

Formulazione, caratterizzazione biochimica e shelf life di una bevanda funzionale a base di siero di YoALP e succhi di frutta coltivata in Valle d'Aosta.

U. S. Laboratori di Analisi – U.S. Valorizzazione produzioni di origine animale – U.S. Frutticoltura

Risultati

La caratterizzazione a livello microbiologico e biochimico è stata effettuata solo sulle bevande che sono risultate, a più degustazioni, le più interessanti dal punto di vista olfattivo e gustativo. Tra queste, sono state individuate: la bevanda a base siero con l'aggiunta di succo di mela Raventse, quella con aggiunta di succo di mela-Aronia (50% succo di mela Renetta e 50% succo di Aronia) e quella con aggiunta di succo di mela-Lampone (45% succo di mela Renetta, 45% succo di mela Golden e 10% succo di Lampone).

Analisi Microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state eseguite al fine di verificare la presenza e la vitalità dei microrganismi probiotici derivati da YoALP, l'assenza di contaminanti e patogeni e monitorare qualunque variazione di questi microrganismi durante la shelf life del siero base e della bevanda.

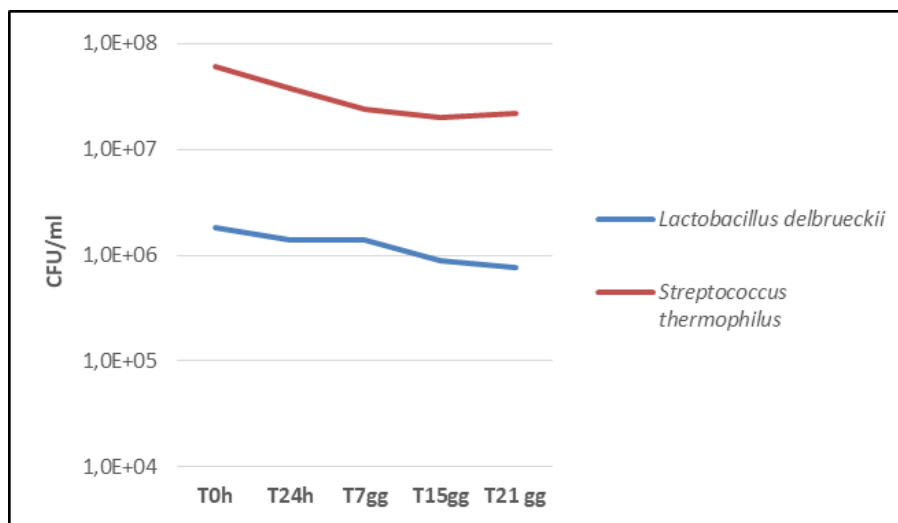


Figura 1. Evoluzione della carica dei batteri lattici di YoALP, presenti nel siero base usato nella formulazione delle bevande funzionali.

In figura 1 viene mostrata l'evoluzione, da T0 a T21 giorni, della carica dei batteri lattici probiotici, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii*, nel siero di YoALP. Come si può osservare la carica dei probiotici rimane pressoché stabile fino a 7 giorni, con valori superiori a quelli raccomandati per legge (1,0E+06 CFU/ml). Questo dato è importante in quanto è stato osservato che, affinché i probiotici attraversino vivi e vitali il tratto gastrointestinale e raggiungano l'intestino in quantità sufficiente ad avere un potenziale effetto benefico, il valore minimo, nell'alimento funzionale deve superare il valore di 1,0E+06 CFU/ml [3]. Analogo risultato è stato riscontrato nelle diverse formulazioni della bevanda funzionale a base siero di YoALP, nonostante la carica dei probiotici, particolarmente del *Lactobacillus delbrueckii*, abbia mostrato

valori più bassi dovuti principalmente all'aggiunta del 40% di succo di frutta al siero base (a T7gg, *Streptococcus thermophilus* 1,7E+07 CFU/ml, *Lactobacillus delbrueckii* 4,6E+05 CFU/ml). Nei campioni a cui sono stati aggiunti il *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* e *Bifidobacterium breve*, è stato notato un lieve calo di questi microrganismi nel corso della shelf life; solo il campione con aggiunta di succo di Ravèntse, ha mostrato un valore di carica dei Bifidobatteri leggermente inferiore al limite di 1,0E+06 CFU/ml (dati non mostrati). La differenza di comportamento di questi microrganismi nel campione con aggiunta di succo di Ravèntse è, probabilmente, dovuta al diverso valore di pH riscontrato, rispetto a quello delle altre bevande funzionali analizzate (bevanda con succo Ravèntse pH 3,73 vs pH 3,96 e pH 3,88 rispettivamente di bevanda con succo mela-Lampone e mela-Aronia), che sfavorisce la crescita e la vitalità dei Bifidobatteri.

La conta microbica totale (CMT) riguardante eventuali contaminanti o patogeni ha mostrato valori ben al di sotto dei limiti di legge. La CMT è rimasta, infatti, per tutta la durata della shelf life, nel siero e in tutte le bevande funzionali analizzate, al di sotto di 1,0E+02 CFU/ml; i Coliformi si mantenevano al di sotto dei limiti indicati e non è stata mai evidenziata presenza di *Escherichia Coli*. Solo i lieviti hanno mostrato una crescita nel corso della shelf life, in particolare, dopo 15 gg i loro valori superavano il limite massimo consentito di 1,0E+02 CFU/ml; questo incremento è probabilmente dovuto al fatto che la colatura è stata fatta in modo artigianale, e questo ha predisposto maggiormente il prodotto a contaminazione da parte dell'ambiente esterno; inoltre la presenza degli zuccheri nei succhi di frutta, utilizzati nella formulazione della bevanda a base siero, ha probabilmente favorito la crescita di questi microrganismi.

Analisi Biochimiche

Al fine di caratterizzare le componenti funzionali delle bevande a base siero di YoALP e la loro potenziale attività biologica, sono stati fatti approfondimenti analitici su peptidi bioattivi, contenuto in polifenoli totali, attività antiossidante e capacità ACE-inibitoria.

L'analisi della frazione peptidica sotto i 10KDa, mediante metodica LC-MS, del siero di YoALP e delle bevande funzionali a base siero maggiormente interessanti, ha portato ad evidenziare la presenza di 118 differenti peptidi, con caratteristici valori di m/z, tutti derivati dalle proteine del latte: α s1-caseina (α s1-CN), α s2-caseina (α s2-CN), β -caseina (β -CN), k-caseina (k-CN), β -lattoglobulina (LGB) e α -lattalbumina (LALBA). Tra questi 118 peptidi presenti, 29 sono stati identificati con un alto grado di certezza arrivando a determinarne, a partire dal loro valore di m/z, la sequenza e la proteina d'origine, grazie all'uso di database on-line e pubblicazioni scientifiche su riviste del settore. Per alcuni di questi è stato possibile attribuire effetti potenziali, in particolare ACE inibitorio (antipertensivo) e antiossidante, ma anche mineral binding, antagonisti degli oppioidi, ed altri. Ottantaquattro peptidi invece hanno mostrato più di una possibile sequenza e origine di proteina, 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 al loro valore di m/z nei database on-line. In tabella 1 sono mostrati alcuni dei peptidi identificati nelle bevande funzionali.

Tabella 1. Elenco di alcuni peptidi identificati nelle bevande funzionali a base siero di YoALP.

Picco	RT	[M+H] ⁺ m/z	PM	Sequenza	ID	Attività biologica
1	22.7	585	584	YLLF	β -LG (102-105)	ACE inibitore

2	43.7	377	376	VYP	β -CN (59-61)	ACE inibitore
3	45.3	439	438	NIPP	β -CN (73-76)	ACE inibitore
4	50.1	787	787	RELEEL	β -CN (1-6)	ACE inibitore
5	52.1	291	290	MAA	β -LG (24-26)	ACE inibitore
6	52.7	375	374	PYP	β -CN (179-181)	ACE inibitore
7	57.4	275	274	EK	Glu-Lys	DPP inibitore
8	59.8	864	2589	SL VYPFPGPIPN SLPQNIP PLTQT	β -CN (57-80) *BCM-9	ACE inibitore
9	61.7	665	664	VLPIPQ	β -CN (161-166)	ACE inibitore

Tra i peptidi identificati, è interessante notare la presenza del peptide con m/z 864, la cui sequenza **SLVYPFPGPIPN**SLPQNIPPLTQT, contiene BCM-9 (evidenziata in rosso), una β -casomorfina, biomarcatore della presenza della variante allelica A2 della β -caseina, nel latte di partenza. Questa β -casomorfina è nota dalla letteratura per avere effetti benefici sulla salute umana al contrario della sua omologa BCM-7, assente in tutti i campioni analizzati, marcatore della presenza della variante allelica A1 sempre della β -caseina, di cui, al contrario, ci sono evidenze scientifiche sugli effetti dannosi in quanto sembrerebbe contribuire alla comparsa di diabete di tipo 1, patologie cardiovascolari ed essere possibile causa di morte in culla [4].

In generale, il numero dei peptidi riscontrati nelle diverse formulazioni della bevanda funzionale a base siero di YoALP, è abbastanza simile; le piccole differenze riscontrate sono dovute probabilmente al diverso periodo di produzione, da marzo a settembre; durante questo arco temporale, infatti, la componente microbica e la composizione chimica del latte può variare lievemente, dovuto al diverso periodo di lattazione, e questo può portare ad avere un prodotto finito con caratteristiche biochimiche leggermente differenti.

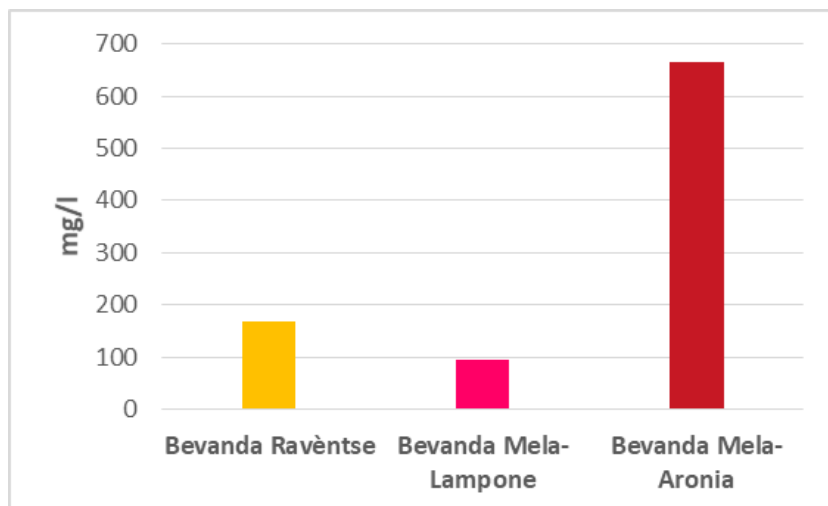


Figura 3. Contenuto medio di polifenoli totali nelle bevande funzionali base siero di YoALP.

Riguardo al contenuto totale in polifenoli, il valore più elevato ($p < 0.05$) è stato osservato nella bevanda funzionale a base siero con l'aggiunta del succo di mela-Aronia (665.99 mg/l CE) rispetto a quella con aggiunta di succo di mela Ravèntse (169.39 mg/l CE) e di succo commerciale mela-Lampone (94.91 mg/l CE) (Fig. 3). Questi valori rispecchiano, evidentemente, l'andamento dei valori dei polifenoli totali ritrovati nei succhi di partenza (dati non mostrati) e si mantengono pressoché stabili nel corso della shelf life. I polifenoli sono una vasta classe di molecole, metaboliti secondari sintetizzati dalle piante in risposta a particolari condizioni ambientali e all'attacco di agenti patogeni, che, se consumati con la dieta, potrebbero offrire diversi vantaggi per la salute in quanto sono potenzialmente in grado di contrastare l'attività dannosa dei radicali liberi sia esogeni che endogeni, contribuendo a mantenere un equilibrio ossidoriduttivo all'interno dell'organismo e quindi uno stato di buona salute. Alla luce di queste conoscenze, è stato misurato, mediante kit ELISA, il potere antiradicalico (ARP, anti-radicalo DPPH*), cioè capacità antiossidante, di tutte le bevande funzionali studiate.

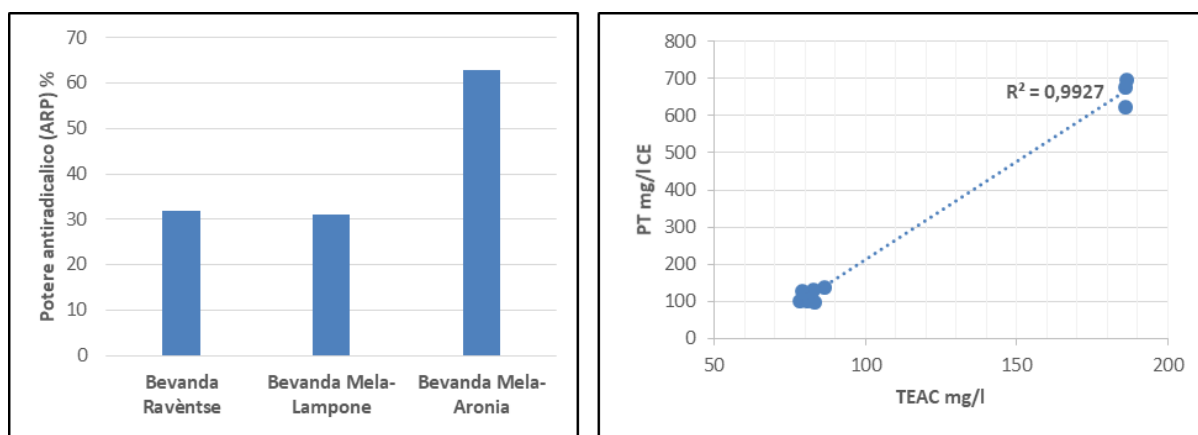


Figura 4. Potere antiradicalico (DPPH) % delle bevande funzionali a base siero di YoALP e correlazione tra capacità antiossidante, espressa come Trolox equivalenti, e i polifenoli totali presenti.

Questa analisi ha mostrato valori interessanti se confrontati con quelli della letteratura e, come nel caso dei polifenoli, la bevanda con maggiore attività antiossidante ($p < 0.05$) è stata quella con aggiunta di succo di mela-Aronia (62.94% ARP). La buona correlazione dei valori di ARP, espressi come capacità antiossidante Trolox equivalenti (TEAC), con quelli dei polifenoli totali ($R^2 = 0.9927$), suggerisce che questa attività antiossidante sia esplicita prevalentemente dai polifenoli presenti all'interno della bevanda funzionale (Fig. 4).

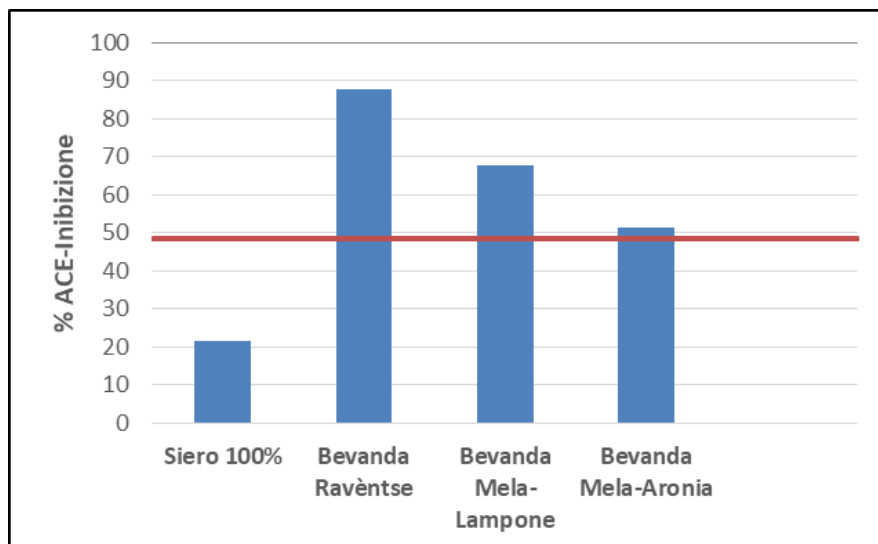


Figura 4. Attività ACE-inibitoria delle bevande funzionali a base siero.

Dal momento che un buon numero di peptidi identificati nelle bevande funzionali presentava un potenziale effetto antipertensivo, su tutte le bevande funzionali studiate (vedi tab. 1) è stata effettuata anche l'analisi dell'attività ACE-inibitoria. L'enzima ACE (Angiotensin Converting Enzyme), è implicato nell'insorgenza di ipertensione e patologie cardiovascolari correlate, per cui la presenza di molecole in grado di inibire la sua attività porta ad un riequilibrio pressorio con conseguente potenziale prevenzione degli effetti dannosi a livello cardiovascolare. I risultati ottenuti hanno mostrato elevati valori dell'attività ACE-inibitoria in tutte le bevande funzionali a base siero analizzate. È presumibile pensare che questa attività antipertensiva possa essere dovuta in parte alla presenza di peptidi bioattivi identificati nelle bevande funzionali analizzate, in parte anche ad alcuni polifenoli, presenti nei succhi utilizzati nella formulazione di queste bevande, che potrebbero contrastare l'attività dell'enzima ACE. Come si può osservare nella figura 4, infatti, già nel siero base, cioè senza aggiunta di succo, si è riscontrata una buona attività (21.44% ACE-inibizione), mentre la bevanda funzionale a base siero con succo di Ravèntse ha mostrato il più alto valore ($p < 0.05$). Inoltre, la percentuale di attività ACE-inibitoria, per tutte le bevande analizzate, è decisamente elevata se confrontata con dati percentuali presenti in letteratura, riguardanti studi effettuati su bevande simili (valore medio: 48.26 % ACE-inibizione, in figura linea rossa).

Per tutti i parametri biochimici analizzati non sono emerse differenze significative nei campioni addizionati con Bifidobatteri (dati non mostrati).

Bibliografia

1. Deepak Mudgil, Sheweta Barak, 3 - Dairy-Based Functional Beverages, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria Holban, Milk-Based Beverages, Woodhead Publishing, 2019, Pages 67-93, ISBN 9780128155042, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815504-2.00003-7>.
2. Diana Rocha-Mendoza, Erica Kosmerl, Abigail Krentz, Lin Zhang, Shivani Badiger, Gonzalo Miyagusuku-Cruzado, Alba Mayta-Apaza, Monica Giusti, Rafael Jiménez-Flores, Israel García-Cano, Invited review: Acid whey trends and health benefits, Journal of Dairy Science, Volume 104, Issue 2, 2021, Pages 1262-1275, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19038>.
3. Ranadheera, C.S.; Vidanarachchi, J.K.; Rocha, R.S.; Cruz, A.G.; Ajlouni, S. Probiotic Delivery through Fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages. Fermentation **2017**, *3*, 67. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040067>.
4. Kamiński S, Cieslińska A, Kostyra E. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. J Appl Genet. 2007;48(3):189-98. doi: 10.1007/BF03195213. PMID: 17666771.

Operazione co-finanziata dall'Unione europea, 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