

I. HADDAD, M. MOZZON,
R. STRABBIOLI, N.G. FREGA

Indagine sulla struttura trigliceridica del latte di giumenta

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 11, N. 3, 149-153, 2009

TITLE
Stereospecific analysis of triacylglycerols in mare's milk

KEY WORDS
Mare milk, triacylglycerols, stereospecific analysis

PAROLE CHIAVE
Latte di giumenta, triacilgliceroli, analisi posizionale

Summary

Fatty acids composition of mare milk triacylglycerols (TGs) was studied at three different lactation stages. Stereospecific analysis of TGs was carried out with Chemical deacylation and enzymatic hydrolysis to determine the fatty acids distribution on the glycerol backbone as the TG structure are of importance when considering the biological functions, the nutritional value as well as the technological properties of milk lipids. Milk samples showed a high content of EFA, about 25% of the total fatty acid composition. In all considered lipid fraction saturated fatty acids (SFA), especially about 50% to 70% of C_{8:0} and C_{10:0}, were prevalently esterified at the sn-2 position. Unsaturated fatty acids (UFA) occupied essentially the sn-(1,3) position; on average only 21.2% of C_{18:3n3} and 19% of C_{18:2} were localized at the sn-2 position.

Riassunto

I dati ottenuti in questo lavoro sulla composizione in acidi grassi del latte di giumenta prelevato in tre diversi stadi di lattazione, dimostrano che gli acidi grassi essenziali costituiscono circa il 25 % della composizione totale. Le analisi posizionali sui trigliceridi sono state eseguite per determinare la distribuzione degli acidi grassi sul glicerolo. In tutti i campioni di latte analizzati, gli acidi grassi saturi risultano principalmente esterificati nella posizione secondaria (sn-2). In particolare, dal 50% al 70% dell'acido caprinico e laurico sono in sn-2. Gli acidi grassi insaturi invece tendono ad occupare le posizioni primarie (sn-1/3); mediamente il 21.2% del 18:3ω3 e il 19% di 18:2 sono localizzati in sn-2.

Università Politecnica Delle Marche,
Dipartimento Alimenti e Salute,
Ancona, Italia

Indirizzo per corrispondenza:
Prof. Natale G. Frega
Università Politecnica Delle Marche,
Dipartimento Alimenti e Salute,
Via Brece Bianche
60131 Ancona, Italia
E-mail: n.g.frega@univpm.it

Abbreviazioni

AG, acido grasso; AGI, acidi grassi insaturi; AGMI, acidi grassi monoin-saturi; AGPI, acidi grassi polinsaturi; AGS, acidi grassi saturi; MG, mono-gliceridi; TG, triacilgliceroli; TLC, thin layer chromatography.

Introduzione

La ridotta allergenicità della fra-zione proteica del latte equino ri-spetto a quella del latte dei rumi-nanti (1, 2) ha costituito la spinta fondamentale ad una più completa valutazione nutrizionale del latte

di giumenta ai fini di un suo possibile impiego nell'alimentazione umana in campo dietetico e in prodotti per l'infanzia sia come bevanda, tal quale o come parte di formulati "umanizzati", sia, dopo trasformazione, come prodotto caseario fresco.

I dati reperiti in letteratura sulla composizione della quota lipidica del latte di giumenta sono piuttosto scarsi e limitati alla composizione acidica totale ed al contenuto in specifici analiti (colesterolo, tocoferoli e altre vitamine liposolubili) (3-5) mentre non è nota la distribuzione dei singoli acidi grassi nelle 3 posizioni del glicerolo, di fondamentale importanza per una valutazione nutrizionale il più corretta possibile della frazione lipidica del latte equino (6, 7).

Le attività enzimatiche, a vario titolo coinvolte nella digestione dei lipidi, infatti, presentano tutte una specificità posizionale di azione, sia nei riguardi di molecole trigliceridiche (lipasi pancreatiche e linguale, lipasi non Ca dipendente del latte umano) che di molecole fosfolipidiche (fosfolipasi A₂).

È pur vero che negli enterociti avviene il riasssemblaggio dei prodotti delle varie attività lipolitiche responsabili della digestione dei lipidi ma è altrettanto dimostrato che le cinetiche di assorbimento dei prodotti di idrolisi (AG, 2-MG) non sono completamente indipendenti dalle caratteristiche della ca-

tena idrocarburica degli AG coinvolti. Circa la razionalizzazione di queste differenze sono stati di volta in volta invocati fattori quali la diversa efficienza dei MG nella stabilizzazione dei sistemi micellari e la diversa solubilità dei saponi di Ca, forma nella quale sono almeno parzialmente presenti gli AG prodotti dalla lipolisi. Inoltre il riasssemblaggio presenta di per sé stesso una sua specificità: gli AG volatili prendono una via diversa rispetto a quelli da 14-16 atomi di C in su, quella venosa anziché quella linfatica, e giungono direttamente al fegato senza praticamente influenzare la risposta lipidica postprandiale (8, 9).

Il presente lavoro si propone quindi di indagare sulla struttura trigliceridica del latte equino al fine di ottenere ulteriori parametri di valutazione sulle caratteristiche nutrizionali di un substrato con significative potenzialità di base.

Disegno sperimentale

I dati analitici sono stati ottenuti da un campione omogeneo di latte massale proveniente dalla mungitura di tre giumente di cavallo da sella Italiano a 20, 40 e 150 giorni post partum. I campioni di latte sono stati immediatamente trasportati in laboratorio, liofilizzati e stoccati a -20°C per le ulteriori analisi.

La frazione lipidica è stata estratta dai liofilizzati mediante una modificazione del metodo di Folch (10). Per la separazione delle singole classi lipidiche è stata utilizzata la TLC preparativa su lastre di Silicagel G in doppio sviluppo (11). La frazione trigliceridica è stata sottoposta ad analisi posizionale attraverso procedure di idrolisi parziale chimica mediante reattivi organometallici e successiva analisi GC dei prodotti dell'idrolisi (11).

Risultati e discussione

Il contenuto di grasso del latte di giumenta, osservato in questa ricerca (Tab. 1), è risultato mediamente basso (2%) rispetto a quello ritrovato nel latte vaccino (3.5-4%) (12) e umano (3.54%) (13). Tale grasso manifesta inoltre un'ampia variabilità durante la lattazione passando dal 2% all'0.8%. Questi risultati concordano abbastanza bene con diversi valori riportati da altri autori che hanno osservato come il contenuto di grasso nel latte di giumenta sia una funzione inversa dello stadio di lattazione (14).

Nella tabella 1 viene indicata la composizione in acidi grassi dei campioni di latte a differenti tempi di prelievo. Gli acidi grassi saturi a corta e media catena (C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0}) sono presenti

in quantità costantemente alti (mediamente il 51% dell'intera composizione acidica) durante tutto il periodo di lattazione. In particolare gli AG saturi presentano le aliquote maggiori durante il primo periodo (più del 55%), ma dimostrano una tendenza a diminuire alla fine della lattazione, per raggiungere un valore simile a quello riportato in letteratura (51.9%) (12). Nettamente inferiore risulta la quantità dell'acido stearico (1.01%) nel grasso del latte di giumenta rispetto a quanto si possa ritrovare nel latte vaccino e quello umano, dove i valori medi si collocano rispettivamente intorno a 13.7% (12) e 7.32% (12). Per quanto riguarda gli AG insaturi, i TG del latte di giumenta risultano più ricchi in acido linoleico e linolenico (25%) rispetto ai lattini vaccino (12) e umano (19%) (15). Il rapporto linoleico/linolenico è inoltre pari a 1 nei primi 20 giorni e decresce durante il periodo di lattazione fino a 0,5. Questi valori di AG polinsaturi sono di grande importanza perché questi composti non vengono autonomamente prodotti dall'organismo umano e sono ancora più importanti per i neonati che non possono assumere latte materno e che debbono necessariamente ricorrere a formule sostitutive.

I dati sulla distribuzione intra-molecolare dei principali acidi grassi sono riportati nella tabella 2.

Tabella 1 - Contenuto lipidico e composizione in acidi grassi del latte equino (n=3)

Giorno di lattazione	20	40	150
Lipidi (g/100 g)	2,10±0.17	2,05±0.10	0,83±0,30
Acido grasso (Moli%)			
C _{8:0}	6.75±1.39	6.10±0.91	8.23±0.15
C _{10:0}	15.38±0.62	11.9± 2.46	14.09± 0.76
C _{10:1}	2.30± 0.08	1.81±0.53	2.93±0.29
C _{11:0}	0.00±0.00	0.00±0.00	0.32±0.02
C _{12:0}	12.56±0.57	9.86±2.33	11.97±0.79
C _{12:1A7}	0.19±0.02	0.24±0.19	0.36±0.04
C _{12:1A9}	0.14±0.03	0.10±0.14	0.30±0.04
C _{13:0}	tracce	tracce	tracce
C _{14:0}	8.74±0.52	7.56±0.64	6.99±0.36
C _{14:1A9c}	0.59±0.05	0.60±0.06	0.73±0.04
C _{15:0}	0.23±0.04	0.24±0.01	0.53±0.02
IsoC _{15:0}	tracce	0.36±0.01	tracce
C _{16:0}	16.04±0.58	17.09±2.00	18.55±0.16
C _{16:1A7}	0.14±0.02	0.26±0.04	0.22±0.02
C _{16:1A9c}	3.20±0.09	4.48±0.15	3.52±0.09
C _{17:0}	0.15±0.02	0.18±0.02	0.37±0.01
C _{17:1A10c}	0.17±0.03	0.25±0.05	0.56±0.02
C _{18:0}	1.13±0.17	0.89±0.20	0.66±0.04
C _{18:1A9c + A11c}	9.23±0.74	11.89±2.07	13.77±0.68
C _{18:2A9, A12c}	10.66±0.40	8.36±1.84	11.51±1.11
C _{20:0}	0.11±0.09	tracce	tracce
C _{18:3ω3}	11.58±0.31	15.60±2.96	17.93±0.24
C _{20:1A11C}	0.10±0.01	0.17±0.14	0.16±0.02
C _{20:2A11c, A14c}	0.17±0.03	0.18±0.05	0.22±0.09
C _{20:4}	0.28±0.02	0.37±0.20	tracce
AGS (%)	57.18±1.26	50.64±3.42	50.18±0.02
AGI (%)	42.01±0.76	47.85±3.21	49.35±1.90
AGMI (%)	17.81±0.50	23.07±1.19	23.36±0.45
AGPI (%)	24.20±0.68	24.79±2.17	27.00±1.45
AGS:AGI	0.74	0.95	0.98
C _{18:2A9, A12c} : C _{18:3ω3}	1.03	0.61	0.72

Nel latte prelevato a 20 giorni di lattazione, la posizione sn-1 risulta esterificata principalmente con il

12:0 (17,39 moli%), il 16:0 (15,85 moli%) e il 10:0 (12,44 moli%). Nella posizione secondaria sono

Tabella 2 - Distribuzione intramolecolare in moli % degli acidi grassi sui trigliceridi (n=3)

Giorno di lattazione	20			40			150		
	sn-1	sn-2	sn-3	sn-1	sn-2	sn-3	sn-1	sn-2	sn-3
C _{8:0}	3,94±0,65	8,43±1,31	4,33±0,68	3,55±0,12	9,35±0,08	5,17±1,10	2,17±0,04	14,53±0,73	3,74±1,02
C _{10:0}	12,44±0,80	17,40±2,74	4,95±0,88	5,97±1,33	16,38±0,91	5,51±2,48	5,96±0,30	19,53±0,39	6,25±0,37
C _{12:0}	17,39±1,12	17,51±0,68	5,51±0,44	8,40±1,02	9,07±0,26	6,36±0,98	8,08±0,10	13,42±0,22	8,42±0,07
C _{14:0}	10,95±0,99	12,09±1,20	6,81±1,83	6,88±0,05	9,51±0,33	6,07±0,14	4,46±0,29	9,21±0,49	4,39±0,21
C _{16:0}	15,85±3,11	22,35±2,84	21,14±2,9	16,73±1,76	26,30±0,06	20,62±6,06	15,26±0,17	16,64±0,49	16,16±0,27
C _{16:1n9c}	3,19±0,24	2,79±0,23	3,44±0,52	4,23±0,06	4,30±0,12	3,78±0,34	3,33±0,07	2,29±0,06	2,68±0,2
C _{18:1n9c + Δ11c}	9,13±1,17	3,20±0,60	22,17±5,35	18,20±2,41	5,33±0,29	19,52±3,43	22,97±1,15	5,34±0,26	21,49±1,02
C _{18:2n9, Δ12c}	9,21±0,74	5,39±0,76	11,05±2,75	9,16±0,05	5,65±0,32	7,83±0,33	14,26±0,62	6,79±0,38	13,93±3,93
C _{18:3n3}	12,95±1,28	5,23±0,87	8,28±0,36	21,65±1,70	8,64±0,63	12,24±0,05	21,48±0,62	8,83±0,14	23,47±2,52

presenti soprattutto il 16:0 (22,35 moli%), il 12:0 (17,51 moli%) e il 10:0 (17,40 moli%). Mentre la sn-3 è occupata essenzialmente del 18:1 (22,17 moli%), il 16:0 (21,14 moli %) e il 18:2 (11,05 moli %).

A 40 giorni di lattazione, la posizione sn-1 risulta esterificata principalmente con il 18:3 (21,65 moli%), il 18:1 (18,20 moli%) e il 16:0 (16,73 moli%). Nella posizione secondaria sono presenti soprattutto il 16:0 (26,30 moli%), il 10:0 (16,38 moli%) e il 14:0 (9,51 moli%). Mentre la sn-3 è occupata essenzialmente del 16:0 (20,62 moli%), il 18:1 (19,52 moli %) e il 18:3 (12,24 moli %).

In fine lattazione, la posizione sn-1 risulta esterificata principalmente con il 18:1 (22,97 moli%), il 18:3 (21,48 moli%) e il 16:0 (15,26 moli%). Nella posizione secondaria sono presenti soprattutto il 10:0 (19,53 moli%), il 16:0

(16,64 moli%) e il 8:0 (14,53 moli%). Mentre la sn-3 è occupata essenzialmente del 18:3 (23,47 moli%), 18:1 (21,49 moli %) e il 16:0 (16,16 moli %).

In tutti i campioni di latte analizzati gli AG saturi risultano esterificati soprattutto nella posizione secondaria; approssimativamente dal 50 al 70% dell'8:0 e del 10:0 sono in sn-2. È necessario sottolineare che con l'aumento del numero di atomi di carbonio gli AG saturi sono più concentrati in sn-2, ma la loro percentuale è sotto il 50%. L'acido palmitico ad esempio, nei tre periodi di lattazione, rappresenta rispettivamente il 37,65%, 39,67% e 34,62%. Questo ultimo dato è importante perché le ricerche sull' influenza della distribuzione posizionale degli acidi grassi su l'assorbimento dei TG nel latte umano e nei formulati infantile (9) dimostrano che gli AG saturi e

particolarmente l'acido palmitico vengono assorbiti meglio quando sono esterificati in sn-2.

Per quanto riguarda gli AG insaturi, l'acido palmitoleico è distribuito quasi uniformemente tra le tre posizioni, mentre quelli con 18 atomi di carbonio tendono ad occupare prevalentemente le posizioni primarie (1/3). Mediamente il 21,2% del C_{18:3n3} e il 19% di C_{18:2} sono localizzati in sn-2; tutto il resto è distribuito fra le posizioni primarie.

La distribuzione degli AG insaturi sui TG del latte equino sono simili a quelli trovati nel latte umano (7), in cui il 9% del acido oleico e il 18% del acido linoleico sono in sn-2. Nonostante che gli AG polinsaturi nel latte umano siano ben assorbiti indipendentemente della posizione che occupano sul glicerolo, la presenza del C_{18:2} e il C_{18:3n3} nella posizione se-

condaria si è rivelata determinante per la sintesi, nel fegato, dell'acido arachidonico (16).

Ringraziamenti

La borsa di dottorato è stata cofinanziata dal Rotary Club di Osimo.

Bibliografia

- Gall H, Kalveram CM, Sick H, Sterry W. Allergy to the heat-labile proteins α -lactalbumin and β -lactoglobulin in mare's milk. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 79 (6): 1304-7.
- Businco L, Giampietr PG, Lucenti P, et al. Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105 (5): 1031-3.
- Gay LS, Kronfeld DS, Grimsley-Cook et al. Retinol, β -carotene and α -tocopherol concentrations in mare and foal plasma and in colostrum. *Journal of Equine Veterinary Science* 2004; 24 (3): 115-20.
- Salimei E, Varisco G, Rosi F. Major constituent, leptin, and non-protein nitrogen compounds in mares' colostrum and milk. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42: 65-72.
- Csapó J, Martin TG, Makray S, Csapó-Kiss ZS. Composition of mare's colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin content. *International Dairy Journal* 1995; 5: 393-402.
- Mu H, Høy CE. The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research* 2004; 43: 105-33.
- Tomarelli RM, Meyer BJ, Weaber JR, Bernhart FW. Effect of positional distribution of the absorption of the fatty acids in human milk and infant formulas. *J. Nutrition* 1968; 95: 583-90.
- Kubow S. The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Nutritional Biochemistry* 1996; 7: 530-41.
- Koletzko B, Demmelmair H, Socha P. Nutritional support of infants and children: supply and metabolism of lipids. *Baillière Clinical Gastroenterology* 1998; 12 (4): 671-93.
- Folch J, Lees M, Solane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
- Christie WW. *Lipid Analysis. Structural Analysis of Lipids by means of Enzymatic Hydrolysis*. Pergamon Press, Oxford, second edition 1973; 155-66.
- Malacarne M, Martuzzi F, Summer A, Mariani P. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal* 2002; 12: 869-77.
- Jensen RG. Lipids in human milk. *Lipids* 1999; 34: 1243-71.
- Pikul J, Wójtowski J. Fat and cholesterol content and fatty acid composition of mare's colostrums and milk during five lactation months. *Livestock Science* 2008; 113: 285-90.
- Romeu-Nadal M, Castellote AI, López-Sabater MC. Effect of cold storage on vitamins C and E and fatty acids in human milk. *Food Chemistry* 2008; 106: 65-70.
- Carnielli VP, Luijendijk IHT, Van Beek RHT, Boerma GJM, Degenhart HJ. Effect of dietary triacylglycerol fatty acid positional distribution on plasma lipid classes and their fatty acid composition in preterm infant. *American Journal of Clinical Nutrition* 1995; 62: 776-81.