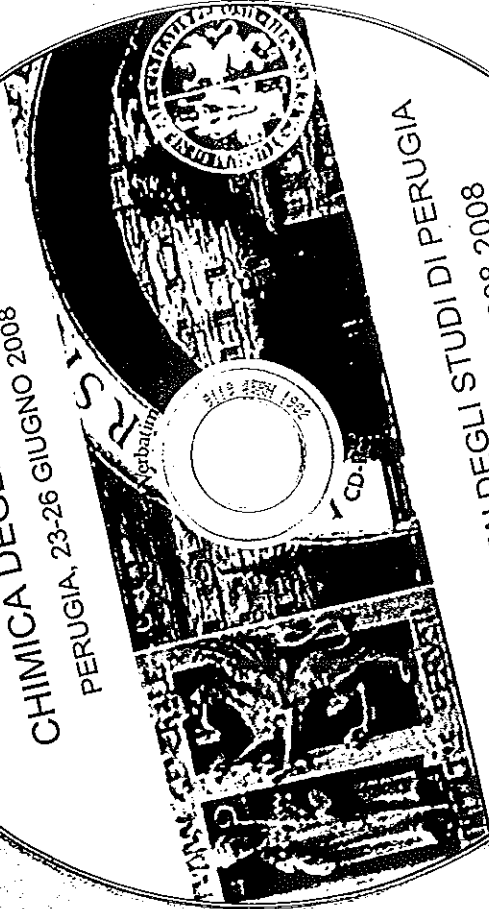


VII CONGRESSO NAZIONALE
di
CHIMICA DEGLI ALIMENTI
PERUGIA, 23-26 GIUGNO 2008



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PERUGIA
VII CENTENARIO 1308 2008
ISBN 978-88-86993-28-9

FINGERPRINT TERPENICO IN DIFFERENTI LATTI D'ALPEGGIO

Giordano M., Belviso S., Grosso S., Zeppa G.

Di.Va.P.R.A. - Settore Microbiologia Agraria e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Torino

Introduzione

La catena montuosa delle Alpi rappresenta un ecosistema unico al mondo, caratterizzato, nel suo complesso, da un'ampia differenziazione vegetazionale, in grado di sostenere numerose ed importanti produzioni casearie tipiche, di cui regioni come il Piemonte, ad esempio, vantano un'antica tradizione. Di importanza primaria sono quindi le attività agropastorali e zootecniche delle comunità alpine le quali, per continuare ad esistere ed a presidiare efficacemente il territorio, necessitano di un'attiva promozione delle loro produzioni. In particolare la valorizzazione dei prodotti di terroir quali latte e formaggi da latte crudo di alpeggio non può prescindere dalla definizione di una catena pascolo-animale-prodotto e quindi da una relazione compositiva tra i suddetti fattori produttivi.

Negli ultimi anni numerosi studi hanno evidenziato che metaboliti secondari delle piante, quali i mono- ed i sesqui-terpeni, possono essere utilizzati per discriminare i latti ed i formaggi ottenuti dal pascolamento del bestiame in zone di alta quota, caratterizzate dalla presenza di dicotiledoni ricche in terpeni, da prodotti provenienti da animali alimentati in zone di fondovalle, in cui vi è una vegetazione con predominanza di graminacee a scarso contenuto terpenico (Bugaud et. al., 2001).

I pascoli sono però caratterizzati da una copertura erbacea costituita da un mosaico più o meno complesso di tipologie di vegetazione e sono assenti studi in cui vengono posti a confronto i profili terpenici del latte ottenuto da formazioni pascolive differenti in condizioni controllate.

In questa ricerca si è quindi cercato di definire la composizione volatile, ed in particolare terpenica, di campioni erbacei provenienti da due formazioni vegetazionali alpine di alta quota, un Trifoglieto ed un Festuceto, poste in una valle alpina piemontese (Valle Stura). In seguito si è analizzata la presenza di tali metaboliti nel latte prodotto durante l'arco estivo da bovine pascolanti, in condizioni controllate, su queste formazioni. L'obiettivo è stato pertanto quello di verificare l'influenza della formazione vegetazionale sulla composizione terpenica del latte per valutare la possibilità di differenziarlo in base all'area

di pascolamento. La tecnica estrattiva di tali metaboliti volatili ha previsto l'utilizzo della microestrazione in fase solida in spazio di testa (HS-SPME).

Materiali e Metodi

Estrazione dei composti volatili dai campioni vegetazionali

Campioni di circa 100 g di due formazioni vegetazionali, un Trifoglieto (T) ed un Festuceto (F) sono stati raccolti in alpeggio (2000 m s.l.m.), durante l'estate 2007, in due periodi sperimentali successivi (periodo 1 e 2) e posti, al momento della raccolta, in sacchetti di polietilene ed immediatamente congelati (-18°C). Prima dell'analisi i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente, tagliati in pezzatura uniforme (2 cm), pesati ed introdotti in contenitori di vetro con tappo perforabile per la successiva estrazione mediante HS-SPME. Si è utilizzata per l'estrazione una fibra trifasica StableFlex 2 cm-50/30 μ m divinilbenzene/carboxen/polidimetilsilossano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco).

Dopo l'ottimizzazione delle condizioni di estrazione, a ciascun campione (20 g), sono stati aggiunti 200 μ L di una soluzione etanolica di 3-metilcicloesano e 4-tert-butilcicloesano (10 ppm) quali standard interni. Le condizioni di estrazione utilizzate sono state: quantità di campione 20 g, volume del contenitore 1 L, tempo di equilibrio 45 minuti, tempo di estrazione della frazione volatile 25 minuti, temperatura di estrazione 53°C. Gli estratti (5 repliche) sono stati quindi analizzati mediante gas cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) in condizioni splitless per 4 minuti.

Estrazione dei composti volatili dai campioni di latte crudo

Durante l'estate 2007 sono stati campionati 500 ml di latte crudo per entrambe le formazioni vegetazionali T ed F, in corrispondenza del 3° e 6° giorno di ciascuno dei due periodi sperimentali (periodo 1 e 2) individuati per il campionamento della vegetazione.

Per le analisi, 12 g di coagulo, ottenuto acidificando a pH=4,2 50 mL di latte crudo, sono stati addizionati di una soluzione di standard interno (400 μ L di 1,3,5-triisopropilbenzene, 10 ppm) e distillati in alto vuoto. Il distillato acquoso ottenuto (3 mL) è stato sottoposto all'estrazione mediante spazio di testa, in un vial da 10 ml, riscaldato mediante blocco di alluminio termostato a 45°C. Dopo 5' di equilibrio, la componente volatile è stata estratta per 30 min con fibra trifasica StableFlex 2 cm-50/30 μ m di DVB/CAR/PDMS (Supelco). Lo spazio di testa è stato analizzato mediante GC/MS in condizioni splitless per 4 minuti (3 repliche).

Analisi GC/MS

Gli estratti sono stati analizzati con un gascromatografo Shimadzu GC-17A accoppiato a uno spettrometro di massa a quadrupolo Shimadzu QP-5000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) dotato di una colonna capillare DB-WAX, 30m×0,25mm i.d., 0,25 μ m spessore del film (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) ed iniettore split/splitless. Il gas carrier utilizzato è stato l'elio con un flusso di 1 ml/min. E' stata usata la seguente programmata di temperatura: 35°C per 5', 2°C/min fino a 173°C, 173°C per 1 minuto, 15°C/min fino a 210°C, 210°C per 5'. Gli spettri di massa sono stati registrati tra 33 e 300 uma con un'energia di ionizzazione a impatto elettronico di 70 eV in modalità TIC per le matrici vegetali e in modalità SIM (Selected Ion Mode) per gli estratti acquosi del latte, monitorando ed integrando le aree dei picchi degli ioni caratteristici dei mono- e dei sesquiterpeni rilevati. La sorgente e l'interfaccia sono stati mantenuti a 230°C e la velocità di scansione è stata di 500 amu/sec.

L'identificazione dei singoli composti è stata effettuata paragonando gli spettri di massa con quelli presenti nei database NIST 12, NIST 62 ed Adams, e con quelli di standard autentici, quando disponibili. Sono stati inoltre identificati calcolando gli indici di ritenzione lineari (LRI) ottenuti previa iniezione di una serie omologa di una miscela di idrocarburi (da C8 a C25) operando nelle stesse condizioni cromatografiche sopra riportate e paragonandoli con quelli pubblicati in letteratura.

I risultati sono stati espressi in unità arbitrarie, rapportando l'area del picco corrispondente allo ione caratteristico o più abbondante dei mono- e sesquiterpeni rilevati con quella del picco corrispondente allo ione caratteristico dello standard interno.

Risultati e discussione

Inizialmente il lavoro è stato indirizzato alla conoscenza del profilo volatile delle matrici vegetali utilizzate per il pascolamento degli animali. Sono state rilevate, nelle due formazioni vegetazionali in sperimentazione, il Trifoglieto ed il Festuceto, la presenza, rispettivamente, di 50 e 48 molecole appartenenti alle classi dei monoterpeni, sesquiterpeni e dei norisoprenoidi (dati non riportati). Alcuni di questi metaboliti secondari potrebbero essere potenzialmente utilizzabili quali traccianti in quanto, come riportato in Tabella 1, numerose delle molecole rilevate nei campioni di latte, prodotti con il pascolamento sul Trifoglieto e sul Festuceto, risultano presenti anche nella relativa formazione vegetazionale. Infatti delle molecole riscontrate nelle due matrici vegetazionali, ne sono state rilevate rispettivamente 15 e 17 nei campioni di latte relativi. Da questi risultati si può ipotizzare che dette molecole possano essere quindi importanti ai fini della

tracciabilità del prodotto. In particolare la maggior parte delle molecole marker riscontrate nel latte è risultata appartenere alla classe dei monoterpene, i più abbondanti dei quali sono risultati il geranil acetone, l' α -terpineolo, la canfora, il limonene ed il linalolo. L'abbondanza dei composti è stata caratterizzata da un'alta variabilità, come si evince dai valori dei coefficienti di variazione (RSD), che variano da un minimo di 5 ad un massimo di 141%, in accordo con i dati riportati in letteratura su latte di malga (Agabriel et al., 2007).

Tabella 1: Aree medie normalizzate dei terpenoidi rilevati nei latti provenienti dalle due differenti formazioni vegetazionali (Trifoglieto e Festuceto)

Composto	LRI ^a	Latte (Trifoglieto)								Latte (Festuceto)							
		Periodo 1				Periodo 2				Periodo 1				Periodo 2			
		Giorno 3°		Giorno 6°		Giorno 3°		Giorno 6°		Giorno 3°		Giorno 6°		Giorno 3°		Giorno 6°	
Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD	Media	RSD		
α -Pinene*	1008	0,152	25	0,105	24	0,009	36	0,013	3	0,050	29	0,045	83	0,061	27	0,094	16
α -Tuiene*	1015	nr	--	0,048	43	nr	--	nr	--	nr	--	0,013	173	nr	--	nr	--
Canfene*	1046	nr	--	nr	--	nr	--	nr	--	nr	--	nr	--	0,011	25	nr	--
b-Pinene*	1081	0,051	8	0,033	26	0,006	33	nr	--	0,051	29	0,068	138	0,113	30	0,201	6
Sabinene*	1101	nr	--	nr	--	nr	--	nr	--	0,017	23	0,022	173	0,032	32	0,059	5
b-Mircene*	1149	nr	--	nr	--	0,008	26	nr	--	0,012	33	0,009	173	0,012	105	nr	--
Limonene*	1176	0,666	97	0,223	31	0,144	46	0,043	7	0,089	37	0,269	66	0,080	53	0,389	52
Cineolo*	1188	16,982	45	0,080	0	0,035	5	0,018	55	0,464	49	0,183	41	0,044	43	0,145	27
(Z)- β -Ocimene*	1227	nr	--	0,025	5	nr	--	nr	--	0,021	49	0,014	173	0,016	42	nr	--
p-Cimene*	1248	0,212	25	0,146	16	0,021	53	0,009	69	0,114	20	0,084	93	0,053	41	0,123	22
cis Linalol ossido*	1427	0,128	44	nr	--	0,031	24	nr	--	0,053	53	0,088	88	0,116	37	0,068	30
Diidromircenolo	1464	29,523	44	0,144	41	0,352	5	0,182	88	0,405	77	19,65	56	12,013	101	10,972	17
Canfora*	1481	14,801	49	0,034	27	0,074	26	0,071	34	0,267	54	0,330	35	0,130	39	0,268	26
Linalolo*	1541	0,489	51	0,044	21	0,087	7	0,045	69	0,089	56	0,283	38	0,197	59	0,246	21
Bornil acetato	1560	26,365	50	0,188	12	0,102	5	0,081	66	0,756	82	0,838	76	0,467	63	0,727	47
β -Cariofillene*	1572	nr	--	0,020	--	0,013	--	nr	--	0,025	40	0,048	15	0,037	26	0,047	38
Mentolo	1627	23,094	59	0,066	5	0,403	38	0,228	115	0,703	55	17,729	43	10,069	69	17,584	32
Terpinil acetato	1675	0,438	46	0,038	77	0,039	24	0,040	58	0,039	99	0,359	77	0,203	104	0,222	20
α -Terpineolo*	1684	0,955	--	nr	--	0,192	23	0,064	141	0,188	42	0,771	49	0,428	63	0,737	31
Carvone	1705	0,151	--	nr	--	0,022	16	0,011	141	0,033	63	0,089	28	0,063	57	0,073	48
α -Ionone	1829	nr	--	nr	--	nr	--	nr	--	0,015	117	0,164	55	0,099	49	0,044	56
Geranil acetone*	1840	12,280	94	0,095	29	0,299	28	0,208	69	0,263	76	0,996	51	0,642	79	16,983	52
β -Ionone*	1918	nr	--	nr	--	nr	--	0,011	141	0,012	58	0,073	42	0,044	58	0,042	94
Sesquiterpene n.i	2032	0,352	70	0,026	38	0,029	43	0,040	100	0,058	88	0,473	22	0,248	50	0,307	22

*: Molecole rilevate sia nel latte che nelle matrici vegetazionali; ^a: indice di ritenzione lineare calcolato su colonna DB-WAX; nr: non rilevato

Alcuni componenti come il canfene, il sabinene e il β -ionone, sono stati osservati solo nei campioni di latte provenienti dal Festuceto, risultando quindi caratteristici della filiera erbalatte relativa a questo areale di pascolamento. Nei campioni di latte sono stati rilevati, tra i sesquiterpeni, il β -cariofillene ed un sesquiterpene non identificato (LRI_{WAX}=2032), mentre tra i norisoprenoidi, per la prima volta segnalati in prodotti caseari, sono stati identificati l' α -ionone ed il β -ionone. Nei campioni di latte provenienti dal pascolamento sul Trifoglieto si è evidenziata una diminuzione delle sostanze terpeniche nel primo periodo fra il 3° ed il 6° giorno di pascolamento, che non si è verificata nel secondo periodo. Nei campioni di latte provenienti dal Festuceto, invece, il contenuto in terpenoidi è aumentato sia nel primo sia nel secondo periodo fra il 3° ed il 6° giorno di pascolamento.

Da evidenziare inoltre la presenza, nei campioni di latte, di numerose molecole terpenoidiche (diidromircenolo, bornil acetato, mentolo, carvone, α -ionone e un sesquiterpene non identificato), non rilevate nella frazione volatile delle formazioni vegetazionali. Si ipotizza che esse derivino in parte da un'attività di sintesi e/o trasformazione delle molecole da parte della microflora ruminale delle bovine (Broudiscou et al., 2007), sulla quale sarà interessante svolgere ulteriori approfondimenti al fine di poter sviluppare un corretto e completo modello di tracciabilità dei prodotti caseari di terroir.

Conclusioni

I risultati hanno messo in evidenza che il fingerprint terpenico di campioni di latte d'alpeggio consente di definire un collegamento con il territorio di origine sia grazie al passaggio diretto di molecole terpeniche dalla vegetazione al latte sia per la formazione di nuovi biomarker di sintesi o trasformazione. Inoltre si può ipotizzare la possibilità di utilizzare il fingerprint terpenico per distinguere prodotti lattiero-caseari dello stesso areale alpino, ma provenienti da formazioni vegetazionali diverse. Questa applicazione dovrà essere confermata da ulteriori studi su altri areali alpini, in cui si porranno a confronto profili terpenici di produzioni casearie derivate da formazioni pascolive differenti da quelle studiate in tale lavoro.

Ringraziamenti

Lavoro condotto nell'ambito del Progetto di ricerca FISR "Pro-Alpe" con finanziamento interministeriale MEF, MIUR, MiPAAF e MATT.

Coordinatore generale Dr. E. Piano, CRA-ISCF (Italia). Pubblicazione n. 16.

Bibliografia

- 1) Agabriel C., Cornu A., Journal C., Sibra C., Grolier P., Martin B., 2007, Tanker milk variability according to farm feeding practices: vitamins A and E, carotenoids, color and terpenoids, J. Dairy Sci., 90: 4884-4896.
- 2) Bugaud C., Buchin S., Coulon J.B., Hauwuy A., Dupont D., 2001, Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk, Lait, 81: 401-414.
- 3) Broudiscou L.-P., Cornu A., Rouzeau A., 2007, In vitro degradation of 10 mono- and sesquiterpenes of plant origin by caprine rumen micro-organisms, J. Sci. Food Agric., 87: 1653-1658.