

INDIVIDUAZIONE DI BIOMARKER TERPENOIDICI PER LA DIFFERENZIAZIONE DI PRODOTTI CASEARI DI MONTAGNA

Simona BELVISO^{1*}, Manuela GIORDANO¹, Mauro COPPA², Giampiero LOMBARDI²,
Giuseppe ZEPPA¹

RIASSUNTO - Negli ultimi anni sono state condotte numerose ricerche sull'utilizzo dei terpeni come biomarker per la tracciabilità dei prodotti lattiero-caseari. Queste molecole infatti, abbondantemente presenti nelle piante, possono essere trasferite dall'erba al latte ed al formaggio derivato, rivelandosi dei potenziali traccianti di filiera. In questo lavoro, i terpeni sono stati analizzati con l'obiettivo di distinguere prodotti lattiero-caseari di aziende di montagna che adottavano diversi sistemi di alimentazione. In particolare, si è confrontato il profilo terpenico di campioni di latte e di formaggio prelevati da aziende con un sistema di allevamento tradizionale estensivo, basato sull'utilizzazione di risorse prato-pascolive, con quello di prodotti reperiti presso un'azienda di controllo, che pratica un allevamento intensivo con bovine alimentate con unifeed. I risultati hanno evidenziato che, tendenzialmente, i prodotti lattiero-caseari derivanti da un'alimentazione ad erba sono più ricchi di composti terpenoidici rispetto a quelli prodotti in condizioni di allevamento intensivo, che utilizza foraggi conservati (prevalentemente, insilato di mais e mangimi). Inoltre, dall'analisi statistica dei dati è emerso che esistono delle molecole terpenoidiche, quali alfa-pinene, beta-pinene, limonene ed i sesquiterpeni, in grado di differenziare i campioni di latte e di formaggio derivanti dai due differenti sistemi di alimentazione.

Parole chiave: latte, formaggio, biomarker, terpeni

SUMMARY - Terpenoids as biomarkers of mountain dairy products - Several studies have been recently carried out to test the effectiveness of terpenes to trace dairy products origin. Terpenes, as plant secondary metabolites, can be directly transferred from forages to milk and cheese. Several authors have proposed terpenes as tracers of animal feeding also in relation to the area of production. Nevertheless dairy product terpene content could be influenced by many factors, such as the type of vegetation exploited, climatic conditions, grazing management, *etc.* In this work, terpenes have been used to differentiate milk and cheeses produced in different farming systems: extensive, based mainly on pasture feeding, and intensive, based on total mixed rations cow feeding. Results showed that dairy products from the extensive farming systems are on average richer in terpenes than those obtained by the intensive ones. Moreover, terpenes such as alfa-pinene, beta-pinene, limonene and sesquiterpenes were able to discriminate milk and cheeses between the two farming systems.

Keywords: milk, cheese, terpenoidic biomarkers

* Corrispondenza ed estratti: simona.belviso@unito.it

¹ DIVAPRA. Università degli Studi di Torino. Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO).

² AGROSELVITER. Università degli Studi di Torino. Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO).

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni sono state condotte numerose ricerche sull'utilizzo dei terpeni come biomarker dei prodotti lattiero-caseari. Queste molecole infatti, quali metaboliti secondari delle piante, possono essere trasferite dall'erba al latte ed al formaggio, rivelandosi dei potenziali traccianti di filiera [1-3].

Tuttavia, alcuni autori hanno osservato come il contenuto in terpeni dei prodotti lattiero-caseari cambi a seconda del tipo di vegetazione, della gestione pastorale, dell'andamento climatico ed anche dell'attività della microflora sia ruminale sia lattica [4, 5].

In questo lavoro è stata studiata la componente terpenoidica di latti e formaggi prodotti da aziende di montagna, quale possibile elemento discriminante del tipo di alimentazione utilizzata: foraggio fresco al pascolo o foraggi conservati (utilizzati in modo prevalente nella razione).

MATERIALI E METODI

Campioni di latte e formaggio. Sono stati analizzati 24 campioni di latte di cisterna provenienti da 9 aziende con sistema di alimentazione estensivo (S.E.) site in Piemonte, nei fondovalle delle valli Orco e Sacra (Torino) e 18 campioni di latte massale provenienti da un'azienda testimone della pianura Piemontese con sistema di alimentazione intensivo (S.I.).

Il S.E. impiega bovine da latte di razza Valdostana Pezzata Rossa, alimentate prevalentemente al pascolo con foraggio fresco (50-80% di erba, 0-35% di fieno e 12-15% di mangimi concentrati), mentre il S.I. impiega bovine di razza Frisona alimentate con unifeed (circa 30-40% di insilato di mais, 30% di fieno e 30% di mangimi concentrati).

La stagione di pascolo del S.E. ha inizio a fine aprile e prosegue fino a fine novembre. Durante il periodo invernale per le bovine del S.E. l'erba di pascolo è sostituita da fieno prodotto almeno per il 50% su prato-pascoli permanenti aziendali ad elevata biodiversità.

Il latte, dopo il campionamento è stato trasformato in formaggi di tipo "Toma", a latte intero crudo, campionati dopo 60 giorni di stagionatura. I campioni sono stati prelevati nel corso dell'anno 2008 e nel mese di gennaio 2009.

Analisi. I campioni sono stati distillati sotto vuoto previa aggiunta di uno standard interno (1,3,5-triisopropilbenzene) e analizzati mediante la tecnica della microestrazione in fase solida in spazio di testa accoppiata alla gas-cromatografia e spettrometria di massa [6].

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nei campioni di latte sono stati rilevati 23 terpenoidi di cui 18 monoterpeni, 2 sesquiterpeni e 3 metaboliti secondari di varia natura (Tab. 1). Nel corso dell'anno, i composti terpenoidici sono risultati tendenzialmente più abbondanti nei campioni di latte da S.E. rispetto a quelli da S.I., come mostrato dalla figura 1 per la classe dei monoterpeni che ha presentato il maggior numero di composti identificati. In particolare, alfa-pinene, beta-pinene, beta-mircene, *p*-cimene, beta-cariofillene, cedrano, beta-ionone e la somma dei sesquiterpeni (beta-cariofillene+cedrano) sono risultati presenti in quantità significativamente maggiori nei campioni di latte del S.E.. Nei campioni di formaggio, sono stati rilevati 27 composti terpenoidici di cui 21 monoterpeni, 2 sesquiterpeni e 3 metaboliti secondari di varia natura (Tab. 2).

Analogamente al caso del latte, nel corso dell'anno, tendenzialmente, i terpenoidi sono risultati più abbondanti nei campioni di formaggio da S.E. rispetto a quelli da S.I., come mostrato dalla figura 2 per la classe più numerosa dei monoterpeni. La figura 2 mostra inoltre che questa tendenza si mantiene anche nel periodo invernale. Anche per il caso del formaggio, il contenuto di alfa-pinene, beta-pinene, *p*-cimene, e della somma dei sesquiterpeni (beta-cariofillene+cedrano) è risultato significativamente più elevato nei campioni da S.E.

Analogamente ad altre ricerche, anche in

Tabella 1 - Valori medi (M), errore standard della media (SEM) e risultati dell'analisi della varianza (P) per ciascuno dei composti volatili identificati nei campioni di latte del sistema estensivo (S.E.) e del sistema intensivo (S.I.). Continua nella pagina successiva

Table 1 - Mean values (M), standard error of the mean (SEM) and ANOVA results (P) for the volatile compounds detected in milk from extensive (S.E.) and intensive farming system (S.I.). It follows in the next page

	S.E.		S.I.		P
	M	SEM	M	SEM	
Alfa-Pinene	0,011	0,002	0,001	0,000	***
Alpha-Pinene					
Beta-Pinene	0,017	0,003	0,000	0,000	***
Beta-Pinene					
Beta-Mircene	0,007	0,002	0,003	0,001	*
Beta-Myrcene					
Limonene	0,083	0,014	0,060	0,009	NS
Limonene					
1,8-Cineolo	0,019	0,003	0,012	0,003	NS
1,8-Cineole					
<i>p</i> -Cimene	0,016	0,003	0,004	0,001	***
<i>p</i> -Cymene					
Mentone is 1	0,035	0,007	0,032	0,007	NS
Menthone is1					
Mentone is 2	0,010	0,002	0,008	0,002	NS
Menthone is2					
Diidromircenolo	0,150	0,021	0,096	0,012	†
Dihydromyrcenol					
Linalolo	0,036	0,004	0,031	0,004	NS
Linalool					
Bornil acetato	0,013	0,003	0,011	0,003	NS
Bornyl acetate					
Beta-cariofillene	0,021	0,006	0,003	0,001	*
Beta-caryophyllene					
Mentolo	0,001	0,001	0,001	0,001	NS
Menthol					
4-Terpineolo	0,002	0,001	0,001	0,000	NS
4-Terpineol					
Isoborneolo	0,001	0,001	0,002	0,001	NS
Isoborneol					
Cedrano	0,012	0,004	0,001	0,000	*
Cedrane					
Terpineol acetato	0,005	0,002	0,009	0,004	NS
Terpinyl acetate					
Alfa-Terpineolo	0,129	0,024	0,126	0,025	NS
Alpha-Terpineol					

segue

	S.E.		S.I.		P
	M	SEM	M	SEM	
Carvone	0,036	0,007	0,034	0,009	NS
Geraniale	0,001	0,000	0,001	0,000	NS
Geranial	0,001	0,000	0,001	0,000	NS
Metil salicilato	0,001	0,000	0,001	0,000	NS
Methyl salicylate					
Beta-Ionone	0,021	0,003	0,013	0,001	*
Beta-Ionone					
Metil diidro jasmonato	0,096	0,022	0,083	0,015	NS
Methyl dihydro jasmonate					
Somma Monoterpeni	0,572	0,069	0,429	0,060	NS
Monoterpenes sum					
Somma altri metaboliti secondari	0,117	0,024	0,096	0,016	NS
Other secondary metabolites sum					
Somma Sesquiterpeni	0,033	0,010	0,003	0,001	*
Sesquiterpenes sum					

† P<0,1; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; NS: non significativo

† P<0,1; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001; NS: not significant;

Is: isomero; Is: isomer

questo lavoro il numero dei monoterpenoidi rilevati ed identificati nei campioni di latte e di formaggio è risultato largamente superiore rispetto a quello dei sesquiterpenoidi [7]. Gli stessi composti che in questo studio hanno consentito di discriminare i due tipi di alimentazione come l'alfa-pinene, il beta-pinene, il limonene e la classe dei sesquiterpeni, sono stati identificati anche da altri autori come composti caratteristici di formaggi ottenuti con un'alimentazione al pascolo [4, 8, 9].

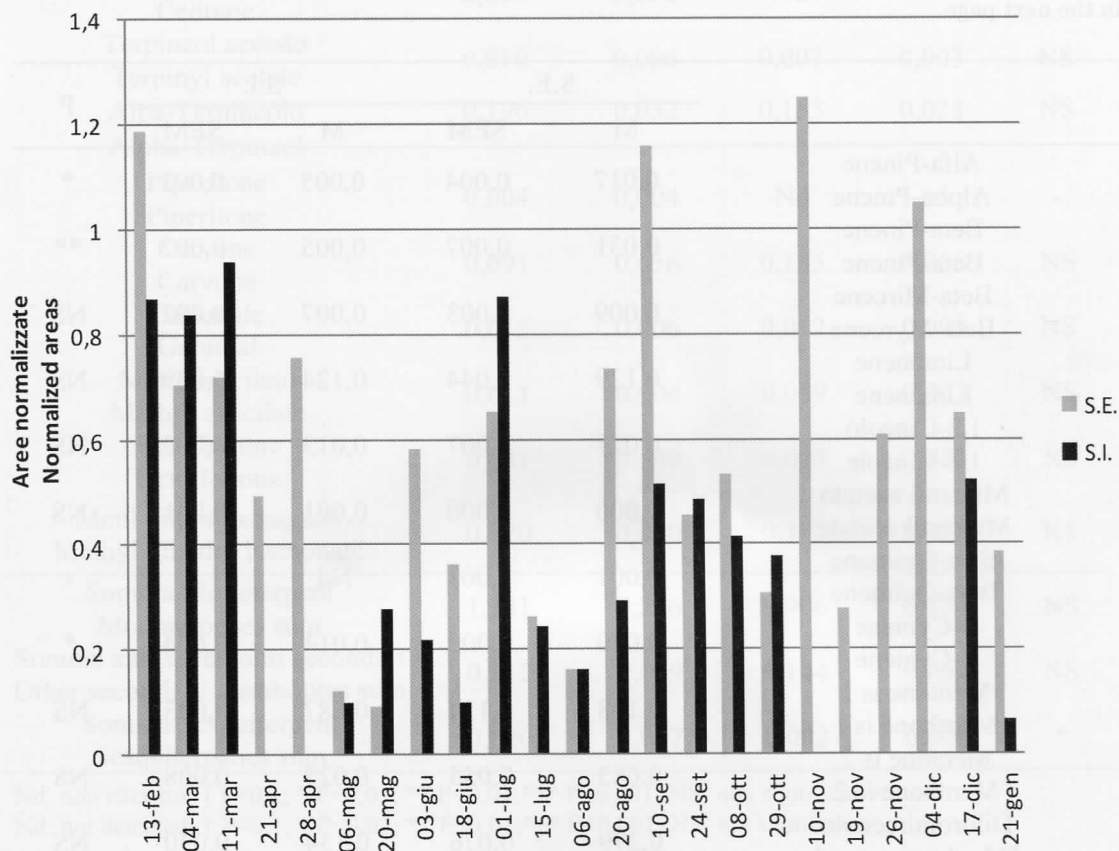
Accanto ai terpenoidi, però, in questo lavoro, sono stati individuati anche altri metaboliti secondari, come il beta-ionone, che, evidenziando una buona capacità discriminante delle due tipologie di alimentazione potrebbe essere utilizzato anch'esso come biomarker. Questa molecola appartiene alla classe dei norisoprenoidi, costituenti ubiquitari di molti frutti e vegetali [10]. La maggior quantità di composti terpenoidici rilevata nel periodo estivo è un dato ampiamente

confermato in letteratura [11].

Un aspetto interessante di questa ricerca è la netta predominanza nel latte di terpenoidi, soprattutto di monoterpeni, anche nel periodo invernale e ciò potrebbe essere dovuto all'utilizzo di fieno di prato-pascoli permanenti di fondovalle alpino ad elevata biodiversità da parte delle aziende del S.E.. La notevole variabilità dei dati, peraltro già evidenziata per questa tipologia di composti in letteratura [4], potrebbe essere stata amplificata, nel presente studio, dal campionamento di latte di cisterna, in cui confluiscono i latti delle 9 aziende che alimentano le bovine giornalmente su appezzamenti diversi, con formazioni vegetazionali di differente composizione floristica e quindi con un profilo in metaboliti secondari molto variabile. Nonostante l'elevata variabilità della matrice di partenza, non si sono tuttavia verificati effetti di "mascheramento" e questo ha consentito di confermare la potenzialità dei composti terpenoidici anche nella discrimi-

Figura 1 - Valori medi della sommatoria delle aree normalizzate dei monoterpeni nei campioni di latte ottenuti dal sistema estensivo (S.E.) e dal sistema intensivo (S.I.)

Figure 1 - Mean values of the sum of the monoterpenes (normalized areas) in milk from extensive system (S.E.) and from intensive system (S.I.)



nazione dei prodotti caseari in funzione del tipo di alimentazione utilizzata dalle lattifere.

Questa ricerca evidenzia che i marker terpenoidici discriminanti rimangono inalterati lungo la filiera latte-formaggio e possono essere considerati quindi marker terpenoidici diretti di filiera oltre che di alimentazione. Il maggior numero di monoterpenoidi identificati nei campioni di formaggio rispetto al latte, potrebbe essere dovuto ad un processo di formazione di questi ultimi nel corso della caseificazione e della stagionatura. Proprio questi processi potrebbero essere la causa della maggiore variabilità del contenuto dei composti individuati nel formaggio con conseguente diminuzione del numero di composti

con capacità discriminante nei confronti delle due tipologie di alimentazione applicate.

CONCLUSIONI

I terpenoidi sono degli interessanti biomarker per la discriminazione dell'origine dei prodotti lattiero-caseari ed in questo lavoro si è messo in evidenza come possano essere utilizzati anche per tracciare il sistema di alimentazione soprattutto se questo è basato sull'utilizzo prevalente di foraggi freschi. L'ampliamento dei dati a disposizione sui prodotti caseari di montagna potrà quindi consentire di costruire un modello di tracciabilità da utilizzarsi per la loro tutela e valorizzazione commerciale.

Tabella 2 - Valori medi (M), errore standard della media (SEM) e risultati dell'analisi della varianza (P) per ciascuno dei composti volatili identificati nei campioni di formaggio da sistema estensivo (S.E.) e da sistema intensivo (S.I.). Continua nella pagina successiva

Table 2 - Mean values (M), standard error of the mean (SEM), and ANOVA results (P) for the volatile compounds detected in cheeses from extensive system (S.E.) and from intensive system (S.I.). It follows in the next page

	S.E.		S.I.		P
	M	SEM	M	SEM	
Alfa-Pinene	0,017	0,004	0,005	0,002	*
Alpha-Pinene					
Beta-Pinene	0,031	0,007	0,005	0,002	**
Beta-Pinene					
Beta-Mircene	0,009	0,003	0,007	0,002	NS
Beta-Myrcene					
Limonene	0,129	0,044	0,124	0,039	NS
Limonene					
1,8-Cineolo	0,027	0,007	0,013	0,003	NS
1,8-Cineole					
Mircenil acetato	0,000	0,000	0,001	0,001	NS
Myrcenil acetate					
Beta-Ocimene	0,001	0,001	Nd	-	-
Beta-Ocimene					
<i>p</i> -Cymene	0,040	0,009	0,014	0,004	*
<i>p</i> -Cymene					
Mentone is 1	0,178	0,114	0,087	0,023	NS
Menthone is 1					
Mentone is 2	0,085	0,055	0,027	0,008	NS
Menthone is 2					
Diidromircenolo	0,279	0,076	0,134	0,030	NS
Dihydromyrcenol					
Linalolo	0,079	0,018	0,054	0,010	NS
Linalool					
Bornil acetato	0,015	0,004	0,006	0,002	†
Bornyl acetate					
Beta-Cariofillene	0,015	0,006	0,002	0,001	†
Beta-Caryophyllene					
<i>Cis</i> Diidrocarvone	0,013	0,011	0,006	0,005	NS
<i>Cis</i> Dihydrocarvone					
Mentolo	0,046	0,029	0,037	0,019	NS
Menthol					
4-Terpineolo	0,017	0,009	0,007	0,004	NS
4-Terpineol					
Isoborneolo	0,057	0,019	0,063	0,026	NS
Isoborneol					

segue

	S.E.		S.I.		P
	M	SEM	M	SEM	
Cedrano					
Cedrane	0,005	0,002	Nd	-	-
Terpineol acetato					
Terpinyl acetate	0,010	0,006	0,007	0,003	NS
Alpa-Terpineolo	0,196	0,032	0,153	0,028	NS
Alpha-Terpineol					
Piperitone					
Piperitone	0,004	0,004	Nd	-	-
Carvone					
Carvone	0,091	0,056	0,145	0,066	NS
Geraniale					
Geranial	0,015	0,006	0,012	0,008	NS
Metil salicilato					
Methyl salicylate	0,011	0,004	0,009	0,003	NS
Beta-Ionone					
Beta-Ionone	0,031	0,009	0,023	0,010	NS
Metil diidro jasmonate					
Methyl dihydro jasmonate	0,170	0,040	0,112	0,026	NS
Somma Monoterpeni					
Monoterpenes sum	1,341	0,256	0,906	0,176	NS
Somma altri metaboliti secondari					
Other secondary metabolites sum	0,212	0,049	0,144	0,032	NS
Somma Sesquiterpeni					
Sesquiterpenes sum	0,020	0,007	0,002	0,001	*

Nd: non rilevato; † P<0,1; * P<0,05; ** P<0,01;*** P<0,001; NS: non significativo

Nd: not detected; † P<0.1; * P<0.05; ** P<0.01;*** P<0.001; NS: not significant

Ringraziamenti:

Poster presentato al 2° Congresso Lattiero-Casario AITeL. Torino, 21 settembre 2010

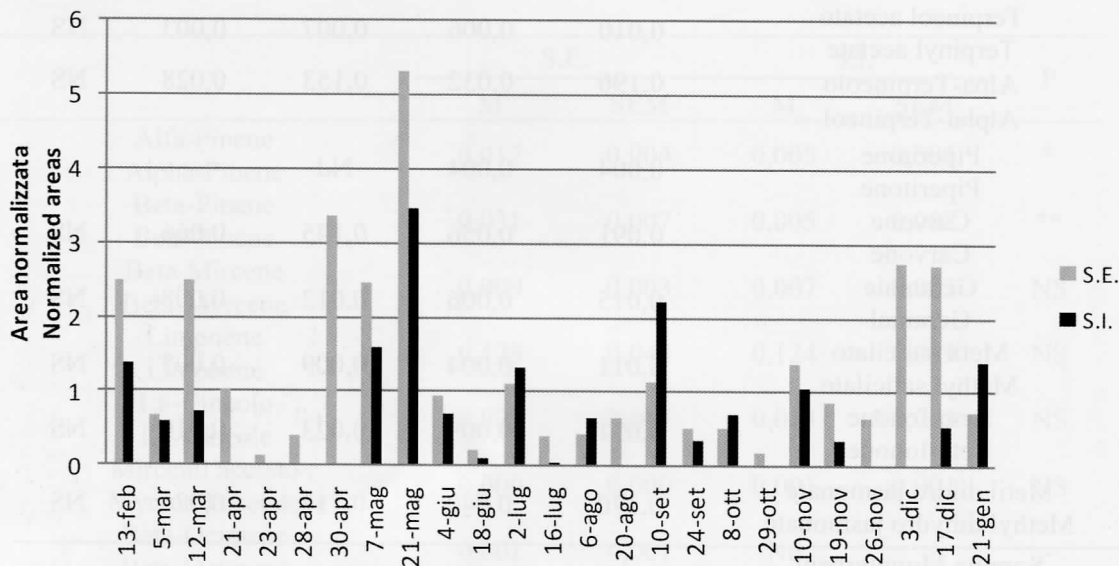
“La ricerca scientifica e la valorizzazione del latte e dei derivati”.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Mariaca RG, Berger TFH, Gauch R, Imhof MI, Jeangros B, Bosset JO (1997) Occurrence of volatile mono-and sesquiterpenoids in highland and lowland plant species as possible precursors for flavor compounds in milk and dairy products. *J Agric Food Chem* 45 4423-4434
- 2) Dumond JP, Adda J (1978) Occurrence of sesquiterpenes in mountain cheese volatiles. *J Agric Food Chem* 26 364-367
- 3) Viallon C, Martin B, Coulon JB, Berdagué JL, Pradel P, Garel JP (2000) Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. *Lait* 80 635-641
- 4) Tornambè G, Cornu A, Pradel P, Kondjoyan N, Carnat AP, Petit M, Martin B (2006) Changes in terpene content in milk from pasture-fed cows. *J Dairy Sci* 89 2309-2319

Figura 2 - Valori medi della sommatoria delle aree normalizzate dei monoterpeni nei campioni di formaggio ottenuti dal sistema estensivo (S.E.) e dal sistema intensivo (S.I.)

Figure 2 - Mean values of the sum of the monoterpenes (normalized areas) in cheeses from extensive system (S.E.) and from intensive system (S.I.)



- 5) Belviso S, Giordano M, Dolci P, Zeppa G (2010) Degradation and biosynthesis of terpenoids by lactic acid bacteria isolated from cheese: first evidence. *Dairy Sci Technol* (in stampa)
- 6) Giordano M, Belviso S, Zeppa G (2009) Analisi di terpeni in prodotti lattiero-caseari mediante tecnica HS-SPME-GC/MS. *Sci Tecn Latt-Cas* 60 85-90
- 7) Cornu A, Kondjoyan N, Martin B, Verdier-Metz I, Pradel P (2005) Terpenes profiles in Cantal and Saint-Nectaire-type cheese made from raw or pasteurized milk. *J Sci Food Agric* 85 2040-2046
- 8) Viallon C, Verdier-Metz I, Denoyer C, Pradel P, Coulon JB, Berdaguè JL (2000) Desorbed terpenes and sesquiterpenes from forages and cheeses. *J Dairy Res* 66 319-326
- 9) Fernandez C, Astier C, Rock E, Coulon JB, Berdaguè JL (2003) Characterization of milk by analysis of its terpene fractions. *Int J Food Sci Technol* 38 445-451
- 10) Winterhalter P, Rouseff R (2001) Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction. In "Carotenoid-derived aroma compounds" (eds Winterhalter *et al*), 1-17. American Chemical Society, Washington, DC
- 11) Cornu A, Martin B, Verdier-Metz I, Pradel P, Coulon JB, Berdaguè JL (2002) Use of terpene profile in dairy products to trace the diet of dairy cows. *Grassland Sci Eur* 7 550-551