

PROFILO LATTOPROTEICO E ATTIVITÀ PROTEASICA TOTALE DEL LATTE DI ASINA

Anna Maria CAROLI¹, Omar BULGARI¹, Carmen GIGLIOTTI¹,
Iolanda ALTOMONTE², Federica SALARI², Mina MARTINI³

RIASSUNTO - È stato condotto uno studio per valutare la variabilità del profilo lattoproteico e dell'attività proteasica totale in campioni individuali di latte d'asina di razza Amiatina. Sono stati analizzati 97 campioni di latte individuale di 26 asine prelevate più volte nel corso della lattazione. L'attività proteasica totale è stata analizzata mediante metodo colorimetrico. Sono state inoltre analizzate le lattoproteine mediante isoelectrofocusing (IEF) di campioni di latte intero. I gel sono stati successivamente quantificati mediante analisi di immagine. L'analisi IEF ha permesso di identificare un polimorfismo genetico a livello della beta-lattoglobulina (LG) I. Le varianti osservate, denominate A e B, presentavano rispettivamente una frequenza di 0,15 e 0,85 nel campione analizzato. L'attività proteasica è risultata particolarmente ridotta; questo fatto può essere imputabile al valore molto elevato di lisozima, antibatterico naturale di cui il latte d'asina è particolarmente ricco. La ripetibilità varia da un valore minimo di 0,29 (attività proteasica totale) ad un massimo di 0,69 (beta-LG). Anche per il lisozima si osserva una ripetibilità superiore al 55%. La ridotta attività proteasica dei campioni di latte analizzati e l'elevato contenuto in lisozima confermano le particolari caratteristiche nutraceutiche del latte di asina. L'analisi IEF rappresenta un'analisi a basso costo che fornisce numerose indicazioni, permettendo di mettere in luce polimorfismi genetici, come pure di quantificare il contenuto percentuale di frazioni lattoproteiche. I valori di ripetibilità osservati suggeriscono buone possibilità per la selezione di particolari frazioni sieroproteiche.

Parole chiave: lattoproteine, asina, attività proteasica

SUMMARY - Milk protein profile and protease activity in donkey milk – We conducted a study to assess the variability of milk protein profile and total protease activity in individual milk samples from Amiata donkey breed. A total of 97 samples of milk from 26 jennies collected several times during lactation were analyzed. Total protease activity was quantified by a colorimetric method. Milk proteins were analysed by isoelectrofocusing (IEF) and subsequently quantified by imaging analysis. A genetic polymorphism was found at the level of beta-lactoglobulin (LG) I. Two variants were observed, named A and B, showing a frequency of

* Corrispondenza ed estratti: annamaria.caroli@unibs.it

¹ Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi. Viale Europa 11, 25123 Brescia.

² Centro di Ricerche Agro-Ambientali Enrico Avanzi. Via Vecchia di Marina 6, 56122 San Piero a Grado, Pisa.

³ Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa. Viale delle Piagge 2, 56124 Pisa.

0.15 e 0.85 respectively. The protease activity was particularly low. This may be due to the very high value of lysozyme, a natural antibacterial agent which is abundant in donkey's milk. The repeatability coefficients were estimated for each quantitative variable, ranging from a minimum value of 0.29 (total protease activity) to a maximum of 0.69 (beta-LG). A repeatability coefficient exceeding 55% was found for lysozyme. The reduced protease activity of the milk samples analyzed and the high content of lysozyme confirm the particular characteristics of the nutraceutical donkey's milk. The IEF analysis provides useful information, allowing to highlight genetic polymorphisms, as well as to quantify the content of milk protein fractions. The repeatability values observed suggest good possibilities for selection of particular whey protein fractions.

Key words: milk proteins, donkey, protease activity

INTRODUZIONE

La produzione di latte d'asina è stata recentemente oggetto di particolare attenzione [1, 2]. Il latte di questa specie, nonostante la quantità limitata, riveste un crescente interesse per le specifiche peculiarità dal punto di vista nutrizionale, ipoallergenico e nutraceutico [3, 4]. È un latte molto più simile al latte umano rispetto a quello di ruminanti, specialmente per il contenuto proteico e costituisce pertanto una valida alternativa al latte vaccino in caso di allergie alimentari dei neonati [5, 6].

Al fine di approfondire le conoscenze sulle caratteristiche biochimiche e funzionali del latte d'asina, il presente lavoro ha indagato il profilo lattoproteico e l'attività proteasica del latte d'asina di razza Amiatina, la cui area tradizionale d'allevamento è il monte Amiata in Toscana. La popolazione, allevata originariamente per il lavoro, è stata oggetto di recenti misure di salvaguardia e viene attualmente utilizzata per la pet therapy e la produzione di latte sia a scopo alimentare che cosmetico.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 97 campioni di latte individuale di 26 asine amiatine prelevate più volte nel corso della lattazione (in media: 3,7 volte, da 30 a 300 giorni). L'attività proteasica totale è stata analizzata mediante metodo colorimetrico [7, 8]. Tale metodo utilizza come substrato l'azocaseina, la quale viene degradata dalle proteasi presenti nel latte permettendo così il dosaggio dell'attività

proteolitica del latte stesso. La degradazione dell'azocaseina libera il gruppo cromoforo, di colore rosso quando è legato alla caseina e incolore quando è libero in soluzione. Come attività enzimatica di riferimento viene utilizzata la proteasi N estratta da *Bacillus subtilis* (6,67 U/mg Fluka Analytical, Aldrich, Steinheim, Germany).

Sono state inoltre analizzate le lattoproteine mediante isoelectrofocusing (IEF) di campioni di latte intero, su gel ultrasottile (250*115*0,3 mm) [9], con l'utilizzo di un film di poliestere GelBond come supporto. I gel sono stati acquisiti e quantificati mediante G:Box (Syngene, model rating, Frederick, MD, USA). Oltre al latte intero sono stati analizzati anche campioni di siero e di caseina acida, per una valutazione comparativa dei tracciati.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante le procedure CORR e GLM del pacchetto SAS [10] per valutare le correlazioni tra le variabili analizzate e gli effetti di alcuni fattori sulle variabili stesse. È stata inoltre utilizzata la procedura VARCOMP del SAS per il calcolo della ripetibilità, parametro genetico che valuta come l'individuo è in grado di ripetere le sue prestazioni in misure ripetute. Per il calcolo della ripetibilità sono state utilizzate le osservazioni ripetute sulla stessa asina almeno 4 volte nel corso della lattazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi IEF ha permesso di identificare, in base al punto isoelettrico, una serie di

frazioni lattoproteiche, tra cui le proteine del siero (Fig. 1). Nel latte degli equidi domestici le proteine del siero rappresentano il 35-50% della frazione azotata, mentre nel latte vaccino esse rappresentano solo il 20% [11]. L'alfa-lattoalbumina (alfa-LA), la beta-lattoglobulina (beta-LG) e il lisozima (LYS) sono le tre principali proteine del siero degli equidi domestici. La beta-LG esiste principalmente come monomero nel latte degli equidi, mentre è sotto forma di dimero nel latte dei ruminanti. Nel latte di cavalla e asina esistono due forme molecolari di beta-LG, denominate beta-LG I e beta-LG II [11].

E' noto che le varianti genetiche possono influenzare le proprietà funzionali e biologiche del latte, come dimostrato nella specie bovina. L'analisi IEF ha permesso di identificare un polimorfismo genetico a livello di beta-LG I (Fig. 1). Le varianti osservate, denominate A e B, presentavano rispettivamente una frequenza di 0,15 e 0,85 nel campione analizzato; le frequenze genotipiche erano in equilibrio di Hardy-Weinberg (Tabella 1).

La Tabella 2 riporta le statistiche dell'attività proteasica totale e della ripartizione percentuale delle principali frazioni lattoproteiche osservate mediante IEF. Le frazioni denominate CN-1, CN-2 e CN-3 sono bande di natura caseinica comprese tra la beta-LG e l'alfa-LA nel gel di IEF (Fig. 1). L'attività proteasica è risultata particolarmente ridotta; questo fatto può essere imputabile al valore molto elevato di lisozima, antibatterico naturale di cui il latte d'asina è particolarmente ricco [12].

L'attività proteasica è correlata negativamente e al limite della significatività statistica ($P < 0,1$) con CN-1 e CN-2; la correlazione con la somma di queste frazioni risulta sempre negativa e statisticamente significativa ($P < 0,05$). Non si osservano correlazioni significative con le altre frazioni lattoproteiche e con i giorni di lattazione. Questi ultimi sono correlati in modo positivo e significativo ($P < 0,05$) con alfa-LA, e in modo negativo e altamente significativo ($P < 0,0001$) con LYS. Alcune correlazioni risultano di particolare interesse, come la correlazione negativa e

Figura 1 - Esempio di isoelectrofocusing (IEF) di alcuni campioni individuali di latte d'asina. Le varianti A e B di beta-LG sono indicate rispettivamente da un cerchio bianco e scuro in tre campioni con differente genotipo (omozigote AA, eterozigote AB e omozigote BB). A = asina; M = mese di lattazione.

Figure 1 - Example of isoelectrofocusing (IEF) of some individual donkey milk samples. The A and B variants of beta-LG are shown with a white and dark dot respectively at the level of three samples with different genotype (homozygous AA, heterozygous AB and homozygous BB). A = donkey; M = month of lactation.

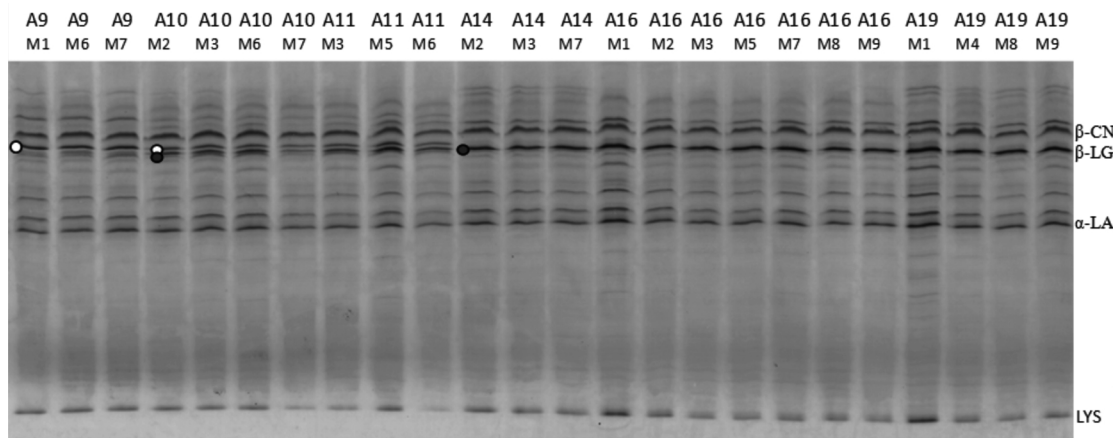


Tabella 1 - Frequenze genotipiche osservate (FO) e attese (FA) al *locus* beta-LG I, e test del chi² per la verifica dell'equilibrio di Hardy-Weinberg.
 Table 1- Observed (FO) and expected (FA) genotype frequencies (FO) at beta-LG I *locus*, and chi² test for verifying Hardy-Weinberg equilibrium.

Genotipo/Genotype beta-LG I	FO	FA	chi ²	P (chi ²)
AA	1	0,6154	0,2404	
AB	6	6,7692	0,0874	
BB	19	18,6154	0,0079	
Totale/Total	26	26	0,3357	0,5623

Tabella 2 - Statistiche descrittive dell'attività proteasica totale (APT) e della ripartizione percentuale delle principali frazioni lattoproteiche osservate mediante IEF. DS = deviazione standard.
 Table 2 - Descriptive statistics of total protease activity (APT) and percent distribution of the major milk protein fractions observed by IEF. SD = standard deviation.

Variabile Variable	N	Media Mean	DS SD	Minimo <i>Minimum</i>	Massimo <i>Maximum</i>
APT (mU/mL)	97	0,0006	0,0002	0,0000	0,0012
beta-CN (%)	97	22,760	2,811	14,853	28,784
beta-LG (%)	97	22,218	3,730	14,594	31,796
CN-1 (%)	97	4,691	2,120	0,000	9,872
CN-2 (%)	97	8,990	1,531	5,361	12,372
CN-3 (%)	97	12,471	1,758	7,627	16,741
alfa-LA (%) alpha-LA (%)	97	19,349	2,380	14,229	26,624
lisozima (%) lysozyme (%)	97	9,521	2,778	4,161	18,005

altamente significativa ($P < 0,0001$) tra LYS e beta-CN.

I coefficienti di ripetibilità sono stati calcolati per l'attività proteasica totale e la ripartizione percentuale delle frazioni lattoproteiche. La Tabella 3 riporta i coefficienti di ripetibilità calcolati per l'attività proteasica totale e la ripartizione percentuale delle frazioni lattoproteiche. La ripetibilità varia da un valore minimo di 0,29 (attività proteasica totale) ad un massimo di 0,69 (beta-LG). Anche per il lisozima si osserva una ripetibilità superiore al 55%.

CONCLUSIONI

Lo studio mostra una ridotta attività proteasica dei campioni di latte analizzati e ne conferma l'elevato contenuto in lisozima utile nella prevenzione delle infezioni intestinali nei bambini. L'analisi IEF rappresenta un'analisi a basso costo che fornisce numerose indicazioni, permettendo di mettere in luce polimorfismi genetici, come pure di quantificare il contenuto percentuale di frazioni lattoproteiche. I valori di ripetibilità osservati suggeriscono buone possibilità per la selezione di particolari frazioni sieroproteiche.

Tabella 3 - Varianze e stima della ripetibilità delle variabili analizzate. FV = fonte di variazione. AP = attività proteasica; CN-1+2 = somma delle bande CN-1 e CN-2.
 Table 3 - Variances and estimation of repeatability of the analysed variables. VS = variation source. PA = protease activity; CN-1+2 = sum of the bands CN-1 and CN-2.

FV	AP	beta-CN	CN-1	CN-2	CN-3	CN-1+2	alfa-LA	LYS	beta-LG
VS	PA	beta-CN	CN-1	CN-2	CN-3	CN-1+2	alpha-LA	LYS	beta-LG
Asina	0,000	2,480	1,648	1,470	2,061	3,527	2,610	2,344	10,306
Jenny									
Errore	0,000	5,003	2,601	0,819	1,353	3,806	3,484	1,865	4,672
Error									
Ripetibilità	0,294	0,331	0,388	0,642	0,604	0,481	0,428	0,557	0,688
Repeatability									

Ringraziamenti:

Poster presentato al 4° Congresso Lattiero-Caseario AITeL, Padova 12 settembre 2014 “Latte e derivati: la ricerca e l’innovazione”. La presente ricerca è stata sviluppata nell’ambito del progetto FILAMI finan-

ziato dal Programma di sviluppo rurale della Regione Toscana 2007-2013, seguente al reg. (Ce) 1698-2005 Misura 124 «Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale».

BIBLIOGRAFIA

- 1) Lo Magno G (2011) Gestione dell’allevamento asinino da latte. In: Milonis E, Polidori P “Latte di asina - produzione, caratteristiche e gestione dell’azienda asinina” Ed Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche Brescia 82 118-128
- 2) Martini M, Altomonte I, Salari F (2014) Amiata donkeys: fat globule characteristics, milk gross composition and fatty acids. *Ital J Anim Sci* 13 123-126
- 3) Polidori P, Vincenzetti S (2011) Peptidi bioattivi e antiossidanti nel latte di asina: proprietà nutraceutiche e dietologiche. In: Milonis E, Polidori P “Latte di asina - produzione, caratteristiche e gestione dell’azienda asinina” Ed Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche Brescia 82 129-138
- 4) Martini M, Altomonte I, Salari F, Caroli AM (2014) Short communication: Monitoring nutritional quality of Amiata donkey milk: Effects of lactation and productive season. *J Dairy Sci* 97 doi:10.3168/jds.2014-8544
- 5) Monti G, Bertino E, Muratore MC, Coscia A, Cresi F, Silvestro L, Fabris C, Fortunato D, Giuffrida MG, Conti A (2007) Efficacy of donkey’s milk in treating highly problematic cow’s milk allergic children: an in vivo and in vitro study. *Pediatr Allergy Immunol* 18 258-264
- 6) Zuffada E (2011) produzione di latte d’asina per il consumo umano. In: Milonis E, Polidori P “Latte di asina - produzione, caratteristiche e gestione dell’azienda asinina” Ed Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche Brescia 82 111-118
- 7) Bendicho S, Martí G, Hernandez T, Martín O (2002) Determination of proteolytic activity in different milk systems. *Food Chem* 79 245-259

- 8) Bulgari O, Campagnari M, Bolzoni G, Gigliotti C, Caroli A (2009) Dosaggio dell'attività enzimatica delle proteasi del latte bovino. *Sci Tecn Latt-Cas* 60 463-472
- 9) Erhardt G, Juszczak J, Panicke L, Krick-Saleck H (1998) Genetic polymorphism of milk proteins in Polish Red Cattle: a new genetic variant of beta-lactoglobulin. *J Anim Breed Genet* 115 63-71
- 10) SAS 9.1 (1999) SAS Institute
- 11) Herrouin M, Mollé D, Fauquant J, Ballestra F, Maubois J -L, Léonil J (2000) New genetic variants identified in donkey's milk whey proteins. *J Protein Chem* 19, 105-115
- 12) Fantuz F, Vincenzetti S, Polidori P, Vita A, Polidori F, Salimei E (2001) Study on protein fractions of donkey milk. *Proceedings of 14th Congress ASPA* pp 635-637