TYPICALP

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

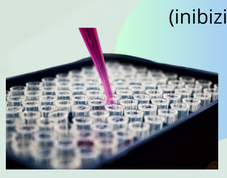
INTRODUZIONE

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'Institut 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 10 kDa
HPLC: colonna Jupiter 1x250 mm, 300 A, 3 µm
LC-MS ESI+: Thermofisher LTQ XL [4]

Lettore 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 biscyanopropylpolisiloxane)
GC/MS: Trace 1300/ TSQ 9000 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: αs1-caseina (αs1-CN), αs2-caseina (αs2-CN), β-caseina (β-CN), k-caseina (k-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.

Tab. 1 Alcuni peptidi bioattivi identificati in YoAlp®

$[M+H]^{+/2+*}$ m/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*	KEMPFPKYPVE	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

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 0,058 µM Captopril equivalenti e 4,43 µg/ml Vitamina C equivalenti.

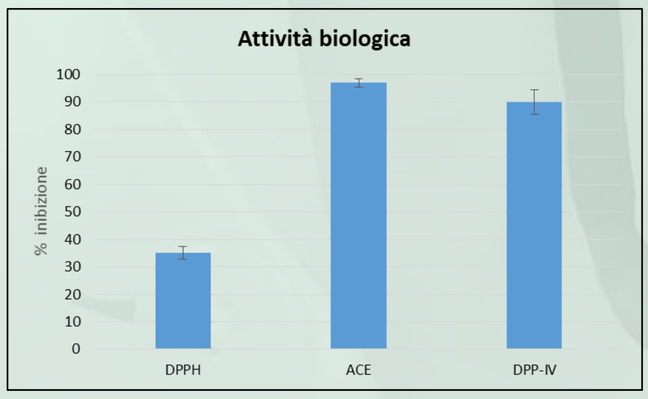
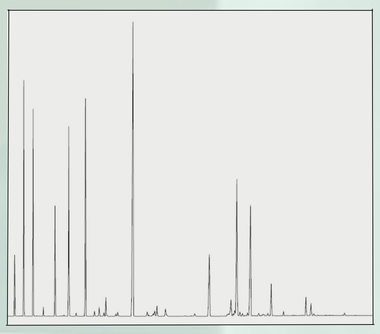


Fig. 1 Attività biologica di YoAlp® espressa come dato medio ottenuto dall'analisi di due differenti lavorazioni.

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).



	%
	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

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.

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).

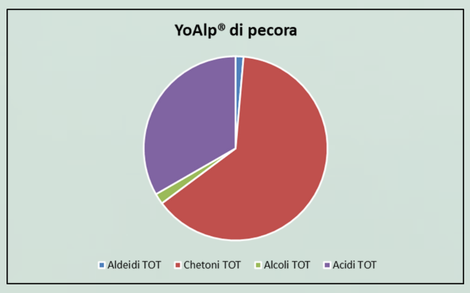


Fig. 3: Abbondanza media relativa (Apicco/Asi) dei composti volatili, ottenuta dall'analisi in triplo di due ripetizioni di YoAlp® di pecora.

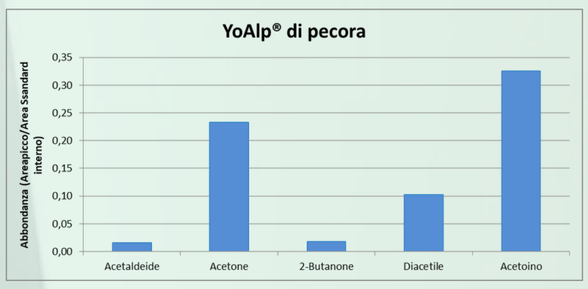


Fig. 4: % di abbondanza media relativa (Apicco/Asi) ottenuta dall'analisi in triplo di due ripetizioni di YoAlp® di pecora, rispetto al totale delle sostanze identificate, per le classi individuate.

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.

BIBLIOGRAFIA

1. Balthazar C.F., Pimentel T.C., Ferrão L.L., Almada C.N., Santillo A., Albenzio M., Mollakhalili N., Mortazavia A.M., Nascimento J.S., Silva M.C., Freitas M.Q., Sant'Ana A.S., Granato D. and Cruz A.G., 2017. Sheep milk: Physicochemical characteristics and relevance for functional food development. Comprehensive reviews in food science and food safety. Vol. 00, 2017. DOI: 10.1111/1541-4337.12250
2. Park Y.W., Juárez M., Ramos M. and Hainlein G.W.F., 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant Research 68 (2007) 88-113. DOI:10.1016/j.smallrumres.2006.09.013
3. Mohapatra A., Shinde A.K. and Singh R., 2019. Sheep milk: A pertinent functional food. Small Ruminant Research. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2019.10.002
4. Sforza S., Cavatorta V., Lambertini F., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R. Cheese peptidomics: A detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging. J. Dairy Sci. 2012, 95, 3514-3526
5. Li Guan-Hong et al. "Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis vol. 37,2 (2005): 219-24.
6. Prieto J.M. Procedure: Preparation of DPPH Radical, and antioxidant scavenging assay. 2012.
7. Jiang J., Bjoerck L., Fondén R. and Emanuelson M., 1996. Occurrence of conjugated Cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. Journal of Dairy Science. Vol. 79, Issue 3, pp. 438-445. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76383-X
8. Pan D.D., Wu Z., Peng T., Zeng X.Q., e Li H. 2014. «Volatile organic compounds profile during milk fermentation by *Lactobacillus Pentosus* and correlations between volatiles flavor and carbohydrate metabolism». Journal of Dairy Science 97 (2): 624–31. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7131.

Progetto cofinanziato dall'Unione Europea, dal Fondo Europeo di Sviluppo Regionale, dallo Stato Italiano, dalla Confederazione Elvetica e dai Cantoni nell'ambito del Programma di Cooperazione Interreg V-A Italia-Svizzera 2014-2020

www.interreg-italiasvizzera.eu