

Caratterizzazione biochimica di un latte fermentato di pecora con batteri lattici autoctoni: YoAlp®

Tania FLUTTO, Mathieu MERLET, Laura THEDY, Luca VERNETTI-PROT, Sabina VALENTINI
Institut Agricole Régional - Regione La Rochère1/A, 11100 Aosta, Italia

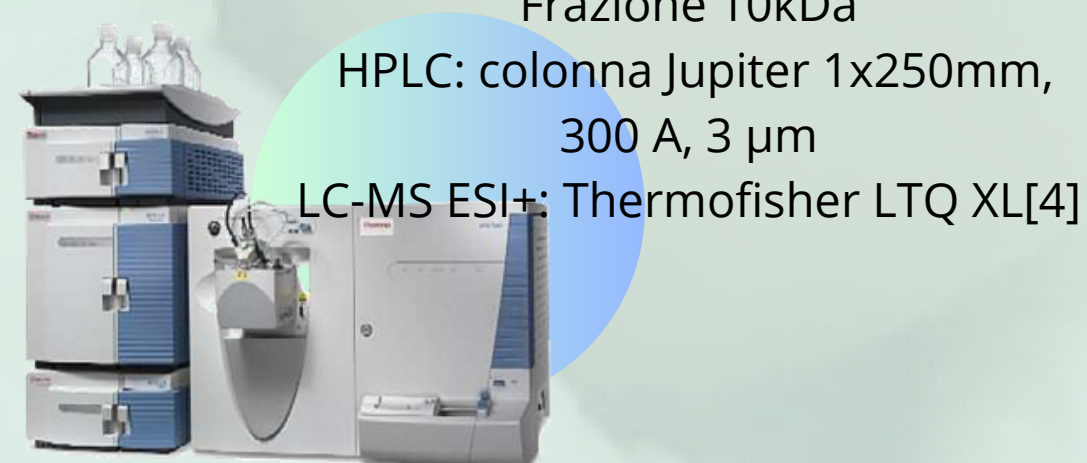
INTRODUZIONE

Il latte di pecora ed i suoi prodotti derivati, in particolare i latti fermentati, stanno acquistando sempre più importanza dal punto di vista nutrizionale grazie all'elevato contenuto in componenti ad alto valore biologico [1-3]. Questi effetti benefici sono attribuibili alla presenza di numerosi peptidi bioattivi, derivanti dalle attività di proteolisi, con potenziale effetto antipertensivo, antiossidante, antinfiammatorio, ipoglicemizzante, ipocolesterolizzante ed antibatterico. La presenza di queste molecole è fortemente influenzata dalla microflora batterica coinvolta, volontariamente o involontariamente, nel processo produttivo e dalle tecniche e parametri di trasformazione adottati. Scopo del presente lavoro è stata la messa a punto e la caratterizzazione, da un punto di vista microbiologico e biochimico, di un latte fermentato ottenuto da latte ovino proveniente da animali allevati in Valle d'Aosta mediante l'utilizzo della coltura starter YoAlp® messa a punto dall'Istitut Agricole Régional a partire da ceppi di batteri lattici (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii*) selezionati sul territorio valdostano. Nel presente lavoro verranno presentati i risultati della caratterizzazione biochimica.

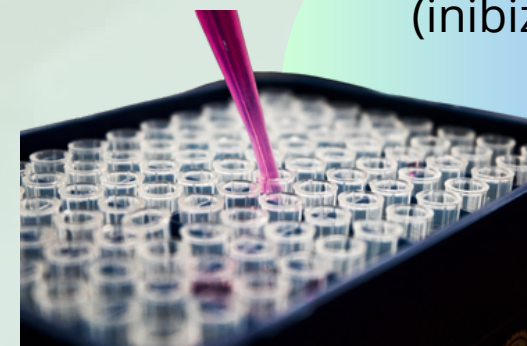
MATERIALI & METODI

Peptidi bioattivi

Frazione 10kDa
HPLC: colonna Jupiter 1x250mm, 300 A, 3 µm
LC-MS ESI+: ThermoFisher LTQ XL[4]

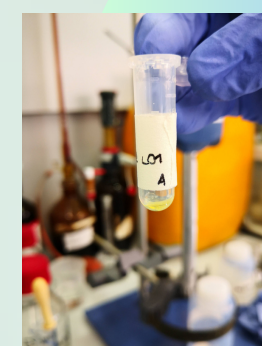


Letture di micropiastre Tecan Infinite 200 Pro
Attività ipoglicemizzante (inibizione di 10 µl di DPP-IV estratto da polvere intestinale di ratto), antiossidante (inibizione di DPPH 0.2 mM) [6] ed antipertensiva (inibizione di ACE 100 mU/ml)



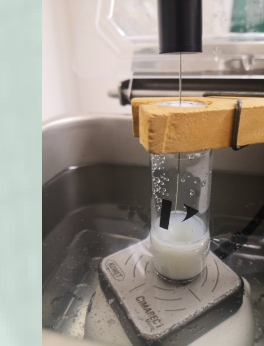
Profilo degli acidi grassi

Estrazione secondo Jiang J. et al [7] con una trans-metilazione in ambiente basico FIL-IDF 182:1999.
Colonna : SP 2560 (100 m x 0.25 mm x 0.2 µm di fase fissa non-bonded biscyanopropilpolisiloxane)
GC/MS: Trace 1300/ TSQ9000 ThermoScientific
GC/FID: Trace 1300 ThermoScientific



Profilo aromatico

Fibra: 85 µm SPME Carboxen/PDMS StableFlexTM
Colonna : DB-WAX J&W (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
GC-MS: Trace 1300/TSQ 9000 ThermoScientific [8]



RISULTATI

L'analisi della frazione peptidica sotto i 10 kDa di peso molecolare ha portato ad evidenziare la presenza di 77 differenti peptidi, con caratteristici valori di m/z, tutti derivati dalle proteine del latte: α1-caseina (αS1-CN), α2-caseina (αS2-CN), β-caseina (β-CN), κ-caseina (κ-CN), β-lattoglobulina (LGB) e α-lattalbumina (LALBA). Tra questi 77 peptidi, 23 sono stati identificati con un alto grado di certezza arrivando a determinarne, la sequenza e la proteina d'origine, grazie all'uso di database on-line e pubblicazioni scientifiche su riviste del settore. Ad alcuni di questi è stato possibile attribuire effetti potenziali, in particolare antipertensivo (ACE inibitori), ipoglicemizzante (DPP-IV inibitori) e antimicrobico (Tab. 1), ma anche antiossidante, immunomodulatore e anticancerogeno.

Quindici peptidi invece hanno mostrato più di una probabile sequenza di origine, per cui non è stato possibile dare un'identificazione certa e di conseguenza attribuire loro un potenziale effetto. Per i restanti peptidi, presenti nei campioni analizzati, non è stato, al momento, possibile trovare una sequenza corrispondente nei database on-line.

L'effetto potenziale funzionale del prodotto della fermentazione del latte ovino con la miscela autoctona è stato confermato dai microsaggi enzimatici che hanno dimostrato come YoAlp® abbia un'alta attività ACE inibitoria (inib. ACE) (97%±1,57) ed una discreta attività antiossidante (inib. DPPH) (35,02%±2,29). Inoltre ha mostrato anche una buona attività ipoglicemizzante (inib. DPP-IV) con un'inibizione del 89,86%±4,49 (Fig. 1). Per quanto riguarda l'inibizione dell'ACE e del radicale DPPH, i valori ottenuti corrispondono rispettivamente a 0,058µM Captopril equivalenti e 4,43 µg/ml Vitamina C equivalenti.

Tab. 1 Alcuni peptidi bioattivi identificati in YoAlp®

[M+H] ⁺ / _z	Sequenza	Posizione	Proteina	Effetto	Probabilità di attività biologica
220	MA	24-25	β-LG	DPP inib.	0,69
246	PM	124-125	β-LG	DPP inib.	0,95
279	FN	151-152	β-LG	DPP inib.	0,95
683	KEMPFKYPVE	122-132	β-CN	ACE inib.	0,43
759	HPIKHQ	4-9	αS1-CN	ACE inib.	0,18
871	LNENLLR	31-37	αS1-CN	antimicrobico	0,28
907	LPQNILPL	70-77	β-CN	antimicrobico	0,69

PEPTIDI BIOATTIVI

ATTIVITÀ BIOLOGICA

PROFILO ACIDI GRASSI

PROFILO AROMATICO

L'analisi della composizione in acidi grassi eseguita in GC/MS e la loro quantificazione tramite GC/FID hanno mostrato come YoAlp® sia un'ottima fonte di acidi grassi desiderabili come gli acidi grassi essenziali, in particolare si osserva un buon rapporto ω6/ω3. Inoltre, il CLA (isomeri coniugati dell'acido linoleico) 9c, 11t, noto per possedere attività anticancerogene rappresenta il 90% dei CLA totali (Fig. 2).

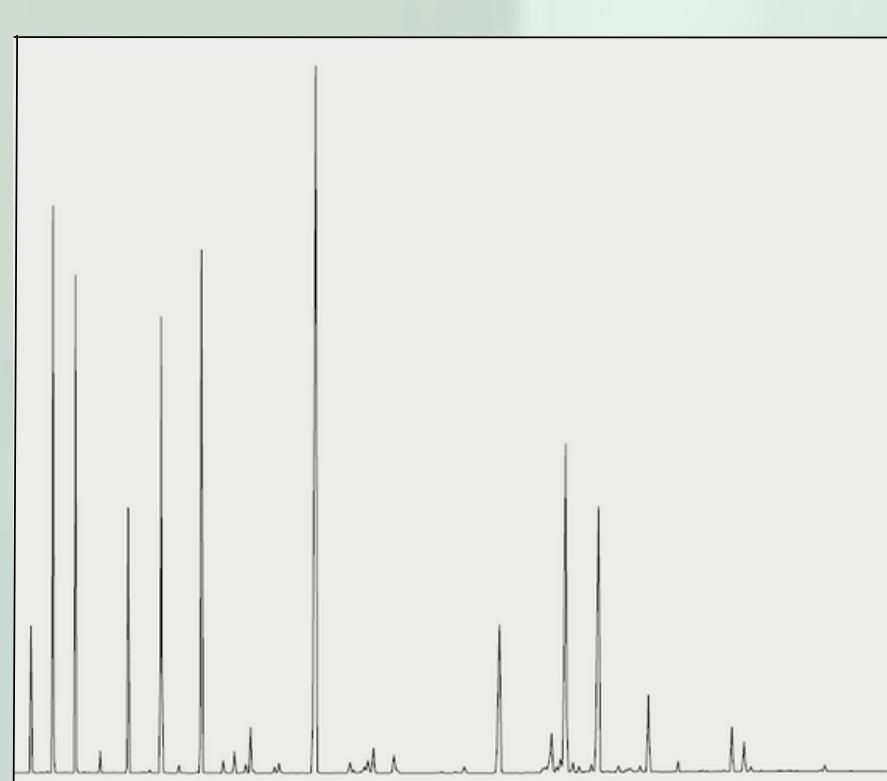


Fig. 2: Cromatogramma GC/FID e contenuto medio (g/100 g grasso) per alcune delle classi di acidi grassi individuate di YoAlp® di pecora. Valori medi calcolati considerando 2 campioni di latte fermentato, estratti in doppio ed analizzati in triplo.

	% YoAlp® di pecora
Σ saturi	73,74
Σ insaturi	26,26
Σ monoinsaturi	20,80
Σ polinsaturi	5,47
Σ CLA	1,13
Σ ω3	1,61
Σ ω6	2,63
Σ ω6/ω3	1,63

Da un punto di vista del profilo aromatico, YoAlp® ha dimostrato di avere un buon contenuto in componenti volatili prevalentemente rappresentati dai chetoni ed acidi. (Fig. 3). Considerando i composti aromatici caratteristici del quadro aromatico di un latte fermentato è stato evidenziato che il fermento autoctono ha un'ottima attitudine alla produzione di diacetile, acetoino, acetone e 2-butanone (Fig. 4).

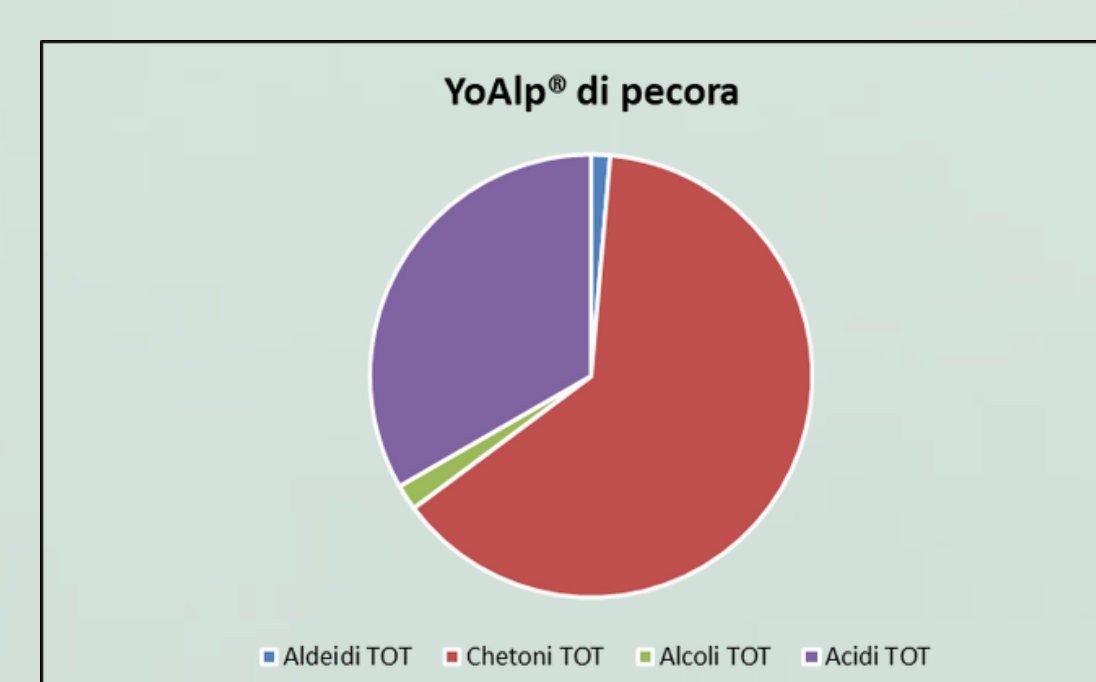


Figura 4: Abbondanza media relativa (Apicco/Asi) dei composti volatili, ottenuta dall'analisi in triplo di due ripetizioni di YoAlp® di pecora.

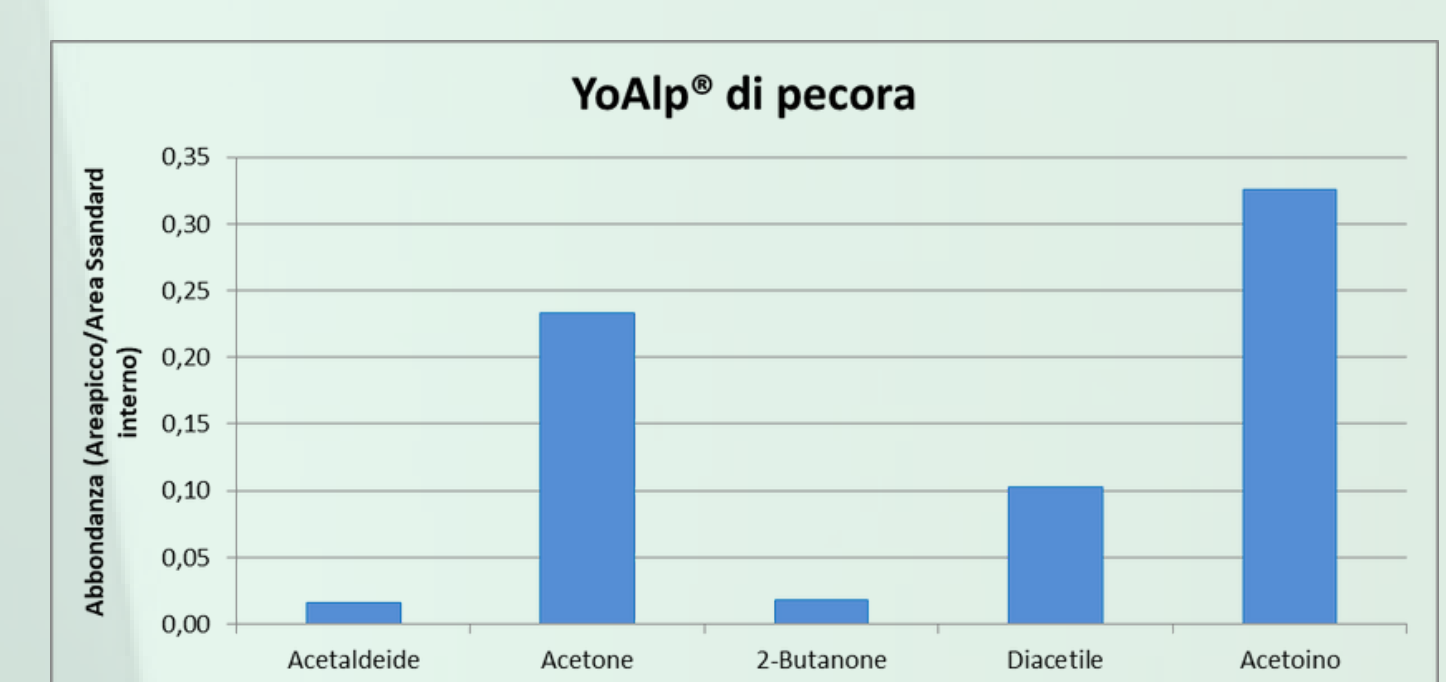


Fig. 3: % di abbondanza media relativa (Apicco/Asi) ottenuta dall'analisi in triplo di due ripetizioni di YoAlp® di pecora, rispetto al totale delle sostanze identificate, per le classi individuate.

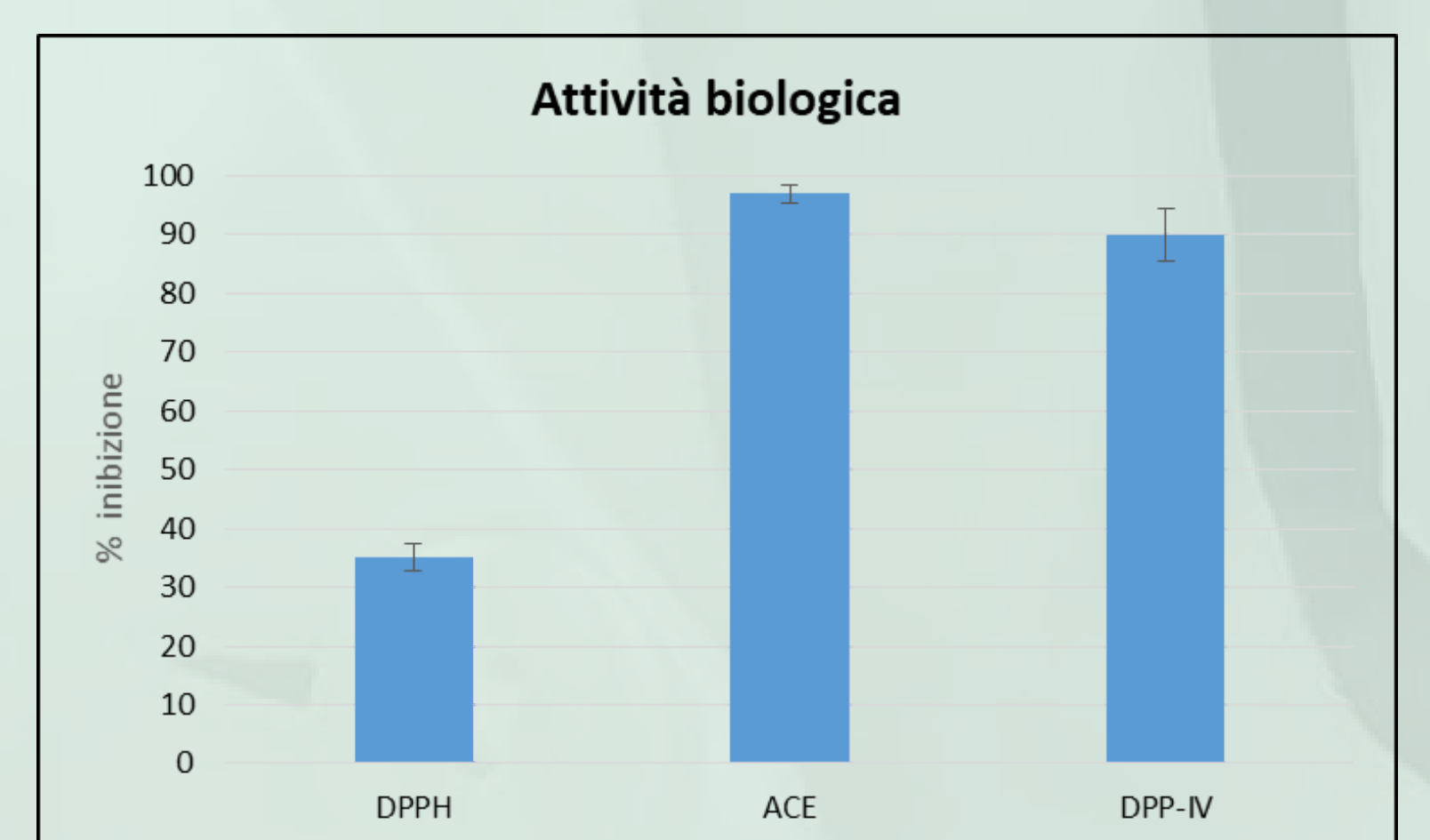


Fig. 1 Attività biologica di YoAlp® espressa come dato medio ottenuto dall'analisi di due differenti lavorazioni.

CONCLUSIONI

La caratterizzazione completa del prodotto finito ha messo in luce diversi aspetti interessanti dal punto di vista dei potenziali effetti benefici di un latte fermentato totalmente legato al territorio di montagna. YoAlp® di pecora rappresenta, dunque, un'opportunità per le aziende del settore lattiero-caseario valdostano, in quanto può concorrere alla diversificazione dell'offerta e preservare la biodiversità e la tipicità delle produzioni della Regione Valle d'Aosta.

Messa a punto di una miscela di batteri lattici autoctoni per la produzione del latte fermentato valdostano YoAlp®

Simona ZENATO, Rita PRAMOTTON, Sabina VALENTINI, Luca VERNETTI-PROT
 Institut Agricole Régional - Regione La Rochère1/A, 11100 Aosta, Italia

INTRODUZIONE



L'attività di ricerca, ha avuto lo scopo di valorizzare le materie prime e la biodiversità microbica del territorio valdostano, attraverso la produzione di un latte fermentato, riconosciuto con marchio registrato YoAlp®, con le caratteristiche di uno yogurt, incrementando l'interesse verso un prodotto lattiero-caseario fortemente legato al territorio valdostano. YoAlp® è stato realizzato utilizzando batteri lattici autoctoni facenti parte della ceppoteca dell'Institut Agricole Régional. La selezione dei ceppi si è basata sullo studio delle caratteristiche genetiche e delle performance tecnologiche mediante prove su scala pilota dei ceppi in miscela su diverse tipologie di latte, su bevande vegetali e in presenza di miele per la produzione di alimenti alternativi, ampiamente richiesti dal mercato odierno.

RISULTATI

La selezione dei ceppi

Dallo studio delle caratteristiche tecnologiche e genetiche di 43 ceppi (batterici) autoctoni, appartenenti alle specie *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii*, isolati nel corso degli anni da microflora lattiche tipiche dell'ambiente agropastorale valdostano come alpeggi e piccoli caseifici che tradizionalmente lavorano il latte senza l'uso di starter commerciali, sono stati individuati 2 ceppi di *S. thermophilus* (M17Pet2'96, MTH17FV5) e un ceppo di *L. delbrueckii* (66QU1MRS/60), non appartenente alla sottospecie *bulgaricus* ma con un'elevata omologia con *L. delbrueckii ssp. lactis*, da impiegare come starter per la produzione del latte fermentato YoAlp® (Fig.1).

Fig. 1 La selezione dei ceppi

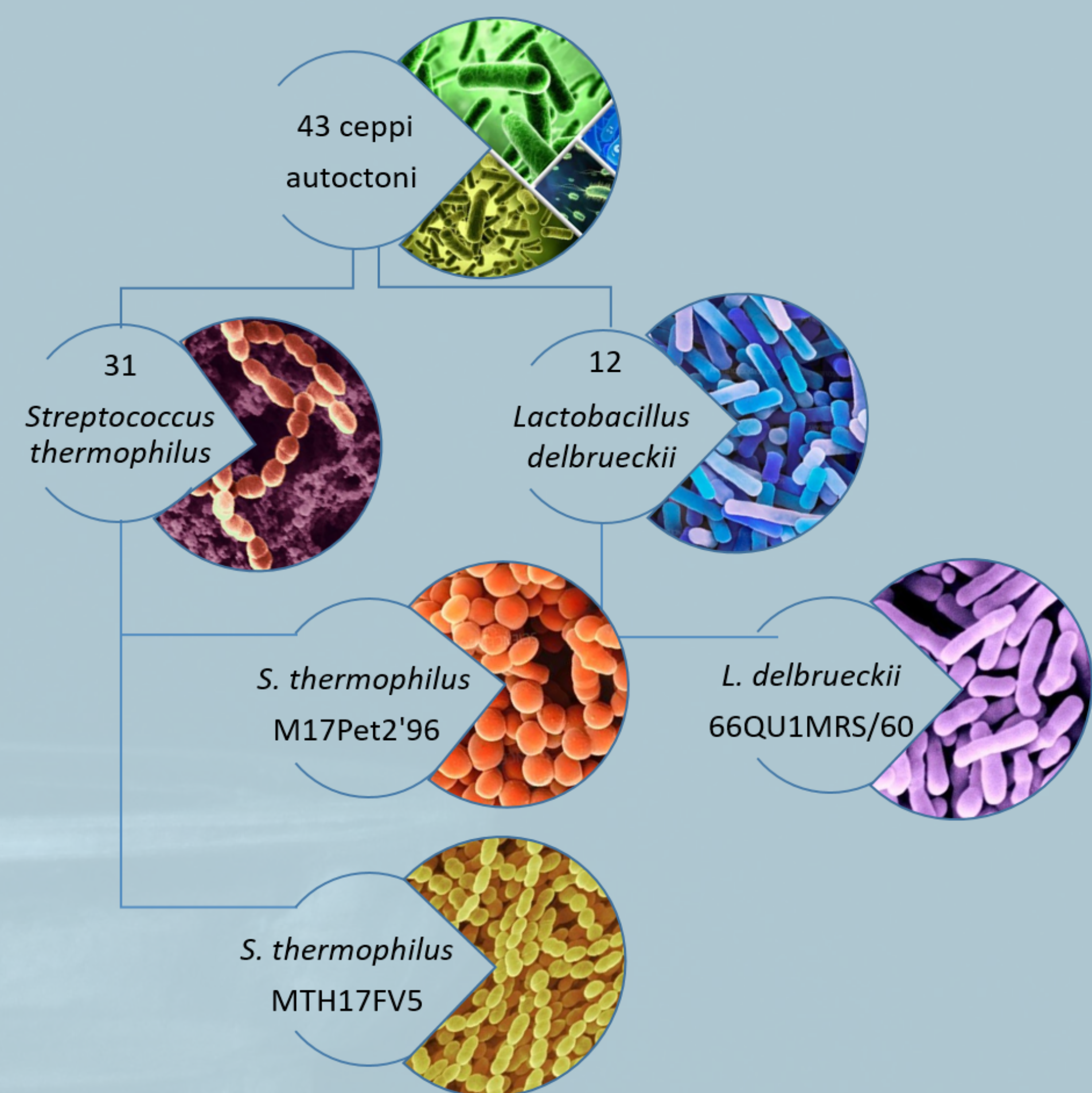


Fig. 2 La miscela

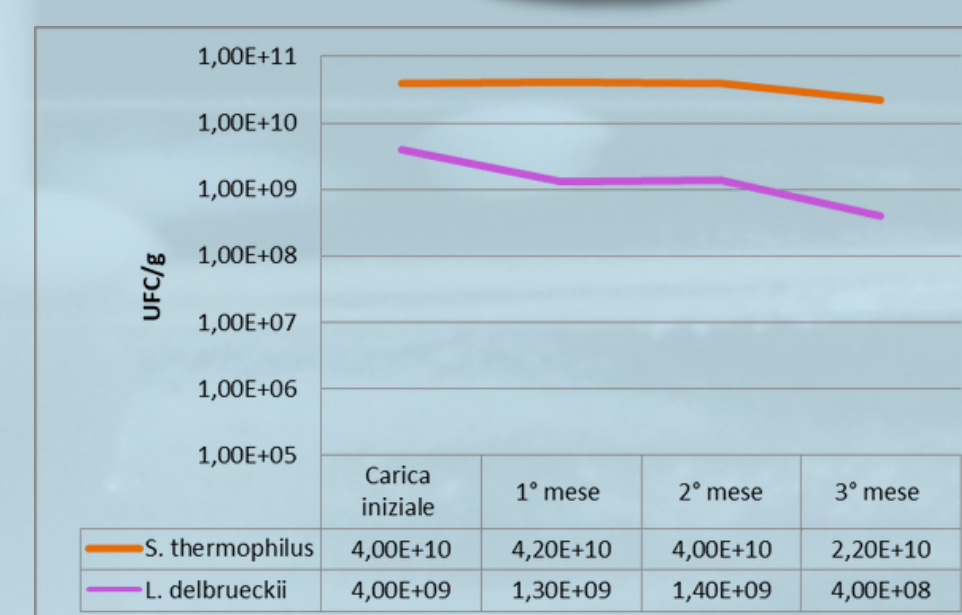


Fig. 3 Vitalità dei ceppi liofilizzati in miscela

La miscela

Il processo di industrializzazione degli starters destinati alla produzione di YoAlp® è stato completato mediante la liofilizzazione dei ceppi e la formulazione di una miscela con una concentrazione pari a 0,6 g/L (rapporto 1:2 tra *S. thermophilus* e *L. delbrueckii*) e con l'aggiunta di 0,4 g/L di eccipiente lattosio (Fig. 2). La vitalità dei ceppi liofilizzati è stata monitorata a intervalli regolari (30-60-90 giorni) e verificata attraverso la conta batterica su terreni microbiologici selettivi.

I ceppi di *S. thermophilus* sono stati seminati su terreno M17 agar incubato a 45°C per 24-48 ore, mentre i ceppi di *L. delbrueckii* su terreno MRS agar incubato in anaerobiosi a 40°C per 48-72 ore. I risultati hanno evidenziato una buona stabilità della carica microbica per i ceppi di *S. thermophilus* mentre per il ceppo di *L. delbrueckii* una riduzione seppur minima a partire dal terzo mese (Fig.3).

Le performance tecnologiche

SU LATTE

La produzione del latte fermentato YoAlp® è stata ottenuta impiegando la miscela liofilizzata per inoculo diretto. La capacità acidificante è stata monitorata alla temperatura di 40°C per un tempo di 6 ore e 30 minuti registrando temperatura, variazione di pH e velocità di acidificazione. La formulazione lattica con i suddetti parametri è stata testata, mediante prove di laboratorio, su latte fresco intero aziendale e su diversi tipi di latte presenti in commercio (parzialmente scremato, magro, alta digeribilità senza lattosio, di pecora e di capra intero). I prodotti ottenuti al termine del processo fermentativo hanno raggiunto valori di pH compresi tra 4,54 e 4,84 e dopo 24 ore alla temperatura di circa 4°C valori di pH compresi tra 4,31 e 4,77 (Fig. 4).

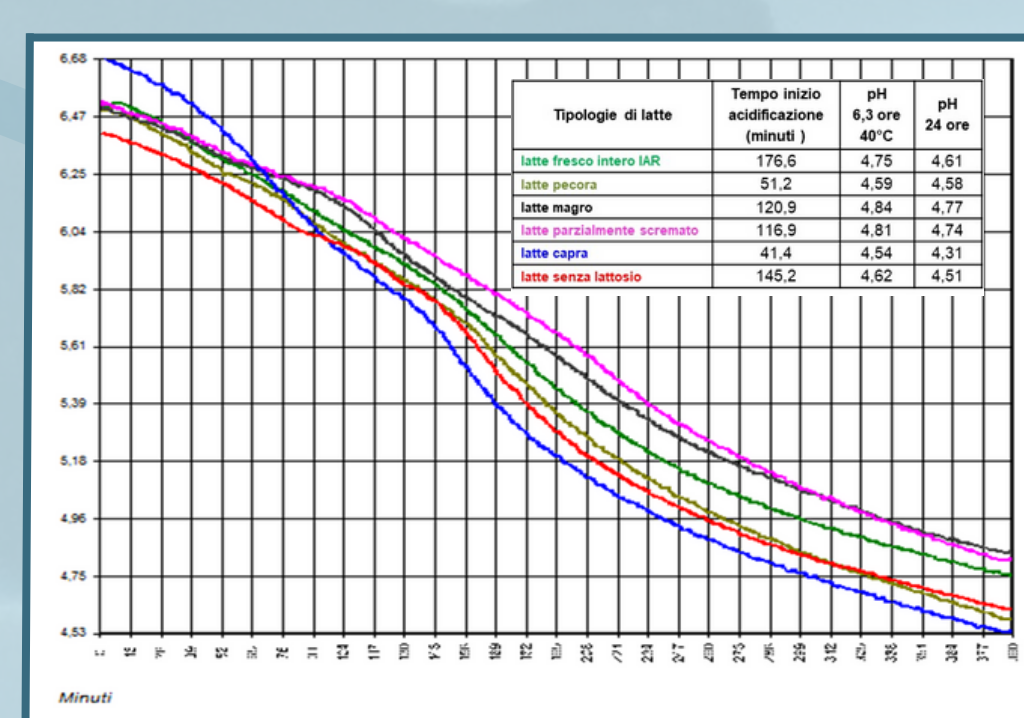


Fig. 4 Curve di acidificazione

La carica batterica dei ceppi misurata previa rivitalizzazione del liofilizzato, subito dopo l'inoculo della miscela nel latte e al termine del processo fermentativo ha evidenziato una buona crescita, raggiungendo complessivamente valori di 10⁹ UFC/g per i ceppi di *S. thermophilus* e valori compresi tra 10⁷ e 10⁹ UFC/g per *L. delbrueckii* (Fig. 5).

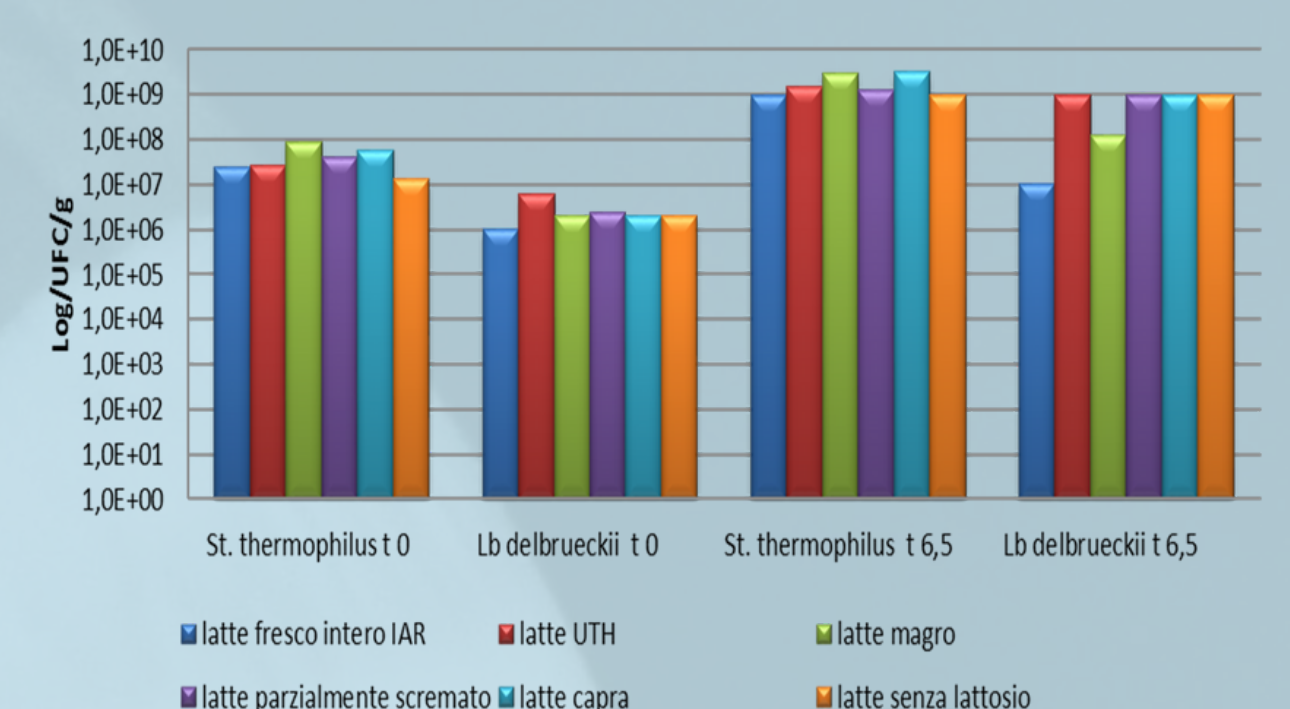


Fig. 5 Carica batterica dei ceppi prima e dopo il processo fermentativo

SU LATTE E MIELE

Il comportamento della miscela è stato esaminato in presenza di miele monoflorale di rododendro, tiglio e acacia utilizzandolo come ingrediente coadiuvante nel processo produttivo e come dolcificante dalle risapute qualità nutrizionali. Le prove sono state condotte su latte intero pastorizzato aziendale con l'aggiunta del 0,5% di miele. Le curve di acidificazione sono risultate omogenee non presentando differenze fra i diversi tipi di mieli (Fig. 6). I prodotti ottenuti sono risultati essere dal punto di vista organolettico non eccessivamente dolci ma delicati e per questo molto gradevoli. La carica batterica misurata al termine del processo fermentativo ha evidenziato complessivamente valori di 10⁹ UFC/g per i ceppi di *S. thermophilus* e valori compresi tra 10⁶ e 10⁸ UFC/g per *L. delbrueckii*.

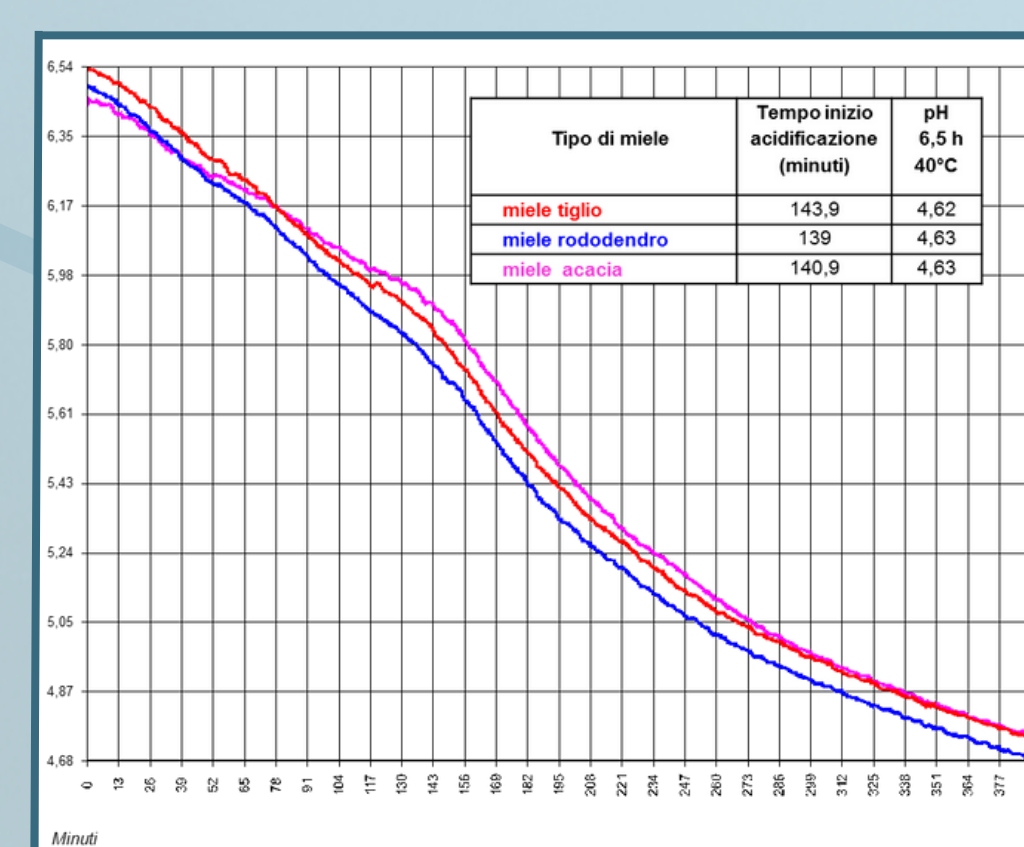


Fig. 6 Curve di acidificazione

SU BEVANDE VEGETALI

La miscela starter testata con diverse tipologie di bevande vegetali è riuscita a terminare il processo fermentativo in 5 o 6 ore, raggiungendo valori di pH compresi tra 3,79 e 4,57 (Fig.7). I prodotti ottenuti hanno presentato complessivamente buone caratteristiche organolettiche ma con consistenza più liquida, ad eccezione del fermentato a base di riso risultato invece troppo acido. Inoltre la carica batterica dei ceppi misurata al termine del processo fermentativo ha evidenziato una buona vitalità, evidenziando complessivamente valori di carica batterica superiori a 10⁸ UFC/g per i ceppi di *S. thermophilus* e valori di 10⁷ UFC/g per *L. delbrueckii*.

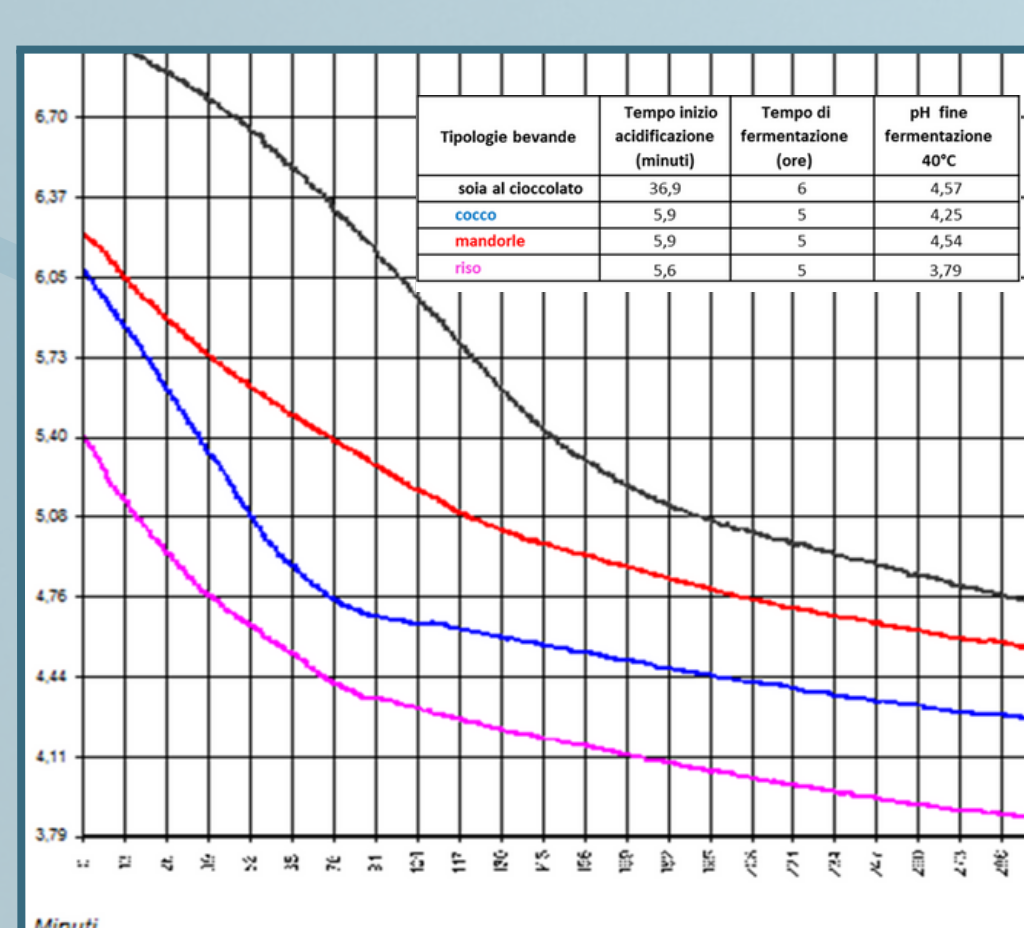


Fig. 8 Curve di acidificazione

Vitalità dei ceppi su prodotto finito



La miscela ha evidenziato rilevanti prestazioni tecnologiche garantendo un'elevata carica microbica vitale durante la conservazione del prodotto YoAlp® ottenuto con latte intero pastorizzato conservato alla temperatura di circa 4°C. La conta dei batteri lattici presenti nel prodotto è stata monitorata nel tempo a intervalli regolari (24 ore, 14-21-28 giorni) su terreni microbiologici selettivi. I risultati hanno evidenziato a 28 giorni una carica vitale di 10⁹ UFC/g per i ceppi di *S. thermophilus* e di 10⁶ UFC/g per il ceppo di *L. delbrueckii*. (Fig. 8).

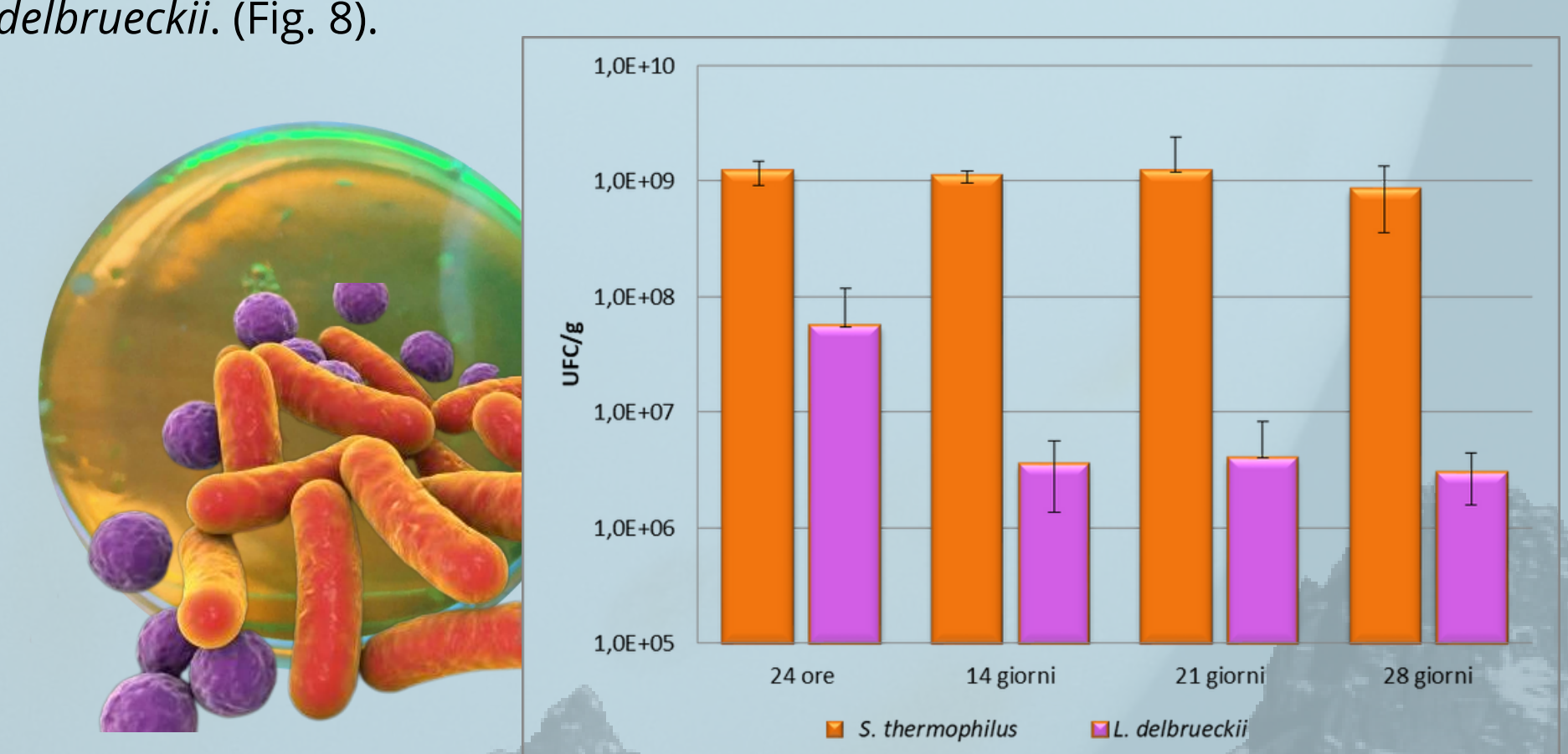


Fig. 8 Andamento della carica batterica nel latte fermentato