

S. LA TERRA¹, V.M. MARINO¹,
S. CARPINO¹, M. MANENTI¹,
G. LICITRA^{1,2}

Acido linoleico coniugato nel formaggio Ragusano DOP (Denominazione di Origine Protetta)

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 10, N. 3, 159-164, 2008

TITLE
Conjugated Linoleic Acid in
Ragusano PDO cheese

KEY WORDS
CLA, cheese, pasture

PAROLE CHIAVE
CLA formaggio, pascolo

Summary

Ragusano PDO (Protected Designation of Origin) is an aged pasta filata cheese. It is a farmstead traditional cheese with unique aroma characteristics correlated to the environmental conditions and traditional cheese making technology. In 1996, Ragusano cheese has been designated PDO from the European Economic Community. It has been reported that dairy cows fed native pasture produce milk and consequently cheese with higher Conjugated Linoleic Acid (CLA) content than dairy cows fed total mixed ration including forages with similar lipid content. The most representative CLA isomer is the rumenic acid (cis-9, trans-11), and it generally constitutes 80%-90% of total CLA. The objective of this study was to determine the effect of Hyblean native pasture diet on CLA isomers content into Ragusano cheese at different ripening stages. We also found that concentration of the total CLA and the cis-9, trans-11 increased with grazing time.

Riassunto

Il Ragusano DOP (Denominazione di Origine Protetta) è un formaggio a pasta filata ottenuto da latte crudo vaccino. Numerosi autori riportano che il latte e conseguentemente i formaggi provenienti da animali allevati al pascolo hanno un contenuto in Acido Linoleico Coniugato (CLA) maggiore di quelli ottenuti da vacche alimentate in stalla. Il principale isomero, che costituisce circa l'80-90% del CLA totale, è l'acido rumenico (cis-9,trans-11). L'obiettivo di questo studio è stata la determinazione dell'effetto del pascolo ibleo sul contenuto del CLA nel Ragusano DOP a diverse stagionature. Inoltre è stata riscontrata una correlazione positiva tra il contenuto totale di CLA e di acido rumenico e il tempo di permanenza (espressa in ore) delle vacche al pascolo. I risultati ottenuti mostrano una correlazione positiva tra i pascoli iblei e l'elevato contenuto in CLA nei campioni di formaggio Ragusano DOP.

Introduzione

L'alimentazione dei ruminanti svolge un ruolo determinante sulla produzione quali-quantitativa del latte

influenzando fortemente le caratteristiche chimico-fisiche ed organolettiche dei prodotti lattiero caseari da esso derivanti (1).

Come è noto il latte è un alimento

¹Consorzio Ricerca Filiera Lattiero-Casearia - CoRFiLaC, Regione Siciliana, Ragusa, Italia,

²Dipartimento di Scienze Agronomiche, Agrochimiche e delle Produzioni Animali - DACPA, Università di Catania, Italia

Indirizzo per corrispondenza:
Dr.ssa. Stefania La Terra
Consorzio Ricerca Filiera Lattiero-Casearia -
CoRFiLaC, Regione Siciliana
S.P. 25 Ragusa Mare Km 5, Ragusa
Tel. 0932-660438
Fax 0932-660448
E-mail: laterra@corfilac.it

con elevato valore nutrizionale, ricco di proteine ad elevato valore biologico, lipidi, vitamine e sali minerali. Tra i lipidi del latte, l'acido linoleico coniugato (CLA), ha delle importanti proprietà funzionali e salutistiche (2). Il CLA comprende un gruppo di isomeri geometrici e posizionali a 18 atomi di carbonio con due doppi legami coniugati. La posizione del doppio legame si trova tra il δ 7 e il δ 14, inoltre la diversa disposizione spaziale degli stessi gruppi funzionali (doppi legami) conferisce alla molecola una diversa configurazione *cis* o *trans*. L'acido rumenico, *cis* 9-*trans* 11, varia dal 75 al 90% del CLA totale nel grasso del latte seguito dagli isomeri *trans* 10-*cis* 12 e *trans* 7-*cis* 9 che rappresentano rispettivamente il 10% e il 2% ed altri isomeri minori; questi isomeri hanno diversi effetti biologici dovuti alle loro differenti proprietà chimiche e fisiche (3).

La grande attenzione rivolta al CLA è stata favorita dal fatto che numerosi esperimenti hanno messo in evidenza un'attività anticancerogena nei confronti di diversi tessuti quali la ghiandola mammaria, il colon, l'epidermide e lo stomaco. Sembra, inoltre, che questa molecola sia capace di modulare la sintesi degli eicosanoidi e di svolgere un'azione antibatterica, antiaterogena e antidiabetica in quanto è stata osservata una diminuzione del tasso di colesterolo LDL nel pla-

sma con conseguente decremento della formazione di placche aterosclerotiche in ratti alimentati con diete arricchite con questo acido grasso. È comunque ritenuto che le specifiche attività biologiche siano da attribuirsi ai singoli isomeri piuttosto che all'intero pool (4). Nel caso del carcinoma della mammella, l'efficacia del *cis* 9-*trans* 11 è dose-dipendente ed è maggiore se la sostanza viene assunta durante lo sviluppo del tumore (5), così come si può osservare per i tumori dell'intestino e della prostata (6).

All'isomero *trans*-10 *cis*-12 si attribuisce la capacità di ridurre l'assorbimento dei lipidi, inibendo l'attività delle lipasi e della stearyl-CoA desaturasi.

La principale fonte di CLA nella dieta umana è rappresentata dagli alimenti derivati dai ruminanti (7). La razione alimentare dei ruminanti se costituita da foraggi verdi rappresenta una fonte specifica di sostanze grasse in grado di variare in modo significativo il contenuto di CLA nel latte (8). I foraggi verdi contengono acidi grassi insaturi ed in particolare l'acido linolenico (che rappresenta da solo il 60% del totale degli acidi grassi), linoleico, oleico. Questi acidi grassi subiscono il processo di bioidrogenazione operata dai microrganismi ruminali cellulolitici. La bioidrogenazione viene svolta dal *Butyrivibrio fibrisolvens* (9), che comporta una prima reazione di isomerizzazione dell'a-

cido linoleico, 18:2^{A-c9,c12}, ad acido linoleico coniugato, 18:2^{Ac9,t11}, e successivamente l'idrogenazione a vaccenico, 18:1^{A-t11}, la cui eventuale saturazione produce l'acido stearico, 18:0. La reazione di isomerizzazione dovuta all'enzima acido linoleico isomerasi, che si trova nella membrana cellulare dei batteri della flora intestinale, avviene in mezzo a una lunga catena idrocarburica lontano da ogni gruppo funzionale.

Studi su questo enzima hanno dimostrato che il massimo di attività si ha con substrati come l'acido linoleico e l'acido linolenico che presentano i doppi legami, necessari per l'attività enzimatica, in posizione *cis*-9-*cis*-12 (10). Pertanto la concentrazione di CLA nei derivati dei ruminanti è influenzata da vari fattori; primo fra tutti incide la quantità di acidi grassi polinsaturi apportati con la dieta, un loro aumento, come nel caso dell'acido linolenico che è il substrato per la sua sintesi, induce un incremento nella produzione del CLA. Si è visto, infatti, che nel latte si hanno variazioni stagionali di CLA con alti valori quando i pascoli sono verdi e quindi ricchi di acidi grassi.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di determinare le differenti concentrazioni dei singoli isomeri di CLA nel formaggio Ragusano a diverse giorni di stagionatura. Il Ragusano è un formaggio a pasta filata prodotto con latte vac-

cino crudo, la cui produzione, su piccola scala, è frutto dell'attività di aziende locali operanti nell'altopiano ibleo, nella zona meridionale della Sicilia (11). Il Ragusano dal 1996 si fregia del marchio DOP (Denominazione di Origine Protetta) (12).

Materiale e metodi

L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di conoscere il contenuto di acido linoleico coniugato (CLA) e di acido rumenico nei campioni di formaggio Ragusano DOP a 90, 120 e 210 giorni di stagionatura.

I campioni analizzati provenivano da quattro aziende produttrici di Ragusano DOP nel territorio Ibleo, selezionate sulla base delle differenti ore di permanenza degli animali al pascolo, rispettivamente a 3, 6, 9, 12 ore.

L'estrazione dei lipidi, dai campioni di formaggio è stata effettuata con la metodica di Folch (13); la saponificazione e la metilazione degli acidi grassi secondo il metodo Banni et al. (14, 15). La determinazione del CLA e dei singoli isomeri è stata effettuata in HPLC.

Inoltre, sugli stessi campioni sono state effettuate le analisi relative all'umidità, grasso, proteine, sale e pH utilizzando le metodiche di riferimento. L'umidità, è stata determinata portando i campioni a peso costante e in una stufa ad aria for-

zata a 100°C per 24 ore (16). Il grasso è stato determinato con il metodo Gerber (17). L'analisi delle proteine è stata effettuata con il metodo Kjeldal (18). Il contenuto di sale (NaCl) è stato determinato secondo il metodo Volhard: retrotitolazione dell'eccesso di Ag^+ con KSCN 0.1 N, utilizzando solfato ferrico d'ammonio come indicatore (19) ed infine il pH è stato misurato con il metodo potenziometrico (20).

Risultati e discussione

La produzione del Ragusano è fortemente legata al pascolo che contiene approssimativamente dall'1 al 3% di grasso/ss, in funzione sia della varietà delle piante ma soprattutto dal periodo stagionale di riferimento, con punte massime in primavera.

Come accennato nell'introduzione il 48-56% del grasso totale dei pascoli è rappresentato dall'acido linolenico, C18:3, importante substrato per la bioidrogenazione ruminale (21). L'elevato contenuto di C18:3 nei foraggi verdi è correlato con l'aumento in CLA, e in particolare di acido rumenico, nel grasso del latte prodotto dagli animali alimentati al pascolo (22).

I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di formaggio Ragusano DOP a diversa stagionatura, rispettivamente 90-120-210 giorni otte-

nuti da vacche alimentate con tempi di permanenza al pascolo differenti (3-6-9-12 ore/d), hanno confermato i dati riportati in letteratura.

Come riportato da Shantha (23) il contenuto di CLA non ha subito variazione significativa con l'avanzare della stagionatura, a 90 giorni infatti il contenuto medio è stato di 913.80 ng/mg di lipidi, a 120 giorni 925.32 ng/mg di lipidi, ed infine a 210 è stato di 901.09 ng/mg di lipidi.

Le ore di permanenza delle vacche al pascolo, invece hanno influito positivamente sull'incremento di CLA totale e di acido rumenico, confermando gli studi riportati in letteratura che dimostrano la diretta correlazione tra pascolo e contenuto di CLA nel grasso del latte e conseguentemente nel formaggio.

I valori di CLA totale hanno mostrato una variazione significativa da 448.45 ng/mg di lipidi per 3 ore fino a 2459.39 ng/mg di lipidi per le 12 ore (Fig. 1), stesso andamento per l'acido rumenico variando da 286.89 ng/mg fat a 1726.26 ng/mg fat (Fig. 2).

I risultati ottenuti indicano inoltre che, a seguito di ulteriori e più approfondite analisi, l'acido coniugato linoleico (CLA) potrebbe essere utilizzato come marker per identificare i formaggi prodotti da latte di animali alimentati con diete a base di pascoli, rispetto a quelli alimentati con silomais e concentrati.

Figura 1 - Contenuto di CLA totale nei campioni di Ragusano DOP in relazione alle ore di pascolo

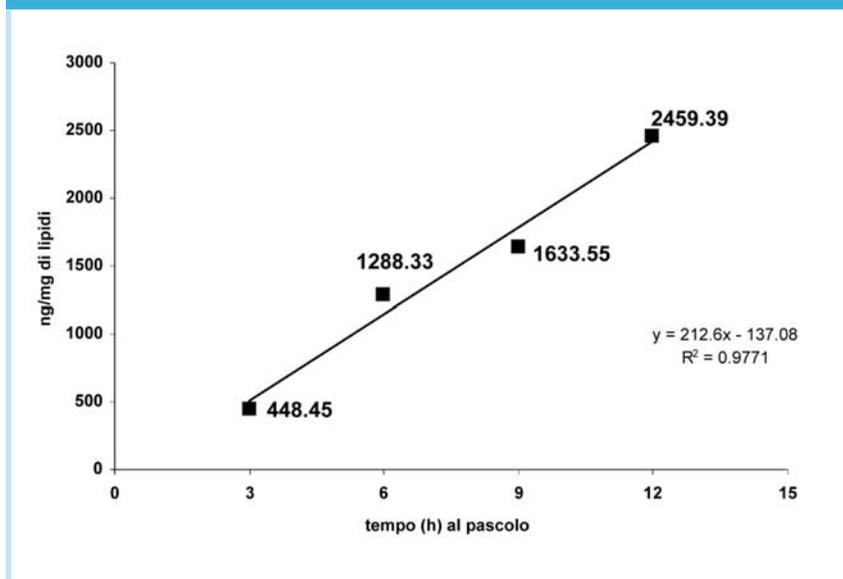
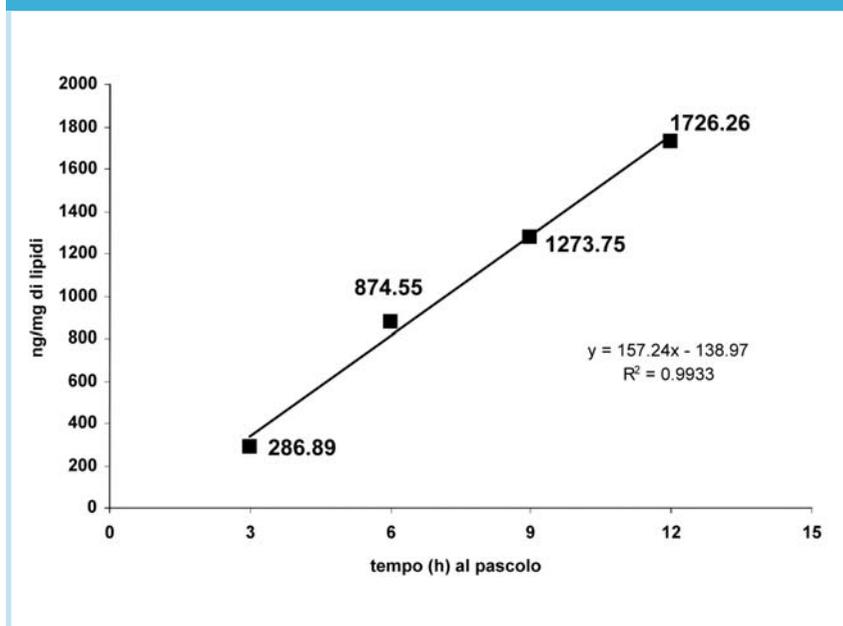


Figura 2 - Contenuto di acido rumenico nei campioni di Ragusano DOP in relazione alle ore di pascolo



Le analisi chimiche relative ai campioni di formaggio sperimentale sono riportate in tabella 1 sono espresse come media in percentuale. In generale, i valori di umidità grasso e di proteina hanno evidenziato un tendenziale aumento con l'aumentare dei giorni di stagionatura del formaggio, andamento da porre in stretta relazione con la diminuzione del contenuto di umidità. Il contenuto di umidità del formaggio, infatti, si è ridotto passando da 42.14% a 90 giorni a 37% a 210 giorni. Per quanto riguarda il grasso, è stato osservato un incremento dei valori con il procedere della stagionatura passando dal 27.75% a 90 giorni al 28.80% a 210. Il contenuto di proteina è variato tra 27.43% e 29.60%. All'aumentare dei giorni di stagionatura del formaggio si osserva un incremento della concentrazione di sale/ss registrando dei valori del 2.26% a 90 giorni fino al 3.64% a 210. Il valore del pH dei formaggi si è mantenuto abbastanza stabile attestandosi su un valore di circa 5.03. Va sottolineato che i migliori produttori nell'ultimo quinquennio hanno ridotto considerevolmente la concentrazione salina dei formaggi, migliorandone il gradimento da parte dei consumatori. In conclusione si può affermare che il pascolo gioca un ruolo fondamentale nel contenuto di molecole neutraceutiche nei formaggi prodotti con latte intero crudo ottenu-

Tabella 1 - Analisi chimiche del formaggio Ragusano DOP a diversi giorni di stagionatura

Componenti	Stagionatura		
	90 giorni	120 giorni	210 giorni
Umidità (%)	42.14	40.89	37.00
Grasso (%)	27.75	28.00	28.80
Proteina (%)	27.43	28.00	29.60
Sale (%)	2.26	2.72	3.64
pH	5.01	5.01	5.03
* Grasso/ST (%)	47.96	47.36	45.71
** Sale/ST (%)	3.90	4.60	5.77

* Grasso/ST = grasso su solidi totali; ** Sale/ST = contenuto di sale su solidi totali

to da sistemi di allevamento tradizionale.

L'incremento del CLA nel latte potrebbe avere un impatto benefico non soltanto per l'incremento degli acidi grassi nel latte e nei formaggi proveniente da questi animali, ma anche per i possibili effetti positivi sulla salute dell'animale stesso.

È anche da ricordare l'effetto favorevole di altri componenti dei grassi, come le vitamine, particolarmente abbondanti nel latte ottenuto da vacche al pascolo, che parallelamente al calo degli acidi grassi saturi mette in evidenza la valenza salutistica dell'alimentazione al pascolo.

Reference

- Bortolami R, Callegari E, Beghelli V. Anatomia e fisiologia degli animali domestici. Bologna: Ed agricole, 1982.
- Secchiari P, Mele M, Serra A. Functional foods nella produzione convenzionale e biologica. Commissione ASPA "Produzioni biologiche e qualità dei prodotti". Centro Stampa Università degli Studi di Perugia, 2003.
- Banni S, Day BW, Evans RW, et al. Liquid chromatography mass spectrometric analysis of conjugated diene fatty acids in a partially hydrogenated fat. *J Am Oil Chem Soc* 1994; 71: 1321-5.
- McGuire MA, McGuire MK. *Proc American Soc Anim Sci* 1999; 118-23.
- Ip C, Jiang C, Thompson HJ, et al. *Carcinogenesis* 1997; 18: 755-9.
- Pariza MW, Park Y, Cook ME. *Prog Lipid Res* 2001; 40: 283-9.
- Chin SF, Liu W, Storkson JM, et al. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acids, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal* 1992; 5: 185-97.
- Riel RR. Physico-chemical characteristics of Canadian milk fat. Unsaturated fatty acids. *J Dairy Sci* 1963; 46: 102-6.
- Kepler RC, Tucker PW, Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV Substrate specificity and inhibition of linoleate 12-cis,11-trans isomerase from *Butyrivibrio Fibrisolvens*. *J Biol Chem* 1970; 245: 3612-20.
- Kepler RC, Tove SB. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of a linoleate delta-12-cis, delta-11-trans isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 1962; 242: 5686-92.
- Licitra G, Portelli G, Campo P, et al. Technology to Produce Ragusano Cheese: a Survey. *J Dairy Sci* 1998; 81: 3343-9.
- Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea. 1996. Serie L163. July 2. CEE no. 1263/96. Delle Commissioni del July 1, 1996. Relativo alla registrazione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine nel quadro della procedura di cui all'articolo 17 del Reg. to CEE no. 2081/92. Lussemburgo. Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea, Brussels, Belgium.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
- Banni S, Carta G, Contini MS, et al. Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues. *J Nutr. Biochem* 1996, 7 (3): 150-5.
- Banni S, Angioni E, Carta G, et al. Influence of dietary conjugated linoleic acid on lipid metabolism in relation to its anticarcinogenic activity. In: "Advances in Conjugated Linoleic Acid Research". Yurawecz, Mossoba, Kramer, Pariza, and Nelson, Eds. AOCS Press Champaign, IL. 1999; 1 (23): 307-18.
- Marshall RT. Standard Methods for the Examination of dairy products, 16th Ed. 1992. American Public Health Association, Washington, DC, 1993.
- Gerber-Norma FIL-IDF 152A del 1997.
- Barbano DM, Clark JL, Dunham CE, Fleming R. Kjeldal method for determination of total nitrogen content of milk: collaborative study. *J Assoc of Off Anal Chem* 1990; 73: 849-59.

19. Metodo Volhard come descritto in Marshall R.T. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th Ed. 1992. American Public Health Association, Washington, DC, 1993.
20. Chiang SD, Gessert CF, Lowry O H. Colorimetric determination of extracted lipids. An adaptation for microgram amounts of lipids obtained from cerumen. *Curr List Med Lit Res* 1957; 33-56.
21. Grünari JM, Chouinard PY, Bauman DE. Trans fatty acid hypothesis of milk fat depression revised. *Proc Cornell Nutr Conf Feed Manuf. Ithaca NY* 1997; 208-16.
22. Kepler RC, Hirons KP, McNaill JJ et al. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Biol Chem* 1966; 241: 1350-4.
23. Shantha Nairl C, Latha N Ram, J O'Leary, Clair L Hicks, Eric A. Decker. Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. *Journal of Food Science* 1995; 60: 695-7.