molto costoso (Marella, 2009), inoltre la frazione liquida residua conterrà concentrazioni molto elevate di sale e sarà problematica da smaltire.

### *3.1.2 Salatura in tecnica*

Esiste un altro metodo detto "salatura in tecnica" che si basa sull'aumento della solubilità della proteina poiché fa diminuire l'interazione fra le stesse molecole proteiche: si aggiungono ioni di sali neutri (solfato di ammonio o cloruro di sodio) che si legano ai gruppi ionici delle proteine e ciò porta ad un aumento della solubilità proteica. Di conseguenza rimangono in soluzione le frazioni proteiche indesiderate, mentre quelle desiderate precipitano (Marella, 2009).

### *3.1.3 Concentrazione isoelettrica*

La concentrazione isoelettrica permette di separare da una miscela multi-proteica un gruppo di proteine specifiche. Il punto isoelettrico (pI) di una proteina si raggiunge al valore di pH in cui la sua carica netta è uguale a zero e nelle date condizioni, la repulsione idrostatica fra le proteine è nulla e perciò tendono ad aggregarsi e precipitare. Sfruttando i diversi pI delle proteine in miscela si riescono a separare per precipitazione le proteine di interesse (Marella, 2009).

### *3.1.4 Precipitazione con temperatura*

Si possono separare le proteine di una miscela combinando sinergicamente le proprietà di un trattamento termico e del pH, infatti, alla base di tale metodo si considera che la stabilità termica delle proteine del siero è legata alle condizioni di acidità del latte (Marella, 2009).

L'aggregazione delle proteine e la separazione della  $\alpha$ -La è possibile riscaldando il siero fino a 55-70°C e regolando il pH con HCl (o acido citrico) in un range di pH di 3,8-5,5 (Pearce, 1983 e 1987), o a 52-55°C con un pH di 3,5-3,6 (Wu, 2003).

### *3.1.5 Frazionamento con solvente*

La solubilità di una proteina dipende anche dalla costante dielettrica della soluzione che la circonda. La costante dielettrica della soluzione può essere modificata aggiungendo solventi organici idrosolubili come acetone o etanolo. Più la costante dielettrica è bassa più aumentano le interazioni elettrostatiche fra le molecole proteiche; ciò provoca un calo della repulsione elettrostatica che determina la precipitazione delle proteine (Marella, 2009).

Ogni frazione proteica richiede diversi tipi di solvente per precipitare in base al suo pI: la quantità ottimale di solvente organico varia dal 5-60% (Marella, 2009).



## 3.2 Processi fisici

### 3.2.1 Separazione su membrana

Per ottenere prodotti ad alto valore nutrizionale e sicuri, utilizzabili in vari ambiti è possibile impiegare membrane di filtrazione semipermeabili che solitamente hanno pori che vanno da pochi millimetri fino a micron e questo permette di classificare le membrane e di ottenere prodotti di diversa purezza e composizione (figura 1) (Pizzichini *et al.*, 2009). Con il termine purezza si intende un prodotto che abbia quasi esclusivamente proteine con il minor contenuto di altri componenti, come grassi, colesterolo, lattosio e carboidrati (Marella, 2009).

Le membrane più utilizzate sono quelle ceramiche o polimeriche che sono impiegate nelle tecniche (figura 1) di microfiltrazione (MF), ultrafiltrazione (UF), nanofiltrazione (NF), osmosi inversa (OR), microfiltrazione a flusso incrociato e scambio ionico (IE).

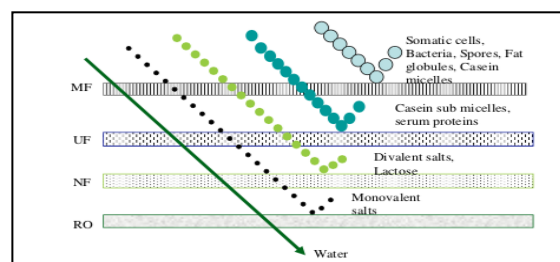


Figura 1: Tipi di filtrazione in base alla membrana, alla grandezza dei pori e al tipo di materiale (Cheryan, 1998; Brans *et al.*, 2004).

Separare tramite una membrana significa allontanare composti target d'interesse, o non, da sospensioni contenenti diverse varietà di macro e micro molecole, sulla base delle dimensioni molecolari.

Nelle separazioni industriali sono fondamentali le differenze nelle proprietà fisiche e chimiche come le dimensioni, forma, densità, solubilità, carica elettrica e altre proprietà delle particelle presenti in una miscela multicomponente (Mohesenin, 1980; Lewis, 1990; Mulder, 1991). La prima membrana sintetica fu sviluppata da Fick per studiare il fenomeno della diffusione e della pressione osmotica, poi solo successivamente, iniziò il loro uso industriale (Marella, 2009).

Le prime membrane commercializzate furono in nitrato di cellulosa ed erano utilizzate prevalentemente in laboratorio, ma il pieno sviluppo commerciale fu raggiunto con le membrane

asimmetriche. L'asimmetria fu creata tramite un processo di riscaldamento che modificava la struttura della membrana e forniva due lati differenti che si comportavano diversamente quando erano esposti alla filtrazione (Pouliot, 2008).

L'asimmetria determina la distinzione fra uno strato superiore sottile e denso con spessore inferiore a 0,5 micron, che definisce la velocità di trasporto, supportato da uno strato poroso inferiore di 50-200 micron (Marella, 2009).

Nella filtrazione attraverso le membrane esiste una terminologia che permette di spiegare al meglio questo processo. Fra questi termini troviamo:

- flusso, è indicato con la portata in L/h o ml/min;
- membrana semipermeabile, che consente il passaggio di alcuni componenti presenti in una soluzione e ne conserva altri in base al peso/dimensione molecolare;
- membrane asimmetriche, che sono composte da un film sottile, con uno strato denso e sottile sopra, e uno strato poroso sotto;
- peso molecolare interrotto, che serve per definire la porosità e quindi la capacità della membrana di trattenere i composti;
- pressione transmembrana, che è responsabile della filtrazione;
- retentato, quantità di materiale trattenuto dalla membrana;
- permeato, le sostanze che passano attraverso la membrana;
- diafiltrazione, questo tipo di processo consiste nell'aggiungere acqua successivamente a una MF o ad una UF, in base alla quantità di soluto che è stato rimosso per riportare volume;

Quando nei processi di filtrazione sono utilizzate membrane porose è necessario basarsi sulla permeabilità selettiva della membrana, che fa passare le sostanze in base alla grandezza dei pori e consente di distinguere due metodi di gestione (Marella, 2009):

- modalità di punto morto (vedi figura 2(a)), in cui la sospensione è pompata direttamente sulla superficie della membrana provocando un brusco aumento della resistenza all'interno del retentato e il flusso diminuisce drasticamente e induce un aumento della pressione (Marella, 2009);

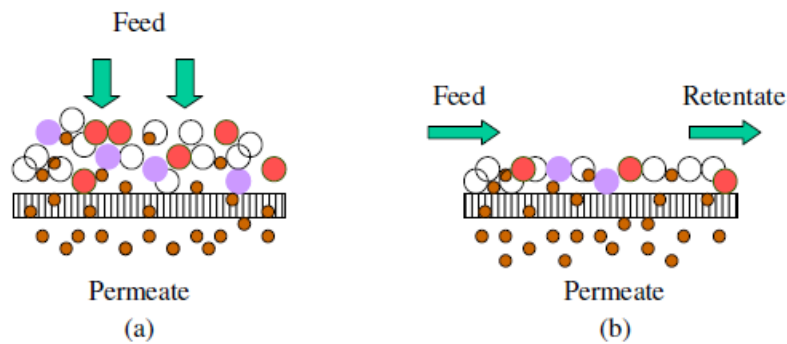


Figura 2: (a) modalità di punto morto; (b) modalità di flusso incrociato (Cheryan, 1998; Brans et al., 2004).

- nella modalità di flusso incrociato (vedi figura 2(b)), invece, la sospensione è pompata attraverso un flusso tangenziale che scorre lateralmente alla superficie della membrana, limitando l'accumulo di solidi sulla parte superiore. Di conseguenza avviene un'erosione della torta di retentato che permette un aumento del flusso del permeato e un calo della pressione del sistema, generando una filtrazione con maggiori velocità (Marella, 2009).

Nella parte sinistra della figura 3 è mostrato il flusso che scorre tangenzialmente al filtro e le molecole più piccole passano tramite un gradiente pressorio; a destra invece si raccoglie il permeato e il concentrato rimane a sinistra (Pizzichini et al., 2009).

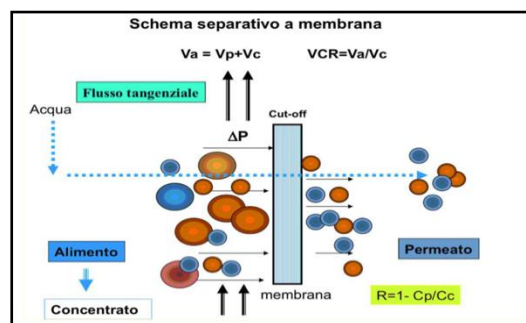


Figura 3: Schema separativo a membrana (Pizzichini et al., 2009).

L'utilizzo delle membrane deve essere progettato in funzione delle caratteristiche compositive del materiale da filtrare, se infatti non si procede con gradualità, utilizzando in serie le tecniche sopra indicate, si rischia di intasare le membrane, cioè avviene il fenomeno del fouling. In questo caso la membrana perde produttività a causa di un intasamento fisico,

in quanto piccole molecole si depositano sulla superficie della membrana occludendo i pori, rendendo necessario il lavaggio e la rigenerazione della membrana (Steinhauer *et al.*, 2015).

### 3.2.2 Microfiltrazione (MF)

La microfiltrazione (MF) utilizza membrane o di tipo polimerica o ceramica con una pressione di 1,4 bar ed è presente un meccanismo di filtrazione fisica con pori di 0,1-20  $\mu\text{m}$  (Pizzichini *et al.*, 2009), in cui è impiegato un flusso tangenziale e uno incrociato per contrastare la formazione della torta di retentato; consente di allontanare batteri e frazioni di grasso (Ko Y. T. e Chipley J. R., 1983).

### 3.2.3 Ultrafiltrazione (UF)

L'ultrafiltrazione (UF) utilizza membrane ceramiche o polimeriche a forma tubolare o cilindrica con una pressione idrostatica di 1-10 bar, è presente una filtrazione/assorbimento e pori di 1-100 kD (Pizzichini *et al.*, 2009); consente di separare le proteine del siero in forma più pura che costituiscono circa l'80-90% del siero (Ko Y. T. e Chipley J. R., 1983).

Se viene applicata la modalità del flusso incrociato con una giusta regolazione di flusso e di pressione, il deposito di sostanze sulla superficie della membrana sarà minore rispetto a MF ma non inevitabile (Marella, 2009).

### 3.2.4 Nanofiltrazione (NF)

La nanofiltrazione (NF), utilizza membrane polimeriche o di materiale composito, con pressione idrostatica di 20-40 bar, si avvale di un meccanismo di solubilità e diffusione, i pori sono di 100-250 D (Pizzichini *et al.*, 2009). La NF è anche utilizzata per concentrare le proteine prima dello spray-drying, risparmiando così una notevole quantità di energia nell'operazione (Marella, 2009), inoltre la NF è nota anche come osmosi inversa libera o ultrafiltrazione leggera (Marella, 2009).

### 3.2.5 Osmosi inversa (OR)

L'osmosi inversa (OI), utilizza materiali polimerici o compositi, con una pressione idrostatica che va da 15-60 bar, si avvale di un meccanismo di solubilità e diffusione con pori che vanno da 10-100 D; (Pizzichini *et al.*, 2009). E' un processo che consente la rimozione di acqua secondo il principio dell'osmosi (Ko Y. T. e Chipley J. R., 1983).

Quando il siero è separato per ultrafiltrazione si ottengono due prodotti, il permeato (polvere di permeato, polvere di lattosio, acqua madre) e il retentato (WPI, whey protein isolate e WPC, whey protein concentrate) (Depuydt, 2008).

La demineralizzazione del siero è un altro processo che si ottiene tramite NF, resine ed elettrodialisi. L'obiettivo di questo processo è quello di conservare il lattosio e le proteine del siero diminuendo la carica minerale fino al 90%. I prodotti ottenuti sono siero demineralizzato e sale (Depuydt, 2008); questo processo è particolarmente utile in prodotti come il siero ottenuto dalla produzione dei formaggi a coagulazione acido-presamica a pasta cotta, come il Parmigiano Reggiano, che, essendo prodotti in caldaie di rame, contengono concentrazioni di rame molto elevate, anche a causa della loro acidità.

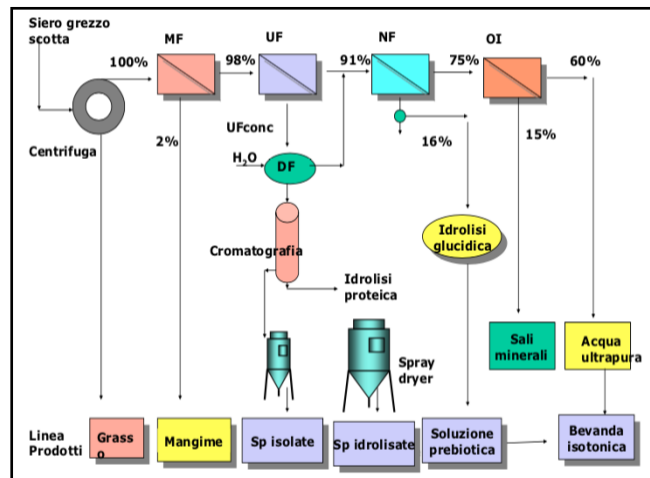


Figura 4: Schema riassuntivo dei processi di ottenimento delle proteine del siero (Depuydt, 2008).

### 3.3 Prodotti e utilizzi del siero

#### 3.3.1 Aspetti commerciali e normativi

Il comitato di filiera del siero di latte, con sede nella Camera di Commercio di Parma ha redatto il regolamento speciale siero di latte, adottato dalla deputazione nazionale con delibera n°6 del 18 aprile 2011.

Come citato nel documento, *“le categorie di prodotto contrattili sono le seguenti: siero di latte e siero di latte trasformato. Quelle invece contrattili per la Borsa Merci Telematica sono: siero di latte per uso zootecnico e siero di latte per uso industriale.*

*Le tipologie di prodotti contrattabili sulla Borsa Merci Telematica Italiana per la categoria “Siero di latte trasformato” (in sigla “Siero di latte trasformato”) sono le seguenti:*

- *Siero di latte in polvere (SWP)*
- *Siero di latte concentrato*
- *Sieroproteine concentrate in polvere (WPC)*
- *Sieroproteine concentrate*
- *Siero di latte concentrato e cristallizzato*
- *Siero di latte concentrato demineralizzato*
- *Lattosio (Lattosio alimentare, Lattosio farmaceutico, Lattosio raffinato)*
- *Derivati del lattosio (gluco-oligosaccaridi, lattulosio, tagatosio, acido lattobionico)*

*Fatte salve le specifiche indicate nella scheda di prodotto, le caratteristiche qualitative del “Siero di latte” e del “Siero di latte trasformato”, devono rispondere alle caratteristiche previste dalle seguenti normative e regolamenti: Reg. CE n.1774/2002 (Norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano), Reg. CE n.852/2004 (Regolamento sull’igiene dei prodotti alimentari), Reg. CE 853/2004 (Norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale), Reg. CE n.79/2005 (attua il Reg. CE n.1774/2002 relativamente all’uso del latte, dei prodotti a base di latte e dei sottoprodotti del latte).*

- *Siero di latte: per siero di latte si intende il prodotto che rimane dalla lavorazione del latte a seguito del processo di cagliatura.*

- *Siero di latte trasformato.*
- *Siero di latte in polvere (SWP): il Siero di latte in polvere è ottenuto mediante processi di concentrazione per evaporazione o per osmosi, cristallizzazione ed essiccamento con sistema spray-drying.*
- *Siero di latte concentrato: il Siero di latte concentrato ha un residuo secco del 18-20%, se ottenuto mediante concentrazione per osmosi inversa, oppure del 30-60%, se ottenuto mediante evaporazione a bassa temperatura sottovuoto (concentrazione per evaporazione).*
- *Sieroproteine concentrate in polvere (WPC): le sieroproteine concentrate in polvere provengono dalla concentrazione del contenuto proteico del siero di latte mediante separazione a membrana. La percentuale di contenuto proteico sul secco deve essere compresa tra il 30-80%.*
- *Sieroproteine concentrate: le sieroproteine concentrate provengono dalla concentrazione del contenuto proteico del siero di latte mediante separazione a membrana. La percentuale di contenuto proteico sul secco deve essere compresa tra il 20-30%.*
- *Siero di latte concentrato e cristallizzato: il Siero concentrato e cristallizzato ha un residuo secco superiore al 55% il cui lattosio ha subito il processo di cristallizzazione mediante un raffreddamento.*
- *Siero di latte concentrato demineralizzato: il Siero di latte concentrato demineralizzato ha un limite di concentrazione di sali pari al 4,25% calcolato sulla quantità di solidi in esso contenuto.*
- *Lattosio alimentare è un lattosio in polvere, con titolo non inferiore al 99%. Può essere recuperato o attraverso la cristallizzazione dal siero concentrato tal quale o dal siero concentrato deproteinato, oppure utilizzando il permeato derivato dall'Ultrafiltrazione del siero stesso, mediante processi di concentrazione, cristallizzazione, centrifugazione, lavaggio, essiccamento e macinazione. Il Lattosio farmaceutico è un lattosio in polvere, presente in misura non inferiore al 99,8% ottenuto mediante gli stessi processi di produzione del lattosio alimentare, con l'aggiunta di almeno un processo di ricristallizzazione. Il Lattosio raffinato è lattosio*

*in polvere, presente in misura non inferiore al 99,5% ottenuto aggiungendo, al processo proprio del lattosio alimentare, quello di raffinazione.*

- *Derivati del lattosio: i derivati del lattosio sono i prodotti ottenuti mediante idrolisi enzimatica del lattosio alimentare.*

### **3.4 Impieghi industriali delle frazioni di siero di latte**

Nella tabella 5 (Lorient *et al.*, 1991) sono indicati i principali impieghi delle frazioni ottenute dal siero del latte e i processi industriali per l'ottenimento.



**Tabella 5: Principali impieghi delle frazioni ottenute dal siero di latte e i processi industriali per l'ottenimento degli stessi:**

Prodotti	Processi	Impieghi suggeriti
Caseina $\beta$	Microfiltrazione MF del caseinato a freddo MF/acidificazione dal latte a freddo Coagulazione a freddo del caseinato di calcio	Agente schiumogeno Agente funzionale in formaggi Sorgente di peptidi bioattivi
Caseina privata della caseina $\beta$	Prodotti derivati dalla separazione della caseina	Ingredienti da aggiungere al latte per formaggio Agente emulsionante
Paracaseinato di calcio privato di caseina $\beta$	Prodotti derivati dalla separazione della caseina	Standardizzazione del latte Agente funzionale per prodotti alimentari
Caseina micellare	Retentato da MF del latte Coagulo dopo acidificazione per elettrodialisi	Agenti funzionali o ingredienti per formaggi fusi o d'imitazione Agente schiumogeno
WPC sgrassato	Permeato da MF del siero	Agente schiumogeno
Fosfolipidi del latte	Retentato da MF del siero	Agente emulsionante
Frazione ricca di $\alpha$ -lattalbumina	Precipitata selettivamente con correzione della forza ionica e del pH del siero	Proteine per alimenti per l'infanzia
$\beta$ -lattoglobulina	Supernatante ottenuto dal processo di preparazione della lattealbumina	Agente emulsionante Agente gelificante
WPC con diverse proporzioni di $\alpha$ -lattalbumina e $\beta$ -lattoglobulina	Selettivi adsorbimenti ed elezioni per scambio ionico	Agenti schiumogeni e gelificanti
Isolato di proteine del siero	Scambio ionico	Agente emulsionante-gelificante Chiarificante di soluzioni

(Fonte: Lorient et al., 1991)

## Capitolo 4: PROTEINE DEL SIERO DI LATTE - WHEY PROTEIN

### 4.1 Introduzione e storia

Il primo utilizzo delle proteine fu da parte dei greci nel 2500 a.C., infatti erano soliti bere siero di latte perché avevano notato che rinforzava il sistema immunitario, aumentava la forza e la crescita muscolare (Krissansen, 2007; Haug, 2007). Successivamente in Svizzera, nel XVI sec., il siero fu utilizzato nell'allevamento dei suini: infatti i suinetti che venivano alimentati a siero di latte crescevano più velocemente e più in forze; di conseguenza anche gli stessi svizzeri iniziarono a berlo (Krissansen, 2007; Haug, 2007). Nel XX sec. soprattutto in America, il siero era un sottoprodotto della produzione di burro e formaggio e, a causa della presenza di lattosio che è fermentescibile, lo rendeva un prodotto facilmente deperibile e perciò doveva essere consumato o impiegato molto rapidamente fino a quando non sono state disponibili tecniche di sterilizzazione (Krissansen, 2007; Haug, 2007). Di conseguenza i contadini presero il siero dalle grandi industrie, lo mischiarono a mangime o ai semi di grano, e ciò risultò essere un ottimo alimento per gli animali della fattoria perché aveva un alto contenuto di proteine (Krissansen, 2007; Haug, 2007).

Oggi le WP sono utilizzate come ingrediente nei prodotti per l'infanzia, come food supplements, nelle barrette e nelle bevande proteiche per sportivi ed in integratori per anziani; sono stati creati molti prodotti che soddisfano le esigenze di ogni consumatore (Krissansen, 2007; Haug, 2007).

Così negli ultimi 20 anni il siero è passato dall'essere un prodotto di scarto a un prodotto con alto valore aggiunto (Krissansen, 2007; Haug, 2007). Con il passare degli anni si sono sviluppate tecnologie che hanno permesso una filtrazione sempre migliore delle sieroproteine dagli altri componenti del siero, perciò si sono sviluppate varie categorie merceologiche di prodotto (Caessens, 1999):

- WPC (whey protein concentrated) che hanno dal 35% al 80% di sieroproteine.
- WPI (whey protein isolated) che contengono >90% di sieroproteine.
- WPH (whey protein hydrolyzed) che contengono proteine già precedentemente idrolizzate.

Le WP possono essere divise in molte classi di prodotti, infatti in base alla loro composizione e alle loro caratteristiche eterogenee soddisfano le più svariate classi di consumatori.

## 4.2 Classificazione WP

Per classificare le sieroproteine, e le proteine in generale, si utilizza una classifica che ne valuta la qualità tramite il “punteggio della digeribilità delle proteine corretto dall’aminoacido limitante” o PDCAAS, che indica la corretta digeribilità degli aminoacidi: i risultati sono confrontati con tutti quegli degli aminoacidi degli altri alimenti (vedi tabella 6) (Boutrif, 1991). Il PDCAAS massimo è di 1,00 e quello delle proteine del siero è di 0,99-1,00 (tabella 7) (Boutrif, 1991). Le proteine del siero contengono piccole percentuali di grassi residui sotto forma di piccoli globuli che possono contenere colesterolo e sono ricche di aminoacidi essenziali ramificati detti anche BCAA (Boutrif, 1991).

**Tabella 6: Costituenti chimici delle varie proteine e il loro valore biologico**

Tipi di proteine	Digeribilità delle proteine e fonte di aminoacidi	Aminoacidi	Valore biologico (VB)	Digeribilità delle proteine %
WP	1,00	1,14	100	99
Albume	1,00	1,21	88-100	98
Caseine	1,00	1,00	80	99
Proteine della soia compatibile	1,00	0,99	74	95
Proteine della carne	0,92	0,94	80	98
Glutine	0,25	0,47	54	91

(Fonte: Hemant, 2011)

**Tabella 7: PDCAAS dei vari tipi di proteine**

Fonte di protein	PDCAAS
WP	1,14
Caseine	1,0
WPI	1,0
Proteine della soia isolate	1,0
Bianco d'uovo essiccato	1,0
Carne di manzo macinata	1,0
Lenticchie in scatola	0,52
Pasta di arachidi	0,52
Glutine del grano	0,52

(Fonte: Hemant, 2011)

### **4.3 Analisi di mercato e statistiche di consumo**

#### *4.3.1 Mercato globale e europeo*

Come riportato nell'articolo *"Whey Protein Powder Market 2018 Global Analysis, Growth, Trends and Opportunities Research Report Forecasting to 2023"*, a livello globale sono stati fatti studi previsionali per il mercato delle WP dal 2015 al 2021. Le proteine prese in considerazione sono le Whey protein powder (WPP), WPC, WPI e WPH che sono utilizzate sia nel settore alimentare per l'ingredientistica che per gli integratori, la pasticceria e altri prodotti dell'industria.

Lo studio *"Global Whey Protein Market will reach from USD 8.2 billion in 2015 to USD 12.4 by 2021: Zion Market Research (M2 Presswire, Coventry 23 Sept 2016)"* ha evidenziato che il mercato delle WP nel 2015 apportava circa 8,2 miliardi di dollari e si prevede che entro il 2021 si arrivi a 12,4 miliardi di dollari.

In 11 paesi europei il mercato delle WP oggi ha superato 1,2 miliardi di euro e si pensa che raggiungerà 1,7 miliardi di euro nel 2022 (Candilab, 2018).

Si prevede che il mercato delle WP continui ad avere un trend positivo perché sta aumentando la percentuale di persone anziane nella popolazione che hanno bisogno di un fabbisogno proteico più alto per combattere la sarcopenia. Inoltre, i centri fitness e palestre sono in continuo aumento e sviluppo e perciò la clientela è sempre più spinta a comprare prodotti inerenti allo stile di vita.

Nelle nuove generazioni sta crescendo l'interesse per lo sport e la nutrizione e questo fa aumentare il consumo di alimenti con un alto valore biologico e nutrizionale.

Il mercato delle WP si divide in WPC, WPI e WPH; le WPC prendono circa il 27% del mercato totale, queste però contengono lattosio e un titolo proteico inferiore rispetto alle altre due categorie.

Le WPI e WPH stanno prendendo una fetta di mercato sempre maggiore per il maggior titolo proteico.

#### *4.3.2 Mercato delle WP in quello degli integratori*

Le WP occupano il 60% del mercato degli integratori alimentari per i motivi prima elencati e inoltre nel settore clinico e farmaceutico saranno ulteriormente in aumento per combattere la carenza proteica dei paesi in via di sviluppo.

Nel 2015 l'Europa ha avuto il mercato più grande delle WP, sia per il settore del fitness sia nel settore medico-clinico.

Nei paesi dell'Asia del Pacifico e dell'America Latina la produzione del siero di latte per le WP sta crescendo notevolmente perché il mercato di questi prodotti porta a un aumento del reddito della popolazione e una maggiore industrializzazione.

I principali attori del mercato del siero di latte sono American Dairy Products Institute, Arla Foods, Agropur MSI, DMK Group, Glanbia Plc e Westland Milk Products.

Inoltre, le WP sono vendute in base alla loro purezza, con prezzi che vanno da 0,55\$ fino a 0,66\$ per le whey powder; prezzi superiori sono presenti con le WPC 34 e WPC 80. I prezzi più alti sono le WPI aromatizzate che sono vendute anche per 26,4\$/kg.

### 4.3.3 Mercato italiano

A livello italiano il mercato delle proteine degli integratori proteici è in continua crescita, infatti, il giro di affari totale è di oltre 100 milioni di euro, con un aumento oltre il 40% per i prossimi anni, fino ad arrivare a 150.000 milioni di euro entro il 2022 (Redazione “la prima pagina”, 2018).

## 4.4 Processo estrattivo/isolamento

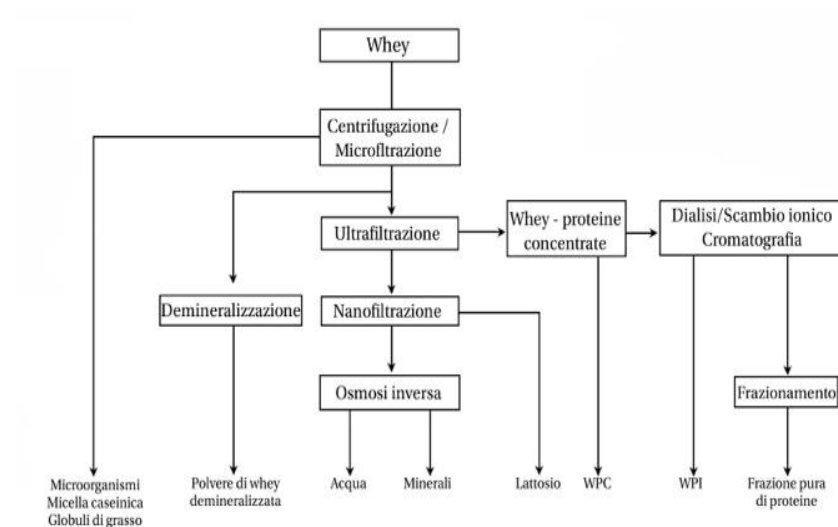


Figura 5: Schema del processo di produzione delle WP (Caballero, 2016).

Il processo estrattivo delle WPC, come mostrato in figura 5, inizia con una prima chiarificazione/MF del siero in cui una centrifugazione rimuove piccole parti di caseina, grasso e batteri (Tomasula, 2015).

Successivamente si utilizza UF, grazie alla quale è possibile separare le WP dal lattosio, sale e acqua (a determinati pH e temperature).

Si possono ottenere proteine sempre più pure più si aggiunge acqua al processo. L'operazione finale è quella dello spray-drying che permette di avere un prodotto con il 95% di sostanza secca (Tunick, 2008).

La NF invece è utilizzata per frazionare miscele di molecole più piccole, infatti, è utilizzata per demineralizzare parzialmente o delattosare totalmente il permeato proveniente dall'UF del siero di latte. La membrana può trattenere metalli pesanti lasciando passare quelli leggeri ed è utilizzata anche nelle operazioni del settore farmaceutico (Atra, 2005).

Se si utilizza OR, passo successivo alla NF, si ha che l'acqua passa attraverso una membrana e i componenti con una dimensione maggiore non passano. Nella produzione delle WP è utilizzata come operazione di disidratazione (Tunick, 2008).

Se viene utilizzata la tecnica dello IE o quella della microfiltrazione a flusso incrociato, il prodotto che si viene a formare sono le WPI, più pure rispetto alle WPC (Atra, 2005).

Lo IE avviene tramite tale processo: le WP hanno una carica positiva parziale sulla superficie e al pH di 5,2 raggiungono il pI e di conseguenza, grazie ai loro cationi, sono attratte da uno scambiatore di cationi. Se invece il pH è maggiore del pI, le WP, hanno una parziale carica negativa e sono assorbite da uno scambiatore di anioni (Tunick, 2008).

Successivamente le proteine sono assorbite dagli scambiatori di ioni in base al cambio di pH, seguiti da dialisi e asciugatura. Lo svantaggio dello IE è che le proteine del siero si denaturano, perdendo così gran parte del loro valore biologico (Tunick, 2008).

Nella microfiltrazione a flusso incrociato, invece, si prevede l'uso di membrane filtranti con pori che hanno dimensioni da 10 nm a 1200 nm. Questo metodo è stato messo a punto per prevenire le problematiche di denaturazione proteica riscontrate con lo IE, risultando la modalità migliore per preservarne la qualità.

Il siero di latte ottenuto dalla prima fase della lavorazione mediante UF (dal quale si ricavano le WPC) viene convogliato in un'apparecchiatura che, utilizzando un sistema di filtri a membrana, procede ad un'ulteriore filtrazione progressiva, attraverso la quale vengono eliminate altre particelle indesiderate, tra cui minerali, lipidi e lattosio (Tunick, 2008).

Le WPI, a differenza delle WPC, hanno un maggior contenuto proteico e minor percentuale di lattosio e di grasso, quindi più pregiate e digeribili ma anche più costose (van der Ven, 2002). Un processo eventualmente applicato è l'idrolisi, cioè un'operazione che causa la rottura delle proteine in aminoacidi e peptidi, prendendo il nome di peptoni. Queste WP sono dette WPI. Può, inoltre, anche essere utilizzato il frazionamento, che consiste nella separazione e nell'isolamento di singole proteine da miscele multi-proteiche. Il frazionamento delle WP in prodotti puri/arricchiti è quello che permette di indicarne l'indice di qualità e

quindi i successivi usi. Le proteine che sono state frazionate con metodi che le hanno rese più pure sono utilizzate in ambito nutraceutico e farmaceutico (Marella, 2009).

## **4.5 Prodotti whey protein**

### *4.5.1 Whey protein concentrate (WPC)*

Le whey protein concentrate o WPC hanno un colore che va dal bianco al crema chiaro con sapore e aroma naturale e delicato. Possono contenere percentuali di proteine che vanno dal 34% all'80%, sono state le prime ad essere prodotte e danno un valore aggiunto agli alimenti nelle quali vengono utilizzate (Marella, 2009).

L'UF è una parte integrante per la produzione delle WPC, ed è utilizzata per ridurre il contenuto di grasso, lattosio e minerali. Se non si utilizza questa tecnica, le WPC conterranno gli stessi componenti presenti nel siero di partenza, di conseguenza in base al tipo di filtrazione eseguita si avrà un prodotto più o meno puro. Le WPC più pure sono usate come ingredienti in integratori alimentari (Marella, 2009).

In base al contenuto di proteine le WPC si dividono in: WPC 34 (34-36%), WPC 60 (60-62%), WPC 75 (75-78%) e WPC 80 (80-82%). Le più utilizzate sono la prima e l'ultima categoria, le quali hanno molte applicazioni diverse. Le proteine in polvere WPC, alle varie concentrazioni, hanno una composizione chimica come indicato nella tabella 8.



**Tabella 8: Composizione chimica delle WPC**

% WPC	34	50	65	80
Umidità	4,6	4,3	4,2	4
Proteine (NTx6,38)	36,2	52,1	67,7	81
Proteine reali	29,7	40,9	59,4	75
Lattosio	46,5	30,9	18,5	7,2
Materia grassa	2,1	3,7	3,5	3,5
Ceneri	7,8	6,4	3,9	3,1
Acido Lattico	2,8	2,6	2,2	1,2

(Fonte: Depuydt, 2008)

#### 4.5.2 Whey protein concentrate 34

Il processo di produzione comporta la concentrazione dei componenti azotati del siero di latte pastorizzato mediante UF, seguita dalla concentrazione del retentato mediante evaporazione convenzionale sottovuoto, seguita da spray-dry. Il processo di UF si applica sul siero stesso che contiene il 6% di solidi totali e il 0,6% di proteine: alla fine del processo le WPC sono presenti al 34% sulla materia secca (Lee, 1999). La composizione delle WPC 34 dipende dalla concentrazione del siero iniziale e di solito contiene il 34-36% di proteine, 46-52% di lattosio, 2-4,5% di grasso, 6,5-8% di ceneri e 96,5-97% di solidi totali (USDEC, 2008).

#### 4.5.3 Whey protein concentrate 80

Le whey protein concentrate 80 (WPC 80) sono quelle che contengono più proteine fra la categoria delle WPC. Queste sono prodotte utilizzando le seguenti operazioni unitarie in combinazione: MF, UF e dialisi che permettono di avere un prodotto finale con pochi grassi e poco sale (Marella, 2009).

Nella prima parte (UF I) del processo, si produce un retentato che ha circa il 15-20% di solidi, mentre nella seconda parte (UF II) il retentato è ulteriormente purificato utilizzando una diafiltrazione associata a una UF. Il retentato finale è solitamente concentrato utilizzando un'evaporazione e poi lo spray-dry, così il prodotto finale avrà un contenuto proteico più alto; inoltre le WPC sono ottenute con il metodo della MF (figura 6). E' possibile utilizzare una successiva NF, anziché l'evaporazione, per rendere più performante l'ultimo step dello spray-dry (Marella, 2009).

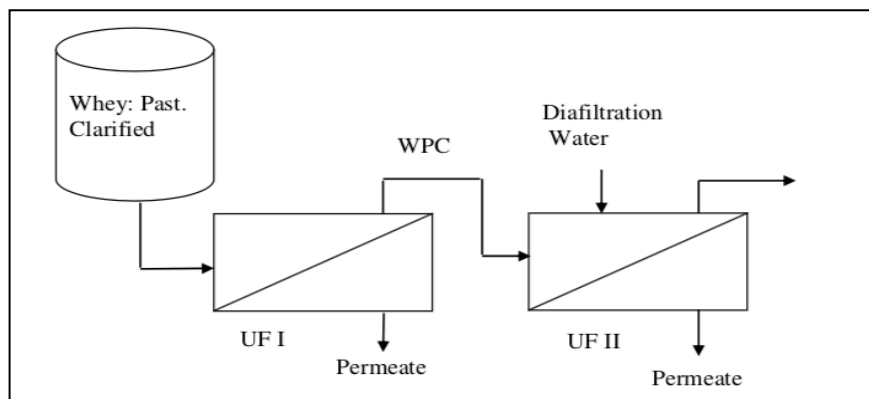


Figura 6: Diagramma di flusso WPC 80 (Marella, 2009)

Le WPC 80 sono composte solitamente da 75-82% di proteine, da 4-7% di lattosio, da 4-7% di grassi, e da 90-95% di solidi totali (USDEC, 2008).

Nella tabella 9 sono riportati alcuni valori nutrizionali di WPC 80 presenti maggiormente nei trend di ricerca in internet in Italia (valori in g/100 g di prodotto).

**Tabella 9: Valori nutrizionali delle principali WPC 80 vendute in Italia (valori in g/100 g di prodotto).**

	100% Whey Protein (cioccolato) (Multipower)	Impact Whey (cioccolato) (My Protein)	100% Whey Gold Standard (cioccolato) (Optimum Nutrition)	Ultra Whey Complex (cioccolato) (Yamamoto Nutrition)
Carboidrati	4,3	4	7,2	6,9
Grassi	4,7	7,5	4,1	5,5
Proteine	78,0	82	76,9	75

(Fonte: [www.vitamincenter.it](http://www.vitamincenter.it))

Le WPC 80 sono l'integratore proteico più comune perché è considerato la forma più efficace ed economica di proteina che il corpo umano possa assorbire e utilizzare. Dal punto di vista fisiologico, il tempo di assorbimento a livello intestinale è di circa 1-1,5 ore.

#### 4.5.4 Whey protein isolate

Le Whey Protein Isolate (WPI) contengono almeno il 90% di proteine sulla sostanza secca totale. Come le WPC 80 sono di un colore bianco o crema chiaro con un aroma e un sapore molto delicato.

Le WPI sono prodotte tramite processi di UF accoppiati con IE o con membrane che combinano UF e MF, come mostrato nella figura 7 (Foegeding E. A. e Luck J. P., 2003).

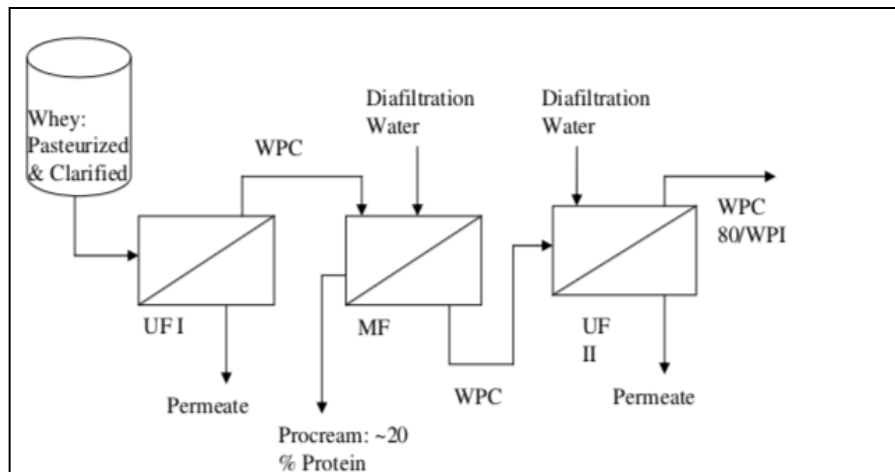


Figura 7: Diagramma di flusso del processo di produzione delle WPI (Marella, 2009)

Nel processo di IE, il siero pastorizzato è pompato attraverso un'apposita colonna per il processo, in cui all'interno è presente una resina che assorbe le proteine. Successivamente con acqua distillata si lava la resina della colonna e le proteine sono rilasciate, di conseguenza è possibile concentrarle con un processo di UF. Per ottenere la polvere di WPI si utilizza il processo di spray-dry (Marella, 2009). Quando invece si utilizzano membrane di separazione, il siero è prima pastorizzato e poi chiarificato; successivamente sono presenti 3 step in cui si combinano UF e MF. Nel primo passaggio la UF è utilizzata per produrre il retentato che sarà sottoposto alla MF. Nel secondo step la MF produce permeato che sarà fatto passare in una successiva UF, e diventerà pronto per il terzo passaggio. Nel terzo step si produce il retentato finale che può essere direttamente mandato all'operazione dello spray-dry o ulteriormente concentrato con una NF per avere un'essiccazione a spruzzo più pura (Marella, 2009).

Nelle WPI ottenute con scambio ionico le percentuali di immunoglobuline, lattoferrine, lattoperossidasi e glicomacropetide sono molto basse; invece nelle WPI ottenute per filtrazione con membrane porose possono avere differenti livelli di queste sostanze, in base al processo di MF utilizzato (Marella, 2009).

Solitamente le WPI contengono il 85-92% di proteine, 0,5-1% di lattosio, 0,5-1,1% di grassi, e il 95,5% di solidi totali (USDEC, 2008). Invece, nella tabella 10, sono indicate alcune WPI vendute in Italia e i loro valori nutrizionali: è possibile vedere come le WPI hanno purezza e proteine nettamente maggiori rispetto alle WPC 80 (tabella 9).

Alla fine del processo è presente una riduzione totale del volume e le membrane utilizzate per le WPI possono essere usate anche per le WPC 80 (Marella, 2009).

**Tabella 10: Valori nutrizionali delle principali WPI vendute in Italia (valori in g/100 g di prodotto).**

	Impact Whey Isolate (cioccolato) (My Protein)	Iso-Fuji (cioccolato) (Yamamoto)	Zero Whey Protein (Big Man)
Grassi	0,3	1,1	0
Carboidrati	2,5	1,8	0
Proteine	90	86	85

(Fonte: [www.vitamincenter.it](http://www.vitamincenter.it))

Le WPI sono sottoposte a un processo di MF “cross flow” o tangenziale: questo permette di ottenere una proteina più pura, quasi priva di grassi, colesterolo e lattosio. E’ un prodotto nettamente più digeribile e leggero rispetto alle WPC e solitamente sono scelte da sportivi che richiedono di mantenere un livello di grasso corporeo basso o per quelli intolleranti al lattosio; infine il tempo di assorbimento a livello gastrico-intestinale è di 30 minuti-1 ora.

#### 4.5.5 *Whey protein hydrolyzated*

Le Whey Protein Hydrolyzated (WPH) subiscono un'idrolisi ad aminoacidi e peptidi; il grado di idrolisi dipende dalle condizioni operative, oltre che dal tipo di enzima utilizzato. I prodotti di nicchia che riguardano questa particolare categoria sono i di-peptidi o tri-peptidi di caseina idrolizzata (Clemente, 2000).

Le WPH hanno un costo nettamente maggiore rispetto alle WPI e WPC infatti sono ottenute con processi industriali più costosi, raggiungendo un valore nutrizionale migliore. Le WPH hanno caratteristiche quali la digestione facilitata, maggiore ipoallergenicità e assenza di lattosio. Inoltre, essendo basso il contenuto di aminoacidi liberi si determina un assorbimento

più efficiente a causa delle differenze di assorbimento intestinale tra peptidi e aminoacidi liberi (Clemente, 2000).

L'intestino infatti è in grado di assorbire più facilmente i di e tri-peptoni rispetto agli aminoacidi liberi e le proteine essendo idrolizzate e, quindi predigerite, sono divise in pezzi più piccoli e assorbite in minor tempo. Le WPH sono quindi utilizzate da sportivi o in situazioni cliniche particolari in cui il paziente ha bisogno di un prodotto leggero e a rapido assorbimento. Inoltre, le WPH sono tollerate meglio a livello gastrointestinale soprattutto da quelle persone che soffrono di gonfiori addominali dopo l'assunzione di integratori classici in polvere. Infine, il picco insulinico è raggiunto in maniera più rapida grazie agli aminoacidi liberi e ciò permette di accelerare il recupero nel post-workout e sfruttare la "finestra anabolica"; se queste sono associate a una corretta dose di carboidrati si aumenta la velocità del ripristino del glicogeno muscolare (Power, 2009).

**Tabella 11: Valori nutrizionali delle principali WPH vendute in Italia (valori in g/100 g di prodotto).**

	Hydrolysed Advanced Whey 90 (cioccolato- mandorla) (Named Sport)	Alpha Protein ISO 104 92 (cioccolato) (L-absinthe)	HydroWhey Zero (cioccolato) (Biotech USA)	HydroRAZAN (cioccolato) (Yamamoto Nutrition)
Grassi	1,6	0	3,8	1,6
Carboidrati	1,4	0	7,5	1,3
Proteine	83	92	80	80

(Fonte: [www.vitamincenter.it](http://www.vitamincenter.it))

Nella tabella 11, si può notare come non ci siano molte differenze a livello dei macronutrienti fra le WPI e le WPH, ma la principale diversità sta che le WPH sono predigerite rispetto alle WPI e gli studi hanno dimostrato evidenti effetti positivi.

## 4.6 Analisi del reale contenuto di proteine in vari brand di whey protein

Un'analisi, riguardo al contenuto di proteine presente in un integratore proteico in polvere, è stata condotta su un prodotto di una famosa azienda produttrice di integratori alimentari (My Protein) per verificare che il contenuto di proteine dichiarato in etichetta fosse lo stesso presente nel prodotto. Il controllo è stato fatto con il metodo Kjeldahl su 3 prodotti (Impact Whey Concentrate; Impact Whey Isolate; ISOPRO97) da parte dell'istituto zooprofilattico sperimentale delle regioni Lazio e Toscana, sotto la supervisione di ACCREDIA (ente italiano di accreditamento) e del Ministero della Salute.

Gli esiti sono stati positivi per tutti e tre i prodotti, quindi corrispondono a quello che è dichiarato in etichetta con un'incertezza che va dal 4,3 al 5,0% (vedi figura 8).

MQ/1 rev. 14  
COPA Regione di Piena s.r.l.  
Via Appia Nuova, 141  
Tel. 06/70961 - Fax: 06/7096724  
(Laboratorio accreditato da ACCREDIA n.0201)

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA  
Via Appia Nuova, 141  
Tel. 06/70961 - Fax: 06/7096724  
(Laboratorio accreditato da ACCREDIA n.0201)

Alta attenzione di: \_\_\_\_\_

Sede di accettazione: \_\_\_\_\_ alle ore 09:42  
 Descrizione dei campioni pervenuti in data: \_\_\_\_\_  
 IMPACT WHEY ISOLATE: n.1 campione composto da n.1 aliquota a temp. Ambiente  
 IMPACT WHEY PROTEIN: n.1 campione composto da n.1 aliquota a temp. Ambiente  
 ISOPRO97: n.1 campione composto da n.1 aliquota a temp. Ambiente  
 per un numero complessivo di 3 campioni.  
 prelevato da: \_\_\_\_\_  
 detenuto: \_\_\_\_\_  
 luogo di provenienza: ALABENI (L. ANAGRAUNE)  
 inizio prove: 03/10/2014 fine prove: 06/10/2014  
 Campioni oggetto delle prove: 1-3

**RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE**

**IMPACT WHEY ISOLATE**  
**PROVA: PROTEINE - TECNICA: VOLUMETRICO-KJELDAHL**

Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
2	1	1		91.6 %

Altro: \_\_\_\_\_  
 Recupero: 96% (Recupero utilizzato nei calcoli)  
 Media di determinazioni n° 2  
 Incertezza estesa: ±4.3%

**IMPACT WHEY PROTEIN**  
**PROVA: PROTEINE - TECNICA: VOLUMETRICO-KJELDAHL**

Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
1	1	1		79.3 %

Altro: \_\_\_\_\_  
 Recupero: 96% (Recupero utilizzato nei calcoli)  
 Media di determinazioni n° 2  
 Incertezza estesa: ±4.3%

**ISOPRO97**  
**PROVA: PROTEINE - TECNICA: VOLUMETRICO-KJELDAHL**

Camp.	Aliq.	UC #	Ident. Camp.	Esito
3	1	1		94.5 %

Altro: \_\_\_\_\_  
 Recupero: 96% (Recupero utilizzato nei calcoli)  
 Media di determinazioni n° 2  
 Incertezza estesa: ±3.9%

Metodo di Piena  
 IMPACT WHEY ISOLATE: 14111990 (GI) C351487 31121992 Livello Proteine: 97%  
 IMPACT WHEY ISOLATE: 14111990 (GI) C351487 31121992 Livello Proteine: 97%  
 IMPACT WHEY PROTEIN: 14111990 (GI) C351487 31121992 Livello Proteine: 97%  
 ISOPRO97: 14111990 (GI) C351487 31121992 Livello Proteine: 97%  
 ISOPRO97: 14111990 (GI) C351487 31121992 Livello Proteine: 97%

Il materiale in esame, prima delle prove, è stato conservato alle seguenti temperature: \_\_\_\_\_

Pagina 1 di 2

MQ/1 rev. 14  
COPA Regione di Piena s.r.l.  
Via Appia Nuova, 141  
Tel. 06/70961 - Fax: 06/7096724  
(Laboratorio accreditato da ACCREDIA n.0201)

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA  
Via Appia Nuova, 141  
Tel. 06/70961 - Fax: 06/7096724  
(Laboratorio accreditato da ACCREDIA n.0201)

IMPACT WHEY ISOLATE (1)  
IMPACT WHEY PROTEIN (1)  
ISOPRO97 (1)

Responsabile delle prove  
Dr. ALESSANDRO UBALDI

Responsabile Struttura Complessa  
Direzioni Operativa Chimica  
Pia Delega Dr. ALESSANDRO UBALDI

I campioni sono eliminati alla data di fine prova ad eccezione di quelli sottoposti a normativa specifica. I documenti relativi alla prova sono conservati come previsto dalla normativa vigente. Per campionamenti di area e specifici il risultato è espresso nell'unità di misura solo se dichiarata dal cliente e mediante ricalcolo. Il presente rapporto di prova riguarda esclusivamente il campione sottoposto a prova, e non può essere riprodotto parzialmente, salvo approvazione scritta dell'Istituto. Il laboratorio è responsabile del campionamento solo se effettuato dallo stesso (PG ACC 007) (fase richiesta dall'accreditamento).

ROMA, 06/10/2014

Fine rapporto di prova

Pagina 2 di 2

Figura 8: Scheda di analisi della marca "My Protein" (ACCREDIA)

Al contrario, sono state condotte analisi su differenti marche di proteine in polvere vendute in Europa e hanno rivelato che 15 su 20 dei prodotti testati contengono meno proteine di quanto dichiarato. Una delle marche che è stata testata contiene il 12,2 g in meno di proteine su 100 grammi rispetto a quanto scritto in etichetta (Nedergaard, 2018). Le analisi sono state

fatte su 20 marche di proteine maggiormente scelte dai consumatori sia in Europa e che nel resto del mondo, ma i risultati finali descrivono una situazione generale negativa: i prodotti contengono circa il 3,5% di proteine in meno rispetto alla dichiarazione nutrizionale (Nedergaard, 2018). Alcuni prodotti rischiano di essere inutili o dannosi perché contengono aminoacidi di scarsa qualità e riducono l'efficacia e la funzionalità delle proteine stesse. Questi aminoacidi sono presenti nel prodotto per ingannare la reale quantità di proteine contenute nell'integratore, infatti contribuiscono alla grammatura totale del prodotto e sono assimilati a proteine di alta qualità (Nedergaard, 2018). Questo fenomeno è detto "amino spiking" ed è sempre più comune. I regolamenti a livello europeo vietano tale pratica, ma questa viene ugualmente effettuata, perché il mercato delle proteine in polvere (e in generale degli integratori proteici) è soprattutto on-line, e perciò i controlli sono meno efficienti. Non esistono organismi di controllo ufficiale per la tutela e la vigilanza di questo tipo di prodotti: per il consumatore è difficile capire qual è il prodotto con effettiva qualità (Nedergaard, 2018). Questo fenomeno è utilizzato dalle aziende per massimizzare il profitto e riducendo i costi di produzione; in USA questo fenomeno sta lentamente decrescendo perché il mercato delle proteine in polvere, essendo diffuso da molti più anni rispetto al continente europeo, è più controllato. In Europa, riguardo agli integratori proteici, quasi non esiste una tutela del consumatore; i regolamenti sono facilmente aggirati e i monitoraggi risultano inefficaci (Nedergaard, 2018).

Secondo "Candilab (Start-Up danese)", per risolvere questo problema sarebbe opportuno una revisione e un aggiornamento delle norme tutt'oggi utilizzate (Nedergaard, 2018).



## **Capitolo 5: LE PROTEINE DEL SIERO DI LATTE COME COMPONENTE CHIAVE NEI SISTEMI ALIMENTARI: PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE, TECNOLOGIE DI PRODUZIONE E APPLICAZIONI**

Le WP sono un ingrediente potenziale e versatile per lo sviluppo di nuovi componenti nei prodotti alimentari (Patel, 2015) e possono fungere da modificatori di texture, agenti addensanti, veicoli di molecole, agenti gelificanti, componenti tensioattivi e agenti schiumogeni (Patel, 2015). I composti presenti nelle WP sono stati utilizzati per incapsulare componenti bioattivi in alimenti e farmaci, migliorando la loro solubilità, trasporto, disperdibilità, biodisponibilità e bioaccessibilità, ottenendo dei risultati simili agli ingredienti classici che erano usati per quelle determinate caratteristiche (Patel, 2015).

L'utilizzo delle WP come ingrediente si è rafforzato negli anni poiché la loro applicazione è diventata sempre più rilevante grazie alle proprietà reologiche e strutturali dei prodotti ottenuti (Cinelli *et al.*, 2014; Moakes *et al.*, 2015; Nicolai *et al.*, 2011; Tarhan *et al.*, 2016).

### **5.1 Proprietà funzionali delle principali WP**

Le WP come la  $\beta$ -LG e la  $\alpha$ -LA sono note per le proprietà antitumorali e come trasportatori di molecole idrofobiche (vitamina E); LF ha attività antimicrobiche e LP ha una risposta antivirale e antinfiammatoria (Yadav *et al.*, 2015).

Le WP sono una materia prima chiave per la categoria degli alimenti funzionali e dell'industria nutraceutica perché sono un substrato ricco di molecole bioattive (Udenigwe C. C. e Aluko R. E., 2012).

### **5.2 Peptidi bioattivi**

Nelle matrici delle WP sono presenti anche peptidi bioattivi che sono molto importanti nel massimizzare l'anabolismo del muscolo scheletrico poiché hanno un valore nutrizionale maggiore rispetto agli aminoacidi liberi e alle proteine intatte (Brandelli *et al.*, 2015). Le proteine del siero di latte sono infatti considerate un'ottima fonte di peptidi bioattivi (Hafeez

*et al.*, 2014). I peptidi bioattivi sono frammenti proteici specifici con un'attività simile a un farmaco o ad un ormone, che modulano le risposte fisiologiche delle funzioni corporee con un'influenza positiva sulla salute (Korhonen H. e Pihlanto A., 2006; Li-Chan, 2015; Park Y. W. e Nam M. S., 2015; Pihlanto-Leppälä, 2000; Sharma *et al.*, 2011; Udenigwe C. C. e Aluko R. E., 2012). La bioattività dipende dalle dimensioni e dalla sequenza degli aminoacidi del peptide (Hafeez *et al.*, 2014) e queste biomolecole sono state studiate e utilizzate per la loro capacità di modulare il sistema gastrointestinale, cardiovascolare, immunitario, endocrino e nervoso (Hafeez, 2014; Park Y. W. e Nam M. S., 2015; Patel, 2015; Yadav *et al.*, 2015). I peptidi bioattivi possono essere generati utilizzando processi fisico-chimici e biologici: sono impiegati anche nei processi in cui si utilizza l'idrolisi enzimatica di proteine vegetali, animali o microbiche attraverso enzimi proteolitici come pepsina e tripsina (Brandelli *et al.*, 2015; Hafeez *et al.*, 2014; Korhonen H. e Pihlanto A., 2006; Chan, 2015; Lopez-Fandiño *et al.*, 2006; Nongonierma A. B. e FitzGerald R. J., 2016; Yadav *et al.*, 2015).

### **5.3 Microincapsulazione con proteine del siero per omogeneità dei prodotti**

Gli ingredienti proteici sono generalmente accettati come materiali idonei per la microincapsulazione nelle applicazioni alimentari, in particolare per gli alimenti liquidi e semi-solidi, si possono infatti sviluppare matrici senza avere effetti negativi sulle proprietà sensoriali del cibo da incapsulare (Chen *et al.*, 2006). Le proteine tramite i loro legami possono proteggere una vasta gamma di composti attivi e hanno anche una funzione di stabilizzazione (Chen *et al.*, 2006). Le proteine del latte hanno proprietà funzionali e nutrizionali che le rendono molto apprezzabili a livello dell'ingredientistica alimentare (Fox P. F. e McSweeney P. L. M., 2013) e, proprio per questo, sono idonee per la nano e la microincapsulazione di nutraceutici e probiotici (Abd El-Salam M. H. e El-Shibiny S., 2012; Augustin *et al.*, 2012; Heidebach *et al.*, Tavares *et al.*, 2014).

I materiali derivanti dalle WP utilizzati nella microincapsulazione, consentono ai batteri di sopravvivere all'interno delle stesse capsule, permettendo la loro sopravvivenza anche durante la lavorazione o la conservazione di alimenti fermentati (Abd El-Salam M. H. e El-Shibiny S., 2015). Le soluzioni concentrate di WP hanno una viscosità moderata che consente una facile dispersione delle cellule batteriche e questo permette, dopo l'incapsulazione, di

avere dei gel ad alta densità e una migliore protezione dei probiotici intrappolati. Un ultimo vantaggio, è che le WP sono ricche di peptidi bioattivi che possono esercitare un effetto fisiologico positivo negli stessi siti di azione dei probiotici, anche creando una sinergia. Le WP sono state utilizzate per l'incapsulamento di *Lactobacillus delbrueckii* e *bulgaricus* al fine di aumentare la resistenza di quest'ultimi contro acidi e sali biliari (López, 2013); e sono utilizzate singolarmente o in combinazione con diversi polisaccaridi nella microincapsulazione (López, 2013).

### 5.3.1 Tecniche per la microincapsulazione utilizzando WP

Le tecniche utilizzate per la microincapsulazione sono:

- Estrusione: questa tecnica si basa sull'estrusione di una miscela di cellule probiotiche vitali concentrate da una soluzione di polisaccaridi e WP (o di solo WP). La concentrazione è eseguita attraverso un ugello che forma goccioline dette microsfele, le quali, durante la caduta, si gelificano. L'estrusione può essere eseguita in due passaggi: i probiotici sono intrappolati nelle perle di polisaccaridi e successivamente sono rivestite dal materiale ottenuto con le WP. Le perle ottenute con questo metodo hanno dimostrato un'elevata stabilità all'acidità e resistenza alla digestione peptidica (Abd El-Salam M. H. e El-Shibiny S., 2015).
- Spray-drying: questa tecnica più economica fornisce una maggior stabilità nella conservazione delle colture microbiche rispetto a quelle congelate o fresche e quelle a temperatura ambiente. Questo metodo causa una leggera perdita di vitalità dei probiotici incapsulati per l'utilizzo di calore e altre tecniche che provocano lesioni fisiche alle microcapsule, causando anche il rilascio di cellule batteriche durante il processo di essiccazione (Ying *et al.*, 2012).
- Emulsificazioni: sono emulsioni singole o doppie che possono essere utilizzate per l'intrappolamento dei probiotici. Per la preparazione di una singola emulsione è necessaria una sospensione di cellule probiotiche vitali, WP e olio vegetale; questa però risulta instabile e perciò ha bisogno di una continua agitazione che può provocare la morte di una parte dei probiotici; eventualmente si può usare anche un tensioattivo

e un processo di omogeneizzazione. L'emulsione genera goccioline oleose o acquose comunemente dette capsule (Abd El-Salam M. H. e El-Shibiny S., 2015).

### 5.3.2 Studi per una migliore interazione fra microrganismi e WP

Al di là di tutte queste tecniche sono stati fatti studi in cui si è trattata l'interazione tra WP e microrganismi: si è dimostrata l'importanza dell'adesione tra le superfici delle cellule batteriche e le WP per il successo dell'intrappolamento dei probiotici. Sulla parete cellulare dei batteri sono presenti pili o esopolisaccaridi che possono interagire con le WP attraverso forze e meccanismi diversi (Abd El-Salam M. H. e El-Shibiny S., 2015).

Sono però necessari ulteriori studi in questo settore per una migliore comprensione dei fattori e dei meccanismi che influenzano l'interazione fra le WP e i probiotici (Abd El-Salam M. H. e El-Shibiny S., 2015).

La maggior parte degli studi fatti sulla microincapsulazione con le WP prevedeva l'uso delle classiche WPC e WPI, ma oggi sono disponibili commercialmente anche solo le frazioni di  $\beta$ -LG, di  $\alpha$ -LA e di  $\beta$ -caseina che possono fungere da parete di rivestimento per l'incapsulamento dei probiotici (Abd El-Salam M. H. e El-Shibiny S., 2015).

Le WP sono una matrice molto versatile perché grazie alle loro proprietà funzionali possono essere modificate e controllate con semplici tecnologie. Ad esempio, la denaturazione a caldo delle WP, a pH e a condizioni di riscaldamento variabile, provocano la formazione di un gel con diverse strutture e proprietà. Per di più, limitati processi di proteolisi condotti sulle WP, portano cambiamenti consistenti nelle proprietà funzionali che possono indurre a un migliore intrappolamento dei probiotici (Abd El-Salam M. H. e El-Shibiny S., 2015)

Un'ulteriore modifica è fatta tramite l'aggiunta di gruppi funzionali alle WP (Poulin *et al.*, 2011): per esempio l'aggiunta di  $\beta$ -LG succinilato protegge il probiotico somministrato contro le condizioni avverse del tratto gastrointestinale, mentre la  $\beta$ -LG nativa non assicura la sopravvivenza cellulare dei microrganismi (Abd El-Salam M. H. e El-Shibiny S., 2015).

Sono stati fatti ulteriori studi sul possibile utilizzo di capsule proteiche di WP caricate con probiotici, poi inserite nei prodotti alimentari: le WP, avendo un sapore blando, non hanno effetto negativo sulla qualità del prodotto o del cibo fermentato (Abd El-Salam M. H. e El-Shibiny S., 2015).

## 5.4 WP utilizzate in emulsioni

Negli ultimi anni, grazie alla maggior importanza che è stata data alla salute e alla prevenzione attraverso il cibo, sono sempre più richiesti prodotti con etichetta pulita e la rimozione di ingredienti sintetici dalle formulazioni. Le WP, quindi, hanno un ruolo fondamentale per la formulazione di emulsioni alimentari, infatti, hanno eccellenti proprietà di gelificazione e interagiscono con altre molecole presenti nella matrice alimentare, in particolare con polisaccaridi, per formare complessi coniugati caratterizzati da proprietà sinergiche (Cinelli *et al.*, 2014; Moakes *et al.*, 2015; Nicolai *et al.*, 2011; Tarhan *et al.*, 2016). Le proteine sono polimeri che grazie alla loro natura riescono a formare “film” spessi e flessibili con la capacità di rimanere ancorati all’interfaccia olio-acqua di un’emulsione.

### 5.4.1 Meccanismi della stabilizzazione delle emulsioni

Sono presenti due meccanismi per la stabilizzazione delle emulsioni realizzate tramite WP: il primo consiste in una stabilizzazione sterica (che è il risultato delle interazioni idrofobiche tra polimeri adsorbiti); mentre il secondo è dato da una repulsione elettrostatica (fra due “goccioline” che hanno la stessa carica) (Kim *et al.*, 2005; Lam R. S. H. e Nickerson M. T., 2013). Le proteine hanno gruppi idrofili e idrofobi che sono rapidamente adsorbiti dall’interfaccia olio-acqua sotto forma di una pellicola protettiva: questa fornisce un supporto strutturale per le goccioline di olio attraverso una combinazione di interazioni elettrostatiche e steriche (Kim *et al.*, 2005; Lam R. S. H. e Nickerson M. T., 2013). La parte idrofoba è quella che influenza il legame con l’interfaccia oleosa della matrice e questo porta a maggiori capacità di emulsione (Kim *et al.*, 2005; Lam R. S. H. e Nickerson M. T., 2013). Invece la parte idrofila influenza la solubilità delle WP all’interno della fase acquosa e, più sono presenti gruppi idrofili, maggiore sarà la velocità di solubilizzazione nella parte acquosa (Karaca *et al.*, 2011; Lam R. S. H. e Nickerson M. T., 2013). Successivamente si forma un film visco-elastico che permette alle goccioline di assumere una carica negativa o positiva a seconda che il pH dell’emulsione sia inferiore o superiore al pI. Oltre a ciò, più la repulsione elettrostatica fra le proteine è forte, più l’emulsione sarà stabile. Se invece il pH si avvicina

al pI domina il fenomeno della flocculazione che porterà le goccioline ad aggregarsi rendendo il sistema instabile (McClements, 2015).

#### *5.4.2 Perdita di solubilità*

A volte le condizioni di lavorazione possono portare a una perdita di solubilità delle WP, ma questa proprietà è una delle più importanti perché ne condiziona altre come quella gelificante, schiumogena e emulsionante. Ad alte temperature, infatti, le WP tendono a disperdersi perché hanno un'elevata sensibilità al calore: le Ig sono quelle che ne risentono di più e già a 70°C si denaturano, subito dopo abbiamo le  $\alpha$ -LA, le  $\beta$ -LG e le BSA che resistono a temperature fino a 100°C. La denaturazione accade perché all'interno della proteina si rompono i ponti solfuro, che provocano un ripiegamento della struttura stessa rendendola insolubile; per ovviare a questo fenomeno è bene aggiungere un polisaccaride che modifica la struttura molecolare delle WP (Lam R. S. H. e Nickerson M. T., 2013).

#### *5.4.3 Interazione fra proteina e biopolimero*

L'interazione che si crea fra proteina e biopolimero può dipendere da molti fattori fra cui: caratteristiche dei biopolimeri (dimensione, conformazioni, rapporto di miscela, tipo e distribuzione dei siti reattivi), condizioni dei solventi (pH e temperatura), concentrazione totale del biopolimero e metodo di preparazione dell'emulsione (Lam R. S. H. e Nickerson M. T., 2013). L'obiettivo finale di questa strategia è creare un agente stabilizzante del complesso proteina-polimero (Dickinson, 2015).

## **5.5 Film commestibili, rivestimenti, idrogel e nanoparticelle di proteine del siero di latte**

### *5.5.1 Pellicole o film e rivestimenti*

Le pellicole e i rivestimenti commestibili utilizzati nel settore alimentare sono considerati come un qualsiasi altro materiale impiegato per la protezione dell'alimento e per prolungarne la shelf-life. Questo materiale può essere consumato assieme al cibo o rimosso; inoltre può sostituire e rafforzare gli strati naturali del prodotto, prevenirne la perdita di umidità e di componenti importanti, fornendo sterilità superficiale e in ultimo consentire uno scambio controllato di gas con l'esterno (Huber K. C. e Embuscado M. E., 2009).

Per differenziare i film e i rivestimenti si esamina lo spessore poiché nella composizione del materiale non ci sono differenze determinanti. I rivestimenti sono applicati al materiale in forma liquida tramite un'immersione nella soluzione polimerica; invece i film commestibili sono plasmati come fogli solidi che faranno da involucro al prodotto (Falguera *et al.*, 2011).

### *5.5.2 Miscelazione di additivi e ingredienti con WP per migliorare le proprietà meccaniche*

Come già scritto in precedenza le WP possono formare film commestibili e trasparenti con proprietà meccaniche e di barriera migliori rispetto ai film di soli polisaccaridi; ci sono, però, alcune limitazioni nelle loro caratteristiche meccaniche e perciò nella formulazione sono aggiunti polialcoli come sorbitolo e glicerolo che sono necessari per migliorare la flessibilità e il trasferimento di umidità (Basiak *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2012). Quindi se le WP sono miscelate a particolari additivi e plastificanti si possono ottenere potenziali imballaggi ecocompatibili con l'alimento (Cinelli *et al.*, 2014).

Per la produzione dei film delle WP si utilizza un processo che richiede la disidratazione a caldo delle proteine in una soluzione acquosa: si produce un gel di WP e si fa una disidratazione a temperatura di 21-23°C e con umidità relativa percentuale (U%) al 50%; oggi si utilizzano anche altri metodi come immersione, irrorazione, schiumatura, fluidificazione, polimerizzazione UV, rivestimento, fusione ed estrusione (Ramos *et al.*, 2012).

Per migliorare la flessibilità del film di rivestimento delle WP si adoperano polioli, come il glicerolo che permette di ridurre lo spazio di interazione fra le catene polimeriche: si facilita

il movimento della catena e il suo successivo stiramento, il quale permette al sistema di deformarsi senza rompersi (Kurek *et al.*, 2014). Uno studio ha evidenziato che se nelle pellicole delle WP, contenenti già glicerolo, si aggiunge anche trealosio, si ottiene un effetto di prevenzione dalla reazione di Maillard, che in alcuni casi è indesiderata (Pérez *et al.*, 2016). Per quanto riguarda l'utilizzo dei lipidi nei film di sieroproteine, sono stati condotti studi in cui si sono impiegati oli di mandorle e noci. L'aggiunta di tali oli ha permesso la riduzione della permeabilità al vapore acqueo, della idrofilicità superficiale e un miglioramento della plasticità (soprattutto nel caso dell'olio di mandorle) (Galus *et al.*, 2016). Sono stati anche miscelati componenti come cera d'api e pullunano (polimero del maltotriosio) che hanno permesso di ottenere migliori risultati riguardo le proprietà chimico-fisiche delle WP (Khanzadi *et al.*, 2015).

### 5.5.3 Incorporazione di antimicrobici nei film di WP

Negli ultimi anni si sono condotti studi per l'incorporazione di agenti antimicrobici in film edibili e nei rivestimenti, che consentirebbero l'applicazione di processi meno drastici, in quanto ridurrebbero la crescita dei microrganismi specifici per quell'alimento. Questi agenti antimicrobici possono essere: batteriocine, fungicidi, enzimi, acidi organici, sali, estratti di olii essenziali e polisaccaridi (Henriques *et al.*, 2016). Ad esempio, sono state incorporate ciclodestrine nei film edibili e queste hanno permesso di controllare meglio la liberazione di antimicrobici come eugenolo e carvacrolo (Barba *et al.*, 2015). In uno studio è stato usato olio essenziale di calendula con funzione antibatterica e antifungina (anche contro *Listeria monocitogenes*, vedi figura 9); oltretutto il risultato più rilevante metteva in evidenza il miglioramento della permeabilità del film al vapore acqueo e alla solubilità in acqua (Bahram *et al.*, 2014).

Un interessante studio ha sviluppato un film antimicrobico per la conservazione del cibo confezionato dopo l'apertura a livello domestico. Sono stati preparati film composti da WP, da cera d'api, da acido oleico e da lisozima. Se il pH dell'alimento scende sotto al 5, il



meccanismo all'interno di questi film fa sì che venga rilasciato in modo graduale il lisozima (Boyacı *et al.*, 2016).

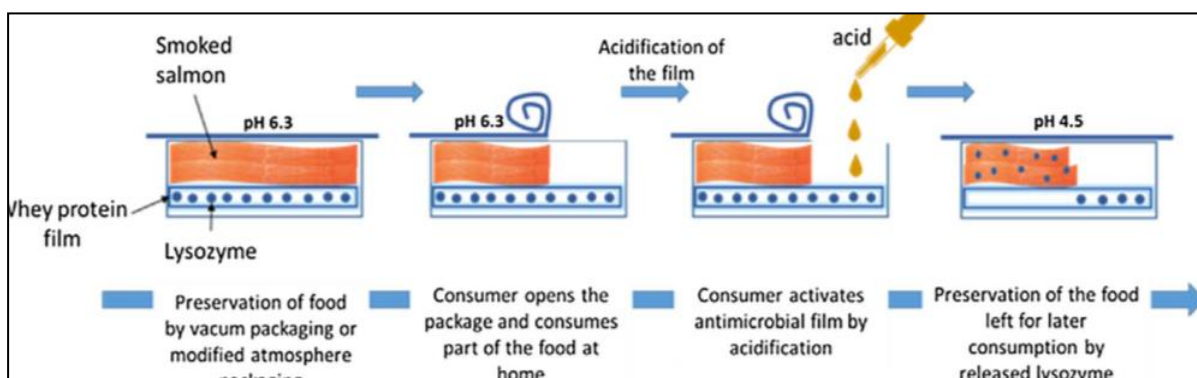


Figura 9: conservazione di prodotto aperto a casa; con questo tipo di film, fettine di salmone affumicate risultano insensibili alla *Listeria monocitogenes* (Boyacı *et al.*, 2016).

#### 5.5.4 Microparticelle di gel di WP

Un ulteriore studio mostra che utilizzando microparticelle costituite da gel di WP e da gel di alginato di sodio, si possono produrre nanoparticelle miste mediante gelificazione a freddo. Nello specifico, le nanoparticelle prodotte che modificano la texture, sono portatrici di aromi e di sostanze nutritive nell'alimento. Alla fine della sperimentazione si sono prodotte delle particelle presentanti un'ampia gamma di proprietà meccaniche in grado di formare un soft-gel: questo può essere utilizzato in alimenti morbidi, facili da masticare e da deglutire (il prodotto era rivolto a persona anziane) (Leon *et al.*; 2016).

Il metodo consiste nella preparazione di una soluzione di WPI denaturate a temperatura ambiente e a diversi pH, con una concentrazione per la gelificazione inferiore alla stessa concentrazione critica (Egan *et al.*; 2013). Gli scienziati che hanno sperimentato questo procedimento, hanno anche usato il metodo di gelificazione a freddo per preparare microgel di WPI per l'immobilizzazione dei lipidi, infatti, lo scopo dello studio era quello di fornire lipidi bioattivi a lento rilascio, utilizzando le proprietà emulsionanti del siero. I risultati sono stati buoni perché non vi era alcuna migrazione della fase lipidica dentro e fuori le matrici; che oltretutto non è stata interrotta dal processo di gelificazione (Egan *et al.*; 2013).

## **Capitolo 6: TECNOLOGIE EMERGENTI APPLICATE ALLA MODIFICA DELLE PROPRIETA' STRUTTURALI E FUNZIONALI DELLE PROTEINE DEL SIERO DI LATTE**

### **6.1 Tecnologie non termiche per le WP**

Le tecnologie emergenti come alte pressioni idrostatiche (HPH), campi elettrici pulsati (PEF), ultrasuoni (US), ozono (O<sub>3</sub>), gas plasma e raggi UV sono tecnologie non termiche, che sono usate per migliorare le proprietà fisico-chimiche e funzionali delle WP con una minima modifica dei valori nutrizionali.

#### *6.1.1 Alte pressioni idrostatiche (HPH)*

Il trattamento fatto con alte pressioni (HPH) ha permesso la denaturazione delle sieroproteine  $\beta$ -LG e  $\alpha$ -LA presenti nel latte crudo intero e si è osservato che più aumentava la pressione più le proteine erano denaturate (Datta *et al.*, 2005). Questo trattamento, inoltre, ha permesso di ridurre le dimensioni degli aggregati proteici e di modificare le proprietà di superficie: la struttura proteica si è probabilmente rotta e in questo modo si sono esposti i gruppi idrofobici che prima si trovavano all'interno, consentendo le interazioni molecolari e la formazione di nuovi aggregati. Un altro vantaggio ottenuto dal trattamento con HPH è stato un miglioramento delle proprietà schiumogene: difatti la schiuma risultava più stabile dopo che le proteine erano state sottoposte al processo (Bouaouina *et al.*, 2006).

#### *6.1.2 Campi elettrici pulsati (PEF)*

La nuova tecnologia non termica dei campi elettrici pulsati (PEF) è stata utilizzata anche in questo campo: consiste nel sottoporre il prodotto a campi elettrici ad alta intensità e in tempi ridotti (Petit *et al.*, 2002). Questa tecnologia provoca un miglioramento della qualità organolettica, dell'aspetto nutrizionale e della sicurezza microbiologica; inoltre non vengono deteriorati i composti termolabili (Jeyamkondan *et al.*, 1999; Sui *et al.*, 2011).

In generale, gli studi che sono stati condotti, non hanno migliorato alcuna proprietà delle sieroproteine, tranne nel caso in cui il gel inizialmente formato dalle proteine, risultava più

debole (Sui *et al.*; 2011). E' presente un'ulteriore caso studio in cui si è preso in considerazione l'effetto dei PEF sulla coniugazione WPI-destrano per la formazione della reazione di Maillard; il trattamento PEF ha provocato un incremento della reazione di Maillard (le misure di colore di imbrunimento sono state utilizzate come indicatore della reazione) e quindi della doratura (Sui *et al.*; 2011). L'applicazione del PEF, quindi, ha provocato la riduzione dei gruppi amminoacidici liberi poiché riescono a formare un legame con il gruppo carbossilico del destrano, permettendo una maggiore solubilità e un miglioramento delle proprietà emulsionanti delle WP. In futuro si potrebbe utilizzare la coniugazione destrano-WP per nuovi emulsionanti nell'industria alimentare (Sun *et al.*; 2011).

### 6.1.3 Ultrasuoni US

Gli ultrasuoni (US) combinano radiazioni ad alta frequenza e bassa energia o bassa frequenza e alta energia e sono associati a una minore perdita di caratteristiche nutrizionali e sensoriali rispetto ai processi termici (Cao *et al.*, 2010).

Uno studio ha dimostrato che le vibrazioni indotte da un trattamento con US causa una parziale denaturazione delle catene proteiche che influenzano le proprietà delle WP; infatti il trattamento ha provocato una diminuzione delle dimensioni delle particelle e in alcuni casi anche del peso molecolare (Jambrak *et al.*; 2014).

### 6.1.4 Ozono (O<sub>3</sub>)

L'ozono (O<sub>3</sub>) è stato utilizzato per trattare le WP provocando una modificazione della struttura e della funzionalità delle stesse proteine a causa del forte potenziale ossidativo (Cataldo, 2003; Kelly *et al.*, 1999).

Dopo il trattamento con O<sub>3</sub> in una soluzione acquosa di WP, la capacità di formare schiuma e la stabilità delle WP erano aumentate: le strutture secondarie  $\beta$  non erano cambiate, mentre c'era stato un lieve aumento delle strutture  $\alpha$ -elica. Quindi trattamenti con l'O<sub>3</sub> possono modificare la solubilità superficiale e aumentare l'idrofobicità superficiale (Segat *et al.*, 2014).

### 6.1.5 Gas plasma

Il gas plasma è stato utilizzato su WP ottenendo un aumento del tenore di carbonile (per modificazione dei gruppi di amminoacidi) nella molecola e parallelamente si è ottenuto una graduale riduzione del contenuto dei gruppi sulfidrilici (Segat *et al.*, 2015).

### 6.1.6 Raggi UV

I raggi UV provocano la formazione di radicali liberi negli amminoacidi a causa della capacità di assorbimento dei doppi legami presenti negli anelli aromatici polari. Grazie a questo processo si è studiato come applicare i raggi UV nella formazione di un film di WPC e di conseguenza come modificare molte delle proprietà meccaniche come la resistenza, l'elasticità, la forza e molte altre (Masutani *et al.*, 2014).

## Capitolo 7: CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo lavoro era osservare la produzione delle proteine del siero di latte tramite un approccio olistico. Sono state elencate le tecniche di estrazione, di produzione e di analisi, ma anche l'ambito riguardante il beneficio alla salute attraverso la loro assunzione.

Le WP sono un prodotto di alta qualità ricco di sieroproteine che facilitano lo sviluppo del sistema muscolare, hanno proprietà antitumorali e se associate con probiotici creano una sinergia che avvantaggia la microflora intestinale.

Con l'avanzare delle tecnologie, soprattutto in un mondo che tende ad essere sempre più ecosostenibile, è bene saper sfruttare ogni scarto disponibile come il siero di latte, un rifiuto che se non viene trattato o utilizzato come sottoprodotto, è molto inquinante.

Le WP saranno sempre più impiegate nel settore del packaging commestibile, per permettere un minor uso di plastica e, di conseguenza inquinare meno. E' importante far notare che nelle nuove tecniche di produzione alimentare le WP saranno maggiormente utilizzate grazie alle loro proprietà meccaniche e chimico-fisiche che si adattano perfettamente alle tecnologie non termiche: permettendo la sostituzione di additivi sintetici per creare prodotti con un'etichetta pulita, che consentano di salvaguardare la salute del consumatore.

Le WP sono state utilizzate per formare film contenenti antimicrobici e batteriocine che prolungano la shelf-life del prodotto sia durante la conservazione primaria "sullo scaffale", sia durante la secondaria nelle abitazioni dei consumatori. Le innovazioni presenti in questo campo daranno la possibilità di vincere, se sfruttata in modo opportuno, un'altra battaglia contro lo spreco di alimenti.

Le WP associate con altri componenti come polialcoli e lipidi, hanno dimostrato un aumento positivo delle proprietà funzionali, permettendo di creare prodotti a ridotto contenuto calorico e ad alto valore nutrizionale. Oltretutto, prendendo in considerazione semplici WP "sprayzzate" si ottiene un prodotto di altissima qualità adoperato da sportivi, da anziani e da persone con eventuali patologie.

Il siero e le WP dimostrano quanto sia importante sfruttare quello che deriva dalla conclusione di una filiera, quella lattiero-casearia e, anziché renderlo un rifiuto inquinante, trasformarlo in una fonte di reddito e sostenibilità.

## Capitolo 8: BIBLIOGRAFIA

Abd-El-Salam M. H., El-Shibiny S., Buchheim W.; (1996). Characteristics and potential uses of casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6, 327-341.

Abd El-Salam M. H., El-Shibiny S.; (2015). Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. *Dairy Science and Technology*, 95, 393–412.

Alais C.; (2000). La scienza del latte, principi di tecnologia del latte e dei derivati, 3a ed. Ed. Tecniche Nuove, Milano.

Atra R., Vatai G., Bekassy-Molnar E., Balint A.; (2005). Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*, 67, 325-332.

Bahram S., Rezaei M., Soltani M., Kamali A., Ojagh S. M., Abdollahi M.; (2014). Whey protein concentrate edible film activated with cinnamon essential oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 1251–1258.

Barba C., Eguinoa A., Maté J. I.; (2015). Preparation and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes as a tool of a controlled antimicrobial release in whey protein edible films. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1362–1369.

Basiak E., Lenart A., Debeaufort F.; (2017). Effects of carbohydrate/protein ratio on the microstructure and the barrier and sorption properties of wheat starch-whey protein blend edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 858–867.

Bouaouina H., Desrumaux A., Loisel C., Legrand J.; (2006). Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, 16, 275–284.

Boutrif E.; (1991). Food quality and consumer protection group, food policy and nutrition division, FAO, Rome: Recent Developments in Protein Quality Evaluation Food, Nutrition and Agriculture.

Boyacı D., Korel F., Yemenicioğlu A.; (2016). Development of activate-at-home-type edible antimicrobial films: An example pH-triggering mechanism formed for smoked salmon slices using lysozyme in whey protein films. *Food Hydrocolloids*, 60, 170–178.

Brans G., Schroen C. G. P. H., van der Sman R. G. M., Boom R. M.; (2004). Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *Journal of the Membrane Science*, 243, 263-272.

Caballero P., Finglas P., Toldra F.; (2015). The encyclopedia of Food Health, 2a ed. Ed. Academic Press, Maryland.

Caessens P., Visser S., Gruppen H., Voragen A. G.; (1999). Beta-lactoglobulin hydrolysis. Peptide composition and functional properties of hydrolysates obtained by the action of 101 plasmin, trypsin, and *Staphylococcus aureus* V8 protease. *Journal of the Agricultural Food Chemistry*, 47, 2973-2979.

Cao S., Hu Z., Pang B., Wang H., Xie H., Wu F.; (2010). Effect of ultrasound treatment on fruit decay and quality maintenance in strawberry after harvest. *Food Control*, 21, 529–532.

Cataldo F.; (2003). On the action of ozone on proteins. *Polymer Degradation and Stability*, 82, 105–114.

Chen L. Y., Remondetto G. E., Subirade M.; (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food & Science Technology*, 17, 272–283.

Cheryan M.; (1998). *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. 2a ed. Ed. Technomic Publishing Company, Lancaster.

Cinelli P., Schmid M., Bugnicourt E., Wildner J., Bazzichi A., Anguillesi I., Lazzeri A.; (2014). Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 151–157.

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

Dai Q., Zhu X., Abbas S., Karangwa E., Zhang X., Xia S., Jia C.; (2015). Stable nanoparticles prepared by heating electrostatic complexes of whey protein isolate–dextran conjugate and chondroitin sulfate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4179–4189.

Datta N., Hayes M. G., Deeth H. C., Kelly A. L.; (2005). Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. *Journal of Dairy Research*, 72, 393.

Depuydt N.; (2008). L'utilizzo dei derivati del siero nell'industria alimentare. Estrapolato da: [http://www.sardegna.ricerche.it/documenti/13\\_143\\_20081215105700.pdf](http://www.sardegna.ricerche.it/documenti/13_143_20081215105700.pdf)

Dickinson E.; (2015). Colloids in food: Ingredients, structure, and stability. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 211–233.

Donnelly W. J., Mehra R. K.; (1993). Fractionation of whey protein components through a large pore size, hydrophilic, cellulosic membrane. *Journal Dairy Research*, 60, 89-97.

Egan T., Jacquier J. C., Rosenberg Y., Rosenberg M.; (2013). Cold-set whey protein microgels for the stable immobilization of lipids. *Food Hydrocolloids*, 31, 317–324.



Falguera V., Quintero J. P., Jiménez A., Muñoz J. A., Ibarz A.; (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 292–303.

Foegeding E. A., Luck J. P.; (2003). Whey protein products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Roginski H., Fuquay J. W., Fox P. F., 1a ed. Ed. Academic Press, New York.

Fox P. F., McSweeney P. L. M.; (2013). *Advances in dairy chemistry, volume 1A: Proteins: Basic Aspect*, 4a ed. Ed. Springer, New York.

Galus S., Kadzińska J.; (2016). Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. *Food Hydrocolloids*, 52, 78–86.

Global Whey Protein Market will reach from USD 8.2 billion in 2015 to USD 12.4 by 2021: Zion Market Research, M2 Presswire (2016) New York. Estrapolato da: <https://markets.businessinsider.com/news/stocks/global-whey-protein-market-size-trends-worth-over-12-4-bn-by-2021-zion-market-researchaccording-to-the-report-the-global-whey-protein-market-accounted-for-usd-8-2-billion-in-2015-and-is-1002317348>

Hafeez Z., Cakir-Kiefer C., Roux E., Perrin C., Miclo L., Dary-Mourot A.; (2014). Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 63, 71–80.

Haug A., Hostmark A. T., Harstad O. M.; (2007). Bovine milk in human nutrition – A review. *Lipids in Health and Disease*, 6, 25.

Heine W. E., Klein P. D., Reeds P. J.; (1990). The importance of  $\alpha$ -Lactalbumin in infant nutrition. *The Journal of Nutrition*, 121, 277-283.

Hemant H. G., Mayur A. C., Pooja S. P., Nayana S. B.; (2011). Department of Pharmaceutics, SNJB's S.S.D.J., College of Pharmacy, Neminagar, Chandwad, Nashik, Maharashtra.

Henriques M., Gomes D., Pereira C.; (2016). Whey protein edible coatings: Recent developments and applications. In Nedović V., Raspor P., Lević J., Tumbas Šaponjac V., Barbosa-Cánovas G. V., ed. *Emerging and traditional technologies for safe, healthy and quality food*, 1a ed. Ed. Springer International Publishing, Cham.

Huber K. C., Embuscado M. E.; (2009). *Edible films and coatings for food applications*, 3a ed. Ed. Springer, New York.

Jambrak A. R., Mason T. J., Lelas V., Paniwnyk L., Herceg Z.; (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 121, 15–23.

Jeyamkondan S., Jayas D. S., Holley R. A.; (1999). Pulsed electric field processing of foods: A review. *Journal of Food Protection*, 62, 1088–1096.

Karaca A. C., Low N., Nickerson M.; (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44, 2742–2750.

Khazadi M., Jafari S. M., Mirzaei H., Chegini F. K., Maghsoudlou Y., Dehnad D.; (2015). Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate–pullulan by application of beeswax. *Carbohydrate Polymers*, 118, 24–29.

Kim H. J., Decker E. A., McClements D. J.; (2005). Influence of protein concentration and order of addition on thermal stability of beta-lactoglobulin stabilized n-hexadecane oil-in-water emulsions at neutral pH. *Langmuir*, 21, 134–139.

- Kim J. G., Yousef A. E., Dave S.; (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *Journal of Food Protection*, 62, 1071–1087.
- Ko Y. T., Chipley J. R.; (1983). Microbial Production of Lysine and Threonine from whey permeate. *Applied and environmental microbiology*, 45, 610-615.
- Korhonen H., Pihlanto A.; (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16, 945–960.
- Krissansen G. W.; (2007). Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *Journal of the American College of Nutrition*, 26, 713S-23S.
- Kurek M., Galus S., Debeaufort F.; (2014). Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packaging and Shelf Life*, 1, 56–67.
- Lam R. S. H., Nickerson M. T.; (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*, 141, 975–984.
- Lee K. M.; (1999). Functionality of 34% whey protein concentrate (WPC) and its application in selected model food systems. PhD Dissertation. The Ohio State University, Columbus, Ohio.
- Leon A. M., Medina W. T., Park D. J., Aguilera J. M.; (2016). Mechanical properties of whey protein/Na alginate gel microparticles. *Journal of Food Engineering*, 188, 1–7.
- Lewis M. J.; (1990). Physical properties of foods and food processing systems, 1a ed. Ed. Ellis Horwood, Chichester.

López-Fandiño R., Otte J., van Camp J.; (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16, 1277–1293.

López L. A. V.; (2013). Influence of “added” whey protein isolates on probiotic properties of yoghurt culture bacteria and yoghurt properties. M.Sc. thesis, Louisiana State University.

Lorient D., Closs B., Courthandon J. L.; (1991). Connaissances nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et des dérivés, *Le Lait. INFRA Science & Impact*, 71, 141-177.

Luhovyy B. L., Akhavan T., Anderson G. H.; (2007). Whey proteins in the regulation of food intake and satiety. *Journal of the American College of Nutrition*; 26, 704S-12S.

Ly M. H., Aguedoc M., Goudota S., Lea M. L., Cayotd P., Teixeira J. A., Leb T. M., Belina J. M., Wache Y.; (2008). Interactions between bacterial surfaces and milk proteins, impact on food emulsions stability. *Food Hydrocolloids*, 22, 742–751.

Macèt M., Jovanović P., Djurdjević L.; (2002). The Influence of high temperatures on milk protein. *Hemijska industrija*, 56, 123-132.

Magarò E.; (2012). Il siero nell’industria lattiero-casearia. Bergamo. Estrapolato da: <https://agrariacantoni.edu.it/wp-content/uploads/Il-siero-di-latte.pdf>

Maldonado Galdeano C., de Moreno de LeBlanc A., Carmuega E., Weill R., Perdigón G.; (2009). Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. *Journal of Dairy Research*, 76, 446–454.

Marella C.; (2009). Whey Protein fraction using membrane separation technology. M.sc thesis, South Dakota State University, Brookings.

Masutani E. M., Kinoshita C. K., Tanaka T. T., Ellison A. K. D., Yoza B. A.; (2014). Increasing thermal stability of gelatin by UV-induced cross-linking with glucose. *International Journal of Biomaterials*, 2014, 1–9.

McClements D. J.; (2015). *Food emulsions: Principles, practices, and techniques*, 3a ed. Ed. CRC Press, Boca Raton.

Moakes R. J. A., Sullo A., Norton I. T.; (2015). Preparation and characterisation of whey protein fluid gels: The effects of shear and thermal history. *Food Hydrocolloids*, 45, 227–235.

Mohsenin N. N.; (1980). *Physical Properties of Plant and Animal Materials: Structure, Physical Characteristics and Mechanical Properties*, 2a ed. Ed. Gordon and Breach, New York.

Montuoro G. L.; (2006). Valutazione analitiche, gestionali e legislative nella filiera del latte alimentare. Dottorato di ricerca in biotecnologie degli alimenti. Università degli Studi di Bologna, Università degli Studi di Perugia.

Mulder M.; (1991). *Basic Principles of Membrane Technology*, 2a ed. Ed. Kluwer academic publishers, Norwell.

Nongonierma A. B., FitzGerald R. J.; (2016). Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 26–43.

Onwulata C., Huth P.; (2009). *Whey processing, functionality and health benefits*, 1a edizione. Ed. Wiley-Blackwell, Iowa.

Park Y. W., Nam M. S.; (2015). Bioactive peptides in milk and dairy products: A review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35, 831–840.

Patel S.; (2015). Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. *Journal of Functional Foods*, 19, 308–319.

Paterson A. H. J.; (2009). Production and Uses of Lactose. In: McSweeney P., Fox F. P., *Advanced Dairy Chemistry: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, 3a ed. Ed. Springer, New York.

Pearce R. J.; (1983). Thermal separation of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin in bovine cheddar cheese whey. *Australian Journal of Dairy Technology*, 38, 144-149.

Pearce, R. J.; (1987). Fractionation of whey proteins. *Australian Journal Dairy Technology*, 212, 150 –153.

Pearce R. J., Dunkerley J. A., Wheaton T. W., Marshall S. C., Tobin A.; (1998). A solid fat replacer for manufactured meat products based on a  $\beta$ -Lactoglobulin rich whey protein ingredients. Proceedings of the 2nd international whey conference, IDF, Brussels, 181-188.

Pérez L. M., Piccirilli G. N., Delorenzi N. J., Verdini R. A.; (2016). Effect of different combinations of glycerol and/or trehalose on physical and structural properties of whey protein concentrate-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 56, 352–359.

Petit B., Ritz M., Federighi M.; (2002). Nouveaux traitements physiques de conservation des aliments: revue bibliographique. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 153, 653–664.

Pihlanto-Leppälä A.; (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 347–356.

Pizzichini M., Russo C., Ferrero E., Tuccimei E.; (2009). Le tecnologia separative mediante membrana. ENEA Report RSE.

Poulin J. F., Caillard R., Subirade M.; (2011).  $\beta$ -Lactoglobulin tablets as a suitable vehicle for protection and intestinal delivery of probiotic bacteria. *International Journal of Pharmacy*, 405, 47–54.

Power O., Hallihan A., Jakeman P.; (2009). Human insulinotropic response to oral ingestion of native and hydrolysed whey protein. *Aminoacids*, 37, 333-9.

Pouliot Y.; (2008). Membrane processes in dairy technology-from simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal*, 18, 735-740.

Prazeres A. R., Carvalho F., Rivas J.; (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48-68.

Ramos O. L., Fernandes J. C., Silva S. I., Pintado M. E., Malcata F. X.; (2012). Edible films and coatings from whey proteins: A review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 533–552.

Ryan P., Walsh G.; (2016). The biotechnological potential of whey. *Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 479–498.

Salvadori del Prato O.; (1998). Trattato di tecnologia casearia, 1a ed. Ed. Edagricole – Ed. Agricole della Calderini s.r.l., Bologna.

Segat A., Misra N. N., Cullen P. J., Innocente N.; (2015). Atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment of whey protein isolate model solution. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 29, 247–254.

Sharma S., Singh R., Rana S.; (2011). Bioactive peptides: A review. *International Journal Bioautomation*, 15, 223–250.

Smithers G. W.; (2008). Whey and whey proteins from ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, 18, 695-704.

Steinhauer T., Marx M., Bogendorfer K., Kulozik U.; (2015). Membrane fouling during ultra- and microfiltration of whey and whey proteins at different environmental conditions: the role of aggregated whey proteins as fouling initiators. *Journal of Membrane Science*, 489, 20-27.

Sui Q., Roginski H., Williams R. P. W., Versteeg C., Wan J.; (2011). Effect of pulsed electric field and thermal treatment on the physicochemical and functional properties of whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 21, 206–213.

Sun W. W., Yu S. J., Zeng X. A., Yang X. Q., Jia X.; (2011). Properties of whey protein isolate–dextran conjugate prepared using pulsed electric field. *Food Research International*, 44, 1052–1058.

Tarhan O., Spotti M. J., Schaffter S., Corvalan C. M., Campanella O. H.; (2016). Rheological and structural characterization of whey protein gelation induced by enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 61, 211–220.

Tomasula P. M., Bonnaille L. M.; (2015). Crossflow Microfiltration in the Dairy Industry. In: *Emerging Dairy Processing Technologies*, 1a ed. Ed. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester.

Tunick M. H., Onwulata C. I., Huth P. J.; (2008). Whey protein production and utilization whey processing, functionality and health benefits, 1a ed. Ed. Blackwell Publishing, IFT Press, Iowa.

Udenigwe C. C., Aluko R. E.; (2012). Food protein derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77, R11–R24.



Van der Ven C., Gruppen H., de Bont D. B., Voragen A. G.; (2002). Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50, 2938-2946.

Vangone P.; (2007). Nuovi Marcatori per stabile ex-post l'intensità del trattamento termico nel latte del commercio. Tesi sperimentali, Dottorato in scienze e tecnologie agro-alimentari. Università degli Studi di Napoli Federico II.

“Whey Protein Powder Market 2018 Global Analysis, Growth, Trends and Opportunities Research Report Forecasting to 2023”, M2 Presswire, Coventry.

Whey. The Encyclopedia Britannica; (1994), 15a ed., Great Britain.

Wu C.; (2003). Whey treatment process for achieving high concentration of  $\alpha$ -lactalbumin, *United State Patent*, 6, 613, 377.

Yadav J. S. S., Yan S., Pilli S., Kumar L., Tyagi R. D., Surampalli R. Y.; (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33, 756–774.

Ying D. Y., Sun J., Sanguansri L., Weerakkody R., Augustin M. A.; (2012). Enhanced survival of spray-dried microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in the presence of glucose. *Journal of Food Engineering*, 109, 597–602.

## Capitolo 9: SITOGRAFIA E DECRETI LEGISLATIVI

<http://dati.istat.it/Index.aspx?QueryId=25520>

[https://www.clal.it/?section=siero\\_regioni](https://www.clal.it/?section=siero_regioni)

[http://www.izs.it/bollettino\\_segn\\_legislative/bollettini\\_2008/marzo\\_08/7.pdf](http://www.izs.it/bollettino_segn_legislative/bollettini_2008/marzo_08/7.pdf)

<https://www.sis.se/api/document/preview/615957/>

<https://law.resource.org/pub/eac/ibr/eas.81.3.2006.pdf>

<http://www.fao.org/ag/humannutrition/3597802317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>

[http://usdec.files.cmsplus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey\\_Lactose\\_Reference\\_Manual\\_Complete2\\_Optimized.pdf](http://usdec.files.cmsplus.com/PDFs/2008ReferenceManuals/Whey_Lactose_Reference_Manual_Complete2_Optimized.pdf)

[https://www.clal.it/?section=quadro\\_italia](https://www.clal.it/?section=quadro_italia)

<http://www.isprambiente.gov.it/contentfiles/00004100/4161-aziende-agroalimentari.pdf>  
[www.usdec.org](http://www.usdec.org). Accessed 22nd Oct 2008.

<https://ironmind.it/qualita-proteine-isolate/>

<https://www.my-personaltrainer.it/integratori/proteine-idrolizzate.html>

<https://www.bodybuilding-natural.com/analisi-delle-proteine-myprotein/>

<https://www.laprimapagina.it/2018/06/22/il-mercato-fraudolento-delle-proteine-in-polvere/>

<https://candidlab.com/it/proteine-in-polvere-2018/>

Protein Powder Industry Analysis, ANDERS NEDERGAARD 2018

EUR-Lex - 02011R1169-20140219 - EN - EUR-Lex [Internet] <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX-:02011R1169-20140219>. cited April 18, 2018

[www.vitamincenter.it](http://www.vitamincenter.it)

<https://markets.businessinsider.com/news/stocks/global-whey-protein-market-size-trends-worth-over-12-4-bn-by-2021-zion-market-researchaccording-to-the-report-the-global-whey-protein-market-accounted-for-usd-8-2-billion-in-2015-and-is-1002317348>

Codice CER 020203 fa parte degli “scarti inutilizzabili per il consumo e la trasformazione” (Dlgs 152/06)

Dlgs 152/06, Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale

REGOLAMENTO SPECIALE SIERO DI LATTE, Adottato dalla Deputazione Nazionale con delibera n°6 del 18 aprile 2011