



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione
Dipartimento di Scienze Biomediche

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie per
l'Alimentazione

**Soia fermentata come fonte di peptidi bioattivi
con caratteristiche antiossidanti:
studio *in vitro* e in un modello cellulare**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Alessandro Bertoli
Dipartimento di Scienze Biomediche

Correlatore:

Chiar.ma Prof. Maria Pia Rigobello
Dipartimento di Scienze Biomediche

Laureanda: Giulia Foffano
Matricola n. 1180127

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

Riassunto

Il consumo di soia, leguminosa ricca di proteine e fitochimici, e i prodotti che ne derivano è in crescita in Occidente. Tale alimento infatti non solo è versatile nel soddisfare le esigenze di alcune fasce di consumatori, ma anche presenta numerose proprietà benefiche. In questo studio si è analizzato in particolare un prodotto fermentato a base di soia poiché tale processo produttivo favorisce il rilascio di peptidi bioattivi, molecole che esplicano diverse attività biologiche. Tra le tante funzioni si è scelta quella antiossidante poiché offre un doppio effetto benefico: può ritardare l'ossidazione degli alimenti preservando la *shelf life* e agire contro malattie cronico-degenerative indotte dall'età e da condizioni di stress ossidativo. In base al confronto fra una matrice fermentata e una non fermentata si è osservato che l'azione dei microorganismi incrementa l'attività antiossidante. Per agevolare ulteriormente il rilascio dei peptidi bioattivi si è simulata la digestione gastrointestinale umana *in vitro*. Si è proseguito poi con la loro estrazione per valutarne il potere antiossidante *in vitro* e in un modello cellulare che simula l'epitelio intestinale, la linea Caco-2.

Abstract

The consumption of soy, a legume rich of proteins and phytochemicals, and the resulting products is growing in West. This food indeed not only satisfy the needs of some consumer groups, but also has numerous beneficial properties. In this study it has been analyzed in particular a fermented soy product because the fermentation helps the release of bioactive peptides, molecules that explicate different biological activities. Among the many functions, it has been choice the antioxidant one because offers a double beneficial effect: it can retarding the food oxidation preserving the *shelf life* and it can acting against chronic-degenerative diseases induced by age and oxidative stress conditions. According to the comparison between a fermented and not-fermented matrix it has been observed that the action of microorganisms increases the antioxidant activity. To agevolate further the release of bioactive peptides it has been simulated the human gastrointestinal digestion *in vitro*. The research is been continued with the extraction of bioactive peptides for testing their antioxidant power *in vitro* and in a cellular model that simulates the intestinal epithelium, the Caco-2 line.

Indice

Riassunto	III
Abstract	V
Abbreviazioni	XI
1. Introduzione	1
1.1 Soia	1
1.1.1 Alimenti a base di soia.....	2
1.1.2 Principali componenti	3
1.1.3 Componenti secondarie	5
1.2 Alimenti fermentati	8
1.2.1 Fermentazione con <i>Lactic acid bacteria</i> (LAB)	9
1.3 La digestione gastrointestinale come fonte di peptidi bioattivi	10
1.3.1 Modelli per la simulazione della digestione gastrointestinale	11
1.4 Peptidi bioattivi	11
1.4.1 Attività antipertensiva	13
1.4.2 Attività antimicrobica	13
1.4.3 Attività oppioide.....	13
1.4.4 Attività antiossidante e specifiche applicazioni	13
1.5 Stress ossidativo e antiossidanti	14
1.5.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS)	14
1.5.2 Antiossidanti.....	17
2 Scopo della tesi	21
3 Materiali e metodi	23
3.1 Il campione: la soia fermentata	23
3.2 Analisi della soia fermentata	26
3.2.1 Determinazione della perossidazione lipidica mediante formazione di MDA 26	
3.2.2 Frammentazione proteica con test dell'ortoftalaldeide (OPA)	28
3.3 Simulazione della digestione gastrointestinale	28
3.3.1 Preparazione dei fluidi.....	29
3.3.2 Fase orale	30
3.3.3 Fase gastrica.....	30
3.3.4 Fase intestinale.....	31

3.3.5	Determinazione del quantitativo proteico mediante il metodo di Bradford	31
3.3.6	Gel Tris/Tricina	32
3.4	Estrazione dei peptidi dalla soia fermentata digerita	33
3.4.1	Estrazione dei peptidi.....	33
3.4.2	Sub-frazionamento della frazione 5-30% di soia fermentata digerita.....	34
3.5	Analisi <i>in vitro</i> del potere antiossidante delle frazioni peptidiche	34
3.5.1	Saggio ABTS su piastre da 96 <i>well</i>	34
3.5.2	Saggio DPPH su piastre da 96 <i>well</i>	35
3.6	Studi nel modello cellulare	36
3.6.1	La linea cellulare Caco-2.....	36
3.6.2	Saggio di vitalità (MTT)	37
3.6.3	Determinazione della produzione di ROS.....	38
3.6.4	Analisi dell'assorbimento dei peptidi con <i>Transwell</i> ®	39
3.6.5	Misurazione della resistenza elettrica transepiteliale	39
3.6.6	Analisi dell'assorbimento delle frazioni peptidiche	40
3.6.7	Analisi dei campioni con HPLC.....	41
3.6.8	Analisi delle frazioni peptidiche tramite spettrometria di massa.....	41
3.7	Analisi statistica	42
4	<i>Risultati e discussione</i>	43
4.1	Analisi del potere antiossidante e della frammentazione proteica della soia fermentata	43
4.1.1	Perossidazione lipidica	43
4.1.2	Saggio dell'ortoftalaldeide (OPA)	44
4.2	Ottenimento della soia fermentata digerita mediante simulazione della digestione gastrointestinale <i>in vitro</i>	46
4.3	Purificazione delle frazioni peptidiche	47
4.4	Misura <i>in vitro</i> del potere antiossidante della frazione peptidica 5-30%.....	48
4.4.1	Test di <i>scavenging</i> del radicale DPPH'	48
4.4.2	Analisi dello <i>scavenging</i> con ABTS ⁺	49
4.5	Sub-frazionamento della frazione peptidica 5-30% della soia fermentata digerita.....	50
4.5.1	Analisi allo spettrometro di massa delle sub-frazioni di soia fermentata digerita	51
4.6	Potere antiossidante <i>in vitro</i> delle sub-frazioni peptidiche: DPPH e ABTS.....	54

4.7	Studi cellulari	54
4.7.1	Analisi della vitalità cellulare mediante saggio con MTT	55
4.7.2	Analisi della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)	57
4.7.3	Analisi dell'assorbimento della frazione 5-30% e delle sub-frazioni in cellule Caco-2	58
5	Conclusioni	65
6	Bibliografia	69
	Appendice A.....	75
	Ringraziamenti	77

Abbreviazioni

ABTS	Acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
ACN	Acetonitrile
AP	Apicale
ARE	<i>Antioxidant response elements</i>
BASE	Prodotto base di soia non fermentata
BL	Basolaterale
BSA	Albumina sierica bovina
CAT	Catalasi
CHP	Cumene idroperossido
CM-H₂DCFDA	5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodiidrofluoresceina diacetato acetil estere
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsolfossido
DPPH	Difenilpicrilidrazile
DTT	Ditiotreitolo
EtOH	Etanolo
ER	Reticolo endoplasmatico
FBS	Siero fetale bovino
GPH	Glutazione
GPx	Glutazione perossidasi
GST	Glutazione S-transferasi
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH associated protein 1</i>
KPS	Potassio persolfato
L·	Diene coniugato
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i>
LH	Acido grasso polinsaturo
LOO·	Radicale idroperossilico
MDA	Malondialdeide
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5)-difeniltetrazolio bromuro
Nrf2	<i>NF-E2-related factor 2</i>
OH·	Radicale idrossile
OPA	Ortoftalaldeide
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
R·	Radicale libero
PTA	Acido fosfotungstico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rT	Temperatura ambiente
SD	Soia digerita
SDS	Sodio dodecil solfato

SF	Soia fermentata
SGF	<i>Simulated gastric fluid</i>
SIF	<i>Simulated intestinal fluid</i>
SOD	Superossido dismutasi
SSF	<i>Simulated salivar fluid</i>
TBA	Acido tiobarbiturico
TbOOH	<i>ter-butile idroperossido</i>
TCA	Acido tricloroacetico
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>
TEER	<i>Transepithelial electrical resistance</i>
TFA	Acido trifluoroacetico
TRIS	2ammino-2 idrossimetil-1,3-propandiolo
Trolox C	Acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico
TrxR	Tioredoxina riduttasi

1. Introduzione

Nella parte introduttiva della tesi viene descritta la matrice alimentare fermentata analizzata nel lavoro sperimentale, ovvero la soia fermentata. Si è scelto un prodotto fermentato in quanto questo processo favorisce il rilascio di peptidi bioattivi, brevi frammenti amminoacidici di interesse per la ricerca grazie alle loro molteplici funzioni biologiche. La funzione biologica su cui ci si è specificatamente concentrati è l'attività antiossidante.

1.1 Soia

La soia (specie *Glycine max*) è una leguminosa proveniente dall'estremo Oriente (figura 1.1). Si tratta di una pianta annuale che misura fino a 1.5 m di altezza avente un fusto rigido ed eretto ed un apparato radicale fittonante capace di fissare l'azoto con batteri simbiotici. Le foglie sono alternate e composte, di forma ovale e lanceolata e di colore verde, che vira al giallo a maturità. I fiori, in base alla varietà, sono di colore bianco o viola, di numero variabile e situati a livello dei racemi ascellari sottoforma di infiorescenze. I frutti della soia da cui si ricavano i vari alimenti, sono deiscenti e possiedono due aperture ai lati opposti, inoltre prendono il nome di legumi e al loro interno si trovano dai tre ai quattro semi di diversa colorazione in base alla varietà, tra le cui la più comune è quella gialla [El-Shemy, 2011].



Figura 1.1: Pianta di soia.

La soia è una pianta coltivata in tutto il mondo, principalmente in USA, Cina, Brasile e Argentina, e vista la sua grande disponibilità ed economicità, è usata moltissimo

nell'industria alimentare [Cabras *et al.*, 2004]. Come alimento essa mostra notevoli vantaggi nutrizionali in quanto presenta un ricchissimo contenuto proteico e alti livelli di acidi grassi essenziali, vitamine, minerali e fibre. Viene consumata principalmente sottoforma di fagioli cotti, salsa di soia, bevanda di soia e tofu. Sebbene gli alimenti a base di soia siano consumati da più di 1000 anni, solamente da un paio di decenni hanno iniziato ad apparire nella cultura e nella dieta dell'Occidente. L'aumento di tale diffusione deriva in primo luogo dalla divulgazione dei diversi benefici derivanti dal consumo regolare di prodotti a base di soia, tra cui la riduzione dell'incidenza di alcune malattie croniche oltre alla capacità di tale alimento di fornire apporti nutrizionali. Inoltre la soia è un ottimo sostitutivo al latte per persone intolleranti o allergiche al lattosio [Jooyandeh, 2011]. In alcuni soggetti infatti le componenti del latte, in particolare le proteine, possono scatenare fenomeni allergici, oppure in altri, la componente zuccherina di questo alimento, il lattosio, può risultare indigeribile vista la mancanza dell'enzima lattasi. Quest'ultima condizione prende il nome di intolleranza al lattosio e coinvolge ben il 75% della popolazione mondiale [Haug *et al.*, 2007]. Anche la maggior diffusione di diete vegetariane e vegane sta portando ad un aumentato interesse nei confronti dei prodotti di origine vegetale.

1.1.1 Alimenti a base di soia

Oltre agli alimenti a base di soia tradizionali, come il tofu, i fagioli di soia e la farina di soia vi sono quelli di seconda generazione che imitano carne e prodotti caseari come gelati e formaggi, categoria di cui fa parte la soia fermentata oggetto della trattazione. Vanno annoverati anche gli additivi alimentari a base di soia utilizzati in prodotti tradizionali come la pasta, i biscotti e i cereali [Jones *et al.*, 2002]. Della prima categoria fanno parte anche natto, tempeh, miso e salsa di soia. Gli alimenti a base di soia (figura 1.2) possono essere ulteriormente suddivisi in fermentati e non fermentati. Il natto per esempio, alimento della cultura nipponica, fa parte della categoria di quelli fermentati ed è l'unico ottenuto tramite fermentazione alcalina a partire da fagioli di soia interi la cui produzione è industrializzata [Beuchat *et al.*, 2007].

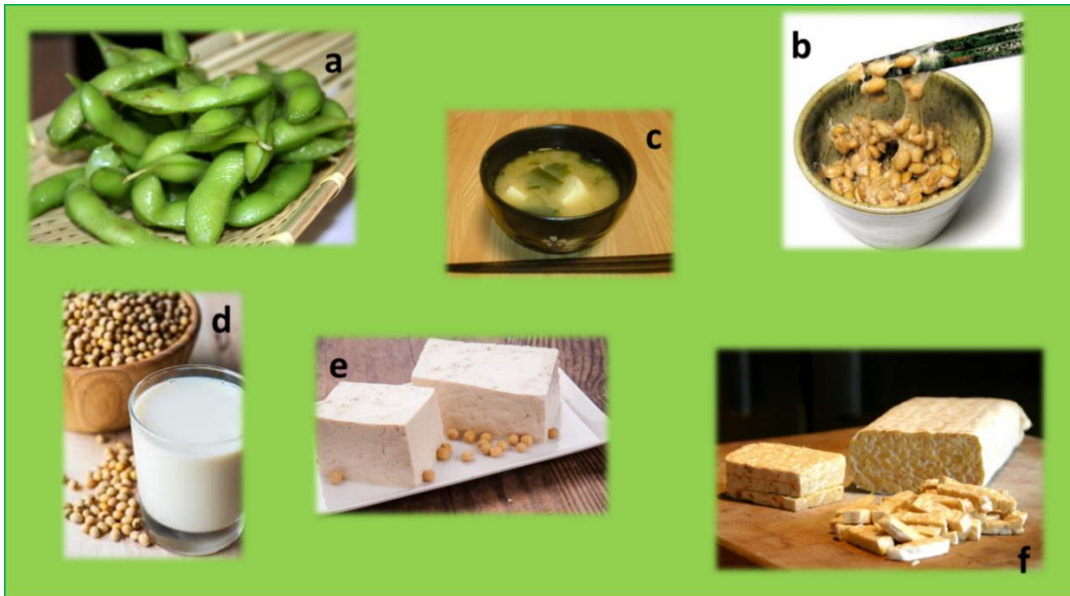


Figura 1.2: Esempi di prodotti alimentari a base di soia, fermentati e non: a) Edamame; b) Natto; c) Miso; d) Bevanda a base di soia; e) Tofu; f) Tempeh

1.1.2 Principali componenti

I prodotti a base di soia sono considerati una buona fonte di proteine, di lipidi, di calcio e di vitamine, in particolare la vitamina E (vedi paragrafo 1.5.2.2). Forniscono inoltre un alto contenuto in acidi grassi monoinsaturi e componenti minori quali alcuni fitochimici con differenti funzioni biologiche [El-Shemy, 2011; Jooyandeh, 2011].

1.1.2.1 Proteine

La maggior parte delle proteine della soia, circa un 40% (figura 1.3), si ritrovano all'interno dei cotiledoni. Le proteine della soia presentano un buon bilanciamento nella composizione amminoacidica e la loro qualità è comparabile a quella delle proteine della carne e del latte. Esse, vista la loro notevole ricchezza in residui di lisina, sono un ottimo complemento alle proteine dei cereali. Le principali proteine della soia sono le globuline 7S (β -conglucina) e 11S (glicina), il cui profilo amminoacidico e la cui struttura proteica influisce di molto sia sulle proprietà fisico-chimiche come l'emulsione e la gelificazione sia sul quantitativo di isoflavoni (vedi paragrafo 1.1.3.1) [Jooyandeh, 2011].



Figura 1.3: Diagramma a torta rappresentante la composizione nutrizionale percentuale della soia

1.1.2.2 Lipidi

I grassi saturi presenti nella soia, intorno al 20% (figura 1.3), sono principalmente trigliceridi (82%) di cui fanno parte l'acido palmitico, l'acido stearico, l'acido oleico e l'acido linoleico; la parte restante comprende fosfolipidi quali la fosfatidiletanolamina, il fosfatidilinositolo, la fosfatidilserina e la fosfatidilcolina. Quest'ultimo fosfolipide è il componente principale della lecitina, agente emulsionante molto usato nell'industria alimentare. Oltre ai lipidi sopra descritti nella soia si riscontrano i glicerolipidi e i carotenoidi. Questi ultimi, composti da una lunga catena di atomi di carbonio con doppi legami coniugati, sono i precursori della vitamina A e hanno una colorazione tipica che varia dal giallo al rosso. La loro rilevanza è rappresentata dal fatto che agiscono da *scavenger* nei confronti dell'ossigeno singoletto [El-Shemy, 2011; Cabras *et al.*, 2004; Gülçin, 2012].

1.1.2.3 Carboidrati

I semi di soia sono costituiti dal 35% di carboidrati (figura 1.3), la cui composizione varia a seguito della maturazione. Prima della maturazione il glucosio è il principale zucchero, successivamente invece si ha un aumento delle quantità di saccarosio, un disaccaride, e di oligosaccaridi come il raffinose e lo stachiosio. Al termine della maturazione l'amido è presente in quantità limitata. I polisaccaridi come emicellulosa, cellulosa e pectina sono prevalentemente riscontrabili nella parete cellulare. Vi sono anche carboidrati come arabinosilani e galattani in minor percentuale rispettivamente del 3.6% e 2.3%. Gli enzimi

intestinali non riescono a digerire gli oligosaccaridi contenuti nella soia provocando sintomi avversi quali flatulenza, crampi addominali e diarrea. Un modo per contrastare tali molecole anti-nutrizionali è il consumo di prodotti a base di soia fermentati in quanto contenenti batteri lattofermentanti in grado di idrolizzarle [Belitz *et al.*, 2009; Battistini *et al.*, 2018]. Gran parte degli zuccheri ora menzionati, non danno nessun apporto calorico e vengono annoverati tra le fibre.

1.1.3 Componenti secondarie

Tra le componenti secondarie insite nella soia, presenti in percentuale inferiore come si vede nella figura 1.3, troviamo vitamine lipo-solubili come la vitamina E ed idro-solubili come la vitamina C, l'acido folico, la biotina, la colina e l'inositolo. Oltre a queste esistono delle componenti bioattive, seppur in minore quantità, tra cui si annoverano i fitoestrogeni, l'acido fitico, le fitoalessine, le saponine, le lectine e alcune tossine. Sono presenti anche minerali quali magnesio, fosforo e calcio [El-Shemy, 2011].

1.1.3.1 Fitoestrogeni

I fitoestrogeni vengono così indicati per la loro somiglianza a livello di struttura chimica agli estrogeni, ormoni sessuali primari femminili, capaci di interferire con l'azione di tali ormoni legandosi ai loro recettori. I maggiori rappresentanti di questo gruppo sono gli isoflavoni, aventi anche potere antiossidante, prodotti ed usati dalla pianta come meccanismo difensivo contro gli erbivori. Essi sono prodotti attraverso la via biosintetica dei fenilpropanoidi, avente come precursore la fenilalanina. Lo stoccaggio dei flavonoidi a seguito della loro produzione avviene sotto forma dei coniugati gluconil e malonil-glucosio. La gran parte di essi presenti nella soia sono la genisteina, la daidzeina e la gliciteina che determinano rispettivamente il 50%, il 40% e il 10% del totale degli isoflavoni in tale leguminosa (vedi figura 1.4). Gli isoflavoni esistono sotto forma di agliconi e di forme glicosidiche, in quantitativo differente in funzione del processamento che ha subito il prodotto della soia. Il fatto che essi si presentano perlopiù coniugati a zuccheri rende interessante il loro meccanismo di assorbimento intestinale visto che è l'idrolisi del loro coniugato un prerequisito importante della loro biodisponibilità [El-Shemy, 2011; Setchell *et al.*, 2002]. Il quantitativo di isoflavoni è strettamente dipendente dalle tecniche di processamento utilizzate durante la produzione. Tipicamente il quantitativo di isoflavoni

è nullo in prodotti quali la salsa di soia e l'olio di soia mentre nella farina di soia il loro contenuto è alto, seguito dalla bevanda a base di soia, dal tofu, dal tempeh e dal miso. Questi fitoestrogeni possono ridurre il rischio di cancro tra cui quello al seno, al colon, al retto e alla prostata [Jooyandeh, 2011]. Tuttavia, per poterne valutare gli effetti biologici deve essere fatta una considerazione importante legata al microbiota. Infatti è il microbiota che determina il rilascio delle molecole attive e per questo tali fitoestrogeni non danno i medesimi risultati a livello della popolazione mondiale.

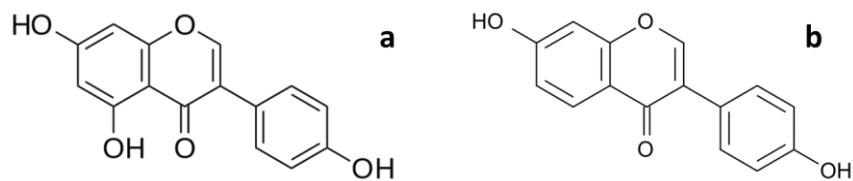


Figura 1.4: Struttura chimica dei due isoflavoni maggiormente rappresentati nella soia: a) Genisteina; b) Daidzeina

1.1.3.2 Acido fitico

L'acido fitico o inositolo 6-fosfato è provvisto di numerose proprietà chelanti, cioè è in grado di legare minerali e metalli. Ne viene riconosciuto il potere antiossidante e l'essere un ottimo *scavenger* di metalli pesanti e specie cationiche tossiche. Presenta però un aspetto anti-nutrizionale in quanto blocca l'*uptake* di minerali essenziali quali magnesio, calcio, ferro e specialmente zinco. Quest'ultimo aspetto viene perso a seguito di processi quali cottura, vista la sua termolabilità, e fermentazione microbica [El-Shemy, 2011].

1.1.3.3 Fitoalessine

La soia produce le fitoalessine come sostanze in risposta a stress ambientali sia abiotici sia biotici e in particolar modo per quanto riguarda questi ultimi a seguito di un'infezione. Tali fitochimici sono inibitori ad ampio spettro e presentano differenti strutture molecolari. La loro biosintesi avviene a partire dalla daidzeina, un isoflavone, ad opera dell'enzima 2'-idrossisoflavone reduttasi. Tra le fitoalessine vanno menzionate come esempi le gliceolline aventi attività antiestrogenica ed antitumorale e il cumestrololo, la cui produzione viene indotta da differenti specie di *Aspergillus spp.* [El-Shemy, 2011; Boué *et al.*, 2000].

1.1.3.4 Saponine

Le saponine sono dei glicosidi anfipatici caratterizzati dalla formazione di schiuma quando miscelati in soluzione acquosa. A tali molecole sono attribuite numerose proprietà benefiche tra le quali attività antifungina, coadiuvante degli effetti dei vaccini e la riduzione del colesterolo, interferendo così anche con la crescita e la divisione cellulare delle cellule tumorali. Un particolare gruppo di saponine però conferisce un indesiderato sapore astringente [El-Shemy, 2011].

1.1.3.5 Lectine

Le lectine vengono classificate tra le emoagglutinine vista la loro capacità di agglutinare i globuli rossi, rendendoli incapaci di assorbire l'ossigeno. Tali proteine, prodotte dalla pianta per contribuire alla sua difesa contro stress biotici, sono stabili e non degradano facilmente tanto che per esempio alcune lectine sono resistenti all'ambiente acido dello stomaco e agli enzimi digestivi. La fermentazione della soia come anche la cottura sono dei processi utili alla disattivazione di queste proteine, pertanto le lectine non sono considerate tossiche. Nonostante ciò il loro consumo è spesso causa di innesco di reazioni allergiche e tossiche [El-Shemy, 2011]. La loro tossicità è dovuta alla capacità di tali proteine di legare alcuni carboidrati presenti nelle cellule epiteliali intestinali diminuendo l'assorbimento dei nutrienti a partire dal tratto digestivo [Shibamoto *et al.*, 2009].

1.1.3.6 Tossine

La soia contiene alcuni composti che hanno attività tossica nei confronti dell'uomo e degli animali. Le tossine maggiormente conosciute della soia sono inibitori tripsinici e chimotripsinici come gli inibitori di Kunitz (che sono solamente inibitori tripsinici) e di Bowman-Birk. Tali inibitori degli enzimi digestivi riescono ad essere inattivati con il calore in quanto termolabili [El-Shemy, 2011; Belitz *et al.*, 2009]. Oltre a questi composti, la soia presenta almeno 28 proteine che mostrano tossicità in soggetti allergici. Esse legandosi alle immunoglobuline E (IgE) per via orale o inalatoria possono provocare sintomi che vanno da *rash* cutanei di media intensità ad anafilassi sistemica. La soia è infatti indicata come uno degli otto maggiori allergeni alimentari dalla FAO (*Food and agriculture organization of the united nations*) insieme a latte, uova, pesce, crostacei, farina, arachidi e noci [Cordle, 2004].

1.2 Alimenti fermentati

La fermentazione, processo con cui si è ottenuta la matrice alimentare oggetto di studio, è una tecnologia che usufruisce della crescita e delle attività metaboliche dei microorganismi per la conservazione e la trasformazione degli alimenti. In primo luogo favorisce l'allungamento della *shelf life* o vita scaffale dei prodotti deperibili per mezzo dei metaboliti generati dai microrganismi fermentanti, come batteriocine e peptidi ad azione antimicrobica, in quanto inibiscono la crescita di microorganismi patogeni e deterioranti. Per *shelf life* si intende il periodo di tempo in cui un prodotto si mantiene salubre e sicuro, secondo le regole di qualità stabilite dall'azienda. In secondo luogo permette di creare nuovi profili organolettici e di migliorare il sapore degli alimenti oltre che i loro aromi, consistenze e profili nutrizionali. I processi di fermentazione tradizionali si suddividono in microbici, ad opera di batteri lattofermentanti, lieviti o muffe, e alcalini. Esempi di prodotti alimentari derivati dalla fermentazione lattica sono yoghurt, formaggi, crauti e salsicce; vino e birra invece sono due esempi di prodotti ottenuti dalla fermentazione ad opera di lieviti. In aggiunta, alimenti prodotti dalla fermentazione per azione di muffe sono la salsa di soia e il tempeh, mentre il natto risulta dalla fermentazione alcalina (vedi paragrafo 1.1.1). Si possono ottenere prodotti fermentati per via artigianale o per via industriale. A livello industriale è richiesto l'uso di bioreattori che possono essere di quattro differenti tipologie: a ciclo semicontinuo, a ciclo continuo, a cellule immobilizzate e a ciclo chiuso [Terefe, 2016]. L'ultima tipologia di bioreattori è quella specificatamente utilizzata dalla Centrale del Latte di Vicenza (CLV), azienda produttrice della matrice utilizzata in questo studio (figura 1.5).



Figura 1.5: Bioreattore a ciclo chiuso della CLV

1.2.1 Fermentazione con *Lactic acid bacteria* (LAB)

La tipologia di fermentazione da cui è derivata la soia fermentata della Centrale del Latte di Vicenza (CLV) impiegata in questo lavoro di tesi è quella microbica. Essa, in particolare, prevede l'uso di batteri lattofermentanti liofilizzati dei ceppi *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, coltivati non su base latte per evitare *cross contamination*. L'avvalersi di queste due specie è una scelta tecnologica: non solo danno i migliori risultati in termini di consistenza e sapore (dati aziendali non riportati) ma anche tra loro, essendo simbionti positivi, offrono fermentazioni estremamente rapide visto l'aumento del vigore fermentativo. Oltre a questo vantaggio si aggiunge anche la loro comune presenza negli alimenti, il loro lungo uso storico e il loro essere classificati come GRAS (*Generally recognized as safe*). Generalmente i batteri lattofermentanti o comunemente detti LAB (*Lactic acid bacteria*) sono definiti tali se il prodotto prevalente della fermentazione degli zuccheri è l'acido lattico. Se il prodotto della fermentazione è solamente quest'ultimo vengono indicati come omofermentanti, qualora invece i prodotti di reazione sono in prevalenza, oltre all'acido lattico, l'acido acetico, l'etanolo e l'CO₂ si definiscono eterofermentanti. Le caratteristiche fondamentali dei LAB sono le seguenti: si tratta di batteri Gram-positivi con cellule di forma sferica o bastoncellare, immobili e che non producono endospore; hanno generalmente auxotrofie multiple ed esigenze nutrizionali elevate; sono catalasi ed ossidasi negativi e non sono un gruppo tassonomicamente omogeneo [Liu *et al.*, 2011]. Il sistema proteolitico di questi batteri è ben conosciuto: presentano infatti una proteinasi legata a livello della parete cellulare, alcune peptidasi intracellulari e specifici sistemi di trasporto per amminoacidi, di- e tripeptidi e oligopeptidi fino a 18 amminoacidi. Sono proprio gli oligopeptidi non trasportati a livello intracellulare che, a seguito di lisi cellulare, vengono ridotti ulteriormente dalle proteasi liberate [Korhonen *et al.*, 2009; Terefe, 2016]. La proteolisi operata durante i processi fermentativi degli alimenti permette il rilascio dei peptidi bioattivi, spiegati in dettaglio nel paragrafo 1.4. La liberazione di questi ultimi è agevolata anche dagli enzimi digestivi presenti nel tratto gastrointestinale dell'uomo.

1.3 La digestione gastrointestinale come fonte di peptidi bioattivi

La digestione è un processo fisiologico che coinvolge meccanismi chimici, fisici e meccanici al fine di ridurre molecole complesse, tra cui le proteine, in molecole più semplici e renderle più facilmente assorbibili dall'organismo. Il processo digestivo è realizzato dall'apparato digerente che si estende dalla bocca all'ano e che può essere suddiviso in due tratti: quello superiore e quello inferiore come si vede in figura 1.6.

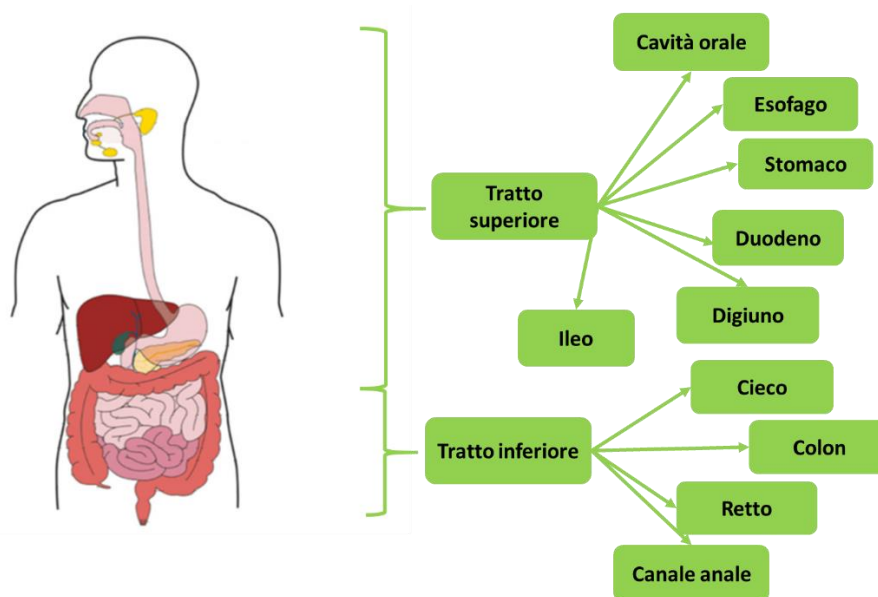


Figura 1.6: Schema rappresentante l'apparato digerente. Sono rappresentati i due tratti, quello superiore e quello inferiore con i rispettivi organi (immagine modificata da Verhooeckx et al., 2015).

Ogni parte dell'apparato digerente ha la sua specifica funzione e coinvolgimento durante il processamento del cibo. A favorire però la liberazione dei peptidi bioattivi giocano un ruolo essenziale gli enzimi proteolitici. Tra di essi spiccano in primo luogo la tripsina, che taglia i legami peptidici dell'estremità C-terminale in presenza di arginina e lisina, e la pepsina che taglia il legame peptidico dopo fenilalanina e leucina. La pancreaticina invece è una combinazione di enzimi che comprende, oltre a lipasi ed amilasi, proteasi che rompono in modo preferenziale legami peptidici nella regione N-terminale fosforilata e nelle regioni idrofobiche C-terminali [Lorenzo et al., 2018; Korhonen et al., 2009; Verhooeckx et al., 2015].

1.3.1 Modelli per la simulazione della digestione gastrointestinale

Il processo di digestione gastrointestinale può essere simulato in vari modi. Ad oggi il *gold standard* di tale metodologia è la digestione *in vivo*, ma per non incorrere a problematiche di natura etica sono stati messi a punto protocolli *in vitro*. Questi ultimi presentano numerosi vantaggi metodologici tra cui la semplicità, la riproducibilità, la facile reperibilità dei materiali e la standardizzazione delle procedure [Capriotti *et al.*, 2015].

I modelli *in vitro* possono essere dinamici o statici. I primi sono i meno utilizzati e prevedono la simulazione degli aspetti dinamici della digestione come il trasporto del pasto digerito, la variazione delle concentrazioni enzimatiche e i cambiamenti di pH nel tempo. I secondi invece prendono in considerazione i rapporti tra il quantitativo di alimento da digerire e la concentrazione di sali ed enzimi opportuni da aggiungere. Oltre a ciò per ogni fase vengono prefissati determinati tempi di digestione e pH dei fluidi simulati. Questo modello viene impiegato per rispondere a differenti quesiti scientifici che possono riguardare la capacità di digeribilità e di bioaccessibilità di differenti composti, tra cui prodotti farmaceutici, micotossine e macronutrienti. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un modello statico per simulare la digestione gastrointestinale come descritto successivamente nel paragrafo 3.3. In particolare sono stati utilizzati enzimi in grado di digerire le proteine come pepsina e pancreatina [Minekus *et al.*, 2014; Karami *et al.*, 2019]. Uno degli obiettivi di questa tecnica è l'ottenimento di peptidi a partire dalle proteine native contenute inizialmente nel campione.

1.4 Peptidi bioattivi

I processi di digestione enzimatica e fermentazione microbica permettono di ottenere piccoli frammenti proteici, detti peptidi, a partire dalla proteina nativa, grazie all'azione di proteasi. Oltre a queste due modalità anche tecnologie per la produzione degli alimenti possono favorirne il rilascio: sono esempi la frollatura della carne, la maturazione della frutta e la stagionatura durante il processamento del formaggio (vedi figura 1.7). Per peptidi bioattivi si intende brevi frammenti amminoacidici che esplicano diverse attività biologiche e che presentano dai 3 ai 20 amminoacidi o generalmente masse inferiori di 6000 Da. Tali peptidi, rilasciati a seguito dell'azione proteolitica degli enzimi digestivi, possono agire localmente o attraversare la barriera gastrointestinale e giungere nel

circolo sanguigno. Successivamente possono essere trasportati verso diversi organi bersaglio esplicando le loro azioni regolatorie [Lorenzo *et al.*, 2018]. Per studiare i peptidi bioattivi è importante sia isolarli, attraverso frazionamenti sequenziali e step di purificazione mediante tecnologie quali cromatografia liquida e ultrafiltrazione, sia identificarli a tutti i livelli strutturali. In questo modo è possibile correlare la funzione biologica alle loro caratteristiche intrinseche come peso molecolare e sequenza amminoacidica. L'identificazione prevede sia studi bioinformatici sia studi riguardanti la loro bioattività che possono essere svolti successivamente alla loro sintesi. Essa può avvenire per via chimica, enzimatica o tramite tecnologia del DNA ricombinante [Lorenzo *et al.*, 2018; Korhonen *et al.*, 2009]. Sottoforma di idrolisati i peptidi bioattivi possono essere utilizzati in prodotti sia dell'industria farmaceutica sia di quella alimentare. Prima però della possibilità concreta del loro utilizzo in quest'ultimo campo, deve esserne testata sia l'adeguatezza clinica sia la bioefficacia valutandone la persistenza e le modalità con cui, essendo più reattivi delle proteine native, si combinano con componenti quali carboidrati o lipidi sia dello stesso sia di altri alimenti. Gli alimenti che contengono peptidi bioattivi come ingredienti prendono il nome di alimenti funzionali, cioè alimenti che provvedono all'aumento dei benefici per la salute oltre a quelli offerti dal contenuto in termini nutrizionali naturalmente presenti nell'alimento. Questi prodotti però non devono avere alterate le proprietà sensoriali [Li-Chan *et al.*, 2015; Jooyandeh, 2011; Karami *et al.*, 2019, Sánchez *et al.*, 2017]. I peptidi bioattivi possono esplicare varie attività tra cui spiccano quella oppioide, antimicrobica, antipertensiva e antiossidante.

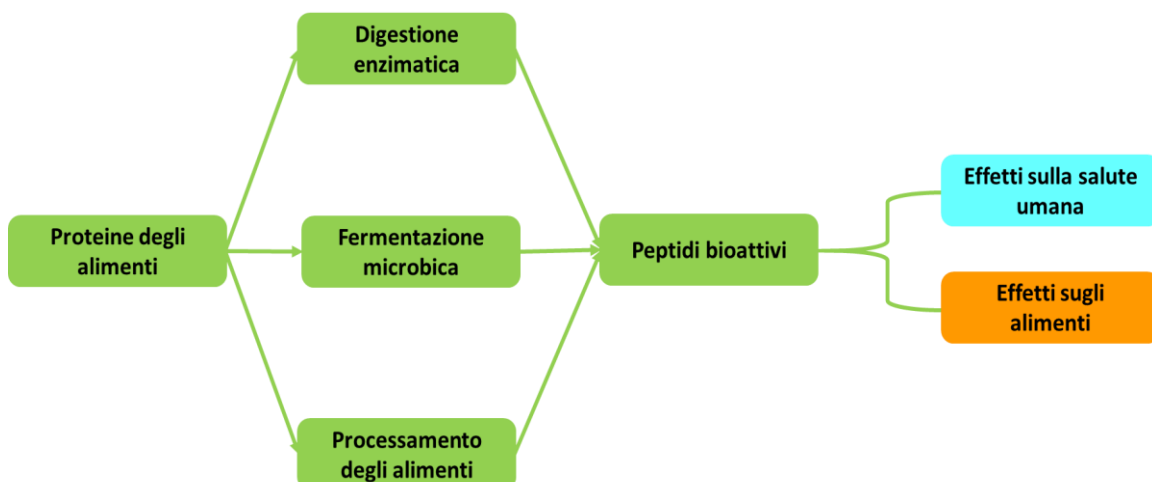


Figura 1.7: Schema dei processi di formazione dei peptidi bioattivi e macroaree di azione di questi ultimi.

1.4.1 Attività antipertensiva

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone è un meccanismo ormonale che regola la pressione sanguigna periferica. In esso svolge un compito fondamentale l'enzima ACE (*Angiotensin I-converting enzyme*), la cui inibizione porta ad un effetto anti-ipertensivo. In questo contesto peptidi bioattivi liberati a seguito dell'azione degli enzimi digestivi giocano un ruolo importante poiché presentano proprio tale azione [Korhonen *et al.*, 2009].

1.4.2 Attività antimicrobica

I peptidi ad attività antimicrobica hanno come bersaglio microorganismi come batteri e funghi. Un esempio di peptidi ad attività antimicrobica isolati da idrolisati da latte bovino sono le lattoferricine, derivate dalla lattoferrina umana e bovina. Essi, distruggendo la normale permeabilità di membrana, sono ottimi per agire contro batteri Gram-positivi e Gram-negativi oltre che lieviti e funghi filamentosi. Un ulteriore esempio sono le ovotrasferrine identificate da gallina che mostrano attività antimicrobica contro ceppi di *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia Coli* [Korhonen *et al.*, 2009]. Nei prodotti tradizionali della soia fermentati con ceppi di *Bacillus spp.*, come il natto, sono presenti peptidi bioattivi ad attività antimicrobica efficaci contro patogeni come *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Botrytis cinerea* [Sanjukta *et al.*, 2016].

1.4.3 Attività oppioide

I peptidi ad attività oppioide sono ligandi dei recettori per gli oppioidi e presentano attività agonistica o antagonistica che si esplica a livello del sistema nervoso. Condizionano oltre a tale sistema anche quello gastrointestinale attraverso due differenti modalità: in primo luogo riducendo il tempo di transito agendo direttamente sulla muscolatura liscia e in secondo luogo influenzando il trasporto intestinale degli elettroliti. Un esempio di peptide con attività oppioide è la β -casomorfina, peptide della β -caseina che è una proteina del latte [Korhonen *et al.*, 2009].

1.4.4 Attività antiossidante e specifiche applicazioni

L'attività dei peptidi bioattivi che ha interessato maggiormente questo lavoro è quella antiossidante, che consiste nella neutralizzazione delle specie radicaliche dannose che si

formano nella cellula. I peptidi con questa proprietà sono in genere ricchi di aminoacidi come prolina, istidina, triptofano e tirosina e possono assumere un duplice effetto benefico: possono sia esser utilizzati come potenziali agenti terapeutici sia come ingredienti antiossidanti per le produzioni alimentari. L'attività antiossidante la possiedono per esempio alcuni peptidi rilasciati a partire dalla caseina aventi non solo la capacità di inibire la perossidazione lipidica enzimatica e non enzimatica, ma anche aventi attività di *scavenging* contro i radicali liberi. I peptidi bioattivi con attività antiossidante possono essere importanti nel loro uso potenziale in produzioni alimentari e farmaceutiche se sottoposti preventivamente a *trial* tossicologici *in vivo* [Korhonen *et al.*, 2009; Lorenzo *et al.*, 2018; Mohanty *et al.*, 2016; Sarmadi *et al.*, 2010].

1.5 Stress ossidativo e antiossidanti

Lo stress ossidativo si verifica quando vi è la rottura del bilancio tra formazione ed eliminazione di specie reattive. Tali specie possono generarsi come sottoprodotti di reazioni endogene quali la respirazione o a seguito di esposizione ad agenti chimici e fisici. Dall'accumulo di specie reattive e dalla loro interazione con molecole essenziali derivano: danni a livello tissutale, alterazione di vie metaboliche ed espressione genica, aumento di rischio e/o facilitazione dell'evoluzione di malattie quali cancro, diabete, aterosclerosi e disordini neurologici [Lorenzo *et al.*, 2018; Bindoli *et al.*, 2013].

1.5.1 Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Le specie reattive dell'ossigeno o ROS (*Reactive oxygen species*) sono coinvolte nel *signaling* cellulare, processo in cui variazioni fisiologiche nella concentrazione di tali specie chimiche porta alla modifica di proteine target in modo reversibile così da permettere l'invio di un messaggio. Questo è dovuto al fatto che l'esistenza di un ambiente aerobico fa sì che gran parte dei *pathway* biochimici portino alla produzione di ROS e che durante l'evoluzione gli organismi li abbiano sfruttati in tal senso [Bindoli *et al.*, 2013]. Tra i vari processi fisiologici in cui le specie radicaliche sono coinvolte, troviamo la regolazione del *signaling* dei fattori di crescita, la risposta osmotica, l'infiammazione e la risposta immunitaria nelle cellule di mammifero. Tali specie reattive però se presenti in eccesso, quindi non a livelli fisiologici, vanno a reagire con alcune molecole vitali quali proteine, lipidi e DNA, alterando l'omeostasi cellulare. In questo caso si parla di "stress ossidativo"

(figura 1.8) [Sies *et al.*, 2017]. La gran parte dei ROS prodotte dalle cellule sono l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 , il radicale idrossile (HO^{\cdot}) e l'ossigeno singoletto (1O_2). Si formano come conseguenza delle specie primarie descritte precedentemente anche molti altri radicali. La loro produzione risulta essere conseguenza di diversi processi e coinvolge differenti compartimenti cellulari come le membrane, il citoplasma, i mitocondri, il reticolo endoplasmatico (ER), i lisosomi e i perossisomi. Un importante complesso enzimatico coinvolto in tali processi di produzione è la NADPH ossidasi, localizzata a livello della membrana delle cellule fagocitiche, utile alla protezione della cellula dallo stress ossidativo [Görlach *et al.*, 2015].

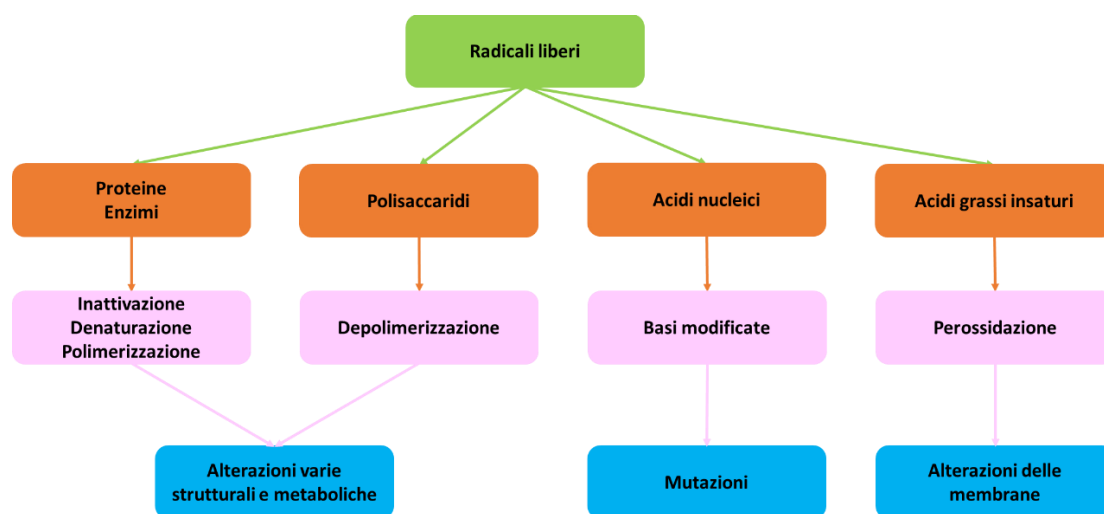


Figura 1.8: Schema riassuntivo dei principali danni causati a livello molecolare dai radicali liberi.

1.5.1.1 Ossidazione proteica

Uno dei maggiori bersagli delle molecole radicaliche sono le proteine, componente macromolecolare molto presente a livello cellulare e avente pertanto elevata probabilità di incontro e di reazione con un radicale libero. L'alta costante di specificità di reazione tra proteine e radicali liberi rende le proteine un ottimo substrato di reazione. La reazione tra proteine e radicali liberi può portare alla sottrazione di un atomo di idrogeno, all'ossidazione o alla riduzione di residui amminoacidici, all'addizione di molecole radicaliche, alla frammentazione di differenti parti della molecola, al riarrangiamento strutturale e alla formazione di *cross-link* con altre proteine che hanno subito un attacco da parte di radicali liberi. All'attacco dei radicali liberi sono maggiormente suscettibili amminoacidi ricchi di gruppi tiolici come la cisteina o la metionina, vista l'elevata

elettrofilicità. Ciò che ne consegue solitamente è la formazione di addotti capaci di interagire con altre molecole [Davies, 2016].

1.5.1.2 Perossidazione lipidica

Durante una condizione di stress ossidativo, la perossidazione lipidica è una delle principali conseguenze. Essa procede con il verificarsi di un meccanismo a cascata che coinvolge lipidi polinsaturi e ossigeno molecolare. La reazione è suddivisa in tre differenti fasi: l'induzione, la propagazione e la terminazione. Durante la prima fase si ha la formazione di un radicale lipidico ($L\cdot$) a seguito della reazione tra un radicale libero ($R\cdot$) e un acido grasso polinsaturo (LH). Il radicale lipidico ($L\cdot$) può reagire con una molecola di ossigeno formando un radicale perossilipidico ($LOO\cdot$) o con altri acidi grassi polinsaturi producendo altre molecole radicaliche e idroperossidi. Si ottengono così differenti prodotti di reazione a partire dalla degradazione di questi ultimi fra cui idrocarburi, esteri, aldeidi, chetoni, alcoli, acidi ed epossidi. Fra questi prodotti secondari una frazione importante è rappresentata dalla malondialdeide (MDA) la cui presenza è indice di avvenuta perossidazione lipidica. La catena di reazione può essere infine bloccata da una serie di reazioni di terminazione in cui tutti i radicali, in seguito alla loro collisione tra loro, si trasformano in specie neutre stabili. In alternativa le reazioni si possono arrestare grazie alla presenza di molecole antiossidanti capaci di donare un atomo di idrogeno al radicale, con la conseguente formazione di un radicale stabile (figura 1.9) [Bindoli *et al.*, 1980].

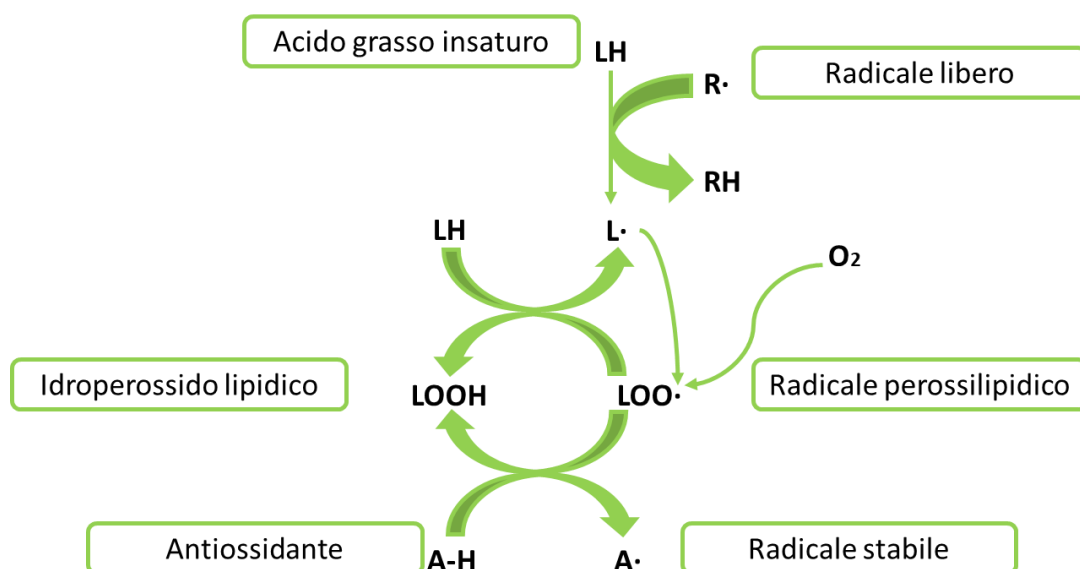


Figura 1.9: Schema delle reazioni che avvengono durante la perossidazione lipidica e effetto di un antiossidante.

1.5.2 Antiossidanti

Gli antiossidanti, che possono essere enzimatici o non enzimatici, sono dei complessi utili alla protezione dal danno ossidativo, in quanto promuovono l'eliminazione di ROS. Il loro principale meccanismo d'azione consta nel trasferire idrogenioni o nel donare elettroni in modo da dismutare, detossificare oppure ridurre o impedire la produzione di ROS. Questi complessi vengono prodotti direttamente dall'organismo oppure possono essere assunti con la dieta [Lorenzo *et al.*, 2018].

1.5.2.1 Antiossidanti primari

Tra i sistemi enzimatici riducenti ad azione antiossidante prodotti dall'organismo ricordiamo in particolar modo: catalasi (CAT), glutazione (GPH), glutazione perossidasi (GPx), glutazione S-transferasi (GST) e superossido dismutasi (SOD) [Halliwell *et al.*, 2015]. Un esempio di detossificazione da ROS è rappresentato dall'azione consequenziale di SOD, GPx e CAT. La SOD ha il compito di eliminare il radicale superossido ($O_2^{\cdot-}$) convertendolo in perossido di idrogeno (H_2O_2) che a sua volta può essere detossificato seguendo due differenti vie: essere convertito in acqua e glutazione ossidato ad opera della GPx o essere convertito in acqua e ossigeno molecolare ad opera della CAT. Se presenti però metalli di transizione anziché essere detossificato, il perossido di idrogeno (H_2O_2) può provocare un aumento della condizione di stress ossidativo in quanto tramite la reazione di Fenton vengono a formarsi due molecole di radicale idrossile (HO^{\cdot}) [Boelsterli, 2009; Halliwell *et al.*, 2015].

1.5.2.2 Antiossidanti secondari

Molte molecole antiossidanti esogene introdotte con la dieta sono utili al potenziamento dei meccanismi endogeni di protezione dallo stress ossidativo, in quanto svolgono un ruolo di cofattori nelle reazioni catalizzate da enzimi antiossidanti o fanno parte della loro struttura molecolare. Il mondo vegetale fornisce molte di queste molecole facenti parte di svariate classi chimiche e prendono il nome di fitochimici. Tali sostanze hanno caratteristiche ben specifiche: sono peculiari del regno vegetale, sono sostanze organiche generalmente a basso peso molecolare, non sono sintetizzate dall'uomo e hanno azione protettiva sulla salute umana se assunte a livelli significativi. I polifenoli per esempio sono composti ubiquitari e fondamentali nella fisiologia della pianta, prodotti da quest'ultima

poiché utili alla resistenza a stress biotici e abiotici oltre che al mantenimento di pigmentazione e caratteristiche organolettiche. La loro struttura chimica, un anello di derivazione benzenica con uno o più gruppi idrossilici associati a questo, permette loro di fungere da *scavenger* per la stabilizzazione dei radicali liberi e degli agenti riducenti e da *quencher* della formazione dell'ossigeno singoletto. Flavonoidi, stilbeni, acidi fenolici e lignani sono le principali classi di polifenoli suddivise in base al numero di anelli fenolici e degli elementi strutturali che legano tali anelli. Dei flavonoidi, difenilpropani distinti a loro volta in classi in funzione del grado di ossidazione dell'anello eterociclico, fa parte la classe degli isoflavoni contenuti in modo elevato all'interno della soia (vedi paragrafo 1.1.3.1) [Carratù *et al.*, 2005]. Un altro esempio anch'esso di una molecola molto presente nella soia è la vitamina E (figura 1.10), in generale i tocoferoli, derivati del tocolo e del tocotrienolo. Questi composti fitochimici agiscono da *scavenger* dei radicali perossilici in quanto fungono da donatori di un atomo di idrogeno; in questo modo agiscono da difesa nei confronti della perossidazione lipidica nelle cellule [Cabras *et al.*, 2004; Halliwell *et al.*, 2015].

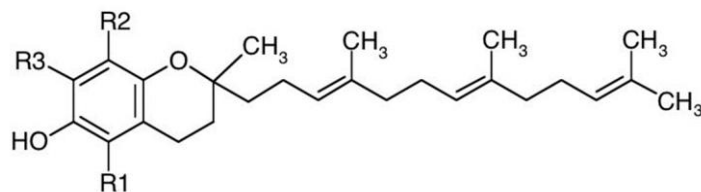


Figura 1.10: Struttura chimica della vitamina E

1.5.2.3 Antiossidanti coinvolti nel *signaling* cellulare

Oltre agli antiossidanti enzimatici e non, gli antiossidanti possono essere anche coinvolti nel *signaling* cellulare. Infatti, a seguito della loro entrata nella cellula, possono avviare la trascrizione di geni che codificano per proteine, coinvolte direttamente o indirettamente, nella difesa contro lo stress ossidativo. Un esempio di *pathway* molecolare attivato in questo modo è la via di segnale costituita dal sistema *NF-E2-related factor 2* (Nrf2) - *Kelch-like ECH associated protein 1* (Keap1) - *Antioxidant response elements* (ARE). In normali condizioni cellulari Nrf-2 e Keap1 si trovano nel citosol e interagiscono tra di loro tramite il dominio *Neh2* di Nrf-2 e il *Kelch domain* di Keap1. A seguito di tale interazione Nrf2 viene stabilizzato, ubiquitinato e, circa ogni 30 minuti, portato al proteasoma per essere degradato. Quando la cellula è in condizioni di stress ossidativo oppure in presenza di

composti elettrofilici o di specifici peptidi, cambiamenti conformazionali fanno sì che Nrf2, non in grado di legarsi con Keap1, migri al nucleo e dimerizzi con una proteina del gruppo Maf (un fattore di trascrizione). Tale complesso, capace di legarsi con gli elementi di risposta agli antiossidanti (ARE), attiva la trascrizione di geni codificanti per enzimi utili alla difesa contro lo stress ossidativo quali la tioredossina reduttasi, la glutatione reduttasi (GR), la SOD e la catalasi come mostrato in figura 1.11 [Bellezza *et al.*, 2018; Tonolo *et al.*, 2019 a].

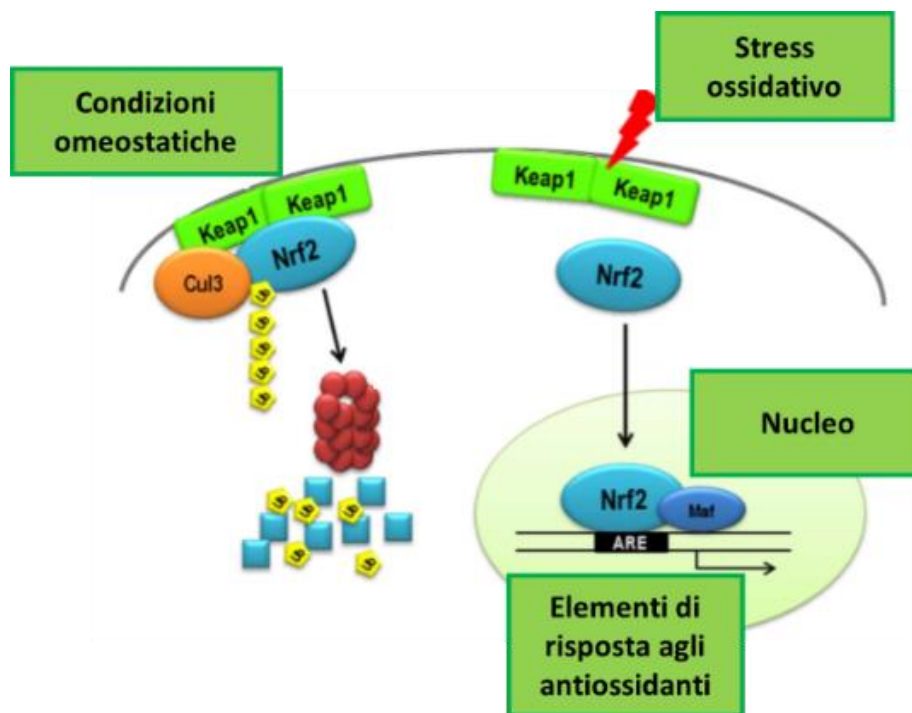


Figura 1.11: Schema del meccanismo molecolare della via di segnale Nrf2-Keap1-ARE (immagine modificata da Bellezza *et al.*, 2018)

2 Scopo della tesi

Negli ultimi anni in Occidente è aumentato l'interesse verso la soia e gli alimenti derivati da essa sia dal punto di vista della ricerca sia da quello della produzione industriale. Questo poiché tale leguminosa ricca di proteine e fitochimici si ritrova oggi, sotto diverse forme, sulla tavola di molti consumatori. Può difatti essere presente come sostitutivo di alimenti provenienti da matrice animale in soggetti allergici o intolleranti al lattosio o che seguono una dieta vegetariana o vegana, oppure semplicemente come alimento d'origine esotica. Viste le numerose proprietà benefiche della soia è risultato d'interesse pertanto indagare la possibile presenza in essa di peptidi bioattivi, cioè brevi frammenti proteici aventi attività biologica. In particolar modo sono stati ricercati i peptidi bioattivi con attività antiossidante, cioè quelli in grado di ritardare o prevenire l'ossidazione di un substrato ossidabile. Ci si è focalizzati su questi poiché presentano dal punto di vista alimentare un duplice effetto benefico: non solo riescono a preservare la *shelf life* degli alimenti ritardandone l'ossidazione, ma anche agiscono contro le malattie cronico-degenerative indotte da età e stress ossidativo. Il secondo focus è risultato essere l'utilizzo di una matrice fermentata il cui processo fermentativo è utile alla liberazione di tali peptidi a partire dalle proteine native. La soia fermentata adoperata, è stata fornita dalla Centrale del latte di Vicenza (CLV), partner di molte collaborazioni scientifiche tra cui progetti di ricerca nell'ambito del Fondo Sociale Europeo (FSE).

Lo studio è stato suddiviso in tre parti. La prima parte di questo lavoro ha interessato l'analisi del potere antiossidante della soia fermentata messo a confronto con quello della base di soia non fermentata. Di tale matrice si è inoltre determinata la proteolisi nel tempo e a diverse temperature. La seconda parte ha riguardato l'ottenimento della soia fermentata digerita attraverso la digestione gastrointestinale *in vitro*, utile, esattamente come il processo fermentativo, ad un'ulteriore frammentazione delle proteine native. Tale processo ha visto il susseguirsi di tre fasi, quella orale, gastrica e intestinale con l'impiego consequenziale di enzimi digestivi, attivi a diversi pH. Successivamente dalla matrice digerita si sono ottenute delle frazioni proteiche attraverso tecniche cromatografiche. La terza parte del lavoro ha riguardato lo studio delle frazioni proteiche. Di queste è stato testato in primo luogo il potere antiossidante *in vitro* con metodologie

biochimiche classiche quali il saggio dell'ABTS e il saggio del DPPH. In secondo luogo è stata testata l'effetto della loro somministrazione, singolarmente e in presenza di un induttore di stress ossidativo, attraverso un modello cellulare, la linea Caco-2. Infine si è analizzato l'assorbimento di tali frazioni proteiche avvalendosi di particolari piastre chiamate *Transwell*[®] sulle quali le cellule della linea cellulare sopracitata sono capaci di differenziare simulando la barriera gastrointestinale.

Oltre allo studio del potere antiossidante di tali peptidi si è anche approfondita la loro eventuale citotossicità, il loro potere protettivo sulle cellule e la loro capacità di essere assorbiti. A seguito quindi della loro identificazione in un prossimo futuro tali peptidi potrebbero essere impiegati per la produzione di alimenti funzionali.

3 Materiali e metodi

3.1 Il campione: la soia fermentata

La matrice alimentare utilizzata durante la parte sperimentale di questo elaborato di tesi è stata il dessert vegetale di soia fermentata (figura 3.1). Tale matrice è stata gentilmente fornita dalla Centrale del Latte di Vicenza (CLV), azienda partner di numerose collaborazioni scientifiche nell'ambito dei seguenti progetti del Fondo Sociale Europeo (FSE): “La *shelf life* dello yogurt in rapporto alla presenza di antiossidanti naturali e addizionali: dal prodotto naturale al prodotto funzionale” (2013); “Ruolo dei peptidi bioattivi del latte e del latte fermentato nell'alimentazione umana” (2015); “Dal latte di raccolta al latte fermentato come fonte di peptidi bioattivi: ricadute ed effetti sulla nutrizione umana” (2016). In particolar modo questo lavoro si inserisce all'interno del progetto FSE del 2018 intitolato: “La ricerca di base a supporto dell'azienda: realizzazione di un *functional food* e di nuovi nutraceutici per il benessere del consumatore”.



Figura 3.1: Dessert vegetale a base di soia fermentata addizionata presente in commercio, venduto e prodotto dalla Centrale del Latte di Vicenza (CLV).

La soia fermentata utilizzata in questo lavoro è ottenuta tramite la fermentazione da parte di specifici batteri lattofermentanti quali *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Il prodotto finito si presenta con un aspetto bianco-giallastro e dalla consistenza cremosa. Nella figura 3.2 vengono schematizzate le principali tappe relative alla preparazione del campione.

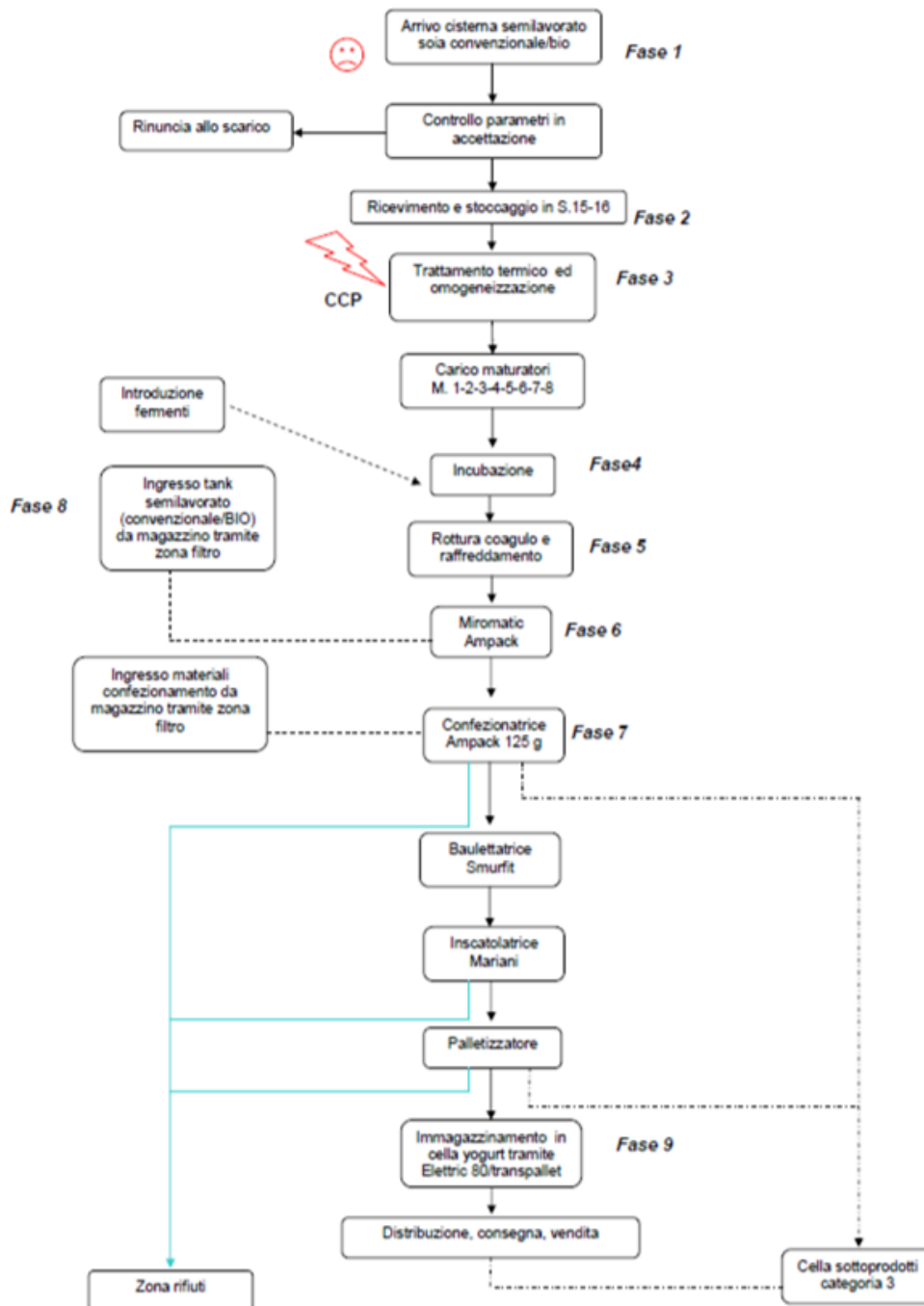


Figura 3.2: Diagramma di flusso fornito dall'azienda Centrale del Latte di Vicenza (CLV) relativo al ricevimento, alla preparazione e al confezionamento della soia fermentata.

La base di soia non fermentata viene consegnata alla Centrale del Latte di Vicenza (CLV) da parte di fornitori (*Bio SLYMTM*, Italia). Questo semilavorato è composto da acqua, semi di soia e zucchero (3%). Dopo un passaggio di preriscaldamento attraverso uno scambiatore di calore a 80°C e di sterilizzazione, il prodotto viene raffreddato a temperatura di inoculo, omogenizzato e caricato nei maturatori. A questo punto vengono aggiunti i batteri lattofermentanti liofilizzati dei ceppi *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus e *Streptococcus thermophilus*. Dopo 24 ore avviene la rottura del coagulo e in seguito al raffreddamento avviene il processo di confezionamento (figura 3.3). La soia fermentata prodotta attraverso le fasi summenzionate mostra una *shelf life* di 50 giorni. Con questo termine, detto anche vita a scaffale, si intende il tempo che intercorre tra la data di produzione e quella di scadenza in cui il prodotto mantiene stabili le proprie caratteristiche chimiche e microbiologiche.



Figura 3.3: Fase del processo di produzione del dessert vegetale a base di soia fermentata.

Per le sperimentazioni si sono utilizzati campioni di soia fermentata di base senza addizioni di vitamine (B2, B12 e D) e calcio, a differenza del prodotto commerciale. Le addizioni, soluzioni adoperate da molte aziende produttrici di prodotti fermentati anche di origine animale, hanno lo scopo di migliorare qualitativamente il prodotto sia a livello nutrizionale (come in questo caso tramite l'aggiunta di calcio, presente a prodotto finito) sia a livello commerciale (esempio è l'uso di addensanti per mitigare la consistenza vischiosa del prodotto, spesse volte non amata dal consumatore). Si è scelto perciò di analizzare il prodotto, senza addizioni, per avere una maggior validità dello studio che prescinde dalle ricette aziendali.

Durante il corso della sperimentazione i campioni sono stati mantenuti a una temperatura costante di 4°C, correttamente sigillati.

Nella tabella 3.1 è riportato il contenuto in termini di proteine, carboidrati e grassi totali in 100 g della base del dessert vegetale di soia fermentata oggetto dello studio [Tonolo *et al.*, 2019 c] analizzato da un laboratorio partner esterno (*ChelabTM*, Italia). I valori specifici

di ogni parametro sono indicati nell'appendice A (tabella A.1), assieme al contenuto di componenti fenolici e tocoferoli presenti nella soia fermentata e nella base di soia non fermentata (tabella A.2).

Parametro	Valore medio (g / 100 g di prodotto)
Proteine totali	4.47 ± 0.28
Carboidrati totali	3.35 ± 0.61
Grassi totali	2.79 ± 0.17

Tabella 3.1: Contenuto in termini di proteine, carboidrati e grassi totali in 100 g della base del dessert vegetale di soia fermentata oggetto dello studio (vedi Appendice A).

3.2 Analisi della soia fermentata

Si è iniziato questo lavoro di tesi studiando la matrice alimentare di soia fermentata in modo da comprendere se fosse un buon punto di partenza per l'ottenimento di peptidi bioattivi con attività protettiva contro lo stress ossidativo. A questo scopo non solo si è analizzata l'attività antiossidante di tale matrice ma anche la si è posta a confronto con il prodotto base di soia non fermentata in modo da capire se il processo produttivo della fermentazione ne implementasse il potere antiossidante. Inoltre è stata valutata la capacità di rilascio di frammenti peptidici, potenziali peptidi bioattivi.

3.2.1 Determinazione della perossidazione lipidica mediante formazione di MDA

Il saggio svolto per la determinazione del potere antiossidante della soia fermentata è relativo alla quantificazione della malondialdeide (MDA), uno dei prodotti della perossidazione lipidica utilizzato come marker di reazione. Tale saggio si è eseguito seguendo il protocollo descritto da Citta *et al.* (2017) operando opportune modifiche sia nella soia fermentata sia nella base di soia non fermentata. Esso sfrutta la produzione di un addotto rosa, risultato della reazione tra l'acido tiobarbiturico (TBA) e la MDA, visualizzabile in fluorescenza.

Si sono inizialmente preparati i campioni secondo la tabella 3.2., stimolandoli chimicamente avvalendosi di 0.005 mL di cumene idroperossido (CHP) 0.5 M e 0.005 mL di emina 1 mM.

	Blank (mL)	Campione (mL)
Campione	/	0.100
H₂O	0.210	0.100
CHP 0.5 M	/	0.005
Emina 1 mM	/	0.005

Tabella 3.2: Saggio per la determinazione della MDA.

I campioni sono stati posti in agitazione per 30 minuti a 250 giri/min a temperatura ambiente e gli si sono aggiunti 3.9 mL di acido solforico (H₂SO₄) 0.1 N e 0.5 mL di acido fosfotungstico (PTA) al 10%. Dopo essere stati mescolati con il vortex, lasciati 10 minuti a temperatura ambiente, centrifugati a 4000 g per 10 minuti ai campioni è stato rimosso il surnatante e smosso il pellet. Quest'ultimo si è risospeso con 2 mL di acido solforico (H₂SO₄) 0.1 N e 0.3 mL di acido fosfotungstico (PTA) al 10%. I campioni sono stati agitati nuovamente con il vortex, lasciati 5 minuti a temperatura ambiente e centrifugati come descritto precedentemente. Al termine della centrifuga si sono rimossi i surnatanti per caduta e si sono asciugati i pellet con carta assorbente per poi aggiungere ai diversi campioni i seguenti composti (tabella 3.3):

Composto	Volume (mL)
NONIDET al 5%	0.20
BHT all'1% di EtOH	0.04
H₂O	2.80
TBA allo 0.67%	1.00

Tabella 3.3: Composti e relativi volumi da aggiungere durante l'esecuzione del saggio MDA.

Si sono posti i campioni per 1 ora a 95°C in modo da favorire la reazione colorimetrica tra il TBA e la MDA. A questo dopo un raffreddamento in ghiaccio per 10 minuti si è proseguito con un'ulteriore centrifuga a 4000 g per 10 minuti. Al surnatante sono stati addizionati 3 mL di n-butanolo saturo con acqua. Infine si sono centrifugati i campioni per 15 minuti a 4000 g in modo da separare le due fasi costituite da campione e da n-butanolo. Si è prelevata la fase superiore e la si è analizzata con il TECAN Infinite M200 PRO in fluorescenza (eccitazione a 530 nm ed emissione a 540 nm) [Citta *et al.*, 2017]. Per l'elaborazione dei risultati si è costruita una retta di taratura (figura 3.4) con standard di MDA 0.1 mM secondo la seguente tabella (tabella 3.4).

	Blank	St0	St1 (mL)	St2 (mL)	St3 (mL)	St4 (mL)	St5 (mL)
MDA 0.1 mM	/	/	0.0025	0.0050	0.0100	0.0250	0.0500

Tabella 3.4: Retta standard con MDA 0.1 mM.

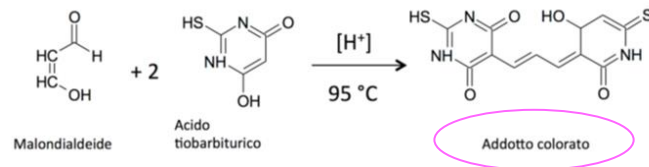
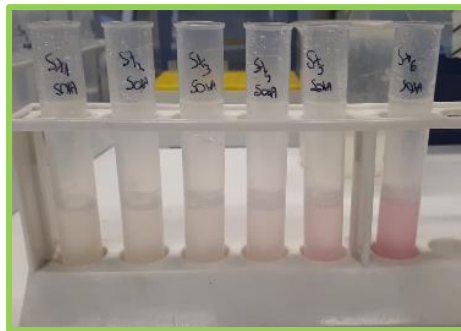


Figura 3.4: Standard per il saggio di MDA. All'aumentare della concentrazione di standard di MDA 0.1 mM si nota un aumento nella colorazione rosa, visibile in fluorescenza. A lato è visibile la reazione tra la malondialdeide e l'acido tiobarbiturico.

3.2.2 Frammentazione proteica con test dell'ortoftalaldeide (OPA)

Il test dell'ortoftalaldeide (OPA) consente lo studio della proteolisi delle proteine presenti in un campione tramite la determinazione dei frammenti peptidici. L'OPA infatti è in grado di legare i gruppi amminici proteici dando vita ad un addotto rilevabile a 340 nm.

Si è preparato il reattivo di OPA, di color giallo tenue, con sodio tetraborato 0.1 M, sodio dodecilsolfato (SDS) allo 0.1%, ortoftalaldeide (OPA) 5.76 mM sciolta in etanolo e ditiotreitolo (DTT) 5.7 mM. Tale soluzione è poi stata posta al buio per 1 ora in agitazione. Per il saggio si sono analizzati i campioni soia fermentata e base di soia non fermentata a vari intervalli di tempo e a tre diverse temperature: 4°C, temperatura ambiente e 37°C. Ad 1 mL di campione si sono aggiunti 2 mL di acido tricloroacetico (TCA) all'1% e 1 mL di acqua. Dopo essere stati mescolati i campioni sono stati filtrati con filtri di carta *Whatman*[®] Chr 1 (*Sigma-Aldrich*TM, USA). A questo punto a 0.150 mL di filtrato si sono aggiunti 3 mL di reattivo di OPA. Infine si è eseguita la lettura spettrofotometrica a 340 nm dopo un'attesa di 2 minuti a temperatura ambiente [Tonolo *et al.*, 2019 c].

3.3 Simulazione della digestione gastrointestinale

Il rilascio a partire dalla proteina nativa dei peptidi bioattivi può avvenire grazie all'azione proteolitica di differenti enzimi tra cui quelli usati in modo consequenziale durante la simulazione della digestione gastrointestinale *in vitro*. Durante queste fasi vengono mimate le condizioni d'organo ricorrendo a buffer salini specifici, ad acidi e basi per

variare il pH e a preparati enzimatici, tenendo conto opportunamente della loro concentrazione, del loro pH di attivazione e dei loro tempi di azione. In generale vengono utilizzati enzimi gastrici proteolitici per la fase gastrica, attivi in ambiente acido, e per la fase intestinale un pool di enzimi pancreatici con attività proteolitica (di nostro particolare interesse la tripsina, utile al rilascio di piccoli peptidi e non singoli amminoacidi), amilolitica e lipolitica [Brodkorb *et al.*, 2019; Nehir El *et al.*, 2015; Minekus *et al.*, 2014].

Per tale motivazione si è proseguito con l'ottenimento della soia fermentata digerita tramite tale tecnica. In primo luogo si è mescolato 20 volte il campione di soia fermentata per inversione in modo da renderlo il più omogeneo possibile. La simulazione della digestione gastrointestinale *in vitro* è stata suddivisa in tre diversi step che includono tipicamente le fasi orale, gastrica e intestinale (figura 3.5). Al fine di riprodurre i movimenti peristaltici e la temperatura più idonea nel corso della metodologia il campione si è mantenuto in agitazione ad una temperatura di 37°C pari alla temperatura corporea. In questo caso, trattandosi di un alimento liquido, si è omessa, durante la fase orale, la simulazione della masticazione. In altri studi viene utilizzata l'amilasi salivare, ma in questo lavoro non è stata presa in considerazione in quanto il target dell'idrolisi di tale enzima sono i carboidrati che eludono dallo scopo di questa ricerca [Minekus *et al.*, 2014].

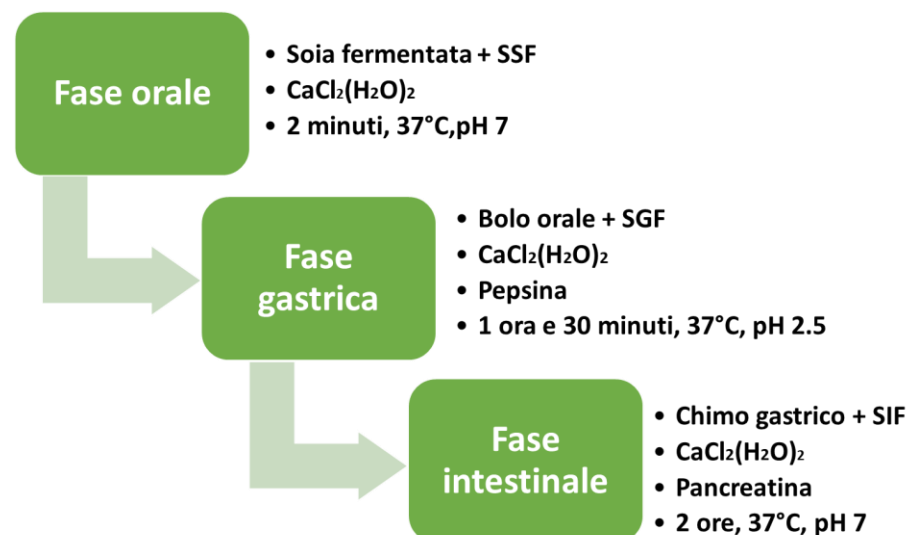


Figura 3.5: Schema riassuntivo delle tre fasi operative della digestione gastrointestinale *in vitro*.

3.3.1 Preparazione dei fluidi

Ciò che si è fatto inizialmente è quello di preparare i tre diversi fluidi simulati con diverse concentrazioni di elettroliti e con relativi pH richiesti: orale (SSF= *simulated salivar fluid*)

a pH 7, gastrico (SGF=*simulated gastric fluid*) a pH 2.5 e intestinale (SIF=*simulated intestinal fluid*) a pH 7.

La concentrazione finale per ogni fluido è descritta nella tabella 3.5.

	SSF (mM)	SGF (mM)	SIF (mM)
KCl	15.10	6.90	6.80
KH ₂ PO ₄	3.70	0.90	0.80
NaHCO ₃	13.60	25.00	85.00
NaCl	/	47.20	38.40
MgCl ₂ (H ₂ O)	0.15	0.12	0.33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0.06	0.50	/
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	1.50	0.15	0.60

Tabella 3.5: Concentrazione finale dei diversi elettroliti nei vari fluidi.

L'aggiunta di CaCl₂(H₂O)₂ è avvenuta al momento della simulazione della digestione per evitare eventuali precipitazioni nei fluidi simulati [Nehir El *et al.*, 2015]. I fluidi si sono conservati a 4°C e prima dell'utilizzo per le fasi successive si sono riequilibrati a 37°C per circa 30 minuti.

3.3.2 Fase orale

A 10 g di campione di soia fermentata si sono aggiunti 8 mL di SSF. Successivamente si sono addizionati 50 µl di soluzione di CaCl₂(H₂O)₂, a pH 7 e si è raggiunto il volume finale di 20 mL. Dopo aver mescolato accuratamente il campione lo si è posto per 2 minuti a 37°C in agitazione a 150 g. Da questa fase si è ottenuto il bolo orale.

3.3.3 Fase gastrica

Si è proseguito poi con la fase successiva della digestione: la fase gastrica. Al bolo orale si sono aggiunti 16 mL di SGF e 10 µl di soluzione di CaCl₂(H₂O)₂. Si sono inoltre addizionati 16 mg di pepsina con rapporto 1:20 enzima su substrato, precedentemente sciolti in 1 mL di acqua. Si è portata poi la soluzione a pH 2.5 in modo da attivare l'attività enzimatica e si è raggiunto il volume finale di 40 mL. Il campione è stato incubato a 37°C per 1 ora e 30 minuti in agitazione a 150 g, in modo da simulare il movimento di rimescolamento gastrico.

3.3.4 Fase intestinale

Nell'ultima fase della digestione, il chimo ottenuto precedentemente è stato addizionato con 17 mL di SIF e 80 µl di soluzione di $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$. Successivamente si sono aggiunti 100 mg di pancreatina sciolta precedentemente in 10 ml di SIF. La solubilità della pancreatina è parziale, infatti la soluzione risulta torbida. Si è poi portato il tutto a pH 7 e al volume finale di 80 mL. Si è poi posto il campione a 37°C in agitazione a 150 g per 2 ore. Si è infine ottenuto il campione digerito, dall'aspetto torbido.

La reazione enzimatica è stata quindi inattivata termicamente, ponendo il campione di soia fermentata digerita a 85°C per 15 minuti. Dopo aver raffreddato il campione lo si è posto in centrifuga a 6000 g per 15 minuti e successivamente si è filtrato con filtri *Millipore™* (*Thermo Fisher Scientific™*, USA) da 0.45 µm. Si è conservato poi il campione a -20°C fino all'utilizzo [Capriotti *et al.*, 2015; Nehir El *et al.*, 2015; Minekus *et al.*, 2014].

3.3.5 Determinazione del quantitativo proteico mediante il metodo di Bradford

Al termine dell'estrazione peptidica si è voluta effettuare una quantificazione delle proteine presenti all'interno del campione ottenuto dalla digestione gastrointestinale simulata. Per fare questo ci si è avvalsi della metodica di Bradford. Tale saggio presenta una sensibilità di rilevazione delle proteine in un *range* che va dai 10 ai 100 µg. Esso si basa sulla rilevazione di uno shift del picco di assorbanza del reagente blu di Coomassie G250 a seguito del suo legame con i residui proteici. Per procedere a tale saggio si è primariamente preparata 100 mL di *stock solution* dissolvendo 3 mg di blu di Coomassie G250 in 10 mL di EtOH al 100%, aggiungendo poi 5.5 mL di acido ortofosforico H_3PO_4 all'85%. Successivamente si è eseguito il saggio secondo la tabella 3.6. La retta di taratura si è costruita con standard di albumina sierica bovina (BSA) concentrata 1 mg/mL (figura 3.6).

Vf= 1 mL	Blank (mL)	St1 (mL)	St2 (mL)	St3 (mL)	Campione (mL)
H ₂ O	0.1000	0.0975	0.0950	0.0900	0.0800
BSA 1 mg/mL	/	0.0025	0.0050	0.0100	/
Campione	/	/	/	/	0.0200
Stock solution	0.9000	0.9000	0.9000	0.9000	0.9000

Tabella 3.6: Volumi delle diverse soluzioni per eseguire il metodo di Bradford.

Dopo aver mescolato e trascorsi 5 minuti a temperatura ambiente in modo che avvenisse la reazione si sono letti i diversi campioni ad una lunghezza d'onda di 595 nm (UV/VIS Lambda 2, Perkin ElmerTM, Italia) [Kruger *et al.*, 2009].

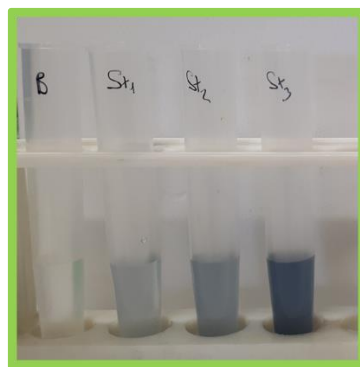


Figura 3.6: Saggio di determinazione proteica. Nella figura è rappresentata la retta di taratura con standard di albumina sierica bovina (BSA) 1 mg/mL.

3.3.6 Gel Tris/Tricina

Per verificare l'avvenuta idrolisi delle proteine native a seguito della simulazione della digestione gastrointestinale umana *in vitro* si è utilizzata la tecnica di elettroforesi su gel tris/tricina. La scelta è ricaduta su questa metodologia in quanto essa è utile alla valutazione della migrazione delle proteine in base al loro peso molecolare. Si è utilizzato un Gel Precast Mini-PROTEAN[®] (Bio-RadTM, USA) al 16.5% con un tampone corsa costituito da Tris (2ammino-2 idrossimetil-1,3-propandiolo) 100 mM, Tricina 100 mM e sodio dodecil solfato (SDS) 0.1%. Ai campioni è stato aggiunto il *loading buffer* 1X e 4X (Tris 0.5 M a pH 6.8, SDS al 10%, glicerolo al 50% e blu di bromofenolo) con DTT 0.1 M e Tris 1M per aggiustare il pH dove necessario.

I campioni sono stati bolliti per 5 minuti a 100° C e caricati sul gel. Si è condotta la corsa elettroforetica a 100 V costanti per la prima mezz'ora e poi a 150 V costanti per un totale di due ore [Tonolo *et al.*, 2019 c].

Terminata la corsa si è colorato il gel mediante *silver staining* o colorazione argentica. Si è posto il gel in una soluzione di fissaggio al 50% di metanolo e 12.5% di acido acetico per 20 minuti in agitazione; tale passaggio si è ripetuto per tre volte. A questo punto si è lavato il gel per 5 minuti in acqua, lo si è pretrattato con una soluzione di DTT 0.2 mM per 30 minuti e lo si è lavato nuovamente in modo rapido con acqua. Successivamente si è colorato il gel con una soluzione di AgNO₃ allo 0.1% lasciandolo in agitazione per 30 minuti e lo si è sviluppato con una soluzione al 3% di Na₂CO₃ e allo 0.0185% di formaldeide. Infine si è lavato il gel con acqua e la reazione si è bloccata aggiungendo acido acetico glaciale concentrato.

3.4 Estrazione dei peptidi dalla soia fermentata digerita

Le sperimentazioni per estrarre i peptidi dal campione di soia fermentata digerita e le successive analisi all'HPLC (*High performance liquid chromatography*) si sono svolte in collaborazione con il laboratorio del prof. O. Marin del Dipartimento di Scienze Biomediche.

3.4.1 Estrazione dei peptidi

Dal campione della soia fermentata digerita si sono ottenuti i peptidi mediante estrazione su fase solida attraverso l'uso di una colonna STRATA C18-E (*Phenomenex*TM, Italia). In primo luogo si è proceduto con la sua attivazione tramite 40 ml di soluzione di acetonitrile (Acn) al 100% e il suo successivo lavaggio con 125 mL di H₂O + acido trifluoroacetico (TFA) 0.1%. Quindi si è caricato il campione di soia fermentata digerita e a seguire si è svolto un ulteriore lavaggio con 125 mL di H₂O + TFA 0.1%. Il campione è stato eluito con un gradiente a step utilizzando diverse concentrazioni di Acn al 5%, al 30% e al 50%. La prima frazione raccolta di 50 mL costituisce la frazione 0-5% di Acn. Si è poi passati al secondo step (50 mL di soluzione di Acn al 30%) per l'ottenimento dell'eluato costituente la frazione 5-30% di Acn ed infine, mediante la stessa procedura, con una soluzione di Acn al 50% si è ottenuta la frazione 30-50%.

Le frazioni raccolte sono state poi congelate a -80°C e liofilizzate (liofilizzatore *Edwards*TM, UK). Visto il limitato contenuto proteico della frazione 30-50% Acn, tutto il lavoro di seguito riportato si è centrato sulla frazione 5-30% di Acn.

Il campione liofilizzato è stato sciolto in acqua *Milli-Q*[®] in modo da ottenere una concentrazione di 5 mg/mL.

3.4.2 Sub-frazionamento della frazione 5-30% di soia fermentata digerita

La frazione 5-30% di Acn ottenuta precedentemente è stata ulteriormente purificata attraverso un gradiente in HPLC. Vengono sciolti 40 mg di frazione peptidica in 2.5 ml di H₂O + TFA 0.1% e caricati su una colonna preparativa SNAP KP-C18-HS 12 g (*Biotage*[®], Svezia). Il gradiente utilizzato è dallo 0% al 40% di Acn in 24 minuti con flusso impostato a 12 mL/min. L'eluato si è raccolto mediante frazionatore ogni minuto. L'assorbanza viene rilevata a 220 nm e 280 nm. Attraverso il cromatogramma ottenuto a 280 nm sono state ricavate diverse frazioni, liofilizzate e successivamente utilizzate per le differenti analisi svolte sia *in vitro* sia a livello cellulare.

3.5 Analisi *in vitro* del potere antiossidante delle frazioni peptidiche

Al fine di testare la capacità antiossidante dei peptidi contenuti nelle sub-frazioni ottenute dalla soia fermentata digerita si sono condotti due differenti saggi *in vitro*, il saggio dell'ABTS e quello del DPPH in piastre da 96 *well* (*Corning Incorporated*TM, USA).

3.5.1 Saggio ABTS su piastre da 96 *well*

Il primo saggio effettuato per l'analisi del potere antiossidante delle frazioni peptidiche sfrutta la capacità delle specie antiossidanti di ridurre il catione radicalico preformato dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS^{•+}) in acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS). Il cromoforo ABTS^{•+} di colore blu/verde viene prodotto a seguito della reazione tra la soluzione di ABTS 7 mM e la soluzione di potassio persolfato (KPS) 2.46 mM. Per poterla utilizzare nel saggio tale soluzione deve essere preparata almeno 18 ore prima e mantenuta al buio a temperatura ambiente, in modo da permettere la stabilizzazione del radicale e il completamento della reazione. Il giorno successivo la soluzione, prima di poter essere utilizzata, viene diluita in acqua ad una concentrazione finale di 0.08 mM. Ciò che avviene in presenza di antiossidanti è la riduzione del catione radicalico preformato ABTS^{•+}, dando vita al prodotto incolore;

pertanto il rilevamento della diminuzione della densità ottica a 415 nm sarà proporzionale al potere antiossidante. Per la costruzione della retta di taratura di tale saggio si usufruisce dell'acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico (Trolox C), molecola solubile in acqua con struttura analoga alla vitamina E [Duda-Chodak *et al.*, 2008; Tonolo *et al.*, 2019 b].

Per il saggio si è proceduto come segue: inizialmente si sono diluite le frazioni peptidiche ad una concentrazione finale di 4 mg/mL. Si sono aggiunti poi nei rispettivi pozzetti i seguenti volumi di acqua *Milli-Q*[®] e i campioni a due diverse concentrazioni come riportato in tabella 3.7. Si sono preparati inoltre gli standard con concentrazioni crescenti di Trolox C sciolto in dimetilsolfossido (DMSO) (tabella 3.8).

	Controllo	Campione (0.05 mg/mL)	Campione (0.10 mg/mL)
H₂O (mL)	0.1000	0.0975	0.0950
Campione (mL)	/	0.0025	0.0050

Tabella 3.7: Saggio dell'ABTS.

	St1	St2 (0.01 mM)	St3 (0.02 mM)	St4 (0.04 mM)	St5 (0.08 mM)	St6 (0.12 mM)
Trolox C (mL)	/	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
H₂O	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
DMSO (mL)	0.01	/	/	/	/	/

Tabella 3.8: Retta di taratura con Trolox C in piastra da 96 well.

A questo punto si è proceduto aggiungendo 0.01 mL di soluzione di ABTS^{•+} 0.08 mM e leggendo al TECAN Infinite M200 PRO in cinetica ogni 30 secondi a 734 nm.

3.5.2 Saggio DPPH su piastre da 96 well

Il secondo saggio effettuato per l'analisi del potere antiossidante delle frazioni peptidiche si basa sulla capacità del radicale difenilpicrilidrazile (DPPH[•]) di ridursi in presenza di molecole antiossidanti. Questo semplice metodo colorimetrico viene comunemente utilizzato per la misurazione del contenuto di antiossidanti in matrici alimentari di diversa natura, sia vegetali sia animali. In funzione dello scopo del saggio esso può essere effettuato usufruendo di diverse tipologie di solventi: dal metanolo all'acetone, dall'etanolo al benzene. La reazione viene valutata spettrofotometricamente in cinetica ad una lunghezza d'onda di 517 nm in quanto si verifica nel progredire di quest'ultima una

decolorazione progressiva dall'iniziale colore viola [Şengül *et al.*, 2012; Tonolo *et al.*, 2019 b].

Come nel saggio descritto nel paragrafo 3.5.1 si sono diluiti i campioni ad una concentrazione finale di 4 mg/mL. Poi si è preparata la soluzione DPPH' 0.2 mM in etanolo (EtOH) e si sono aggiunti nei rispettivi pozzetti i seguenti volumi di acqua *Milli-Q*® e campioni a due diverse concentrazioni come in tabella (tabella 3.9):

	Blank	Campione Cf=0.05 mg/mL	Campione Cf=0.10 mg/mL
H2O (mL)	0.1000	0.0975	0.0950
Campioni (mL)	/	0.0025	0.0050

Tabella 3.9: Saggio del DPPH.

Si sono successivamente aggiunti ad ogni pozzetto 100 µL di soluzione DPPH' 160 µM in EtOH e si è letta la piastra al TECAN Infinite M200 PRO a 517 nm eseguendo 12 misurazioni ogni 5 minuti con un metodo in cinetica. Infine si è calcolata la percentuale di DPPH' *scavenging* nella modalità seguente:

$$\% \text{ DPPH' scavenging} = \frac{\text{Abs controllo} - \text{Abs campione}}{\text{Abs controllo}} * 100$$

3.6 Studi nel modello cellulare

3.6.1 La linea cellulare Caco-2

La seconda parte dello studio ha previsto l'utilizzo di un modello cellulare: la linea cellulare Caco-2 (figura 3.7), ottenuta dall'ATCC (*American type culture collection*) e proveniente da adenocarcinoma coloretale. Tale linea cellulare viene mantenuta in DMEM (*Dulbecco's modified eagle's medium*) al 10% di siero fetale bovino (FBS) ad una temperatura di 37°C e mediante un'atmosfera contenente il 5% di CO₂. Il medium durante il mantenimento deve essere cambiato ogni 3 giorni. La linea cellulare Caco-2 può essere utilizzata sia prima del differenziamento come semplice coltura cellulare epiteliale in monostrato, sia dopo il differenziamento (circa 21 giorni dopo la semina) come coltura cellulare con cellule polarizzate simili agli enterociti dell'intestino tenue. Le principali caratteristiche assunte ad avvenuto differenziamento sono: l'essere polarizzate, l'avere giunzioni strette fra cellule adiacenti e l'orletto a spazzola a livello apicale, ed infine l'esprimere i tipici enzimi digestivi, le peptidasi di membrana e i trasportatori degli

enterociti dell'intestino tenue. Questa linea cellulare completamente differenziata è utilizzata per lo studio del trasporto e dell'assorbimento di *drugs* e alimenti e per lo studio della permeabilità della barriera gastrointestinale [Lea *et al.*, 2015].



Figura 3.7: Cellule Caco-2 al microscopio ZEISS TELAVAL 31, 10 x.

3.6.2 Saggio di vitalità (MTT)

Il primo saggio condotto con la linea cellulare Caco-2 è un saggio di citotossicità utile a determinare la percentuale di vitalità cellulare a seguito di trattamenti con le frazioni peptidiche estratte. Esso è basato sulla misurazione di attività enzimatiche necessarie per il mantenimento dello stato energetico della cellula. Il suo principio utilizza la capacità dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi di ridurre i sali di tetrazolio (MTT) in cristalli di formazano che vengono poi solubilizzati tramite l'utilizzo di DMSO. Il saggio colorimetrico permette di seguire la reazione, in quanto si sviluppa un color violaceo di varie intensità, rilevabile spettrofotometricamente (figura 3.8). Pertanto tale saggio, in questo contesto, è utile per verificare la vitalità cellulare dopo trattamento con le frazioni peptidiche a seguito della somministrazione sia della frazione 5-30% di Acn sia delle sub-frazioni peptidiche ottenute dall'HPLC.

Si sono sciolte in acqua *Milli-Q*[®] sia la frazione di Acn 5-30% sia le diverse sub-frazioni, in modo da avere una concentrazione finale di 5 mg/mL. Si sono poi seminate le cellule Caco-2 (1×10^4) in piastre da 96 *well* e incubate a 37°C e 5% di CO₂. Dopo 48 h si sono trattate le cellule con le frazioni peptidiche a diverse concentrazioni, incubando successivamente per 24 ore. A questo punto si procede con la rimozione del terreno e l'aggiunta di 0.1 mL di soluzione di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5)-difeniltetrazolio bromuro (MTT) 0.5 mg/mL diluita in PBS 1X; poi la piastra viene mantenuta in incubazione al buio per 3 ore. Rimossa poi la soluzione di MTT, si aggiungono 0.1 mL di *stop solution*, composta per il 90% da

isopropanolo e per il 10% da DMSO. La piastra viene poi messa in agitazione per 15 minuti a 37°C al buio in modo da favorire la solubilizzazione dei cristalli di formazano. Si è poi terminato il saggio con la lettura delle piastre attraverso l'utilizzo del TECAN Infinite M200 PRO a 565 nm e a 690 nm. Le letture a 690 nm sono state poi sottratte alle letture a 565 nm durante la fase di rielaborazione dei dati per eliminare il rumore di fondo [van Meerloo *et al.*, 2011; Tonolo *et al.*, 2019 b]. Si è infine calcolata la percentuale di vitalità cellulare ottenibile con la formula sottostante:

$$\% \text{ vitalità cellulare} = \frac{\text{Abs campione (565 nm - 690 nm)}}{\text{Abs controllo (565 nm - 690 nm)}} * 100$$

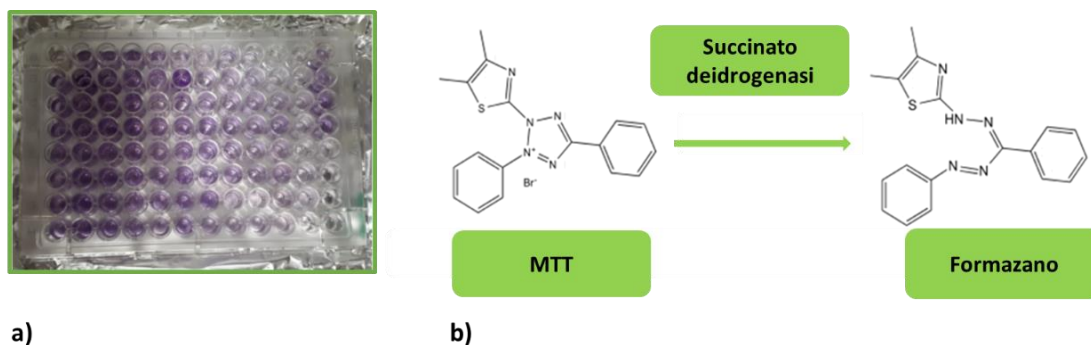


Figura 3.8: Saggio di vitalità MTT: a) Esempio di piastra in cui è stato eseguito il protocollo dell'MTT; b) Schema della reazione di riduzione dell'MTT da parte dell'enzima succinato deidrogenasi a formazano.

3.6.3 Determinazione della produzione di ROS

Il secondo test eseguito con la linea cellulare Caco-2 riguarda la determinazione del quantitativo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte dalle cellule in presenza di induttori di stress ossidativo conseguentemente a trattamenti con le frazioni peptidiche estratte. A questo scopo si è utilizzata la sonda 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihydrofluoresceina diacetato acetil estere (CM-H₂DCFDA) (*Thermo Fisher ScientificTM*, USA). Tale sonda, dopo aver attraversato la membrana plasmatica, viene idrolizzata da parte delle esterasi intracellulari in anione carbossilato H₂DCF. Questa forma ossidandosi a contatto con H₂O₂, dà vita alla sua forma fluorescente DCF.

Si sono seminate le cellule Caco-2 in piastre da 96 *well* (1 x 10⁴), incubate a 37°C e 5% di CO₂ per 48 ore. Le cellule poi sono state trattate con le sub-frazioni peptidiche a concentrazione finale di 0.05 mg/mL per 24 ore. Le cellule successivamente sono state lavate con 100 μ L/*well* di PBS 1X-D-Glucosio 10 mM e poi sono stati posti 80 μ L/*well* di sonda diluita per 20 minuti al buio a 37°C e 5% di CO₂. Si è rimossa la sonda e nei pozzetti

non trattati sono stati posti 100 μL di PBS 1X-D-Glucosio 10 mM, mentre in quelli trattati 100 μL di una soluzione di TbOOH in modo da avere una concentrazione finale 250 μM . Successivamente si è eseguita la lettura al TECAN Infinite M200 PRO seguendo la produzione di ROS in fluorescenza per 1 ora e 30 minuti attraverso una metodica in cinetica (eccitazione a 485 nm ed emissione a 527 nm) [Wojtala *et al.*, 2014].

3.6.4 Analisi dell'assorbimento dei peptidi con *Transwell*®

Per simulare l'assorbimento dei frammenti proteici ottenuti dalla soia fermentata digerita a livello della mucosa intestinale, si è usufruito della capacità delle cellule della linea cellulare Caco-2 di differenziarsi in un monostrato, che è simile a livello strutturale e funzionale all'epitelio intestinale. Tali cellule a confluenza differenziano spontaneamente in cellule colonnari e polarizzate che esibiscono a livello apicale microvilli ben sviluppati. Per procedere con questa sperimentazione si usano particolari piastre da coltura cellulare da 12 *well* (*Transwell*®, *Corning Incorporated*™, USA) nelle quali sono presenti appositi inserti formati da una membrana porosa di policarbonato con pori di diametro di 0.4 μm (figura 3.9 a). Tali inserti permettono la formazione di due compartimenti, uno apicale (AP) e uno basolaterale (BL), che rappresentano rispettivamente il primo, il lume intestinale, e il secondo, la superficie delle cellule intestinali a contatto con vasi sanguigni e linfatici.

Le cellule, seminate ad una concentrazione di $8 \times 10^4/\text{well}$, vengono fatte crescere per 21 giorni in modo da permetterne il differenziamento, cambiando il terreno DMEM completo in cui viene mantenuta la linea cellulare tre volte alla settimana. Il cambio del terreno viene fatto seguendo un ordine preciso, prima rimuovendo il terreno a livello del comparto basolaterale e poi a livello di quello apicale ed effettuando l'aggiunta del nuovo terreno seguendo l'ordine contrario. Tutto ciò serve per mantenere l'integrità dell'epitelio, evitandola formazione di pressioni e depressioni che possano provocare il distacco delle cellule dal supporto [Lea *et al.*, 2015].

3.6.5 Misurazione della resistenza elettrica transepiteliale

Il mantenimento delle attività fisiologiche di scambio tra i due comparti formatesi attraverso il modello descritto è determinato dall'integrità della barriera cellulare, che deve essere monitorata durante la crescita e il differenziamento cellulare. Questo è

possibile farlo attraverso la misura della TEER (*Trans epithelial electrical resistance*), che consiste nell'inserimento (in modo opportuno) di due elettrodi Ag-AgCl posizionati uno a livello del comparto apicale e uno a livello del comparto basolaterale separati solamente dal monostrato cellulare come mostrato nella figura 3.9 b. La misurazione della TEER viene espressa in $\Omega \times \text{cm}^2$ e si basa sul calcolo della differenza del potenziale elettrico tra i due comparti data dall'applicazione di corrente elettrica e calcolabile con la seguente:

$$TEER = (R - R_b) * A$$

dove R è la resistenza dell'inserito in presenza del monostrato cellulare, R_b è la resistenza dell'inserito senza il monostrato cellulare e A è rispondente all'area di crescita della membrana in cm^2 [Srinivasan *et al.*, 2015].

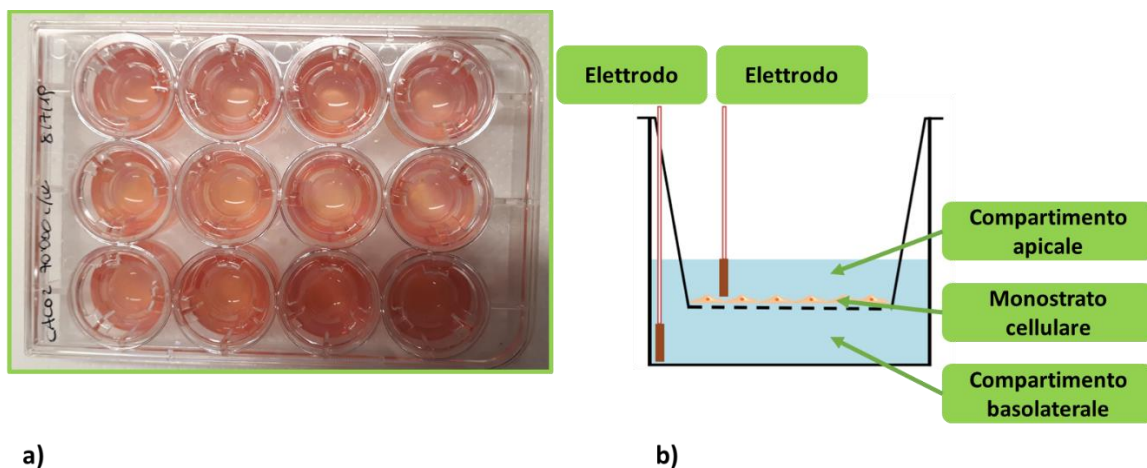


Figura 3.9: Analisi dell'assorbimento dei peptidi con piastra Transwell® e misurazione della TEER: a) Esempio di piastra Transwell® da 12 pozzetti b) Schema del pozzetto di una piastra Transwell® con inserto in policarbonato con membrana porosa durante la misurazione della TEER. Si denoti la suddivisione dei due comparti apicale e basolaterale (immagine modificata da Srinivasan *et al.*, 2015).

3.6.6 Analisi dell'assorbimento delle frazioni peptidiche

Verificata l'integrità dell'epitelio, si è proseguito con il protocollo per lo studio dell'assorbimento delle frazioni peptidiche. Dopo 21 giorni, dopo aver rimosso il terreno, si effettuano tre lavaggi consecutivi delle cellule con una soluzione di *Hank's balanced salt solution* (HBSS) 1X addizionata con D-glucosio 10 mM, a cui si è intervallato 1 minuto di agitazione a temperatura ambiente. All'ultimo lavaggio si sono aggiunti 685 μL di HBSS e D-glucosio 10 mM nel comparto apicale e 1.3 ml della soluzione summenzionata nel comparto basolaterale. La piastra è poi stata equilibrata per 30 minuti a 37°C. Sono stati somministrati 15 μL di frazioni peptidiche a livello del comparto apicale, incubando le

cellule a 37°C. Trascorsi prima 10 minuti poi 120 minuti si sono raccolte le soluzioni presenti nei due compartimenti e mantenute in ghiaccio. Al termine della raccolta i campioni si sono centrifugati a 2900 g per 7 minuti, congelati e successivamente liofilizzati.

Le cellule invece sono state lavate con 0.4 mL di acqua *Milli-Q*[®], raccolte e sottoposte a tre cicli di “*freeze and thawing*” per poi essere centrifugate a 11600 g per 6 minuti. Infine il surnatante è stato prelevato e congelato a -20°C.

3.6.7 Analisi dei campioni con HPLC

L'analisi delle diverse soluzioni raccolte dai compartimenti apicale e basolaterale richiede l'utilizzo dell'HPLC. I campioni precedentemente liofilizzati vengono sciolti in 0.1 mL di acqua *Milli-Q*[®] e TFA 0.1%, mescolati con il vortex e centrifugati rapidamente. Quindi ciascun campione ottenuto dai due compartimenti (apicale e basolaterale) viene sottoposto a cromatografia usando una strumentazione HPLC analitica composta da WATERS 2695 *separation module* e da WATERS 996 *Photodiode Array Detector* e con una colonna Jupiter[®] 5 µm C18 300 Å (250 x 4.6 mm). I campioni vengono eluiti con un gradiente da 0-60% di Acn in 37 minuti seguendone il profilo di densità ottica a 220 nm. In funzione dell'aumento dell'assorbimento analizzato dall'HPLC vengono raccolte le frazioni. Gli eluati raccolti poi sono stati liofilizzati e conservati in modo da poter procedere all'identificazione dei peptidi in essi presenti mediante spettrometria di massa.

3.6.8 Analisi delle frazioni peptidiche tramite spettrometria di massa

Le sub-frazioni peptidiche ricavate dalla soia fermentata digerita e le soluzioni dei compartimenti apicale e basolaterale ottenute dall'analisi dell'assorbimento si sono identificate mediante lo spettrometro di massa MALDI TOF/TOF 4800 (*Applied Biosystem*TM, USA) (figura 3.10).



Figura 3.10: Spettrometro di massa MALDI TOF/TOF 4800 (Applied Biosystem™, USA).

Per la deposizione dei campioni sulla piastra si sono mescolati 3 μ l di ogni frazione peptidica con 3 μ l di matrice di α -ciano-4-idrossicinnamico, adatta a peptidi di piccole dimensioni. La lettura è stata eseguita in doppio per ogni campione.

3.7 Analisi statistica

Si sono espressi tutti i valori come media \pm deviazione standard di almeno quattro esperimenti e si è condotta l'analisi della varianza in base al Tukey-Kramer *multiple comparison test* con un livello di significatività $P < 0.05$. Le diverse analisi statistiche si sono condotte tramite l'utilizzo del *software* GraphPad InStat® 3.

4 Risultati e discussione

La matrice alimentare su cui si è focalizzato questo lavoro di tesi è la soia fermentata, fornita dalla Centrale del Latte di Vicenza, partner di numerose collaborazioni scientifiche. In particolare questo studio si è inserito in un progetto del Fondo Sociale Europeo (FSE) del 2018 intitolato: “La ricerca di base a supporto dell’azienda: realizzazione di un *functional food* e di nuovi nutraceutici per il benessere del consumatore”.

La ricerca è suddivisa in tre parti. Durante la prima parte ci si è concentrati sullo studio del potere antiossidante della soia fermentata confrontandola con la base di soia non fermentata e, in secondo luogo, nella determinazione della frammentazione proteica. Nella seconda parte dello studio, mediante simulazione della digestione gastrointestinale umana *in vitro*, si è ottenuta la soia fermentata digerita e da essa, con tecniche cromatografiche, diverse frazioni proteiche. Infine si è valutato il ruolo antiossidante di tali frazioni sia *in vitro* sia in un modello cellulare che simula l’epitelio intestinale dell’uomo.

4.1 Analisi del potere antiossidante e della frammentazione proteica della soia fermentata

Si è valutato il potere antiossidante della soia fermentata *in vitro* confrontandolo con la base di soia non fermentata tramite l’analisi della perossidazione lipidica. È stata inoltre misurata la proteolisi a diverse temperature e nel tempo eseguendo il test dell’ortoftalaldeide (OPA).

4.1.1 Perossidazione lipidica

Per analizzare la perossidazione lipidica si è quantificata la malondialdeide (MDA), uno dei suoi sottoprodotti, la cui formazione è conseguente alla presenza eccessiva di radicali liberi. In questo studio la lipoperossidazione è stata indotta da cumene idroperossido (CHP) 0.5 M ed emina 1 mM, molecole in grado di stimolare la formazione di malondialdeide essendo noti induttori del processo. L’addotto colorato, prodotto della reazione tra la MDA e l’acido tiobarbiturico (TBA), è rilevabile sia in assorbanza sia in fluorescenza. I dati riportati si riferiscono ai soli valori di fluorescenza, normalizzati

costruendo una retta di taratura (paragrafo 3.2.1 dei Materiali e metodi) ed espressi in nmoli di MDA/mL di prodotto.

L'analisi è stata eseguita confrontando un campione di soia fermentata con uno di base di soia non fermentata, entrambi forniti dalla Centrale del Latte di Vicenza (CLV) e differenti in termini di aspetto e consistenza, al fine di valutare se il processo fermentativo potesse portare a variazioni nella capacità antiossidante.

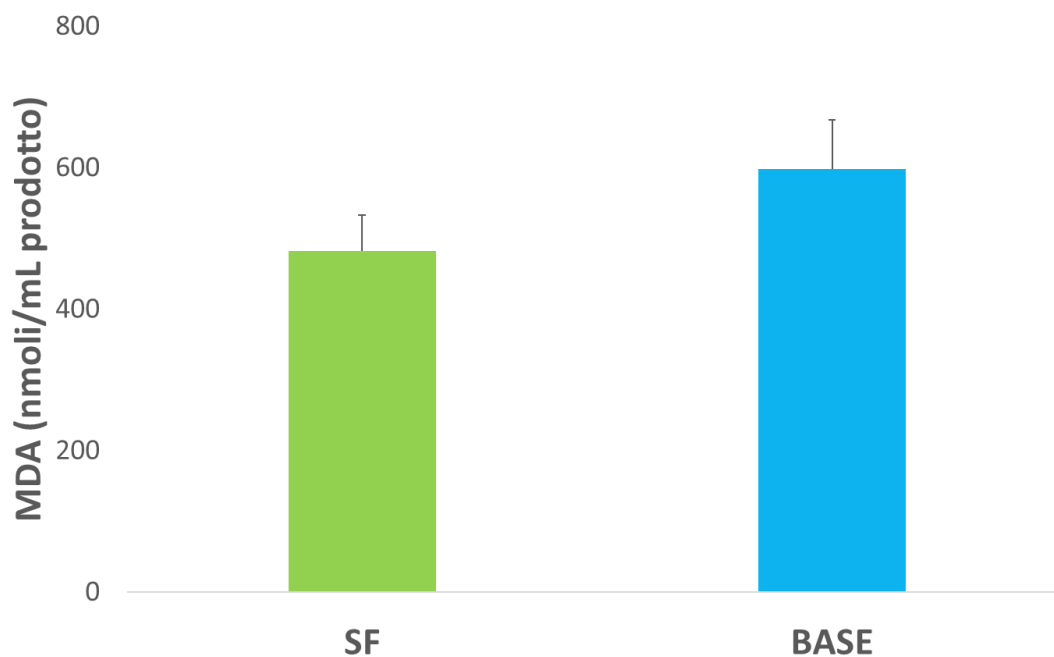


Figura 4.1: Perossidabilità dei campioni di soia fermentata (SF) e del prodotto base di soia non fermentata (BASE). Si è valutata la quantità di malondialdeide indotta a seguito della perossidazione lipidica in presenza di CHP 0.5 M ed emina 1 mM. I valori riportati sono espressi in nmoli di MDA/mL di prodotto.

Come si può notare dalla figura 4.1 il valore relativo alla soia fermentata è inferiore del 24% rispetto a quello ottenuto con il prodotto base di soia non fermentato, dovuto probabilmente alla presenza di ceppi fermentanti in grado di modificare la matrice. Un primo risultato pertanto è che la soia fermentata è meno soggetta a perossidazione lipidica e quindi potrebbe presentare maggiori caratteristiche antiossidanti rispetto alla base di soia non fermentata.

4.1.2 Saggio dell'ortoftalaldeide (OPA)

Uno degli eventi che possono presentarsi nelle matrici proteiche fermentate è la proteolisi ad opera degli agenti fermentanti. Tale parametro è stato valutato con il saggio dell'ortoftalaldeide (OPA) (paragrafo 3.2.2 dei Materiali e metodi). L'analisi della

frammentazione proteica in questo studio è stata effettuata in campioni di soia fermentata conservati a temperature diverse (4°, temperatura ambiente e 37°C) misurandoli spettrofotometricamente a 340 nm dopo 6, 18 e 24 ore come riportato nella figura 4.2.

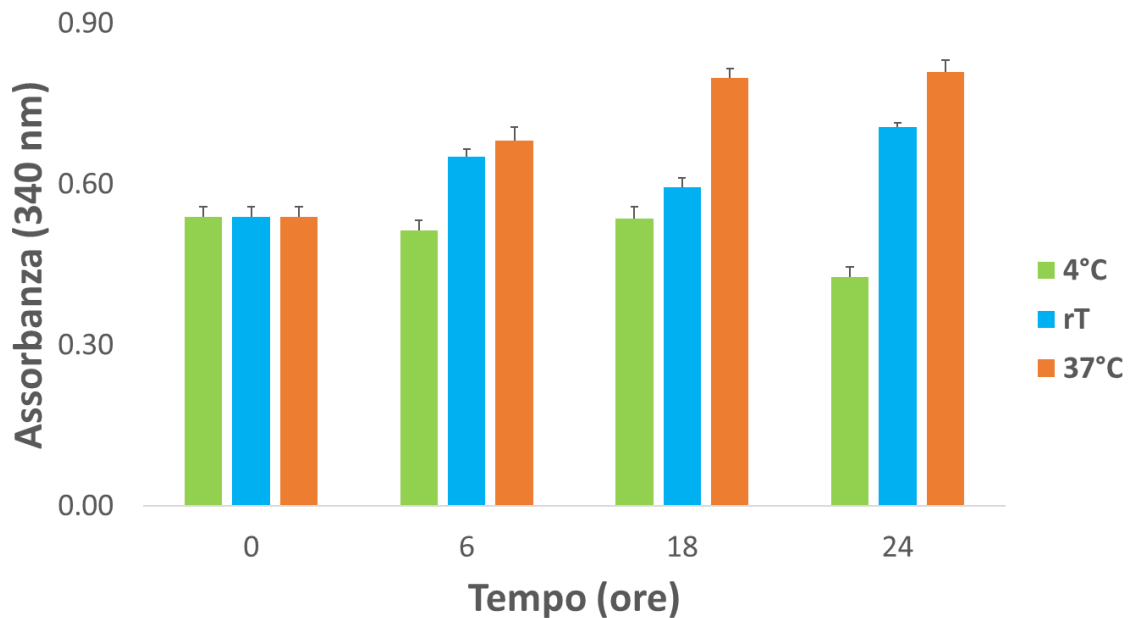


Figura 4.2: Valutazione della frammentazione proteica della soia fermentata nel tempo. Viene riportato l'incremento di densità ottica a 340 nm in presenza di ortoftaldeide (OPA) a diverse condizioni sperimentali di temperatura (4 °C, temperatura ambiente e 37 °C) e nel tempo.

Dal grafico si può notare che se i campioni vengono conservati correttamente a 4°C, nel tempo non subiscono variazioni apprezzabili, mentre a temperatura ambiente i valori di assorbanza aumentano nelle 24 ore. La proteolisi maggiore avviene conservando il campione a 37 °C in quanto si denota un aumento, probabilmente dovuto alla riattivazione dei microorganismi ancora presenti. Tale risultato è molto interessante in quanto dimostra che ad opportuni tempi e temperature i microorganismi agiscono attivamente favorendo il rilascio di peptidi e altri composti.

Grazie a queste considerazioni preliminari si è scelto di proseguire l'analisi della formazione dei peptidi. In lavori precedenti si sono estratte delle frazioni peptidiche a partire dall'estratto acquoso del campione di partenza [Tonolo et al., 2019 c], tuttavia i peptidi ottenuti in questo modo sono risultati non abbondanti e non idonei alla somministrazione cellulare. Pertanto si è deciso di passare all'impiego di una metodologia

in vitro che simulasse la digestione gastrointestinale umana al fine di favorire un'ulteriore frammentazione delle proteine native, già avvenuta a seguito del processo fermentativo.

4.2 Ottenimento della soia fermentata digerita mediante simulazione della digestione gastrointestinale *in vitro*

Allo scopo di agevolare il rilascio dei peptidi bioattivi a basso peso molecolare si è eseguita la simulazione della digestione gastrointestinale *in vitro* sul campione di soia fermentata. Questa metodologia ha previsto tre diversi step, che ricreano ciò che accade a livello della cavità orale, dello stomaco e dell'intestino in termini di pH e temperatura, attraverso l'utilizzo di soluzioni differenziali di acqua ed elettroliti oltre che di preparati enzimatici (pepsina e pancreatina) come descritto in dettaglio nel paragrafo 3.3 dei Materiali e metodi. Il bolo orale, ottenuto nel primo step a partire da 10 g di campione, è stato digerito con pepsina, enzima attivo in ambiente acido a pH 2.5 (rapporto 1:20 enzima su substrato). Durante il terzo step invece, per digerire il chimo, ci si è avvalsi della pancreatina, *pool* enzimatico comprendente lipasi, amilasi e proteasi, e attivo a pH 7.

Al termine delle varie fasi del processo digestivo, per verificare l'effettivo realizzarsi della frammentazione proteica conseguente, si è eseguita una corsa elettroforetica facendo uso di un gel Tris/Tricina Precast Mini-PROTEAN® al 16.5% colorato mediante *silver staining* (paragrafo 3.3.6 dei Materiali e metodi).

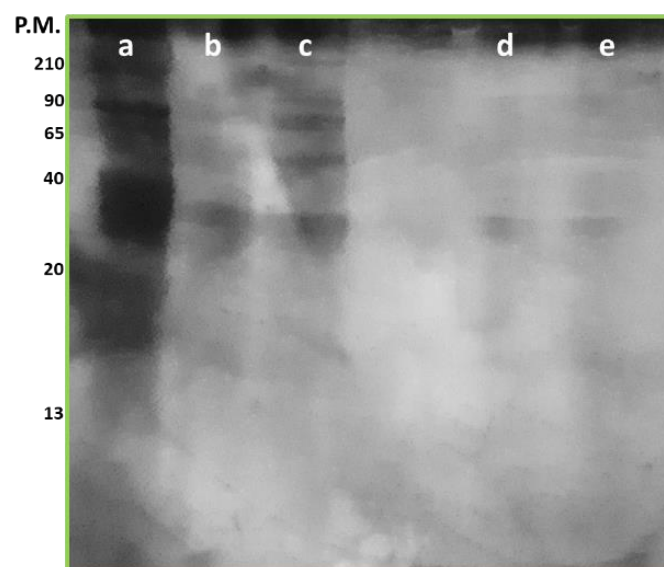


Figura 4.3: Gel Tris/Tricina (colorazione con *silver staining*) con campioni di soia fermentata (SF) e soia digerita (SD). Lane: a) Marker; b) SF 30 µg; c) SF 15 µg; d) SD 20 µg; e) SD 15 µg.

Le proteine sono state determinate mediante il metodo di Bradford (paragrafo 3.3.5 dei Materiali e metodi). Come riportato nella figura 4.3 i campioni di soia fermentata (SF) e di soia fermentata digerita (SD) sono stati sottoposti a gel elettroforesi. I campioni caricati nelle lanes c ed e sono pari a 15 µg di proteine in modo da permetterne il confronto, mentre nelle lanes b e d sono state caricate quantità diverse del campione (30 e 20 µg) al solo scopo di evidenziare in maniera più marcata eventuali proteine poco rilevabili. Tra le lanes dei campioni di SF e SD vi sono evidenti differenze, denotando l'avvenuta frammentazione proteica che ha portato alla quasi totale scomparsa del bandeggio rilevabile.

Appurata la buona riuscita della simulazione della digestione gastrointestinale *in vitro* si è voluto proseguire la ricerca purificando i peptidi mediante cromatografia a step.

4.3 Purificazione delle frazioni peptidiche

Questa parte dello studio è stata condotta in collaborazione con il laboratorio del Prof. O. Marin (Dipartimento di Scienze Biomediche). La purificazione cromatografica a step porta all'ottenimento di frazioni peptidiche concentrate e più facilmente analizzabili per poter misurare l'eventuale potere antiossidante.

La tecnica, spiegata più dettagliatamente nel paragrafo 3.4.1 dei Materiali e metodi, consiste in una estrazione con acetonitrile su fase solida attraverso l'uso di una colonna STRATA C18-E (*PhenomenexTM*, Italia). Si sono così ottenute due frazioni denominate 5-30% e 30-50% di Acn. Della seconda però, visto il limitato contenuto proteico, non si è proseguito con l'analisi.

Per verificare che all'interno della frazione 5-30% di Acn vi fossero solo peptidi di medio-basso peso molecolare si è proceduto con l'analisi allo spettrometro di massa MALDI TOF/TOF 4800 (paragrafo 3.6.8 dei Materiali e metodi).

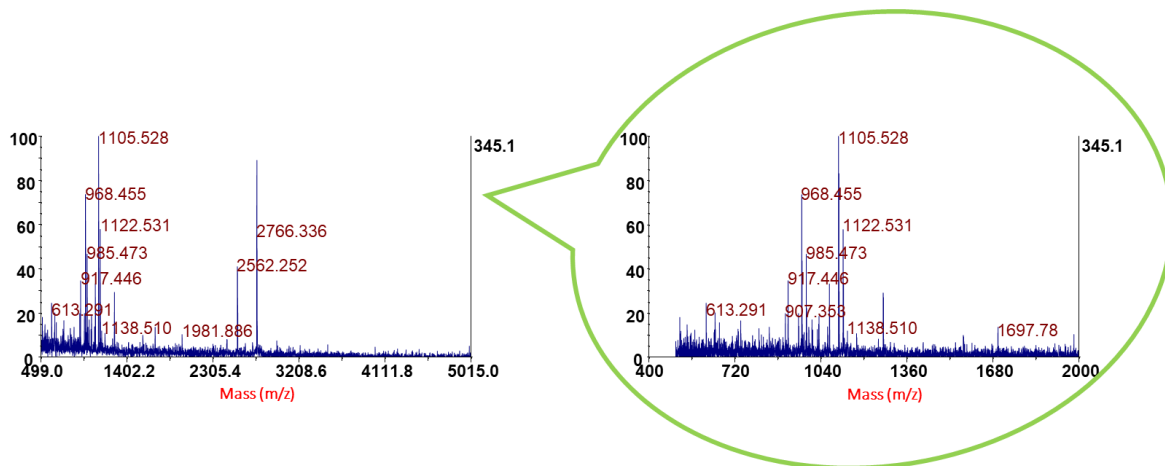


Figura 4.4: Spettri di massa della frazione 5-30% di Acn di soia digerita. Gli spettri ottenuti mostrano la presenza di peptidi a basso e medio peso molecolare.

Come si evidenzia dalla figura 4.4 i peptidi presenti nella frazione 5-30% di Acn hanno un peso molecolare medio-basso, masse esemplificative sono 917 u.m.a, 968 u.m.a., 985 u.m.a, 1105 u.m.a. e 1122 u.m.a.

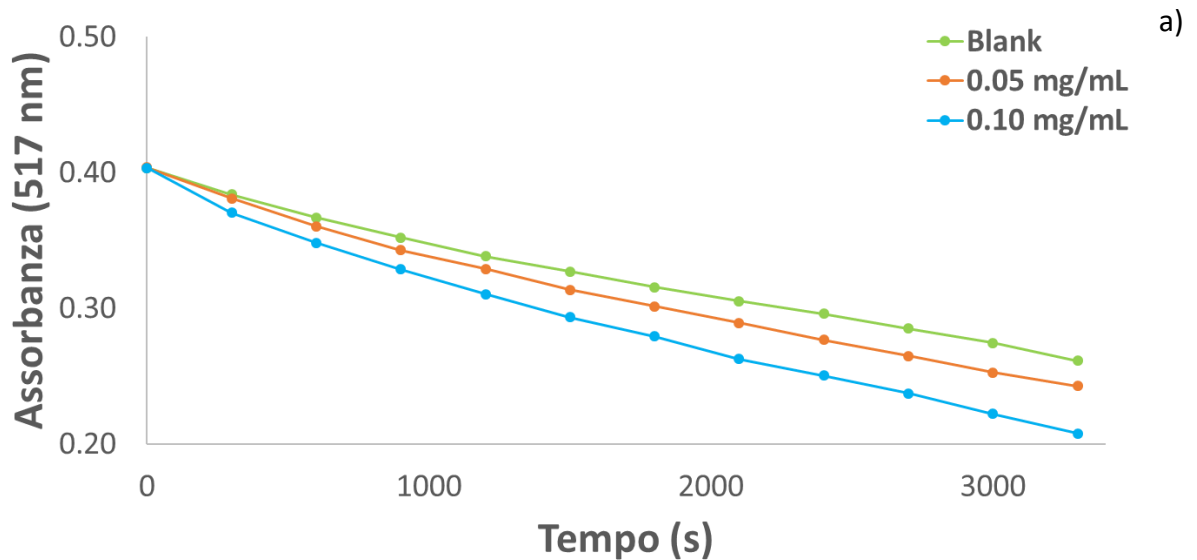
Confermata così la presenza di probabili peptidi di nostro interesse la ricerca è continuata verificandone la loro capacità antiossidante sia *in vitro* sia in un modello cellulare.

4.4 Misura *in vitro* del potere antiossidante della frazione peptidica 5-30%

Si è valutata la frazione peptidica 5-30% di Acn ottenuta dallo step cromatografico per la sua capacità antiossidante prima di tutto *in vitro*. I saggi di *scavenging* svolti a tale scopo sono stati il test del DPPH e quello dell'ABTS.

4.4.1 Test di *scavenging* del radicale DPPH'

La prima analisi *in vitro* ha previsto la determinazione della capacità del campione di eliminare il radicale stabile difenilpicrilidrazile (DPPH'). Quest'ultimo, presente in soluzione, è stato fatto reagire con la frazione peptidica 5-30% di Acn e di tale reazione si è determinata la diminuzione dell'assorbanza a 517 nm.



b)

Campione (5-30% Acn)	DPPH' scavenging (%)
0.05 mg/mL	15.27 ± 5.98 (***)
0.10 mg/mL	21.49 ± 5.13 (***)

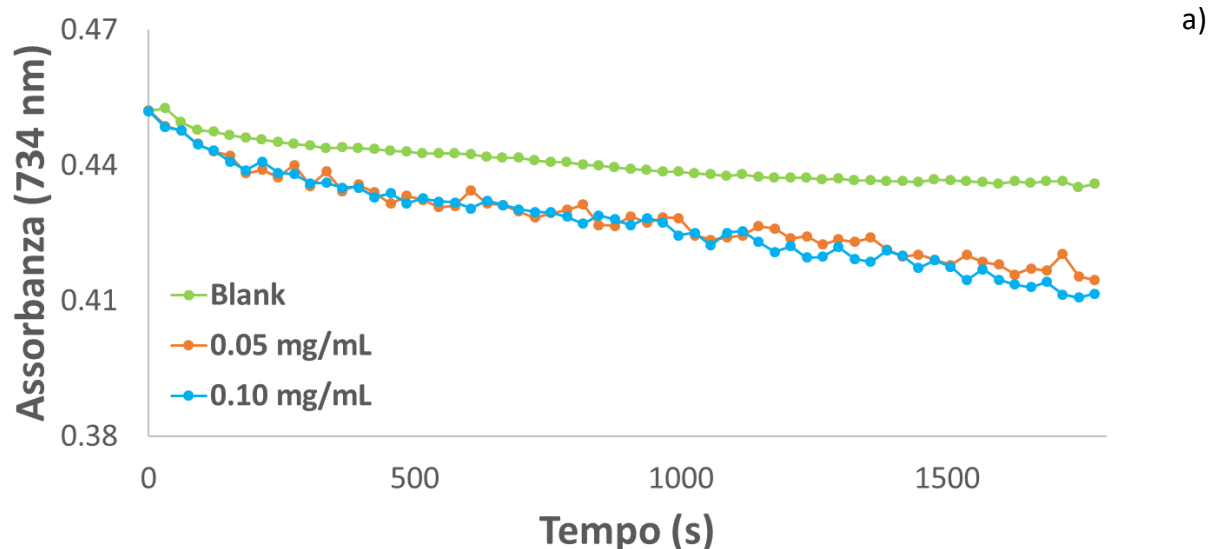
Figura 4.5: Saggio del DPPH in vitro con frazione peptidica 5-30% di Acn di soia fermentata digerita. Le concentrazioni testate sono 0.05 mg/mL e 0.10 mg/mL. **a) Analisi del potere antiossidante nel tempo.** **b) Tabella relativa al potere antiossidante espresso come DPPH' scavenging (%).** I dati si riferiscono alla media e alla deviazione standard di almeno 4 prove. (***) $P < 0.001$, rispetto al controllo.

Dalle curve riportate in figura 4.5 (a) si osserva la capacità di *scavenging* della frazione peptidica 5-30% di Acn, denotando il potere antiossidante concentrazione dipendente sia a 0.05 mg/mL sia a 0.10 mg/mL. Nella tabella (b) della stessa figura sono riportati i valori in percentuale di DPPH' *scavenging*.

Già da questo primo esito è risultato evidente il potere antiossidante presente nei peptidi all'interno della frazione peptidica 5.30% di Acn della soia fermentata digerita. Per supportare tale dato si è proceduto con un ulteriore prova *in vitro*.

4.4.2 Analisi dello *scavenging* con ABTS^{•+}

Il secondo saggio *in vitro* per la determinazione dell'attività antiossidante prevede l'utilizzo del radicale cationico ABTS^{•+}. La soluzione, preparata come descritto nel paragrafo 3.5.1 dei Materiali e metodi, è stata diluita e fatta reagire con la frazione peptidica 5-30% di Acn. La quantità di antiossidanti presenti nel campione è stata misurata in cinetica in funzione della diminuzione dell'assorbanza a 734 nm e i valori finali si sono espressi come TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*), riferendosi alla retta di taratura costruita con il Trolox C.



b)

Campione (5-30% Acn)	TEAC (μM Trolox C)
0.05 mg/mL	0.57 ± 0.37 (***)
0.10 mg/mL	0.58 ± 0.17 (***)

Figura 4.6: Potere antiossidante della frazione peptidica 5-30% di Acn della soia fermentata digerita mediante il saggio dell'ABTS. La frazione è stata testata a due concentrazioni: 0.05 e 0.10 mg/mL. **a) Analisi del potere antiossidante nel tempo.** **b) Tabella relativa al potere antiossidante espresso come TEAC (μM Trolox C/mL di prodotto).** I dati si riferiscono alla media e alla deviazione standard di almeno 4 prove. (***) $P < 0.001$, rispetto al controllo.

Come si può notare dalla figura 4.6 (a) le cinetiche, alle due diverse concentrazioni della frazione peptidica 5-30% di Acn, indicano entrambe la capacità protettiva dall'azione del radicale $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Anche i valori di TEAC, altamente significativi rispetto al controllo, supportano tale osservazione (b), indicando che, in questo test, il massimo del potere antiossidante si raggiunge già alla concentrazione più bassa.

Ottenuti questi risultati si è deciso di procedere con un'ulteriore purificazione del contenuto peptidico della frazione 5-30% di Acn della soia fermentata digerita.

4.5 Sub-frazionamento della frazione peptidica 5-30% della soia fermentata digerita

Allo scopo di purificare ulteriormente la frazione peptidica 5-30% di Acn e per arrivare ad un'individuazione e purificazione dei peptidi, si è eseguito un altro step cromatografico. Quest'ultimo si è ottenuto tramite analisi HPLC su colonna preparativa SNAP KP-C18-HS secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.4.2. dei Materiali e metodi. Seguendo la

densità ottica a 280 nm abbiamo individuato 6 picchi a contenuto proteico, successivamente raccolti e liofilizzati. Il frazionamento con flusso di 12 mL/min ha visto l'eluizione con un gradiente da 0% al 40% di Acn. I picchi peptidici sono stati raccolti al 13.7% di Acn (sub-frazione I), 19.8% di Acn (sub-frazione II), 24.8% di Acn (sub-frazione III), 29.5% di Acn (sub-frazione IV), 34.0% di Acn (sub-frazione V) e 37.3% di Acn (sub-frazione VI) (figura 4.7).

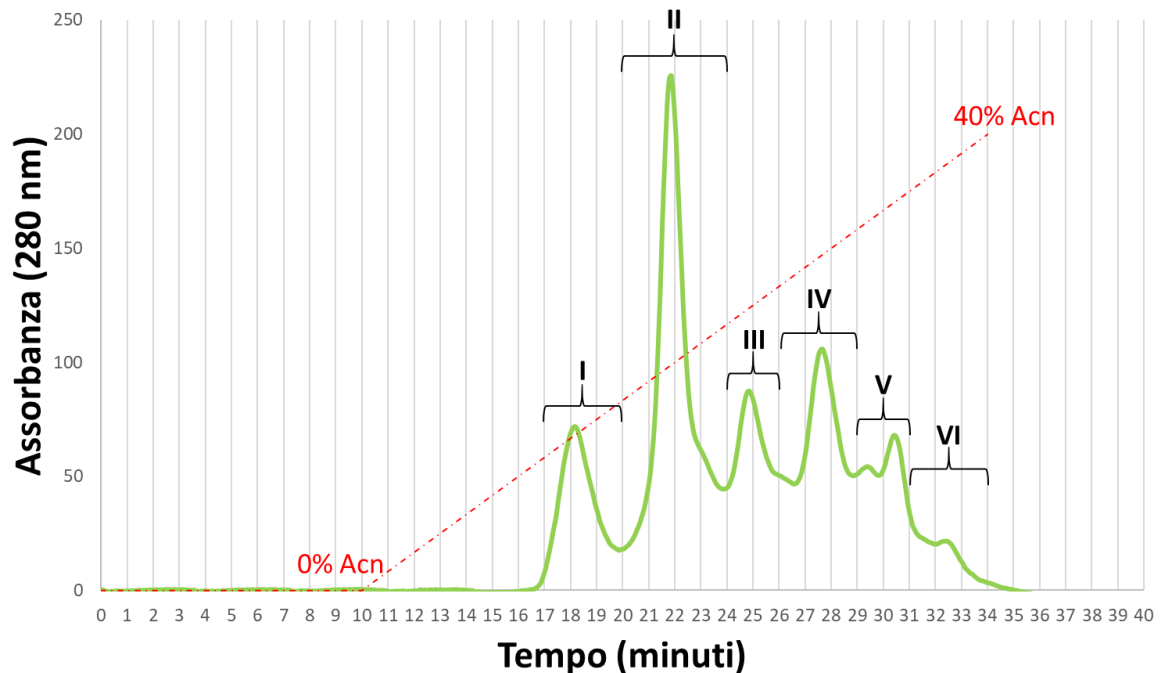


Figura 4.7: Cromatogramma della frazione 5-30% di Acn di soia fermentata digerita. Le sub-frazioni peptidiche si sono ottenute con l'analisi HPLC utilizzando un gradiente dallo 0% al 40% di Acn con flusso pari a 12 mL/min. Si sono raccolte le sub-frazioni e liofilizzate secondo lo schema che è riportato nel cromatogramma.

Dalla liofilizzazione le sub-frazioni ottenute sono state sottoposte all'analisi allo spettrometro di massa e successivamente valutate per il loro potere antiossidante sia *in vitro* sia in un modello cellulare.

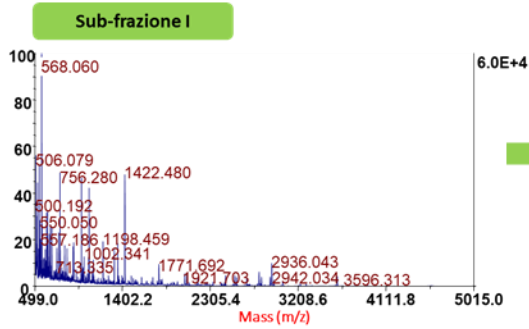
4.5.1 Analisi allo spettrometro di massa delle sub-frazioni di soia fermentata digerita

Per la sub-frazione VI si è deciso di non proseguire lo studio visto il limitato quantitativo risultante dalla liofilizzazione.

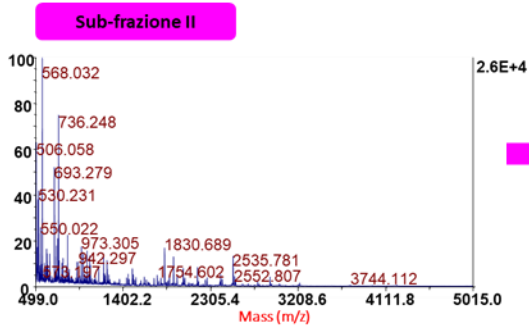
Per le sub-frazioni peptidiche I, II, III, IV, V si è eseguita un'analisi allo spettrometro di massa MALDI TOF/TOF 4800 in modo da verificare la presenza di peptidi a medio-basso peso molecolare, target della sperimentazione.

Nella figura 4.8 sono riportati gli spettri di massa delle varie singole sub-frazioni e nella colonna di destra le rispettive principali masse individuate.

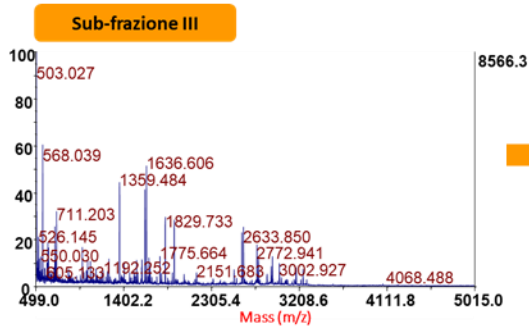
Principali masse (u.m.a.)



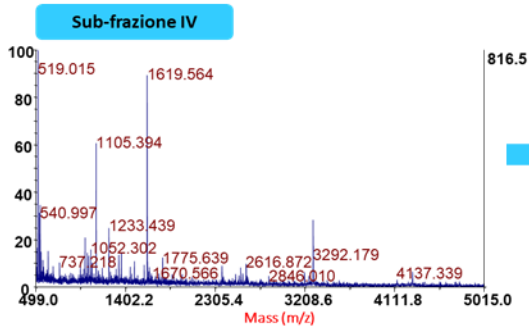
- 713, 713, 756, 807, 809, 828, 897, 828, 972, 977, 1002, 1051, 1055, 1085, 1101, 1198, 1314, 1349, 1422, 1525, 1594, 1605, 1693, 1760, 1771, 1806, 1921, 1962, 2037, 2058, 2062, 2171, 2265, 2456, 2552, 2687, 2805, 2812, 2919, 2936, 2942, 3032, 3049, 3596



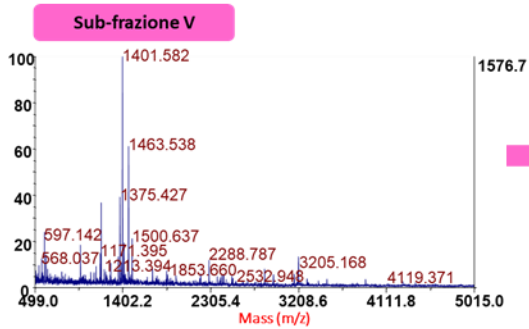
- 693, 736, 782, 830, 938, 942, 973, 993, 1031, 1059, 1152, 1202, 1212, 1269, 1499, 1506, 1622, 1722, 1754, 1829, 1830, 1921, 1958, 1971, 2011, 2021, 2031, 2038, 2167, 2179, 2248, 2210, 2407, 2424, 2535, 2552, 2757, 2790, 3075, 3744



- 629, 711, 1028, 1031, 1059, 1192, 1233, 1244, 1407, 1474, 1512, 1535, 1359, 1619, 1636, 1661, 1775, 1792, 1829, 1921, 2023, 2048, 2151, 2537, 2616, 2772, 2918, 3002, 3006, 3159, 3176, 3246, 4070



- 534, 540, 655, 947, 981, 1016, 1105, 1129, 1178, 1233, 1333, 1317, 1359, 1490, 1463, 1619, 1641, 1872, 1973, 2616, 3292, 3265, 4291



- 550, 613, 621, 629, 647, 1171, 1181, 1213, 1359, 1375, 1397, 1401, 1463, 1500, 1587, 1631, 1708, 1853, 2050, 2201, 2288, 2532, 3205, 4119

Figura 4.8: Spettri di massa delle sub-frazioni di soia fermentata digerita ottenute mediante MALDI TOF/TOF 4800. Le frazioni raccolte come indicato in figura 4.7 sono state sottoposte all'analisi allo spettrometro di massa.

4.6 Potere antiossidante *in vitro* delle sub-frazioni peptidiche: DPPH e ABTS

Analogamente a quanto fatto per la frazione peptidica 5-30% di Acn di soia fermentata digerita anche per le sub-frazioni sono stati condotti i test del DPPH e dell'ABTS. L'obiettivo infatti è stato la stima delle sub-frazioni presentanti azione protettiva contro lo stress ossidativo allo scopo di proseguire con l'identificazione dei peptidi.

Campione	DPPH' scavenging (%)	TEAC (μ M Trolox C)
I	n.d.	0.95 \pm 1.25 (n.s.)
II	n.d.	1.87 \pm 1.08 (***)
III	8.93 \pm 2.75 (*)	1.95 \pm 1.42 (***)
IV	11.55 \pm 5.83 (**)	2.64 \pm 1.32 (***)
V	11.12 \pm 6.22 (**)	2.78 \pm 1.10 (***)

Tabella 4.1: Potere antiossidante espresso come DPPH' scavenging (%) e TEAC (μ M Trolox C/mL prodotto)
Le sub-frazioni sono state analizzate ad una concentrazione 0.05 mg/mL. Per i valori riportati nella terza colonna si è costruita prima una retta di taratura con Trolox C. I valori riportati sono la media e la deviazione standard di almeno 4 prove. (n.s.) non significativo, (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$, rispetto al controllo.

In merito alla percentuale di DPPH' scavenging (tabella 4.1) delle diverse sub-frazioni analizzate alla concentrazione 0.05 mg/mL si osserva che solo le frazioni III, IV e V mostrano una buona capacità antiossidante. La medesima considerazione può essere tratta riferendosi ai valori di TEAC (μ M Trolox C/mL di prodotto) calcolati con la retta di taratura costruita con standard di Trolox C riportati in tabella 4.1. Eseguendo il saggio di scavenging dell'ABTS, pur alla medesima concentrazione, diversamente da quanto risulta dal saggio del DPPH anche le sub-frazioni I e II proteggono dall'azione radicalica, sebbene la I non in modo significativo rispetto al controllo. Tuttavia l'azione protettiva maggiore è data dalle sub-frazioni IV e V.

Per comprendere meglio l'efficacia della capacità antiossidante, indagata finora con prove *in vitro*, sia della frazione peptidica 5-30% di Acn sia delle sub-frazioni di soia fermentata digerita, si è deciso di proseguire il lavoro eseguendo una serie di studi cellulari.

4.7 Studi cellulari

Il modello cellulare usato per l'analisi del potere antiossidante delle sub-frazioni della frazione 5-30% di Acn di soia fermentata digerita è la linea Caco-2. Le cellule di tale linea,

come descritto nel paragrafo 3.6.1 dei Materiali e metodi, sono state isolate da adenocarcinoma coloretale e il loro differenziamento porta alla simulazione di una barriera intestinale.

4.7.1 Analisi della vitalità cellulare mediante saggio con MTT

Il primo saggio in cellule con cui si è valutato il potere antiossidante della frazione peptidica 5-30% di Acn e delle sub-frazioni di soia fermentata digerita, è un saggio di vitalità cellulare. Quest'ultimo si basa sulla reazione di riduzione, operata dall'enzima succinato deidrogenasi, dei sali di tetrazolio (MTT) in cristalli di formazano (paragrafo 3.6.2 dei Materiali e metodi). Lo scopo di questo saggio è in primo luogo comprendere se tali frazioni possano causare citotossicità e in secondo luogo se mostrino capacità antiossidanti in presenza di un induttore di stress ossidativo, il *ter*-butile idroperossido (TbOOH).

Le cellule sono state seminate (1×10^4) e trattate con la frazione peptidica 5-30% di Acn alle concentrazioni di 0.05 mg/mL e 0.10 mg/mL e con le sub-frazioni ad una concentrazione di 0.05 mg/mL per 24 ore. In alcuni pozzetti delle piastre da 96 *well*, dopo 2 ore di trattamento con le sub-frazioni, si è aggiunto lo stimolo ossidante, costituito da *ter*-butile idroperossido (TbOOH 200 μ M).

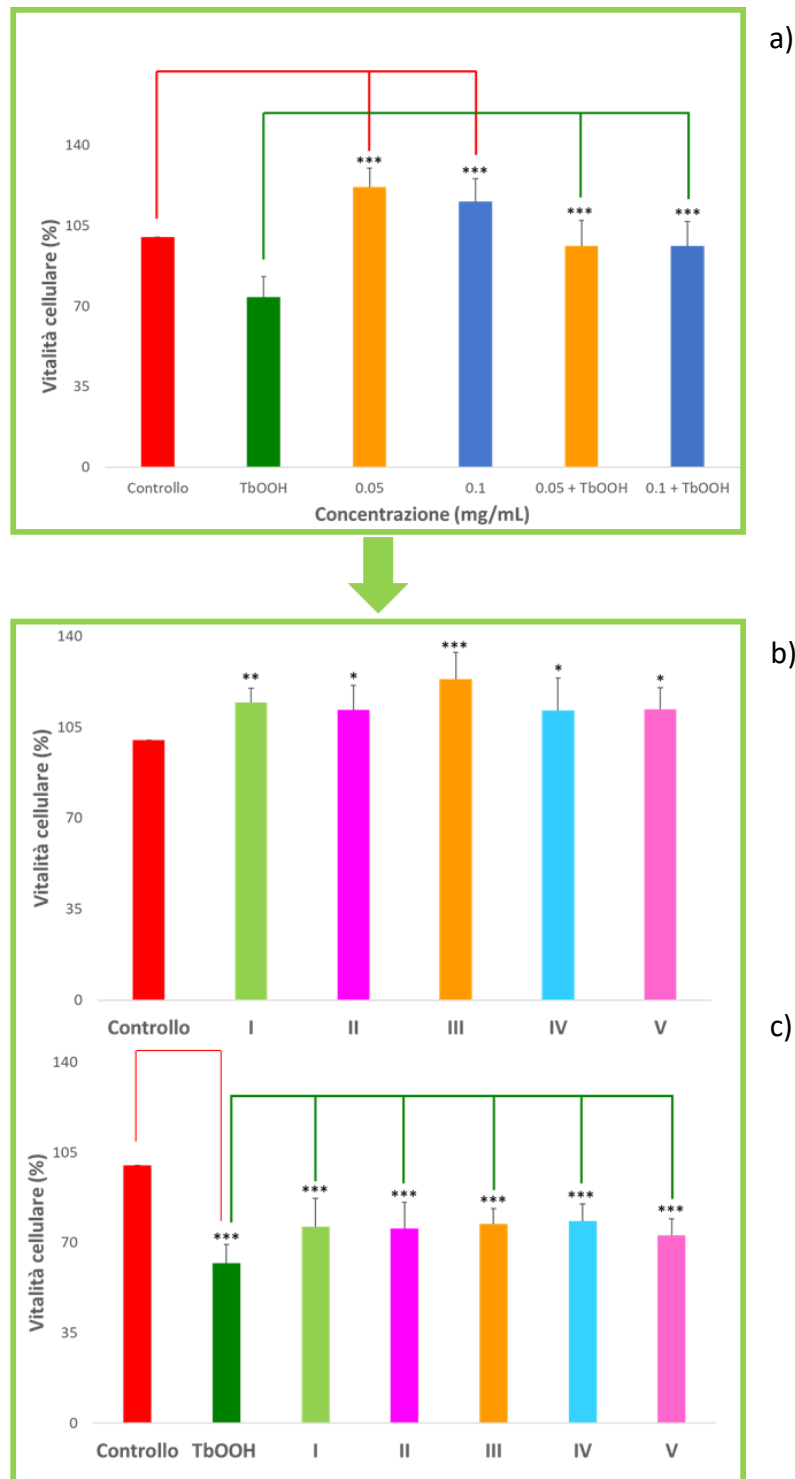


Figura 4.9: Saggi di vitalità in cellule Caco-2 in presenza o meno di induttore di stress ossidativo a seguito di pretrattamento con frazioni peptidiche di soia fermentata digerita: a) Analisi della citotossicità e della protezione dallo stress ossidativo con la frazione peptidica 5-30% di Acn. Le cellule sono state trattate con la frazione peptidica a due diverse concentrazioni: 0.05 e 0.10 mg/mL. Lo stress ossidativo è stato indotto con TbOOH 200 μ M. (***) $P < 0.001$, rispetto al controllo (■) e al TbOOH (■). **b) Analisi della citotossicità con le sub-frazioni di soia fermentata digerita derivanti dalla frazione peptidica 5-30% di Acn.** Le cellule sono state trattate con le sub-frazioni a concentrazione 0.05 mg/mL. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$, (***) $P < 0.001$, rispetto al controllo. **c) Analisi della protezione dallo stress ossidativo con le sub-frazioni di soia fermentata digerita derivanti dalla frazione peptidica 5-30% di Acn.** La vitalità cellulare è stata valutata in cellule trattate con le sub-frazioni alla medesima concentrazione del pannello b e con TbOOH 200 μ M. (***) $P < 0.001$, rispetto al controllo e rispetto al campione trattato con TbOOH.

Nella figura 4.9 sono riportate le percentuali di vitalità delle cellule trattate con le frazioni peptidiche in presenza o meno di induttore di stress ossidativo. La frazione peptidica 5-30% di Acn ad entrambe le concentrazioni (a) non mostra citotossicità determinando un lieve incremento di vitalità cellulare. In egual modo, alla concentrazione testata di 0.05 mg/mL, le sub-frazioni non mostrano alcuna citotossicità (b). Le cellule trattate con la frazione peptidica 5-30% di Acn a cui è stato indotto lo stress ossidativo ad entrambe le concentrazioni rispondono positivamente evidenziando un aumento di vitalità (a). Anche per quelle trattate con le sub-frazioni peptidiche si può trarre la medesima conclusione (c).

Da questi risultati si può dedurre che all'interno della frazione 5-30% di Acn di soia fermentata digerita ed in particolare nelle sue sub-frazioni sono presenti dei peptidi bioattivi con attività antiossidante.

4.7.2 Analisi della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

A comprova del potere antiossidante delle sub-frazioni si è eseguita la misura della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Per fare questo test (paragrafo 3.6.3 dei Materiali e metodi) si sono seminate le cellule Caco-2 in piastre da 96 *well* (1×10^4) che sono state pretrattate per 24 h con le sub-frazioni peptidiche ad una concentrazione di 0.05 mg/mL. Lo stimolo ossidativo è stato indotto mediante uso di TbOOH 250 μ M. La produzione di ROS si è monitorata tramite sonda CM-H₂DCFDA che, a contatto con specie radicaliche, si ossida e diventa fluorescente. Per tale motivazione quindi l'aumento della produzione di ROS nel tempo è proporzionale ad un aumento di fluorescenza.

Nella figura 4.10 sono riportate le cinetiche di un esperimento modello e l'istogramma che rappresenta i valori di fluorescenza a 5000 sec in condizioni basali e in presenza di TbOOH di 4 esperimenti.

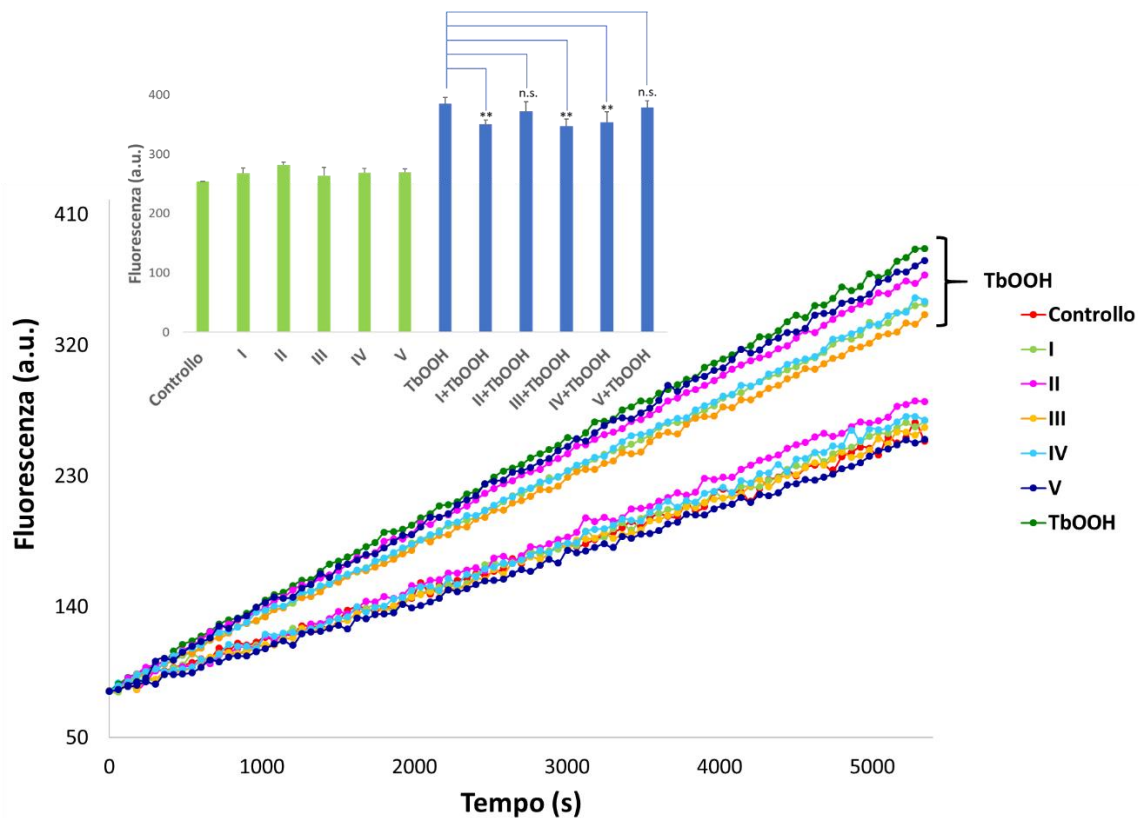


Figura 4.10: Produzione di ROS in presenza delle sub-frazioni di soia fermentata digerita dopo HPLC. Nell'inserto sono riportate medie e deviazioni standard a 5000 s dei 4 esperimenti. Sono inoltre indicate le comparazioni delle medie con il controllo trattato (blu: in presenza del TbOOH). (n.s.) non significativo, (**) $P < 0.01$ rispetto al controllo trattato.

È possibile vedere che in condizioni basali le sub-frazioni non mostrano *di per sé* indurre importanti variazioni nella produzione di ROS rispetto al controllo. Sotto stimolo ossidativo invece si denota che le sub-frazioni causano una riduzione moderata nella produzione di ROS, in particolar modo le sub-frazioni I, III e IV, dove si denota una significatività statistica. Come si osserva da questo risultato anche la sub-frazione I mostra un discreto potere antiossidante, seppur *in vitro* non era risultato manifesto. Questo aspetto sarà discusso successivamente.

4.7.3 Analisi dell'assorbimento della frazione 5-30% e delle sub-frazioni in cellule Caco-2

A questo punto si è analizzata la capacità delle diverse sub-frazioni di attraversare la barriera intestinale sfruttando la facoltà delle cellule della linea Caco-2 di differenziarsi simulando tale barriera, sia a livello strutturale sia a livello funzionale. Queste cellule infatti, dopo 21 giorni di crescita su piastre *Transwell*[®], si differenziano in cellule colonnari e polarizzate che esibiscono a livello apicale microvilli ben sviluppati, esattamente come

gli enterociti intestinali. In questo modo vengono ricreate le condizioni atte a mimare quello che accade durante la fase di assorbimento intestinale, in modo da comprendere quali piccole molecole, come i peptidi, riescono a giungere ai vasi sanguigni e linfatici. Le piastre *Transwell*[®] sono progettate in modo da separare due compartimenti: quello apicale e quello basolaterale.

Si è deciso di somministrare ai diversi campioni di cellule 75 µg di frazioni peptidiche procedendo all'analisi dell'assorbimento come descritto nel paragrafo 3.6.6 dei Materiali e metodi. Le soluzioni dei comparti apicale e basolaterale sono state raccolte dopo 10 minuti e dopo 120 minuti e sottoposte ad un'analisi HPLC (figura 4.11). I campioni ai 120 minuti sono stati ulteriormente analizzati allo spettrometro di massa (figura 4.12).

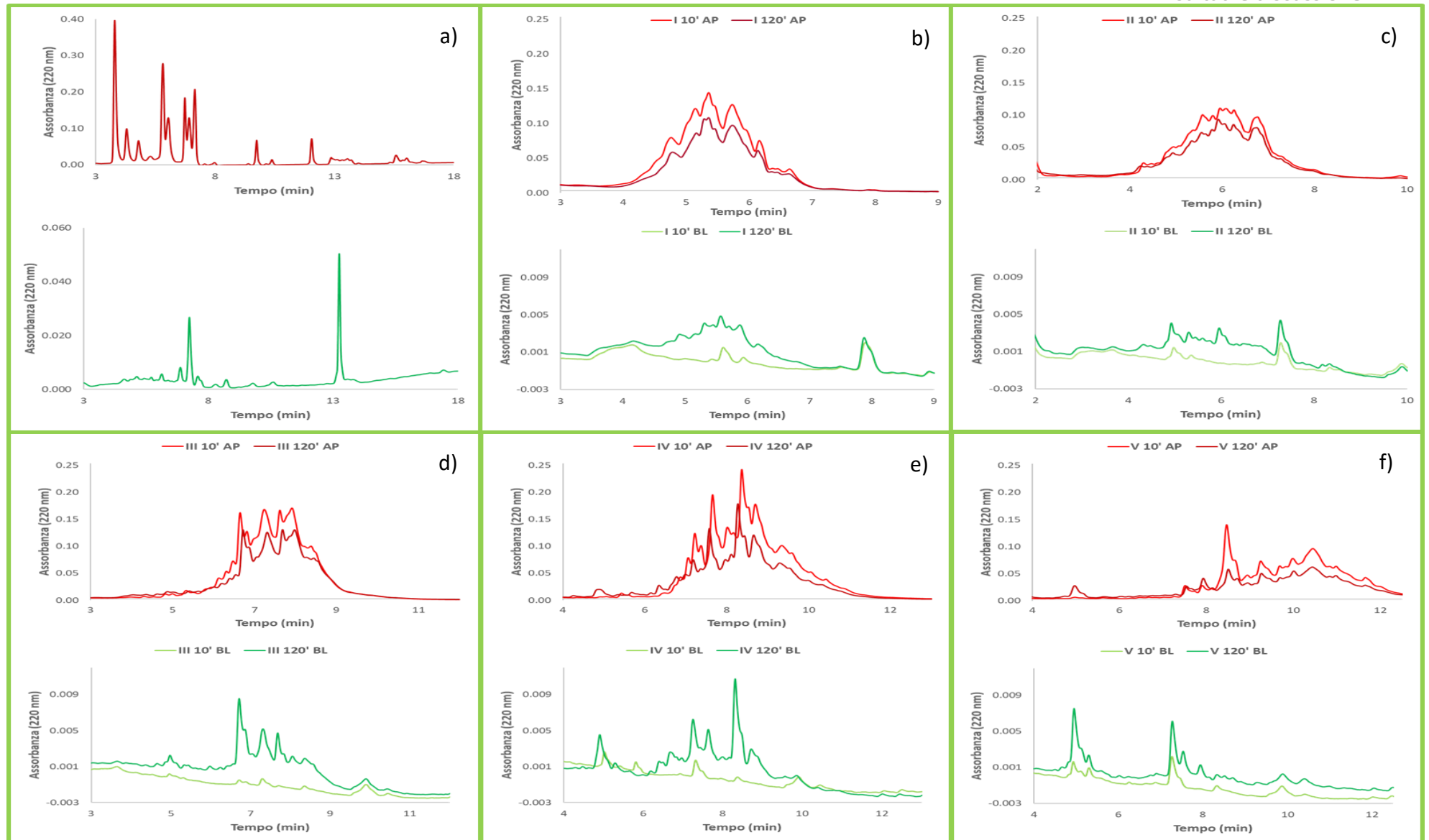


Figura 4.11: Cromatogrammi delle frazioni peptidiche ottenuti dall'HPLC dopo l'analisi dell'assorbimento: a) frazione 5-30% di Acn di soia fermentata digerita; b) sub-frazione I; c) sub-frazione II; d) sub-frazione III; e) sub-frazione IV; f) sub-frazione V. In ogni pannello nella parte alta è rappresentato il contenuto apicale (AP) mentre nella parte bassa quello basolaterale (BL). Le soluzioni del comparto apicale e basolaterale della frazione 5-30% di Acn di soia fermentata digerita sono state raccolte solamente dopo 120'.

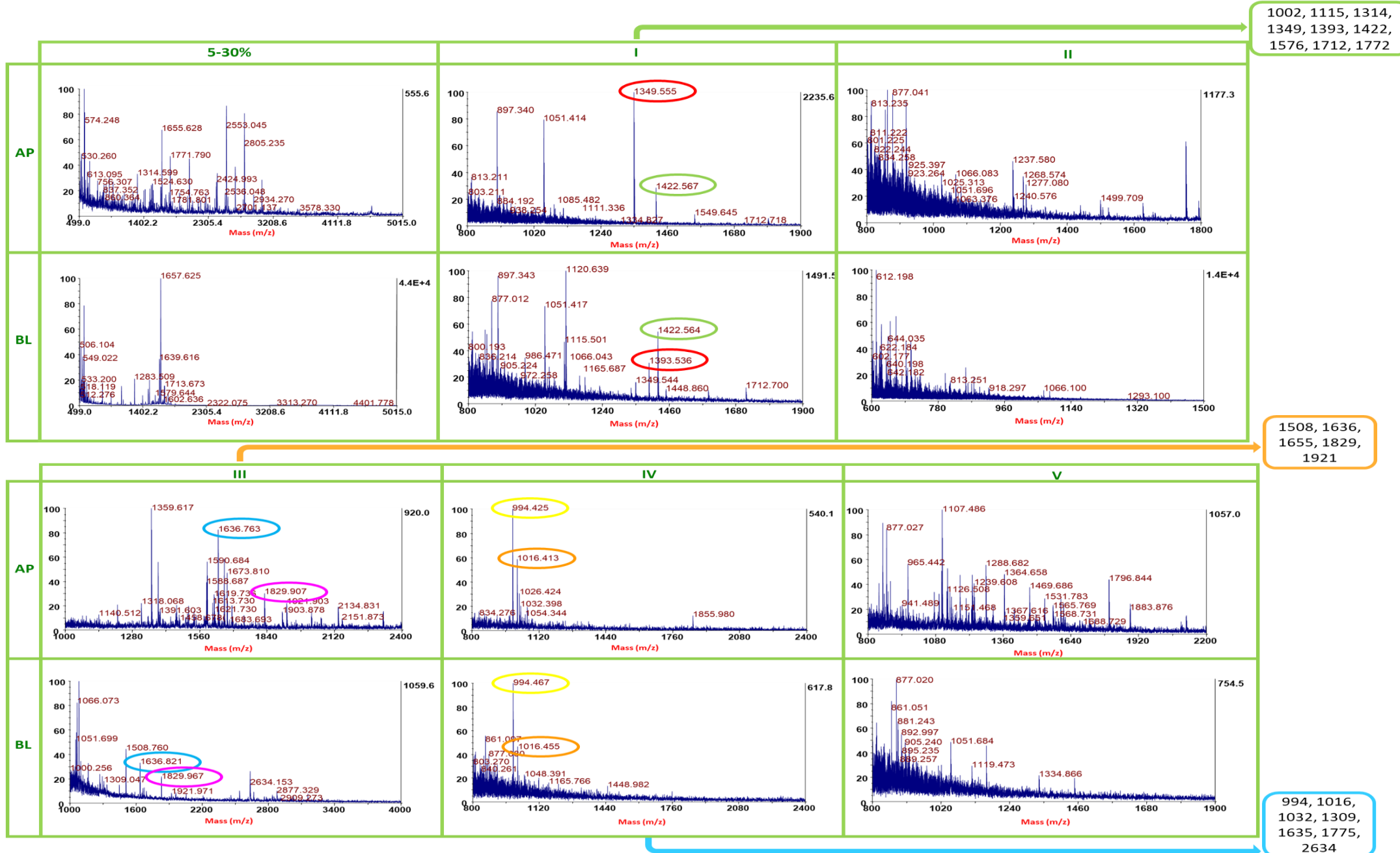


Figura 4.12: Spettri di massa dell'analisi dell'assorbimento dopo 120 minuti. I pannelli a differenti zoom si riferiscono agli spettri di massa relativamente ai comparti apicale (AP) e basolaterale (BL) dopo l'analisi dell'assorbimento della frazione 5-30% di Acn delle sub-frazioni I, II, III, IV e V di soia fermentata digerita. A lato sono riportate le masse più rilevanti espresse in u.m.a. dei peptidi che si ritrovano sia nel comparto apicale sia nel comparto basolaterale delle sub-frazioni I, III e IV.

Le sub-frazioni peptidiche somministrate alle cellule sono state valutate a tempi diversi in quanto, da esperimenti precedenti, il tempo di 120 minuti è considerato sufficiente per osservare l'eventuale passaggio dei peptidi dal comparto apicale (AP) a quello basolaterale (BL). Infatti come si può osservare, tutte le diverse sub-frazioni peptidiche (figura 4.11 b-f) valutate nel comparto AP dopo 120 minuti mostrano un netto decremento del contenuto peptidico se confrontate con il campione prelevato dopo 10 minuti. Questo potrebbe essere dovuto o alla loro degradazione/modificazione o al passaggio dei peptidi attraverso il comparto basolaterale. Per questo motivo si è voluto studiare il contenuto peptidico nel comparto basolaterale sia dopo 10 minuti sia dopo 120 minuti. Si è notato che, pur in quantitativo limitato, ma in linea con quello che si ritrova in letteratura per questo tipo di sperimentazione, le sub-frazioni I, III e IV risultano esserci anche nel comparto BL. Quindi il primo importante risultato è che i peptidi presenti, almeno per alcune frazioni, sono in grado di attraversare l'epitelio intestinale. Non tutte le frazioni hanno avuto il medesimo comportamento, in quanto sia per la frazione di partenza 5-30% Acn sia per le frazioni II e V, non si sono rilevate masse apprezzabili di interesse. Questo potrebbe essere dovuto o al contenuto peptidico troppo ridotto, o alla lunghezza dei peptidi. Inoltre le cellule possono svolgere un'azione di degradazione/modificazione dei peptidi stessi. Pertanto affiancata all'analisi HPLC appena descritta si è operata una valutazione quantitativa allo spettrometro di massa MALDI TOF/TOF 4800 della frazione 5-30% di Acn e delle sub-frazioni I, II, III, IV, V con i relativi campioni apicali e basolaterali a 120 minuti. Alcuni peptidi, come riportato nei diversi zoom di figura 4.12, si ritrovano con la stessa massa atomica sia nel comparto apicale sia in quello basolaterale nel caso delle frazioni I, III e IV. Questo risultato è di notevole interesse, dato che le frazioni in grado di attraversare la barriera epiteliale, sono le stesse che hanno mostrato di ridurre la produzione di ROS come evidenziato nel paragrafo 4.7.2. In dettaglio alcuni peptidi che si ritrovano nel comparto apicale e basolaterale per la sub-frazione I sono: 1002 u.m.a., 1115 u.m.a., 1314 u.m.a., 1349 u.m.a., 1393 u.m.a., 1422 u.m.a., 1576 u.m.a., 1712 u.m.a., 1772 u.m.a. Analogamente quelli per la sub-frazione III sono: 1508 u.m.a., 1636 u.m.a., 1655 u.m.a., 1829 u.m.a. e 1921 u.m.a., e infine quelli per la sub-frazione IV: 994 u.m.a., 1016 u.m.a., 1032 u.m.a., 1309 u.m.a., 1635 u.m.a., 1775 u.m.a., 2634 u.m.a. In figura sono evidenziati solo i principali peptidi relativi ai due

comparti. Con l'impiego dello spettrometro di massa (MALDI TOF/TOF 4800) non possiamo rilevare masse molto piccole.

Lo sviluppo immediato del lavoro sarà quello di determinare la sequenza amminoacidica dei peptidi facendo uso sia di analisi massa/massa (*de novo sequencing*) sia di tools bioinformatici quali MASCOT. Una volta nota la sequenza si procederà con la sintesi di tali peptidi per via chimica per ricercare nello specifico quello/i con maggiore potere antiossidante e capirne il meccanismo molecolare.

5 Conclusioni

La soia fermentata è un alimento da cui si possono ottenere molecole ad attività biologica come i peptidi bioattivi, la cui azione è esplicata localmente o a livello sistemico a seguito della loro liberazione a partire dalla proteina nativa [Karami *et al.*, 2019; Korhonen *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2017]. Le proprietà dei peptidi bioattivi sono molteplici, infatti possono presentare azione antipertensiva, oppioide, antimicrobica ed antiossidante. È stata proprio la ricerca di peptidi bioattivi ad attività antiossidante in soia fermentata la tematica principale di questo lavoro di tesi.

I campioni di soia fermentata analizzati nella parte sperimentale sono stati prodotti dalla Centrale del Latte di Vicenza (CLV) utilizzando batteri lattofermentanti dei ceppi *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Lo studio si è rivolto a diversi aspetti tra cui l'estrazione dei peptidi bioattivi presenti nel prodotto fermentato e la loro analisi *in vitro* per verificarne il potere antiossidante. In un secondo tempo si è sottoposto il prodotto a una simulata digestione gastrointestinale *in vitro*, processo utile per l'ottenimento ulteriore di peptidi bioattivi.

Si è proceduto inizialmente con un confronto tra la matrice di soia fermentata con quella non fermentata determinandone la perossidazione lipidica ed effettuandone la valutazione della proteolisi nel tempo. Quantificando la produzione di malondialdeide e quindi la lipoperossidazione si è visto che la soia fermentata possiede una capacità antiossidante superiore a quella non fermentata. Per quanto riguarda la proteolisi, si è osservato che i batteri fermentanti portano avanti la loro azione con conseguente aumento della frammentazione proteica durante tutta la *shelf life* (dati non riportati). Tali esiti hanno dato conferma all'ipotesi che la fermentazione sia un processo che favorisce la liberazione di peptidi bioattivi ad azione antiossidante dalle proteine native. Per incrementare la liberazione dei peptidi si è inoltre simulata la digestione gastrointestinale *in vitro* attraverso le fasi orale, gastrica e intestinale. Per fare questo ci si è avvalsi di due miscele di preparati enzimatici quali la pepsina e la pancreatina, in grado di digerire le proteine della matrice. Verificata tramite gel elettroforesi l'avvenuta digestione delle proteine, si è passati alla fase di purificazione delle frazioni peptidiche risultanti.

Per poter purificare i peptidi bioattivi di nostro interesse si è ricorsi a diverse tappe cromatografiche. Tramite una cromatografia a step che ha richiesto l'uso di una colonna

STRATA C18-E si è ottenuta la frazione 5-30% di Acn di soia fermentata digerita. Questo è stato uno step determinante per scartare tutte le proteine di medio/alto peso molecolare residuali. Si è confermata la presenza di peptidi in tale frazione mediante spettrometria di massa, osservando un grande arricchimento in peptidi con masse oscillanti tra 600 u.m.a e 1200 u.m.a. In secondo luogo si è voluto verificare il potere antiossidante della frazione peptidica ottenuta tramite due test di *scavenging* radicalico: il saggio del DPPH e il saggio dell'ABTS. Si è visto che la frazione 5-30% di Acn di soia fermentata digerita mostra potere antiossidante. Proprio per questa motivazione si è proseguito lo studio con un'ulteriore tappa cromatografica ottenendo a partire dalla frazione 5-30% di Acn di soia fermentata digerita 6 sub-frazioni peptidiche per mezzo di un'analisi HPLC su colonna preparativa SNAP KP-C18-HS. Le sub-frazioni ottenute (figura 4.7) sono state nuovamente analizzate ed hanno evidenziato potere antiossidante sia *in vitro* sia in ambito cellulare. Utilizzando la linea cellulare Caco-2, si è studiata la potenziale citotossicità sia della frazione 5-30% di soia fermentata digerita sia delle sue sub-frazioni in un modello cellulare. Dai dati di vitalità ottenuti con *MTT test* i peptidi non hanno mostrato effetti di citotossicità ad una concentrazione 0.05 mg/mL. Inoltre le frazioni hanno evidenziato di proteggere, in modo significativo, le cellule da un induttore di stress ossidativo, come il TbOOH. Si è dimostrato poi che sia la frazione 5-30% di Acn di soia fermentata digerita sia le sue sub-frazioni sono capaci di ridurre la produzione di ROS a seguito di induzione di stimolo ossidativo. In particolare si sono dimostrate efficaci le sub-frazioni I, III e IV.

Acquisiti tali risultati si è deciso di proseguire lo studio andando ad analizzare cosa accade alle frazioni peptidiche dopo l'assorbimento intestinale, per valutare qual è la loro biodisponibilità a livello dell'organismo per poi essere portati ai diversi organi target dove esplicare il loro effetto benefico. Per farlo si è nuovamente utilizzata la linea cellulare Caco-2 dopo il suo differenziamento. È emerso dall'analisi dell'assorbimento che, somministrando alle cellule la frazione 5-30% di Acn di soia fermentata digerita e la sub-frazione II e V, il contenuto peptidico che si ritrova nel comparto basolaterale è molto limitato. Tale contenuto invece è rilevabile nelle sub-frazioni III e IV ed in particolare nella I. Questo è dovuto alla capacità di alcuni peptidi che vi sono in tali sub-frazioni di attraversare l'epitelio intestinale simulato.

La parte sperimentale di questa ricerca è terminata con la determinazione delle masse dei peptidi in grado di passare dal comparto apicale al comparto basolaterale. È emerso che,

in linea con quanto osservato con lo studio della produzione di ROS, solamente all'interno delle sub-frazioni III, IV e in particolare nella I sono presenti peptidi con tale caratteristica. Concludendo, dal prodotto di partenza, soia fermentata, anche grazie al processo digestivo, si possono ottenere peptidi bioattivi in grado di essere assorbiti a livello intestinale. Di queste frazioni peptidiche ne è stata evidenziata la capacità antiossidante. Ora si tratta di procedere con l'identificazione dei principali peptidi presenti, soprattutto quelli della sub-frazione I, arrivando a determinarne la loro sequenza. Dalle sequenze ottenute si potranno fare ipotesi struttura/funzione e passare poi alla sintesi di alcuni peptidi in quantità rilevante per essere singolarmente somministrati alle cellule. Da questo studio inoltre è emerso un aspetto molto interessante: non sempre le frazioni attive nei test *in vitro* come antiossidanti mantengono la loro potenzialità in ambito cellulare e viceversa. Le molecole antiossidanti infatti, similmente a quanto si può dire per altre molecole come gli isotiocianati, all'interno della cellula sono coinvolte nel *signaling* cellulare, assumendo la funzione di attivatori della trascrizione genica di enzimi di fase II. La via attivata potrebbe essere quella di Nrf2-Keap1 (figura 5.1).

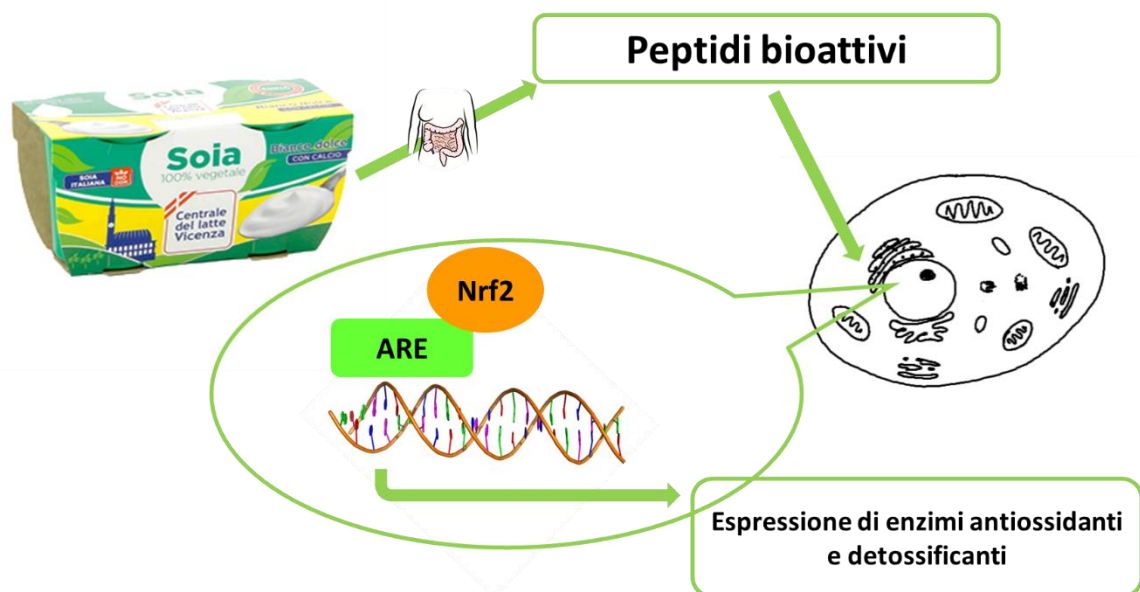


Figura 5.1: Ipotetica azione dei peptidi bioattivi sul signaling cellulare

Tale via di segnale fa sì che venga stimolata la trascrizione di geni che codificano per enzimi come la superossido dismutasi, la catalasi, la glutatione perossidasi e la tioredossina riduttasi, in grado di contrastare l'azione dei radicali liberi [Bellezza *et al.*, 2018; Tonolo *et al.*, 2019 a]. La prospettiva immediata e futura è quella di arrivare a proporre tali peptidi come *functional food*, rendendoli addizionabili ai prodotti di partenza.

6 Bibliografia

Battistini C., Gullón B., Ichimura E.S., Pereira Gomes A.M., Ribeiro E.P., Kunigk L., Vieira Moreira J. U., Jurkiewicz C. Development and characterization of an innovative synbiotic fermented beverage based on vegetable soybean. *Brazilian journal of microbiology*, **2018**, 49, 303–309.

Belitz. H.-D., Grosch W., Schieberle P. *Food chemistry*, **2009**. IV ed. Springer, Berlino, Germania.

Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *BBA-molecular cell research*, **2018**, 1865, 721-733.

Beuchat L.R., Sarkar P.K., Nout M.J.R. Indigenous fermented food. In: Doyle M.P. *et al.* (eds) *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, **2007**. III ed. ASM Press, Washington, D.C., Stati Uniti.

Bindoli A., Cavallini L. *I radicali liberi. Aspetti biochimici e medici*, **1980**. I ed., Piccin Editore, Padova, Italia.

Bindoli A., Rigobello M.P. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. *Antioxidant and redox signaling*, **2013**, 18, 1557-1593.

Boelsterli U.A. *Mechanistic toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets*, **2009**. II ed. Informa, Londra, Regno Unito.

Boué S., Carter C.H., Ehrlich K.C., Cleveland T.E. Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2000**, 48, 2167–2172.

Brodkorb A., Egger L., Alminger M., Alvito P., Assunção R., Ballance S., Bohn T., Bourlieu-Lacanal C., Boutrou R., Carrière F., Clemente A., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Edwards C., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A.R., Martins C., Marze S., McClements D.J., Ménard O., Minekus M., Portmann R., Santos C.N., Souchon I., Singh R.P., Vegarud G.E., Wickham M.S.J.,

Weitschies W., Recio I. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, **2019**, 14, 991-1014.

Cabras P., Martelli A. *Chimica degli alimenti*, **2004**. Piccin Editore, Padova, Italia.

Capriotti A.L., Caruso G., Cavaliere C., Samperi R., Ventura S., Zenezini Chiozzi R., Laganà A. Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *Journal of food composition and analysis*, **2015**, 44, 205-213.

Carratù B., Sanzini E. Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annali dell'istituto superiore di sanità*, **2005**, 41, 7-16.

Citta A., Folda A., Scalcon V., Scutari G., Bindoli A., Bellamio M., Feller E., Rigobello M.P. Oxidative changes in lipids, proteins and antioxidants in yogurt during the shelf life. *Food science & nutrition*, **2017**, 5, 1079-1087.

Cordle C.T. Soy protein allergy: incidence and relative severity. *The journal of nutrition*, **2004**, 134, 1213-1219.

Davies M.J. Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical journal*, **2016**, 473, 805-825.

Duda-Chodak A., Tarko T., Statek M. The effect of antioxidants on *Lactobacillus casei* cultures. *ACTA scientiarum polonorum technologia alimentaria*, **2008**, 7, 39-51.

El-Shemy H.A. *Soybean and health*, **2011**. InTech, Rijeka, Croazia.

Görlach A., Dimova E.Y., Petry A., Martínez-Ruiz A., Hernansanz-Agustín P., Rolo A.P., Palmeira C.M., Kietzmann T. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and disease: problems solved?. *Redox biology*, **2015**, 6, 372-385.

Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, **2012**, 86, 345-391.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*, **2015**. V ed. Oxford university press, Oxford, Regno Unito.

Haug A., Høstmark A. T., Harstad O. M. Bovine milk in human nutrition-a review. *Lipids in health and disease*, **2007**, 6, 1-16.

- Jones G., Koszewski W.** *A Guide to soy food*, 2002. University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska, Stati Uniti.
- Jooyandeh H.** Soy products as healthy and functional foods. *Middle-East journal of scientific research*, 2011, 7, 71-80.
- Karami Z., Akbari-adergani B.** Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of food science and technology*, 2019, 56, 535-547.
- Korhonen H.** Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of functional foods I*, 2009, 1, 177–187.
- Kruger N.J.**, The Bradford method for protein quantitation. In: Walker J.M. (eds) *The protein protocols handbook*, 2009. III ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, Stati Uniti.
- Lea T.**, Caco-2 cell line. In: Verhoeckx K. *et al.* (eds) *The impact of food bioactives on health*, 2015. I ed. Springer, Berlino, Germania.
- Li-Chan, E. C. Y.** Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current opinion in food science*, 2015, 1, 28–37.
- Liu S., Han Y., Zhou Z.** Lactic acid bacteria in traditional fermented chinese foods. *Food research international*, 2011, 44, 643-651.
- Lorenzo J.M., Munekata P.E.S., Gòmez B., Barba F.J., Mora L., Pérez-Santaescolástica C., Toldrà F.** Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – a review. *Trends in food science and technology*, 2018, 79, 136-147.
- Minekus M., Alminger M., Alvito P., Ballance S., Bohn T., Bourlieu C., Carrière F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Egger L., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A., Marze S., McClements D.J., Ménard O., Recio I., Santos C.N., Singh R.P., Vegarud G.E., Wickham M.S.J., Weitschies W., Brodkorb A.** A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and function*, 2014, 5, 1113-1124.

Mohanty D.P., Mohapatra S., Misra S., Sahu P.S. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health- a review. *Saudi journal of biological sciences*, **2016**, 23, 577-583.

Nehir El S., Karakaya S., Simsek S., Dupont D., Menfaatlic E., Eker A.T. In vitro digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides. *Food and function*, **2015**, 6, 2322.

Sánchez A., Vázquez A. Bioactive peptides: a review. *Food Quality and Safety*, **2017**, 1, 29-46.

Sanjukta S., Rai A.K. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. *Trends in food science & technology*, **2016**, 50, 1-10.

Sarmadi B.H., Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, **2010**, 31, 1949-1956.

Şengül M., Erkaya T., Şengül M., Yildiz H. The effect of adding sour cherry pulp into yoghurt on the physicochemical properties, phenolic content and antioxidant activity during storage. *International journal of dairy technology*, **2012**, 65, 429-436.

Setchell K., Brown N.M., Zimmer-Nechemias L., Brashear W.T., Wolfe B.E., Kirschner A., S., Heubi J.E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *The american journal of clinical nutrition*, **2002**, 76, 447-453.

Shibamoto T., Bjeldanes L. *Introduction to food toxicology*, **2009**, Elsevier, Amsterdam, Paesi Bassi.

Sies H., Berndt C., Jones D.P. Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, **2017**, 86, 715-748.

Srinivasan B., Kolli A.R., Esch M.B., Abaci H.E., Shuler M.L., Hickman J.J. TEER Measurement Techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation*, **2015**, 20, 107-126.

Terefe N.S., *Food fermentation*, **2016**, Elsevier, Amsterdam, Paesi Bassi.

Tonolo F., Folda A., Cesaro L., Scalcon V., Marin O., Ferro S., Bindoli A., Rigobello M.P. Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Under revision to Journal of functional foods*, **2019 (a)**.

Tonolo F., Moretto L., Ferro S., Folda A., Scalcon V., Sandre M., Fiorese F., Marin O., Bindoli A., Rigobello M.P. Insight into antioxidant properties of milk-derived bioactive peptides in vitro and in a cellular model. *Journal of peptide science*, **2019 (b)**, 25, 1-7.

Tonolo F., Moretto L., Folda A., Scalcon V., Bindoli A., Bellamio M., Feller E., Rigobello M.P. Antioxidant properties of fermented soy during shelf life. *Plant foods for human nutrition*, **2019 (c)**, 74, 287-292.

van Meerloo J., Kaspers G.J.L., Cloos J. Cell sensitivity assays: The MTT assay. In: Cree I. (eds) *Cancer cell culture. Methods in molecular biology (methods and protocols)*, **2011**. I ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, Stati Uniti.

Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D., Wichers H. *The impact of food bioactives on health*, **2015**. I ed. Springer, Berlino, Germania.

Wojtala A., Bonora M., Malinska D., Pinton P., Duszynski J., Wieckowski M.R. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. In Galluzzi L. *et al.* (eds) *Methods in enzymology*, **2014**. I ed. Elsevier, Amsterdam, Paesi Bassi.

Appendice A

Parametro	Valore medio (g / 100 g di prodotto)
Proteine totali	4.47 ± 0.28
Carboidrati totali	3.35 ± 0.61
Fruttosio	0.07 ± 0.01
Saccarosio	2.65 ± 0.42
Fibre	0.68 ± 0.34
Grassi totali	2.79 ± 0.17
	Percentuale (%)
Grassi acidi saturi	15.83 ± 0.78
Grassi acidi monoinsaturi	27.60 ± 0.94
Grassi acidi polinsaturi	56.57 ± 1.47

Tabella A.1: Contenuto in termini di proteine, carboidrati e grassi in 100 g della base del dessert vegetale di soia fermentata oggetto dello studio [Tonolo et al., 2019 c].

	Base di soia non fermentata (mg/Kg)	Soia fermentata (mg/Kg)
Daidzina	47.5±4.8	60.2±6.1
Glicitina	5.9±0.7	6.3±0.7
Genistina	73.9±7.4	94.3±9.5
Malonil daidzina	75.8±7.6	65.3±6.6
Malonil glicitina	3.0±0.5	4.6±0.6
Malonil genistina	124.0±12.0	102.0±10.0
Daidzeina	1.9±0.4	3.9±0.5
Gliciteina	1.9±0.4	3.9±0.5
Genisteina	10.7±1.1	8.3±0.9
Isoflavoni totali	344.6±16.8	348.9±16.5
Polifenoli totali	493.0±49.0 g/100 g	395.0±40.0 g/100g
Alfa-tocoferolo	0.1±0.07 mg/100g	0.1±0.07 mg/100g
Delta-tocoferolo	0.8±0.1 mg/100g	0.7±0.1 mg/100g
Gamma-tocoferolo	1.7±0.3 mg/100g	1.6±0.24 mg/100g
Tocoferoli totali	2.6±0.3 mg/100g	2.3±0.3 mg/100g

Tabella A.2: Quantificazione dei composti fenolici e dei tocoferoli in soia fermentata e non fermentata [Tonolo et al., 2019 c].

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto la professoressa Maria Pia Rigobello e i professori Alessandro Bertoli, Alberto Bindoli e Guido Scutari per la loro disponibilità e per avermi insegnato molto, grazie alla grande passione che mettono nel loro lavoro.

Un grazie speciale va alle persone che mi hanno seguita e accolta nel laboratorio dove ho svolto la tesi in quanto mi hanno aiutata a muovere i miei primi passi in autonomia nell'impervio mondo del lavoro.

Si ringrazia il professor Oriano Marin e il Suo laboratorio, in particolare Federico, per la collaborazione nelle parti sperimentali riguardanti le analisi dei peptidi.

Si ringrazia la Centrale del Latte di Vicenza, in modo particolare il direttore Dott. Emiliano Feller, per la disponibilità e per la fornitura dei campioni con le relative schede tecniche e le informazioni inerenti al processo di produzione.

Voglio ringraziare con tutto il cuore mio nonno Tiziano che, anche se ora è lassù, mi è sempre stato affianco incoraggiandomi, avendo fiducia nelle mie capacità e spingendomi a scoprire sempre qualcosa di nuovo.

Uno speciale grazie va alla mia famiglia e in particolare ai miei genitori, Rossella e Roberto, e a mia nonna Ileana, persone splendide, generose e di buon cuore che mi hanno accompagnata e sostenuta durante questo percorso ricco di sfide, sacrifici e soddisfazioni.

Ringrazio Gabriele che mi è rimasto accanto dandomi amore e al cui fianco vorrei affrontare tutte le altre prove che la vita ha da offrirmi.

Un grazie va ai miei amici e soprattutto ai miei compagni di Università, in particolare Lele, Giordi e Fede, su cui posso sempre contare e con cui ho condiviso degli anni meravigliosi di lezioni, esami e soprattutto risate.

Grazie a tutti,

Giulia