

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
DIPARTIMENTO DI CHIMICA

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE
INDIRIZZO IN SCIENZE CHIMICHE
XXIV CICLO



***METODI ANALITICI PER LA CARATTERIZZAZIONE E LA VALUTAZIONE
DELLA SICUREZZA ALIMENTARE DI PRODOTTI TRADIZIONALI DELLA
FILIERA LATTIERO-CASEARIA OVINA DELLA SARDEGNA***

TESI DI CLAUDIA ZAZZU

TUTOR: PROF. GAVINO SANNA

COORDINATORE: PROF. GIUSEPPE B. SUFFRITTI

A.A. 2010/2011

*“Grazie alla vita che mi ha dato tanto
mi ha dato la marcia dei miei piedi stanchi
con loro ho camminato per città e pozzanghere
spiagge e deserti, montagne e pianure ...”*

(Violeta Parra, Gracias a la vida)

INDICE

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1 I PRODOTTI TIPICI.....	7
1.1 IL RUOLO DEL COMPARTO AGROALIMENTARE INTERNAZIONALE E NAZIONALE	7
1.2 IL RUOLO DEL CONSUMATORE	8
1.3 LE DENOMINAZIONI D'ORIGINE.....	10
1.4 I PRODOTTI TIPICI IN ITALIA	15
1.5 I PRODOTTI TIPICI IN SARDEGNA	16
CAPITOLO 2 IL FORMAGGIO	17
2.1 FASI DI PRODUZIONE DEL FORMAGGIO	19
2.1.1 <i>I pretrattamenti del latte</i>	19
2.1.2 <i>Coagulazione del latte, sineresi, rottura, eventuale cottura e messa in forma della cagliata</i>	21
2.1.3 <i>Salatura</i>	25
2.2 STAGIONATURA E SVILUPPO DELL'AROMA NEI FORMAGGI	27
2.2.1 <i>Processi fermentativi e metabolismo del lattosio e del citrato</i>	28
2.2.2 <i>Lipolisi</i>	31
2.2.3 <i>Proteolisi</i>	35
2.2.4 <i>Catabolismo degli amminoacidi ed eventi correlati</i>	38
2.3 CLASSIFICAZIONE DEI FORMAGGI	39
2.4 IL FORMAGGIO FIORE SARDO DOP	40
2.4.1 <i>Cenni storici</i>	40
2.4.2 <i>Caratteristiche</i>	41
2.4.3 <i>Il processo produttivo</i>	43
CAPITOLO 3 LE ALTERAZIONI NEGLI ALIMENTI E NEI FORMAGGI	49
3.1 LIPIDI	51
3.1.1 <i>Idrolisi o inacidimento</i>	51
3.1.2 <i>Irrancidimento chetonico</i>	52
3.1.3 <i>Irrancidimento ossidativo</i>	53
3.2 GLUCIDI	54
3.2.1 <i>Fermentazione alcolica (omofermentativa)</i>	55
3.2.2 <i>Fermentazione omolattica (omofermentativa):</i>	56
3.2.3 <i>Fermentazione etero lattica (eterofermentativa):</i>	57
3.2.4 <i>Alterazione dei prodotti del metabolismo glucidico.</i>	58
3.3 PROTEINE E AMMINOACIDI	59
3.3.1 <i>Denaturazione proteica</i>	60
3.3.2 <i>Reazione di Maillard</i>	60
3.3.3 <i>Proteolisi e putrefazione</i>	62
3.3.4 <i>Modifica delle catene laterali degli amminoacidi</i>	64

3.4	ALTERAZIONI E DIFETTI DEI FORMAGGI	65
3.4.1	<i>Il gonfiore precoce</i>	65
3.4.2	<i>Il gonfiore al decimo giorno</i>	66
3.4.3	<i>Il gonfiore tardivo</i>	68
3.4.4	<i>Infestazioni da acari</i>	70
3.4.5	<i>Gli insetti del formaggio: la Piophilidae casei</i>	71
CAPITOLO 4 LE AMMINE BIOGENE		73
4.1	SINTESI DELLE AMMINE BIOGENE	74
4.2	PRODUZIONE DELLE AMMINE BIOGENE NEL FORMAGGIO	81
4.3	FATTORI CHE INFLUENZANO LA PRODUZIONE DELLE AMMINE BIOGENE NEL FORMAGGIO.....	82
4.3.1	<i>Trattamento del latte</i>	82
4.3.2	<i>Livello iniziale di batteri produttori di ammine biogene e presenza di batteri inibitori</i>	83
4.3.3	<i>Tipo e livello di colture starter</i>	83
4.3.4	<i>Aggiunta di enzimi proteolitici</i>	85
4.3.5	<i>Condizioni di maturazione</i>	85
4.3.6	<i>Trattamento del formaggio a pressioni elevate</i>	86
CAPITOLO 5 METODI ANALITICI PER LA CARATTERIZZAZIONE DEI FORMAGGI		87
5.1	STUDIO DELLA MACROCOMPOSIZIONE E DELLA PROTEOLISI.....	87
5.1.1	<i>Il pH</i>	87
5.1.2	<i>Sostanza secca</i>	88
5.1.3	<i>Grasso</i>	88
5.1.4	<i>Proteine</i>	89
5.1.5	<i>Indici di proteolisi</i>	90
5.1.6	<i>Metodi di frazionamento</i>	90
5.2	STUDIO DEL PROFILO DEGLI ACIDI GRASSI LIBERI (LIPOLISI)	93
5.2.1	<i>L'analisi GC degli acidi grassi</i>	93
5.3	DEFINIZIONE DELL'AROMA - CARATTERIZZAZIONE DELLA FRAZIONE VOLATILE.....	93
5.3.1	<i>Estrazione degli analiti volatili dal formaggio</i>	94
5.3.2	<i>Tecniche basate sull'analisi dello spazio di testa</i>	95
5.3.2.1	Spazio di testa statico	95
5.3.2.2	Spazio di testa dinamico (Purge & Trap).....	97
5.3.2.3	Microestrazione su fase solida (SPME).....	99
5.3.2.4	Fibre per SPME.....	102
5.3.2.5	Considerazioni sull'impiego di fibre adsorbenti e diffusione delle tecniche SPME	103
5.3.3	<i>Gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS)</i>	103
CAPITOLO 6 METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DELLE AMMINE BIOGENE. 105		
6.1	TECNICHE ANALITICHE UTILIZZATE PER LA DETERMINAZIONE DELLE AMMINE BIOGENE NELLE MATRICI ALIMENTARI.....	105
6.2	ESTRAZIONE ACIDA	106
6.3	USO DELLO STANDARD INTERNO	106
6.4	DERIVATIZZAZIONE	107
6.5	PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI	108
6.6	TECNICHE DI SEPARAZIONE	109

6.6.1	<i>Cromatografia su strato sottile</i>	109
6.6.2	<i>Elettroforesi capillare</i>	110
6.6.3	<i>Cromatografia capillare elettrocinetica micellare</i>	111
6.6.4	<i>Cromatografia ionica e biosensori elettrochimici</i>	112
6.6.5	<i>Gasromatografia</i>	113
6.6.6	<i>Cromatografia liquida ad elevate prestazioni, HPLC</i>	113
CAPITOLO 7 PARTE SPERIMENTALE 1: MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DEL METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLE AMMINE BIOGENE NEI FORMAGGI..... 115		
7.1	INTRODUZIONE	116
7.2	OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA ANALITICA PER LA DETERMINAZIONE DELLE AMMINE BIOGENE.....	117
7.2.1	<i>Scelta del derivatizzante</i>	117
7.2.2	<i>Neutralizzazione del derivatizzante ed estrazione con solvente</i>	119
7.2.3	<i>Separazione HPLC dei DCI-derivatizzati</i>	121
7.2.4	<i>Rivelazione spettrofotometrica e scelta della lunghezza d'onda di assorbimento</i>	122
7.2.5	<i>Applicazione della procedura analitica ad una soluzione di standard.</i>	123
7.3	COSTRUZIONE DELLA CURVA DI CALIBRAZIONE	125
7.3.1	<i>Preparazione delle soluzioni standard per le curve di calibrazione</i>	125
7.3.2	<i>Procedura di derivatizzazione delle soluzioni standard di calibrazione</i>	125
7.4	OTTIMIZZAZIONE DELLA PROCEDURA ANALITICA PER LA DETERMINAZIONE DELLE AMMINE BIOGENE NELLA MATRICE FORMAGGIO	126
7.4.1	<i>Procedura di estrazione delle ammine biogene dal formaggio</i>	126
7.4.2	<i>Derivatizzazione dell'estratto acido</i>	127
7.4.3	<i>Quantificazione delle ammine biogene nei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP</i>	128
7.5	VALIDAZIONE DEL METODO ANALITICO.....	129
7.5.1	<i>Introduzione</i>	129
7.5.2	<i>Limite di rivelabilità (LoD) e limite di quantificazione (LoQ)</i>	130
7.5.3	<i>Range dinamico lineare</i>	132
7.5.4	<i>Precisione</i>	136
7.5.4.1	<i>Ripetibilità e riproducibilità</i>	136
7.5.5	<i>Esattezza</i>	138
CAPITOLO 8 PARTE SPERIMENTALE 1: DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI AMMINE BIOGENE NEI CAMPIONI DI FORMAGGIO "FIORE SARDO"..... 141		
8.1	CAMPIONAMENTO.....	142
8.2	CONTENUTO IN AMMINE BIOGENE TOTALI NEI FORMAGGI ANALIZZATI	142
8.3	CONTENUTO IN AMMINE INDIVIDUALI NEI FORMAGGI ANALIZZATI	145
CAPITOLO 9 PARTE SPERIMENTALE 2: CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEI CAMPIONI DI FORMAGGIO FIORE SARDO DOP..... 150		
9.1	CAMPIONAMENTO.....	151
9.2	ANALISI DELLA MACROCOMPOSIZIONE	151
9.2.1	<i>Sostanza secca</i>	151
9.2.2	<i>Grasso</i>	152
9.2.3	<i>Determinazione potenziometrica dei cloruri</i>	152

9.2.4	<i>Determinazione dell'azoto totale</i>	153
9.2.4.1	<i>Azoto totale (TN)</i>	153
9.2.5	<i>Frazioni azotate o indici di proteolisi</i>	153
9.2.5.1	<i>Azoto solubile a pH 4.6 (SN)</i>	154
9.2.5.2	<i>Azoto non proteico solubile in TCA al 12% (SN-TCA)</i>	154
9.2.5.3	<i>Azoto solubile in acido fosfotungstico (SN-PTA)</i>	155
9.3	DETERMINAZIONE DEL PROFILO LIPOLITICO	155
9.3.1	<i>Estrazione della frazione lipidica</i>	155
9.3.2	<i>Purificazione degli AGL dalla matrice lipidica</i>	156
9.3.3	<i>Separazione gascromatografica</i>	156
9.4	ANALISI SPME-GC/MS DELLA FRAZIONE VOLATILE-AROMATICA	159
9.4.1	<i>Estrazione SPME</i>	159
9.4.2	<i>Separazione cromatografica</i>	159
9.4.3	<i>Identificazione degli analiti mediante spettrometria di massa</i>	161
	CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEI CAMPIONI DI FORMAGGIO FIORE SARDO DOP	165
	RISULTATI E DISCUSSIONE	165
9.5	STUDIO DELLA MACROCOMPOSIZIONE	166
9.6	INDICI DI PROTEOLISI	167
9.7	STUDIO DELLA LIPOLISI	169
9.8	CARATTERIZZAZIONE DELLA FRAZIONE VOLATILE	173
9.9	ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI	179
	CAPITOLO 10 CONCLUSIONI	183
	INDICE DELLE FIGURE	185
	INDICE TABELLE	189
	BIBLIOGRAFIA	191

INTRODUZIONE

La dinamica internazionale del mercato dei prodotti agroalimentari ha subito recentemente importanti trasformazioni, a partire dall'ingresso di nuovi Paesi esportatori come la Cina, sino ad arrivare alla recente divulgazione degli ultimi orientamenti della politica agricola europea (PAC). Quest'ultima è stata infatti orientata alla riduzione della quantità dell'offerta, mediante la regolazione dei surplus di produzione delle derrate alimentari, spesso provenienti dalle zone agricole più evolute, a vantaggio della qualità del prodotto offerto al consumatore. Questi interventi hanno mirato in particolare a favorire lo sviluppo agricolo di zone rurali svantaggiate, in cui i costi di produzione sono necessariamente alti, ma da cui provengono prodotti fortemente caratterizzati e frutto delle tradizioni locali. Parallelamente sono mutate le esigenze del consumatore, più consapevole e attento alla qualità dei prodotti e sempre più attratto dai prodotti tradizionali, e ciò anche a causa di frequenti scandali alimentari che hanno abbassato il livello di fiducia verso prodotti di cui non si conosce con esattezza la storia e la provenienza. I prodotti tradizionali, invece, per la loro storia, per il legame con gli usi e i costumi locali, per il rapporto con il territorio di produzione e per le loro caratteristiche, costituiscono una garanzia intrinseca di qualità e di sicurezza alimentare.

In questo contesto, e con lo scopo di garantire che un prodotto tradizionale abbia veramente le caratteristiche evocate dal suo nome, è nata l'esigenza di introdurre strumenti quali disciplinari e marchi collettivi al fine di tutelare congiuntamente sia i consumatori sia i produttori, questi ultimi spesso vittime di concorrenza sleale. A livello europeo esiste una specifica normativa che regola e tutela, attraverso il rispetto dei "Disciplinari di Produzione", i prodotti tradizionali legati a un territorio riconoscendoli come prodotti DOP (Denominazione d'Origine Protetta) e IGP (Indicazione Geografica Protetta). In Italia i prodotti DOP e IGP costituiscono una quota importante della produzione agricola, sia in termini economici sia per il ruolo che hanno nel trasmettere l'immagine del prodotto "made in Italy" nel mondo. In Sardegna diversi prodotti alimentari godono di questa tutela: il Fiore Sardo DOP, il Pecorino Sardo DOP e il Pecorino

Romano DOP tra i formaggi; l'Agnello di Sardegna IGP tra le carni fresche, l'Olio di Sardegna DOP tra gli oli e infine il Carciofo di Sardegna DOP e lo Zafferano di Sardegna DOP tra i prodotti vegetali. La disciplina dei prodotti a denominazione tutelata, attraverso il rispetto del "Disciplinare di Produzione", tende ad utilizzare la tipicità come un elemento che aggiunge valore qualitativo al prodotto, affiancandola a quelle che sono le sue caratteristiche nutrizionali o sensoriali.

L'ISO (International Organization for Standardization), universalmente definisce la qualità di un prodotto come: "l'insieme delle caratteristiche in grado di soddisfare la domanda espressa o non espressa dal consumatore" (Dell'Orto e Sgoifo Rossi, 2000). La qualità di un prodotto alimentare è concetto dipendente da un gran numero di variabili, talune delle quali sono soggettive o legate a fattori di tradizione etnica o addirittura familiare (Rubino *et al.*, 1999), altre legate alla tendenza contemporanea del consumatore a richiedere prodotti standardizzati, soprattutto per l'influenza della pubblicità (Manfredini, 1992).

Pur essendo di grande rilevanza presso i consumatori, il tema della qualità degli alimenti risulta molto difficile da affrontare a livello scientifico per la difficoltà di individuare parametri oggettivi che consentano di valutare le caratteristiche qualitative di un prodotto alimentare. Come già accennato, il soddisfacimento della domanda di qualità è infatti estremamente complesso e legato ad un insieme multi-fattoriale di componenti chimico-fisiche, nutrizionali, sanitarie, tecnologiche e sensoriali molto difficili da definire in modo univoco e comunque estremamente variabili nel tempo e nello spazio.

La qualità e la sicurezza di un alimento dipendono dall'operato di numerosi attori coinvolti nella complessa catena della produzione della materia prima, della lavorazione e/o trasformazione, del trasporto, della conservazione e del consumo.

Per tutelare la qualità e la sicurezza di un prodotto sono necessari da un lato procedure operative che garantiscano la salubrità dell'alimento, e dall'altro sistemi di monitoraggio atti ad assicurare che tutte le predette operazioni vengano effettuate correttamente. La strada da percorrere a tale scopo si dipana attraverso varie tappe:

- ✓ l'applicazione all'intera filiera alimentare del quadro giuridico, che riflette la politica "dai campi alla tavola";
- ✓ l'attribuzione al mondo della produzione della responsabilità primaria di una produzione alimentare sicura;

- ✓ l'esecuzione di capillari ed efficienti controlli ufficiali;
- ✓ la capacità di attuare rapide ed efficaci misure di salvaguardia di fronte ad emergenze sanitarie che si oggettivino in qualsiasi punto della filiera.

L'esigenza, particolarmente sentita negli ultimi anni, di disporre di adeguati strumenti di controllo e certificazione in campo alimentare ha generato diverse disposizioni specifiche a tutela della garanzia e della tracciabilità di prodotto. Tra questi, giocano un ruolo principale i sistemi di autocontrollo basati sul metodo HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), riconosciuto a livello legislativo, e - più recentemente - il Regolamento 178/2002, che stabilisce i requisiti generali della legislazione alimentare ed introduce importanti sistemi di controllo delle filiere, quali ad esempio la rintracciabilità del prodotto.

Così come previsto dalle normative europee sulla sicurezza alimentare, altrettanto basilare appare essere la necessità di attivare funzionali canali di comunicazione con i consumatori. Questi ultimi devono essere tenuti adeguatamente informati sull'attività degli organismi istituzionalmente preposti all'assicurazione della salubrità degli alimenti, sulle nuove problematiche in materia di sicurezza alimentare, sui rischi che certi alimenti possono presentare per determinati gruppi di persone e sulle ripercussioni a livello sanitario di un regime alimentare inappropriato.

Durante il processo di produzione e conservazione dell'alimento, i principi nutritivi in esso contenuti possono subire diverse trasformazioni. Alcune di esse sono volute e guidate dall'uomo, altre sono dovute a delle vere e proprie alterazioni dell'alimento, e quindi dovrebbero essere ritardate e ostacolate (Cappelli e Vannucchi, 2000).

Tra le trasformazioni che avvengono negli alimenti, quelle a carico delle proteine portano alla formazione di una particolare classe di ammine, le ammine biogene, la cui presenza nell'alimento può essere vista come un indice di contaminazione microbiologica e quindi come un indicatore di qualità e affidabilità del prodotto. Nell'alimentazione umana tiramina, istamina, putrescina, cadaverina, spermidina e spermina sono le ammine biogene più frequentemente rinvenibili in alimenti come latte e derivati, carne, prodotti carnei e prodotti ittici. Esse mostrano potenzialità mutagena e oncogena e costituiscono un potenziale ed intrinseco rischio per la sicurezza dei consumatori.

Questa classe di ammine si forma sia negli alimenti freschi di origine animale a partire dagli amminoacidi, sia negli alimenti fermentati in seguito a reazioni enzimatiche

indotte da particolari batteri decarbossilanti appartenenti a diverse specie (Fernández-García *et al.*, 2000, Innocente *et al.*, 2002). Il formaggio potrebbe costituire un ambiente ideale per lo sviluppo delle ammine biogene, in quanto è alimento ricco di proteine che, in particolari condizioni di pH, temperatura di conservazione e stagionatura, possono andare incontro a degradazioni. L'azione di enzimi proteolitici genera amminoacidi liberi in una serie di processi che hanno come esito finale la formazione di ammine biogene per opera di decarbossilasi batteriche. La formazione di tali sostanze nel formaggio potrebbe essere controllata con l'uso rigoroso di una buona igiene sia nella produzione della materia prima "latte" che nelle successive fasi di trasformazione e stagionatura del formaggio.

Malgrado sia presente un'ampia disponibilità di dati relativi alla procedura di determinazione ed al contenuto delle ammine biogene nei formaggi, molto poco è presente in letteratura riguardo al loro contenuto nei formaggi ovis DOP prodotti in Sardegna. Risulta quindi interessante, sia da un punto di vista scientifico che per la salvaguardia della salute pubblica, poter stabilire con facilità il contenuto di tali sostanze durante la produzione e la stagionatura di formaggi DOP prodotti in Sardegna.

I metodi per la determinazione delle ammine biogene comportano quasi sempre una fase di estrazione acida seguita da un passaggio di purificazione liquido-liquido per separare selettivamente le ammine dagli amminoacidi (Moret *et al.*, 1996). L'estrazione dalla matrice alimentare rappresenta un passaggio molto critico, spesso a causa di recuperi analitici molto bassi. Questo problema è dovuto alla non omogenea struttura chimica degli analiti.

L'estrazione è spesso seguita da uno stadio di derivatizzazione diretta dell'estratto acidico e successiva separazione dei derivatizzati. La separazione tramite HPLC è molto utilizzata grazie alla risoluzione e sensibilità del metodo (Moret *et al.*, 2005, Martuscelli *et al.* 2005, Innocente *et al.*, 2007). Questi metodi permettono la determinazione quantitativa (individuale o simultanea) delle ammine nei cibi.

Partendo dai metodi già presenti in letteratura, nella presente tesi di Dottorato si è cercato di definire una procedura analitica che permettesse la determinazione quantitativa delle ammine biogene nei formaggi. Il metodo analitico proposto è stato sottoposto a procedura di validazione per verificarne la precisione, l'accuratezza, la ripetibilità e la riproducibilità.

Il metodo è stato successivamente applicato alla determinazione del contenuto in ammine biogene in campioni commerciali di uno dei formaggi a Denominazione di Origine Protetta, il Fiore Sardo DOP. Il formaggio Fiore Sardo è stato scelto come oggetto di studio in quanto alcune peculiarità, che caratterizzano la sua tecnologia (utilizzo del latte crudo, elevata biodiversità della microflora nativa e secondaria, variabilità dell'umidità e della concentrazione di NaCl nella cagliata) lo rendono un modello interessante come ambiente ideale, in determinate condizioni, per lo sviluppo di ammine biogene. Il lavoro è stato infine completato dalla determinazione in tale matrice dei macrocostituenti (umidità, proteine, grasso e NaCl), del grado di maturazione proteolitica e lipolitica e del profilo dei componenti la frazione volatile-aromatica.

Capitolo 1

I prodotti tipici

1.1 Il ruolo del comparto agroalimentare internazionale e nazionale

I mercati agro-alimentari nazionale, comunitario ed extracomunitari si inseriscono in un contesto caratterizzato dall'affermazione di alcune tendenze:

- ✓ insediamento di nuove forme di distribuzione organizzata, con operatori del settore estremamente esigenti per tutto quanto attiene la qualità (garantita) dei processi produttivi;
- ✓ crescita culturale dei consumatori, che esigono sempre più maggiori informazioni e garanzie dai prodotti alimentari che consumano.

Questo scenario è reso più complesso dal processo di globalizzazione internazionale che sta via via portando le grandi aziende multinazionali ad invadere i mercati nazionali con prodotti alimentari fortemente standardizzati, ma resi estremamente accattivanti grazie alla forte componente di servizio che li caratterizza e, nella maggior parte dei casi, anche ad un basso prezzo.

La globalizzazione, e con essa la facile circolazione delle materie prime e dei prodotti alimentari su scala mondiale, ha modificato sostanzialmente ed irreversibilmente il rapporto del consumatore con gli alimenti. Fino a poco tempo fa era possibile avere garanzie sulla salubrità, l'origine e i processi di trasformazione di un prodotto attraverso il contatto diretto col produttore. Oggigiorno, a causa dell'affievolimento di tale legame, risulta necessario affidare tali garanzie a una serie di norme, etichette e riconoscimenti accettati a livello internazionale.

In Italia, il comparto produttivo agroalimentare è trainante per l'economia nazionale (è il secondo per importanza economica) tuttavia la competitività del mercato globale lo sottopone alla pesante concorrenza delle multinazionali e dei nuovi prodotti a basso prezzo, comprimendo prospettive e redditività delle produzioni tradizionali italiane. Le peculiarità del settore e - in particolare - il patrimonio di conoscenze che lo contraddistingue appaiono comunque in grado di contribuire allo sviluppo e al rilancio

dell'economia italiana nei prossimi anni. In quest'ottica di intervento e sviluppo il governo italiano ha delineato due linee di azione:

- 1) una rapida espansione nei mercati extracomunitari;
- 2) il consolidamento delle peculiarità del “made in Italy”.

Al di là delle scelte strategiche, l'espansione internazionale del mercato agroalimentare italiano appare essere comunque una scelta obbligata. La crisi economica degli ultimi anni ha infatti modificato l'atteggiamento degli italiani rispetto alla spesa alimentare, che oggi sono costretti a privilegiare, in luogo del prodotto qualitativamente migliore, quello offerto al prezzo minore.

Il rilancio ed il consolidamento del “made in Italy” oltre frontiera deve basarsi sull'elevato valore aggiunto e sulla qualità delle produzioni agroalimentari tradizionali. Ne emerge un modello, coerente con le direttive comunitarie e tale da offrire ai consumatori garanzie e livelli di qualità elevati. In questo sistema gli standard di salubrità e sicurezza alimentare, la varietà d'offerta e la cultura alimentare sono i principali punti di forza da utilizzare per difendere anche il mercato interno dalla concorrenza, spesso sleale, delle importazioni. In questa logica di sviluppo economico è fondamentale lavorare per la tutela e la valorizzazione delle produzioni tipiche, attuata attraverso l'emanazione di specifiche normative europee relative alle denominazioni protette. I prodotti alimentari tipici devono acquisire competitività, differenziandosi dalle produzioni di massa che operano esclusivamente facendo leva sul fattore prezzo. In tal modo si conferisce al prodotto un valore sia intrinseco che di mercato, che favorisce la sopravvivenza di produzioni direttamente legate al territorio e alle tradizioni.

1.2 Il ruolo del consumatore

Le dinamiche dei consumi alimentari hanno un ruolo determinante nel definire le linee evolutive del sistema agroalimentare. In altri termini, il consumatore è in grado di influenzare il comportamento degli operatori economici; allo stesso tempo gli operatori possono influire sulle scelte operate dai consumatori. Il consumatore moderno si fa portatore di un insieme complesso di nuovi bisogni, che possono essere soddisfatti da specifiche caratteristiche del prodotto quali ad esempio il gusto, il valore nutrizionale, la freschezza, la salubrità, la genuinità, la varietà, la novità, la comodità d'uso. In

quest'ottica un numero sempre maggiore di consumatori è tendenzialmente portato a dare una prioritaria importanza ad aspetti qualitativi in campo alimentare, ad esempio ricercando prodotti aventi un'origine geografica ben identificabile. Quindi gli elementi che permettono di acquisire certezze sull'origine del prodotto diventano importanti strumenti di scelta consapevole.

Conseguentemente alla necessità di offrire al consumatore garanzie sulla salubrità dei prodotti si è diffuso il sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), che mira a valutare, in ogni fase della produzione, i rischi igienico-sanitari che possono influenzare la sicurezza degli alimenti, attuando misure preventive sulle singole fasi di produzione. Il sistema venne ideato negli anni sessanta negli Stati Uniti ed è stato introdotto in Europa nel 1993 con la direttiva 43/93/CE (recepita in Italia con il decreto legislativo 26 maggio 1997, n. 155), che prevede l'obbligo di applicazione del protocollo HACCP per tutti gli operatori a qualsiasi livello della catena alimentare.

A questa direttiva si aggiunge lo Standard ISO 22000:2005, pubblicato dall'Ente di Normazione Internazionale ISO nel Settembre 2005 e contenente norme, che applicate su base volontaria dagli operatori del settore alimentare, hanno l'intento di armonizzare gli standard (nazionali e internazionali) preesistenti in materia di sicurezza alimentare ed HACCP.

Accanto agli aspetti relativi alla salubrità del prodotto, la libera circolazione dei prodotti ha determinato la necessità di definire le proprietà e le caratteristiche che ognuno di questi deve possedere. Affinché sia possibile associare nelle diverse parti del mondo lo stesso nome allo stesso prodotto è oggi operante un sistema complesso ed articolato di organismi e commissioni, che lavorano sia su base governativa sia su base volontaria.

Nel 1963 è stato istituito il Codex Alimentarius ad opera della FAO (l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura) e del WTO (l'Organizzazione mondiale del commercio). Il Codex Alimentarius, che definisce gli standard alimentari, è formato da una Commissione intergovernativa che rappresenta 173 Paesi più la Comunità Europea e opera a salvaguardia della salute del consumatore e a garanzia di una leale concorrenza nel commercio alimentare. La Commissione si riunisce una volta all'anno per revisionare ed aggiornare il Codex Alimentarius Procedural Manual: ai lavori partecipano autorità di controllo del cibo, esperti scientifici, tecnici alimentari,

rappresentanti di associazioni dei consumatori, dei produttori, dell'industria e del commercio. Tutti contribuiscono alla stesura delle regole del Codex, che poi possono servire da base per le normative nazionali e alla quale la WTO fa riferimento per decidere se un determinato prodotto può circolare liberamente a livello internazionale.

Limitatamente al comparto dei prodotti lattiero-caseari, la FIL-IDF (Federation Internationale de Laiterie, International Dairy Federation) costituisce l'organismo di riferimento a livello mondiale per gli operatori del settore. E' un'organizzazione non governativa che è stata fondata nel 1903, nella quale gli specialisti del settore si incontrano per risolvere, su base scientifica, problemi relativi alla definizione, produzione e commercializzazione dei prodotti lattiero-caseari. L'IDF lavora a stretto contatto con organizzazioni internazionali come il Codex Alimentarius la Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), la World Organization for Animal Health (OIE), l'International Organization for Standardization (ISO), il World Health Organization (WHO), l'International Federation for Agricultural Producers (IFAP), l'Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), e con altri corpi internazionali a carattere governativo e non-governativo. L'IDF collabora strettamente con il Codex Alimentarius per ciò che riguarda la consulenza scientifica; inoltre, libera da pregiudizi nazionali, con l'adozione del "Codex General Standard for the Use of Dairy Terms", protegge i prodotti artigianali e tradizionali dalle imitazioni.

1.3 Le denominazioni d'origine

La concomitanza degli effetti sui consumatori che la globalizzazione dei mercati e la crisi economica hanno complessivamente determinato hanno fatto sì che questi abbiano rivolto la loro attenzione verso i prodotti di tipo industriale che, ad un prezzo contenuto, garantiscono comunque la sicurezza dal punto di vista igienico-sanitario. Negli ultimi anni la maggiore consapevolezza degli aspetti nutrizionali degli alimenti e le frequenti crisi di fiducia legate a scandali alimentari hanno condotto il consumatore "evoluto" ad orientarsi su prodotti che, a fronte di un prezzo leggermente maggiore, garantiscano salubrità e la qualità alimentare. La moderna accezione del termine "qualità", intesa come "la capacità di soddisfare le aspettative, esplicite o implicite, che il consumatore ha verso il prodotto", trova oggi una sua concretizzazione in prodotti agro-

alimentari aventi una origine geografica determinata, o che siano frutto di specifiche tradizioni produttive, genericamente definiti come “Prodotti Tipici” o “Prodotti Tradizionali”.

I prodotti tipici sono il risultato di una sperimentazione alimentare condotta nei secoli, in genere sinonimo di garanzia per il consumatore. La massima espressione a garanzia della identificazione e qualità di un prodotto in relazione al territorio di produzione è oggi la DOP, Denominazione d’Origine Protetta, istituita con regolamento (CE) 2081/92 (Commissione Europea, 1992a) e sostituito oggi dal regolamento (CE) 510/2006 del consiglio del 20 marzo 2006. Il Regolamento riporta testualmente che: “È opportuno favorire la diversificazione della produzione agricola al fine di ottenere un migliore equilibrio fra l’offerta e la domanda sui mercati. La promozione di prodotti di qualità aventi determinate caratteristiche può essere un notevole vantaggio per l’economia rurale, in particolare nelle zone svantaggiate o periferiche, sia per l’accrescimento del reddito degli agricoltori, sia per l’effetto di mantenimento della popolazione rurale in tali zone”.

La Denominazione di Origine Protetta è destinata a prodotti strettamente associati alla specifica area della quale portano il nome. Il testo del regolamento riporta:

“... il nome di una regione, di un luogo determinato o, in casi eccezionali, di un paese che serve a designare un prodotto, agricolo o alimentare, originario di tale regione, di tale luogo determinato o di tale paese, la cui qualità o le cui caratteristiche siano dovute essenzialmente o esclusivamente ad un particolare ambiente geografico, inclusi i fattori naturali e umani, e la cui produzione, trasformazione e elaborazione avvengano nella zona geografica delimitata ...”

Poiché la produzione, trasformazione ed elaborazione del prodotto devono avvenire nell’area geografica di cui il prodotto porta il nome, il collegamento tra le caratteristiche del prodotto e la sua origine geografica deve essere strettissimo ed oggettivo.

Alcuni prodotti possono fregiarsi della denominazione di origine protetta anche se le materie prime utilizzate provengono da un’area geografica più vasta o differente da quella di trasformazione. In questo caso la zona di produzione delle materie prime deve essere comunque delimitata, devono inoltre sussistere sia condizioni particolari per la

produzione delle materie prime che un regime di controllo che garantisca l'osservanza di tali condizioni.

Affinché un prodotto ottenga il bollino (figura 1.1) che identifica la Denominazione d'Origine Protetta il metodo di produzione, solitamente tramandato di padre in figlio, deve essere univoco. Devono essere inoltre definiti e verificati gli elementi (anche storici e sociali) che comprovano i suoi legami con il territorio e lo rendono unico ed inimitabile. Allo stesso tempo devono essere definite le caratteristiche chimiche, fisiche, microbiologiche, metriche e sensoriali che lo caratterizzano e lo differenziano rispetto a produzioni similari. Deve essere inoltre valutata e codificata la capacità delle aziende di garantire che la loro produzione abbia le caratteristiche attese.



Figura 1.1 Bollino che identifica i prodotti D.O.P.



Figura 1.2 Bollino che identifica i prodotti I.G.P.



Figura 1.3 Figura Bollino che identifica i prodotti S.T.G.

Oltre alla DOP, a livello comunitario esistono anche altri livelli di tutela e valorizzazione dei prodotti agro-alimentari, come la IGP (Indicazione Geografica Protetta)

(Figura 1.2) di cui al regolamento (CE) 510/2006, e la STG (Specialità Tradizionale Garantita) (Figura 1.3), definita con il regolamento (CE) 509/2006.

Con l'Indicazione Geografica Protetta (IGP) si identificano i prodotti collegati ad una precisa aria geografica della quale portano il nome; il legame in questo caso è comunque differente rispetto a quello esistente tra prodotti DOP e loro area di origine. Affinché un prodotto possa fregiarsi della denominazione IGP, deve rispondere a due condizioni:

- deve esser stato prodotto all'interno dell'area geografica della quale porta il nome. A differenza della DOP però, qui è sufficiente che almeno una delle fasi di produzione, trasformazione ed elaborazione sia stata realizzata nell'area definita;
- da una sua qualità, reputazione o altra caratteristica deve inoltre evincersi un collegamento tra il prodotto e l'area che gli conferisce la denominazione.

Tuttavia quest'ultimo aspetto non deve intendersi indispensabile od esclusivo, come nel caso della denominazione di origine protetta, è sufficiente che all'origine geografica sia attribuibile una specifica qualità, reputazione od altra caratteristica.

Con il Regolamento 509/2006 la Comunità Europea ha fornito ulteriori strumenti per la tutela di alcune tipologie di prodotti alimentari che, pur non avendo una origine geografica oggettivamente dimostrabile, siano tradizionali e con caratteristiche di specificità, ossia aventi un elemento o diversi elementi caratterizzanti e che contraddistinguono il prodotto da altri analoghi appartenenti alla stessa categoria. Per elementi distintivi si intendono le caratteristiche intrinseche del prodotto, come le caratteristiche fisiche, chimiche, microbiologiche od organolettiche, o il metodo di produzione del prodotto, o infine le condizioni specifiche che vengono adottate durante la produzione. La tradizionalità del prodotto può derivare dalla natura delle materie prime, dalla composizione o dal metodo di produzione e/o di trasformazione. Il regolamento definisce "tradizionale" un uso, del prodotto, sul mercato comunitario per un periodo di tempo pari almeno a venticinque anni. I prodotti che soddisfano questi requisiti possono richiedere il riconoscimento della denominazione "Specialità Tradizionale Garantita" (STG). Il disciplinare di produzione non contempla gli elementi legati alla specificità geografica (e quindi delimitazione dell'area geografica, prova dell'origine e legame con il territorio), mentre comprende gli elementi chiave che definiscono la specificità del prodotto e quelli che ne attestano la tradizionalità.

In Italia esiste un ulteriore marchio di protezione per i prodotti agroalimentari tradizionali al di fuori della normativa sulle denominazioni DOP, IGP e STG. Si tratta dei prodotti di nicchia ad alto valore gastronomico e culturale, ottenuti lavorando secondo antiche ricette o pratiche di produzioni agricole o zootecniche. In genere sono prodotti per i quali non può essere applicata la tutela comunitaria, ma sui quali il legislatore ha ritenuto necessario intervenire per arrestare il fenomeno della loro scomparsa. Il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali ha inteso valorizzare questo patrimonio gastronomico: con l'art. 8 del DLgs 173/98 e successivamente, con il D.M. 350/99, sono state determinate le norme per l'individuazione dei prodotti tradizionali. In particolare il metodo di produzione, seguito secondo regole tradizionali e mai modificate da almeno 25 anni, è il requisito fondamentale richiesto.

1.4 I prodotti tipici in Italia

L'Italia vanta attualmente il primo posto in Europa per il numero di prodotti alimentari a denominazione d'origine, ed il secondo posto, dopo la Francia, per quanto riguarda i formaggi.

In particolare, ad Ottobre 2011 i prodotti italiani a marchio DOP o IGP sono complessivamente 229, dei quali 143 a Denominazione d'Origine Protetta e 86 ad Indicazione Geografica Protetta. Tra questi i formaggi e altri prodotti lattiero-caseari sono 41, con 40 DOP e 1 IGP.

Il patrimonio di prodotti tipici che, nel corso dei secoli, l'agricoltura italiana è stata capace di creare è comunque ben più numeroso di quelli che vantano ad oggi un marchio di qualità, e non è improbabile che molti altri ancora, nel prossimo futuro, potranno ottenere analoghi riconoscimenti. L'impegno da parte dei produttori è notevole, ma costante deve essere l'attenzione sia ai mercati che alle informazioni trasferite al consumatore. I produttori dovranno infatti dimostrare, non solo sulla carta del disciplinare, ma nel quotidiano confronto con i consumatori, di essere capaci di ottenere prodotti tipici che siano all'altezza della loro fama.

1.5 I prodotti tipici in Sardegna

In Sardegna operano circa 11 mila aziende ovine e 1.400 aziende caprine. Secondo i dati del 6° Censimento Generale dell'Agricoltura condotto dall'ISTAT nel 2010, nell'isola si allevano 3.245.902 capi ovini (in aumento rispetto ai 3.018.194 del 2000). Essi rappresentano circa il 43% del totale nazionale, mentre il settore caprino, che è distribuito territorialmente in modo analogo, consta invece di 237.000 capi. La produzione isolana di latte ovino ammonta a circa 320 milioni di litri, mentre quella di latte caprino si attesta intorno ai 30 milioni. Nella passata campagna casearia il latte ovino trasformato, a livello industriale, è stato pari a 280 milioni di litri di latte, con una approssimazione del 5-10%. Mentre la filiera ovina risulta ben definita, altrettanto non può dirsi per quella caprina, infatti, non essendovi un sistema strutturato di trasformazione del latte di capra in purezza, una rilevante parte dello stesso, stimabile tra i 10 e i 15 milioni di litri, confluisce nel sistema lattiero-caseario ovino.

Si stima che circa il 58% dei formaggi da latte ovino prodotti in Sardegna, siano costituiti da pecorini DOP (53% Pecorino Romano, 4% Pecorino Sardo, 1% Fiore Sardo).

La trasformazione casearia coinvolge in Sardegna circa 85 caseifici, di cui 30 in forma cooperativa, si stima inoltre l'esistenza di circa 100 minicaseifici, di cui 48 afferenti al sistema Fiore Sardo. Accanto alla realtà produttiva industriale si estende nell'Isola un tessuto di piccole realtà artigianali distribuite su una superficie agricola utilizzata (SAU) pari a 1.152.756 di ettari (Dati Istat, 2010). Questo quadro produttivo si riflette anche sulla tipologia dei principali prodotti di trasformazione. Così, oltre a quelli prodotti su larga scala, quale il Pecorino Romano, si osserva una produzione di nicchia a carattere soprattutto artigianale.

E' dal lontano 1 Giugno 1951 che i più importanti formaggi sardi sono stati inseriti negli allegati della Convenzione Internazionale di Stresa sull'uso della denominazione d'origine e dei nominativi dei formaggi. Attualmente il comparto delle produzioni tradizionali conta in Sardegna sette denominazioni d'origine, di cui ben 4 legate al comparto ovino (Pecorino Romano, Pecorino sardo, Fiore Sardo e Agnello di Sardegna), una che riguarda l'olio d'oliva extravergine, un'altra riguardante lo zafferano di Sardegna e l'ultima, in fase di istituzione, relativa al carciofo spinoso di Sardegna.

Capitolo 2

Il formaggio

La storia del latte e dei suoi derivati si perde nei tempi più remoti, risale infatti al periodo in cui l'uomo ha iniziato ad addomesticare ed in seguito ad allevare i primi animali. Già 8000 anni fa le popolazioni della Mesopotamia tentavano di addomesticare animali lattiferi e - verosimilmente - utilizzavano e lavoravano il latte da questi prodotto. Resta tuttavia oscuro il passaggio che ha portato l'uomo a scoprire la cagliata e di conseguenza il formaggio. L'origine così remota della scoperta ha favorito la nascita di numerose leggende attorno ad essa, la più nota è quella del mercante arabo.

...Un mercante, dovendo attraversare il deserto, portò con sé alcuni alimenti, tra cui latte, servendosi per il trasporto di un otre fatto con lo stomaco essiccato di una pecora. Il movimento del viaggio, il caldo e gli enzimi rimasti sulla parete dello stomaco della pecora avrebbero acidificato il latte e coagulato le proteine presenti al suo interno in piccoli grumi.

Il formaggio, considerato per secoli un alimento poco nobile rispetto ad altri quali pane, vino e carne, ha rappresentato fino ad oggi una tra le più efficienti forme di conservazione delle proprietà nutritive del latte. Le varie culture hanno utilizzato al meglio questa peculiare forma di trasformazione al punto che, nei secoli, si sono sviluppati migliaia di prodotti caseari che costituiscono oggi un importante patrimonio alimentare, economico e sociale per i paesi che li producono.

Secondo dati recenti, riferiti dal Bulletin of the International Dairy Federation 446/2010 – The World Dairy Situation, la produzione mondiale di latte nel 2009 non è cresciuta con lo stesso ritmo degli anni precedenti, infatti se confrontata con la situazione precedente del 2008 la crescita è stata solo dello 0.8% (703 milioni di tonnellate vs 697 milioni). La situazione appare ancora più drammatica se si considera l'andamento degli anni precedenti ossia la crescita del 2% tra il 2008 e 2007 e del 2.3% osservata durante il periodo dal 2000 al 2007. I ridotti guadagni ricavati dalla produzione di latte e gli elevati

costi di produzione sembra che abbiano scoraggiato gli allevatori in molte parti del mondo.

Recenti dati forniti dallo USDA (United States Department of Agriculture - Dairy World Markets and Trade, July 2011) mostrano che circa un terzo della produzione mondiale di latte viene utilizzato per la produzione di formaggio, per un totale di circa 15 milioni di tonnellate annuali, delle quali il 47% ha origine nella sola Unione Europea, e il 36% nel Nord America; mentre la restante quota è prodotta principalmente nel Sud America, nella ex Unione Sovietica, in Australia, Nuova Zelanda e - in piccola parte - anche in Asia e Nord Africa.

Il formaggio è un alimento ad alto valore nutrizionale, ricco di proteine, calcio e fosforo, che vanta anche proprietà antitumorali (Aimutis, 2004; Parodi, 2004; Pfeuffer *et al.*, 2001; Heller, 2001). Esso è comodo e versatile da consumare, facilmente confezionabile ed offre un'enorme varietà di aromi e consistenze. Queste caratteristiche ne hanno determinato un crescente utilizzo nel settore dei servizi alimentari, con un conseguente aumento del consumo, che tra il 2006 e il 2011, ha registrato una crescita del 7.2% (USDA 2011).

Le diverse forme e varietà nelle quali il formaggio è prodotto in tutto il mondo hanno reso difficile la sua definizione, tanto che questo ha rappresentato negli anni una fonte di discussione tra i maggiori esperti del settore. Oggi il formaggio è definito, secondo quanto specifica il *Codex Alimentarius* (CODEX STAN A-6-1978, Rev. 1-1999, Amended 2006) come “...il prodotto stagionato o fresco spalmabile, morbido, semimorbido o duro, in cui il rapporto tra le proteine del siero e le caseine non supera quello del latte di provenienza...”.

Per la legge italiana, il formaggio è “...il prodotto che si ricava dal latte intero, parzialmente o totalmente scremato, oppure dalla crema in seguito a coagulazione acida o presamica...”. Pertanto il formaggio può essere ottenuto attraverso:

- ✓ la coagulazione completa o parziale delle proteine del latte, latte scremato, parzialmente scremato, crema o crema del siero, o da qualunque altra combinazione di questi, mediante l'azione presamica o di qualsiasi altro agente coagulante, e attraverso il parziale drenaggio del siero ottenuto dalla coagulazione. Dal momento che la caseificazione implica una concentrazione delle proteine del latte (in particolare della frazione caseinica), il contenuto

proteico del formaggio risulterà più alto rispetto al livello di proteine delle miscele delle materie prime dalle quali il formaggio viene prodotto;

- ✓ tecniche di lavorazione che implicano la coagulazione delle proteine del latte e/o prodotti ottenuti dal latte che diano un prodotto finale con caratteristiche chimico-fisiche ed organolettiche simili a quelle definite nel punto precedente.

2.1 Fasi di produzione del formaggio

Le principali fasi tecnologiche che accomunano tutti i formaggi sono le seguenti: pretrattamenti del latte, coagulazione, acidificazione, sineresi della cagliata, formatura e salatura e maturazione.

2.1.1 I pretrattamenti del latte

Prima di essere sottoposto alla coagulazione il latte può subire dei pretrattamenti che possono sia migliorare alcune caratteristiche di composizione del prodotto finale che agevolare i successivi processi tecnologici.

In tale fase il latte può subire opportuni trattamenti termici di risanamento che hanno lo scopo di controllare o abbattere completamente la flora batterica in esso contenuta. I trattamenti termici si differenziano, a seconda della temperatura di esercizio, in termizzazione o pastorizzazione. Mentre la termizzazione (57-68°C per 15s) è volta ad inattivare parzialmente la flora nativa e ad abbattere i batteri mesofili, la pastorizzazione (72°C per 15s) ha l'obiettivo di distruggere tutti i microrganismi patogeni eventualmente presenti nel latte. Sebbene molto utilizzato, il trattamento di pastorizzazione presenta però gli svantaggi di ridurre la microflora nativa del latte e di inattivare alcuni enzimi.

I trattamenti termici vanno applicati in funzione della tipologia di formaggio che si vuole ottenere. I trattamenti troppo spinti vanno in genere evitati poiché appiattiscono le caratteristiche sensoriali (gusto e aroma), alterano la capacità di coagulazione del latte e quindi i processi di sineresi della cagliata (espulsione del siero).

Il formaggio ottenuto utilizzando un latte trattato termicamente offrirà ampie garanzie dal punto di vista igienico, ma verrà privato delle peculiarità sensoriali che ci si

attende da un alimento tipico. Questo rischio igienico sanitario non sussiste per formaggi a latte crudo per i quali la normativa vigente impone un adeguato periodo di stagionatura (almeno 60 giorni). Detto periodo è necessario, oltre che a sviluppare ed affinare il bouquet sensoriale, anche a permettere l'eliminazione naturale e spontanea degli eventuali agenti patogeni in esso presenti, garantendone quindi la sicurezza alimentare. E' possibile comunque che tali tipologie di formaggio possano essere potenzialmente soggette ad anomalie nel processo di stagionatura, quali fermentazioni anomale determinate dallo sviluppo di batteri anticaseari.

Il latte viene posto in caldaia ad una temperatura che deve essere quella ottimale sia per l'azione del caglio sia per la crescita dei fermenti lattici che si intende far sviluppare. Sia che si faccia uso di fermenti lattici naturali (lattoinnesto, sieroinnesto, scottainnesto) o selezionati e inoculati nel latte, sia che ci si affidi solamente allo sviluppo della microflora naturale del latte, la temperatura del latte in caldaia è importante. Per la fabbricazione di formaggi la cui microflora lattica sia prevalentemente mesofila, le temperature oscillano dai 25 ai 32°C, mentre per formaggi con flora termofila, le temperature variano da 32-33 fino a 40°C. Il livello di inoculo, con colture pure di fermenti lattici, dipende dalla tipologia di formaggio che si vuole produrre, in generale l'inoculo si aggira da un minimo dello 0.1% fino ad un massimo del 5%.

Il latte, alla temperatura voluta, può essere tenuto (fase di sosta) per periodi variabili (da 2 a 12 ore) fino allo sviluppo dell'acidità desiderata. Periodi di sosta particolarmente lunghi, specialmente in caldaie aperte, espongono il latte alla possibilità di contaminazione da parte di microbi ed altri agenti presenti nell'ambiente circostante. Periodi di acidificazione da venti minuti ad un ora sono abbastanza comuni per molte tipologie di formaggio. Nel caso in cui si proceda ad una preventiva acidificazione del latte con aggiunte massicce di siero innesto acido o fermenti lattici, l'incremento di acidità immediato del latte in caldaia può essere sufficiente per procedere subito alla caseificazione senza sosta di maturazione (Grana Padano, Pecorino Romano e Provolone). Durante il periodo di sosta in caldaia, un incremento, anche modesto, dell'acidità del latte (un decimo di grado SH/50), dovuta alla produzione di acido lattico per idrolisi enzimatica del lattosio, è indice di attività batterica in progresso. Raggiunto il grado di acidità desiderato si procede all'aggiunta del coagulante.

Nella trasformazione casearia a livello industriale, un altro accorgimento largamente impiegato per la produzione di formaggi semigrassi o per mantenere costante il rapporto grasso/caseine, è la correzione del titolo di grasso attraverso l'impiego di apposite centrifughe scrematrici e titolatrici.

2.1.2 Coagulazione del latte, sineresi, rottura, eventuale cottura e messa in forma della cagliata

Nel processo tecnologico di produzione del formaggio la fase successiva al pretrattamento del latte è la sua coagulazione. Questa avviene a seguito di modifiche chimico-fisiche dei costituenti del latte, in particolare delle micelle caseiniche che, passando dallo stato micellare disperso a strutture reticolari via via più complesse, rendono il sistema instabile, consentendone la separazione di fase. Durante la coagulazione le caseine si aggregano tra loro inglobando i globuli di grasso (cagliata), dalle quali viene espulso, in maniera più o meno significativa, il siero. La cagliata così ottenuta contiene solo piccole quantità di siero, ma è ricca di enzimi e batteri lattici che interverranno nelle successive fasi di trasformazione della cagliata in formaggio.

Durante il processo di caseificazione la coagulazione può essere indotta dall'azione - spesso combinata - del calore, dell'acidificazione e degli enzimi. Il peso di ognuno di questi fattori è spesso decisivo per l'ottenimento di uno specifico prodotto.

La coagulazione del latte può quindi essere ottenuta mediante:

- ✓ coagulazione presamica (via enzimatica)
- ✓ coagulazione acida (acidificazione del latte).

La coagulazione presamica

Il sistema di coagulazione più diffuso nella produzione di formaggi molli e stagionati è quello enzimatico. La coagulazione enzimatica del latte è un processo che in natura avviene nello stomaco dei ruminanti lattanti (vitelli, capretti, agnelli) durante la prima fase di digestione del latte. In tecnologia casearia la coagulazione enzimatica avviene grazie all'azione di enzimi coagulanti e proteolitici (chimosina e pepsina) contenuti nel caglio (o presame) che viene aggiunto al latte, in condizioni predeterminate

e controllate, durante la fase di coagulazione. L'azione coagulante di questi enzimi è in particolare ascrivibile alla chimosina, che destabilizza le micelle caseiniche portandole all'aggregazione. Nel latte, le micelle caseiniche sono stabilizzate in fase colloidale dalla κ -caseina la cui porzione C-terminale (il caseino glico macro peptide, CMP), essendo idrofilica e carica negativamente, emerge verso l'esterno impedendo l'aggregazione delle micelle. L'apporto di enzimi coagulanti-proteolitici, ed in particolare della chimosina, provoca il distacco del frammento oligopeptidico polare ed annulla l'azione stabilizzatrice della κ -caseina nei confronti del colloide.

Il processo di coagulazione per via enzimatica può essere suddiviso in tre fasi, di cui la terza è un processo di aggregazione.

La **fase primaria** è caratterizzata dall'azione di lisi enzimatica della κ -caseina esercitata dalla chimosina. In questa fase la chimosina idrolizza in modo specifico il legame peptidico Phe₁₀₅-Met₁₀₆ della porzione idrofilica della κ -caseina. Quindi, mentre la parte idrofobica la para- κ -caseina rimane legata alla micella, il residuo C-terminale idrofilico passa nel siero. La destabilizzazione della micella per allontanamento del peptide CMP genera un abbassamento del potenziale superficiale delle micelle, che coagulano solo dopo che circa l'85% dei legami è stato idrolizzato.

La **fase secondaria** è la fase in cui le caseine destabilizzate, Ca-sensibili, si combinano con il calcio presente in soluzione nel latte, formando un gel a viscosità crescente. In questa fase si ha la formazione di legami intermicellari tramite i radicali fosforici e carbossilici, in cui il calcio in forma ionica si dispone a ponte. Si ottiene così la formazione di un reticolo gelatinoso omogeneo, il cosiddetto caseinato di calcio insolubile, che interessa tutto il volume inizialmente occupato dal latte.

Le velocità con cui decorrono le reazioni coinvolte nella fase primaria e secondaria dipendono da alcune importanti condizioni operative. In maniera determinante sulla velocità di coagulazione influiscono i seguenti fattori: la concentrazione dell'enzima, il pH, la disponibilità di calcio in forma ionica e la temperatura.

La concentrazione dell'enzima è direttamente proporzionale alla velocità iniziale della fase primaria ed è per questo uno dei fattori che maggiormente influisce sulla velocità dell'intero processo di coagulazione.

L'abbassamento del pH contribuisce ad abbassare la carica superficiale delle micelle caseiniche, conseguentemente a pH inferiori a 6,6 la coagulazione ha inizio, anche se l'idrolisi della k-caseina non è completa.

Il calcio ionico ha un ruolo fondamentale, in quanto neutralizza le cariche negative superficiali delle micelle e risulta quindi essere parte attiva nella formazione dei legami fosforici e carbossilici.

Infine la temperatura, che influisce solo sulla fase secondaria del processo di coagulazione, ossia sulla velocità di aggregazione delle micelle destabilizzate che tendono ad aggregarsi in gel. Un innalzamento di temperatura contribuisce infatti all'aumento degli urti tra le micelle caseiniche ormai destabilizzate. Questa fase si verifica infatti a temperature superiori ai 20°C, di fatto le temperature operative sono maggiori in quanto in genere si caseifica almeno a temperature fisiologiche (attorno ai 37°C).

Nella **fase terziaria** il gel assume via via una maggiore consistenza, a causa dell'aumento del numero dei legami intermicellari. Oltre alle interazioni ioniche, in questa fase si instaurano anche legami ad idrogeno e ponti disolfuro che, consentendo l'avvicinamento delle micelle destabilizzate, provocano la contrazione del coagulo con conseguente espulsione di siero. Questa fase di riorganizzazione della cagliata e spurgo del siero è chiamata *sineresi*, ed avviene spontaneamente in tempi piuttosto lunghi. Per esigenze tecnologiche la fase di spurgo può essere accelerata attraverso la rottura della cagliata, eventualmente seguita dalla cottura della stessa.

L'entità del taglio della cagliata così come i tempi di cottura possono essere regolati in base alle caratteristiche fisiche e sensoriali del tipo di formaggio che si vuole ottenere. Con la rottura della cagliata avviene la separazione del gel caseoso dal siero trattenuto nel coagulo. La cessione del siero sarà tanto più veloce e completa quanto più piccola sarà la dimensione dei granuli ottenuti. Regolando la dimensione dei granuli di cagliata è possibile ottenere formaggi a diverso grado di durezza. Se si desidera uno spurgo maggiore si può intervenire anche con la cottura della cagliata che, una volta rotta, viene mantenuta in agitazione sotto siero fino al raggiungimento di una temperatura compresa tra i 48 e i 55°C, al fine di ottenere una contrazione dimensionale dei granuli con ulteriore espulsione del siero. La fase di cottura può essere preceduta (o seguita) da una sosta più o meno prolungata della cagliata sotto siero, durante la quale essa si riorganizza e si instaurano alcune fermentazioni ad opera dei batteri lattici che ne

favoriscono l'acidificazione. Successivamente la cagliata viene messa negli stampi, ovvero in appositi contenitori che conferiscono ai diversi formaggi la loro caratteristica morfologia esteriore. L'acidificazione e lo spurgo della cagliata continuano anche nelle ore successive alla messa in forma e possono essere accentuate dalla stufatura delle stesse forme in camera calda.

La coagulazione acida

L'abbassamento del pH nel latte provoca una neutralizzazione dei gruppi acidi ionizzati della caseina (acido aspartico, acido glutammico) con una conseguente diminuzione della carica superficiale delle micelle caseiniche e riduzione dell'affinità per il calcio, che tende a sua volta a passare in soluzione. Quando tutto il fosfato di calcio colloidale, presente nella struttura delle micelle caseiniche, è completamente solubilizzato nel siero, avviene una progressiva disgregazione della micella caseinica in submicelle accompagnata da modificazioni nella loro struttura quaternaria. Ad un valore di pH pari a circa 4.6, corrispondente al punto isoelettrico delle caseine, si ha una neutralizzazione della carica elettrica complessiva con una diminuzione drastica della sfera di idratazione delle micelle. Lo squilibrio tra il basso livello di idratazione e il peso molecolare relativamente alto delle submicelle induce queste ad interagire tra loro, dando luogo alla flocculazione. Questo fenomeno è favorito a temperature relativamente alte e non avviene al di sotto dei 5°C. I legami che si instaurano durante la fase di flocculazione sono di natura elettrostatica ed idrofobica e portano alla formazione di un coagulo friabile e poroso che non acquista consistenza, contrariamente a quanto accade con i coaguli ottenuti per via enzimatica. Nel coagulo acido l'espulsione del siero avviene con una certa difficoltà, pertanto la cagliata mostra una maggiore umidità. A tal riguardo la maggior possibilità di contaminazione e di sviluppo di microrganismi patogeni nelle cagliate ottenute per coagulo acido è conseguenza dovuta alla elevata concentrazione d'acqua residua. Pertanto i formaggi ottenuti in questo modo presuppongono l'impiego di latte pretrattato termicamente, e sono comunque destinati al consumo entro un breve lasso di tempo dalla loro produzione. Generalmente la coagulazione acida avviene *in situ* mediante la fermentazione del lattosio che, ad opera dei batteri lattici, viene trasformato in acido lattico.

La coagulazione acida è alla base delle produzioni di molti derivati del latte, tra cui lo yogurt (acidificazione per fermentazione), il mascarpone (acidificazione chimica) ed il latte fermentato. La coagulazione prevalentemente acida, utilizzata comunque in concomitanza con quella enzimatica, viene impiegata anche per la produzione di formaggi a pasta fresca (ad esempio i formaggi “caprini”).

2.1.3 Salatura

La salatura rappresenta, dopo la messa in forma e la stufatura, l'ultima fase del processo di produzione del formaggio prima della sua stagionatura. Il sale assolve a varie funzioni: esso infatti, favorendo la diminuzione del contenuto in acqua e quindi dell'attività dell'acqua libera (a_w), inibisce sia un certo numero di fermentazioni sia la crescita di muffe superficiali indesiderate, allungando così la shelf life del prodotto. In sinergia con il processo di riduzione di pH, che avviene naturalmente durante il primo periodo di stagionatura del formaggio, il sale influenza le attività enzimatiche, rallentando ad esempio alcuni processi proteolitici e lipolitici e, conseguentemente, rallentando la velocità di maturazione del formaggio.

Il sale ha un ruolo importante nel definire il gusto del formaggio esaltandone la sapidità. Una differenza solo dello 0,2% nel contenuto in sale di un formaggio viene infatti rilevata dal consumatore medio.

La penetrazione, la diffusione e, quindi, la concentrazione in sale di un formaggio dipendono da diversi fattori che rendono la salatura un passaggio chiave della tecnologia di fabbricazione di ogni sua tipologia. L'operazione di salatura può avvenire con modalità differenti: in salamoia, a secco o per aggiunta diretta di sale al latte o alla cagliata.

L'utilizzo della salamoia prevede l'immersione delle forme di formaggio in soluzioni saline a diverse concentrazioni di cloruro di sodio (10-26%) a seconda della tipologia di formaggio che si vuole ottenere. E' il metodo di salatura più utilizzato in quanto assicura una maggiore uniformità di trattamento ed un miglior controllo delle operazioni. E' comunque necessario evitare l'invecchiamento e l'inquinamento delle salamoie, che vanno rinnovate o risanate periodicamente. Il risanamento della salamoia si effettua attraverso un trattamento termico a 90-95°C per 5-6 ore, seguito dalla

correzione della salinità residua nel surnatante. Il deposito di sale susseguente a tale trattamento viene scartato.

Il contenuto di sale del prodotto finito, ottenuto tramite la tecnica di immersione in salamoia, dipende da numerosi fattori, i più importanti dei quali sono: la concentrazione della salamoia, il tempo di permanenza in essa, la temperatura della salamoia, il peso e la forma dei formaggi.

Maggiore è la concentrazione di sale della salamoia, maggiore sarà la velocità di assorbimento del sale. Con i formaggi di grossa pezzatura (tipo il Grana Padano o il Parmigiano Reggiano) si usano, infatti, salamoie praticamente sature, con un tempo di permanenza che può anche arrivare ad un mese. Infatti l'assorbimento del sale diminuisce via via che si riduce la differenza di concentrazione salina tra l'acqua libera nel formaggio e la salamoia stessa.

La temperatura della salamoia influisce notevolmente sulla penetrazione del sale nel formaggio. Tenendo conto dell'esigenza di controllare lo sviluppo delle fermentazioni, che possono avvenire nei formaggi durante la salatura, la temperatura della salamoia può variare dai 4-5°C per i formaggi molli, ai 10-12°C per i formaggi semiduri, fino ai 15-18°C per formaggi a pasta dura.

La velocità di assorbimento del sale è regolata dalla geometria della forma, in quanto da quest'ultima dipendono sia il numero di direzioni di penetrazione del sale che il rapporto tra superficie piana e superficie curva di un formaggio. Conseguentemente un formaggio a forma di parallelepipedo (3 direzioni di penetrazione effettive) è caratterizzato da un maggior assorbimento di sale di un formaggio cilindrico (2 direzioni di penetrazione).

La modalità di salatura a secco, in cui il sale viene cosparso direttamente sulla superficie della forma, è la tecnica più antica ma ancora usata (come nel caso del Pecorino Romano) quando si vuole accelerare il processo di assorbimento del sale. In alcuni casi la salatura a secco viene usata come perfezionamento del trattamento di salatura eseguito in salamoia, per ritardare lo sviluppo di muffe non desiderate sulla superficie dei formaggi o per completare il processo di assorbimento del sale senza prolungare eccessivamente il periodo di immersione delle forme.

Alcune produzioni, come ad esempio quella del Cheddar, utilizzano l'aggiunta parziale o totale di sale direttamente al latte o alla cagliata (salatura in pasta) prima che

venga posta negli stampi. Questa tecnica di salatura è comunque poco diffusa nelle altre tipologie di formaggio.

I contenuti più bassi di sale si hanno nei formaggi molli a breve maturazione (1-2%), nei formaggi a pasta semidura e dura il contenuto in sale è più elevato, e in alcune tipologie può giungere fino a concentrazioni del 4-6%, come avviene in alcuni formaggi ovini come il Pecorino Romano e il Fiore Sardo.

2.2 Stagionatura e sviluppo dell'aroma nei formaggi

La stagionatura (o maturazione) è il periodo che intercorre tra la fine delle operazioni di salatura e il consumo del formaggio; esso varia a seconda della tipologia di prodotto. Durante la stagionatura avvengono nel formaggio numerose trasformazioni biochimiche, frutto dei processi di maturazione glicolitica, proteolitica e lipolitica, catalizzate in alcuni casi da enzimi specifici, che concorrono allo sviluppo di quegli attributi caratterizzanti l'aspetto, la struttura, il sapore, l'odore e l'aroma e la qualità nutrizionale del formaggio. Il formaggio è paragonabile ad un complesso reattore all'interno del quale le molecole, regolate nei corretti rapporti in funzione delle caratteristiche che si vogliono ottenere, interagiscono in un sistema influenzato da condizioni ambientali esterne quali la temperatura, l'umidità relativa, la microflora ambientale etc.

Il formaggio è quindi un prodotto biochimicamente attivo e dinamico. Le cagliate fresche delle differenti tipologie di formaggio hanno aromi blandi e del tutto simili tra loro, ma è durante la stagionatura che si sviluppano quei composti che caratterizzeranno ciascuna varietà di formaggio. Secondo la teoria "dell'equilibrio dei componenti", appare chiaro che l'aroma della maggior parte dei formaggi è il risultato della combinazione armonica di un gran numero di composti, sapidi e non, presenti nelle dovute proporzioni e concentrazioni (Mulder, 1952; Bosset *et al.*, 1993).

La maturazione del formaggio è determinata da due tipologie di fattori. La prima di queste è l'insieme dei processi biochimici, che avvengono a partire dalla formazione dei primi fiocchi caseosi fino alla fase finale di stagionatura, regolati dalla presenza di enzimi nativi del latte, aggiunti con il caglio e prodotti dai microrganismi della microflora nativa, starter e secondaria. Il secondo gruppo di fattori comprende tutti quegli accorgimenti

tecnologici, quali temperatura e umidità dei locali, pulizia della crosta, rivoltamento delle forme, che intervengono sul corretto sviluppo di muffe in superficie e che possono influenzare l'andamento dei processi biochimici.

I principali processi biochimici che avvengono durante la stagionatura del formaggio sono i seguenti:

- ✓ glicolisi: metabolismo di lattosio, lattato e citrato che residuano nella cagliata,
- ✓ lipolisi: liberazione degli acidi grassi liberi (FFA, Free Fatty Acids) e reazioni cataboliche associate,
- ✓ proteolisi: degradazione della matrice proteica (caseina) in una serie di peptidi e amminoacidi liberi, (FAA, Free Amino Acids) e le successive reazioni coinvolte nel catabolismo degli amminoacidi.

2.2.1 Processi fermentativi e metabolismo del lattosio e del citrato

Lo sviluppo di microorganismi sottintende diversi processi biochimici che avvengono durante la maturazione dei formaggi. I microorganismi più numerosi nel latte sono i batteri lattici appartenenti alle famiglie dei Lattobacilli e degli Streptococchi. I batteri lattici possono essere omofermentanti nel caso in cui producano principalmente acido lattico dal metabolismo del glucosio, mentre vengono detti eterofermentanti quando sono in grado di produrre oltre all'acido lattico anche alcol etilico, anidride carbonica ed acido acetico (Tabella 2.1). La fermentazione omolattica è sicuramente la più diffusa nella produzione casearia.

Tabella 2.1 Caratteristiche dei più importanti batteri lattici filocaseari

genere	monosaccaride	fermentazione	pathway	prodotto(i) principali
<i>Lactococcus</i>	esosi	omolattica	EMP	acido lattico
<i>Streptococcus</i>	esosi	omolattica	EMP	acido lattico
<i>Pediococcus</i>	esosi	omolattica	EMP	acido lattico
<i>Leuconostoc</i>	esosi	eterolattica	HMS	acido lattico CO ₂ acetate/etanolo, (1:1:1)
	pentosi	eterolattica	PP	acido lattico acetate/etanolo, (1:1)
<i>Lactobacillus</i>	gruppo I esosi	omolattica	EMP	acido lattico
	gruppo II esosi	omolattica	EMP	acido lattico
		pentosi	eterolattica	PP
	gruppo III esosi	eterolattica	HMS	acido lattico CO ₂ acetate/etanolo, (1:1:1)
	pentosi	eterolattica	PP	acido lattico acetate/etanolo, (1:1)
<i>Bifidobacterium</i>	esosi	eterolattica	BP	acido lattico acido acetico, (1:1.5)

EMP = emden-Meyerhoff-Parnas;

HMS = hexose monophosphate shunt (phosphogluconate-phosphoketolase)

PP = pentose-phosphate;

BP = bifidus (fructose ketolase)

Il contenuto di acido lattico nel formaggio raggiunge il suo valore massimo dopo 24-48 ore dall'inizio della caseificazione, in seguito diminuisce in quanto salifica a lattato e viene successivamente metabolizzato ad opera sia di batteri starter che non starter, come riportato in figura 2.1.

Il processo di trasformazione del lattosio in lattato è fondamentale nella produzione di tutti i tipi di formaggio. Il lattosio può essere metabolizzato tramite processi di glicolisi ad opera di starter batterici o mediante l'azione delle fosfochetolasi ad

opera dei *Leuconostoc* spp (Cogan *et al.*, 1993). I prodotti principali del metabolismo del lattosio sono L- o D- lattato o una miscela racemica di entrambi. Alcuni microrganismi eterofermentanti, quali *Leuconostoc* spp., sono in gradi di produrre altri prodotti, quali ad esempio, l'etanolo (Vedamuthu, 1994).

Alcuni starter batterici, quali ad esempio lo *Streptococcus thermophilus*, non sono in grado di metabolizzare il galattosio pertanto, affinché esso non si accumuli nella cagliata, devono crescere in associazione con microrganismi galattosio-positivi come i Gal+lattobacilli.

Il lattato contribuisce alla formazione dell'aroma nei formaggi a cagliata acida e nelle varietà stagionate soprattutto a inizio maturazione. L'acidificazione del formaggio ha un'importanza indiretta nell'aroma, infatti influisce sulla capacità tamponante del formaggio, sulla crescita dei microrganismi e sull'attività degli enzimi coinvolti nella stagionatura. In funzione della classe di microorganismi, il lattato può anche essere convertito attraverso diversi percorsi metabolici in molti composti che contribuiscono all'aroma del formaggio (Figura 2.1).

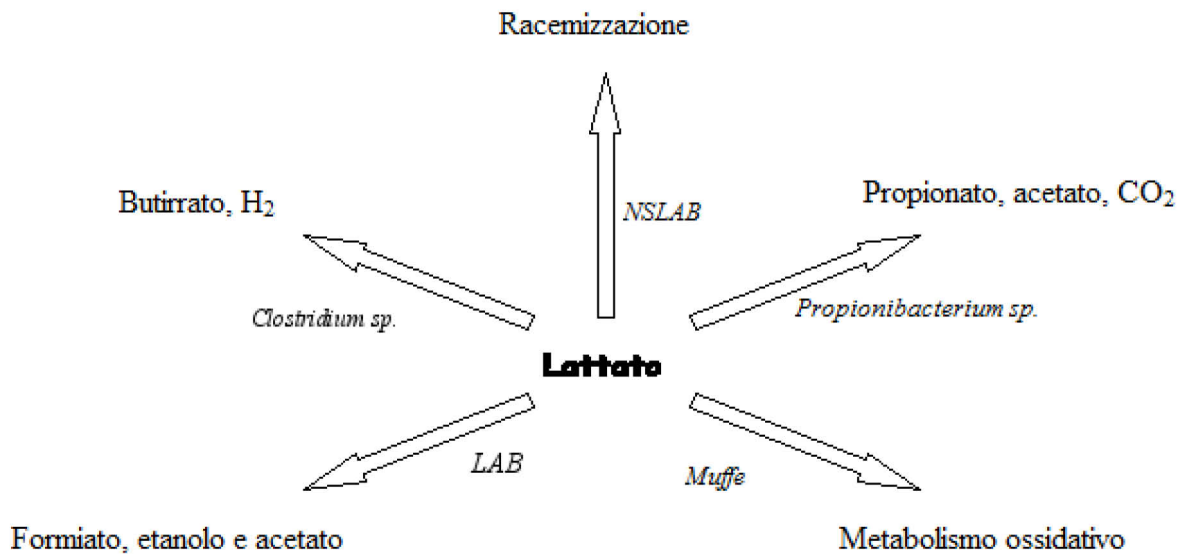


Figura 2.1 Percorsi metabolici a carico del lattato

Un altro importante processo metabolico che avviene durante la maturazione dei formaggi è quello di degradazione del citrato. Il contenuto residuo di citrato nella cagliata, anche se relativamente basso (10 mmol/kg), viene comunque metabolizzato, ad opera di alcuni starter batterici mesofili della flora non-starter (citrato-positivi, Cit+, lattococus e Leuconostoc sp.), in una serie di composti importanti dal punto di vista dell'aroma finale del formaggio (Cogan, 1985; Cogan *et al.*, 1993; Fox *et al.*, 1990; Hugenholtz, 1993).

I principali composti aromatizzanti prodotti dal metabolismo del citrato sono l'ione acetato, il diacetile, l'acetoino e il 2,3-butandiolo. Generalmente vengono prodotte solo quantità minime di diacetile (1-10 µg/ml nel latte), mentre l'acetoino è prodotto in concentrazioni 10-50 volte maggiori a quelle del diacetile. Dal citrato si produce acetato in concentrazioni equimolari. Il processo di produzione del 2,3-butandiolo per mezzo di starter non è stato ancora completamente chiarito.

2.2.2 Lipolisi

La frazione lipidica del latte è essenziale al corretto sviluppo dell'aroma del formaggio durante la stagionatura. La stessa tipologia di formaggio, generalmente

prodotto da latte intero, non sviluppa lo stesso aroma se prodotta da latte scremato o da latte il cui il grasso sia stato sostituito con altri lipidi (Foda *et al.*, 1974; Ohren *et al.*, 1967; Wijesundera *et al.*, 1998). La lipolisi è uno dei principali cambiamenti biochimici della materia grassa che avvengono durante la stagionatura del formaggio, essa è catalizzata da enzimi nativi del latte o apportati dai coadiuvanti tecnologici quali caglio e starter batterico.

I rapporti fra le concentrazioni di alcuni FFA (acidi grassi liberi) possono essere utilizzati come indici di stagionatura del formaggio, anche se essi sono meno utilizzati rispetto a quelli proteolitici (Farkye *et al.*, 1990).

Come avviene per tutti i cibi ad alta concentrazione di grassi, la degradazione dei lipidi presenti nel formaggio può essere causata o da fenomeni ossidativi o per effetto di reazioni di idrolisi. L'ambiente riducente normalmente presente nella matrice formaggio limita comunque la probabilità di ossidazione dei lipidi, tuttavia la misura con cui avviene e il suo contributo all'aroma del formaggio non è stata ancora chiarita (Fox *et al.*, 1995).

L'idrolisi enzimatica dei trigliceridi in acidi grassi e glicerolo è invece essenziale per lo sviluppo dell'aroma in ogni tipo di formaggio. La frazione trigliceridica del grasso del latte e quindi del formaggio contiene elevate concentrazioni di acidi grassi a corta e media catena. Questi acidi grassi, rilasciati durante la lipolisi, influenzano l'aroma di vari tipi di formaggio sia direttamente, come avviene nelle varietà italiane, in cui gli acidi grassi a corta catena sono i diretti responsabili del gusto e dell'aroma (Woo *et al.*, 1984; Addis *et al.*, 2005a; Addis *et al.*, 2005b; Pirisi *et al.*, 2007), sia come precursori di altri composti quali metil-chetoni, alcoli, lattoni ed esteri (Urbach, 1991).

Le lipasi responsabili dei processi degradativi a carico dei lipidi nel formaggio derivano da diverse fonti: il latte, il caglio (in particolare il caglio in pasta), gli starter, la microflora secondaria e, ove impiegate, le lipasi esogene. La lipasi, nelle varietà di formaggio a prevalente maturazione lipolitica, proviene di norma dal coagulante, come il caglio in pasta per alcune varietà di formaggio prodotte nei paesi del bacino del mediterraneo (Italia, Spagna e Grecia), o dagli starter aggiunti (formaggi erborinati).

Lipasi del latte

La LPL (lipoprotein-lipasi) è la principale lipasi endogena del latte, essa è stata ben caratterizzata da Olivecrona *et al.*, 1992. E' relativamente non specifica e libera gli acidi

grassi dalle posizioni sn-1 e sn-3 dei mono- di- o trigliceridi e dalla posizione sn-1 dei fosfolipidi. Circa l'80% della LPL nel latte bovino è associata alla micella caseinica, e viene così incorporata nel reticolo della cagliata.

La LPL ha un'influenza maggiore sulla lipolisi dei formaggi prodotti da latte crudo perché la sua attività viene ridotta dalla pastorizzazione, probabilmente contribuisce anche alla lipolisi nei formaggi prodotti da latte termizzato, poiché la sua completa disattivazione avviene previo trattamento a 78 °C per 10 s.

Lipasi presenti nel caglio in pasta

L'attività lipolitica del caglio dipende fortemente dalla sua tipologia. I cagli liquidi di vitello e di bovino adulto, che vengono comunemente utilizzati per la produzione della maggior parte delle varietà di formaggio sono normalmente privi di attività lipolitica. D'altro canto i cagli in pasta, utilizzati nella produzione di diverse tipologie di formaggio dell'area del mediterraneo, sono invece caratterizzati dalla presenza di lipasi e di esterasi. In particolare, i cagli in pasta ottenuti da abomasi di agnelli non svezzati e macellati a stomaco pieno presentano un'elevata attività lipolitica a causa del loro contenuto di lipasi pregastrica (PGE) (Piredda *et al.*, 1998; Bustamante *et al.*, 2000).

La PGE viene secreta dalle ghiandole situate alla base della lingua e nella regione del retrobocca, e la sua secrezione è stimolata dalla suzione di latte. In seguito alla secrezione essa viene trascinata nell'abomaso dell'animale insieme al cibo. Il caglio in pasta è preparato a partire dagli abomasi dei ruminanti (generalmente agnelli e capretti) parzialmente essiccati, macinati e ridotti in pasta. La PGE presente nei cagli in pasta è una glicoproteina (MW = 49 KDa) altamente specifica nei confronti degli acidi grassi a corta catena in posizione sn-3 del trigliceride, la sua azione provoca il rilascio di elevate quantità di acido butirrico (Pitas e Jensen, 1970; Nelson *et al.*, 1977; Ha e Lindsay, 1993). Il caratteristico aroma piccante o pungente che caratterizza i formaggi italiani Pecorino Romano, Fiore Sardo e Provolone è infatti legato all'elevato contenuto di acido butirrico liberato dall'azione della PGE durante la stagionatura e, dunque, all'uso di questo tipo di caglio (Barzaghi *et al.*, 1997; Addis *et al.*, 2005a; Addis *et al.*, 2005b).

Sostanze volatili prodotte per degradazione degli acidi grassi liberi

Oltre a contribuire direttamente allo sviluppo dell'aroma nel formaggio, gli acidi grassi liberi prodotti dalla lipolisi dei trigliceridi costituiscono i precursori molecolari per una serie di reazioni cataboliche che portano alla produzione di altri composti aromatici (Figura 2.2).

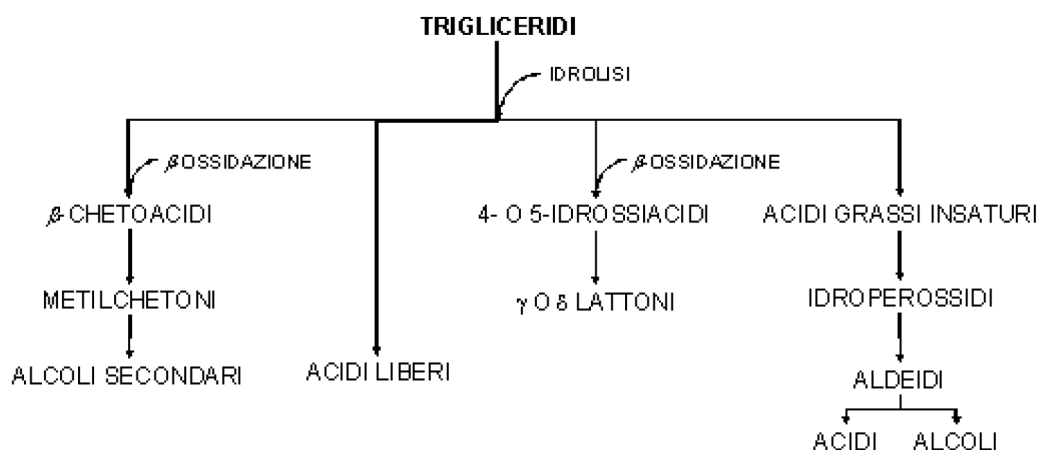


Figura 2.2 Principali percorsi di degradazione degli acidi grassi liberi

L'aroma dei formaggi erborinati, i cosiddetti Blue Cheeses come il Gorgonzola o il Roquefort, prodotti con l'aggiunta di *Penicillium roqueforti* è dominato dalla presenza dei 2-alcanoni (2-metil chetoni). La produzione dei 2-metil chetoni in questa tipologia di formaggi è stato oggetto di studio da parte di molti ricercatori (Fox *et al.*, 1995; McSweeney *et al.*, 1997; Molimard *et al.*, 1996).

Gli enzimi, prodotti dal *Penicillium roqueforti*, catabolizzano gli FFA con n atomi di carbonio producendo i corrispondenti metilchetoni con n-1 atomi di carbonio. Principalmente vengono prodotti l'eptan-2-one, il nonan-2-one e l'undecan-2-one, che sono i diretti responsabili dell'odore e dell'aroma caratteristici dei formaggi erborinati. La formazione dei 2-metil chetoni (β -ossidazione) avviene mediante il rilascio degli acidi grassi tramite lipolisi, la loro ossidazione a β -chetoacidi e la successiva decarbossilazione a 2-alcanoni contenenti un atomo di carbonio in meno rispetto all'acido grasso di partenza.

I metil chetoni possono essere successivamente ridotti agli alcoli secondari corrispondenti (alcan-2-oli), e questa riduzione è reversibile in condizioni aerobiche.

L'esterificazione intramolecolare degli idrossiacidi grassi porta alla formazione dei lattoni.

I principali lattoni del formaggio sono i γ - e δ - lattoni, prodotti stabili con intenso aroma, che si formano spontaneamente a partire dai corrispondenti γ - e δ - idrossi-acidi.

Gli acidi grassi liberi possono reagire sia con gli alcoli per produrre esteri, i quali impartiscono al formaggio un aroma forte e caratteristico associato spesso alla presenza di note fruttate, sia con i gruppi sulfidrilici liberi per produrre tioesteri.

Nell'Emmental sono stati individuati 14 diversi esteri (Bosset *et al.*, 1995; Bosset *et al.*, 1997; Imhof *et al.*, 1984; Rychlik *et al.*, 1997), e si pensa che gli esteri siano anche tra i principali responsabili dell'aroma del Parmigiano-Reggiano (Meinhart *et al.*, 1986). Gli esteri principali tra i 38 individuati nel Parmigiano-Reggiano sono: l'etil-butanoato, l'etil-esanoato, l'acetato di etile, l'etil-ottanoato, etil-decanoato e metil-esanoato (McSweeney *et al.*, 1997).

2.2.3 Proteolisi

La proteolisi è, tra i tre principali, il processo biochimico più complesso e - in molte varietà di formaggio - anche il più importante che avviene durante la stagionatura. La proteolisi è stata argomento di numerosi studi (Fox, 1989; Fox *et al.*, 1991; Fox *et al.*, 1996; Fox *et al.*, 1995; Grappin *et al.*, 1985; Rank *et al.*, 1985).

Durante la stagionatura del formaggio l'idrolisi delle proteine ha un ruolo importante in quanto sovrintende:

- ✓ ai cambiamenti che avvengono nella struttura della cagliata e del formaggio, dovuti alla degradazione del tessuto proteico;
- ✓ alla diminuzione della attività dell'acqua libera (a_w) attraverso le interazioni tra l'acqua ed i gruppi carbossilici e amminici liberi;
- ✓ all'aumento del pH, in particolare nella superficie delle varietà erborinate e a crosta fiorita;

- ✓ al contributo diretto nella formazione di aromi e sapori nel formaggio, a volte anche sgradevoli (l'amaro) tramite formazione di peptidi e amminoacidi liberi, FAA;
- ✓ alla formazione di substrati (soprattutto amminoacidi) per reazioni metaboliche secondarie (per es. deaminazione, decarbossilazione, transaminazione, desolfurazione, catabolismo dei amminoacidi quali fenilalanina, tirosina, triptofano e reazioni degli amminoacidi con altri composti);

Nel formaggio il processo biochimico di proteolisi può essere catalizzata dai seguenti agenti:

- ✓ enzimi coagulanti e proteolitici aggiunti con il caglio (per es. chimosina, pepsina e proteinasi acide da piante o funghi);
- ✓ enzimi nativi del latte (plasmina, catepsina D e - probabilmente - altre proteasi derivanti dalle cellule somatiche);
- ✓ enzimi prodotti dallo starter batterico;
- ✓ enzimi prodotti dai batteri non-starter o dagli starter secondari (per es. *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, *Propionibacterium* spp. *Brevis Bacterium linens*);
- ✓ proteasi esogene e/o peptidasi usate per accelerare la stagionatura.

In quasi tutte le tipologie di formaggio l'idrolisi iniziale delle caseine è dovuta all'azione degli enzimi del caglio e, ad un livello inferiore, dalla plasmina e dalle proteasi delle cellule somatiche (per es. la catepsina D). Questo processo, conosciuto come proteolisi primaria (Grappin *et al.*, 1985), porta alla formazione di peptidi di elevato (non idrosolubili) e medio (idrosolubili) peso molecolare. In particolare, durante la proteolisi primaria viene idrolizzata la frazione di α -caseina generando così delle importanti alterazioni nella struttura dei formaggi (Creamer *et al.*, 1982).

In uno stadio successivo (proteolisi secondaria) i polipeptidi vengono degradati a peptidi ed amminoacidi ad opera del sistema di proteasi-peptidasi dei batteri starter e non starter (Fox, 1989).

I coagulanti utilizzati in ambito caseario contengono solitamente enzimi coagulanti (chimosina) e proteolitici (pepsine e gastricsine). La chimosina è la proteasi principale dei cagli di origine ruminante, ed è responsabile in genere del 70-95% dell'attività coagulante

totale del caglio, mentre la restante percentuale è dovuta alla pepsina (Rothe *et al.*, 1977). Quasi tutta la chimosina aggiunta in fase di coagulazione viene persa con il siero, solo il 6% circa rimane nella cagliata; la chimosina che residua nella cagliata contribuisce alla proteolisi primaria in molte varietà di formaggi (Creamer *et al.*, 1985). Anche le pepsine e le gastricsine che residuano nella cagliata contribuiscono alla proteolisi primaria del formaggio durante la stagionatura.

La proteasi endogena che predomina nel latte è la plasmina, enzima ampiamente studiato (Bastian *et al.*, 1996; Grufferty *et al.*, 1988). Il sistema della plasmina nel latte è complesso ed è composto dall'enzima attivo (plasmina), dal suo zimogeno (plasminogeno), dagli attivatori del plasminogeno e dagli inibitori della plasmina; la plasmina, il plasminogeno e gli attivatori del plasminogeno sono associati alle micelle caseiniche nel latte, mentre gli inibitori della plasmina rimangono nel siero. La plasmina, le cui condizioni ottimali di lavoro sono pH 7.5 e 37°C, è altamente specifica per alcuni legami peptidici ed è particolarmente attiva nelle α_2 e β caseine; l'idrolisi di queste ultime porta alla formazione di gamma-caseine (frammenti C-terminali) e di proteosi-peptoni (frammenti N-terminali) (Farkye *et al.*, 1992).

Il latte contiene anche una proteasi acida conosciuta come catepsina D, questa è relativamente termolabile (viene inattivata a 70°C per 10 minuti), e possiede un pH ottimale di 4.0 (Kaminogawa *et al.*, 1980). La specificità proteolitica della catepsina D è simile a quella della chimosina (McSweeney *et al.*, 1995), con preferenza per le α_1 caseine ma con una attività coagulante molto bassa (McSweeney *et al.*, 1995). Nei formaggi a coagulazione non presamica, la formazione della frazione della α_1 CN contenente gli amminoacidi 24-199) è stata attribuita all'attività della proteinasi acida del latte (Visser *et al.*, 1977).

Alla proteolisi del formaggio contribuiscono anche gli enzimi proteolitici derivanti dalle cellule somatiche. Essi sono in grado di attivare i plasminogeni aumentando i livelli di plasmina, possono influire sulla proteolisi del formaggio.

Nonostante i batteri lattici (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*) siano debolmente proteolitici, essi possiedono un corredo completo proteasi/peptidasi che è stato largamente studiato (Fox *et al.*, 1996; Kungi, 1996; Law *et al.*, 1997). Il sistema proteolitico dei batteri lattici è necessario per consentire la loro crescita nel latte; esso, in condizioni normali, contiene solo una ridotta quantità di peptidi piccoli e amminoacidi. In

particolare nei formaggi a latte crudo, la quantità di microflora non lattica (NSLAB) può raggiungere livelli tali da coadiuvare l'azione proteolitica dello starter, producendo peptidi e FAA (Lynch, 1997).

2.2.4 Catabolismo degli amminoacidi ed eventi correlati

Gli amminoacidi liberi (FAA) sono i prodotti finali della proteolisi, e la loro concentrazione nel formaggio viene normalmente impiegata come indice di stagionatura (Aston *et al.*, 1983; McSweeney *et al.*, 1997; Puchades *et al.*, 1989). Il livello di peptidi e amminoacidi solubili in acido fosforotungstico al 5% (PTA) è considerato un indicatore dell'entità di sviluppo dell'aroma nel formaggio (Ardo *et al.*, 1988; Aston *et al.*, 1983). I peptidi di medio e piccolo peso molecolare e gli amminoacidi contribuiscono infatti all'aroma di fondo di molte varietà di formaggio (Urbach, 1995).

Alcuni autori sostengono che l'aroma e la concentrazione degli amminoacidi liberi non siano correlati, poiché vari formaggi (Cheddar, Gouda e Edam) hanno sapori molto diversi pur avendo concentrazioni e relative proporzioni di amminoacidi generalmente simili (Fox *et al.*, 1997). A questo proposito è stato suggerito (Fox *et al.*, 1996) che probabilmente il fattore discriminante è invece la modificazione enzimatica o chimica che gli amminoacidi liberi subiscono durante la stagionatura.

Il catabolismo degli amminoacidi è alla base della produzione di un gran numero di composti, tra i quali ammoniaci, ammine, aldeidi, fenoli, indolo e alcoli, la maggior parte dei quali contribuisce allo sviluppo dell'aroma del formaggio. Il catabolismo degli amminoacidi avviene in tutte le varietà di formaggio, ma è particolarmente importante nei formaggi erborinati, a crosta fiorita e a crosta lavata.

Il primo stadio del catabolismo degli amminoacidi può essere la decarbossilazione, la deaminazione, transaminazione, desolfurazione o anche l'idrolisi della catena laterale. Il secondo stadio riguarda la conversione dei composti derivati (ammine e α -chetoadiacidi), come anche degli amminoacidi stessi, ad aldeidi. Lo stadio finale è infine la riduzione delle aldeidi ad alcoli, o la loro ossidazione ad acidi. Gli amminoacidi solforati possono andare incontro a un gran numero di reazioni, che portano alla formazione di molti derivati solforati, compreso il metantiolo.

In conclusione, viste le numerose trasformazioni che possono avvenire durante la produzione e la stagionatura del formaggio, l'unicità e la tipicità di questo dipendono da un armonico equilibrio dei processi fermentativi ed enzimatici. Il prevalere o meno di alcuni di questi processi metabolici conduce allo sviluppo di prodotti con caratteristiche peculiari differenti. Il formaggio Fiore Sardo DOP, oggetto di indagine nel corso di questa tesi, è caratterizzato, come si vedrà più avanti, da una spiccata maturazione di tipo lipolitico.

2.3 Classificazione dei formaggi

La classificazione dei formaggi può essere fatta in funzione del contenuto di grassi, della consistenza, della temperatura di lavorazione della cagliata e del periodo di stagionatura.

La classificazione in base al contenuto di grasso è espressa come percentuale sulla sostanza secca.

Contenuto di grasso	Tipo di formaggio
>40%	Grasso
20% - 40%	Leggero
< 20%	Magro

La classificazione in base alla consistenza viene effettuata in funzione del contenuto di acqua e della tecnologia di separazione della cagliata dal siero.

Umidità	Tipo di formaggio	Tecnica di separazione
>45%	molle	Spurgo limitato
40% - 45%	semiduro	Spurgo superiore
< 40%	duro	Spurgo spinto

La classificazione in base alla tecnologia viene effettuata sulla base della temperatura di cottura della cagliata.

Temperatura	Tipo di formaggio
nessun riscaldamento	a pasta cruda
< 48°C	a pasta semicotta
> 48°C	a pasta cotta

La classificazione in base al periodo della stagionatura è fatta sulla base del tempo che passa dalla coagulazione alla possibile commercializzazione del prodotto.

Tempo	Tipo di formaggio
Pochi giorni	fresco
< 30 giorni	a maturazione breve
1- 6 mesi	a maturazione media
> 6 mesi	a maturazione lenta

2.4 Il formaggio Fiore Sardo DOP

2.4.1 Cenni storici

La tradizione lattiero-casearia in Sardegna ha origini antichissime, in quanto da sempre la pastorizia è stata la forma di attività lavorativa e di sostentamento più diffusa nell'isola. Le testimonianze che riguardano la produzione di formaggio in Sardegna sono numerose e risalgono già a partire dal primo secolo a.C. Già in epoca romana, come riportato nei trattati di Diodoro Siculo e Palladio Rutilio Tauro, si narra di una solida tradizione casearia caratterizzata da continue sperimentazioni tecnologiche come ad esempio l'utilizzo di pietre arroventate in caldaia per scaldare il latte prima della coagulazione, o l'impiego di coagulanti vegetali estratti da cardi del genere *Cynara cardunculus*.

Il sistema produttivo del Fiore Sardo, che si è tramandato nel tempo conservando molte delle sue peculiarità, è sicuramente quello più antico fra tutti quelli della tradizione casearia Sarda. Nel trattato *Rifiorimento della Sardegna nel miglioramento di sua agricoltura* del 1776, Padre Francesco Gemelli descrive una tecnica di produzione ancora in uso e riconducibile a quella del Fiore Sardo: *“veniva asciugato su un tessuto di canna nella parte superiore del covile e vi accendevano sotto il fuoco. Contraeva così l’odore di fumo che non dispiaceva ai romani”*. Al Fiore Sardo accenna il Lamarmora nella sua opera dal 1839 *Viaggio in Sardegna*, in cui riporta che i formaggi di latte di pecora costituivano una grande risorsa per l’isola e venivano già da allora esportati in grandi quantità verso Napoli. Fino all’introduzione, alla fine del XIX secolo da parte di imprenditori laziali, della tecnologia di fabbricazione del Pecorino Romano, il Fiore Sardo è rimasta la principale produzione casearia della Sardegna (Campus, 1936).

2.4.2 Caratteristiche

Il Fiore Sardo DOP, così come descritto nel Disciplinare di Produzione, è un formaggio a pasta dura, cruda, prodotto ancora oggi principalmente con metodi di trasformazione artigianali, esclusivamente da latte di pecora di razza Sarda, intero, proveniente dagli allevamenti situati nella regione Sardegna.

In Italia è l’unico formaggio ovino prodotto con latte crudo che ad aver ottenuto la Denominazione d’Origine Protetta. Questa sua caratteristica esige una lavorazione immediata del latte che, non subendo processi di termizzazione o pastorizzazione, viene generalmente fatto coagulare subito dopo la mungitura. Il latte viene coagulato utilizzando il caglio in pasta di agnello o di capretto sardo. Tale trattamento induce nel formaggio un elevato grado di lipolisi dovuto prevalentemente all’azione delle lipasi pregastriche contenute nel caglio utilizzato (Piredda *et al.*, 1998)

Si presenta con crosta consistente, di colore da giallo carico a marrone scuro (Figura 2.3). La pasta è di colore bianco o giallo paglierino e il sapore è più o meno piccante a seconda dello stadio di maturazione.



Figura 2.3 Formaggio Fiore Sardo DOP a sei mesi di stagionatura

La produzione e la stagionatura del Fiore Sardo avvengono esclusivamente nel territorio della Regione Sardegna. Essendo un formaggio prodotto a partire da latte crudo, il Fiore Sardo viene ammesso al consumo dopo almeno 3,5 mesi di stagionatura.

La produzione del Fiore Sardo è prevalentemente di tipo artigianale e avviene in circa 45 aziende situate in aree collinari e montane distribuite in tutta l'isola. Si tratta prevalentemente di aziende a conduzione familiare che solitamente producono meno di 20 tonnellate di formaggio l'anno. La produzione industriale di Fiore Sardo riguarda attualmente poco più del 30% della produzione totale.

L'attività del sistema Fiore Sardo è quella di un settore di nicchia, caratterizzato negli ultimi anni da una discreta crescita. Nonostante i quantitativi di formaggio prodotti siano abbastanza contenuti se confrontati con quelli di altri sistemi caseari sardi, come ad esempio quello del Pecorino Romano, la produzione del Fiore Sardo riveste ancora oggi una notevole importanza, non solo per le caratteristiche di unicità e tipicità del prodotto, ma anche sotto il profilo del patrimonio culturale e del contesto produttivo storico della popolazione sarda.

La valorizzazione delle produzioni artigianali presso le aziende zootecniche situate in zone marginali, come quelle in cui si produce il Fiore Sardo, ha oggi una grande importanza strategica, in quanto tende a garantire la presenza e la gestione da parte dell'uomo di territori che altrimenti rischierebbero l'abbandono. La tutela del Fiore Sardo ha trovato riscontro in una serie di provvedimenti normativi Nazionali e Comunitari, a partire dall'inserimento negli allegati della Convenzione di Stresa, nel 1951, fino all'ottenimento della Denominazione di Origine Protetta con il Decreto 1236/96.

2.4.3 Il processo produttivo

La produzione del Fiore Sardo avviene nel rispetto del Disciplinare di Produzione adottato ai sensi dell'art.4 del Regolamento 510/06. L'attività di verifica del rispetto del disciplinare viene effettuata, ai sensi dell'art. 11 del suddetto Regolamento, secondo specifici piani di controllo adottati dall'Organismo di controllo, autorizzato ai sensi dell'art 4 della Legge 526/99. Lo schema tecnologico riportato in Figura 2.4 illustra le fasi del processo produttivo.

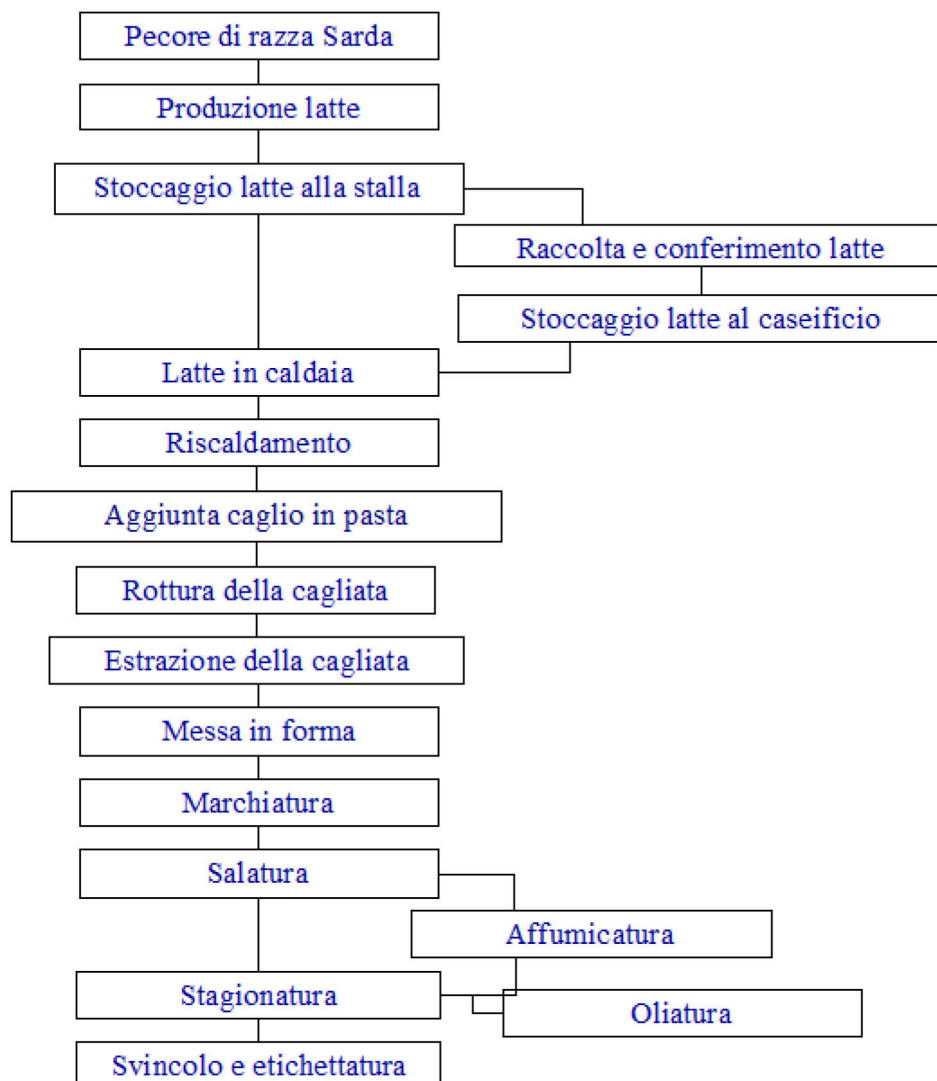


Figura 2.4 Fasi del processo di produzione

Il latte proveniente da pecore di razza Sarda intero, fresco e crudo, deve avere le seguenti caratteristiche: pH intorno a 6,6, grasso tra 6,2 e 7,5%, proteine tra 5,5 e 6,3%,

eventualmente refrigerato per un periodo non superiore alle 36 ore, viene filtrato e immesso nella caldaia di coagulazione.

Il latte viene quindi coagulato ad una temperatura compresa tra 34 e 36°C con l'aggiunta di un estratto acquoso di caglio di agnello e/o di capretto in pasta (Figura 2.5), in quantità tale da determinare la coagulazione in circa 12-17 minuti (tempo di presa).



Figura 2.5 Aggiunta del caglio



Figura 2.6 Rottura della cagliata

Il rassodamento della cagliata avviene in circa 25-28 min (tempo di indurimento). Si procede quindi alla rottura del coagulo (Figura 2.6), molto energica, per la durata circa 3 min, fino ad ottenere granuli di cagliata delle dimensioni assimilabili a quelle di un chicco di miglio.

Ultimata l'operazione di rottura, la cagliata viene lasciata depositare sul fondo della caldaia dove sosta per circa 5 min. La massa caseosa viene successivamente trasferita negli stampi (Figura 2.7) dove si realizza il primo drenaggio del siero.



Figura 2.7 Formatura

Lo spurgo del siero può essere agevolato mediante rivoltamenti, pressatura e/o sosta delle forme in ambiente caldo-umido.

La cagliata, immessa negli stampi tronco conici, può quindi essere sottoposta a scottatura.

I formaggi vengono salati in salamoia satura. Il piatto della forma che emerge dal bagno salino può essere ricoperto di sale. La durata della fase di salatura va da 36 a 48 ore in locali a temperatura inferiore a 15°C.

Terminata l'operazione di salatura, le forme vengono avviate alla stagionatura.

All'inizio della stagionatura (I fase), che dura circa 15 giorni, il formaggio può essere affumicato (Figura 2.8) per circa due ore al giorno alla temperatura di 18°-20°C, impiegando mezzi naturali (fumo di essenze vegetali endemiche quali corbezzolo, perastro e mirto).



Figura 2.8 Affumicatura

La fasi successive della stagionatura, che durano almeno 3 mesi, proseguono in locali freschi in cui la temperatura e l'umidità ambientale sono quelle naturali (cantine di stagionatura) oppure in apposite celle (celle di stagionatura) ove la temperatura di maturazione non supera i 15 °C e l'umidità relativa oscilla intorno all'80-85%.

Durante la stagionatura i formaggi vengono sottoposti a periodici rivoltamenti e a operazioni di manutenzione, in particolare le oliature della crosta con olio d'oliva o con un'emulsione composta da olio di oliva, aceto di vino e sale da cucina.

Capitolo 3

Le alterazioni negli alimenti e nei formaggi

L'alterazione di un alimento è una trasformazione a carico di uno o più componenti chimici che ne determina una modificazione delle proprietà fisiche, chimiche e biologiche. Queste modifiche sono percepite come un'alterazione in senso positivo o negativo delle proprietà nutritive e/o sensoriali (colore, forma, consistenza, odore, sapore) dell'alimento o delle sue caratteristiche tecnologiche.

La natura dei processi trasformativi a carico dei componenti chimico-nutritivi dei prodotti alimentari grezzi è eterogenea in relazione alle caratteristiche intrinseche del prodotto, alle condizioni operative, agli intervalli di tempo che intercorrono. In generale si tratta di fenomeni o processi di natura fisica, fisico-chimica, chimica, biochimica e microbiologica, spesso interagenti fra loro in un sistema di trasformazioni complesso, più o meno drastico.

Si usa il termine trasformazione quando il processo porta a risultati desiderati e quindi è nel suo complesso positivo. Si usa invece il termine alterazione quando il processo porta a risultati indesiderati, se non addirittura dannosi. Le trasformazioni si possono svolgere spontaneamente, con o senza il controllo dei parametri ambientali ed operativi, oppure artificialmente, creando quindi le condizioni affinché le stesse si avviino nella direzione desiderata. Le alterazioni si svolgono sempre spontaneamente. Esse possono essere "fisiologiche", in quanto fenomeni ordinari integrati nel ciclo della sostanza organica come i processi fermentativi, l'irrancidimento chetonico nei formaggi, la caramellizzazione degli zuccheri e la denaturazione proteica nelle carni. Altre trasformazioni sono indotte da errate (o non ottimali) condizioni ambientali (od operative), come le putrefazioni e l'irrancidimento ossidativo dei grassi. In ogni caso si cerca di intervenire per prevenire, arrestare o rallentare lo svolgimento dei processi indesiderati. È interessante notare che uno stesso processo (o fenomeno) può essere definito in certi contesti come una trasformazione desiderata, in altri come un'alterazione. Questo si può verificare su prodotti diversi o anche sullo stesso prodotto.

Basti pensare, ad esempio, alla fermentazione acetica: è un processo di alterazione se il vino è il prodotto finale, una trasformazione voluta se invece il vino è un prodotto intermedio da trasformare in aceto. Nel primo caso si creano le condizioni per prevenire la fermentazione acetica, nel secondo si creano le condizioni per far sì che si svolga in modo ottimale.

Nella maggior parte dei casi le trasformazioni comportano la combinazione di più fenomeni e più vie metaboliche, parallele o consecutive, di cui una (o più) assume le prerogative di trasformazione principale, relegando le altre al ruolo di processi complementari. I primi sono alla base della tecnologia che identifica genericamente il prodotto trasformato (es. la fermentazione alcolica nella vinificazione, la coagulazione della caseina nella caseificazione), le altre, invece, rientrano nei processi di maturazione fondamentali per il conferimento delle proprietà sensoriali che tipizzano le varianti del prodotto (bouquet, aroma, consistenza, ecc.). I processi fondamentali sono in generale ben conosciuti nella loro dinamica al punto che, in alcune tecnologie, si possiede un livello di conoscenza tale da poter guidare le trasformazioni con il controllo rigoroso dei parametri ambientali, dello stato fisico e strutturale, della composizione chimica, degli organismi coinvolti, ecc.

La maggior parte delle trasformazioni sono di natura biochimica, dovute quindi all'azione di enzimi endogeni o esogeni. Sono endogeni gli enzimi propri dell'organismo da cui deriva l'alimento, sono esogeni quelli prodotti da organismi che vengono a contatto, accidentalmente o meno, con l'alimento. In quest'ultimo caso si parla per lo più di trasformazioni microbiche in quanto i processi enzimatici sono prodotti da Batteri, Attinomiceti e Funghi. Questi ultimi rientrano in genere nelle categorie generiche delle muffe (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, ecc.) e dei lieviti (*Saccharomyces*, *Torula*, *Candida*, ecc.).

In qualsiasi tipo di trasformazione agroalimentare (fisica, conservazione, trasporto) si adottano tecnologie che sono svolte a favorire le trasformazioni desiderate oppure a prevenire, rallentare, arrestare le alterazioni.

3.1 Lipidi

I lipidi presenti negli alimenti sono rappresentati, per la quasi totalità (98%), dai trigliceridi degli acidi grassi, ossia i grassi propriamente detti. Questi composti sono soggetti fondamentalmente a tre tipi di trasformazioni:

- ✓ idrolisi;
- ✓ irrancidimento chetonico;
- ✓ irrancidimento ossidativo.

3.1.1 Idrolisi o inacidimento

L'idrolisi, detta anche inacidimento, è un fenomeno favorito dall'umidità e, soprattutto, dall'azione combinata della luce e della lipasi, un enzima che può essere di natura endogena o esogena. Il risultato di questa trasformazione è la scissione del grasso nei suoi componenti, rappresentati da glicerolo, mono e digliceridi e, infine, acidi grassi liberi (Figura 3.1).

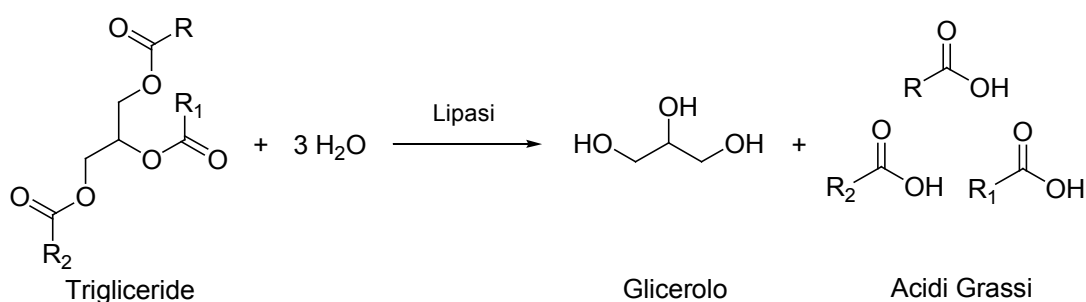


Figura 3.1 Reazione di idrolisi di un trigliceride (Cappelli *et al.*, Chimica degli Alimenti, Zanichelli, Bologna, 2000)

Il glicerolo subisce successivamente una disidratazione dalla quale si ottiene l'acroleina, una sostanza volatile, di odore pungente, particolarmente irritante per il fegato e le mucose gastriche, mentre gli acidi grassi possono dare reazioni di termossidazione con formazione di perossidi, chetoni e aldeidi. Entrambi i prodotti hanno

sull'alimento un effetto negativo, in quanto ne intensificano il colore, ma ne aumentano anche la viscosità e la tendenza a formare schiume, abbassandone il punto di fumo; inoltre ne peggiorano le caratteristiche sensoriali e nutrizionali.

L'incidimento si verifica in particolare negli alimenti ricchi d'acqua (grassi animali) e nei frutti oleosi (es. le olive). In generale è un processo negativo perché predispone maggiormente gli alimenti all'irrancidimento ossidativo, inoltre porta anche allo sviluppo di sapori e odori sgradevoli quando si liberano acidi grassi a basso peso molecolare (acido butirrico, acido capronico e acido caprinico). L'idrolisi non si può bloccare con l'aggiunta di antiossidanti, ma si può evitare mantenendo l'alimento in buone condizioni igieniche, al riparo dalla luce ed adottando misure preventive nei confronti di proliferazioni batteriche.

3.1.2 Irrancidimento chetonico

L'irrancidimento chetonico è un processo di natura enzimatica portato avanti da batteri, lieviti e muffe (come *Penicillium glaucum* e *Aspergillus niger*) a carico di acidi grassi a basso peso molecolare. Questo tipo di alterazione avviene successivamente ad una precedente idrolisi e comporta la beta-ossidazione di un acido grasso, con formazione di un β -chetoacido che, per decarbossilazione, si trasforma in un dialchilchetone (Figura 3.2).

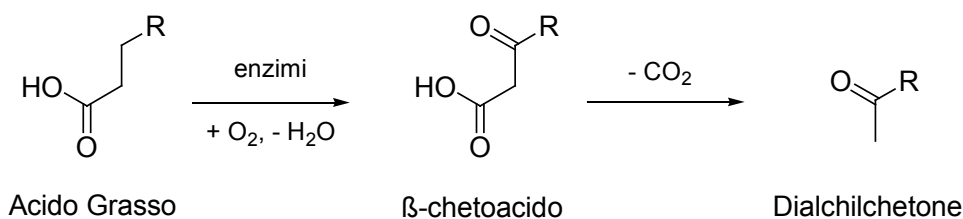


Figura 3.2 Reazione di un acido grasso già idrolizzato (Cappelli *et al.*, Chimica degli Alimenti, Zanichelli, Bologna, 2000)

In genere si tratta di un'alterazione microbica, a carico di frutti e semi oleaginosi provvisti di un certo grado di umidità, che porta alla formazione di odori e sapori sgradevoli. Può essere evitata con l'aggiunta di antimicrobici e un'accurata igiene.

L'irrancidimento chetonico è invece, in alcuni casi limitati, un processo desiderato. In questo caso l'esempio classico è rappresentato dai formaggi erborinati (Gorgonzola, Roquefort, Brie, Camembert, ecc.), in questi formaggi si favorisce lo sviluppo di muffe dei generi *Penicillium* o *Aspergillus* che producono enzimi capaci di decarbossilare gli acidi grassi in metilchetoni (2-pentanone, 2-eptanone e 2-nonanone) responsabili del caratteristico aroma.

3.1.3 Irrancidimento ossidativo

L'irrancidimento ossidativo è invece considerata l'alterazione più grave e più frequente a carico dei grassi alimentari. Sono colpiti, oltre ai grassi veri e propri, anche i fosfolipidi e alcuni composti organici formati da catene idrocarburiche (es. i caroteni). E' determinata principalmente dall'assorbimento di ossigeno da parte degli acidi grassi insaturi sia liberi che esterificati. Il processo è fondamentalmente di natura chimica e si svolge in tre fasi: una fase di iniziazione (o induzione), in cui si sviluppano radicali, una fase centrale di propagazione, che si sviluppa a catena, e una fase di terminazione, in cui i radicali si stabilizzano portando alla formazione di prodotti finali diversi: primari (idroperossidi dei lipidi insaturi) e secondari (aldeidi, chetoni, polimeri, idrocarburi, alcoli, acidi, ed esteri), molti dei quali sono volatili e conferiscono all'alimento il caratteristico odore di rancido dei grassi ossidati (Figura 3.3).

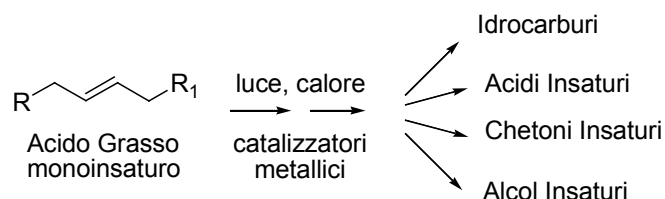


Figura 3.3 Schema di reazione dell'irrancidimento ossidativo a carico di un acido grasso monoinsaturo (Cappelli *et al.*, Chimica degli Alimenti, Zanichelli, Bologna, 2000)

L'alterazione è favorita, nelle fasi iniziali, dal concorso di alcuni fattori ambientali, fra cui l'esposizione alla luce, alle temperature alte, la presenza di perossidi, il contatto o la presenza di alcuni metalli (fra cui Fe, Cu, Co, Ni, Mn), la presenza dell'enzima lipossidasi. Un ruolo fondamentale è svolto dalla presenza, nell'alimento, di composti che rallentano

la fase di iniziazione (antiossidanti, come i tocoferoli) o la favoriscono (pro-ossidanti, come la mioglobina, l'emoglobina e la clorofilla). La predisposizione è comunque il risultato di un complesso insieme di fattori che possono proteggere gli alimenti o esporli maggiormente a questa alterazione.

Per bloccare questo tipo di alterazione è necessario evitare l'esposizione dell'alimento all'aria, all'umidità, al calore e al contatto con i metalli.

Anche il colesterolo, come gli acidi grassi insaturi, è in grado di auto-ossidarsi per produrre idroperossidi (composti primari) ed altri composti secondari detti Cholesterol oxidation products, (COPs), che si possono formare in alimenti disidratati a base di latte, uova e carne.

3.2 Glucidi

I processi a carico dei glucidi, come l'amido e la cellulosa, sono i più frequenti e rappresentano spesso le più importanti trasformazioni. Quelle di maggiore interesse sono operate a fini energetici da batteri, muffe e lieviti. Sono di due differenti tipi, le fermentazioni e, meno frequentemente, la respirazione totale. In entrambi i casi vengono usati i componenti fermentescibili, rappresentati in genere da zuccheri semplici (glucosio, fruttosio, ecc.), disaccaridi (saccarosio, maltosio, ecc.) e amido. Disaccaridi e amido subiscono prima l'idrolisi enzimatica, che porta alla formazione degli zuccheri semplici. Sia le fermentazioni sia la respirazione seguono inizialmente la via metabolica della glicolisi, o via di Embden-Meyerhof-Parnas, per poi differenziarsi nella fase finale, che è ossidativa nella respirazione e riduttiva nelle fermentazioni.

La respirazione è un processo desiderato quando deve condurre ad una moltiplicazione dei microrganismi (fermenti). Si verifica, ad esempio, durante la prima fase della vinificazione (fermentazione tumultuosa). La respirazione è inoltre il processo alla base della lievitazione nella panificazione: i lieviti si moltiplicano producendo sacche di anidride carbonica che restano imbrigliate nell'impasto provocandone il caratteristico rigonfiamento della lievitazione.

In generale, però, la respirazione è un processo negativo in quanto riduce le proprietà nutritive ed organolettiche dell'alimento (es. riduzione del tenore zuccherino nella frutta) o le proprietà tecnologiche del prodotto agricolo (es. riduzione della resa in

zucchero delle barbabietole). In generale è di natura endogena in quanto è un ordinario processo metabolico che si verifica all'interno delle cellule. È favorita dalle alte temperature ambientali e dall'aerazione, perciò si può rallentare con la refrigerazione ed operando in atmosfera controllata o modificata.

Le fermentazioni, che si svolgono in condizioni di anaerobiosi differiscono per la maggior parte nei passaggi finali, che determinano una o più trasformazioni riduttive a carico dell'acido piruvico.

Le fermentazioni si dividono in:

- ✓ omofermentative, se portano alla formazione di un unico prodotto;
- ✓ eterofermentative, se portano alla formazione di due o più prodotti.

Le più importanti fermentazioni sfruttate nell'industria agroalimentare sono le seguenti:

3.2.1 Fermentazione alcolica (omofermentativa)

La fermentazione alcolica (Figura 3.4) viene ritenuta la trasformazione più importante a carico dei glucidi; essa è utilizzata per la produzione del vino, della birra e del pane, e avviene ad opera di lieviti di tipo *Saccharomyces* (saccaromiceti),

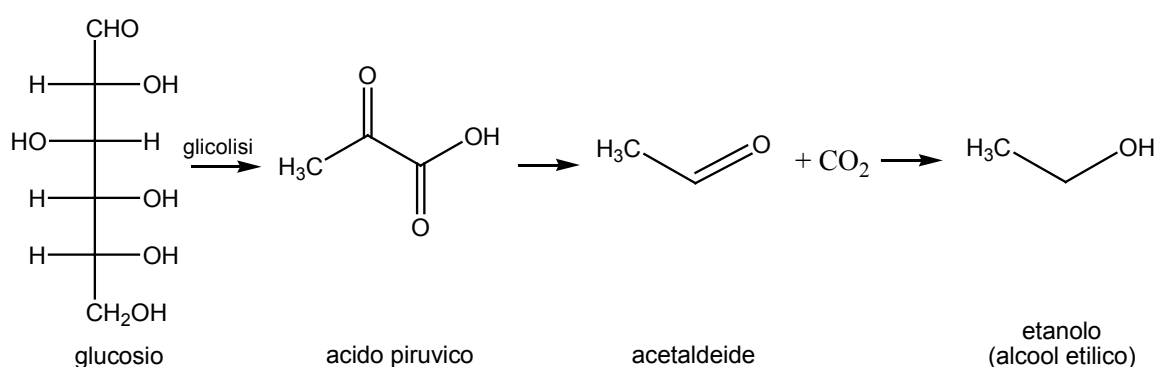


Figura 3.4 Schema del processo fermentativo alcolico a carico del glucosio durante il processo della glicolisi (Lehninger, Principi di Biochimica, Zanichelli, Bologna, 2002)

Decorre con numerose tappe secondo lo schema di Embden-Mayerhof e Parnas (glicolisi) a cui segue la decarbossilazione dell'acido piruvico in acetaldeide e la

riossidazione del NADH (che può rientrare in circolo come NAD^+) con formazione di etanolo. Attuata per lo più da lieviti, è alla base della produzione di tutte le bevande alcoliche, mentre è un processo secondario in alcuni altri processi di trasformazione. Ad esempio il kefir (latte fermentato) si ottiene con una fermentazione mista, lattico-alcolica.

3.2.2 Fermentazione omolattica (omofermentativa):

Nella fermentazione omolattica (Figura 3.5) l'acido piruvico è ridotto ad acido lattico.

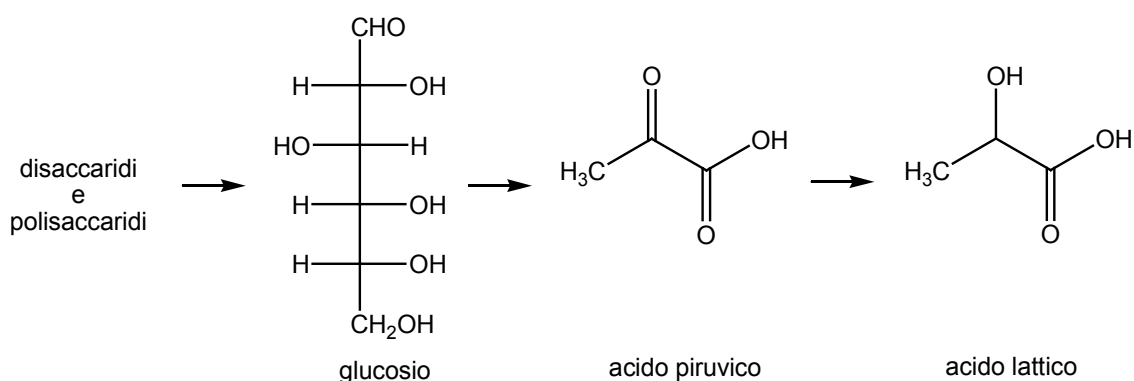


Figura 3.5 Schema della fermentazione lattica (Cappelli *et al.*, Chimica degli Alimenti, Zanichelli, Bologna, 2000)

È svolta da batteri, chiamati genericamente fermenti lattici, appartenenti per lo più ai generi *Streptococcus* e *Lactobacillus*. La fermentazione omolattica è il processo fondamentale nella produzione dello yogurt e del latte fermentato, nella formazione della cagliata per i formaggi che si ottengono per coagulazione acida e, più in generale, come processo complementare nella maturazione della cagliata dei formaggi. In queste trasformazioni la fermentazione si svolge a spese del lattosio presente nel latte. La fermentazione omolattica è tuttavia un processo complementare frequente nella maturazione di diversi prodotti agricoli conservati per acidificazione biologica combinata con altre tecniche di conservazione. Prodotti ottenuti con processi che coinvolgono la fermentazione lattica sono, ad esempio, i crauti, le olive in salamoia, i salumi.

3.2.3 Fermentazione etero lattica (eterofermentativa):

La fermentazione etero lattica è attuata da alcuni fermenti lattici, di cui i più importanti fanno capo al genere *Leuconostoc*, è basata sulla riduzione dell'acido piruvico ad acido lattico, accompagnata da riduzioni e ossidazioni collaterali che portano alla formazione di prodotti secondari (etanolo, CO₂, ecc.).

A differenza della fermentazione omolattica, la fermentazione eterolattica sfrutta un processo di degradazione del glucosio diverso dalla glicolisi. Questa via, nota come shunt degli esosi monofosfati, consiste nella ossidazione del glucosio-6-fosfato a 6-fosfogluconato (con riduzione di una molecola di NAD); il 6-fosfogluconato viene successivamente decarbossilato producendo uno zucchero a cinque atomi di carbonio. Questo zucchero viene a sua volta trasformato in gliceraldeide-3-fosfato ed acetil-fosfato. La gliceraldeide viene avviata ad acido lattico con le stesse reazioni della seconda parte della glicolisi mentre l'acetil-fosfato viene convertito in etanolo.

Le trasformazioni a carico dell'amido decorrono tramite processi di idrolisi enzimatica attuati da amilasi endogene, con formazione di disaccaridi (maltosio) e monosaccaridi (glucosio). L'idrolisi enzimatica dell'amido è un processo che si svolge spontaneamente nel corso della maturazione della frutta, generalmente sulla pianta e, nelle fasi finali, durante la conservazione dei frutti a maturazione climaterica (banane, kaki, mele, pesche, ecc.). È inoltre un processo attivato artificialmente da fasi preliminari per ottenere substrati fermentescibili da prodotti amilacei (cereali, patate) per la produzione di bevande alcoliche (birra, sakè, whisky, ecc.).

Le fermentazioni non sono le uniche forme di alterazione dell'alimento a carico dei glucidi. Anche durante la cottura dell'alimento si possono avere delle alterazioni, diverse a seconda del tipo di carboidrato. Tra gli zuccheri, i monosaccaridi tendono a sciogliersi nell'acqua di cottura mentre i disaccaridi subiscono reazioni di caramellizzazione o termodegradazione, dando luogo ad imbrunimenti e liberando sostanze volatili che modificano l'aroma. Gli zuccheri più complessi come amido, cellulosa e pectine tendono generalmente a idrolizzare e ad ammorbidirsi, aumentando così la digeribilità dell'alimento.

3.2.4 Alterazione dei prodotti del metabolismo glucidico.

Anche gli alcoli, i composti carbonilici e gli acidi organici presenti in un prodotto agroalimentare sono soggetti a trasformazioni fermentative che conducono a composti che solitamente influenzano le proprietà organolettiche dell'alimento. La natura di questi processi fermentativi, gli organismi coinvolti e il ruolo svolto nella trasformazione variano secondo i casi, ma si tratta di processi collaterali o consecutivi che rientrano nella generalità dei fenomeni connessi alla maturazione e alla stagionatura del prodotto. Fra i vari processi fermentativi si citano i seguenti:

Fermentazione glicerica. Attuata da alcune categorie di lieviti, si tratta di una deviazione della glicolisi che, a partire da un suo prodotto intermedio, il diidrossiacetone fosfato, porta alla formazione del glicerolo. La fermentazione glicerica è un processo collaterale alla fermentazione alcolica e contribuisce alla formazione del gusto, in quanto la glicerina, per il suo sapore dolciastro, conferisce morbidezza al vino. Se supera una certa soglia, è un processo dannoso, in quanto altera le proprietà sensoriali tipiche del vino.

Fermentazione propionica. Attuata da batteri del genere *Propionibacterium*, è una fermentazione secondaria che, a partire dall'acido lattico, sviluppa acido propionico, acido acetico e anidride carbonica. È un processo di maturazione fondamentale nella produzione dei formaggi con occhiatura (Emmentaler, Asiago, Gruviera, Edam, Gouda, ecc.).

Fermentazione butirrica. Attuata da batteri, prevalentemente del genere *Clostridium*, è una fermentazione secondaria che, a partire dall'acido lattico, sviluppa acido butirrico, acetico, H₂ e CO₂. In generale è un processo dannoso nella caseificazione in quanto responsabile di un'alterazione, il gonfiore tardivo, a carico dei formaggi stagionati (es. Grana).

Fermentazione malolattica. Attuata da fermenti lattici, è un processo secondario della vinificazione che, a partire dall'acido malico, sviluppa acido lattico. Questo processo

è fondamentale per alcuni vini rossi al fine di ridurre la percezione dell'acidità fissa e dare più morbidezza e corpo al vino. È invece un processo dannoso per la maggior parte dei vini bianchi, che fondano le loro proprietà organolettiche sull'acidità fissa.

Fermentazione acetica. Attuata da batteri del genere *Acetobacter*, è una fermentazione ossidativa che converte l'etanolo in acido acetico. Il processo è fondamentale per la produzione dell'aceto, mentre in generale è dannoso in quanto costituisce un'alterazione dell'alimento. Fra gli alimenti soggetti alla fermentazione acetica rientrano il vino, la frutta, il miele.

Fermentazioni aromatiche. Attuate da fermenti eterolattici, sono processi secondari che, a partire dall'acido lattico o dall'acido piruvico, portano allo sviluppo di composti carbonilici, in particolare acetaldeide e diacetile. Questi processi sono in particolare fondamentali per il conferimento dell'aroma al burro.

3.3 Proteine e amminoacidi

Le alterazioni che riguardano le proteine e gli amminoacidi possono avvenire in seguito a processi di trasformazione dovuti ad agenti fisici come somministrazione (o sottrazione) di calore, ad esempio durante la cottura dei cibi, oppure all'azione degradativa di enzimi e microrganismi, come nella maturazione dei formaggi, insaccati e alimenti stagionati. Molti di questi fenomeni agiscono sull'alimento dal punto di vista nutritivo e sensoriale, conferendogli specifiche proprietà organolettiche (es: un buon aroma) e una buona digeribilità.

Tra i processi desiderati si distinguono:

- ✓ la denaturazione proteica;
- ✓ la modificazione delle catene laterali degli amminoacidi;
- ✓ l'interazione delle proteine con i glucidi (Maillard).

Le azioni degradative di enzimi e microrganismi sono:

- ✓ l'idrolisi proteica;
- ✓ la demolizione enzimatica degli amminoacidi (putrefazione).

3.3.1 Denaturazione proteica

La denaturazione consiste nella perdita della struttura quaternaria, terziaria o secondaria delle proteine senza che si abbia la rottura della catena polipeptidica (struttura primaria). Tali trasformazioni sono generalmente irreversibili, e le proteine possono subire diversi gradi di denaturazione, a causa del disordine che si viene a creare. I fenomeni di denaturazione sono per lo più di natura fisico-chimica, anche se possono essere indotti da un processo microbico (ad esempio la coagulazione della caseina a seguito dell'abbassamento del pH causato dalla fermentazione lattica). Gli agenti diretti della denaturazione sono tuttavia fattori fisici, fisico-chimici o chimici. Fra i più importanti si citano le alte temperature (in generale superiori ai 60-65°C, scottatura, cottura, pastorizzazione, sterilizzazione), il freddo (congelazione), la modifica dell'attività dell'acqua o della concentrazione ionica del mezzo, il pH, le sollecitazioni meccaniche (durante i processi di impastamento, laminazione, sbattitura per creare le schiume nelle emulsioni), alcune tecniche per trattare gli alimenti prima della conservazione (essiccamento spinto, uso di ultrasuoni o radiazioni ionizzanti) o addirittura una conservazione che si protrae troppo a lungo.

Gli effetti principali della denaturazione consistono nella perdita di solubilità, data la presenza di componenti idrofobe, con conseguente aggregazione e precipitazione (coagulazione), e nella perdita di specifiche proprietà biologiche e chimico-fisiche. Sotto l'aspetto nutrizionale uno degli effetti più rilevanti della denaturazione è l'aumento di sensibilità all'azione degli enzimi proteolitici, con conseguente aumento della digeribilità delle proteine.

La denaturazione proteica di un alimento ne altera anche le proprietà sensoriali. Un esempio è dato dalla rottura dei ponti disolfuro durante la bollitura del latte.

3.3.2 Reazione di Maillard

È una reazione di particolare interesse per tutti quegli alimenti che contengono allo stesso tempo zuccheri e proteine. La reazione di Maillard (Figura 3.6), detta anche 'caramellizzazione', è favorita dal calore, dalla presenza della luce e dei metalli.

Il meccanismo di reazione si suddivide in tre fasi:

I^a fase - *condensazione*: il gruppo carbonilico dello zucchero reagisce con il gruppo amminico della proteina per formare una base di Schiff;

II^a fase - *trasposizione di Amadori*: la base di Schiff si riarrangia per formare un prodotto di Amadori, ossia un aminochetoso;

III^a fase - *scissione*: serie di reazioni nelle quali il prodotto di Amadori si scinde in derivati carbonilici e policarbonilici (es. HMF):

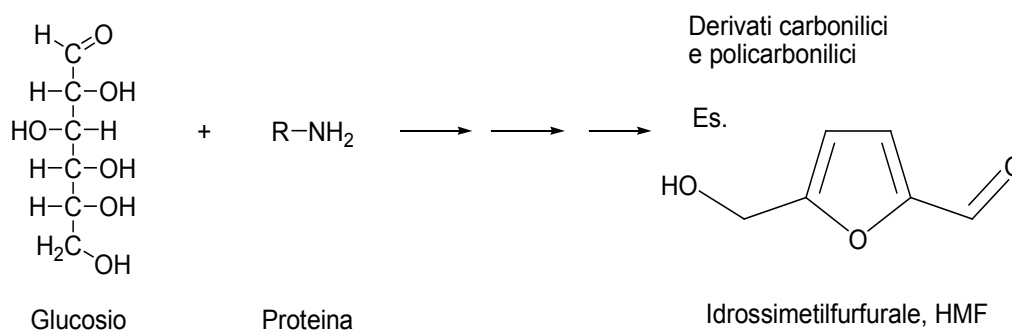


Figura 3.6 Reazione di Maillard

L'idrossimetilfurfurale che si viene a formare è uno dei prodotti principali degli imbrunimenti degli alimenti. Con la sua azione distruttiva nei confronti di alcuni amminoacidi, porta effetti antinutrizionali come una ridotta digeribilità e disponibilità di amminoacidi essenziali.

Nel complesso queste trasformazioni influenzano notevolmente le proprietà nutritive e sensoriali dell'alimento. Le più importanti conseguenze sono le seguenti:

- ✓ aumento delle proprietà aromatiche, che possono essere gradevoli o sgradevoli, dovute soprattutto ai composti carbonilici e allo sviluppo di una certa quantità di ammoniaca;
- ✓ imbrunimento dell'alimento, causato dalle melanoidine;
- ✓ riduzione della digeribilità delle proteine a causa della stabilità dei legami delle melanoidine.

Le reazioni di Maillard sono indotte in particolare dalle alte temperature sviluppate con la cottura (frittura, bollitura), in relazione alla durata di esposizione, oppure da cattive condizioni di conservazione di alcuni alimenti, per esposizione alla luce e a temperature alte. La produzione dell'idrossimetilfurfurale è in taluni alimenti un indice analitico del grado di qualità di un prodotto: alti tassi di HMF, infatti, denunciano un invecchiamento dell'alimento, accentuato anche da cattive condizioni di conservazione, oppure indicano che l'alimento è stato sottoposto a trattamenti termici (sterilizzazione, pastorizzazione, ecc.).

In generale le reazioni di Maillard sono un fenomeno negativo che provoca un decadimento qualitativo del prodotto (imbrunimento, aromi più o meno sgradevoli, sapore di cotto). Fra gli alimenti deprezzati dalle reazioni di Maillard si citano ad esempio il latte, sottoposto a cottura o a sterilizzazione, e il miele invecchiato, sottoposto a pastorizzazione o conservato in condizioni inidonee (esempio: alta temperatura). Vi sono tuttavia casi in cui le reazioni di Maillard sono un processo desiderato perché migliorano le proprietà sensoriali o tecnologiche del prodotto, come ad esempio nel caso del caffè e del malto torrefatti, oltre che di alimenti come il pane tostato, la birra, il cacao, i prodotti da forno e i cereali per la prima colazione.

3.3.3 Proteolisi e putrefazione

La proteolisi e la putrefazione sono due processi fra loro strettamente correlati in quanto il primo è il preludio al secondo. La proteolisi consiste nella rottura della struttura primaria delle proteine e, quindi, nello sviluppo di catene polipeptidiche più piccole e di amminoacidi liberi. In generale la proteolisi porta ad un aumento della digeribilità delle proteine ma anche ad una potenziale riduzione del loro valore nutritivo. La putrefazione propriamente detta consiste invece nella distruzione degli amminoacidi, con conseguente sviluppo di composti maleodoranti e dotati di soglia olfattiva estremamente bassa, derivati dal metabolismo dell'azoto (ammoniaca, ammine, cadaverina, putrescina, ecc.) e dello zolfo (idrogeno solforato, mercaptani). I primi sono responsabili di odori che ricordano, ad esempio, il pesce marcio, i secondi degli odori che ricordano le uova marce.

La proteolisi è un processo utile e desiderato se procede in modo controllato e non particolarmente spinto. Una moderata proteolisi modifica infatti lo stato strutturale dell'alimento migliorandone le proprietà sensoriali e, entro una certa misura, la digeribilità. Una blanda alterazione degli amminoacidi, riconducibile ad un principio di putrefazione, è inoltre positiva in quanto può migliorare le proprietà aromatiche e la serbevolezza dell'alimento. Queste azioni si verificano, in particolare, nei trattamenti di maturazione delle carni macellate fresche e dei formaggi.

Subito dopo la macellazione la carne ha caratteristiche di scarsa commestibilità, a causa del rigor mortis e dello stato strutturale delle proteine muscolari, che migliorano con la frollatura. La frollatura si svolge mediante il mantenimento dei quarti a 0-4 °C e ad un'umidità relativa del 75% per un periodo di 10-14 giorni dopo la macellazione. La frollatura è una proteolisi attuata da enzimi di origine microbica e tissutale e permette alla carne di acquisire un maggior grado di tenerezza e succosità, una perdita di colore. Lo sviluppo moderato di sostanze aromatiche (chetoni, aldeidi, ammoniaca, ammine, idrogeno solforato, ecc.) conferiscono alla carne una maggiore serbevolezza. Un'elevata carica microbica iniziale, un prolungamento della frollatura e un'alterazione delle condizioni ambientali rendono tali processi di tipo degenerativo e causano il deperimento della carne per putrefazione.

Nei formaggi la proteolisi rappresenta il processo più importante - ed anche più complesso - nella loro fase di maturazione: la trasformazione delle proteine è infatti fondamentale per lo sviluppo dei composti intermedi del metabolismo dell'azoto e dello zolfo (ammoniaca e ammine, composti solforati), dei composti ossigenati volatili (composti carbonilici, acidi), per la modifica della consistenza e della tessitura dovuta alla rottura del reticolo caseinico, per migliorare la capacità di ritenzione dell'acqua, per dare sapidità in seguito al rilascio dell'acido glutammico, ecc. L'intensità e il ruolo di queste trasformazioni e il loro rapporto con l'altro processo fondamentale, la lipolisi, cambiano secondo i contesti e concorrono alla differenziazione delle varie tipologie di formaggi.

La putrefazione è un'alterazione indesiderata nella quale prendono parte diverse reazioni, come processi anaerobi, proteolisi e successive degradazioni degli amminoacidi dovute per lo più all'azione di enzimi microbici. I prodotti di tali reazioni possono essere di diversi tipi, a seconda degli amminoacidi che la subiscono:

- ✓ *cataboliti solforati*: degradazione della cisteina (liberazione di solfuro di idrogeno) e della metionina (formazione di metilmercaptano),
- ✓ *prodotti di degradazione del triptofano*: formazione dell'indolo la cui metilazione porta allo scatolo, o della serotonina,
- ✓ *composti azotati*: deaminazione degli amminoacidi (formazione di ammoniaca), decarbossilazione degli amminoacidi (formazione di ammine biogene), che spesso conferiscono all'alimento un odore fetido (conferito da diammine alifatiche quali cadaverina, putrescina, ecc.).

3.3.4 Modifica delle catene laterali degli amminoacidi

L'azione del calore può causare alterazioni chimiche delle catene laterali degli amminoacidi, distruggendole. Tali modifiche corrispondono a:

- ✓ desulfidrilazione degli amminoacidi cisteina e cistina;
- ✓ deaminazione della glutammina e dell'asparagina;
- ✓ disidratazione della serina;
- ✓ formazione di derivati ciclici dotati di potere mutageno;
- ✓ ossidazione dei gruppi R.

Anche in questo caso, come nel caso della denaturazione proteica, la rottura dei ponti disolfuro conferisce all'alimento l'odore caratteristico di latte bollito.

Per evitare le suddette alterazioni alimentari sono sufficienti i comuni trattamenti e controlli che vengono effettuati sugli alimenti; inoltre le stesse non hanno ripercussioni rilevanti sul piano nutrizionale.

3.4 Alterazioni e difetti dei formaggi

3.4.1 Il gonfiore precoce

Produrre un formaggio perfetto in quanto privo di difetti non è cosa facile, soprattutto se la trasformazione avviene a partire da latte crudo e in ambienti di trasformazione organizzati in maniera “artigianale”. In tali circostanze gli operatori devono adottare una serie di accorgimenti e precauzioni, che consentano di contenere l’insorgenza dei difetti e quindi il decadimento igienico, qualitativo e merceologico della produzione ad essi correlato. I difetti dei formaggi possono essere suddivisi in due grandi gruppi, quelli che insorgono a causa delle inadeguate condizioni di trasformazione (elevata contaminazione microbica del latte, scarsa igiene delle attrezzature e degli ambienti di trasformazione etc.) e quelli che si manifestano per effetto delle inidonee condizioni di salatura e stagionatura (errata gestione della salamoia, inadeguate condizioni di stagionatura, scarsa manutenzione dei formaggi etc.) Spesso i difetti appartenenti ad entrambe le categorie si riscontrano contemporaneamente sullo stesso prodotto. In tali condizioni il decadimento qualitativo del formaggio è molto rapido.

Il cosiddetto “gonfiore precoce” fa parte del primo gruppo. Esso si manifesta in genere dopo 24 ore dalla produzione e, in taluni casi, anche durante le prime ore dalla fabbricazione (da qui la definizione di “gonfiore precoce”). In queste circostanze le forme interessate dal “gonfiore” si presentano deformate con il piatto superiore rigonfio. Tale deformazione è dovuta alla pressione esercitata, all’interno della pasta del formaggio, dal gas (principalmente anidride carbonica) prodotto dall’attività fermentativa di alcuni microrganismi. In tal caso, osservando l’interno del formaggio, sono facilmente riscontrabili nella pasta “occhiature”, talvolta molto diffuse e di piccole dimensioni, spesso accompagnate da odori inusuali, talvolta sgradevoli, dovuti alle sostanze volatili liberate nel corso dell’anomala fermentazione. Questo difetto è provocato molto frequentemente dai batteri coliformi e - in minor misura - anche da lieviti. Sia i coliformi che i lieviti hanno la caratteristica comune di fermentare il lattosio, producendo quantità rilevanti di anidride carbonica.

Il “gonfiore precoce” è il difetto che preoccupa maggiormente gli addetti alla trasformazione del latte, in quanto frequentemente è causato dallo scarso livello igienico nelle operazioni di trasformazione, e quindi è in capo, in un certo senso, a chi in prima persona esegue la fabbricazione. I coliformi hanno una grandissima diffusione in natura, la loro presenza nel latte crudo è praticamente inevitabile, essendo esposto alla contaminazione durante tutte le fasi critiche, dalla mungitura sino alla trasformazione. Per limitarne la presenza e la loro rapida proliferazione è estremamente importante avere molta cura nell’igiene generale (mammella, attrezzature, ambienti etc.) e, qualora il latte non venga immediatamente trasformato dopo la mungitura, deve essere rapidamente refrigerato a temperature inferiori ai 4°C, in modo da limitarne la proliferazione. Fortunatamente i batteri coliformi sono molto sensibili ai trattamenti termici e possono essere facilmente eliminati attraverso il riscaldamento del latte, anche a temperature di modesta entità (60-63°C). Quando il formaggio è fabbricato a partire da latte crudo, il rischio che si manifesti il gonfiore precoce è chiaramente molto più elevato, soprattutto qualora nel latte non vi sia un’adeguata presenza di batteri lattici acidificanti. Soprattutto nelle prime ore della caseificazione l’attività acidificante dei batteri lattici ostacola notevolmente lo sviluppo dei coliformi, sia attraverso la competizione per i nutrienti che per l’inibizione dovuta al repentino abbassamento del pH nella pasta del formaggio.

Se non si dispone di idonei sistemi di refrigerazione del latte e si sceglie di trasformarlo crudo, è importante che ciò avvenga entro le prime ore dalla mungitura. Inoltre, al fine di salvaguardare la qualità del formaggio e scongiurare l’insorgenza del gonfiore precoce, è opportuno arricchire sempre la microflora lattica naturale del latte in lavorazione, anche quando esso è trasformato crudo, mediante l’aggiunta in lavorazione di una buona coltura lattica naturale.

3.4.2 Il gonfiore al decimo giorno

Un altro difetto abbastanza frequente, dovuto anch’esso all’attività fermentativa “anomala” di alcune specie batteriche, è il “gonfiore al decimo giorno”. Questa definizione deriva dal fatto che tale difetto si manifesta nei formaggi generalmente dopo 10 - 15 giorni dalla fabbricazione, attraverso il rigonfiamento dei piatti delle forme in

stagionatura. La pasta di questi formaggi è caratterizzata dalla presenza di occhiature e/o sfoglie più o meno accentuate, che nei casi più gravi, appaiono come vere e proprie spaccature. L'insorgenza di questo difetto è dovuta alla presenza nel latte e nel formaggio di un particolare gruppo di batteri lattici, i lattobacilli eterofermentanti (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus brevis*, etc). Queste specie, a differenza di quelle utili alla caseificazione (tipiche delle colture lattiche), che fermentano prevalentemente il lattosio in acido lattico, sono in grado di fermentare il lattosio e i citrati (per questo conosciuti anche come lattobacilli citratofermentanti) e produrre diverse sostanze, fra le quali l'anidride carbonica. È proprio la pressione esercitata dal progressivo accumulo di questo gas nella pasta del formaggio, a determinare la formazione delle occhiature e delle sfoglie. Fortunatamente, questo genere di "gonfiore", non comporta un elevato decadimento qualitativo e merceologico del formaggio, poiché al difetto di struttura non è associata la produzione di sostanze che ne alterano eccessivamente l'aroma e l'odore.

I batteri che causano il "gonfiore del decimo giorno" in talune circostanze sono presenti nel latte crudo, talora anche in quantità rilevanti, soprattutto quando gli animali in produzione sono alimentati con foraggi insilati e/o sostano per lunghi periodi sulle lettiere umide e poco rinnovate. In entrambi i substrati, questi microrganismi raggiungono elevate concentrazioni e passano al latte attraverso l'insudiciamento della mammella. Un'altra fonte di contaminazione, certamente non secondaria, può essere rappresentata dal caglio in pasta, dove i batteri eterofermentanti giungono direttamente dagli abomasi freschi utilizzati per prepararlo. Generalmente, le condizioni di produzione e conservazione del caglio in pasta permettono di ridurre, sino ad eliminarla completamente, la microflora anticasearia in esso contenuta.

La termizzazione del latte è sicuramente assai efficace rispetto alla quasi totale riduzione dei batteri eterofermentanti, ma in molti casi non è compatibile con la tecnologia di fabbricazione che s'intende applicare. In tali circostanze bisogna intervenire alla fonte, limitando l'uso dei foraggi insilati, mantenendo pulite e asciutte le lettiere di stabulazione degli animali e soprattutto curando l'igiene della mammella nella fase di mungitura. Per quanto riguarda il caglio in pasta, è fondamentale che sia preparato nel rispetto di procedure ben definite (Pettinau *et al.*, 1977) e conservato a basse temperature (2-4°C), per non meno di 4 - 5 mesi prima dell'utilizzo in lavorazione. Infine,

l'impiego di una buona coltura lattica, anche quando il latte è trasformato crudo, può rappresentare una soluzione al problema.

3.4.3 Il gonfiore tardivo

In genere questo difetto si manifesta nel formaggio in stagionatura dopo qualche settimana o mese dalla fabbricazione e si riscontra prevalentemente nella categoria dei formaggi a pasta dura. Le forme interessate dal difetto presentano un rigonfiamento più o meno accentuato dei "piatti", nonché la formazione di occhiature e/o spaccature più o meno grandi, tendenzialmente riunite al centro della pasta. Il difetto è causato dall'attività fermentativa di due gruppi microbici: i clostridi (batteri anaerobici e sporigeni) e i propionici (batteri anaerobici). Entrambi i gruppi batterici sono accomunati dalla capacità di metabolizzare l'acido lattico presente nel formaggio in stagionatura e produrre rilevanti quantità di gas (i clostridi producono anidride carbonica e idrogeno, mentre i propionici, solo anidride carbonica). Alla produzione di gas è associata anche la formazione di altre sostanze (principalmente acido acetico, acido butirrico, acido propionico) responsabili dell'alterazione delle proprietà sensoriali del formaggio. Quando il difetto è di modesta entità, il formaggio può essere in parte recuperato, destinandolo ad esempio alla preparazione di formaggi fusi, ma se al gonfiore è anche associata una certa attività proteolitica e lipolitica, tipica di talune specie di clostridi, definite "putrefacenti", il formaggio può subire modificazioni tali, da non permettere alcuna forma di recupero, anche parziale del prodotto. In genere, i batteri propionici, rispetto ai clostridi, esplicano un'attività fermentativa meno devastante. Infatti, i formaggi interessati dalla sola fermentazione propionica, sono facilmente recuperabili e addirittura, in alcuni casi, quando la fermentazione non è molto intensa, le sostanze prodotte possono arricchire il sapore e l'aroma del formaggio. Il "gonfiore tardivo" insorge quando, nel latte crudo, la contaminazione da batteri clostridi e/o propionici supera un certo livello. Nel caso dei clostridi tale limite è relativamente basso, giacché sono sufficienti 50 spore/litro per avere complicazioni nella fase di stagionatura del formaggio. La contaminazione del latte da parte di entrambi questi gruppi microbici è prevalentemente fecale e ha luogo quando le condizioni igieniche degli animali in

mungitura sono precarie. Il rischio di contaminazione aumenta in maniera rilevante quando gli animali sono alimentati con insilati (foraggi fermentati), dove clostridi e propionici possono raggiungere elevate concentrazioni (sino a 1.000.000 per grammo). Un'altra fonte di contaminazione del latte può essere rappresentata dal caglio in pasta, prodotto a partire dagli abomasi degli animali lattanti. Gli abomasi, infatti, se non adeguatamente stagionati possono contenere elevate concentrazioni di specie batteriche potenzialmente "anticasearie". Generalmente, se la preparazione del caglio in pasta avviene nel rispetto di precise procedure di salatura, essiccazione e conservazione, la microflora "anticasearia" viene in gran parte eliminata. I comuni sistemi di trattamento termico del latte non risolvono il problema del "gonfiore tardivo", infatti entrambi i gruppi microbici possiedono un'elevata termoresistenza anche alle normali condizioni di pastorizzazione. In tali condizioni è necessario agire direttamente in modo da ridurre il rischio di contaminazione del latte, e nel contempo, intervenire sul processo di trasformazione per limitare la possibilità di sviluppo delle cellule eventualmente presenti nel formaggio in stagionatura. Alcuni accorgimenti sono:

- ✓ ridurre o – meglio - eliminare l'uso di foraggi insilati dall'alimentazione degli animali in lattazione e, ove ciò non fosse possibile, essere certi della loro elevata qualità batteriologica;
- ✓ curare le condizioni igieniche generali dell'allevamento, in particolare nella fase di mungitura;
- ✓ utilizzare caglio in pasta prodotto mediante l'applicazione di specifiche procedure, capaci di determinare la naturale riduzione della microflora "anticasearia" in esso contenuta e, per quanto possibile, utilizzarlo previo controllo microbiologico;
- ✓ favorire la perfetta coagulazione del latte e lo spurgo del siero dalla cagliata;
- ✓ arricchire la microflora lattica del latte in lavorazione attraverso l'utilizzo di una coltura starter, al fine di favorire la regolare acidificazione della pasta del formaggio sino al raggiungimento del pH finale. L'attività dei clostridi e dei propionici è assai limitata a bassi valori di pH (4.90 – 5.00);
- ✓ verificare che il latte in lavorazione sia esente da antibiotici e/o sostanze inibenti che possono ostacolare l'attività acidificante della microflora lattica;

- ✓ controllare le condizioni di salatura in modo da favorire la regolare ed uniforme penetrazione del sale nel formaggio. Il sale costituisce infatti un fattore limitante per lo sviluppo di questi batteri;
- ✓ controllare le condizioni di stagionatura ed evitare repentini innalzamenti della temperatura, soprattutto durante i primi 60 giorni di maturazione. L'attività dei clostridi e dei propionici è favorita quando la temperatura supera i 12°C.

3.4.4 Infestazioni da acari

Questo difetto si manifesta principalmente sulle produzioni artigianali, quando il formaggio non viene adeguatamente curato durante la fase di stagionatura. La crosta del formaggio si presenta completamente ricoperta da muffe e infestata da acari che, partendo dalla crosta, possono scavare piccoli cunicoli fino a invadere più o meno profondamente la forma. Se l'attacco non viene fermato in tempo, una notevole quantità di formaggio viene ridotta in una sottile polvere, che si manifesta tutta intorno alla forma colonizzata. La presenza di acari sui formaggi costituisce un danno merceologico economicamente importante, ma può anche creare problemi di tipo sanitario a carico dell'uomo. Sono infatti stati descritti diversi disturbi provocati dagli acari, quali dermatiti, allergie e problemi intestinali.

Gli acari più comuni che vivono sul formaggio sono l'*Acarus siro*, il *Tyrophagus longior* e il *Tyrollychus casei*. Le condizioni ambientali favorevoli allo sviluppo delle muffe favoriscono anche la diffusione degli acari fitofagi (che si nutrono cioè delle muffe), cui possono subentrare, in un secondo momento, quelli zoofagi (che si nutrono dei primi). In condizioni ottimali gli acari possono portare a termine un ciclo riproduttivo in meno di 10 giorni, e possono raggiungere facilmente un numero di circa 1500-2000 individui per centimetro quadrato.

Le condizioni ottimali per lo sviluppo delle muffe sono tali anche per lo sviluppo degli acari, dunque umidità elevata nei locali di stagionatura, assi e locali di stagionatura contaminati da muffe e acari, formaggi contaminati da muffe. Quindi, il modo migliore per limitare o impedire la crescita degli acari è quello di impedire uno sviluppo invasivo delle muffe.

3.4.5 Gli insetti del formaggio: la *Piophil*a casei

Gli acari non sono i soli animali che tendono a colonizzare i formaggi. Spesso, infatti, è possibile riscontrare nei locali di stagionatura insetti, la cui presenza non deve essere sottovalutata dal personale addetto alla cura del formaggio. Un esempio è costituito dalla cosiddetta mosca del formaggio (*Piophil*a casei), piccolo dittero che depone le uova sul formaggio ancora fresco, o comunque quando questo ha la crosta ancora morbida, e su altri prodotti alimentari. Tale insetto, sia nella forma larvale sia da adulto, può rappresentare un pericoloso veicolo di germi potenzialmente patogeni per l'uomo. Infatti, questi insetti sono soliti frequentare anche materiale organico in via di putrefazione e, quando infettati, possono trasportare germi anche a notevole distanza, inquinando qualsiasi cosa con la quale entrino in contatto.

Le larve della mosca del formaggio schiudono in 30-48 ore a temperature comprese tra i 20 e i 22 °C e raggiungono il loro completo sviluppo in circa 8 giorni, mentre oltre due settimane sono loro necessarie per diventare insetti adulti. La durata del ciclo riproduttivo è comunque molto influenzata dalle condizioni ambientali e in particolare dalla temperatura. Nei locali di stagionatura dei formaggi, ove la temperatura è inferiore a quella ottimale per lo sviluppo di questi insetti, il ciclo riproduttivo può subire un notevole rallentamento, arrivando a compiersi anche in qualche mese.

Le larve della *Piophil*a sono molto resistenti alle condizioni ostili e possono sopravvivere, anche per molti mesi, in completo digiuno. Esse si muovono attraverso un caratteristico moto saltatorio e, penetrando nel formaggio, generalmente quando sono neonate, attraverso l'azione degli enzimi presenti nella saliva provocano la digestione della pasta caseosa che, divenendo cremosa e piccante, risulta particolarmente apprezzata da taluni consumatori (Casu marzu, tradotto letteralmente "formaggio marcio").

Purtroppo le larve, che vengono talora ingerite insieme al formaggio, possiedono una notevole resistenza all'azione dei succhi gastrici dell'uomo, possono infatti passare indenni lungo il tubo digerente e causare problemi intestinali. Tali disturbi sono legati in particolare all'azione del loro apparato boccale, particolarmente robusto, che può provocare piccole ferite a carico dei villi intestinali.

La lotta contro questo insetto può essere condotta mettendo in atto sistemi di difesa fisici (reti a maglie strette alle finestre, lampade ad azione insetticida, trappole con sostanze attrattive) o mediante l'impiego di insetticidi non tossici per l'uomo (piretro o piretroidi). Si dovrà tuttavia essere molto scrupolosi nella pulizia dei locali e delle scaffalature, allo scopo di eliminare residui organici che possano costituire focolai di infestazione da insetti, e nelle operazioni di manutenzione e cura della superficie dei formaggi, particolarmente di quelli a media e lunga maturazione.

Capitolo 4

Le ammine biogene

Le ammine biogene (Figura 4.1) sono basi organiche a basso peso molecolare caratterizzate da attività biologica. Chimicamente sono formate da una struttura alifatica, aromatica o eterociclica a cui sono legati uno o più gruppi amminici (monoammine, diammine e poliammide).

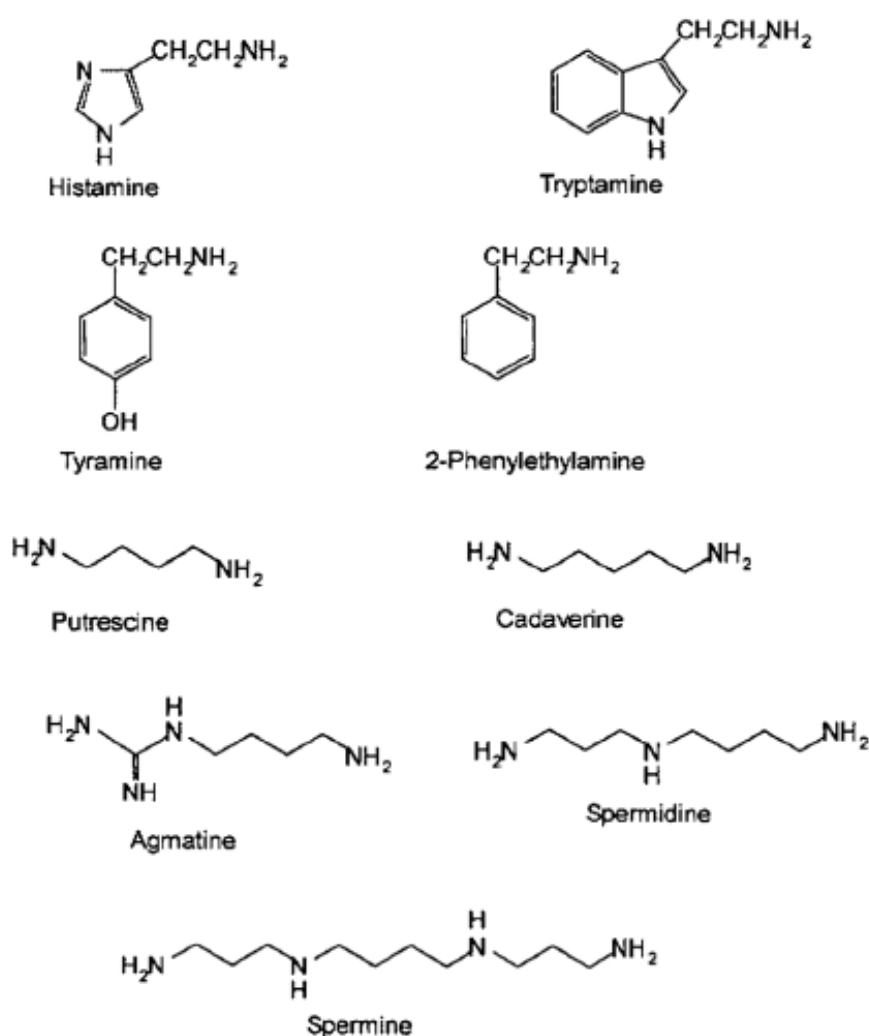


Figura 4.1 formula di struttura delle ammine biogene

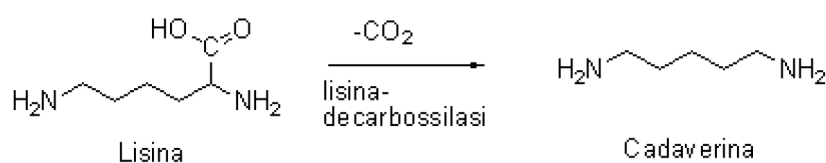
Le monoammine e le diammine (tiramina, fenilettilammina, istamina, triptamina, cadaverina e putrescina) sono il risultato dell'azione decarbossilasica che viene portata avanti a carico degli aminoacidi precursori ed in determinate condizioni sia dagli enzimi nativi che da quelli prodotti dallo sviluppo di microrganismi decarbossilasi positivi negli alimenti. Le poliammine (spermidina e spermina) possono aver origine da reazioni di "deureazione", da un cammino metabolico alternativo consistente nell'incorporazione di un gruppo aminopropilico derivante dalla metionina. Diammine quali putrescina e cadaverina possono reagire con i nitriti per formare nitrosammine dotate di attività potenzialmente carcinogeniche. Le poliammine e le diammine possono essere inoltre convertite in composti N-nitroso stabili, anch'essi potenzialmente responsabili della comparsa di carcinomi all'intestino. In virtù di questo fatto l'accumulo delle ammine biogene negli alimenti fermentati e stagionati deve essere tenuto sotto controllo.

4.1 Sintesi delle Ammine Biogene

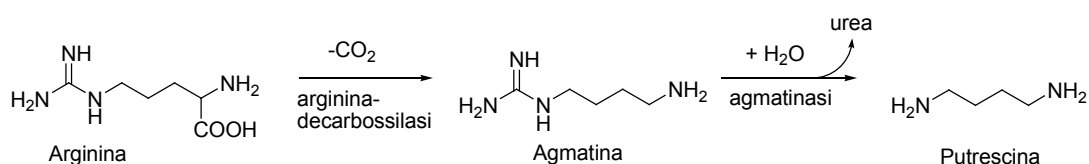
Le condizioni necessarie per la formazione delle ammine biogene in un alimento sono la disponibilità di aminoacidi liberi, la presenza di batteri decarbossilasi-positivi e fattori ambientali favorevoli alla sintesi e all'attività decarbossilasica.

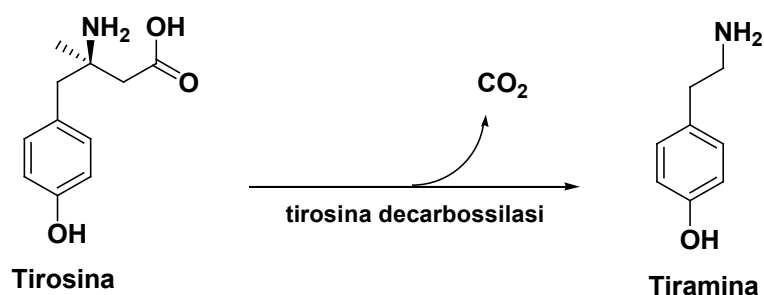
La sintesi delle ammine inizia con una decarbossilazione aminoacidica e la rimozione del gruppo α -carbossilico dell'amminoacido precursore.

La cadaverina deriva dalla decarbossilazione della lisina:



In alcuni casi, come ad esempio per la formazione della putrescina, si ha la formazione di un composto intermedio:





Sia l'istamina che la tiramina non vengono avvertite dall'uomo con il gusto o con l'olfatto e possono essere causa di intossicazioni alimentari, perché dotate di azioni psicoattive e/o vasoattive.

L'ingestione di elevati quantitativi di tali ammine biogene può provocare intossicazioni e conseguenze dannose per l'organismo. I sintomi più comuni sono prurito, emicrania, arrossamento del viso e del collo, orticaria, sbalzi pressori, attacchi asmatici e alterazioni della frequenza cardiaca, specie se l'assunzione viene associata a farmaci che inibiscono gli enzimi intestinali responsabili del loro catabolismo.

Le più importanti sindromi di origine alimentare causate dall'ingestione di ammine biogene sono l'avvelenamento da istamina (sindrome sgombroide) e l'intossicazione da tiramina (sindrome del formaggio), documentate da numerosi studi epidemiologici. Generalmente tali intossicazioni avvengono a seguito di consumo di alimenti in qualche modo alterati: pesce poco fresco, formaggi e vini contaminati da fermentazioni anomale.

Alcuni sintomi, come nausea, diarrea e vertigini, possono variare in dipendenza della quantità di tossina introdotta e dalla sensibilità individuale. Il periodo d'incubazione è breve: da pochi minuti ad alcune ore. Nei casi più gravi si può arrivare allo shock istaminico con ipotensione fino al collasso cardio-circolatorio.

La sensibilità individuale alle ammine biogene è molto variabile, livelli superiori a 500 mg/kg per l'istamina e 100 mg/kg per la tiramina sono considerati potenzialmente pericolosi per la salute umana. Una ingestione di soli 6 mg di tiramina può essere sufficiente per causare effetti negativi in individui suscettibili o che facciano uso di inibitori delle monoamine ossidasi (MAO), enzimi questi coinvolti nel meccanismo di detossificazione delle ammine biogene.

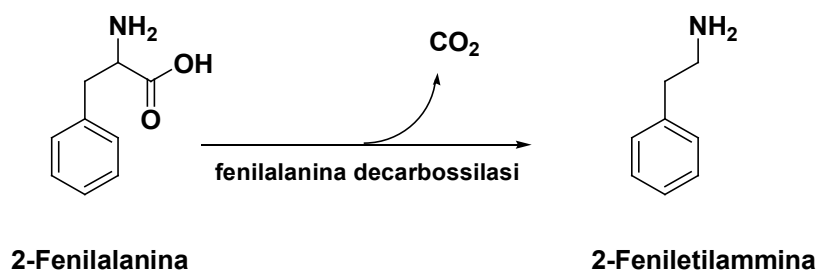
I limiti di legge, riguardanti la presenza di istamina e tiramina negli alimenti di origine ittica sono stabiliti nel Decreto legislativo n 531/1992 (cap. V dell'allegato, capo II, punto 3) in cui si legge:

- “- il tenore medio non deve superare 100 ppm (parti per milione);
- due campioni possono avere un tenore superiore a 100 ppm ma inferiore a 200 ppm;
- nessun campione deve avere un tenore superiore a 200 ppm”.

Questi valori limite si applicano unicamente ai pesci delle famiglie *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae* e *Coryphenidae*. Tuttavia i pesci che abbiano subito un trattamento di maturazione enzimatica in salamoia possono contenere una concentrazione più elevata di istamina.

Dal punto di vista istituzionale, la presenza di alimenti contenenti concentrazioni di istamina superiori ai limiti di legge rientra nel novero dei casi per i quali sono stati stabiliti in Europa reti di sorveglianza sulla sicurezza alimentare con obbligo di denuncia (Regolamento CE n. 178/2002 del 28 gennaio 2002: sistema di allerta comunitaria). Queste reti permettono di agire sia ritirando i prodotti dal mercato che adottando le necessarie misure nei confronti degli impianti di produzione e informando la popolazione a rischio (Unità di Progetto Sanità Animale e Igiene Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Venezia).

Il cacao, come tutti gli alimenti fermentati microbiologicamente, può contenere monoammine, in particolare feniletilammina (derivante dalla decarbossilazione della fenilalanina) e serotonina (derivante da analogo processo a carico del triptofano).



Le ammine biogene presenti nel cacao non raggiungono valori elevati nonostante alcuni individui ne risultino particolarmente sensibili, in particolare chi soffre di emicrania.

Dopo la tostatura del cacao si trova un aumento significativo della concentrazione di ammine biogene, probabilmente causato dalla decarbossilazione termica degli amminoacidi liberi.

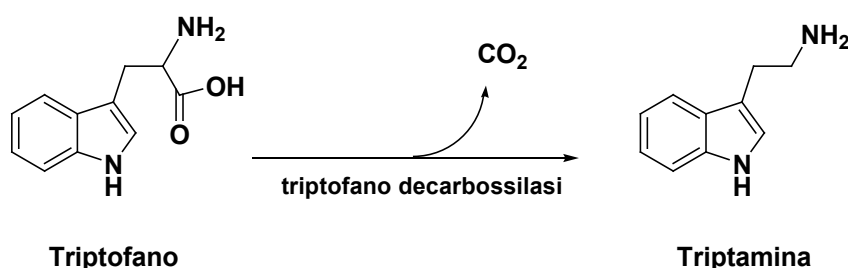
La feniletilammina presenta una struttura analoga alle anfetamine e condivide con esse gli effetti neuro-farmacologici, legandosi agli stessi recettori cerebrali. L'anello benzenico ne conferisce il profilo aromatico mentre il gruppo amminico ne determina il carattere basico. Essa è infatti molecola fortemente basica, che subisce un rapido metabolismo, e ciò ne evita un eccessivo accumulo cerebrale.

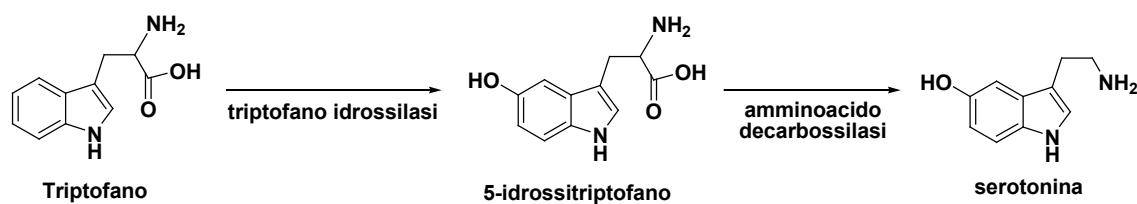
La feniletilammina è nota anche come "love-drug" (droga dell'amore) dato che è in grado di produrre sensazioni come quelle sperimentate quando una persona è "innamorata", e per tale ragione si pensa possa essere responsabile degli effetti afrodisiaci attribuiti al cioccolato. Infatti la feniletilammina viene rilasciata nel cervello quando l'individuo sperimenta sentimenti di gioia e amore. Inoltre alcuni studi hanno dimostrato che la feniletilammina, proprio come le anfetamine, ha interessanti proprietà:

- ✓ inibisce l'appetito;
- ✓ ritarda la comparsa della fatica;
- ✓ modifica l'umore;
- ✓ favorisce la veglia e le funzioni mentali.

È importante ricordare che a differenza delle anfetamine la feniletilammina non sviluppa tolleranza, dipendenza, o effetti collaterali.

La serotonina (*5-idrossitriptamina*) è un neurotrasmettitore monoamminico sintetizzato nel sistema nervoso centrale e in alcune cellule dell'apparato gastrointestinale (*cellule enterocromaffini*). La sostanza fu isolata nel 1935, inizialmente considerata un polifenolo; due anni più tardi, fu rinominata *enteramina* e nel 1948 prese il nome di serotonina. La biosintesi della serotonina segue una via simile a quella delle altre ammine, dall'amminoacido precursore triptofano:





Il triptofano viene convertito in 5-idrossitriptofano grazie all'azione dell'enzima triptofano-idrossilasi. Il 5-idrossitriptofano così prodotto viene decarbossilato a serotonina ad opera delle decarbossilasi.

Così come la feniletilammina, anche la serotonina svolge un ruolo importante nella regolazione dell'umore, del sonno, della temperatura, della sessualità e dell'appetito. Questo neurotrasmettitore è inoltre bersaglio di alcune droghe, come anfetamine e l'ecstasy, che agiscono inibendo la sua detossificazione.

Tabella 4.1 Ammine biogene, effetti farmacologici e presenza negli alimenti

Ammine biogene, effetti farmacologici e presenza negli alimenti		
AMMINA BIOGENA	EFFETTI FARMACOLOGICI	ALIMENTI A RISCHIO
Istamina	Libera adrenalina e noradrenalina; stimola la muscolatura liscia dell'utero; stimola i neuroni motori e sensoriali; controlla la secrezione gastrica	estratti di lieviti, diversi tipi di formaggi, pesce in scatola, vini rossi, spinaci, pomodori
Tiramina	Vasocostrittore; aumenta il battito cardiaco; causa lacrimazione e salivazione, aumento della glicemia ed emicrania	arance, avocado, banane, crauti, formaggi, lamponi, estratti di lieviti, pesce, pomodori, prugne, salsicce
Cadaverina, Putrescina, Spermidina, Spermina	Ipotensione; bradicardia; potenziano l'azione tossica delle altre ammine	Alimenti proteici in fase di decomposizione avanzata (carne e pesce in primis)
Feniletilamina	Rilascia noradrenalina; aumenta la pressione sanguigna; causa emicrania	Cioccolato, vini rossi, alimenti fermentati

In condizioni normali l'organismo neutralizza le ammine biogene grazie all'azione delle amminossidasi e all'azione detossificante del fegato. Il catabolismo delle mono- e delle diammine è mediato da reazioni ossidative operate dai sistemi enzimatici mono- (MAO) e diammino-ossidasi (DAO) intestinali, mentre quello delle poliammine si realizza mediante acetilazioni e/o ossidazioni mediate da poliammino-ossidasi (PAO) (Mercogliano *et al.*, 2008).

Tuttavia, come accennato, alcune sostanze mono- e diamminossidasi-inibitrici, ma anche l'abuso di alcol, o la presenza dello stesso in alimenti in decomposizione ricchi di putrescina e cadaverina, possono rallentare o inibire l'eliminazione delle ammine biogene dall'organismo. I livelli di tolleranza individuale sono molto variabili e generalmente inferiori nelle persone allergiche e in chi soffre frequentemente di emicrania.

Per ostacolare la formazione di ammine biogene è bene rispettare le indicazioni riportate sull'etichetta per quanto riguarda i tempi e le modalità di conservazione degli alimenti, prima e dopo l'apertura. In generale, prima si consuma l'alimento e meglio è, anche quando la data di scadenza appare lontana. Infine è importante anche curare l'igiene domestica nella conservazione o preparazione degli alimenti, poiché contribuisce

a ridurre la proliferazione delle specie microbiche implicate nella sintesi di ammine biogene.

4.2 Produzione delle ammine biogene nel formaggio

Durante la maturazione del formaggio la proteolisi primaria e secondaria sono i principali cambiamenti biochimici che sottintendono la formazione degli amminoacidi e - quindi - la produzione di ammine biogene.

La contaminazione microbiologica è generalmente l'elemento responsabile della formazione delle ammine biogene nel formaggio. Tradizionalmente i lattobacilli etero fermentanti e gli enterococchi sono considerati in tale matrice come i principali produttori rispettivamente di istamina e di tiramina. Comunque anche altri LAB (Lactic Acid Bacteria) e alcuni batteri Gram-negativi possono essere coinvolti nella produzione di ammine biogene.

In uno studio riguardante lo screening di 129 ceppi di enterococchi, la maggior parte di essi isolati da prodotti caseari, 124 sono risultati produttori di tiramina da tirosina, tuttavia nessuno di essi è risultato dotato di attività decarbossilasica su istidina, lisina e ornitina. In un'indagine riguardante 20 formaggi spagnoli sono stati isolati 117 ceppi batterici Gram-positivi, dei quali 92 sono risultati essere enterococchi che producono tiramina (Roig-Sagués *et al.*, 2002). L'istamina è stata prodotta solo da 10 ceppi Gram-positivi, 3 dei quali lattobacilli e 6 lattococchi. In uno studio riguardante il Pecorino Abruzzese, tra i batteri Gram-positivi isolati sono stati individuati sia lattobacilli ed enterococchi decarbossilanti tirosina, fenilalanina e ornitina che lattococchi ed enterococchi con attività decarbossilasica su tirosina. Nessuno dei ceppi isolati ha mostrato attività sull'istidina (Martuscelli *et al.*, 2005). Lo screening di 1237 isolati di batteri lattici, ottenuti dal formaggio Montasio, ha permesso di individuare 151 ceppi con attività decarbossilasica sulla tirosina e 13 sull'istidina. Nello stesso studio i ceppi relativi allo *Streptococcus thermophilus* sono quelli che hanno mostrato la maggiore attività seguiti dagli enterococchi e *Leuconostoc*.

Relativamente ai batteri Gram-negativi, solo due ceppi, isolati in una indagine su formaggi spagnoli, sono stati capaci di produrre tiramina e 43 di produrre istamina. Uno studio condotto su formaggi erborinati ha messo in evidenza che tutti i ceppi isolati (104)

mostravano attività decarbossilasica su almeno due amminoacidi ed in particolare tutti i ceppi erano capaci di produrre cadaverina, 100 putrescina, 71 tiramina e 60 istamina (Nuñez *et al.*, 2011).

Dal Pecorino Abruzzese sono state isolate enterobatteriacee capaci di decarbossilare la lisina, l'ornitina, la fenilalanina, la tirosina e il triptofano ma non l'istidina.

Su 200 enterobatteriacee isolate dal formaggio Montasio, 169 hanno mostrato attività nei confronti dell'ornitina e 134 nei confronti della lisina.

Molti lieviti isolati dal formaggio Armada, prodotto a partire da latte crudo di capra, e appartenenti alle specie *Geotricum candidum*, *Candida lambica*, *Candida krusei*, *Candida lipolytica*, *Kluveromyces lactis*, *Kluveromyces marxianus*, *Saccharomyces unisporus* e *Trichosporon beigeli* sono risultati capaci di produrre istamina e tiramina (Tornadijo *et al.* 1998). Ceppi di *Debaryomyces hansenii* e di *Yarrowia lipolytica*, isolati da Pecorino Crotonese, hanno mostrato attività decarbossilasica su diversi amminoacidi (Gardini *et al.*, (2006).

4.3 Fattori che influenzano la produzione delle ammine biogene nel formaggio

4.3.1 Trattamento del latte

Il trattamento di pastorizzazione del latte è capace, minimizzando la concentrazione di microrganismi produttori termolabili, di contenere la formazione delle ammine biogene nel formaggio. Il formaggio a latte crudo Idiazábal a 6 mesi di stagionatura ha mostrato un contenuto di tiramina 3.5 volte superiore rispetto alla concentrazione determinata nei formaggi prodotti da latte pastorizzato (Ordóñez *et al.*, 1977). In formaggi ottenuti da latte di capra crudo, il contenuto di istamina, tiramina, cadaverina, putrescina e feniletilammina, è risultato rispettivamente essere, dopo 90 giorni di maturazione, 29.8, 6.8, 3.1, 1.6, e 5.9 volte superiore alle concentrazioni determinate nei formaggi prodotti da latte pastorizzato (Tornadijo *et al.*, 1998).

I trattamenti non termici di risanamento del latte, quali la bactofugazione e la omogeneizzazione a pressione elevata (HPH), riducono considerevolmente la carica batterica totale, e quindi anche il numero di batteri produttori di ammine biogene. L'utilizzo di latte bactofugato per la produzione di Emmental ha indotto una minore concentrazione di putrescina e cadaverina rispetto al formaggio prodotto da latte crudo, mentre lo stesso trattamento non ha avuto alcuna influenza su istamina e tiramina. La omogeneizzazione del latte a pressioni elevate (HPH) riduce il contenuto di lieviti, lattobacilli e *Microcaccacee* ma non di enterococchi. In formaggi tipo caciotta, prodotti a partire da latte che aveva subito il trattamento HPH, è stato messo in evidenza un contenuto inferiore di putrescina, cadaverina e istamina rispetto alla stessa tipologia di formaggio prodotto da latte crudo o pastorizzato (Lanciotti *et al.*, 2007). Nello stesso lavoro è stato osservato che il Pecorino prodotto da latte HPH era caratterizzato da livelli inferiori di putrescina, cadaverina e tiramina rispetto alla stessa tipologia di formaggio prodotta a partire da latte crudo o pastorizzato.

4.3.2 Livello iniziale di batteri produttori di ammine biogene e presenza di batteri inibitori

L'aggiunta di *Lattobacillus buchneri* St2A come inoculo del latte in caseificazione ha condotto all'ottenimento di formaggio Gouda con un contenuto di istamina superiore rispetto al controllo (senza inoculo) (Leuschner *et al.*, 1998). La completa inibizione della produzione di istamina è stata ottenuta quando, all'inoculo di *Lattobacillus buchneri* St2A, sono stati aggiunti batteri lattici capaci di produrre batteriocine. Il produttore di batteriocine più utilizzato per prevenire la produzione di tiramina è una mutazione dell'*Enterococcus faecalis* carente dell'enzima tirosina decarbossilasi.

4.3.3 Tipo e livello di colture starter

Il tipo di coltura starter utilizzato in caseificazione può influenzare la formazione di ammine biogene nel formaggio tramite l'effetto sull'accumulo di amminoacidi liberi, sul

pH del formaggio, e sulla produzione di batteriocine che possono inibire i batteri produttori di ammine biogene.

E' stato riportato che l'aggiunta di *Enterococcus faecalis* ha avuto l'effetto di incrementare il livello di istamina (1800 mg/kg vs 500-667 mg/kg) in formaggio Gouda prodotto con l'inoculo di un'associazione di *Lactobacillus buchneri* St2A e sei diversi starter mesofili, e ciò indipendentemente dallo starter utilizzato (Leuschner *et al.*, 1998). Formaggi molli prodotti a partire da latte crudo usando uno starter commerciale formato solo da lattococchi hanno mostrato un livello di istamina, tiramina, cadaverina, putrescina e fenilettilamina dalle 2.5 alle 3.8 volte superiore rispetto ai formaggi ottenuti utilizzando un siero innesto naturale composto da *S. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e lattococchi. Uno studio condotto sul formaggio Idiazabal ha messo in evidenza che il formaggio prodotto da latte crudo con l'aggiunta di uno starter commerciale contenente lattococchi aveva un maggior contenuto di tiramina, putrescina ed un minor contenuto di istamina, cadaverina, spermidina, triptamina e fenilettilamina rispetto all'analogo formaggio prodotto con uno starter autoctono e *Lactobacillus casei* (Ordóñez *et al.*, 1977). Il contenuto totale di ammine biogene nel formaggio Montasio a 4 mesi di stagionatura è risultato essere di 207 mg/kg quando per la produzione veniva utilizzato latte termizzato addizionato con una coltura lattica naturale; sempre nello stesso studio è stata per contro evidenziata una diminuzione della concentrazione fino a 30 mg/kg quando il latte innesto naturale veniva utilizzato in combinazione con una coltura starter commerciale (Marino *et al.*, 2008).

Il livello della coltura starter (0.1% o 1%), usata per la produzione del formaggio Manchego ha influenzato la concentrazione di ammine biogene con un aumento del 24% per la tiramina e del 20% per l'istamina nei formaggi ottenuti con lo starter all'1%, e ciò nonostante la conta dei batteri decarbossilasi attivi non variasse. Gli autori hanno attribuito questo andamento al valore leggermente più alto di pH tipico dei formaggi prodotti con lo starter all'1%, che può aver favorito la formazione degli amminoacidi liberi e la reazione di decarbossilazione (Fernández-García *et al.*, 1999).

4.3.4 Aggiunta di enzimi proteolitici

L'aggiunta di enzimi proteolitici al latte o alla cagliata potrebbe influenzare, favorendola, la produzione di amminoacidi liberi e quindi, almeno in linea teorica, anche la formazione di ammine biogene. Un aumento della concentrazione di tiramina e istamina è stato in effetti osservato nella produzione di formaggio Manchego a seguito di aggiunta in fase di caseificazione di una proteinasi neutra prodotta dal *Bacillus subtilis* (Gaya *et al.*, 2005).

4.3.5 Condizioni di maturazione

In molte varietà di formaggio l'aumento della concentrazione delle ammine biogene totali non è di solito una funzione lineare del tempo di maturazione, cionondimeno essa dipende fortemente sia dalle condizioni di produzione che di stagionatura del formaggio.

Un aumento della temperatura dell'ambiente di maturazione del formaggio dovrebbe indurre una maggiore proteolisi, e quindi un maggior sviluppo di amminoacidi liberi e, conseguentemente, di ammine biogene. Nel formaggio Gouda prodotto da latte inoculato con *Lb. Buchneri St2A* e stagionato per 12 mesi alle temperature di 9, 14, 18 e 21°C è stato osservato un aumento della concentrazione dell'istamina pari rispettivamente a 245, 378, 622 e 756 mg/kg. La stagionatura dei formaggi a temperature superiori a quelle convenzionali, ancorchè applicata per brevi periodi di tempo, può favorire lo sviluppo di ammine biogene.

La concentrazione delle ammine biogene normalmente aumenta con la stagionatura del formaggio. Nel Gouda la concentrazione di istamina aumenta di un fattore pari a 4.4, 4.9, 5.6 e 4.3 passando da 3 a 12 mesi di stagionatura per temperature di stagionatura pari rispettivamente a 9, 14, 18 e 21°C (Leuschner *et al.*, 1998). In uno studio effettuato sul formaggio tipo Dutch è stato osservato un accumulo di tiramina maggiore nella crosta che nel centro della forma, con una velocità di accumulo rispettivamente pari a 1.19 e 0.19 mg/kg al giorno.

Come è stato osservato nel formaggio Idiazabal, nel tempo potrebbe verificarsi anche una diminuzione della concentrazione delle ammine biogene; in particolare questo comportamento è stato osservato per la triptamina, la feniletilammina e l'istamina. Nello stesso studio è stato osservato che la cadaverina rimane invece costante, mentre la tiramina e la putrescina aumentano di un fattore rispettivamente pari a 8.2 e 1.9 passando da 30 a 180 giorni di stagionatura.

4.3.6 Trattamento del formaggio a pressioni elevate

L'applicazione di pressioni elevate al formaggio, finalizzata all'abbattimento della carica batterica, provoca una batteriolisi con il rilascio di enzimi intracellulari, e questo può comportare un aumento della proteolisi del formaggio e - conseguentemente - un incremento del contenuto in ammine biogene. È stato osservato su un formaggio di capra a 14°C che la pressurizzazione a 400 Mpa per 5 min, o per 50 MPa per 72h o per 400 MPa per 5 min + 50 Mpa per 72 h determina, dopo 28 giorni di stagionatura, un incremento del livello di tiramina e istamina pari a 2.8 e 2.9 volte nel trattamento a 50 MPa rispetto ai formaggi non trattati, mentre le stesse ammine diminuiscono nei trattamenti condotti a pressioni superiori. Putrescina, cadaverina, spermidina e spermina aumentano invece di 22.7, 7.0, 1.2 e 3.9 volte nel formaggio pressurizzato a 50 MPa e di un fattore pari a 14.0, 4.3, 1.4 e 2.8 nel formaggio 400 + 50 Mpa.

Capitolo 5

Metodi analitici per la caratterizzazione dei formaggi

5.1 Studio della Macrocomposizione e della Proteolisi

Lo studio della macrocomposizione dei formaggi rappresenta il primo livello della loro caratterizzazione. Tale indagine si basa sull'impiego di specifiche, ma consolidate metodologie analitiche, in genere relativamente semplici, che consentono di avere un quadro delle principali proprietà chimico-fisiche dei formaggi e dell'avanzamento di alcuni processi biochimici legati alla loro maturazione. I parametri, generalmente, presi in considerazione nello studio della macrocomposizione sono: il pH, il contenuto di grasso, di proteine, di cloruro di sodio, il contenuto totale di sostanza secca e di frazioni azotate.

5.1.1 Il pH

L'acidità reale del formaggio, dovuta alla concentrazione degli ioni H^+ liberi, viene misurata attraverso la determinazione del pH. Le diverse tipologie di formaggio sono in genere caratterizzate da differenti valori di pH; per la stessa tipologia, invece, esso varia con la stagionatura. Il pH della cagliata diminuisce nelle prime 4 ore dalla caseificazione a causa della produzione dell'acido lattico dalla fermentazione del lattosio ad opera dei batteri lattici della microflora nativa del latte o dello starter microbico aggiunto. Nelle successive 48 ore il pH tende a variare di poco per un effetto tampone, dovuto alla presenza del lattato. Durante le successive fasi di maturazione, il pH subisce variazioni legate ai processi biochimici di proteolisi e/o lipolisi che avvengono rispettivamente a carico della materia proteica e lipidica. Ad esempio, nei formaggi a spiccata maturazione proteolitica il pH tenderà ad aumentare, a causa dello sviluppo di sostanze basiche azotate. Tale aumento sarà meno importante nei formaggi caratterizzati da una proteolisi meno intensa o da una prevalente maturazione lipolitica.

5.1.2 Sostanza secca

Si definisce sostanza secca di un formaggio il contenuto di materia organica ed inorganica che residua a seguito all'evaporazione dell'acqua contenuta nella matrice caseosa. Il contenuto di sostanza secca è strettamente legato alla tipologia e alla tecnologia di produzione del formaggio, ossia a quella serie di operazioni che determinano l'entità dello spurgo del siero (quindi rottura, cottura, pressatura e stufatura della cagliata). A parità di tecnologia utilizzata, il contenuto di sostanza secca è strettamente legato al periodo di maturazione del formaggio. Durante la maturazione, il contenuto di sostanza secca di un formaggio tende ad aumentare in seguito al naturale processo di perdita di acqua che il prodotto subisce.

Il metodo analitico ufficiale utilizzato per la determinazione della sostanza secca è riportato nella norma IDF Standard 4 A del 1982.

5.1.3 Grasso

Il contenuto di grasso di un formaggio viene definito come il contenuto di lipidi neutri (trigliceridi) e lipidi polari (digliceridi, monogliceridi, acidi grassi liberi, fosfolipidi etc) che vengono inglobati nel suo reticolo proteico durante la coagulazione. Ovviamente anche il contenuto di grasso è strettamente legato alla tipologia ed alla tecnologia di produzione del formaggio, ossia a tutte quelle operazioni (quali rottura, cottura e pressatura della cagliata) che influenzano la ritenzione della materia grassa nel reticolo proteico. Invece, a parità di tecnologia utilizzata il contenuto di grasso è strettamente legato al periodo di maturazione del formaggio. In particolare, il contenuto di grasso di un formaggio tende ad aumentare durante la maturazione in seguito al naturale processo di perdita di acqua che il prodotto subisce.

La determinazione del grasso nel formaggio si effettua tramite metodi volumetrici o ponderali.

Fra i metodi volumetrici il più conosciuto ed utilizzato è il metodo Gerber con le varie modificazioni proposte da Siegfeld, Van Gulik, Kooper e Roeder. Per l'esecuzione dell'analisi si utilizzano butirrometri da latte o butirrometri speciali per formaggio. Il

principio del metodo (Van Gulik – ISO 3433: 1975) si basa sulla separazione del grasso mediante centrifugazione, dopo aver denaturato la matrice proteica e favorito la separazione del grasso con alcool isoamilico.

Fra i metodi ponderali ricordiamo:

Il metodo di riferimento adottato dal VII Congresso Internazionale della IDF del 1926 (metodo di Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, IDF 5: 2005/ISO 1735:1999). Il tenore in materia grassa è determinato gravimetricamente attraverso l'estrazione con etere etilico ed etere di petrolio della materia grassa da una dispersione idroalcolica in ambiente acido del formaggio, seguita dall'evaporazione dei solventi e pesata finale del residuo.

Infine ricordiamo il metodo di Soxhlet (FIL-IDF 172: 2001 / ISO 14156:2001), che prevede la determinazione gravimetrica della materia grassa mediante estrazione in continuo con etere etilico, successiva evaporazione del solvente e pesata del residuo.

5.1.4 Proteine

Il contenuto di proteine di un formaggio viene definito come il contenuto di azoto totale (azoto proteico e non proteico) moltiplicato per un fattore di conversione che - nel caso delle proteine del latte - è pari a 6.38. L'azoto proteico è costituito principalmente dalle caseine denaturate ad opera degli enzimi del caglio durante la coagulazione, da una piccola parte di sieroproteine che, pur essendo solubili nel siero, vengono comunque inglobate nel reticolo caseinico, e da peptidi insolubili. L'azoto non proteico è invece costituito da peptidi solubili di medio e piccolo peso molecolare, o da semplici composti organici azotati quali amminoacidi, ammine, urea etc.

Anche il contenuto di proteine di un formaggio dipende dalla sua tipologia, dalle tecnologie adottate per la sua produzione e, a parità delle predette condizioni, dal periodo di maturazione. Al pari della sostanza secca e del contenuto lipidico, anche il tenore proteico tende a crescere con la maturazione del formaggio.

L'azoto totale viene determinato mediante il metodo Kjeldhal (FIL-IDF Standard 20B: 1993). Tale metodo prevede la trasformazione dell'azoto organico in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la corrispondente liberazione come azoto ammoniacale, la sua distillazione e la relativa titolazione alcalimetrica (con HCl a titolo noto).

5.1.5 Indici di proteolisi

I metodi analitici utilizzati per lo studio dei processi di proteolisi possono essere suddivisi in metodi aspecifici e specifici. I metodi aspecifici si basano sulla complessiva quantificazione delle varie forme di azoto solubile precedentemente frazionate mediante l'utilizzo di opportuni agenti precipitanti (acido citrico, acido tricloroacetico e acido fosotungustico). I metodi specifici sono invece impiegati per la determinazione dei singoli peptidi o amminoacidi liberi, e fanno generalmente ricorso ad opportune tecniche strumentali di separazione (cromatografia, elettroforesi, etc).

L'analisi delle componenti azotate del formaggio viene eseguita secondo uno schema di frazionamento consolidato, che tiene conto della distribuzione dell'azoto nella matrice caseosa. Questa procedura analitica fornisce importanti informazioni sull'avanzamento dei processi di degradazione a carico delle proteine che avvengono durante la stagionatura del formaggio.

5.1.6 Metodi di frazionamento

Mentre le caseine sono insolubili nella maggior parte dei solventi, i peptidi, prodotti dalla loro degradazione, possono essere solubilizzabili, e la loro concentrazione aumenta col progredire della proteolisi. Su questi principi si basano un gran numero di tecniche analitiche di frazionamento della componente proteica nei formaggi.

La maggior parte delle proteine e dei peptidi ad alto peso molecolare sono solubili in soluzione acquose di urea da 4 a 6 M. Questa caratteristica viene spesso utilizzata nella preparazione dei campioni omogenei da sottoporre a successive tecniche separative.

L'acqua (o le soluzioni acquose) è comunque il solvente più utilizzato per estrarre i composti azotati derivanti da attività proteolitica nel formaggio. Il livello di azoto solubile in acqua (WSN) viene spesso utilizzato come indice di maturazione del formaggio (Rank *et al.*, 1985; Fox *et al.*, 1995b), in quanto varia in base alla tipologia di formaggio e, a parità di prodotto, esso aumenta durante la stagionatura per effetto della proteolisi. Per la maggior parte dei formaggi la frazione WSN è prodotta essenzialmente dall'attività di

enzimi quali la chimosina (usato come coagulante) e, in parte, dalla plasmina (Visser, 1977; Fox *et al.*, 1995a).

Il livello di azoto solubile (SN), estratto dalla matrice caseosa con una soluzione 0.5 M di citrato di sodio anidro e successiva acidificazione a pH 4.6 (punto isoelettrico delle caseine) con HCl, è utilizzato come indice di proteolisi. Al pari di WSN, anche SN deriva essenzialmente dall'azione degli enzimi del caglio. Le proteine del siero e i proteosolubili liberati dall'azione della plasmina sono anch'essi solubili a pH 4.6 ma il loro contributo al valore complessivo è relativamente basso. Rank *et al.*, (1985) hanno dimostrato che il metodo, che prevede l'estrazione a pH 4.6, fornisce un valore di azoto solubile leggermente inferiore a quello WSN, tuttavia anche se più laborioso, è più semplice da standardizzare e per questa ragione è ampiamente utilizzato per l'ottenimento degli indici di proteolisi (Fox, 1989).

Il frazionamento dell'azoto solubile si ottiene mediante estrazioni e successive precipitazioni con l'impiego di opportuni solventi.

L'acido tricloroacetico (TCA) è molto utilizzato come agente precipitante le proteine. Poiché i peptidi più grossi sono solubili a concentrazioni relativamente basse di TCA, il range di concentrazioni operative varia, in funzione del grado di frazionamento desiderato, tra il 2,5% (O'Sullivan *et al.*, 1990) e il 12 % (Addeo *et al.*, 1992). I peptidi contenenti meno di 7 aminoacidi sono solubili in TCA al 12% e la loro solubilità dipende a sua volta dal grado di idrofobicità (Yvon *et al.*, 1989). Come riportato da Addeo *et al.* (1994) la maggior parte del materiale proteico estratto con questo metodo da formaggi duri (come il Parmigiano Reggiano) sono fosfopeptidi.

I peptidi ottenuti per estrazione con TCA al 12% sono in parte imputabili all'azione del caglio, e in parte a quella di peptidasi e proteasi batteriche dello starter e della microflora secondaria.

L'impiego del TCA quale agente utilizzato per il frazionamento dei peptidi ha lo svantaggio che esso deve essere rimosso dal mezzo di reazione prima di procedere all'analisi delle successive frazioni. La rimozione è purtroppo piuttosto laboriosa. e può richiedere l'impiego di separazioni cromatografiche. Si è infatti notato (Fox, 1989) che l'adozione delle più convenzionali tecniche di dialisi provocherebbe la perdita dei piccoli peptidi e degli aminoacidi liberi. Per ovviare a questo inconveniente viene spesso

utilizzato, in luogo di TCA, l'acido trifluoroacetico (TFA), che ha il vantaggio di poter essere rimosso dalla soluzione per semplice evaporazione.

L'ultimo stadio di frazionamento dell'azoto solubile consiste nella quantificazione dei soli aminoacidi liberi, in seguito alla precipitazione di tutti i peptidi presenti nell'estratto del formaggio. Le informazioni riguardanti la formazione e la concentrazione degli aminoacidi liberi sono piuttosto importanti, dal momento che essi contribuiscono in buona misura alla definizione delle caratteristiche sensoriali dei formaggi.

Una soluzione acquosa al 5% di acido fosfotungstico ($12\text{WO}_3 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; PTA) è un reagente precipitante molto selettivo in quanto in grado di precipitare tutto il materiale proteico di peso molecolare superiore a 600 Da (Jarret *et al.*, 1982). Altri reagenti precipitanti utilizzabili per la determinazione della componente aminoacidica dei formaggi sono l'acido 5-solfosalicilico (Cliffe *et al.*, 1991) e l'acido picrico (Fox, 1989).

Il frazionamento dei peptidi in funzione del peso molecolare può essere effettuato anche mediante l'adozione di tecniche di dialisi, ultrafiltrazione e cromatografia ad esclusione dimensionale. Rispetto alla dialisi, l'ultrafiltrazione ha il vantaggio di essere più rapida, permette il trattamento di quantità maggiori di campione, impiega membrane con notevole costanza di pesi molecolari di cut-off e riduce il problema costituito dal recupero dei peptidi in un grosso volume di permeato.

Alcuni degli indici più utili per descrivere l'avanzamento della proteolisi nei formaggi sono rappresentati da:

- il rapporto percentuale (SN/TN) tra l'azoto solubile in tampone citrato a pH 4,6 (SN) e l'azoto totale (TN); esso rappresenta un indice di maturazione del formaggio in quanto la frazione SN comprende peptidi di medio peso molecolare, proteoso-peptoni, proteine del siero e aminoacidi liberi.
- Il rapporto SN-TCA/TN, che rappresenta invece il contributo relativo sull'azoto totale dato dai piccoli peptidi prodotti dall'attività proteolitica del caglio e dalle peptidasi dei microrganismi.
- Il rapporto SN-PTA/TN, che rappresenta la frazione di azoto (comprendente anche peptidi molto piccoli ed aminoacidi liberi) rispetto all'azoto totale.

5.2 Studio del Profilo degli acidi grassi liberi (Lipolisi)

5.2.1 L'analisi GC degli acidi grassi

E' questa una delle tecniche analitiche per gascromatografia maggiormente consolidate ed utilizzate. La metodica analitica non presenta particolari problemi, si impiega una colonna capillare con fase polare e si opera con un detector a ionizzazione di fiamma (FID). Spesso, per classi omogenee di acidi grassi, i fattori di risposta possono essere considerati in prima approssimazione unitari. Data l'enorme popolarità del metodo GC-FID, non si ritiene di dover entrare in ulteriore dettaglio.

5.3 Definizione dell'Aroma - Caratterizzazione della Frazione Volatile

Nei precedenti capitoli è stata diffusamente oggettivata l'importanza delle caratteristiche sensoriali del formaggio nell'influenzare in modo determinante la scelta del consumatore. In questo contesto, l'aroma dei formaggi riveste un ruolo determinante, e lo studio dei composti volatili che maggiormente concorrono alla sua definizione è da tempo oggetto di studio da parte della comunità scientifica.

Infatti la caratterizzazione della frazione volatile nei prodotti lattiero-caseari riveste particolare importanza sia in quanto tale, che anche come strumento di individuazione di un legame tra il prodotto ed il territorio del quale è espressione. Più che nei prodotti a latte vaccino, questo legame è particolarmente presente nei prodotti ovicaprini, in cui la componente pascolo esercita una notevole influenza sulla composizione del latte da cui derivano.

Gli approcci analitici utilizzati nella valutazione della frazione volatile del formaggio sono numerosi, ma quasi tutti sono accomunati dall'adozione di metodologie strumentali cromatografiche (spesso gascromatografiche) interfacciate con spettrometri di massa.

5.3.1 Estrazione degli analiti volatili dal formaggio

L'estrazione degli analiti volatili dal formaggio costituisce un passaggio critico, a causa della complessità della matrice in oggetto (Urbach, 1993). Il formaggio costituisce un esempio emblematico a riguardo, in quanto contiene sostanze distribuite su tutta la gamma di polarità, dai sali minerali in cui prevalgono le interazioni ioniche ai grassi saturi, pressoché apolari.

I metodi di analisi tradizionali prevedono l'impiego di un opportuno sistema solvente che faciliti l'estrazione degli analiti dalla matrice. L'estrazione con solvente comporta in verità anche alcuni svantaggi, il più importante dei quali è legato al rischio di perdita dell'analita nei passaggi di estrazione e purificazione del campione. Esso risulta molto accentuato ove si operi con analiti volatili. La tecnica di semplice estrazione con solvente è scarsamente sensibile allorché la concentrazione tipica dell'analita sia assai minore rispetto a quella dei potenziali interferenti. I metodi che prevedono una (o più fasi) di estrazione con solvente sono comunque dispendiosi, sia in termini di tempo che di reagenti, e spesso impiegano reattivi e condizioni operative potenzialmente pericolose, e ciò impone l'adozione di opportune procedure di recupero e/o smaltimento dei reflui.

Oggi la disponibilità di nuove tecniche di estrazione in grado di limitare, o addirittura eliminare, l'impiego di solventi (le cosiddette tecniche *solvent-free*) ha spinto la comunità scientifica ad abbandonare, ove possibile, le tradizionali tecniche di estrazione. Le tecniche *solvent-free* vengono classificate, in base al tipo di fase impiegata per l'estrazione, in tecniche a fase gassosa e tecniche a fase assorbente, come mostra lo schema 1 (Figura 5.1).

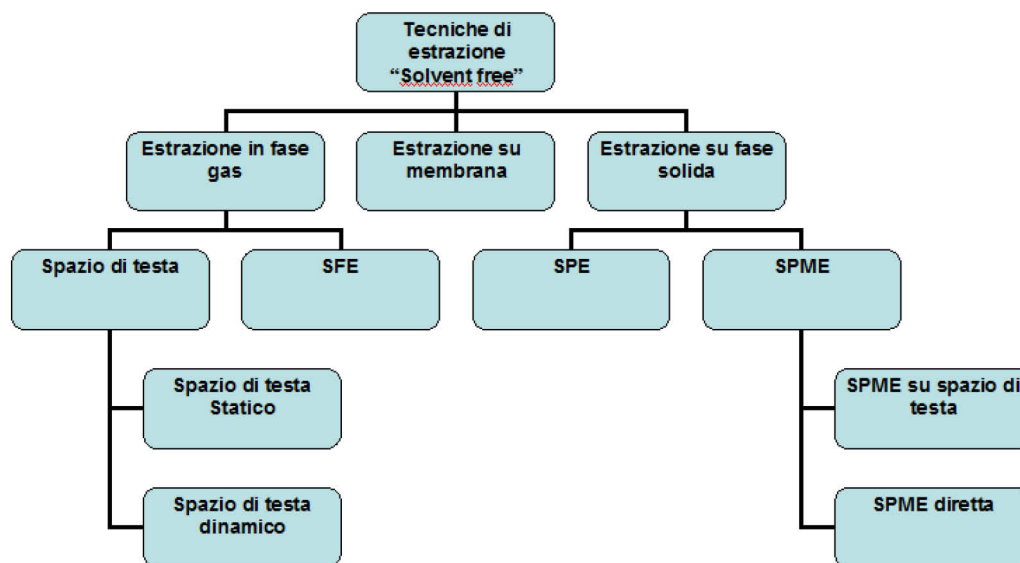


Figura 5.1 Schema 1 – Classificazione delle tecniche di estrazione per l’analisi di composti volatili

Di seguito vengono illustrati i principi delle tecniche che trovano maggiore applicazione nell’analisi dei formaggi.

5.3.2 Tecniche basate sull’analisi dello spazio di testa

Lo spazio di testa costituisce la fase vapore di un sistema binario eterogeneo in cui il campione rappresenta la fase condensata. Le tecniche di analisi dello spazio di testa sono di due tipi: spazio di testa statico, in cui l’estrazione degli analiti viene effettuata in condizioni di equilibrio; spazio di testa dinamico, in cui l’estrazione avviene in continuo. Di seguito vengono esposti principi, vantaggi e svantaggi delle tecniche che sfruttano l’analisi dello spazio di testa.

5.3.2.1 Spazio di testa statico

Le prime applicazioni all’analisi alimentare dello spazio di testa statico, accoppiato ai sistemi gas cromatografici (HS-GC) risalgono ai primi degli anni ’60.

Il campione viene pesato in un vial in modo che rimanga uno spazio vuoto tra campione e tappo del vial (spazio di testa). Dopo un certo periodo di tempo si stabilirà un equilibrio tra il campione e la fase vapore sopra di esso. Gli analiti volatili presenti nel campione si distribuiranno quindi tra la fase condensata e quella vapore, e la concentrazione relativa nelle due fasi dipenderà dalla pressione parziale di ciascun componente. Prelevando un'aliquota di fase vapore sarà possibile analizzare i composti volatili senza l'interferenza dovuta alla matrice.



Figura 5.2 Vial per SPME con campione di formaggio

La distribuzione dell'analita tra le due fasi è governata, all'equilibrio, da una costante $K = C_S/C_G$, in cui C_S e C_G sono le concentrazioni di analita nella fase solida e in quella vapore rispettivamente. Assumendo che il volume del campione non cambi durante questi processi ed operando alcune semplificazioni all'equazione del bilancio di

massa si ottiene: $C_G = \frac{C_0}{K + \beta}$, ove C_0 è la concentrazione iniziale di analita nel campione,

K è il coefficiente di ripartizione e β è il rapporto V_G/V_S (V_G è il volume della fase vapore, V_S è il volume del campione). Poiché K e β all'equilibrio sono costanti, la concentrazione dell'analita in fase vapore è proporzionale alla concentrazione iniziale dell'analita nel campione. Il coefficiente di ripartizione K è inversamente proporzionale alla pressione di

vapore e al coefficiente di attività dell'analita i -esimo considerato: $K \propto \frac{1}{p_i^0 \cdot \gamma_i}$. Pertanto,

un aumento della pressione di vapore parziale dell'analita indurrà una diminuzione del coefficiente di ripartizione dell'analita stesso, ed un contemporaneo aumento della concentrazione dell'analita nella fase vapore. Strategicamente si cerca di aumentare la

sensibilità analitica dello spazio di testa incrementando proprio la pressione di vapore dell'analita. Ciò solitamente si ottiene aumentando la temperatura del campione, in virtù della relazione $\log p_i^0 = -\frac{B}{T} + C$ in cui B e C sono costanti specifiche per ogni sostanza, oppure introducendo elettroliti al campione, in modo da ridurre le interazioni tra la matrice e l'analita.

5.3.2.2 Spazio di testa dinamico (Purge & Trap)

Uno degli inconvenienti della tecnica dello spazio di testa statico è legato al fatto che la matrice influenza l'equilibrio di ripartizione dell'analita tra la fase condensata e quella gassosa. Conseguentemente, le analisi dei composti caratterizzati da un elevato grado di affinità verso la matrice sono spesso caratterizzate da una sensibilità relativamente bassa. Essa è inoltre ulteriormente ridotta dal fatto che con la tecnica dello spazio di testa statico solo una piccola aliquota di fase vapore viene prelevata e inviata al gascromatografo.

Il sistema analitico dello spazio di testa dinamico ovvia a questi inconvenienti, in quanto esso prevede uno stadio di estrazione in continuo, il che comporta un aumento della concentrazione dell'analita nella fase vapore.

La tecnica del Purge & Trap (P&T), ad esempio, prevede che i composti organici - più o meno volatili - vengano estratti in continuo da una matrice liquida o solida e concentrati su una trappola di assorbimento (Figura 5.3). Gli analiti vengono desorbiti termicamente dalla trappola e concentrati nel sistema di iniezione del gascromatografo dove vengono separati e rilevati come singoli analiti. La tecnica del Purge & Trap è efficace per estrarre e concentrare composti organici volatili presenti in matrici solide e liquide (terreni, sedimenti, matrici acquose, alimenti, bevande, farmaci). La procedura di analisi consiste in tre step:

- fase di purge, con simultanea concentrazione degli analiti
- fase di desorbimento
- fase di condizionamento della trappola



Figura 5.3 Apparecchiatura per Purge & Trap. Sparger (Particolare)

Nella fase di purge, il campione (nello specifico formaggio grattugiato ed omogeneizzato) viene posto in un apposito contenitore di vetro (sparger, Figura 13), termostato ad una data temperatura ed attraversato da un flusso di gas inerte.

Gli analiti strippati dal campione vengono inviati in una colonna (trappola) di opportuno materiale adsorbente. Il flusso del gas impiegato nella fase di purge normalmente varia tra i 20 e i 50 ml/min. Man mano che la fase vapore viene allontanata dal campione, dell'altro analita tenderà a portarsi in equilibrio tra le due fasi, fino a quando tutte le molecole di interesse saranno state strippate. Alla fase di *purge* propriamente detta, ne segue una di *dry purge*, dove il gas inerte fluisce nella trappola per eliminare l'acqua eventualmente accumulatasi durante il passaggio del carrier attraverso il campione.

Durante la fase di desorbimento, la trappola di materiale adsorbente viene rapidamente portata ad elevate temperature (180-250°C, in funzione del tipo di materiale adsorbente). Questo favorisce il desorbimento degli analiti, che vengono allontanati tramite il passaggio del gas inerte e convogliati in una trappola crioscopica raffreddata a -125°C con azoto liquido. Gli analiti vengono, in tal modo, crio-focalizzati nell'iniettore del gascromatografo e successivamente iniettati in colonna.

Rispetto allo spazio di testa statico, in cui è possibile analizzare solo una porzione relativamente piccola di spazio di testa, il vantaggio più importante dello spazio di testa dinamico è rappresentato dal fatto che risulta possibile, almeno in linea di principio, inviare in colonna tutto l'analita presente nel campione. Ciò determina una sensibilità elevata, che permette di raggiungere limiti di determinabilità decisamente bassi.

La tecnica di P&T è stata utilizzata spesso e con buon successo per la caratterizzazione della frazione volatile di un gran numero di formaggi (Frank *et al.*, 2004). La sua applicazione richiede comunque apparecchiature altamente specifiche con costi di gestione piuttosto alti, dovuti in particolare al consumo di azoto liquido impiegato per garantire la criofocalizzazione. Alcune difficoltà operative rendono inoltre difficile la sua completa automazione, precludendone il suo impiego su larga scala. Questi motivi hanno recentemente inciso sulla scelta da parte degli utilizzatori di tecniche ed apparecchiature innovative per la caratterizzazione dei formaggi, quali ad esempio l'SPME-GC-MS

5.3.2.3 Microestrazione su fase solida (SPME)

La microestrazione su fase solida (SPME) è stata recentemente inventata da Pawliszyn nel 1989 (Belardi e Pawliszyn, 1989; Arthur e Pawliszyn, 1990), divenendo commercialmente disponibile a partire dal 1994. La tecnica si basa sull'utilizzo di una fibra rivestita con un materiale adatto per l'estrazione di piccole quantità di analiti da una miscela solida, liquida o gassosa. La microestrazione su fase solida si è rapidamente diffusa nel settore delle analisi ambientali, per coprire, più recentemente, molte altre applicazioni analitiche, dall'analisi degli alimenti alla chimica forense.

La tecnica SPME consta fondamentalmente di due passaggi (Magdic *et al.*, 1996). Inizialmente gli analiti vengono estratti dalla soluzione (o dallo spazio di testa) tramite assorbimento sulla fibra, successivamente essi vengono desorbiti ed iniettati nel gascromatografo. La fase di estrazione (Figura 5.4) si divide in tre momenti principali.

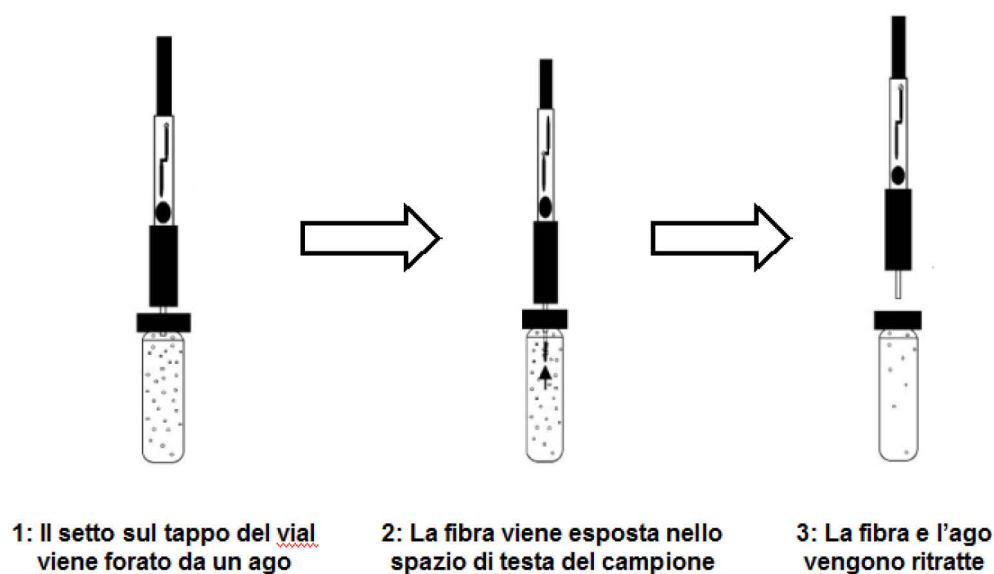
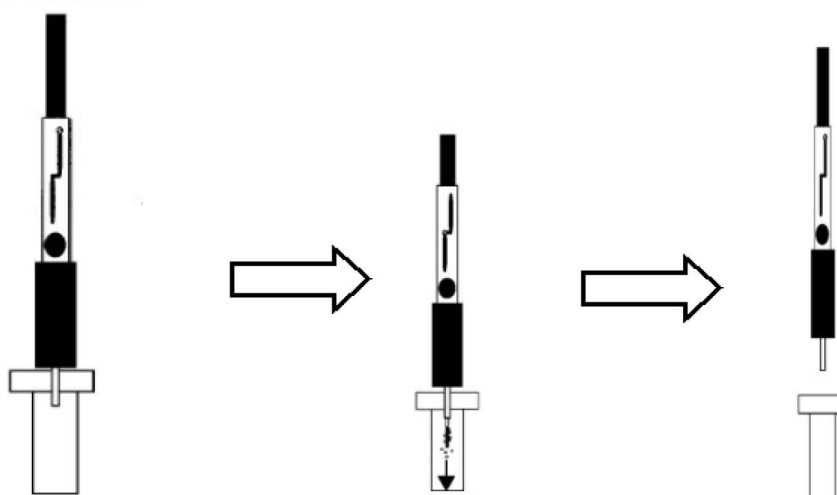


Figura 5.4 SPME: Fase di estrazione

Nella prima fase il tappo del vial contenente il campione viene forato da un ago che alloggia al suo interno la fibra. La fibra di silice su cui aderisce la fase stazionaria è infatti molto fragile, e necessita quindi di una opportuna protezione. A riguardo si impiega un sistema coassiale, in cui l'ago costituisce l'involucro esterno della fibra. Quando l'ago fora il setto, la fibra viene fatta fuoriuscire mediante un movimento telescopico rispetto all'ago stesso, ed esposta nello spazio di testa o, per immersione, direttamente nel campione. A questo punto ha inizio la fase di assorbimento/estrazione, durante la quale gli analiti diffondono verso la fibra in funzione della affinità per la fase stazionaria, della loro concentrazione e della loro tensione di vapore. Dopo un intervallo di tempo prefissato, la fibra viene ritratta all'interno dell'ago e il sistema viene allontanato dal campione.

Anche la fase di desorbimento (Figura 5.5) viene divisa in tre momenti.



1: L'ago contenente la fibra fora il setto dell'iniettore GC

2: La fibra viene esposta nel liner dell'iniettore e gli analiti vengono desorbiti termicamente

3: La fibra e l'ago vengono ritratte

Figura 5.5 SPME: Fase di desorbimento

L'ago contenente la fibra fora il setto dell'iniettore del GC. La fibra viene quindi esposta nel liner dell'iniettore all'interno del quale avviene il desorbimento termico degli analiti. Infine la fibra viene ritratta e l'intero holder estratto dall'iniettore del gascromatografo.

Rispetto ad altre tecniche di estrazione, la tecnica SPME offre diversi vantaggi in particolare per le sostanze volatili e semivolatili:

- ✓ è di semplice utilizzo, e può essere completamente automatizzata
- ✓ è una tecnica *solvent free*
- ✓ è a basso costo, in quanto gli unici materiali di consumo consistono nelle sole fibre, che peraltro possono essere riutilizzate per diverse estrazioni
- ✓ presenta una elevatissima sensibilità
- ✓ permette tempi di estrazioni variabili ed ottimizzabili
- ✓ non richiede ulteriori step di preparazione del campione
- ✓ permette il campionamento su campo

I principali svantaggi sono dovuti al fatto che il suo utilizzo per immersione diretta è limitato ai campioni liquidi acquosi caratterizzati da concentrazioni non troppo elevate di analita.

5.3.2.4 Fibre per SPME

Il tipo di fase stazionaria ha un ruolo di primaria importanza nel processo di estrazione SPME, pertanto è necessario scegliere opportunamente il tipo di fibra da utilizzare in relazione alle caratteristiche del/degli analiti. La fibra viene scelta essenzialmente in funzione della natura della fase stazionaria, del suo spessore e della sua lunghezza. Uno strato troppo spesso di materiale assorbente può dar luogo a fenomeni di trascinamento, poiché necessita di maggiore tempo per essere permeato (o desorbito). Generalmente si scelgono fibre con spessori relativamente contenuti (30-65 μm). Tuttavia l'impiego di una fibra con film sottile può non essere appropriato se il tipo di fase stazionaria non è sufficientemente selettivo per gli analiti di interesse e, al contrario, possiede molta affinità per composti che costituiscono la matrice. Le fibre SPME con film sottile sono quindi indicate per analiti che mostrano una elevata affinità verso quella specifica fase stazionaria, mentre per gli altri analiti è preferibile utilizzare fibre con un maggiore spessore di rivestimento.

In commercio (la ditta Supelco detiene il brevetto esclusivo per la vendita di fibre SPME) è disponibile un'ampia gamma di fibre, a fase stazionaria liquida o solida, con differente spessore e polarità (Tabella 5.1).

Tabella 5.1 Fasi stazionarie per SPME (SUPELCO)

Fase Stazionaria	Tipo di fase	Spessore del film (μm)	pH	Temperatura di desorbimento
PDMS	Non legata	100	2-10	200-280 °C
PDMS/DVB	Legata	65	2-11	200-270 °C
Poliacrilato	Legata	85	2-11	220-310 °C
CAR/PDMS	Legata	75	2-11	250-310 °C
CW/DVB	Legata	65	2-9	200-250 °C
DVB/CAR/PDMS	legata	50/30	2-11	230-270 °C

Le fasi liquide estraggono gli analiti dalla matrice per assorbimento. Poiché il processo non è competitivo, la composizione della matrice non influenza la quantità di

analita estratto, e ciò permette un range lineare molto ampio (Gorecki, 1999). Tra queste, le fibre a base di polidimetilsilossano (PDMS) sono quelle più diffuse. Essendo il PDMS una fase non polare molto versatile e robusta, essa è solitamente disponibile in un'ampia gamma di spessori di rivestimento, solitamente 7, 30 e 100 μm . Le fasi adsorbenti sono invece costituite da particelle solide porose legate sul capillare della fibra. In base al diametro dei pori queste particelle possono essere a micro-pori (< 20 Å), meso-pori (20-500 Å) e macro pori (>500 Å).

5.3.2.5 Considerazioni sull'impiego di fibre adsorbenti e diffusione delle tecniche SPME

La tecniche SPME-GC/MS trovano ampia applicazione nella caratterizzazione della frazione volatile dei formaggi molli semiduri e duri (Lee *et al.*, 2007; Innocente *et al.*, 2007; Vitova *et al.*, 2007; Mondello *et al.*, 2005; Mallia *et al.*, 2005).

La caratterizzazione dei formaggi mediante tecnica SPME è stata spesso impiegata nelle indagini volte a stabilire un legame tra le caratteristiche botaniche del pascolo e lo sviluppo di sostanze importanti nella definizione dell'aroma nei formaggi.

La comparazione delle due tecniche analitiche (P&T e SMPE) applicate all'analisi dell'aroma dei formaggi rivelano le migliori performances per le fibre SPME nell'analisi di composti acidi, mentre la tecnica P&T pare dare miglior risultati nell'analisi degli alcoli. Bisogna sottolineare inoltre che le condizioni operative ottimali per le due tecniche (temperature tempi di estrazione, natura delle fibre e del materiale adsorbente) sono alquanto differenti. Entrambe le tecniche si prestano comunque egregiamente a caratterizzare gli aromi di formaggi di diverso tipo, fornendo spesso informazioni complementari.

5.3.3 Gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS)

La separazione di analiti di rilievo in matrici casearie viene effettuata tramite gascromatografia utilizzando una colonna capillare ad elevata polarità. Normalmente viene impiegata come fase stazionaria un polietilenglicol (PEG). L'identificazione degli analiti viene effettuata tramite spettrometria di massa. Il sistema di ionizzazione

generalmente impiegato è l'impatto elettronico (EI). Questa è la modalità più classica di ionizzazione del campione, adatto per molecole di medio-basso peso molecolare (<800 Dalton), volatili e termicamente stabili. Il riconoscimento della molecola avviene sia tramite l'interpretazione dello spettro di massa ottenuto sia tramite il confronto dello stesso con gli spettri presenti nelle estese banche dati (librerie Wiley, Nist) di cui sono generalmente corredati i programmi di elaborazione.

Capitolo 6

Metodi analitici per la determinazione delle ammine biogene

Alcune delle maggiori applicazioni relative alla determinazione analitica delle ammine biogene nei prodotti alimentari riguardano:

- ✓ il controllo di qualità degli alimenti;
- ✓ il monitoraggio dei processi di fermentazione;
- ✓ il controllo dei processi di produzione;
- ✓ la ricerca e lo sviluppo in campo analitico.

In letteratura sono riportati diversi metodi analitici per la determinazione delle ammine biogene negli alimenti. Indipendentemente dalla procedura adottata, l'estrazione delle ammine dalla matrice alimentare rappresenta sempre un passaggio critico, a causa della disomogeneità nelle proprietà chimiche e chimico-fisiche degli analiti cercati. Tale criticità è spesso oggettivata in letteratura da metodi non sempre ben ottimizzati che spesso evidenziano recuperi analitici assai lontani dall'accettabilità.

Anche da questo punto di vista il formaggio si rivela essere matrice assai complessa, ed i metodi analitici sinora sviluppati comportano quasi sempre la necessità di una fase di estrazione acida seguita da un passaggio di purificazione liquido-liquido al fine di separare selettivamente le ammine dagli amminoacidi (Moret & Conte, 1996; Moret *et al.*, 1996).

6.1 Tecniche analitiche utilizzate per la determinazione delle ammine biogene nelle matrici alimentari

La determinazione delle ammine biogene di una qualsiasi matrice alimentare prevede numerosi passaggi chiave quali:

- ✓ estrazione acida del campione
- ✓ derivatizzazione

- ✓ purificazione dei prodotti
- ✓ separazione e determinazione analitica.

6.2 Estrazione acida

Le procedure di estrazione delle ammine biogene dalla matrice formaggio sinora proposte si differenziano innanzitutto per la natura dell'acido estraente.

Proposto da Moret *et al.* (1992, 1996 e 2005) e ripreso da Innocente *et al.* (2001, 2002 e 2007), l'acido cloridrico in concentrazione pari a 0.1 M è stato da diversi Autori (Martuscelli *et al.*, 2005; Gosetti *et al.*, 2007) riconosciuto essere un ottimo sistema estraente per ammine biogene in matrici casearie

Altri autori (Vale *et al.*, 1997; di Komprda, 2007), hanno confrontato differenti procedure di estrazione acida, utilizzando acidi di diversa natura quali il tricloroacetico (TCA), l'acido cloridrico ed il metanolo, i risultati ottenuti hanno confermato che, l'acido cloridrico è il miglior mezzo estraente per quanto riguarda sia ripetibilità che i recuperi.

Anche l'acido perclorico (HClO₄) risulta essere con successo utilizzato per l'estrazione delle ammine biogene sia da formaggi (Lanciotti *et al.*, 2007; da Pinho *et al.*, 2001) che da cioccolato (Pastore *et al.*; 2005).

6.3 Uso dello standard interno

La determinazione quantitativa delle ammine viene generalmente effettuata attraverso il metodo dello standard interno. Lo standard interno più utilizzato per l'estrazione delle ammine biogene da formaggio e da matrici vegetali è l'1,7 diamminoeptano. Esso viene aggiunto nella fase di estrazione (Innocente *et al.* 2001; Innocente *et al.*, 2002; Martuscelli *et al.*, 2005; Moret *et al.*, 2005; Innocente *et al.*, 2007), o aggiunto direttamente al campione (Komprda *et al.*, 2007). Altri standard interni in passato utilizzati sono il 2-ammino-3-fenil-1-propanolo (Fernández-García *et al.*, 2000) e l'1,7 diamminopentano (Marino *et al.*, 2000).

6.4 Derivatizzazione

La derivatizzazione di un analita viene generalmente effettuata per poter accrescere la sensibilità del metodo durante la fase di rivelazione strumentale. L'agente derivatizzante può agire incrementando la volatilità o la stabilità della molecola che si vuole identificare.

La volatilità di un'analita viene generalmente incrementata attraverso la derivatizzazione dei gruppi funzionali polari (-OH, -NHR, -SH, -COOH) che, in forma libera, hanno la capacità di formare legami ad idrogeno e rendono la molecola meno volatile. Per le molecole di piccole dimensioni l'incremento del peso molecolare realizzato attraverso la derivatizzazione determina invece una riduzione della volatilità. In questo caso la derivatizzazione consente inoltre di diminuire la polarità della molecola dando origine a picchi molto più netti e stretti durante la sua rivelazione.

I derivatizzanti che vengono comunemente usati in cromatografia liquida hanno la funzione di migliorare il coefficiente di assorbimento molare nell'UV-Visibile o rendere fluorescenti gli analiti.

Nei metodi riportati in letteratura e riguardanti la determinazione delle ammine biogene, la maggior parte degli approcci analitici utilizza la derivatizzazione diretta dell'estratto acido, che rende più veloce la successiva separazione e consente di ottenere recuperi migliori (Moret et al., 1996).

L'agente derivatizzante più utilizzato in cromatografia liquida (HPLC) è il 5-dimetilamminonafalene-1-solfonil cloruro, dansil cloruro, DCI, (Moret et al., 1996; Marino et al., 2000; Martuscelli et al., 2005; Innocente et al., 2007; Komprda et al., 2007; Lanciotti et al., 2007; Bouton et al., 2009); mentre agenti meno usati paiono essere il 4-dimetilammino-azobenzen-4-solfonil cloruro, (Krause et al., 1995; Pinho et al. 2001) e l'oftaldeide (OPA) (Moret et al., 2005; Giuffrida et al., 2006).

Khuhawar et al., (1999) hanno riportato la determinazione di putrescina e cadaverina nel siero di pazienti affetti da cancro utilizzando una tecnica gascromatografica che impiega come agente derivatizzante il trifluoroacetilacetone. Il metodo ha mostrato una buona sensibilità con un intervallo di calibrazione lineare di 0.5-0.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^{-3}$ per entrambe ammine.

In genere tutti i metodi di derivatizzazione che precedono la separazione in cromatografia liquida richiedono una procedura multi-step che include un passaggio di estrazione con solvente. Tali approcci non sono purtroppo suscettibili di automazione o integrazione all'interno dei sistemi strumentali. Inoltre le interazioni con la matrice tendono a provocare interferenze ed artefatti nell'analisi.

Approcci alternativi alla estrazione in fase liquida e successiva derivatizzazione prevedono l'uso della spettrometria di mobilità ionica (IMS) e derivatizzazione su fibra. Un'altra procedura di derivatizzazione su fibra fa uso della tecnica di microestrazione su fase solida (SPME) ed è stata utilizzata in matrici complesse. Un esempio di tale approccio è stato descritto per la derivatizzazione ed estrazione simultanea di cinque farmaci anfetaminici in campioni di urina. Il metodo prevede la determinazione tramite GC-MS delle ammine, derivatizzate con anidride eptafluorobutirrica e cloruro eptafluorobutirrico, ed estratte dallo spazio di testa tramite SPME (Ali Awan *et al.*, 2008).

6.5 Purificazione dei prodotti

Al passaggio di estrazione acida e di derivatizzazione segue uno stadio di purificazione atto a separare le ammine biogene derivatizzate da altri ammino composti. Di solito viene effettuata una estrazione liquido-liquido utilizzando n-butanolo come solvente di estrazione (Voigt *et al.*, 1974; Moret *et al.*, 1996; Vale *et al.*, 1997; Innocente *et al.*, 2001; Innocente *et al.*, 2002), ma è stata anche proposta la miscela n-butanolo - cloroformio (Moret *et al.*, 1992).

I due metodi di estrazione-purificazione sono stati confrontati in un lavoro di Moret *et al.*, (1996). Sebbene i due sistemi estraenti appaiano essere simili tra loro, la miscela n-butanolo-cloroformio sembra consentire l'ottenimento di recuperi migliori su putrescina, cadaverina, spermina e spermidina, mentre utilizzando n-butanolo puro si migliorano i recuperi di triptamina e istamina. La miscela n-butanolo-cloroformio presenta inoltre il vantaggio di evaporare in tempi più brevi, tuttavia nel caso del formaggio non può essere utilizzata in quanto, durante la fase di ripartizione liquido-liquido, si ha spesso la formazione di un gel che impedisce il recupero della fase organica. Comunque se il formaggio non ha subito un eccessivo processo di proteolisi, il passaggio di purificazione può – almeno in linea di principio - essere evitato.

In un lavoro di Vale *et al.*, (1997) la capacità estraente del n-butanolo è stata confrontata con quella dell'etere etilico, e quest'ultimo solvente è risultato essere maggiormente efficiente. Più recentemente, Gosetti *et al.*, (2007) hanno fatto uso della tecnica di estrazione in fase solida (SPE), ottenendo nel formaggio performances migliori rispetto a quelle evidenziate dalle classiche tecniche di estrazione liquido-liquido.

6.6 Tecniche di separazione

Nel corso degli anni sono stati proposti diversi metodi strumentali che consentono di separare e quantificare le singole ammine biogene presenti nei vari alimenti. I metodi riportati in letteratura utilizzano tecniche di cromatografia su strato sottile (TLC), gascromatografia (GC), elettroforesi capillare (CE) e cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC).

6.6.1 Cromatografia su strato sottile

La cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography*, TLC) fa parte di quelle tecniche dette "planari", in quanto fanno uso di uno strato piano e relativamente sottile di materiale che può sostenersi da solo o rivestire una superficie di vetro, plastica o metallo. La fase mobile si muove attraverso la fase stazionaria piana per capillarità, talvolta aiutata dalla forza di gravità o dall'applicazione di un potenziale elettrico. Tra queste tecniche, quella su strato sottile è sicuramente la più veloce e la più sensibile, e mostra una risoluzione migliore rispetto alla corrispondente tecnica su carta.

La tecnica cromatografica su strato sottile con doppio sviluppo monodimensionale, è stata usata, con un sistema solvente cloroformio/etere/trietilammina (6:4:1, v/v/v) seguito da cloroformio/trietilammina (6:1, v/v), per la separazione e determinazione dei dansil derivati di 8 ammine biogene. La determinazione quantitativa di queste ammine è stata poi eseguita con densitometria a 254 nm (Onal, 2007).

6.6.2 Elettroforesi capillare

L'elettroforesi è un processo che si basa sulla separazione di specie cariche (ioni o particelle colloidali) sfruttandone le diverse velocità di migrazione in seguito alla generazione di un campo elettrico. È una tecnica molto utilizzata dagli studiosi di biochimica e biologia molecolare per separare, isolare e analizzare proteine, polinucleotidi ed altri biopolimeri.

La più diffusa di queste tecniche è l'elettroforesi capillare (CE), che a sua volta presenta alcune varianti, come l'elettroforesi capillare a zone (CZE) oppure l'elettroforesi capillare ad elevate prestazioni (HPCE).

Le ammine biogene presenti in alcuni alimenti (salame, formaggio, vino, e birra) sono state determinate attraverso la separazione dell'estratto acido tramite elettroforesi capillare (CE) diretta, evitando il passaggio della derivatizzazione o purificazione del campione. Le ammine sono state rivelate con rivelatore conduttimetrico (Onal, 2007).

L'elettroforesi capillare a zona (CZE) è metodo molto sensibile per l'analisi simultanea di istamina e istidina, usando come metodo di rivelazione la fluorescenza a lampada-indotta. Il naftalene-2,3-dicarbossaldeide (NDA) è stato utilizzato come reagente di derivatizzazione in fluorescenza (Zhang *et al.*, 2004). In un altro lavoro di Zhang (2004) è stata descritta la determinazione di istamina e poliammide nel tabacco attraverso l'utilizzo di CE e rivelazione a fluorescenza lampada-indotta con 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzossadiazolo come reagente di derivatizzazione (Zhang *et al.*, 2005). Utilizzando le stesse condizioni, altri autori hanno separato 7 ammine biogene (Kvasnicka *et al.*, 2006).

La CZE è stata utilizzata da Cortacero-Ramírez *et al.* (2007), usando acetone come modificatore organico e rivelazione a fluorescenza laser-indotta (LIF). Gli stessi autori hanno determinato alcune ammine biogene nelle birre e in campioni del processo di fabbricazione della birra dopo derivatizzazione con fluoresceina isotiocianato (FITC).

Le ammine biogene nel latte sono state separate e quantificate mediante CE con rivelazione amperometrica pulsata (PAD) (Sun *et al.*, 2003).

L'accoppiamento di un dispositivo di campionamento gas estraente, integrato in CFS, con uno strumento per elettroforesi capillare ha consentito di separare e determinare ammine volatili direttamente in campioni di pesce. Questa disposizione ha

permesso l'introduzione diretta del campione solido con un elevato livello di automazione (Lista *et al.*, 2001).

Arce *et al.*, (1998) hanno messo a punto un metodo ad iniezione di flusso multipla (FI) per automatizzare la determinazione delle ammine biogene nel vino usando CE con rivelazione UV indiretta. Il metodo implica, nel sistema di iniezione a flusso, la purificazione dei campioni di vino tramite l'uso di cartucce a scambio ionico e un passaggio di preconcentrazione. La metodologia proposta consente di determinare un largo intervallo di ammine biogene in meno di 10 minuti.

Le ammine biogene presenti nei pesci, nel vino e nelle urine sono state derivatizzate con o-ftalaldeide, e poi tenute a 5°C per permettere la formazione di complessi di inclusione con metil- β -ciclodestrina. I derivatizzati sono stati separati e rivelati tramite elettroforesi capillare ciclodestrina-modificata con rivelazione UV o a fluorescenza laser-indotta (LIF) (Male *et al.*, 2001).

La CE è stata interfacciata con iniezione di flusso multipla consentendo lo sviluppo di un approccio automatico per la determinazione di ammine biogene in campioni solidi (Ruiz-Jiménez *et al.*, 2006).

È stato riportato un metodo di rivelazione a chemiluminescenza on-line con elettroforesi capillare per ammine biogene (metilendiammina, putrescina, cadaverina e diamminoesano) marcate con N-(4-amminobutil)-N-etilsoluminolo (Liu *et al.*, 2003).

6.6.3 Cromatografia capillare elettrocinetica micellare

La tecnica elettroforetica capillare non è adatta alla separazione di analiti non carichi, motivo per cui è stata modificata per poter separare sostanze come i fenoli e i composti nitroaromatici a basso peso molecolare. È stata così ideata la cromatografia capillare elettrocinetica micellare (MECC), che utilizza un tensioattivo (ad es. il dodecilsolfonato di sodio) capace di formare delle micelle in soluzione tampone acquosa. La superficie delle micelle presenta una forte carica negativa che le porta a muoversi verso l'elettrodo positivo. Quando un campione viene introdotto in questo sistema, i suoi componenti si distribuiscono tra la fase acquosa e la fase organica contenuta nelle micelle, in base alla propria polarità (Skoog *et al.*, 2000).

In vini rossi francesi dalla regione Cahors, durante un periodo di 14 anni di maturazione, sono stati quantificati 28 analiti tra ammine biogene e amminoacidi mediante separazione cromatografica elettrocinetica micellare (MECC) e rivelazione a fluorescenza laser-indotta (LIF) dei corrispondenti derivatizzati con fluoresceina tiocarbammato (Nouadje *et al.*, 1997).

Altri autori hanno applicato il metodo MECC con rivelazione LIF per la determinazione di ammine biogene derivatizzate utilizzando come reagente fluorogenico il 3-(2-furoil)crinolina-2-carbossaldeide (Liu *et al.* 2003). Il metodo è stato anche usato per la determinazione di ammine biogene in estratti da foglie di tabacco.

Le ammine biogene, presenti in alcune birre imbottigliate, sono state separate e quantificate come N-benzammidi tramite la MECC (Kalac *et al.*, 2002).

Utilizzando come agente derivatizzante il 6-amminochinolin-N-idrossisuccinimidil carbammato sono state determinate le ammine biogene, tramite MECC, presenti in diversi alimenti quali vino, salame ed erba cipollina (Kovacs *et al.*, 1999).

6.6.4 Cromatografia ionica e biosensori elettrochimici.

La cromatografia ionica si utilizza per la separazione e determinazione di ioni utilizzando resine a scambio ionico. I processi a scambio ionico si basano sugli equilibri di scambio tra ioni in soluzione e ioni con carica di ugual segno presenti sulla superficie di un solido insolubile ad alto peso molecolare le cosiddette resine. Le resine possono essere di origine naturale (argille o zeoliti) o più frequentemente di origine sintetica.

I biosensori sono dei trasduttori costituiti da elettrodi a membrana o sonde sensibili ai gas, che permettono di determinare molecole organiche complesse con la stessa velocità e facilità che caratterizzano le determinazioni ionoselettive delle specie inorganiche (Skoog, *et al.*, 2000).

Alcuni autori hanno messo a punto un biosensore elettrochimico per la determinazione delle ammine biogene in prodotti alimentari. Il biosensore è stato utilizzato per misurare la variazione del contenuto di ammine nelle acciughe, durante il tempo di maturazione; nello stesso lavoro le determinazioni analitiche sono state eseguite utilizzando sia il biosensore che la cromatografia ionica con rivelazione

amperometrica pulsata integrata (IC-IPAD) (Draisci *et al.*, 1998). Un biosensore a matrice enzimatica è stato messo a punto per la determinazione di 3 ammine biogene (istamina, tiramina e putrescina) in diversi campioni di cibo (Lange *et al.*, 2002).

Utilizzando la spettrometria a mobilità ionica è stato monitorato il deterioramento di alcune carni (pollo, tacchino, bue, maiale e pesce) attraverso la quantificazione delle ammine biogene (Karpas *et al.*, 2002).

6.6.5 Gascromatografia

Fernandes *et al.*, (2000) hanno sviluppato un metodo gas cromatografico accoppiato alla spettrometria di massa (GC-MS) in modalità SIM, per la determinazione delle ammine biogene nel vino Porto, usando anidride eptafluorobutirrica come reagente derivatizzante. È stato recentemente pubblicato un metodo gas cromatografico che consente, in tempi ridotti (meno di 20 minuti) di determinare l'istamina nei pesci e nei prodotti ittici; rispetto al metodo classico l'istamina viene iniettata in colonna senza alcuna derivatizzazione (Onal, 2007).

6.6.6 Cromatografia liquida ad elevate prestazioni, HPLC

Le colonne più utilizzate per la separazione delle ammine biogene in HPLC sono la Spherisorb 3S TG 150 x 4.6 mm I.D., 3 µm (Moret *et al.*, 1996; Pinho *et al.*, 2001; Martuscelli *et al.*, 2005; Moret *et al.*, 2005) e la RP-Kromasil KR 100-5 C18 (Innocente *et al.*, 2002, Moret *et al.*, 2005; Innocente *et al.*, 2007) con le quali le ammine vengono separate in gradiente di eluizione. Molti autori riportano l'uso del rivelatore UV accoppiato all'analisi HPLC, ma, a causa della bassa volatilità e alla mancanza di gruppi cromofori nella struttura della maggior parte delle ammine biogene, la larga maggioranza degli autori impiegano il rivelatore a fluorescenza con tecniche di derivatizzazione precolonna o postcolonna (Onal, 2007).

Questi metodi permettono la determinazione quantitativa delle ammine sia individualmente che simultaneamente nei cibi.

Capitolo 7

PARTE SPERIMENTALE 1

Messa a punto e validazione del metodo per la determinazione delle ammine biogene nei formaggi

7.1 Introduzione

Le procedure per la determinazione delle ammine biogene negli alimenti trovano ampio spazio in letteratura. Diversi autori hanno lavorato sulla determinazione delle ammine biogene in alimenti differenti quali formaggio, pesce e carne. Relativamente ai formaggi prodotti da latte ovino, le informazioni pubblicate sono generalmente scarse e - nello specifico - del tutto assenti per i formaggi ovini prodotti in Sardegna.

Nel presente lavoro di tesi si è cercato di mettere a punto e validare una metodologia analitica volta alla determinazione del contenuto di ammine biogene nei formaggi ovini prodotti in Sardegna. Nello specifico, si è voluto applicare il metodo di cui sopra al formaggio "Fiore Sardo" DOP che, per sue peculiarità tecnologiche, potrebbe favorire l'instaurarsi di condizioni ambientali (quali una elevata carica batterica) ideali per lo sviluppo di tali analiti.

I metodi analitici già pubblicati e ampiamente discussi nel Capitolo 6 prevedono quasi sempre una fase di estrazione acida seguita da un passaggio di purificazione liquido-liquido, il cui scopo è quello di separare selettivamente le ammine biogene dagli amminoacidi presenti nella matrice (Moret *et al.*, 1996). A tale passaggio segue sempre uno stadio di derivatizzazione diretta dell'estratto acidico. La derivatizzazione delle ammine biogene ha lo scopo di agevolare la successiva fase di separazione, rendendola più veloce e consentendo allo stesso tempo di ottenere maggiori recuperi. La separazione finale dei derivati delle ammine avviene generalmente mediante l'uso di tecniche HPLC, che consentono una elevata risoluzione e sensibilità, accoppiate ad un rivelatore DAD, UV o rivelatori in fluorescenza (Moret *et al.*, 2005, Martuscelli *et al.* 2005, Innocente *et al.*, 2007).

Prendendo spunto da alcuni lavori presenti in letteratura (Martuscelli *et al.* 2005, Innocente *et al.*, 2007) è stata sviluppata una metodica analitica in grado di determinare quantitativamente e simultaneamente 8 ammine biogene (cadaverina (CAD), istamina (HIS), feniletilamina (PHE), putrescina (PUT), spermidina (SPD), spermina (SPM), triptamina (TRP) e tiramina (TYR).

7.2 Ottimizzazione della procedura analitica per la determinazione delle ammine biogene

A causa della elevata volatilità che caratterizza le ammine biogene tal quali, per la preparazione delle soluzioni standard sono stati utilizzati sempre i relativi standard in forma cloridrata, tutti aventi purezza maggiore del 99% (Sigma Aldrich).

7.2.1 Scelta del derivatizzante

In cromatografia liquida la derivatizzazione degli analiti viene effettuata al fine di incrementarne la sensibilità analitica nei confronti di uno (o più..) specifici rivelatori (che generalmente sono lo spettrofotometro UV-Vis o lo spettrofluorimetro).

Le tecniche di derivatizzazione si possono suddividere in derivatizzazioni pre-column e derivatizzazioni post-column. Nelle prime la reazione di derivatizzazione viene effettuata direttamente sul campione da analizzare, iniettando poi la miscela di reazione nella colonna cromatografica. In alternativa la derivatizzazione può essere compiuta dopo la separazione cromatografica, ma ovviamente prima della rivelazione.

L'apparecchiatura necessaria alla derivatizzazione pre-column è abbastanza semplice: è sufficiente, infatti, condurre la reazione in una provetta con tappo a tenuta in un termostato. La procedura di derivatizzazione pre-column presenta diversi vantaggi, che vanno dalla scelta di un'ampia gamma di solventi all'assenza di requisiti cinetici specifici per la derivatizzazione (vale a dire che la reazione di derivatizzazione può anche essere non eccessivamente veloce). La stessa tecnica comporta però alcuni svantaggi: innanzitutto l'eccesso d'agente derivatizzante, l'eventuale catalizzatore, il tampone, ed il solvente possono complicare il profilo cromatografico. Ogni campione richiede una preparazione individuale ed è necessario l'uso di uno standard interno, infatti la resa della reazione di derivatizzazione può non essere né quantitativa, né riproducibile.

Nella procedura di derivatizzazione post-column si inserisce, tra la colonna cromatografica e il rivelatore, un condotto aggiuntivo, costituito da un tubo di arrivo ed una pompa peristaltica che favorisce la miscelazione dei vari analiti del campione, separati dalla colonna, con il reagente derivatizzante. In questo caso la reazione di

derivatizzazione deve essere necessariamente veloce. I tempi di reazione ottimali devono essere infatti non superiori a 30-40 sec. Anche la scelta del solvente da usare per il derivatizzante è soggetta a limitazioni: esso deve infatti essere compatibile con la fase mobile; gli effetti di miscelazione possono infine sfavorire una buona separazione. La tecnica presenta comunque dei vantaggi quali l'assenza di preparazioni specifiche e di manipolazioni per il campione; è possibile un'automatizzazione del metodo con grandi giovamenti per la riproducibilità; non si ha lo "sporco" del cromatogramma, in quanto i reagenti usati per la derivatizzazione non entrano in colonna.

Nella cromatografia liquido-liquido si usa preferenzialmente la derivatizzare pre-column, salvo casi particolari in cui si contare su reazioni di derivatizzazione pressoché istantanee.

Dall'esame dei metodi analitici relativi alla determinazione HPLC di ammine biogene in prodotti alimentari emerge che non esiste ancora una tecnica di derivatizzazione di riferimento. Sono stati utilizzati diversi approcci, impieganti dansil cloruro, dabsil cloruro, *o*-ftaldeide, fluoresceina isotiocianato, diclorotriazinilamino-fluoresceina, benzoil cloruro e fenilisotiocianato. L'*o*-ftaldeide rappresenta una buona scelta quando si debbano determinare simultaneamente sia ammine che amminoacidi liberi, ma richiede rivelazione spettrofluorometrica e lunghi tempi di eluizione. Risultati interessanti e tempi di analisi brevi sono comunque stati ottenuti utilizzando la procedura di derivatizzazione pre-column con dansil cloruro (DCI) (Martuscelli *et al.*, 2005; Innocente *et al.*, 2007; Gennaro *et al.*, 2003; Moret *et al.*, 1996).

Il DCI ha la capacità di reagire sia con le ammine primarie che secondarie, ma anche con i gruppi fenolici. Tale derivatizzazione consente l'introduzione, nella molecola dell'analita, di un gruppo cromoforo capace di incrementare l'assorbimento UV-Vis.

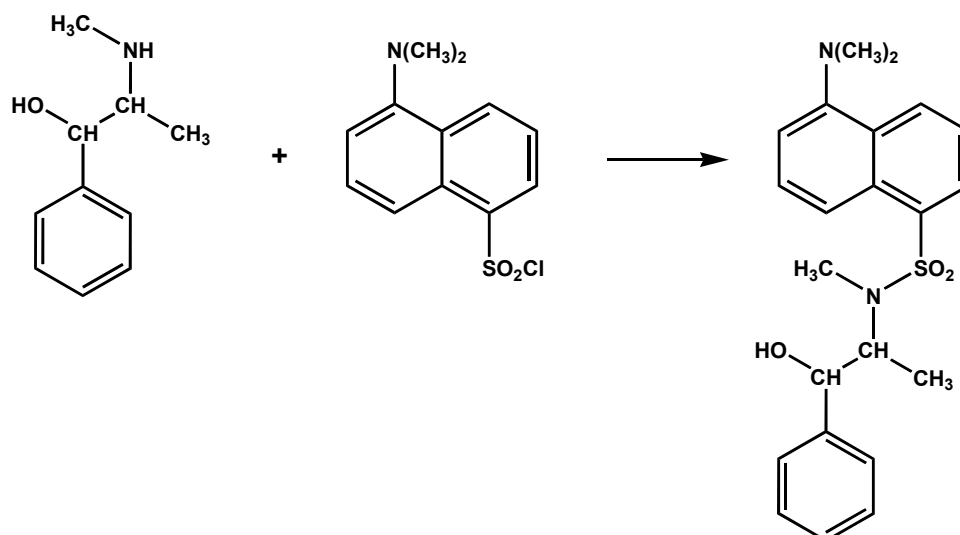


Figura 7.1 Reazione del dansil cloruro con un'ammina

Affinchè la reazione proceda speditamente è necessario bloccare con una base l'acidità libera che si sviluppa. A tal scopo si impiega lo ione idrogeno carbonato (HCO_3^-), in grado di neutralizzare l'acido cloridrico che si libera. La lentezza della reazione ne pregiudica l'impiego in derivatizzazione post-column.

Il dansil cloruro viene generalmente utilizzato in soluzione acetonica, a concentrazioni comprese tra 5 e 20 mg/ml (Moret *et al.*, 1992; Martuscelli *et al.*, 2005; Innocente *et al.*, 2007). Nel presente lavoro l'ottimizzazione della reazione ha permesso di evidenziare che la concentrazione ideale del DCl è pari a 10mg/ml.

7.2.2 Neutralizzazione del derivatizzante ed estrazione con solvente

Lo stadio di derivatizzazione è sempre seguito dalla neutralizzazione del DCl in eccesso. La letteratura riporta l'utilizzo di due possibili agenti neutralizzanti: una soluzione acquosa di L-prolina (C =100 mg/ml) o una di NH_3 al 30% (Innocente *et al.*, 2007; Martuscelli *et al.*, 2005).

Nel presente lavoro di tesi è stata, inizialmente, seguita la procedura di neutralizzazione proposta nel lavoro di Innocente del 2007, che prevede l'utilizzo di 200 μL di una soluzione di L-prolina (100 mg/ml) come reagente per neutralizzare l'effetto del dansil cloruro in eccesso. Tuttavia, anche per elevate concentrazioni di L-prolina il

derivatizzante in eccesso non veniva neutralizzato, determino pertanto problemi di risoluzione con il picco dello standard interno (Figura 7.2, cromatogramma A). Si è riusciti ad ovviare a questo inconveniente ed eliminare ogni traccia di DCI in eccesso utilizzando come reagente di neutralizzazione una soluzione acquosa di NH_3 al 30% (200 μL) come riportato da Martuscelli nel 2005 (Figura 7.2, cromatogramma B).

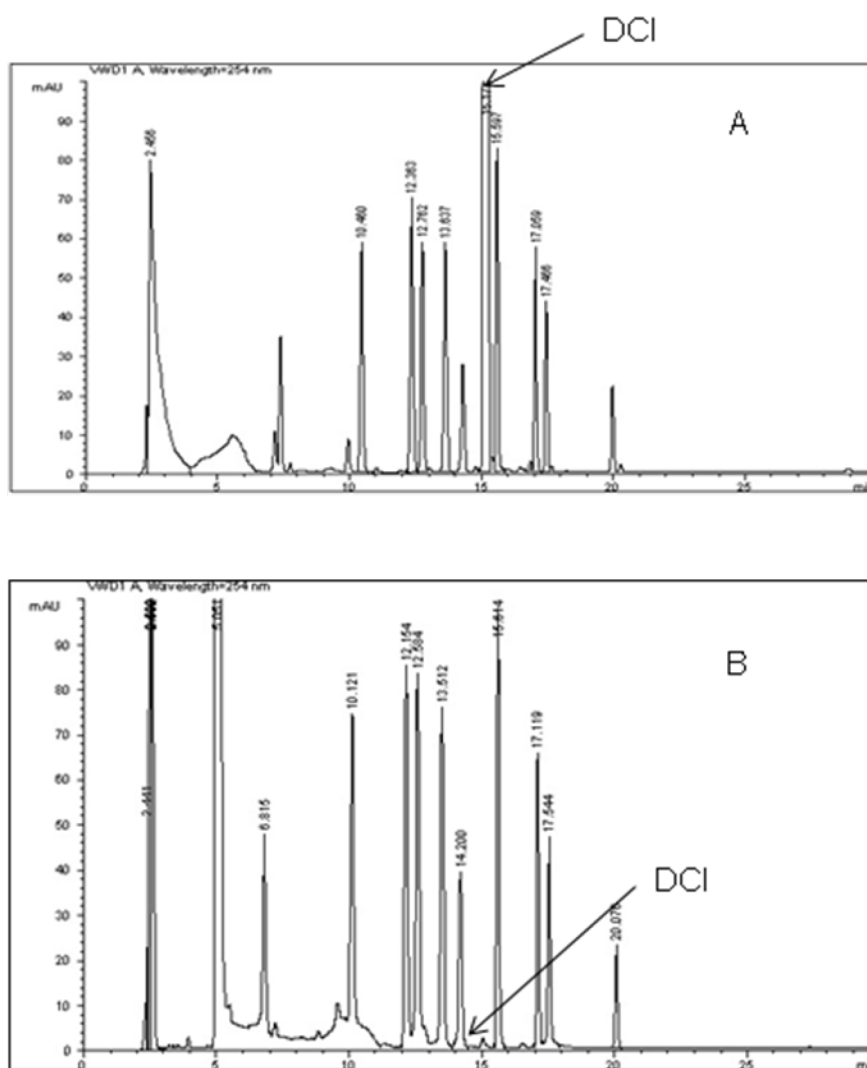


Figura 7.2 A, Cromatogramma con DCI; B, cromatogramma senza DCI

Le ammine derivatizzate vengono poi estratte dal mezzo di reazione. Questa operazione è stata effettuata con etere etilico, in accordo a quanto riportato da Vale *et al.*, (1997).

7.2.3 Separazione HPLC dei DCI-derivatizzati

La separazione delle ammine biogene derivatizzate è stata effettuata tramite cromatografia liquida traendo ispirazione dalle condizioni descritte da diversi Autori (Moret & Conte, 1996a; Moret *et al.*, 1996b; Moret *et al.*, 2005; Innocente *et al.*, 2007).

Nello specifico le condizioni utilizzate sono le seguenti:

HPLC 1100 Agilent Technologies (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)

Volume di iniezione di 10 μ L

Precolonna: Guard- RP, HI-5RP-10C5/K (Agilent Technologies)

Colonna: Kromasil KR 100-5 C18, 250 mm x 4.6 mm (Agilent Technologies), termostata a 30°C.

Flusso 0.8mL/min.

Programma di eluizione come riportato di seguito:

Tabella 7.1 Programma di eluizione utilizzato

Tempo (min)	A(%)	B(%)
0	65	35
1	65	35
10	80	20
12	90	10
16	100	0
30	100	0
Post run		
30.1	65	30
35	65	30

A = acetonitrile, B = acqua

La durata della corsa (incluso il post run) è di 35 min.

Rivelatore Spettrofotometro UV-Vis a lunghezza d'onda fissa $\lambda = 218$ nm (Agilent Technologies).

7.2.4 Rivelazione spettrofotometrica e scelta della lunghezza d'onda di assorbimento

La rivelazione degli analiti è avvenuta tramite spettrofotometria UV-Vis. La lettura degli assorbimenti è stata effettuata, inizialmente, ad una lunghezza d'onda di 254 nm, così come riportato in letteratura per questa tipologia di analiti (Moret *et al.*, 1992; Martuscelli *et al.*, 2005; Innocente *et al.*, 2007). Tuttavia l'ottimizzazione del metodo, effettuata tramite uno spettrofotometro UV-visibile a serie di diodi (DAD), ha permesso di evidenziare che, per tutti gli analiti, il massimo di assorbimento è localizzato a 218 nm. Tale lunghezza d'onda è quindi stata utilizzata per la rivelazione di tutti gli analiti.

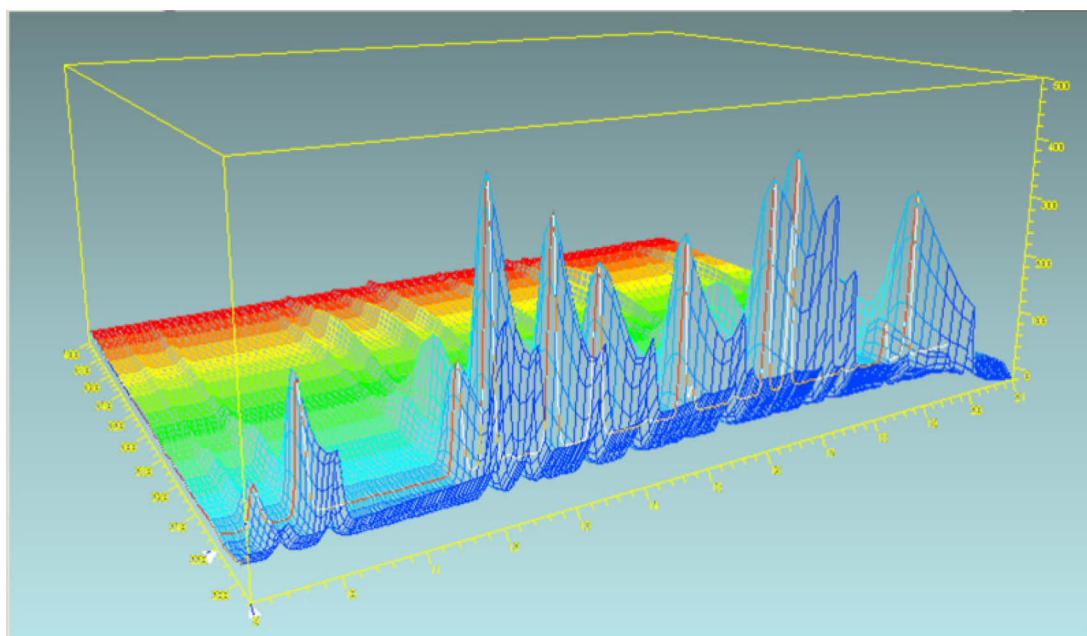


Figura 7.3 Spettro di assorbimento 3D (DAD) dei dansil derivati degli standard delle ammine biogene (soluzione a 5 ppm)

La Figura 7.3 oggettiva meglio le differenti sensibilità analitiche alle due lunghezze d'onda considerate.

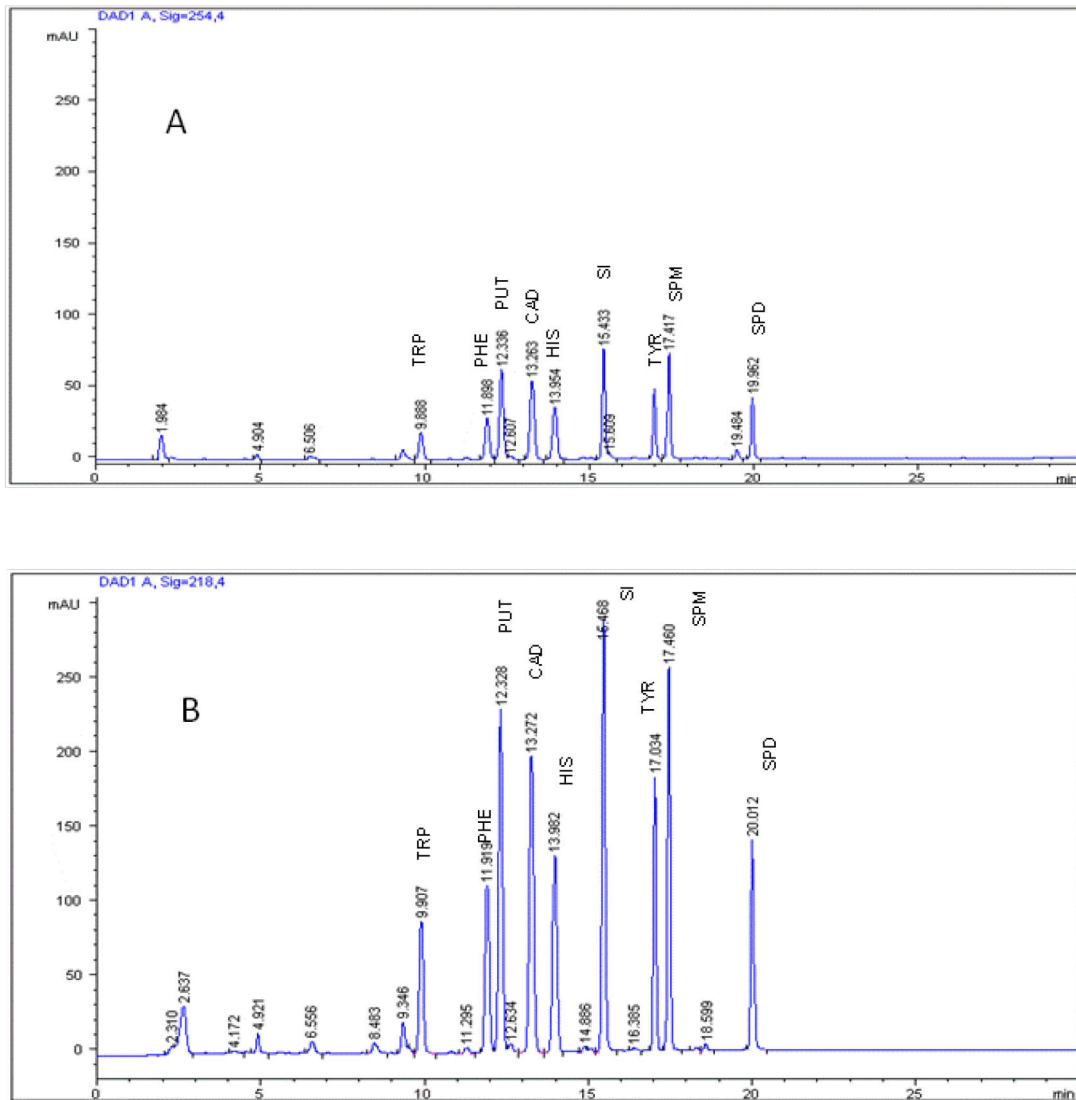


Figura 7.4 Cromatogramma A: standard di ammine biogene (5 $\mu\text{g/ml}$), lunghezza d'onda di 254 nm; cromatogramma B: standard di ammine biogene (5 $\mu\text{g/ml}$), lunghezza d'onda di 218 nm - rivelatore DAD. 1= TRP, 2=PHE, 3=PUT, 4=CAD, 5=HIS, 6=SI, 7=TYR, 8=SPM, 9=SPD.

7.2.5 Applicazione della procedura analitica ad una soluzione di standard.

Al fine di definire i tempi di ritenzione degli analiti ed ottimizzarne la separazione cromatografica è stata utilizzata una soluzione acquosa contenente tutte le ammine biogene in esame (triptamina (TRP), feniletilamina (PHE), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), istamina (HIS), tiramina (TYR), spermidina (SPD), spermina (SPM), e lo standard interno (1,7 diammino-eptano) ad una concentrazione di 10 mg/L, in analogia a quanto riportato in letteratura (Innocente *et al.*, 2007). La soluzione contenente le ammine

biogene e lo standard interno è stata derivatizzata utilizzando la procedura precedentemente descritta, e qui sinteticamente riportata di seguito.

Ad 1 ml della soluzione standard da 10 mg/L, posto in una provetta in vetro con tappo a vite in teflon, è stato aggiunto 1 ml di reagente DCI (10 mg/ml in acetone), la miscela di reazione è stata scaldata a 40°C per 60 minuti, agitando al vortex ogni 15 min per 15 sec. Per eliminare l'eccesso di DCI, vengono aggiunti 200 µl di una soluzione di ammoniaca da 300 g/L (NH₃ al 30%), la miscela di reazione viene quindi agitata al vortex per 1 min e lasciata al buio per 15 min a temperatura ambiente. I dansil derivati vengono estratti per tre volte dalla miscela di reazione con 1 ml di etere etilico. Gli estratti eteri riuniti vengono portati a secco sotto flusso di azoto (o aria), il residuo viene ridisciolto in 1 ml di acetonitrile (grado analitico per HPLC) e filtrato con filtri per siringa in PTFE (Phenomenex) da 0.2 µm in un vial di vetro da 2 ml. 10 µL della soluzione vengono iniettati in HPLC. Gli analiti sono stati separati e rivelati secondo le condizioni descritte nel paragrafo 7.2.3.

In Figura 7.5 è riportato il cromatogramma con tempi di ritenzione per ogni ammina identificata

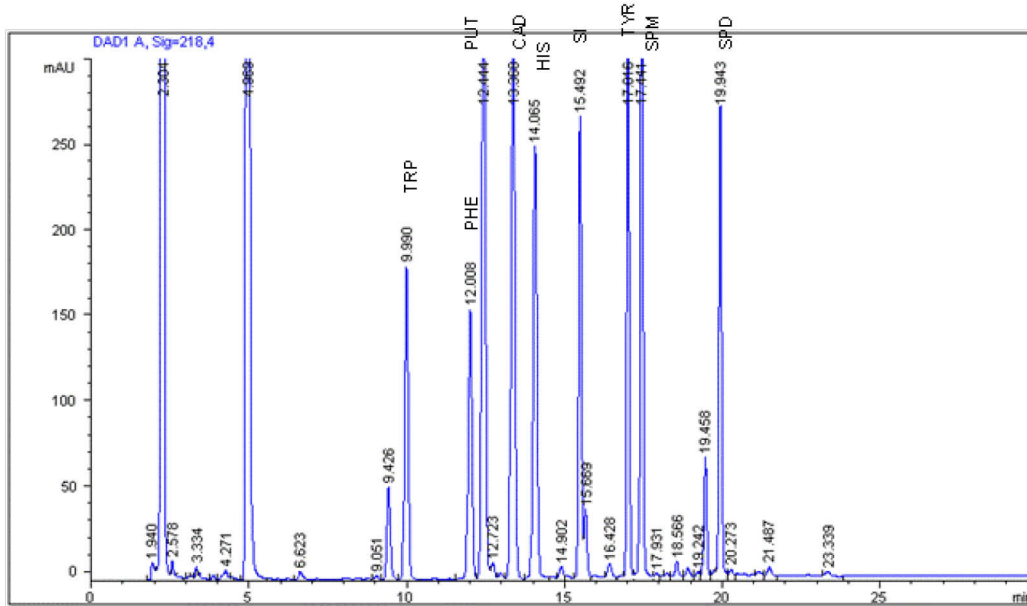


Figura 7.5 Tempi di ritenzione delle ammine standard (soluzione da 10 mg/L)

7.3 Costruzione della curva di calibrazione

7.3.1 Preparazione delle soluzioni standard per le curve di calibrazione

È stata preparata una soluzione acquosa madre da 1000 mg/L contenente tutti gli standard delle ammine biogene in forma cloridrata. Partendo dalla soluzione madre sono state preparate le diluizioni da utilizzare per la costruzione della curva di calibrazione (50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 1, 0.5 e 0.1 mg/L) in modo da ottenere un range di concentrazione da 0,25 mg/kg a 1250 mg/kg di formaggio, che sono state sottoposte alla procedura di derivatizzazione e analizzate in HPLC come descritto precedentemente.

7.3.2 Procedura di derivatizzazione delle soluzioni standard di calibrazione.

Ad 1 ml della soluzione standard di calibrazione, posta in una provetta in vetro con tappo a vite in teflon, è stato aggiunto 1 ml di una soluzione a 8 mg/L di standard interno (SI). Per la derivatizzazione è stato aggiunto 1 ml di DCI (soluzione a 10 mg/ml, in acetone). La miscela di reazione è stata lasciata per 60 minuti a 40°C agitando al vortex

ogni 15 min per 15 secondi. Per eliminare l'eccesso di DCI la miscela viene trattata con 200 µl di una soluzione di ammoniaca da 300 g/L (NH₃ al 30%) agitata al vortex per 1 min e lasciata al buio per 15 min a temperatura ambiente. I dansil derivati vengono estratti per tre volte dalla miscela di reazione con 1 ml di etere etilico. Gli estratti eteri riuniti vengono portati a secco sotto flusso di azoto (o aria), il residuo viene ridisciolti in 1 ml di acetonitrile (grado analitico per HPLC) e filtrato con filtri in PTFE da 0.2 µm (Phenomenex) in un vial di vetro da 2 ml. 10 µL della soluzione vengono iniettati in HPLC. Gli analiti sono stati separati e rivelati secondo le condizioni descritte nel paragrafo 7.2.3.

7.4 Ottimizzazione della procedura analitica per la determinazione delle ammine biogene nella matrice formaggio

7.4.1 Procedura di estrazione delle ammine biogene dal formaggio

La metodologia di estrazione delle ammine biogene dalla matrice formaggio è stata messa a punto traendo ispirazione dal metodo descritto da Martuscelli *et al.*, (2005). La procedura ottimizzata ed applicata nel presente lavoro di tesi è di seguito descritta.

A due grammi di formaggio, posti in provettoni da centrifuga in polietilene, sono stati aggiunti 20 ml di una soluzione contenente 20 mg/L di standard interno in HCl 0.1N. La miscela è stata omogeneizzata in Ultraturrax a circa 11000 giri per 2 minuti; il residuo del formaggio che aderisce all'asta dell'Ultraturrax è stato recuperato lavando l'asta con 2 ml circa di HCl 0.1N. La dispersione acquosa del formaggio è stata centrifugata per 20 minuti in centrifuga termostata a 4 °C a 3200 rpm. L'estratto acido surnatante è stato recuperato e trasferito in pallone tarato da 50 ml. La procedura di estrazione è stata ripetuta con ulteriori 20 ml di una soluzione di HCl 0.1N. Gli estratti acidi sono stati riuniti nello stesso matraccio da 50 ml che viene portato a volume con una soluzione di HCl 0.1N. Si filtra con filtro di carta Whatman 41.

7.4.2 Derivatizzazione dell'estratto acido

Un ml dell'estratto estratto acido è stato trasferito in una provetta da centrifuga in vetro munita di tappo a vite e setto in teflon. Sono stati aggiunti 0.5 ml di una soluzione satura di NaHCO_3 e 1 ml della soluzione del derivatizzante DCl (10 mg/ml, in acetone). Dopo essere stata agitata al vortex per 1 minuto, la miscela di reazione viene termostata a 40 °C per 60 minuti, agitando (al vortex) ogni 15 minuti per 15 secondi. La comparsa di una certa effervescenza è segno che la reazione di derivatizzazione procede, l'HCl prodotto viene, infatti, neutralizzato dallo ione HCO_3^- con produzione di CO_2 .

Si raffredda per 5 minuti e l'eccesso di DCl viene eliminato aggiungendo 200 μl di una soluzione di NH_3 al 30 % e agitando al vortex per 1 minuto. La miscela di reazione viene ancora lasciata al buio per 30 min a temperatura ambiente. I dansil derivati sono stati estratti per ripetuti trattamenti (tre volte) con 1 ml di etere etilico, agitando al vortex per 30 secondi per facilitare l'estrazione. Gli estratti eterei, riuniti in una provetta da centrifuga, sono stati portati a secco sotto flusso d'aria, ripresi con 1 ml di acetonitrile (per HPLC) e filtrati con filtri in PTFE da 0.2 μm (Phenomenex) in un vial di vetro da 2 ml. 10 μL della soluzione vengono iniettati in HPLC. Gli analiti sono stati separati e rivelati secondo le condizioni descritte nel paragrafo 7.2.3.

In Figura 7.6 è riportato un esempio di cromatogramma ottenuto su un campione di formaggio Fiore Sardo.

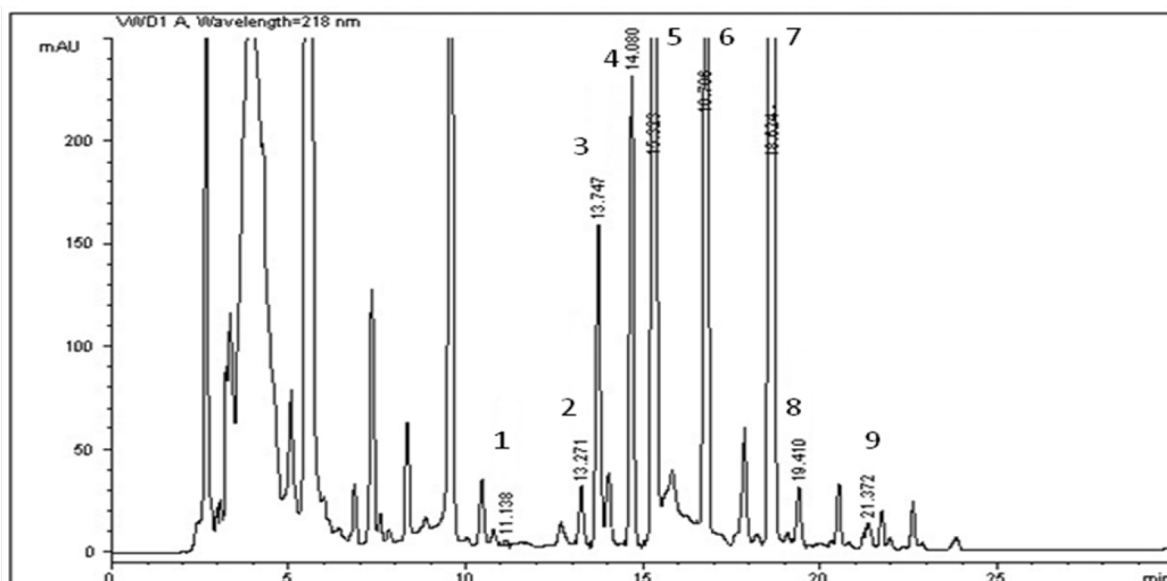


Figura 7.6 cromatogramma ottenuto su un campione di formaggio “Fiore Sardo”. 1=Trp, 2=Phe, 3=Put, 4=Cad, 5=His, 6=Sl, 7=Tyr, 8=Spm, 9=Spd.

7.4.3 Quantificazione delle ammine biogene nei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP

Il metodo analitico descritto nei precedenti paragrafi (7.4.1 e 7.4.2) è stato utilizzato per quantificare il contenuto delle singole ammine biogene in 36 campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP, acquistati presso quattro differenti punti vendita.

In letteratura vi sono evidenze di quantificazioni operate tramite metodo delle aggiunte. Alcuni autori hanno utilizzato il metodo delle aggiunte multiple standard nella determinazione del contenuto di ammine biogene in campioni di formaggio Castelmagno, Raschera e Toma Piemontese mettendo in evidenza un forte effetto matrice (Gosetti *et al.*, 2007).

Partendo da questi presupposti, visto il gravoso carico di lavoro che comporta l'adozione del metodo delle aggiunte per l'effettuazione delle analisi, si è voluto sperimentalmente verificare, attraverso la quantificazione di sette selezionati campioni di “Fiore Sardo”, l'esistenza o meno di una discrepanza statisticamente significativa (t-test a due code, $p = 0.95$) tra le concentrazioni di ammine biogene misurate con la miglior retta

di calibrazione e con il metodo delle aggiunte multiple. In tutte le situazioni si è registrato un fortissimo effetto matrice, tale da produrre, per quasi tutte le ammine quantificate, sovrastime anche quasi del 400% ove si effettuasse la quantificazione tramite curva di calibrazione. Solo nel caso della Spermina l'effetto matrice, seppur esistente, risulta essere di segno opposto alla restanti sei ammine biogene.

Si è quindi provveduto ad effettuare la quantificazione su ciascun campione di formaggio per tre aggiunte di standard a concentrazioni rispettivamente pari al 25%, 50% e 100% del valor medio dell'ammina biogena stimata per il campione in lettura. I risultati sono riportati e discussi nel Capitolo 8.

7.5 Validazione del metodo analitico

7.5.1 Introduzione

I metodi analitici vengono generalmente valutati per la loro affidabilità, applicabilità e praticabilità secondo le normative nazionali ed internazionali. Per fare ciò è necessario effettuare delle misure di controllo di qualità capaci di certificare la bontà di un metodo analitico nel fornire dati oggettivi.

Tali misure richiedono l'adozione di metodi validati, l'adozione di un controllo interno di qualità, la partecipazione a Studi Collaborativi tra diversi laboratori o a Proficiency Tests e l'accreditamento per Standard di Competenza Internazionali, normalmente UNI CEI EN ISO/IEC 17025

I fattori che possono incidere sulla correttezza e l'affidabilità delle determinazioni analitiche eseguite includono: l'operatore, il luogo di lavoro e le condizioni ambientali, i metodi di prova e la loro validazione, le apparecchiature, la riferibilità delle misure, il campionamento, l'assicurazione della qualità dei risultati e la loro presentazione.

Tra questi, la validazione del metodo viene intesa come "la conferma attraverso l'esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti". Validare un metodo significa "dimostrarne la validità", mediante la valutazione di tutti i parametri utili a tale scopo (caratteristiche tecniche, applicabilità, performance analitiche, ecc.).

Le grandezze caratteristiche che definiscono le prestazioni di un metodo analitico sono quantomeno:

- limite di rivelabilità;
- limite di quantificazione;
- range dinamico lineare;
- accuratezza;
- precisione.

Nei paragrafi successivi è riportata la validazione del metodo relativo alla determinazione delle ammine biogene nel formaggio e descritto nei paragrafi precedenti.

7.5.2 Limite di rivelabilità (LoD) e limite di quantificazione (LoQ)

Si definisce limite di rivelabilità, LdR (detection limit o limit of detection, LoD): “la più bassa concentrazione di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco” (ISO 11843), che può essere rilevata con un certo grado di sicurezza, ma non necessariamente determinata quantitativamente, nelle condizioni sperimentali del metodo.

In letteratura esistono vari modelli per il calcolo del limite di rivelabilità; il più utilizzato è il modello EPA (Currie, 1995) che prevede la misura ripetuta del segnale del bianco, inteso nel nostro caso come il segnale di un cromatogramma relativo a una matrice priva di ammine biogene.

L'intera procedura analitica di derivatizzazione, estrazione e separazione cromatografica, precedentemente descritta, è stata applicata ad una soluzione contenente soltanto lo standard interno, e pertanto identificata come bianco.

Per ciascuna ammina è stata costruita una retta di calibrazione con concentrazioni prossime ad un presunto LoD, nell'intervallo 0.01 – 0.5 mg/L.

Il limite di rivelabilità, per ciascuna ammina biogena, è stato calcolato utilizzando la formula seguente:

$$LoD = (3,3 \cdot \sigma_b)/b$$

dove σ_b è la deviazione standard del segnale del prodotto da misurazioni multiple del bianco e b la pendenza della curva di regressione (segnale/concentrazione) ottenuta per ciascuna ammina nell'intervallo di concentrazione (0.01-0.5 mg/L). I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 7.2.

Tabella 7.2 Limite di rivelabilità (LoD) calcolati per ciascuna ammina biogena con il metodo EPA.

Ammine Biogene	Concentrazione (mg/L)	LoD (mg/L)
Trp	0.01-0.50	0,008
Phe	0.01-0.50	0,004
Put	0.01-0.50	0,003
Cad	0.01-0.50	0,005
His	0.01-0.50	0,008
Tyr	0.01-0.50	0,006
Spd	0.01-0.50	0,009
Spm	0.01-0.50	0,003

Il limite di quantificazione o limite di rivelabilità quantitativo, LdQ (quantification limit o limit of quantification, LoQ) è definito invece come la minima concentrazione di analita quantificabile con certezza statistica. In genere la sua stima si basa sulla scelta arbitraria di un livello di confidenza rispetto al limite di rivelabilità, generalmente il 95%. Per il metodo EPA esso risulta:

$$LoQ = 3,3 LoD$$

In Tabella 7.3 sono mostrati i risultati relativi al LoQ calcolato per ciascuna ammina biogena.

Tabella 7.3 LoQ calcolati per ciascuna ammina biogena con il metodo EPA

Ammine Biogene	Concentrazione (mg/L)	LoQ (mg/L)
Trp	0.01-0.50	0,025
Phe	0.01-0.50	0,013
Put	0.01-0.50	0,008
Cad	0.01-0.50	0,016
His	0.01-0.50	0,026
Tyr	0.01-0.50	0,020
Spd	0.01-0.50	0,029
Spm	0.01-0.50	0,009

I limiti di rivelabilità e quantificazione calcolati variano rispettivamente negli intervalli 0.003-0.009 mg/l e 0.008-0.029 mg/l. I dati ottenuti nel presente lavoro, riguardo ai valori degli LoD, relativamente a ciascuna ammina, appaiono essere confrontabili con quelli pubblicati da Moret *et al.*, (1992).

7.5.3 Range dinamico lineare

Il range dinamico lineare è definito come l'intervallo di concentrazione per il quale vi è una corrispondenza lineare fra segnale e concentrazione di analita. La linearità del metodo è stata stimata mediante la valutazione dei parametri di regressione (principalmente il coefficiente di correlazione r^2) calcolati per le rette di calibrazione (segnale/concentrazione) di ciascuna ammina nel range 0.1 – 50 mg/L come mostrato in Tabella 7.4.

Tabella 7.4 Range dinamico lineare per ciascuna ammina biogena nell'intervallo di concentrazione 0.1 – 50 mg/L

Ammine Biogene	Concentrazione (mg/L)	Curve di calibrazione	R²
Trp	0.1-50	$y=(0.678\pm 0.006)x+(0.024\pm 0.019)$	0.9993
Phe	0.1-50	$y=(0.596\pm 0.004)x+(0.025\pm 0.012)$	0.9996
Put	0.1-50	$y=(1.274\pm 0.044)x+(0.194\pm 0.126)$	0.9905
Cad	0.1-50	$y=(1.174\pm 0,030)x+(0.136\pm 0.085)$	0.9949
His	0.1-50	$y=(1.089\pm 0.009)x+(0.039\pm 0.027)$	0.9994
Tyr	0.1-50	$y=(0.944\pm 0.015)x+(0.068\pm 0.044)$	0.9979
Spd	0.1-40	$y=(1.013\pm 0.028)x+(0.072\pm 0.063)$	0.9945
Spm	0.1-50	$y=(0.858\pm 0.022)x+(0.019\pm 0.062)$	0.9949

L'analisi grafica dei residui della regressione può eventualmente oggettivare situazioni "nascoste" di non linearità. Si calcola la differenza tra il valore osservato sperimentalmente y_i e il valore predetto dalla regressione, y_m , per un dato valore di x e si costruisce quindi il grafico ponendo sull'asse delle ascisse i valori delle concentrazioni utilizzate per costruire la curva e sulle ordinate i residui.

Nella valutazione del grafico dei residui si deve tener conto della forma, del numero di residui positivi e negativi, e della distribuzione casuale del segno dei residui.

A tal riguardo si possono fare alcuni esempi teorici mostrati in Figura 7.7:

- A. correlazione lineare: distribuzione casuale attorno allo zero, errore costante
- B. (omoschedastico);
- C. pendenza errata;
- D. errore distribuito in modo non costante (eteroschedastico);

A. deviazione dalla linearità.

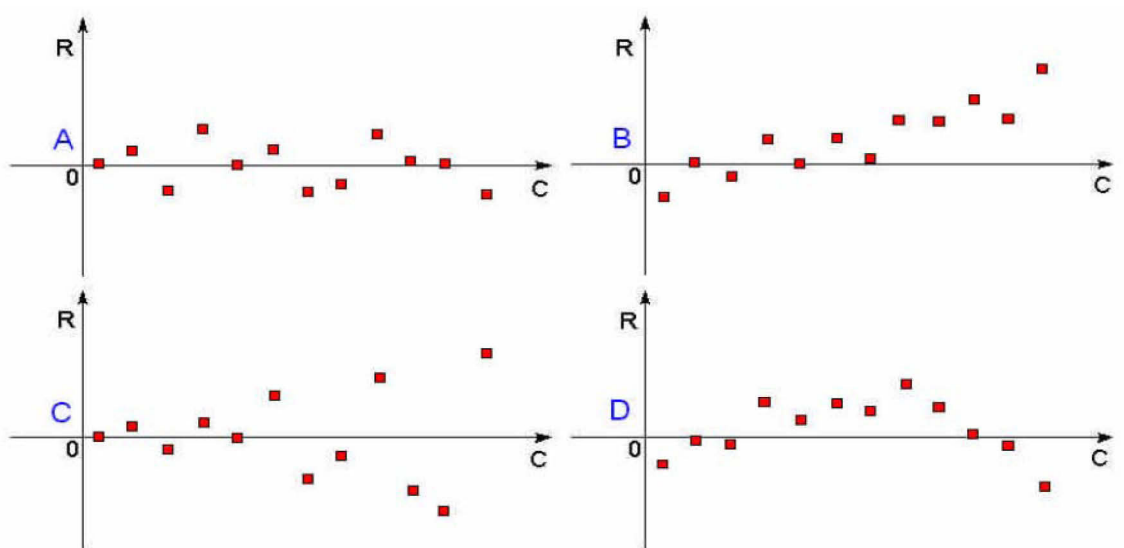


Figura 7.7 Esempio di grafici dei residui

Nei diagrammi riportati in Figura 7.8 viene mostrato l'andamento dei residui relativi al metodo applicato alle 8 ammine biogene in fase di validazione:

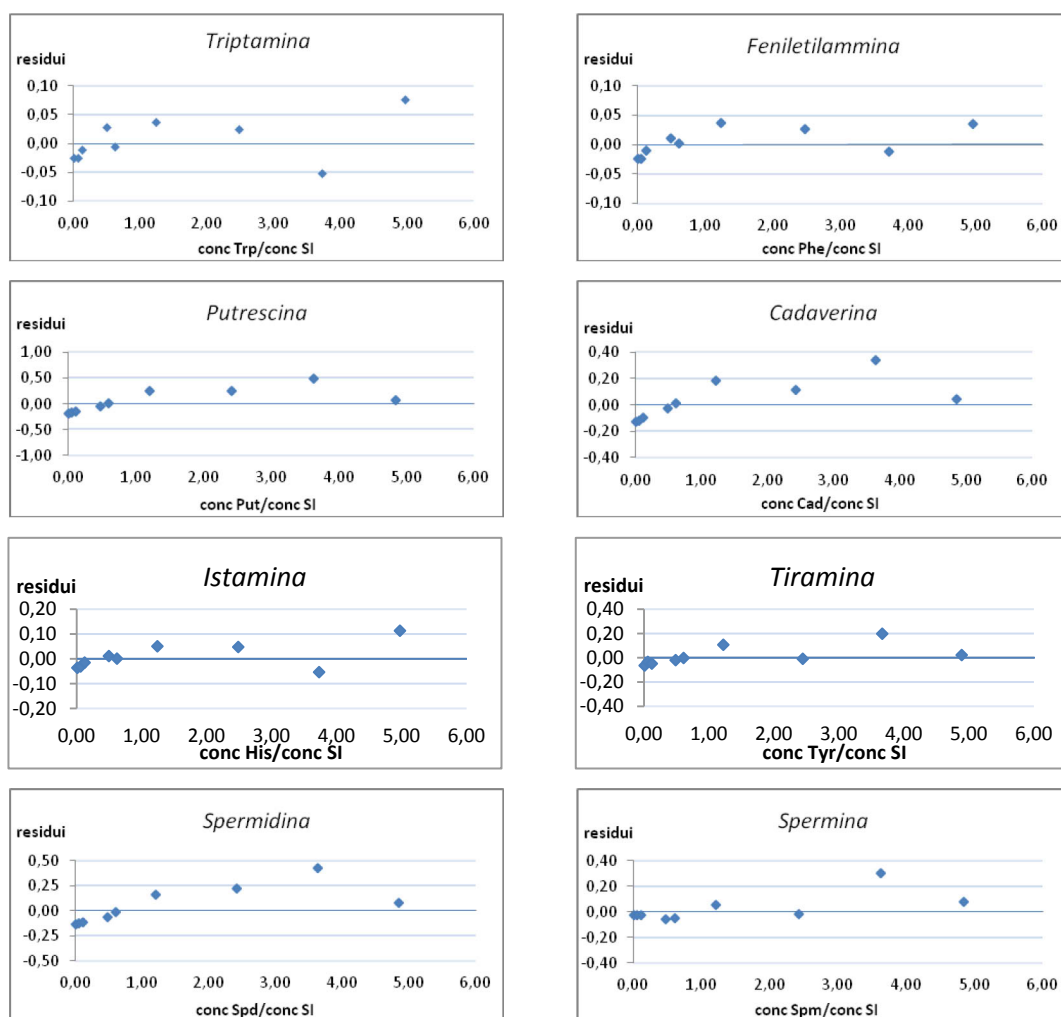


Figura 7.8 analisi dei residui delle 8 ammine biogene analizzate

Per quasi tutte le situazioni si nota una sostanziale omoschedasticità – più o meno soddisfacente – tranne che per la triptamina, che evidenzia una certa eteroschedasticità.

Ove il range dinamico lineare individuato fosse significativamente maggiore di quello operativamente necessario per provvedere alla quantificazione, mediante retta di calibrazione, delle ammine biogene presenti nei campioni di Fiore Sardo DOP selezionati, si è provveduto, prima della quantificazione, ad una ricalibrazione in un range di concentrazione congruente con la dispersione delle concentrazioni osservate. Tale accorgimento si è reso necessario per le seguenti ammine biogene: Trp, Phe, Cad, His e Spm.

Tabella 7.5 Curve di calibrazione per ciascuna ammina biogena

Ammine Biogene	Concentrazione (mg/L)	Curve di calibrazione	R²
Trp	0-4	0,7155x + 0,0029	0,9998
Phe	0-5	0,6495x + 0,0012	0,9998
Cad	0-10	1,3961x + 0,0059	0,9999
His	0-20	1,1230x + 0,0179	0,9997
Spm	0-4	0,7791x - 0,0019	0,9999

7.5.4 Precisione

La precisione rappresenta la misura dell'accordo tra i risultati di misure ripetute della stessa grandezza fatte sullo stesso campione. A seconda dei casi, la precisione si può esprimere in termini di ripetibilità e di riproducibilità.

7.5.4.1 Ripetibilità e riproducibilità

La ripetibilità (*r*) esprime l'accordo fra misure eseguite dallo stesso operatore nelle medesime condizioni sperimentali e in un breve lasso di tempo. Questa grandezza è stata esaminata su un campione di formaggio "Fiore Sardo" nel quale le ammine biogene presentassero un livello di concentrazione generalmente intermedio all'interno del range di variabilità per ciascun analita. Dieci aliquote, da circa 2 grammi ciascuna, dello stesso campione sono state quindi sottoposte all'intero processo analitico di cui al paragrafo 7.4.

La riproducibilità (*R*) di un metodo riguarda invece l'accordo fra misure eseguite da diversi operatori in differenti condizioni sperimentali, ad esempio in giorni e in laboratori diversi o utilizzando reagenti e strumentazione differente. Nel nostro caso l'analisi è stata eseguita, da quattro operatori diversi, a distanza di una settimana l'una dall'altra, sullo stesso campione di formaggio "Fiore Sardo" cercate sul quale si è valutata la ripetibilità.

L'accettabilità di ripetibilità e riproducibilità è stata poi valutata mediante l'approccio oggettivo proposto da William Horwitz (1982) per determinare la precisione di

metodi impiegati in campo agro-alimentare. Tale metodo studia l'andamento del coefficiente di variazione percentuale (CV%) in funzione della concentrazione dell'analita, che Horwitz ha visto essere pari a:

$$CV\% = 2^{1-0,5\text{Log}C}$$

dove C è la concentrazione espressa in termini di frazione decimale ponderale.

La precisione del metodo è quindi indipendente dalla natura dell'analita, dalla matrice e dal metodo analitico ma dipende soltanto dalla concentrazione. L'evoluzione degli studi di Horwitz gli ha permesso di definire un parametro, chiamato indice HorRat, (**Horwitz Ratio**), uguale al rapporto tra il CV% ricavato sperimentalmente ($CV\%_{\text{sperim}}$) e il CV% calcolato mediante l'equazione di Horwitz. Il $CV\%_{\text{sperim}}$ è ritenuto accettabile quando l'indice HorRat è minore di 1,5. In Tabella 7.6 vengono mostrati i $CV\%_{\text{sperim}}$ relativi alla ripetibilità e riproducibilità del metodo analitico per ciascuna ammina biogena. Nella stessa Tabella sono riportati i valori dei rapporti di HorRat che per ogni singola ammina sono ben inferiori ai limite di accettabilità (1.5).

Tabella 7.6 Accettabilità dei valori di Ripetibilità e Riproducibilità del metodo analitico

Ammine Biogene	Ripetibilità ($CV\%_{\text{sperim}(r)}$)	Riproducibilità ($CV\%_{\text{sperim}(R)}$)	Rapporto HorRat ($CV\%_{(r)}$)	Rapporto HorRat ($CV\%_{(R)}$)
Trp	6.5	14.3	0,4	0,9
Phe	6.8	10.7	0,4	0,7
Put	4.4	7.0	0,3	0,4
Cad	4.1	6.4	0,3	0,4
His	3.8	9.2	0,2	0,6
Tyr	5.0	4.9	0,3	0,3
Spd	-	-	-	-
Spm	8.6	16.1	0,5	1.0

I valori ottenuti relativi alla ripetibilità sono confrontabili a quelli determinati da Innocente *et al.*, (2007) che utilizza condizioni analitiche molto simili a quelle utilizzate nel presente lavoro di tesi.

7.5.5 Esattezza

Un metodo si può dire esatto se l'applicazione dello stesso su di un campione di riferimento certificato della matrice in esame contenente concentrazioni quantificate e note di analita produce valori analitici non statisticamente distinguibili da quello certificato. Tuttavia, in mancanza di materiali di riferimento certificati, la valutazione dell'assenza di errori sistematici può essere effettuata mediante prove di recupero. La procedura adottata prevede l'estrazione e l'analisi in triplo di tre aliquote uguali di un campione di formaggio "Fiore Sardo", caratterizzato da una concentrazione media, rispetto al range di variazione, di ciascuna ammina biogena, arricchite con quantità note dell'analita per il quale si vuole determinare il recupero percentuale.

La seguente relazione esprime la dipendenza della concentrazione sperimentale di ogni ammina dalla quantità di analita aggiunta al campione:

$$C_{sper} = C_0 + q_a/m$$

dove C_{sper} è la concentrazione sperimentale di analita, C_0 è la concentrazione di analita nel campione senza aggiunta, q_a è la quantità di standard aggiunta ed m è la quantità pesata di formaggio. Il metodo utilizzato per il calcolo del recupero si basa sulla costruzione di una curva di regressione lineare tra la quantità C_{sperim} ed il rapporto q_a/m . La percentualizzazione della pendenza della retta di regressione così ottenuta permette di valutare l'entità del recupero per ciascun campione.

Tabella 7.7 Prove di recupero

Ammine Biogene	media \pm ds
Trp	99 \pm 2
Phe	94 \pm 2
Put	87 \pm 9
Cad	95 \pm 12
His	85 \pm 5
Tyr	90 \pm 6
Spm	82 \pm 8

I valori ottenuti relativi alle prove di recupero sono confrontabili con quelli riportati in letteratura (Moret *et al.*, (1992), Moret *et al.*, (1996), Innocente *et al.*, (2007)), ed oggettivano l'assenza di errore sistematico per la triptamina, e la presenza di un moderato bias di sottostima per le restanti sei ammine biogene, che tuttavia appare all'interno del range di accettabilità definito dall'AOAC nei suoi Peer Verified Methods per il livello di concentrazione indagato.

Capitolo 8

PARTE SPERIMENTALE 1

Determinazione del contenuto di ammine biogene nei campioni di formaggio “Fiore Sardo”

Risultati e discussione

8.1 Campionamento

Presso 4 punti vendita diffusi su tutto il territorio nazionale, di seguito indicati come A, B, C e D, sono stati reperiti campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP. I formaggi commercializzati presso ogni punto vendita provengono da altrettanti differenti produttori artigianali.

In ogni punto vendita sono stati eseguiti tre campionamenti a distanza di 15 giorni l’uno dall’altro. In occasione di ogni campionamento sono state acquistate tre porzioni del peso di 400 g circa cadauna di formaggio “Fiore Sardo”. In totale sono stati quindi raccolti 36 campioni.

Su ciascun campione di formaggio è stato determinato il contenuto in ammine biogene (Trp, Phe, Put, Cad, His, Tyr e Spm) applicando il metodo analitico, la cui messa a punto e validazione è stata discussa nel precedente capitolo (Capitolo 7).

I risultati sono di seguito riportati.

8.2 Contenuto in ammine biogene totali nei formaggi analizzati

Subito dopo il pesce, il formaggio è l’alimento più comunemente associato con la sindrome di avvelenamento da istamina (His) (Stratton *et al.*, 1991). Oltre all’istamina, anche la Tiramina (Tyr) e la fenilettilammina (Phe) possono essere responsabili di reazioni avverse caratterizzate da mal di testa e crisi ipertensive (Rice *et al.*, 1976). Altre ammine biogene, rinvenute nel formaggio, come triptamina (Trp), putrescina (Put) e cadaverina (Cad) possono potenziare l’effetto tossico delle altre ammine a causa del loro potere inibente nei confronti degli enzimi che detossificano l’istamina come MAO, DAO e HMT (Stratton *et al.*, 1991).

La determinazione dell’esatta soglia di tossicità delle ammine biogene è complessa, in quanto la dose potenzialmente tossica dipende fortemente dall’efficienza del meccanismo di detossificazione individuale (Halász *et al.*, 1994). Una ingestione di ammine biogene superiore a 40mg per pasto è stata considerata potenzialmente tossica.

Non tutte le ammine biogene sono ugualmente tossiche, His, Tyr e Phe sono quelle che causano i disturbi più gravi (Shalabi *et al.*, 1996), come già ampiamente

discusso nel Capitolo 4. Alcuni autori suggeriscono che la somma di Tyr, His, Cad e Put non debba superare i 900 mg/kg di formaggio (Spanjer *et al.*, 1991). Tuttavia, al momento non esistono limiti legali relativamente al contenuto di ammine biogene nel formaggio. Nell'Unione Europea e negli Stati Uniti tale limite è stato stabilito solo per l'istamina nel pesce ed in derivati ittici.

La Tabella 8.1 riporta, in mg/kg di formaggio, sia il contenuto totale (media \pm sd) di ammine biogene sia il valore relativo alla somma delle quattro ammine biogene (Tyr, His, Put e Cad) determinato nei campioni di formaggio "Fiore Sardo" esaminati. In Tabella 8.2 per gli stessi parametri è riportato l'intervallo di variabilità (min÷max).

Il contenuto totale di ammine biogene nei campioni di "Fiore Sardo" analizzati, nel presente lavoro di tesi, è risultato in media pari a 630 mg/kg di formaggio (Tabella 8.1). Risultati simili sono stati osservati per diverse tipologie di formaggio: Feta (Valsamaki *et al.*, 2000), Pecorino Abruzzese (Martuscelli *et al.*, 2005) e Formaggio di Malga (Innocente *et al.*, 2001). Le prime due tipologie di formaggio sono prodotte a partire da latte ovino, il primo da latte pastorizzato a 65°C per 15 min, mentre il secondo da latte crudo, il formaggio di Malga è prodotto invece da latte crudo bovino (Tabella 8.5). Valori anche superiori sono stati riportati per alcuni formaggi piemontesi a latte crudo: "Toma", "Raschera" e "Castelmagno" prodotti a partire da latte bovino crudo (Gosetti *et al.*, 2007), per il "Pecorino Abruzzese", da latte ovino pastorizzato (Martuscelli *et al.*, 2005), per il "Azeitao" ed il "Pecorino di Farindola" entrambi da latte ovino crudo (Pinho *et al.*, 2001; Scirone *et al.*, 2011) (Tabella 8.5). Valori inferiori invece sono stati osservati per il formaggio "Cheddar" e "Ras" egiziano ottenuti da latte bovino pastorizzato, e per la "Provola dei Nebrodi" da latte bovino crudo (Ali Awan *et al.*, 2008; Kebary *et al.*, 1999; Giuffrida *et al.*, 2006) (Tabella 8.5). Il trattamento termico di pastorizzazione del latte (70-80°C) per le prime due tipologie di formaggio, così come anche la filatura della cagliata a temperature superiori a 80°C, per la Provola dei Nebrodi, spiegano il basso contenuto di ammine biogene determinate in queste tre tipologie di formaggio. L'elevata temperatura è infatti responsabile della riduzione dei microorganismi capaci di decarbossilare gli aminoacidi precursori (Giuffrida *et al.*, 2006).

La significativa presenza di ammine biogene misurata nei campioni di "Fiore Sardo" oggetto del presente lavoro di tesi, è da attribuire ad alcune peculiarità che caratterizzano la sua tecnologia quali l'utilizzo di latte crudo e la consuetudine

generalmente diffusa di non utilizzare un innesto microbico. Conseguentemente il formaggio Fiore Sardo è caratterizzato da una microflora lattica caratterizzata da un elevato contenuto di enterococchi (Pirisi *et al.*, 2011) che, come è noto, sono particolarmente attivi nella produzione di enzimi ad attività decarbossilasica nei confronti degli amminoacidi precursori (Halász *et al.*, 1994).

Il carattere fortemente artigianale della produzione trova un suo adeguato riscontro nell'estrema variabilità di concentrazione delle ammine biogene nei quattro punti vendita campionati. I campioni di formaggio "Fiore Sardo" acquistati presso il punto vendita A sono caratterizzati dal contenuto più basso di ammine biogene totali (168 mg/kg, Tabella 8.1), il contenuto più elevato è stato osservato invece nei campioni provenienti dai punti vendita B e C (969 e 1091 mg/kg, rispettivamente per B e C, Tabella 8.1) mentre intermedio è il contenuto determinato nei campioni commercializzati presso il punto vendita D (462 mg/kg, Tabella 8.1).

Come già ampiamente discusso nel Capitolo 4, è noto che il contenuto in ammine biogene è spesso correlato positivamente con l'entità del processo proteolitico, in quanto una maggiore concentrazione di precursori (amminoacidi) favorisce la produzione di ammine biogene nel formaggio. Nei campioni di formaggio in esame non è stata tuttavia trovata alcuna correlazione positiva fra l'entità del processo di proteolisi e il contenuto in ammine biogene, in quanto i campioni caratterizzati dagli indici di proteolisi più elevati (campioni A, Capitolo 9) sono caratterizzati infatti dal contenuto più basso di ammine biogene. Questo comportamento potrebbe essere dovuto al fatto che il Fiore Sardo è considerato un formaggio a prevalente maturazione lipolitica (Addis *et al.*, 2005b; Pirisi *et al.*, 2007).

Il maggior contenuto in ammine biogene osservato nei campioni di formaggio B e C, rispetto agli altri campioni, pare essere invece correlato con il valore più elevato di pH che caratterizza questi campioni (5.2 e 5.1, rispettivamente per i campioni B e C, Capitolo 9). Come è stato già discusso nel Capitolo 4 è noto infatti che il processo di decarbossilazione degli amminoacidi è favorito da valori di pH superiori a 5.

Come già fatto notare, il range di variabilità del contenuto di ammine biogene, determinato nei campioni di "Fiore Sardo" in esame è davvero molto ampio (80 – 1222 mg/kg, Tabella 8.2). Questa elevata variabilità, all'interno della stessa tipologia di

formaggio, è confermata dai non molti dati presenti in letteratura (Tabella 8.5) e dipende da diversi fattori tecnologici i più importanti dei quali sono:

- utilizzo di latte crudo;
- elevata biodiversità della microflora nativa e secondaria;
- variabilità dell'umidità della cagliata;
- variabilità della concentrazione di NaCl nella cagliata.

Il contenuto di ammine biogene dei campioni di formaggio analizzati nel presente lavoro di tesi, seppur marcato, è comunque nella norma di quanto in precedenza misurato per formaggi a latte crudo. Cionondimeno, i valori misurati portano a suggerire cautela nel consumo significativo di tali alimenti per soggetti potenzialmente sensibili a sindromi istaminoidi.

8.3 Contenuto in ammine individuali nei formaggi analizzati

In Tabella 8.3 è riportato il contenuto (mg/kg di formaggio, media \pm sd) delle 7 ammine biogene rilevate nei campioni di formaggio "Fiore Sardo" in esame: Triptamina, Feniletilammina, Putrescina, Cadaverina, Istamina, Tiramina, Spermina. In nessuno dei campioni analizzati è stato possibile oggettivare la presenza della Spermidina. In Tabella 8.4 è riportato, per le stesse ammine, l'intervallo di variabilità di concentrazione osservato nei campioni di formaggio analizzati (min \div max).

Tiramina e Putrescina sono le ammine biogene più abbondanti nei campioni di formaggio "Fiore Sardo" analizzati nel presente lavoro di tesi. La concentrazione di Tiramina è in media pari al 56% del contenuto totale di ammine biogene, mentre quella della Putrescina si attesta attorno al 23%. Risultati analoghi sono stati osservati anche in altre tipologie di formaggi prodotti a partire da latte ovino quali: Pecorino Abruzzese, Pecorino di Farindola e Feta (Tabella 8.5). Come è possibile osservare in Tabella 8.5 le ammine più rappresentative, nei formaggi prodotti a partire da latte bovino, sono invece Tiramina e Istamina.

In generale sia nei campioni di formaggio analizzati nel presente lavoro di tesi (Tabella 8.3) che in altre tipologie di formaggio (Tabella 8.5) le ammine biogene meno rappresentative sono la Triptamina, la Feniletilammina, la Spermidina e la Spermina.

Tabella 8.1 Contenuto in ammine biogene (mg/kg; media \pm sd) dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP

Punti vendita	Totali^a
A	168 \pm 64
B	970 \pm 170
C	1092 \pm 85
D	460 \pm 270
Insieme dei campioni	673 \pm 413

^aTotali = (Trp+Phe+Cad+Put+His+Tyr+Spm)

Tabella 8.2 Contenuto in ammine biogene (mg/kg; min \div max) dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP

Punti vendita	Totali^a
A	80 \div 258
B	762 \div 1220
C	982 \div 1210
D	232 \div 912
Insieme dei campioni	80 \div 1220

^aTotali = (Trp+Phe+Cad+Put+His+Tyr+Spm)

Tabella 8.3 Contenuto in ammine biogene (mg/kg; media \pm sd) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP

Punti vendita	Trp	Phe	Put	Cad	His	Tyr	Spm
A	0.4 \pm 0.4	2 \pm 2	<LOD	6 \pm 4	4 \pm 6	56 \pm 74	100 \pm 34
B	3 \pm 3	16 \pm 8	450 \pm 180	22 \pm 34	86 \pm 75	360 \pm 100	32 \pm 29
C	5 \pm 4	15 \pm 10	130 \pm 70	37 \pm 22	210 \pm 17	670 \pm 100	32 \pm 31
D	6 \pm 6	9 \pm 10	16 \pm 16	39 \pm 26	10 \pm 14	340 \pm 260	48 \pm 14
Insieme dei campioni	3 \pm 4	10 \pm 9	150 \pm 200	26 \pm 27	78 \pm 92	350 \pm 260	53 \pm 39

Tabella 8.4 Contenuto in ammine biogene (mg/kg; min ÷ max) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP

Punti vendita	Trp	Phe	Put	Cad	His	Tyr	Spm
A	<LOD ÷ 1.2	0.15 ÷ 6.3	<LOD ÷ <LOD	1.3 ÷ 13	<LOD ÷ 19	<LOD ÷ 180	68 ÷ 160
B	0.2 ÷ 8.2	1.8 ÷ 25	88 ÷ 730	1.0 ÷ 94	5.2 ÷ 250	170 ÷ 530	10 ÷ 88
C	0.3 ÷ 10.5	9.3 ÷ 42	36 ÷ 210	6.7 ÷ 70	190 ÷ 250	445 ÷ 800	17 ÷ 115
D	0.02 ÷ 16.9	1.3 ÷ 27	<LOD ÷ 49	7.3 ÷ 83	<LOD ÷ 33	110 ÷ 770	29 ÷ 65
Insieme dei campioni	<LOD ÷ 16.9	0.15 ÷ 42	<LOD ÷ 730	1.0 ÷ 94	<LOD ÷ 250	0.00 ÷ 800	10 ÷ 160

Tabella 8.5 Confronto tra il contenuto in ammine biogene dei formaggi “Fiore Sardo” (min – max) e dati riportati in letteratura relativamente ad altre tipologie di formaggio

Formaggio	latte	trattamento	stagionatura	Trp (mg/kg)	Phe (mg/kg)	Put (mg/kg)	Cad (mg/kg)	His (mg/kg)	Tyr (mg/kg)	Spd (mg/kg)	Spm (mg/kg)	Totale (mg/kg)
Cheddar ¹ stagionato	bovino					38	22					60
Toma ²	bovino	crudo				180-530	220-480	9-29	54-111			463-1150
		pastorizzato				47-119	83-221	nd-67	nd-35			130-442
Provola dei Nebrodi ³	bovino	crudo				0.1-1.31	0.1-2.23	0.1-22.39	0.1-8.46			6.4-34.39
Toma ⁴	bovino	crudo		255			1.25	587	282	6.58	193	1324
Raschera ⁴	bovino	crudo		389			118	452	153	10	352	1480
Castelmagno ⁴	bovino	intero		1048			310	645	1009	0.42	449	3461
Ras egiziano ⁵	bovino	crudo	fresco	1.3	0.7	21	16.7	29	40.7	0	24.3	133.7
			90gg	2.7	1.7	28	19.2	56.8	62	1.2	24.4	196
			180gg	3.3	2.6	37.5	24.5	74.5	80	2.5	32.6	257.5
Pecorino Abruzzese ⁶	ovino	crudo		nd-7.2 mg/L	nd-8.4 mg/L	nd-85 mg/L	nd-192 mg/L	nd-40.8 mg/L	nd-141.4 mg/L	nd-6.1 mg/L	nd-25.3 mg/L	697 mg/kg
		pastorizzato										1086 mg/kg
Azeitao ⁷	ovino	crudo										838-1078
Pecorino di Farindola ⁸	ovino	crudo			0-127	9.9-394	26.8-276.1	0-21.8	52.3-826.6	25-143.9		114-1789
Formaggio di Malga ⁹	bovino	crudo		5.27	7.38	256.95	67.93	38.85	48.93			425.86
Feta ¹⁰	ovino	termizzato		5.74	4.94	193	82.8	84.6	246			617
Fiore Sardo ¹¹	ovino	crudo		0-16.9	0.15- 41.58	0-726	0.95-94.15	0-250	0-796	0	10.0- 163.5	80 - 1222

¹Ali *et al.*, (2008); ²Gennaro *et al.*, (2003); ⁴Gosetti *et al.*, (2007); ⁵Keব্য *et al.*, (1999); ⁶Martuscelli *et al.*, (2005); ⁷Pinho *et al.*, (2001); ⁸Schirone *et al.*, (2011); ⁹Innocente *et al.*, (2001); ¹⁰Valsamaki *et al.*, (2000); ¹¹Dati tesi dottorato.

Capitolo 9

PARTE SPERIMENTALE 2

Caratterizzazione chimica dei campioni di formaggio Fiore Sardo DOP

Materiali e metodi

9.1 Campionamento

Come descritto nella precedente Parte Sperimentale, presso 4 punti vendita diffusi su tutto il territorio nazionale, di seguito indicati come A, B, C e D, sono stati reperiti campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP. I formaggi commercializzati presso ogni punto vendita provengono da altrettanti differenti produttori artigianali.

In ogni punto vendita sono stati eseguiti tre campionamenti, adistanza di 15 giorni l’uno dall’altro. In occasione di ogni campionamento sono state acquistate tre porzioni del peso di 400g circa cadauna di formaggio “Fiore Sardo”. In totale sono stati quindi raccolti 36 campioni su cui è stato determinato, oltre al contenuto in ammine biogene (Capitolo 8), anche il profilo dei macrocostituenti (umidità, proteine, grasso e NaCl) il grado di maturazione proteolitica e lipolitica nonché il profilo dei componenti la frazione volatile-aromatica. I risultati sono di seguito riportati.

9.2 Analisi della Macrocomposizione

9.2.1 Sostanza secca

In una capsula di nichel, preventivamente essiccata e portata a peso costante, sono stati esattamente pesati, utilizzando una bilancia analitica, circa 5 g di formaggio.

I campioni, essiccati in stufa a 105°C per 6 ore, sono stati lasciati raffreddare in essiccatore per almeno 2 ore e pesati. Sono stati rimessi in stufa per altre 4 ore e pesati dopo raffreddamento. La procedura è stata ripetuta fino al raggiungimento del peso costante (Norma IDF Standard 4A: 1982).

La percentuale di sostanza secca (%SS) è stata quindi così calcolata:

$$\%SS = \frac{(\text{peso capsula del campione essiccato}) - (\text{tara capsula}) \times 100}{\text{peso campione}}$$

9.2.2 Grasso

Circa 3 g di formaggio sono stati esattamente pesati, utilizzando una bilancia analitica, in un filtro di cellulosa nel quale è stata introdotta una spatolata di solfato di sodio anidro. L'imboccatura del filtro è stata chiusa con cotone idrofilo.

Il filtro è stato introdotto nell'estrattore Soxhlet e sottoposto ad estrazione con etere etilico per almeno 6 ore su bagnomaria settato a 95°C. Allontanato l'etere per evaporazione, i campioni sono stati essiccati in stufa a 105°C fino a peso costante.

(Metodo Soxhlet, norma IDF Standard 172: 2001 / ISO 14156:2001).

Il contenuto di grasso può essere espresso come percentuale sul formaggio tal quale o sulla Sostanza Secca:

$$\% \text{ di grasso sul tal quale} = \frac{(\text{peso pallone} + \text{grasso}) - (\text{tara pallone})}{\text{peso campione}} \times 100$$

$$\% \text{ di grasso sulla SS} = \frac{(\% \text{ di grasso sul t.q.})}{\% \text{ di S.S.}} \times 100$$

9.2.3 Determinazione potenziometrica dei cloruri

Circa 2.5g di formaggio sono stati esattamente pesati, utilizzando una bilancia analitica, in un beker da 50 mL, sono stati quindi dispersi con acqua distillata contenente 2-3 gocce di HNO₃ concentrato (densità 1.20 g/ml). Il campione è stato tenuto per circa mezz'ora a bagnomaria a 70°C, cercando di non farlo raggrumare e sciacquando le pareti del beker con acqua distillata. Dopo raffreddamento, la dispersione acquosa del formaggio è stata titolata con AgNO₃ 0.1000 N mediante titolatore automatico Toledo modello DL55, (Mettler Toledo, USA) utilizzando un elettrodo di riferimento Ag/AgCl e un anello d'Argento come elettrodo di misura (DM 141-SC, Mettler Toledo, USA).

9.2.4 Determinazione dell'azoto totale

L'azoto organico totale è stato trasformato in azoto ammoniacale previa mineralizzazione; successivamente, mediante l'impiego di un distillatore automatico FOSS-TECATOR, l'azoto ammoniacale, distillato in corrente di vapore e raccolto in una soluzione di acido bórico, è stato titolato con HCl 0.1000 N.

Di seguito sono stati descritti i metodi impiegati per ottenere le varie frazioni azotate. (Metodo Kjeldhal, norma IDF Standard 20B: 1993).

9.2.4.1 Azoto totale (TN)

0.5 g di formaggio sono stati esattamente pesati, utilizzando una bilancia analitica, direttamente in un provettone per Kjeldahl in cui sono stati aggiunti 20 ml di acido solforico al 96%, circa 8 g di solfato di potassio, ed 1 ml di una soluzione acquosa di solfato di rame (5% p/v) come catalizzatori. L'azoto organico è stato quindi mineralizzato utilizzando la seguente rampa di temperatura: 140°C per 15', 180°C per 1h e 15', 220°C per 15', 290°C per 15', 320°C per 15', 450°C per 1h e 15'.

In queste condizioni tutto l'azoto presente nella matrice viene trasformato in azoto ammoniacale che, distillato in corrente di vapore e trattenuto in una soluzione di acido bórico, viene quindi titolato con una soluzione di HCl 0.1000 N.

Il contenuto d azoto totale (TN) viene espresso in percentuale su 100 g di formaggio tal quale:

$$\text{TN (\%)} = \frac{1.4007 \times (\text{ml HCl} - \text{ml bianco}) \times 0.1000 \text{ (normalità HCl)}}{\text{Peso campione}}$$

Il contenuto in proteine si ottiene moltiplicando il valore del TN per un fattore di conversione che, nel caso del latte e formaggio, è pari a 6.38.

$$\text{Proteine (\%)} = \text{TN (\%)} \times 6.38$$

9.2.5 Frazioni azotate o indici di proteolisi

Gli indici di proteolisi più comunemente utilizzati sono: SN/TN, SN-TCA/TN e SN-PTA/TN.

Il rapporto percentuale tra l'azoto solubile in tampone citrato a pH 4,6 (SN) e l'azoto totale (TN) rappresenta un indice di maturazione del formaggio. La frazione SN comprende peptidi di medio peso molecolare, proteoso peptoni, proteine del siero e amminoacidi liberi. Il rapporto SN-TCA/TN rappresenta invece l'incidenza dei piccoli peptidi, prodotti dall'attività proteolitica del caglio e dalle peptidasi dei microrganismi, sull'azoto totale. Il rapporto SN-PTA/TN rappresenta la frazione di azoto comprendente peptidi molto piccoli ed amminoacidi liberi rispetto all'azoto totale.

In un beker da 300 ml sono stati esattamente pesati, utilizzando una bilancia analitica, circa 20g di formaggio, cui sono stati aggiunti 80 ml di soluzione 0.5 M di citrato di sodio tribasico a pH = 7. La miscela, tenuta a bagnomaria a 45°C per 45 minuti, è stata successivamente omogeneizzata per un minuto mediante Ultraturrax a 16000 giri. Dopo aver fatto decantare a bagnomaria la schiuma formatasi, il pH della soluzione è stato aggiustato, mediante aggiunta di HCl 1:1 (v/v), ad un valore di 4.5 per far precipitare le caseine (punto isoelettrico = 4.6). La sospensione è stata quindi tenuta in agitatore oscillante a 45 rpm per 20 minuti, portata a volume in un pallone da 500 ml e lasciata riposare un'ora prima di essere filtrata su carta Whatman n°42. Il filtrato (A) ottenuto viene utilizzato per la determinazione delle frazioni di seguito elencate:

9.2.5.1 Azoto solubile a pH 4.6 (SN)

50 ml di filtrato A, rappresentativi di circa 2 g di formaggio, sono stati introdotti in un tubo Kjeldahl. Si è proceduto alla mineralizzazione, distillazione dell'azoto ammoniacale e sua titolazione così come riportato precedentemente per l'NT.

$$SN = \frac{1.4007 \times (\text{ml HCl} - \text{ml bianco}) \times 0.1000 \text{ (normalità dell'HCl)}}{2 \text{ g (peso campione)}}$$

9.2.5.2 Azoto non proteico solubile in TCA al 12% (SN-TCA)

80 ml di filtrato A sono stati trasferiti in un matraccio tarato da 100 ml e portati a volume con acido tricloroacetico (TCA) al 60%. Dopo precipitazione la soluzione è stata filtrata su carta Whatman n°42. 40 ml di filtrato, corrispondenti a circa 1.28 g di formaggio, sono stati quindi introdotti in un tubo per Kjeldahl e mineralizzati come riportato per il TN. L'azoto ammoniacale è stato quindi distillato, raccolto su soluzione di

acido borico e titolato con una soluzione di HCl 0.1000 N. Il risultato è espresso come azoto non proteico in TCA al 12%.

$$\text{SN-TCA} = \frac{1.4007 \times (\text{ml HCl} - \text{ml bianco}) \times 0.1000 \text{ (normalità dell'HCl)}}{1.28 \text{ g (peso campione)}}$$

9.2.5.3 Azoto solubile in acido fosfotungstico (SN-PTA)

80 ml di filtrato A sono stati trasferiti in una beuta da 250 ml. Sono stati aggiunti 40 ml di acido fosfotungstico al 10% e 40 ml di acido solforico al 25% (v/v), quindi la soluzione è stata lasciata riposare 24 h. Dopo filtrazione su carta Whatman n°42, 60 ml di filtrato, corrispondenti a circa 1,20 g di formaggio, sono stati introdotti in un tubo Kjeldahl e mineralizzati, distillati e titolati come descritto in precedenza.

$$\text{SN-PTA} = \frac{1.4007 \times (\text{ml HCl} - \text{ml bianco}) \times 0.1000 \text{ (normalità dell'HCl)}}{1.20 \text{ g (peso campione)}}$$

9.3 Determinazione del profilo lipolitico

Gli acidi grassi liberi (AGL) nel formaggio sono stati determinati per via gascromatografica secondo il metodo descritto da De Jong e Badings (1990).

9.3.1 Estrazione della frazione lipidica

Su provetta in vetro pyrex con tappo a vite provvisto di guarnizione in teflon sono stati pesati 3 g di Na₂SO₄ ed 1g di formaggio, quest'ultimo utilizzando una bilancia analitica. Al campione sono stati addizionati 0.3 ml di soluzione acquosa 2.5 M di H₂SO₄, 1 ml di soluzione di standard interno contenente 1.5 mg/ml di C5:0, C9:0, C13:0 e C19:0, e 3 ml di una soluzione di etere/n.eptano (1:1 v/v). Le provette sono state agitate per 1 minuto e quindi centrifugate a 4°C per 1 minuto a circa 300 rpm .

Le fasi organiche sono state raccolte su provette con tappo a vite contenenti 3 g di Na_2SO_4 come anidrificante. La procedura è stata ripetuta per altre due volte utilizzando sempre 3 ml di etere/n.eptano per ciascuna estrazione.

Le fasi organiche così raccolte sono state riunite insieme e avviate a purificazione SPE.

9.3.2 Purificazione degli AGL dalla matrice lipidica

Il clean-up degli AGL è stato condotto mediante purificazione su colonnine SPE da 0.5g di amminopropile (BOND ELUT VARIAN).

Alle colonnine, precedentemente equilibrate con 10 ml di n.eptano, sono state aggiunte le fasi organiche. Le colonnine sono state quindi lavate, per allontanare i lipidi neutri, con 10 ml di una soluzione di cloroformio/isopropanolo (2:1 v/v).

Gli acidi grassi liberi sono stati successivamente eluiti con 5 ml di etere etilico acidificato con acido formico al 2%.

1 μ l di questa frazione, contenente gli acidi grassi liberi non derivatizzati, è stata iniettata al gascromatografo.

9.3.3 Separazione gascromatografica

La separazione degli AGL è avvenuta in un GC 6890 Agilent technologies (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) utilizzando una colonna capillare HP_FFAP (lunghezza 50 m, diametro interno 0.32 mm, spessore fase fissa 0.50 μm di glicole polietilenico cross-linked). È stato usato He come gas di trasporto ad un flusso costante di 2 ml/min.

La separazione in colonna è avvenuta utilizzando la seguente programmata di temperatura: da 65°C a 240°C con incrementi di 10°C/min, la temperatura è stata quindi tenuta a 240°C per 20 minuti.

La temperatura dell'iniettore era di 290°C, mentre il detector (a ionizzazione di fiamma) è stato mantenuto alla temperatura costante di 290°C.

Tabella 9.1 Range operativo e limite di determinabilità strumentale per i singoli AGL

Acido	LoD (mmol/kg _{form})	LoQ (mmol/kg _{form})	Range dinamico lineare (mmol/kg _{form})		r ²
			min	max	
C2:0	0.5	1.5	1.5	7.1	0.9982
C3:0	0.15	0.45	0.45	4.78	0.9996
iC4:0	0.02	0.07	0.20	4.06	1.0000
C4:0	0.1	0.3	1.1	20.9	1.0000
iC6:0	0.01	0.03	0.11	2.24	1.0000
C6:0	0.05	0.15	0.35	6.92	1.0000
C8:0	0.15	0.46	0.46	3.94	0.9995
C10:0	0.03	0.09	0.33	6.70	1.0000
C11:0	0.01	0.02	0.08	1.61	1.0000
C12:0	0.03	0.10	0.15	2.97	1.0000
C14:0	0.04	0.11	0.20	3.95	1.0000
C15:0	0.02	0.06	0.07	1.39	0.9999
C16:0	0.1	0.4	0.4	5.6	0.9998
C16:1 c9	0.01	0.04	0.07	1.47	1.0000
C17:0	0.03	0.08	0.08	1.09	0.9998
C18:0	0.08	0.25	0.25	1.05	0.9976
C18:1 c9	0.09	0.27	0.27	3.49	0.9998
C18:2 c9, c12	0.03	0.10	0.10	1.23	0.9998
C18:3 c9, c12, c15	0.02	0.05	0.05	0.79	0.9998
(C4-C10)	0.3	1.0	< 2.2	38.5	
Media catena	0.3	0.8	< 1.1	18.1	
Lunga catena	0.2	0.7	< 0.5	6.6	
AGL Totali	0.8	2.5	< 6.4	63.2	

LoD = limite di rivelabilità strumentale; LoQ = limite di quantificazione; ^aMedia Catena, C12:0 – C16:1; ^bLunga Catena, C18:0 – C18:3; ^cAGLT, acidi grassi liberi totali

La ripetibilità dell'intera metodica è stata valutata mediante l'esecuzione di prove ripetute su un campione di formaggio Fiore Sardo a 3,5 mesi di stagionatura. La tabella riporta i dati di ripetibilità ottenuti per ogni analita presente nel campione:

Tabella 9.2 Ripetibilità nella determinazione dei singoli acidi liberi su matrice reale (n=3)

Acido	media mmol/Kg formaggio	s_{rel} (%)
C2:0	15	4.8
C4:0	4.7	4.8
C6:0	1.9	4.9
C8:0	1.2	5.0
C10:0	2.8	3.8
Corta catena	26	4.6
C12:0	1.4	4.1
C14:0	1.9	4.6
C15:0	0.2	4.5
C16:0	3.3	5.2
Media catena	6.8	4.7
C18:0	1.7	4.5
C18:1 9c	3.9	6.2
C18:2 9c, 12c	0.4	7.8
C18:3 9, 12, 15c	0.2	5.7
Lunga catena	6.3	5.3
Totali	38.8	4.4

9.4 Analisi SPME-GC/MS della frazione volatile-aromatica

9.4.1 Estrazione SPME

La frazione volatile-aromatica dei formaggi è stata effettuata mediante estrazione degli analiti con fibra SPME e successiva separazione e identificazione tramite GC/MS.

Circa 3g di formaggio, precedentemente grattugiato e omogeneizzato, sono stati pesati in vial di vetro da 10 ml. Il vial, chiuso ermeticamente con setto in Viton e ghiera di metallo è stato termostato a 40°C per 15 minuti. Nello spazio di testa del vial è stata esposta la fibra SPME in DVB/Carboxen/PDMS 50/30 µm da 1 cm (SUPELCO). Il tempo ottimale di esposizione, determinato in precedenti lavori (Urgeghe *et al.*, 2011), è stato fissato in 3 min. Dopo la fase di assorbimento, la fibra è stata ritratta dal campione ed esposta nell'iniettore del gascromatografo per il desorbimento dei composti volatili intrappolati.



Figura 9.1 Principali fasi del processo analitico SPME-GC/MS

9.4.2 Separazione cromatografica

La separazione è avvenuta utilizzando un gascromatografo Varian 3800 (Varian, Palo Alto, USA). Il desorbimento degli analiti dalla fibra SPME è avvenuto nell'iniettore del GC tenuto ad una temperatura costante di 250°C. La fase di desorbimento della fibra è durata 10 minuti, con l'iniettore in condizioni di splitless per i primi 5 minuti e con un rapporto di splitting pari a 1:60 nei successivi 5 minuti.

La separazione cromatografica è stata condotta su colonna DB-Wax ETR (Extended Temperature Range) da 60 m x 0.32 mm spessore del film 0.50 μm (Agilent Technologies). E' stato usato He come carrier gas ad un flusso costante di 1 ml/min. La separazione è avvenuta con programmata di temperatura da 45°C a 250°C secondo lo schema riportato:

Tabella 9.3 programmata di temperatura

T (°C)	Velocità (C/min)	Hold (min)	Tempo totale (min)
45		4.00	4.00
150	5.0	3.00	28.00
250	10.0	5.00	43.00

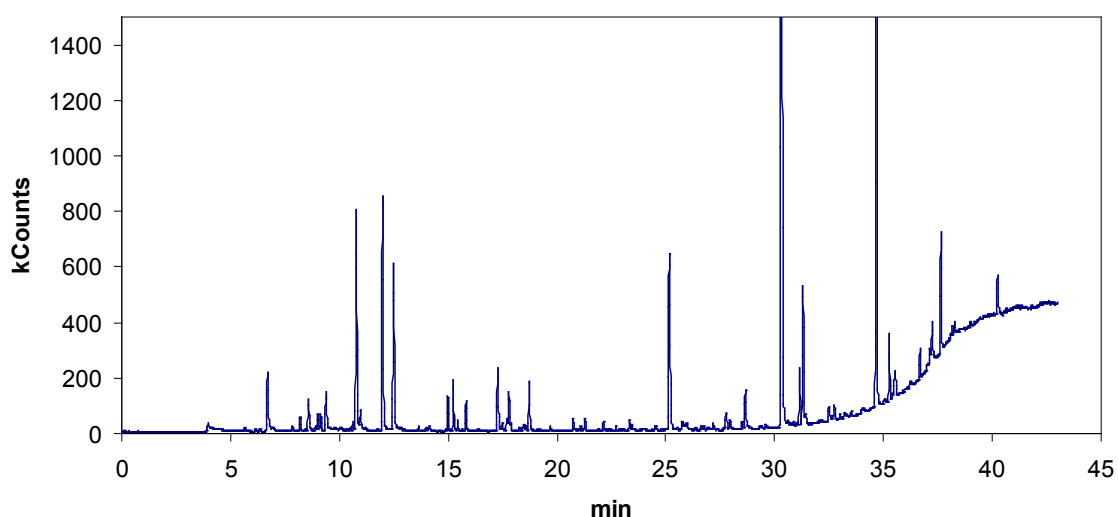


Figura 9.2 Esempio di cromatogramma SPME-GC/MS ottenuto su Fiore Sardo a 3.5 mesi di stagionatura

La colonna in uscita è stata splittata verso due detector, lo spettrometro di massa per l'identificazione degli analiti ed il FID per l'integrazione dell'area del picco corrispondente all'analita identificato, con un rapporto di 2:3 (MS/FID). Lo splittaggio è stato realizzato utilizzando due transfer lines disattivate da 0.15 mm.

9.4.3 Identificazione degli analiti mediante spettrometria di massa

Gli spettri di massa sono stati ottenuti utilizzando come spettrometro di massa una trappola ionica (Saturn 2000, Varian, Palo Alto, USA), operante in un range di masse continuo nell'intervallo 20-300 m/z. Il sistema di ionizzazione impiegato era l'impatto elettronico (EI).

L'identificazione degli analiti è stata ottenuta mediante ricerca in libreria degli spettri, e, ove possibile, per confronto del tempo di ritenzione dei singoli analiti con quello dei relativi standard di riferimento e per confronto dell'indice di ritenzione lineare (LRI) calcolato dei singoli analiti con quelli riportati in bibliografia. La Tabella 9.4 mostra l'elenco dei composti confermati mediante confronto del tempo di ritenzione e degli LRI.

Tabella 9.4 elenco degli analiti determinati e confermati mediante confronto degli LRI calcolati e degli LRI presenti in bibliografia (Bianchi et al., 2007; Mallia et al. 2005; Ziino et al., 2005; Povoletto et al., 2007)

Classe	Analita	RT	LRI
alcoli e fenoli	2-propanolo	11.78	948
	2-butanolo	14.38	1041
	1-propanolo	14.85	
	2-pentanolo	17.30	1139
	1-butanolo	18.13	1166
	3-metil-1-butanolo	20.03	1229
	1-pentanolo	21.29	1256
	2-metil,3-buten-1-olo	21,45	1263
	2-eptanolo	23.19	1339
	1-esanolo	24.20	1378
	2-nonen-1-olo	25.77	1420
	2-etil1-esanolo	28.26	1510
	2-furan-metanolo	32.79	1671
	3-metossi-fenil-oxime	33.79	1725
	2-metossi-fenolo	36.58	1934
	2-metossi, 4-metil-fenolo	37.91	2017
	fenolo	38.39	2038
Acidi	Acido acetico	27.33	1493
	Acido propanoico	29.94	1583
	Acido 2-metil propanoico	30.60	1607
	Acido butanoico	32.02	1650
	Acido 3-metil butanoico	32.88	1676
	Acido pentanoico	34.16	1761
	Acido esanoico	35.90	1892
	Acido ottanoico	38.74	2106

	Acido decanoico	41.52	2310
Aldeidi	Acetaldeide	6.96	720
	2-metil butanale	11.39	
	3-metil butanale	11.53	940
	Esanale	16.53	
	Eptanale	19.72	
	benzaldeide	30.32	1589
esteri	Acetato di etile	10.61	913
	Acetato di propile	13.08	1001
	Butanoato di metile	13.43	1012
	Butanoato di etile	14.94	1061
	Acetato di butile	16.07	1097
	Butanoato di propile	17.62	1147
	Butanoato di butile	17.79	1244
	Esanoato di etile	20.96	1259
	Esanoato di propile	23.43	1346
	Ottanoato di metile	25.47	1418
	Esanoato di butile	26.07	1438
	Ottanoato di etile	26.69	1459
	Decanoato di etile	32.16	1646
2-chetoni	2-propanone	8.99	841
	2-butanone	11.04	928
	2-pentanone	13.26	1006
	2, 3-butandione	13.28	1008
	2-esanone	16.43	
	2-eptanone	19.63	1214
	3-idrossi, 2-butanone	22.99	1335
	2-nonanone	25.58	1423
	3-Ottene	9.30	849
	Toluene	15.35	1074
	p-xilene	18.35	1167
	m-xilene	18.56	1172
	o-xilene	19.98	1220
	Limonene	20.15	

E' stata valutata la ripetibilità del processo di estrazione mediante fibra SPME, analizzando ripetutamente un campione di formaggio Fiore Sardo con sei mesi di stagionatura. La tabella riporta i dati di ripetibilità ottenuti per ogni analita:

Tabella 9.5 Valori di ripetibilità per i singoli analiti identificati su un campione di Fiore Sardo

Analita	CV (%)	Analita	CV (%)
1-butanolo	9.9	fenolo	8.9
2-butanolo	1.7	metossi- fenilossima	22
2-butanone	9.0	m-xilene	3.8
2-eptanolo	8.0	ottanoato di etile	4.7
2-eptanone	6.8	o-xilene	17
2-esanolo	20	p-xilene	26
2-esanone	19	toluene	11
2-etil-1-esanolo	6.3		
2-furanmetanolo	4.3		
2-metossi-4-metilfenolo	12		
2-metossifenolo	9.2		
2-nonanone	3.2		
2-pentanolo	12		
2-pentanone	8.4		
2-propanolo	9.1		
2-propanone	8.8		
3-idrossi-2-butanone (Acetoino)	4.6		
3-metil-1-butanolo (alcol isoamilico)	5.9		
Acetato de etile	9.6		
Acetato di butile	4.7		
Acido 2-metilpropanoico (isobutirrico)	18		
Acido 3-metilbutanoico (isovalerico)	8.5		
Acido acetico	1.9		
Acido butirrico	5.0		
acido decanoico	14		
acido esanoico	9.6		
acido ottanoico	11		
acido pentanoico	6.5		
acido propanoico	12		
butanoato di butile	4.7		
butanoato de etile	8.3		
butanoato di propile	12		
esanoato di propile	7.2		
esanoato di etile	4.1		

Caratterizzazione chimica dei campioni di formaggio Fiore Sardo DOP

Risultati e discussione

9.5 Studio della macrocomposizione

In Tabella 9.6 sono riportati i risultati relativi ai parametri chimico fisici dei 36 campioni di formaggio “Fiore Sardo DOP”, acquistati presso i quattro punti vendita (A, B, C e D) ed espressi come media \pm sd. Nella Tabella 9.7 sono invece mostrati, per gli stessi parametri analitici, gli intervalli di variazione (min \div max).

I valori relativi al contenuto in umidità, grasso e proteine, riferiti a 100 grammi di prodotto (Tabella 9.6) sono confrontabili con quanto riportato in letteratura per la stessa tipologia di formaggio, con una stagionatura compresa tra 105 (termine minimo per la commercializzazione di tale formaggio) e 180 giorni (Pettinau *et al.*, 1978; Ledda *et al.*, 1995; Addis *et al.*, 2005b, Pisanu *et al.*, 2006; Pirisi *et al.*, 2007).

Il valore relativo al contenuto di grasso sulla sostanza secca è risultato sempre maggiore del 40% (50%, 49%, 49% e 47% per A, B, C e D rispettivamente), ossia del minimo valore previsto per il Fiore Sardo, in accordo al Disciplinare di Produzione (DPR 1279, 30/10/1955).

I campioni di formaggio acquistati presso il punto vendita D risultano tendenzialmente avere un contenuto di grasso, proteine ed NaCl superiore rispetto a quello determinato nei campioni acquistati presso gli altri punti vendita. Gli stessi campioni (punto vendita D) sono caratterizzati invece dal più basso valore di pH e di umidità.

La relativa ampiezza degli intervalli di variabilità (Tabella 9.7) dei parametri chimico fisici determinati denotano una elevata variabilità delle caratteristiche macrocompositive del prodotto commerciale “Fiore Sardo”, sia fra le diverse catene commerciali presso cui sono stati acquistati i campioni che – addirittura - all’interno di quelli (presumibilmente provenienti dallo stesso fornitore) reperibili nel medesimo punto vendita. Questa elevata variabilità dipende in modo particolare dal carattere artigianale della produzione del formaggio “Fiore Sardo” e le cause vanno ricercate nella tecnologia di trasformazione che, del tutto manuale, tende a far divenire “unica” ciascun batch di produzione. In particolare, la durata della presa e dell’indurimento, l’entità della rottura della cagliata e la pressatura (quando effettuata) sono le fasi tecnologiche che maggiormente influenzano le caratteristiche macrocompositive del prodotto finale.

Un altro parametro tecnologico influenzato dall'artigianalità della trasformazione e legato alla manualità del produttore è il contenuto di cloruro di sodio. La concentrazione di NaCl influenza le caratteristiche sensoriali del prodotto finito sia direttamente, attraverso il sapore, sia in modo indiretto, in quanto agisce sull'attività libera dell'acqua. Questo parametro partecipa infatti alla regolazione dei processi biochimici di maturazione che portano alla formazione dei composti che, a loro volta, concorrono alla definizione dell'aroma.

Tabella 9.6 Parametri chimico fisici (media \pm sd) dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP

Punti vendita	pH	Umidità (%)	Grasso (%)	Proteine (%)	NaCl (%)
A	5.0 \pm 0.1	32.2 \pm 0.4	34.2 \pm 0.5	26.8 \pm 0.4	1.7 \pm 0.2
B	5.2 \pm 0.2	33 \pm 1	33 \pm 1	27 \pm 2	2.0 \pm 0.2
C	5.1 \pm 0.1	34.4 \pm 1.5	30 \pm 1	27.8 \pm 0.8	2.5 \pm 0.3
D	4.8 \pm 0.1	30.1 \pm 2.5	33 \pm 2	29 \pm 3	3.6 \pm 0.2

Tabella 9.7 Parametri chimico fisici (min \div max) dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP

Punti vendita	pH	Umidità (%)	Grasso (%)	Proteine (%)	NaCl (%)
A	4.9 \div 5.3	31 \div 33	33 \div 35	26.4 \div 27.4	1.5 \div 2.0
B	4.9 \div 5.4	31 \div 35	31 \div 36	25.4 \div 32.5	1.8 \div 2.7
C	5.0 \div 5.2	31 \div 36	29 \div 33	26.6 \div 28.8	2.0 \div 2.9
D	4.7 \div 5.0	25.5 \div 34	30 \div 36	26.3 \div 34.8	3.3 \div 3.9
Insieme dei campioni	4.7 \div 5.4	25.5 \div 36	29 \div 36	25.4 \div 34.8	1.5 \div 3.9

9.6 Indici di Proteolisi

In Tabella 9.8 sono riportati i risultati (media \pm sd) relativi agli indici di proteolisi (SN/TN, SN-TCA/TN, SN-PTA/TN) determinati nei campioni di "Fiore Sardo" analizzati.

Anche in questo caso i valori ottenuti sono confrontabili con le caratterizzazioni a suo tempo effettuate in precedenti lavori su questa tipologia di formaggio (Pettinau *et al.*, 1978; Ledda *et al.*, 1995; Addis *et al.*, 2005b, Pirisi *et al.*, 2007) e riflettono in generale una maturazione proteolitica poco accentuata, caratteristica di questa tipologia di formaggio.

I campioni di formaggio acquistati presso il punto vendita A sono caratterizzati da una proteolisi superiore rispetto a quella dei campioni reperiti presso gli altri punti vendita. E' possibile ipotizzare che il processo di maturazione proteolitica, più accentuato nei formaggi A, sia riconducibile ad una maggiore attività enzimatica, legata a sua volta al minore contenuto di sale che caratterizza questi formaggi (Tabella 9.6).

In Tabella 9.9 sono riportati gli intervalli di variazione di tali dati. Essi evidenziano anche in questo caso, come già precedentemente accennato per i parametri di macrocomposizione, una marcata variabilità legata sia alla altrettanto variabile composizione enzimatica del tipo di caglio utilizzato che alla microflora nativa del latte. Per la produzione del Fiore Sardo il casaro non ricorre, generalmente, all'utilizzo di un innesto durante la caseificazione, pertanto è abbastanza ragionevole ritenere che il processo proteolitico sia governato principalmente dagli enzimi coagulanti e proteolitici aggiunti con il caglio in fase di coagulazione. Trattandosi comunque di un formaggio prodotto da latte crudo, anche gli enzimi prodotti dai batteri lattici, che costituiscono la microflora nativa del latte di partenza, possono potenzialmente contribuire alla proteolisi, ancorchè in una fase secondaria.

Tabella 9.8 Indici di proteolisi (media \pm sd) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP

Punto vendita	SN/TN	SN-TCA/TN	SN-PTA/TN
A	32 \pm 1	30 \pm 1	13.3 \pm 0.4
B	26 \pm 4	24 \pm 4	10.2 \pm 1.5
C	26.0 \pm 0.9	24.5 \pm 1	12.4 \pm 1.5
D	24 \pm 2	22 \pm 3	9.1 \pm 1.6

Tabella 9.9 Indici di proteolisi (min \div max) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP

Punto vendita	SN/TN	SN-TCA/TN	SN-PTA/TN
A	29 \div 33.6	27 \div 31	12.8 \div 13.8
B	22 \div 33	20 \div 31	8 \div 12.5
C	24.5 \div 27	23 \div 26	10 \div 15
D	20 \div 27	17 \div 25	6.6 \div 10.6
Insieme dei campioni	20 \div 33.6	17 \div 31	6.6 \div 15

9.7 Studio della lipolisi

La Tabella 9.10 mostra i risultati (media \pm sd) relativi al profilo lipolitico dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” analizzati nel presente lavoro di tesi. Per facilitare la discussione gli acidi grassi liberi sono stati raggruppati in acidi grassi a corta catena (C4:0-C10:0), media catena (C12:0-C16:1), lunga catena C18:0-C18:3) e AGLT (acidi grassi liberi totali).

L'elevato contenuto totale di acidi grassi liberi (35 \pm 16 mmol/kg di formaggio) che caratterizza in generale i campioni analizzati, conferma che il formaggio “Fiore Sardo” è caratterizzato da una maturazione prevalentemente lipolitica.

Il coagulante utilizzato nella fase di caseificazione svolge un ruolo fondamentale nell'indirizzare il processo di lipolisi. E' interessante rilevare come nei campioni analizzati gli acidi grassi liberi a corta catena (C4-C10) siano risultati i più rappresentativi fra gli acidi grassi liberi, con una percentuale, rispetto al totale, maggiore in tutti i casi del 50% (53%, 61%, 53% e 52%, rispettivamente per i formaggi A, B, C e D). Virto *et al.*, 2003 suggeriscono che un livello di acidi grassi a corta catena tra il 50 e il 55% (espressi come percentuale degli acidi grassi liberi totali) possa essere interpretato come un indice abbastanza attendibile per dedurre la presenza di lipasi pregastrica nel caglio impiegato per la coagulazione.

I formaggi acquistati presso il punto vendita D sono caratterizzati, tendenzialmente, da un contenuto maggiore sia di acidi grassi liberi totali che a corta, media e lunga catena rispetto ai campioni reperiti presso gli altri punti vendita.

Il carattere artigianale delle lavorazioni si riflette pesantemente anche sulla variabilità dei risultati relativi al profilo lipolitico (Tabella 9.11). Le cause più importanti sono anche in questi casi da ricercarsi sia nella altrettanto elevata variabilità della attività lipolitica del caglio in pasta impiegato dai vari produttori che nelle altrettanto variabili condizioni di stagionatura.

La composizione enzimatica dell'estratto di caglio in pasta dipende infatti da diversi fattori che possono essere raggruppati in due classi principali. La prima classe di fattori di variabilità è legata alle condizioni di allevamento e di macellazione degli agnelli da cui vengono prelevati gli abomasi e comprende i seguenti fattori:

- alimentazione degli animali (esclusivamente allattati o al pascolo);
- stato fisiologico dell'animale al momento della macellazione (stomaco pieno o digiuno);
- età dell'animale.

L'alimentazione prevalentemente latte e la macellazione degli animali subito dopo la suzione comportano l'ottenimento di abomasi, e quindi di cagli in pasta, con un corredo enzimatico prevalentemente composto da chimosina e lipasi pregastrica. La presenza di erba nell'alimentazione, l'età avanzata dell'animale al momento della macellazione e lo stato fisiologico di digiuno determinano invece la prevalenza di pepsina e lipasi gastriche e/o microbiche (Piredda *et al.*, 1998 ; Addis *et al.*, 2005b; Addis *et al.*, 2007; Bustamante *et al.*, 2000).

La seconda classe di fattori di variabilità che influisce sulla composizione enzimatica del caglio, comprende tutti gli accorgimenti tecnologici adottati dapprima in fase di preparazione del caglio in pasta, e successivamente dell'estratto da utilizzare per la coagulazione, quali:

- modalità di preparazione e durata di stagionatura degli abomasi (salatura, affumicatura, etc);
- modalità di preparazione del caglio in pasta (macinazione, triturazione, impiego della sola gemma o dell'intero caglio);
- modalità di preparazione dell'estratto (rapporto tra caglio in pasta e acqua, solubilizzazione della pasta, filtrazione etc).

L'utilizzo di cagli in pasta, la cui composizione enzimatica è estremamente variabile, non solo da azienda ad azienda ma a volte anche all'interno della stessa realtà aziendale nel corso dell'intera campagna casearia, comporta l'ottenimento di formaggi in cui i processi biochimici di maturazione si sviluppano in tempi e modi differenti.

Anche i dati relativi al profilo qualitativo e quantitativo degli acidi grassi liberi, determinato nei campioni in esame, sono confrontabili con le caratterizzazioni già effettuate in precedenti lavori su questa tipologia di formaggio (Addis *et al.*, 2005b, Pirisi *et al.*, 2007).

Tabella 9.10 Profilo lipolitico (media \pm sd) dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP

Catena di distribuzione	C4:0 – C10:0 (mmol/kg)	Media Catena ^a (mmol/kg)	Lunga Catena ^b (mmol/kg)	AGLT ^c (mmol/kg)
A	12 \pm 2	6 \pm 1	5.0 \pm 0.7	23 \pm 3
B	21 \pm 4	7.2 \pm 1.5	6 \pm 2	34 \pm 6
C	19 \pm 4	9 \pm 3	6.9 \pm 1.6	35 \pm 8
D	25 \pm 15	14 \pm 8	9 \pm 3	48 \pm 25

^aMedia Catena, C12:0 – C16:1; ^bLunga Catena, C18:0 – C18:3; ^cAGLT, acidi grassi liberi totali

Tabella 9.11 Profilo lipolitico (min ÷ max) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP

Catena di distribuzione	C4:0 – C10:0 (mmol/kg)	Media Catena ^a (mmol/kg)	Lunga Catena ^b (mmol/kg)	AGLT ^d (mmol/kg)
A	10 ÷ 16	4 ÷ 8	4 ÷ 6	18 ÷ 30
B	14 ÷ 27	5 ÷ 10	4 ÷ 9	26 ÷ 42
C	15 ÷ 27	6.5 ÷ 14	5 ÷ 10	27 ÷ 50
D	11 ÷ 51	7 ÷ 29	6 ÷ 14	25 ÷ 93
Insieme dei campioni	10 ÷ 51	4 ÷ 29	4 ÷ 14	18 ÷ 93

^aMedia Catena, C12:0 – C16:1; ^bLunga Catena, C18:0 – C18:3; ^cAGLT, acidi grassi liberi totali

Analizzando insieme i dati relativi al contenuto in acido acetico e al contenuto totale in ammine biogene dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” (Figura 9.3) è stata messa in evidenza una correlazione positiva ($r^2=0.71$, $P<0.001$) fra il contenuto in acido acetico (C2:0) e il contenuto totale in ammine biogene. Questa correlazione, messa in evidenza anche da altri autori sul formaggio di “Malga” (Innocente *et al.*, 2001), può essere spiegata dal fatto che i microrganismi responsabili della produzione delle ammine biogene potrebbero essere gli stessi coinvolti nella fermentazione del lattosio che ha fra i prodotti finali anche l’acido acetico.

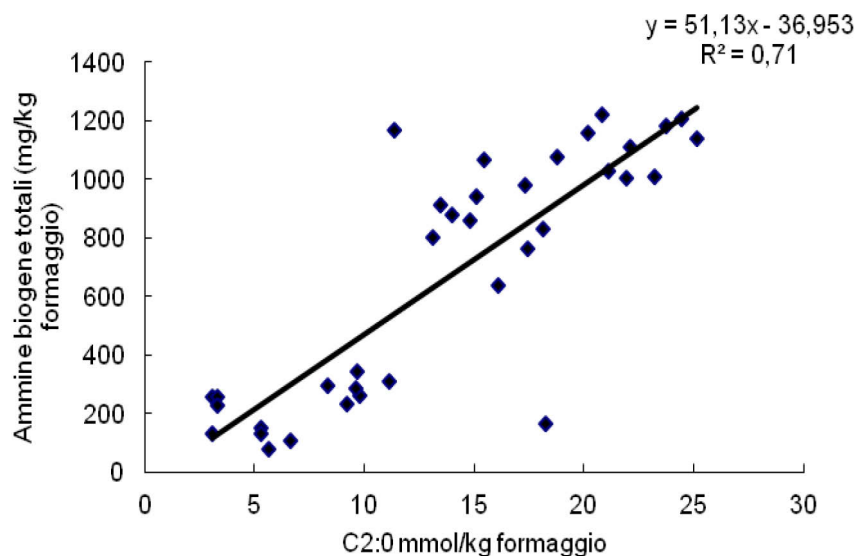


Figura 9.3 Correlazione tra il contenuto in acido acetico (C2:0) e il contenuto totale di ammine biogene nei campioni di “Fiore Sardo”

9.8 Caratterizzazione della frazione volatile

In Figura 9.3 è riportata la composizione percentuale media della frazione volatile dei campioni di Fiore Sardo analizzati nel presente lavoro di tesi. Il profilo determinato evidenzia come la classe degli acidi carbossilici sia quella più importante in quanto rappresenta il 58% circa dei composti volatili totali, seguita dagli alcoli (25%), chetoni (8%) ed esteri (5%). Sono stati identificati inoltre alcuni componenti minori (3%) quali aldeidi, idrocarburi e fenoli che, sebbene presenti in concentrazioni relativamente basse, contribuiscono, a causa della loro bassa soglia di percezione olfattiva, alla definizione dell'aroma di questa tipologia di formaggio.

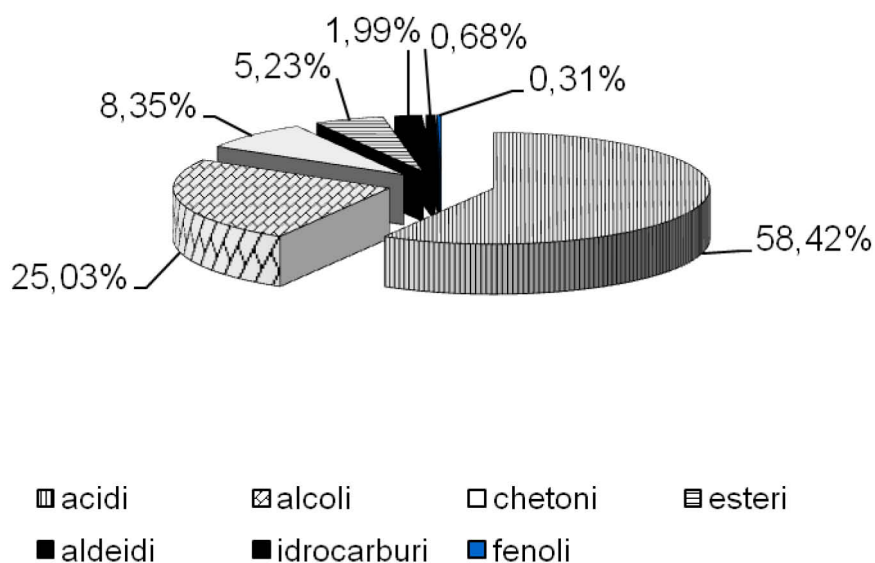


Figura 9.4 Composizione percentuale media della frazione volatile dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" analizzati

L'elevata variabilità, già messa in evidenza per i parametri relativi alla macrocomposizione e al profilo lipolitico, ed in gran parte dovuta sia alla variabilità della microflora nativa del latte di partenza sia alle peculiarità della procedura tecnologica adottata da ciascun produttore, si riflette inevitabilmente anche nel profilo della frazione volatile (Figura 9.4). In generale tutti i campioni analizzati sono caratterizzati da un profilo aromatico fortemente influenzato dalla presenza di acidi carbossilici a corta catena (C4:0-C10:0). Come si vede nella figura 9.5, il profilo aromatico più "bilanciato" appare essere quello dei campioni di formaggio acquistati presso il punto vendita C, caratterizzato per il 43% da acidi, il 35% da alcoli, il 12% da chetoni ed il 6% da esteri.

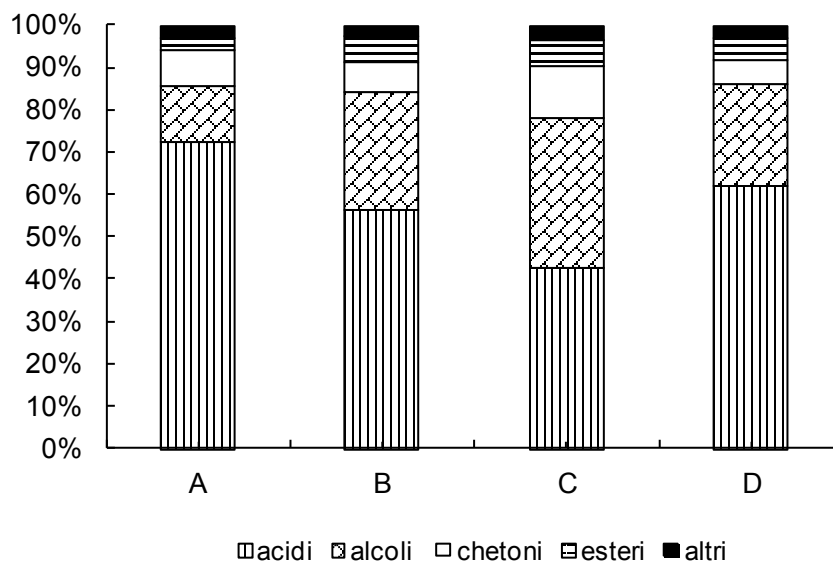


Figura 9.5 Variabilità nella composizione della frazione volatile dei campioni di formaggio “Fiore Sardo”

Scarsi sono in letteratura i lavori in cui è stata presa in esame la frazione volatile del “Fiore Sardo”. Recentemente Urgeghe *et al.*, (2011) hanno messo in evidenza, in campioni di formaggio “Fiore Sardo” a sei mesi di stagionatura, un profilo aromatico mediamente caratterizzato dal 68% di acidi carbossilici, seguiti dagli esteri (14%), chetoni (9%) ed alcoli (8%). Il profilo determinato da questi autori differisce dal profilo determinato nel presente lavoro di tesi, in particolare relativamente alle percentuali della classe degli esteri e degli alcoli, tali differenze sono comunque all’interno dell’elevato range di variabilità intrinseca della tecnologia di produzione di questa tipologia di formaggio.

Come atteso, è stata oggettivata una correlazione positiva ($r^2 = 0,85$, Figura 9.6) tra il contenuto nel formaggio in acidi grassi liberi (C4-C10) estratti mediante solvente, e la loro disponibilità nella frazione volatile determinata mediante SPME dello spazio di testa. Le due tecniche sono pertanto da considerarsi complementari nello studio della lipolisi e dello sviluppo di sostanze volatili.

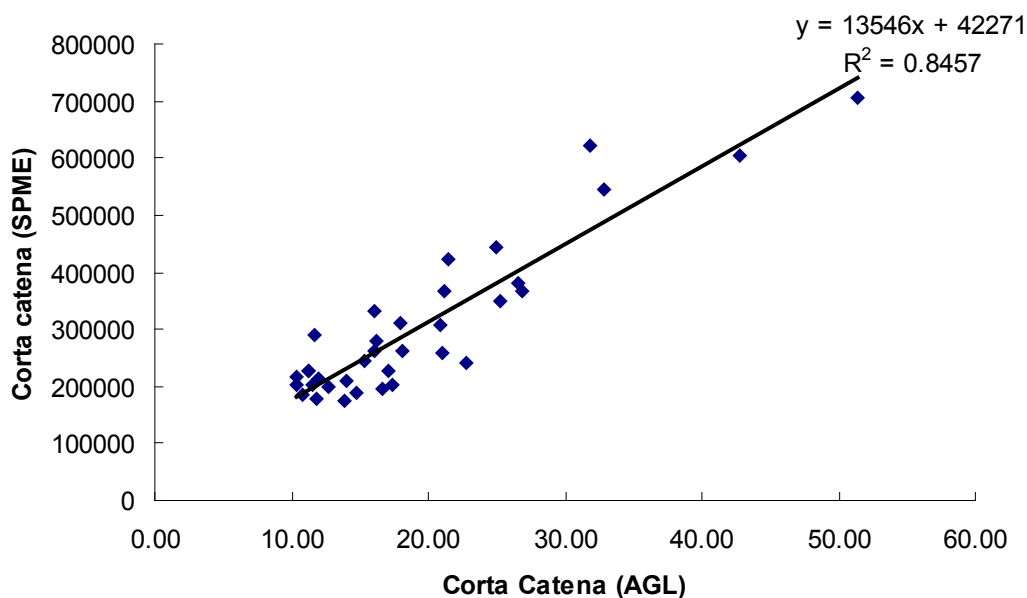


Figura 9.6 Correlazione fra il contenuto di AGL (C4-C10) nel formaggio ed il contenuto di C4-C10 presente nella frazione volatile dello spazio di testa

La tabella 9.12 riporta la distribuzione percentuale dei composti volatili per classe di appartenenza. Tra la classe degli acidi grassi liberi, derivati dall'azione lipolitica delle lipasi del caglio utilizzato, il più rappresentativo è l'acido butirrico (64%, 65%, 57% e 63%, rispettivamente per il pool di campioni A, B, C e D). La presenza di questo acido è responsabile delle note pungenti e di formaggio stagionato che ne caratterizzano l'aroma. La presenza dei 2-metilchetoni, derivanti dalla degradazione degli acidi grassi liberi per effetto della β -ossidazione, è determinante nella definizione dell'aroma del formaggio, in particolare per la tipologia degli erborinati, poiché ad essi è associato l'aroma fruttato e di muffa. Nei campioni analizzati il 2-eptanone risulta, per la classe dei 2-metilchetoni, quello maggiormente rappresentato (26%, 29% e 30%) rispettivamente per i campioni di Fiore Sardo A, C e D. I campioni reperiti presso il punto vendita B sono invece caratterizzati da un contenuto elevato di 2-butanone (56%), derivante dal metabolismo del citrato.

Gli esteri, derivanti dalla reazione di esterificazione dei corrispondenti acidi con gli alcoli (soprattutto etanolo), sono spesso associati alla comparsa nel formaggio di note fruttate e - in alcuni casi - floreali. Nei formaggi analizzati gli esteri maggiormente rappresentati sono il butirrato, l'esanoato ed il decanoato di etile, conseguentemente

all'elevato contenuto dei corrispondenti acidi grassi liberi (butanoico, esanoico e decanoico).

Relativamente alla classe degli alcoli il 2-propanolo è risultato essere il più rappresentativo degli alcoli secondari, mentre l'1-butanolo e l'1-propanolo per gli alcoli primari.

Tabella 9.12 Distribuzione percentuale dei composti volatili per classe di appartenenza

Acidi	A (% sulla classe)	B (% sulla classe)	C (% sulla classe)	D (% sulla classe)	Processo biochimico	Nota sensoriale
acido butanoico	64.51	65.22	57.74	63.04	Lipolisi dei trigliceridi	Rancido, formaggio
acido esanoico	24.89	23.48	25.99	26.12		Pungente, erborinato
acido acetico	4.62	5.20	7.94	4.78		Pungente, Aceto
acido ottanoico	3.39	2.73	3.25	2.99		Capra, cera
acido decanoico	1.08	0.84	1.04	0.89		Rancido
acido 3- metilbutanoico	0.46	0.72	1.12	0.18		Frutta matura
acido pentanoico	0.43	0.40	0.45	0.50		Pungente
acido 2- metilpropanoico	0.31	0.41	0.88	0.85		Frutta matura
acido propanoico	0.31	1.00	1.59	0.66		Pungente, aceto
2-metilchetoni da β-ossidazione	A	B	C	D	Processo biochimico	Nota sensoriale
2-eptanone	26.80	11.46	29.51	30.45	β-ossidazione degli acidi grassi liberi	Formaggio erborinato
2-pentanone	21.30	7.96	21.68	20.02		Fruttato
2-propanone	15.28	5.98	9.64	9.78		Acetone
2-nonanone	5.61	3.25	7.96	7.50		Fruttato, muffa
Chetoni	A	C	D	S	Processo biochimico	Nota sensoriale
3-idrossi, 2- butanone	18.77	8.70	2.03	2.76	Metabolismo del citrato	
diacetile (2,3 butandione)	9.14	4.13	3.21	7.63		Burro
2-butanone	1.58	56.58	23.24	3.58		Acetone
2-esanone	0.00	0.00	1.70	15.72	β-ossidazione	Floreale, fruttato
2,3- dimetilciclopent-2- en-1-one	1.53	1.94	1.02	2.55		
Esteri	A	B	C	D	Processo biochimico	Nota sensoriale
butanoato di etile	42.89	43.66	38.46	48.91	Esterificazione chimica o enzimatica	Ananas
esanoato di etile	18.38	27.65	30.65	34.17		Ananas, banana
decanoato di etile	15.39	4.18	2.84	4.67		
acetato di etile	7.36	2.46	1.26	1.61		Solvente, ananas
butanoato di metile	7.22	3.38	3.27	2.17		Fruttato
ottanoato di etile	5.03	3.75	2.13	3.25		Albicocca, vino
butanoato di butile	2.26	1.54	1.78	0.63		Fruttato
esanoato di propile	1.47	4.09	6.42	1.36		Fruttato
acetato di propile	0.00	0.91	1.56	0.00		
Esteri	A (% sulla classe)	B (% sulla classe)	C (% sulla classe)	D (% sulla classe)	Processo biochimico	Nota sensoriale

acetato di butile	0.00	1.24	1.55	0.00	Esterificazione chimica o enzimatica	Ananas
butanoato di propile	0.00	6.04	8.73	3.24		Ananas, banana
esanoato di butile	0.00	0.80	0.76	0.00		
ottanoato di metile	0.00	0.31	0.60	0.00		
2-alcanoli	A	B	C	D	Processo biochimico	Nota sensoriale
2-propanolo	63.24	39.04	29.84	51.04	Riduzione dei 2-chetoni corrispondenti	Dolce, alcolico
2-pentanololo	3.91	3.87	9.97	10.63		Dolce, alcolico
2-eptanololo	0.66	0.70	1.43	1.22		Erba
2-butanolo	0.66	23.43	37.70	17.11	Riduzione chetoni	
1-alcanoli						
1-butanolo	23.51	11.79	5.65	2.38		
1-pentanololo	2.21	0.57	0.27	0.39		
1-esanololo	1.08	0.86	0.68	0.42		
1-propanolo	0.41	17.23	10.56	2.31		
Altri alcoli						
Alcoli ramificati	A	B	C	D	Processo biochimico	Nota sensoriale
3-metil-1-butanolo	2.74	0.70	1.78	8.91	Degradazione della leucina	Fruttato, alcolico
2-etil-1-esanololo	0.78	0.23	0.12	0.24		
2-metil-3-buten-1-olo	0.45	0.06	0.04	0.07		
2-metil-1-propanolo	0.00	0.00	0.60	0.00	Degradazione della valina	Alcolico
2-nonen-1-olo	0.35	0.08	0.37	0.22		
2-furanmetanololo	0.00	1.42	0.98	5.06		
Fenoli	A	B	C	D	Processo biochimico	Nota sensoriale
fenolo	73.45	14.80	50.88	50.29	Processi di degradazione di Tyr, Phe, Trp	
2-metossifenolo	0.00	59.32	22.61	31.11		
2-metossi-4-metil, fenolo	0.00	19.04	7.69	9.66		
3-metossifenilossima	26.55	6.85	18.82	8.94		
Aldeidi	A	B	C	D	Processo biochimico	
Aldeidi lineari						
eptanale	12.47	8.81	6.93	10.81		
esanale	9.77	11.79	10.65	1.84		
acetaldeide	8.48	8.39	2.57	6.28	Metabolismo del lattato	

Acidi	A (% sulla classe)	B (% sulla classe)	C (% sulla classe)	D (% sulla classe)	Processo biochimico	Nota sensoriale
3-metilbutanale	58.07	49.66	72.00	71.23	Degradazione della leucina	
2-metilbutanale	7.54	10.59	4.37	4.78	Degradazione della isoleucina	
benzaldeide	3.67	10.76	3.48	5.07		
Idrocarburi						
Idrocarburi aromatici	A	B	C	D		
m-xilene	28.22	15.20	12.81	2.37		
toluene	28.17	24.80	14.56	2.87		
o-xilene	13.88	9.83	49.45	89.21		
limonene	13.02	32.76	8.48	3.72		
p-xilene	9.13	10.08	6.33	0.70		
Idrocarburi lineari	A	B	C	D		
3-Ottene	7.58	7.34	8.37	1.13		

9.9 Analisi delle componenti principali

Utilizzando il software The Unscambler X (CAMO Softwares, Osòlo, Norway) è stata eseguita un'analisi delle componenti principali (PCA) sul dataset costituito dal contenuto in ammine biogene di tutti i campioni. Etichettando gli *score* (i campioni) in funzione del distributore presso i quali sono stati campionati (A,B,C,D), si osserva una netta separazione tra i campioni in funzione di questo parametro (Figura 9.6), in particolare i campioni dei distributori A e D si separano dagli altri lungo la prima componente principale per l'alto contenuto in spermina (Spm). Lungo la seconda componente principale invece si osserva la separazione tra i campioni dei distributori B e C, i primi caratterizzati da un alto contenuto in Phe Trp e Put, mentre per i campioni C si osserva un'ulteriore separazione in due sottogruppi, uno caratterizzato da un alto contenuto in Cad e His ed un altro dall'alto contenuto in Tyr. Anche i campioni D presentano una leggera separazione dai campioni A lungo la seconda componente principale dovuta al maggior contenuto in Cad, His e Tyr dei campioni D rispetto agli A.

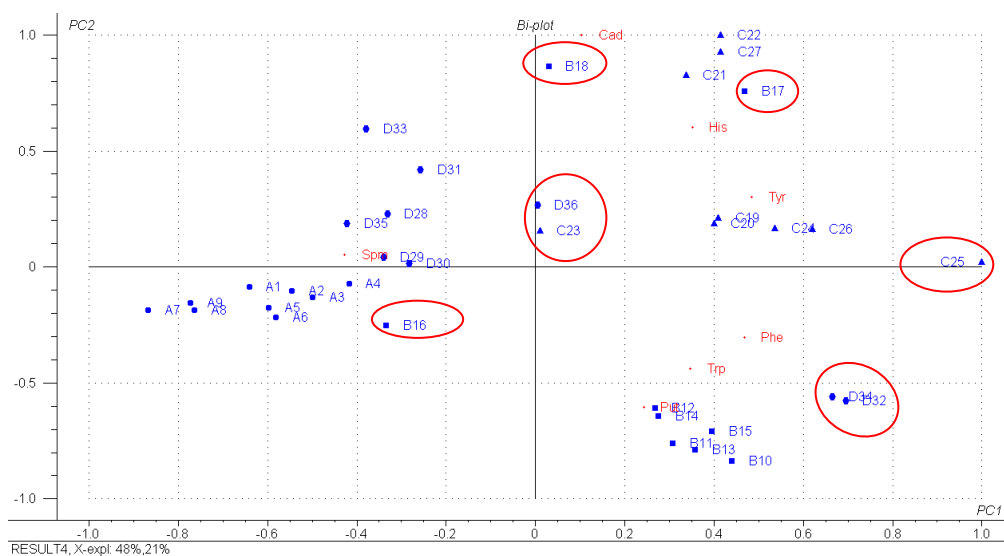


Figura 9.7 Analisi delle componenti principali effettuata utilizzando i dati relativi al contenuto in ammine biogene

Dal grafico si evince anche che alcuni campioni (cerchiati di rosso) presentano un contenuto in ammine biogene differente rispetto a quello che caratterizza i campioni provenienti dallo stesso distributore, ed in effetti gli stessi sono stati indicati dal software come possibili *outliers* (cioè campioni che non sono ben descritti dal modello e/o che influenzano il modello in maniera troppo marcata). gli stessi campioni presentano un comportamento “anomalo” anche quando, ampliando il dataset, vengono inclusi anche i valori relativi alla macrocomposizione, alla lipolisi, alla proteolisi e alla componente volatile (Figura 9.8). In particolare i campioni D34 e D32 presentano un valore di lipolisi talmente elevato da distorcere il modello, lo stesso per quanto riguarda il campione C25 e il suo contenuto in Phe e Tyr.

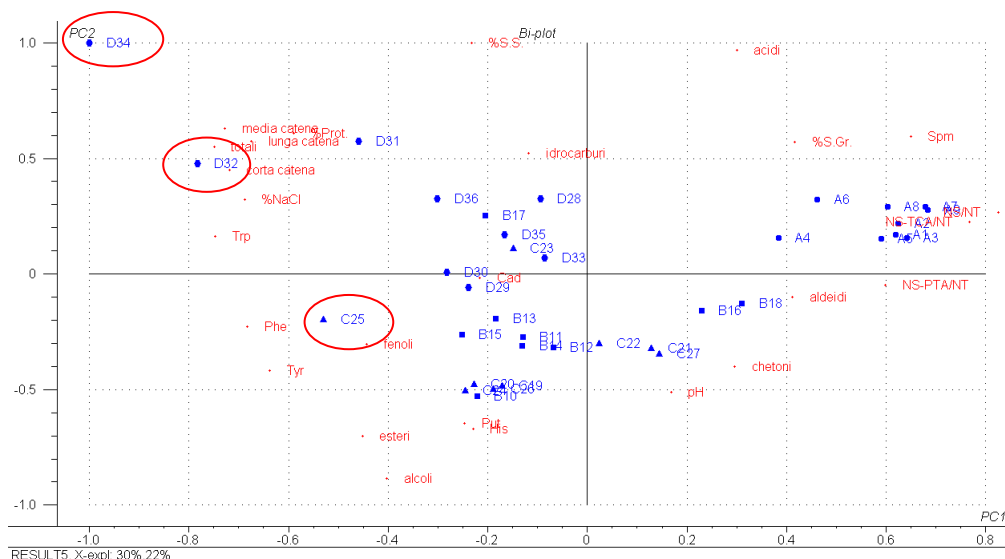


Figura 9.8 Analisi delle componenti principali effettuata utilizzando i dati relativi al contenuto in ammine biogene, macrocomposizione, lipolisi e proteolisi.

Preso atto del comportamento “anomalo” di questi campioni, essi sono stati esclusi dal calcolo delle componenti principali (Figura 9.7) al fine di migliorare il modello ed eseguirne una più corretta interpretazione. In Figura 9.8 si osserva che la varianza associata alla prima componente principale passa dal 30% al 35% e sia le variabili che i campioni presentano una distribuzione meno costretta, aspetti che permettono di interpretare meglio i risultati ottenuti.

Le considerazioni qualitative precedentemente effettuate sul contenuto in ammine biogene vengono sostanzialmente confermate dalle evidenze PCA. A queste si possono aggiungere quelle relative alla lipolisi, alla proteolisi, alla componente volatile e alla macrocomposizione che sembrano anch’esse differenziare i campioni in funzione del distributore. Lungo la prima componente principale si mantiene la separazione tra i campioni provenienti dal distributore A con gli altri campioni non solo per il loro alto contenuto in spermina ma anche per la maggiore proteolisi associata a questi campioni ed una componente volatile caratterizzata dalla presenza di acidi, mentre i campioni B, ed un gruppo di campioni C sono caratterizzati da un’elevata lipolisi e dalla presenza di alcoli ed esteri nella loro componente volatile. Gli altri campioni C (C21, C22 e C27) si differenziano dagli altri per il loro elevato pH e per l’alto contenuto di chetoni e aldeidi. Infine i campioni D si caratterizzano per l’elevato contenuto in NaCl, grasso, sostanza

secca, fenoli e idrocarburi, e per una leggera lipolisi a carico degli acidi grassi a lunga catena.

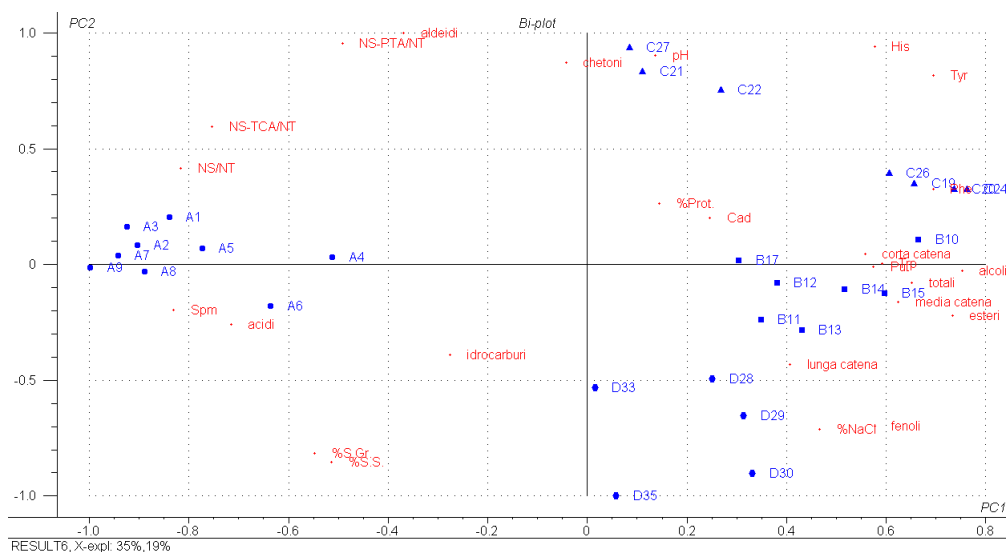


Figura 9.9 Analisi delle componenti principali effettuata utilizzando i dati relativi al contenuto in ammine biogene, macrocomposizione, lipolisi e proteolisi, eliminando i campioni *outliers*.

Capitolo 10

Conclusioni

L'esigenza, particolarmente sentita negli ultimi anni, di possedere adeguati strumenti di controllo, di certificazione e di oggettivazione della sicurezza in campo alimentare, ha reso necessaria l'adozione di specifiche disposizioni a tutela del consumatore. Questo iter non poteva non riguardare anche alcune delle più importanti produzioni tradizionali a Denominazione di Origine Protetta del comparto lattiero-caseario sardo.

Nel presente lavoro di tesi è stato approfondito il discorso relativo ad uno dei più significativi aspetti connessi alla sicurezza alimentare del formaggio "Fiore Sardo" DOP: la presenza e la quantificazione delle ammine biogene. La problematica ci è subito apparsa stimolante: oltre alla consueta povertà di background scientifico relativo ai prodotti di trasformazione del comparto lattiero-caseario ovino, alcuni elementi peculiari di tale prodotto, quale la natura della materia prima e l'artigianalità delle fasi di lavorazione lo rendevano potenzialmente incline allo sviluppo di questi prodotti di degradazione.

Il formaggio in generale costituisce in realtà un ambiente ideale per lo sviluppo delle ammine biogene, la cui presenza nell'alimento può essere vista come un indice di contaminazione microbiologica e quindi come un indicatore di qualità e affidabilità del prodotto. Sebbene l'argomento sia stato già in passato trattato da diversi gruppi di ricerca, l'indagine si è prevalentemente focalizzata su formaggi vaccini, solo raramente su formaggi ovini a latte crudo, e mai su formaggi ovini DOP prodotti in Sardegna. Partendo da questi presupposti, nel presente lavoro di tesi è stata innanzitutto messa a punto una metodologia analitica per la determinazione delle ammine biogene, che è stata sottoposta a procedura di validazione per verificarne la precisione, l'accuratezza, la ripetibilità e la riproducibilità. Il metodo validato è stato quindi applicato su campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP reperiti in commercio.

Presso quattro punti vendita (A, B, C e D) diffusi su tutto il territorio nazionale, in tre occasioni sono stati acquistati dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP

provenienti da altrettanti differenti produttori artigianali. Sui campioni in esame è stato determinato il contenuto in ammine biogene, applicando il metodo validato. Il lavoro analitico è stato infine completato dalla determinazione in tale matrice dei macrocostituenti (umidità, proteine, grasso e NaCl), del grado di maturazione proteolitica e lipolitica e del profilo dei componenti la frazione volatile-aromatica.

Nei campioni analizzati è stata rilevata la presenza di sette delle otto ammine biogene che il metodo è in grado di analizzare: Triptamina, Feniletilammina, Putrescina, Cadaverina, Istamina, Tiramina e Spermina. È significativo notare innanzitutto la notevole estensione dell'intervallo di variabilità (tra 80 e 1222 mg/kg) della somma delle sette ammine quantificate, mentre il loro contenuto medio relativo come somma è risultato pari a 630 mg/kg. Sebbene importanti, questi valori sono risultati comunque confrontabili con quanto riportato in letteratura per formaggi prodotti a partire da latte ovino crudo o termizzato quali il Pecorino Abruzzese e il Feta. Le ammine biogene maggiormente abbondanti sono la tiramina (concentrazione media nei 36 campioni pari a 350 mg/Kg) e la putrescina (150 mg/Kg), Triptamina e Feniletilammina sono quelle meno abbondanti (concentrazioni medie comprese tra i 3 e 10 mg/Kg, rispettivamente), mentre le altre tre ammine hanno concentrazioni medie pari a qualche decina di mg/Kg. I tentativi di correlazione con la macrocomposizione, con il profilo dei costituenti volatili e con gli indici di maturazione proteolitica e lipolitica, effettuati anche tramite analisi PCA, ha oggettivato solo riscontri nei confronti del pH. Il contenuto di ammine biogene pare infatti aumentare con l'aumento del valore di pH.

Contrariamente a quanto riportato in letteratura, nei campioni di formaggio in esame non è stata trovata alcuna correlazione positiva fra l'entità del processo di proteolisi ed il contenuto in ammine biogene, questo comportamento potrebbe essere attribuito al fatto che comunque il formaggio "Fiore Sardo" non è caratterizzato da una prevalente maturazione proteolitica, ma lipolitica, come peraltro ben oggettivato dal significativo sviluppo di acidi grassi a corta catena, che predominano anche fra i composti volatili aromatici. Le cause dell'elevata variabilità riscontrata a livello delle ammine biogene vanno quindi ricercate nell'artigianale tecnologia di trasformazione che tende a far divenire pressoché "unico" ciascun lotto di produzione.

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.1 Bollino che identifica i prodotti D.O.P.	13
Figura 1.2 Bollino che identifica i prodotti I.G.P.	13
Figura 1.3 Figura Bollino che identifica i prodotti S.T.G.	13
Figura 2.1 Percorsi metabolici a carico del lattato	31
Figura 2.2 Principali percorsi di degradazione degli acidi grassi liberi	34
Figura 2.3 Formaggio Fiore Sardo DOP a sei mesi di stagionatura	42
Figura 2.4 Fasi del processo di produzione	43
Figura 2.5 Aggiunta del caglio	45
Figura 2.6 Rottura della cagliata	45
Figura 2.7 Formatura	46
Figura 2.8 Affumicatura	47
Figura 3.1 Reazione di idrolisi di un trigliceride (da Patrizia Cappelli, Vanna Vannucchi, Chimica degli Alimenti, Zanichelli, Bologna, 2000)	51
Figura 3.2 Reazione di un acido grasso già idrolizzato (da Patrizia Cappelli, Vanna Vannucchi, Chimica degli Alimenti, Zanichelli, Bologna, 2000)	52
Figura 3.3 Schema di reazione dell'irrancidimento ossidativo a carico di un acido grasso monoinsaturo (da Patrizia Cappelli, Vanna Vannucchi, Chimica degli Alimenti, Zanichelli, Bologna, 2000)	53
Figura 3.4 Schema del processo fermentativo alcolico a carico del glucosio durante il processo della glicolisi (da Lehninger, A.L., Biochimica)	55
Figura 3.5 Schema della fermentazione lattica (da Patrizia Cappelli, Vanna Vannucchi, Chimica degli Alimenti, Zanichelli, Bologna, 2000)	56
Figura 3.6 Reazione di Maillard	61
Figura 4.1 formula di struttura delle ammine biogene	73
Figura 5.1 Schema 1 – Classificazione delle tecniche di estrazione per l'analisi di composti volatili	95
Figura 5.2 Vial per SPME con campione di formaggio	96

Figura 5.3 Apparecchiatura per Purge & Trap. Sparger (Particolare)	98
Figura 5.4 SPME: Fase di estrazione	100
Figura 5.5 SPME: Fase di desorbimento	101
Figura 7.1 Reazione del dansil cloruro con un'ammina	119
Figura 7.2 A, Cromatogramma con DCI; B, cromatogramma senza DCI	120
Figura 7.3 Spettro di assorbimento 3D (DAD) dei dansil derivati degli standard delle ammine biogene (soluzione a 5 ppm)	122
Figura 7.4 Cromatogramma A: standard di ammine biogene (5 µg/ml), lunghezza d'onda di 254 nm; cromatogramma B: standard di ammine biogene (5 µg/ml), lunghezza d'onda di 218 nm - rivelatore DAD. 1= TRP, 2=PHE, 3=PUT, 4=CAD, 5=HIS, 6=SI, 7=TYR, 8=SPM, 9=SPD.	123
Figura 7.5 Tempi di ritenzione delle ammine standard (soluzione da 10 ppm)	125
Figura 7.6 cromatogramma ottenuto su un campione di formaggio "Fiore Sardo". 1=Trp, 2=Phe, 3=Put, 4=Cad, 5=His, 6=SI, 7=Tyr, 8=Spm, 9=Spd.	128
Figura 7.7 Esempio di grafici dei residui	134
Figura 7.8 analisi dei residui delle 8 ammine biogene analizzate	135
Figura 9.1 Principali fasi del processo analitico SPME-GC/MS	159
Figura 9.2 Esempio di cromatogramma SPME-GC/MS ottenuto su Fiore Sardo a 3.5 mesi di stagionatura	160
Figura 9.3 Correlazione tra il contenuto in acido acetico (C2:0) e il contenuto totale di ammine biogene nei campioni di "Fiore Sardo"	173
Figura 9.4 Composizione percentuale media della frazione volatile dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" analizzati	174
Figura 9.5 Variabilità nella composizione della frazione volatile dei campioni di formaggio "Fiore Sardo"	175
Figura 9.6 Correlazione fra il contenuto di AGL (C4-C10) nel formaggio ed il contenuto di C4-C10 presente nella frazione volatile dello spazio di testa	176
Figura 9.7 Analisi delle componenti principali effettuata utilizzando i dati relativi al contenuto in ammine biogene	180
Figura 9.8 Analisi delle componenti principali effettuata utilizzando i dati relativi al contenuto in ammine biogene, macrocomposizione, lipolisi e proteolisi.	181

Figura 9.9 Analisi delle componenti principali effettuata utilizzando i dati relativi al contenuto in ammine biogene, macrocomposizione, lipolisi e proteolisi, eliminando i campioni *outliers*.

182

INDICE TABELLE

Tabella 2.1 Caratteristiche dei più importanti batteri lattici filocaseari.....	29
Tabella 4.1 Ammine biogene, effetti farmacologici e presenza negli alimenti	80
Tabella 5.1 Fasi stazionarie per SPME (SUPELCO).....	102
Tabella 7.1 Programma di eluizione utilizzato	121
Tabella 7.2 Limite di rivelabilità (LoD) calcolati per ciascuna ammina biogena con il metodo EPA.	131
Tabella 7.3 LoQ calcolati per ciascuna ammina biogena con il metodo EPA.....	132
Tabella 7.4 Range dinamico lineare per ciascuna ammina biogena nell'intervallo di concentrazione 0.1 – 50 mg/L.....	133
Tabella 7.5 Curve di calibrazione per ciascuna ammina biogena.....	136
Tabella 7.6 Accettabilità dei valori di Ripetibilità e Riproducibilità del metodo analitico	137
Tabella 7.7 Prove di recupero	139
Tabella 8.1 Contenuto in ammine biogene (mg/kg; media \pm sd) dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP	146
Tabella 8.2 Contenuto in ammine biogene (mg/kg; min \div max) dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP	146
Tabella 8.3 Contenuto in ammine biogene (mg/kg; media \pm sd) dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP	147
Tabella 8.4 Contenuto in ammine biogene (mg/kg; min \div max) dei campioni di formaggio "Fiore Sardo" DOP	148
Tabella 8.5 Confronto tra il contenuto in ammine biogene dei formaggi "Fiore Sardo" (min – max) e dati riportati in letteratura relativamente ad altre tipologie di formaggio.....	149
Tabella 9.1 Range operativo e limite di determinabilità strumentale per i singoli AGL	157
Tabella 9.2 Ripetibilità nella determinazione dei singoli acidi liberi su matrice reale (n=3).....	158

Tabella 9.3 programmata di temperatura.....	160
Tabella 9.4 elenco degli analiti determinati e confermati mediante confronto degli LRI calcolati e degli LRI presenti in bibliografia (Bianchi et al., 2007; Mallia et al 2005; Ziino et al., 2005; Povoletto et al., 2007)	161
Tabella 9.5 Valori di ripetibilità per i singoli analiti identificati su un campione di Fiore Sardo	163
Tabella 9.6 Parametri chimico fisici (media \pm sd) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP	167
Tabella 9.7 Parametri chimico fisici (min \div max) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP	167
Tabella 9.8 Indici di proteolisi (media \pm sd) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP	169
Tabella 9.9 Indici di proteolisi (min \div max) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP	169
Tabella 9.10 Profilo lipolitico (media \pm sd) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP	171
Tabella 9.11 Profilo lipolitico (min \div max) dei campioni di formaggio “Fiore Sardo” DOP	172
Tabella 9.12 Distribuzione percentuale dei composti volatili per classe di appartenenza	177

BIBLIOGRAFIA

Addeo F., Chianese L., Salzano A., Sacchi R., Cappuccio U., Ferranti P., Malorni A. (1992). Characterization of the 12% trichloroacetic acid-soluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *Journal of Dairy Research*, 59: 401-411.

Addeo F., Chianese L., Sacchi R., Spagna Musso S., Ferranti P., Malorni A. (1994). Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese soluble in 120 g trichloroacetic acid/L. *Journal of Dairy Research*, 62: 297-309.

Addis M., Piredda G., Pes M., Di Salvo R., Scintu M.F., Pirisi A. (2005a). Effect of the use of three different lamb paste rennets on lipolysis of the PDO Pecorino Romano cheese. *International Dairy Journal*, 15: 563-569.

Addis M., Pirisi A., Di Salvo R., Podda F., Piredda G. (2005b). The influence of the enzymatic composition of lamb rennet paste on some properties of experimentally produced PDO Fiore Sardo cheese. *International Dairy Journal*, 15: 1271-1278.

Aimutis W.R. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticarcinogenesis. *Journal of Nutrition*, 134: 989-995.

Ali Awan M., Fleet I., Thomas C.L.P. (2008). Determination of biogenic diamines with a vaporisation approach using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 111: 462-468.

AOAC Peer-Verified MethodsSM Program Manual on Policies and Procedures, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD

Arce L., Rios A., Valcarcel M. (1998). Direct determination of biogenic amines in wine by integrating continuous flow clean-up and capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Journal of Chromatography A*, 803: 249–260.

Ardo Y. & Petterson H.E. (1988). Accelerated cheese ripening with heat-treated cells of *Lactobacillus helveticus* and a commercial proteolytic enzyme. *Journal of Dairy Research*, 55: 239-245.

Arthur C. L. & Pawliszyn J. (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, 62: 2145-2148.

Aston J.W. & Douglas K. (1983). The production of volatile sulphur compounds in Cheddar cheeses during accelerated ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*, 38: 66-70.

Barzaghi S., Davoli E., Rampilli M., Contarini G. (1997). Lipolysis in Provolone cheese: Effect of rennet-paste. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 48: 146-156.

Bastian E.D. & Brown R.J. (1996). Plasmin in milk and dairy products: an update. *International of Dairy Journal*, 6: 435-457.

Belardi R. & Pawliszyn J. (1989). The Application of Chemically Modified Fused Silica Fibres in Extraction of Organics from Water Matrix Samples, and their Rapid Transfer to Capillary Column. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 24 (1): 179-191.

Bianchi F., Cantoni C.M. Careri M., L. Chiesa L.M., Musci M., Pinna A. (2007). Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. *Talanta* 72: 1552–1563.

Bosset J.O. & Gauch R. (1993). Comparison of the volatile flavour compounds of six European 'AOAC' cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *International Dairy Journal*, 3: 359-377.

Bosset J.O., Gauch R., Mariaca R., Klein B. (1995). Comparison of various sample treatments for the analysis of volatile compounds by GC-MS: application to the Swiss Emmental cheese. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.*, 86: 672-698.

Bosset J.O., Butikofer U., Gauch R., Sieber R. (1997). Ripening of Emmental cheese wrapped in foil with and without addition of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. II. Gas chromatographic investigation of some volatile neutral compounds using dynamic headspace, *Lebensm. Wiss. u. Technology*, 30: 464-470.

Bouton Y., Buchin S., Duboz G., Pochet S., Beuvier E. (2009). Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk swisse-type cheese. *Food Microbiology*, 26: 183-191.

Bustamante M.A., Chavarri F., Santisteban A., Ceballos G., Hernandez I., Miguelez M.J., Aramburu I., Barron L.J.R., Virto M., De Renobales M. (2000). Coagulating and lipolytic activities of artisanal lamb rennet paste. *Journal of Dairy Research*, 67: 393-402.

Campus A. (1936). IL "pecorino" romano e sardo – L'evoluzione dell'industria del formaggio pecorino nel Lazio e in Sardegna. *Roma: S.A. Arte della Stampa*.

Cappelli P. & Vannucchi V. (2000). *Chimica degli Alimenti*, Zanichelli, Bologna.

Cliffe A.J. & Law B.A. (1991). A time course study of peptide production in accelerated-ripened Cheddar cheese using reverse phase high performance liquid chromatography. *Food Biotechnology*, 5: 1-17.

Cogan T.M. (1985). The Leuconostoc: milk products, in: Gilliland S.E. (Ed.), *Bacterial Starter Cultures for Food*, CRC Press, Boca Raton, FL, 25-40.

Cogan T.M. & Hill C. (1993). Cheese starter cultures, in: Fox P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Chapman & Hall, London, 2nd ed., 193-255.

Cortacero-Ramirez S., Arraez-Roman D., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A. (2007). Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100: 383-389.

Creamer L.K., Olson N.F. (1982). Rheological evaluation of maturing cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47: 631-646.

Creamer T.M., Lawrence R.C., Gilles J. (1985). Effect of acidification of cheese milk on the resultant Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science & Technology*, 20: 185-203.

Currie L.A. (1995). *Pure & Appl. Chem.*, 67, 1699.

Dell'Orto V. & Sgoifo Rossi C.A. (2000). Aspetti nutrizionali e gestionali per la produzione di carne bovina di qualità. *L'Informatore Agrario*, 14: 45-56.

De Jong C., Badings H.T. (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13: 94-98.

Direttiva 93/43/CEE del consiglio del 14 giugno 1993.

Draisici R., Volpe G., Lucentini L., Cecilia A., Federico R., Palleschi G. (1998). Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. *Food Chemistry*, 62, 225–232.

Farkye N.Y. & Fox P.F. (1990). Objective indices of cheese ripening. *Trends in Food Science and Technology*, 1: 37-42.

Farkye N.Y. & Fox P.F. (1992). Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. *Journal of Dairy Research*, 59: 209-216.

Fernandes J.O. & Ferreira M.A. (2000). Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. *Journal of Chromatography A*, 886: 183-195.

Fernández-García E., Tomillo J. & Nuñez M. (1999). Effect of added proteinases and level of starter culture on the formation of biogenic amines in raw milk Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 52: 189-196.

Fernández-García E., Tomillo J., Nunez M. (2000). *Journal of Food Protection*, 63: 1551-1555.

FIL-IDF Standard 4A, 1982. Cheese and processed cheese. Determination of the total solid content (Reference Method).

FIL-IDF Standard , 1993:20B , parte I. Metodo Kjeldahl. Determination de la teneur en azote (Reference Method).

FIL-IDF 172: 2001 / ISO 14156:2001- “Milk and Milk products-Extraction methods for lipids and liposoluble compounds”.

Foda F.A., Hammond E.G., Reinbold G.W., Hotchkiss D.K. (1974). Role of fat in flavor of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 57: 1137-1142.

Fox P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72: 1379-1400.

Fox P.F., McSweeney P.L.H., Singh T.K. (1990). Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29: 237-253.

Fox P.F. & Law J. (1991). Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology*, 5: 239-262.

Fox P.F., Singh T.K., McSweeney P.L.H. (1995). Biogenesis of flavour compounds in cheese during ripening, in: Malin E.L., Tunick M.H. (Eds.), *Chemistry of Structure/Function relationships in Cheese*, Hardcover.

Fox P.F., Singh T.K., McSweeney P.L.H. (1995a). Biogenesis of flavour compounds in cheese, In: Chemistry of Structure/Function Relationships in Cheese (Malin E.L., Tunick M.H., eds). *Plenum Publ. Corp.*, New York, 59-98.

Fox P.F., McSweeney P.L.H., Singh T.K. (1995b). Methods for assessing proteolysis in cheese during ripening, In: Chemistry of Structure/Function Relationships in Cheese (Malin E.L., Tunick M.H., eds). *Plenum Publ. Corp.*, New York, 161-194.

Fox P.F. & McSweeney P.L.H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, 12, 4: 457-509.

Fox P.F. & Wallace J.M. (1997). Formation of flavour compounds. *Advances in Applied Microbiology*, 45: 17-85.

Frank D.C., Owen C.M., Patterson J. (2004). Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 37: 139-154.

Gaya P., Sánchez C., Nuñez M., and Fernández-García E. (2005). Proteolysis during ripening of Manchego cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. Seasonal variation. *Journal of Dairy Research*, 72: 287-295.

Gardini F., Tofalo R., Belletti N., Iucci L., Suzzi G., Torriani S., Guerzoni M. E., Lanciotti R. (2006). Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiology*, 23: 641-648.

Gennaro M.C., Gianotti V., Marengo E., Pattono D., Turi R.M. (2003). A chemiometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chemistry*, 82, 545-551.

Giuffrida D., Ziino M., Verzera A., Conduro C., Romeo V. (2006). Biogenic amines in a typical "pasta filata" Italian cheese. *Acta Alimentaria*, 35 (4): 435-443.

Górecki T. (1999). Solid versus Liquid Coatings, Applications of Solid Phase MicroExtraction, Edited by Janusz Pawliszyn. *Royal Society of Chemistry*, Hertfordshire, UK, 92-108.

Gosetti F., Mazzucco E., Gianotti V., Polati S., Gennaro M.C. (2007). High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of biogenic amines in typical Piedmont cheeses. *Journal of Chromatography A*, 1149: 151-157.

Grappin R., Rank T., Olson N. (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening, A review. *Journal of Dairy Science*, 68: 531-540.

Grufferty M.B. & Fox P.F. (1988). Milk alkaline proteinase: a review. *Journal of Dairy Research*, 55: 609-630.

Ha J.K. & Lindsay R.C. (1993). Release of the volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. *Journal of Dairy Science*, 76: 677-690.

Halász S., Báráth A., Simon-Sarkadi L., Holzapfel W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganism in food. *Trend in Food Science and Technology*, 5: 42-49.

Heller K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 374-379.

Horwitz W. (1982). *Analytical Chemistry*, 54: 67A-76A.

Hugenholtz J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 12: 165-168.

Imhof R. & Bosset J.O. (1994). Relationship between microorganisms and formation of aroma compounds in fermented dairy products (review). *Z Lebensm Unters Forsch*, 198: 267-276.

Innocente N., D'Agostin P., Corradini C. (2001). Presenza di ammine biogene nel formaggio prodotto in malga. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 52: 325-332.

Innocente N. & D'Agostin P. (2002). Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. *Journal Food Protection* 65, 9, 1498-1501.

Innocente N., Biasutti M., Padovese M., Moret S. (2007). Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract *Food Chemistry*, 101: 1285-1289.

Innocente N Biasutti M Comuzzo P. (2007). Characterization of a traditional semi-hard Italian cheese produced by soaking in wine. *Food Chemistry*, 105 (4): 1452-1456.

ISO 3433: 1975. Cheese- Determination of fat content- Van Gulik method (Routine method).

ISO 11843. "Capability of detection", (several parts), International Standards Organisation, Geneva.

Jarret W.D., Aston J.W., Dulley J.R. (1982). A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 37: 55-58 (corr 1983, 38).

Kalac P., Savel J., Krizek M., Pelikanova' T., & Prokopova' M. (2002). Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*, 79: 431-434.

Kaminogawa S., Yamauchi K., Miyazawa S., Koga Y. (1980). Degradation of casein components by acid protease of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 63: 701-704.

Karpas Z., Tilman B., Gdalevsky R., Lorber A. (2002). Determination of volatile biogenic amines in muscle food products by ion mobility spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 463: 155-163.

Kebery K.M. K., El-Sonbaty A.H., Badawi R.M. (1999). Effects of heating milk and accelerating ripening of low fat Ras cheese on biogenic amines and free amino acids development. *Food Chemistry*, 64: 67-75.

Khuhawar M.Y., Memon A.A., Jaipal P.D., Bhangar M.I. (1999). Capillary gas chromatographic determination of putrescine and cadaverine in serum of cancer patients using trifluoroacetylacetone as derivatising reagent. *Journal of Chromatography B*, 723: 17-24.

Komprda T., Smelà D., Novickà K., Sustovà K., Pechovà P. (2007). Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*, 102: 129-137.

Kovacs A., Simon-Sarkadi L., Ganzler K. (1999). Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 836: 305–313.

Krause I., Bockhardt A., Neckermann H., Henle T., Klostermeyer H. (1995). Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 715: 67-79.

Kungi E.R.S., Micrav I., Hagting A., Poolman B., Konings W.N. (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70: 187-221.

Kvasnička F. & Voldřich M. (2006). Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1103: 145-149.

Lanciotti R., Patrignani F., Iucci L., Guerzoni M. E., Suzzi G., Belletti N., Gardini F. (2007). Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chemistry*, 104: 693-701.

Lange J. & Wittmann C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372: 276–283.

Law J. & Haandrikman A. (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 7: 1–11.

Ledda A., Scintu M.F., Pirisi A., Sanna S., Mannu L. (1994). Caratterizzazione tecnologica di ceppi di lattococchi e di enterococchi per la produzione di formaggio pecorino Fiore Sardo. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 45: 443-456.

Lee J., Kirn D.H., Chang P.S., Lee J.H. (2007). Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) analysis of oxidized volatiles from free fatty acids (FFA) and application for measuring hydrogen donating antioxidant activity. *Food Chemistry*, 105(1): 414-420.

Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. (2002). *Principi di Biochimica*. III ed. Zanichelli, Bologna.

Leuschner R.G.K., Kurihara R., Hammes W.P. (1998). Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 15-20.

- Lista A., G., Arce L., Rios A., Valcarcel M.** (2001). Analysis of solid samples by capillary electrophoresis using a gas extraction sampling device in a flow system. *Analytica Chimica Acta*, 438: 315–322..
- Liu Y.-M. & Cheng, J.-K.** (2003). Separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography with on-line chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1003, 211–216.
- Liu X., Yang L.X. Lu Y.T.** (2003). Determination of biogenic amines by 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 998: 213–219.
- Lynch C.M., McSweeney P.L.H., Fox P.F., Cogan T.M., Drinan F.D.,** (1997). Contribution of starter and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with controlled microflora. *Lait*, 77: 441-459.
- Magdic S., Boyd-Boland A., Jinno K., Pawliszyn J.** (1996). Analysis of Organophosphorous Insecticides from Environmental Samples by Solid Phase Microextraction. *Journal of Chromatography A*, 736: 219-228.
- Male K.B. & Luong, J.H.T.** (2001). Derivatization, stabilization and detection of biogenic amines by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis–laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 926: 309–317.
- Mallia S., Fernandez-Garcis R., Bosset J.O.** (2005). Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *International Dairy Journal* 15 (6-9): 741-758.
- Manfredini M.** (1992). Produzione qualitativa e cause di variabilità. In: "Ovinicoltura" - UNAPOC, Roma: 189-198.
- Martuscelli M., Gardini F., Torriani S., Mastrocola D., Serio A., Chaves-López C., Schirone M., Suzzi G.** (2005). Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*, 15: 571-578.
- Marino M., Maifreni M., Moret S., Rondinini G.** (2000). The capacity of enterobacteriaceae specie sto produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 31: 169-173.

Marino M., Maifreni M., Bartolomeoli I., Rondinini G. (2008). Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. *Journal of Applied Microbiology*, 105: 540–549.

McSweeney P.L.H., Fox P.F., Olson N.F. (1995). Proteolysis of bovine caseins by cathepsin D: preliminary observations and comparison with chymosin. *International Dairy Journal*, 5: 321-336.

McSweeney P.L.H. & Fox P.F. (1997). Indices of Cheddar cheese ripening. *Proc. 5th Cheese Symp. Moorepark*, Fernoy, Co. Cork, Ireland, 143-158.

Meinhart E. & Schreier P. (1986). Study of flavour compounds from Parmigiano Reggiano cheese. *Milchwissenschaft*, 689-691.

Mercogliano R. & Cortesi M. L. (2008). Presenza di amine biogene negli alimenti di origine animale. *Industrie Alimentari*, 12: 43-50.

Molimard P. & Spinnler H.E. (1996). Review: compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79: 169-184.

Mondello L., Costa R., Tranchida P.Q., Chiofalo B., Zumbo A., Dugo P., Dugo G. (2005). Determination of flavor components in Sicilian goat cheese by automated HS-SPME-GC. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(6): 659-665.

Moret S., Bortolomeazzi R., Lercker G. (1992). Improvement of extraction procedure for biogenic amines in foods and their high-performance liquid chromatographic determination. *Journal of Chromatography*, 591: 175-180.

Moret S. & Conte L.S. (1996a). High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics *Journal of Chromatography A*, 729: 363-369.

Moret S., Conte L., Spoto E. (1996b). Presenza delle ammine biogene nei formaggi fattori che ne influenzano le determinazioni analitiche. *Industrie Alimentari*, 35: 788-792.

Moret S., Smela D., Populin T., Conte L.S. (2005). A survey on free biogenic content offresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*, 89: 355-361.

Mulder H. (1952).Taste and flavour-forming substances in cheese, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 6: 157-167.

Nelson J.H., Jensen R.G., Pitas R.E. (1977). Pregastric esterase and other oral lipase – A review. *Journal of Dairy Science*, 60: 327-362.

Nouadje G., Simeon N., Dedieu F., Nertz M., Puig Ph., Couderc F. (1997). Determination of twenty eight biogenic amines and amino acids during wine aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 765(2): 337–343.

Nunez M. & Medina M. (2011). Biogenic Amines. *Encyclopedia of Dairy Science*. (Second Edition), 451-456.

Ohren J.A. & Tuckey S.L. (1967). Relation of flavor development in Cheddar cheese to chemical changes in the fat of the cheese. *Journal of Dairy Science*, 52: 598-607,

Olivecrona T., Vilarò S., Bengtsson-Olivecrona G. (1992). Indigenous enzymes in milk, II. Lipases in milk, in: Fox P.F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry. 1. Proteins. Elsevier Applied Science*, 292-310, London.

Onal A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103: 1475-1486.

Ordóñez A.I., Ibañez F.C., Torre P., Barcina Y. (1977). Formation of biogenic amines in Idiazábal ewe's-milk cheese: Effect of ripening, pasteurization and starter. *Journal of Food Protection*, 60: 1371-1375.

O'Sullivan M., Fox P.F. (1990). A scheme for partial fractionation of cheese peptides. *Journal of Dairy Research*, 57: 135-139.

Parodi P.W. (2004). Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*, 59: 3-59.

Pastore P., Favaro G., Badocco D., Tapparò A., Cavalli S., Sacconi G. (2005). Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode. *Journal of Chromatography A*, 1098: 111-115.

Pettinau M., Nuvoli G., Podda F. (1978). Rilievi sulla composizione chimica del Fiore Sardo. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 29: 169-181.

Pettinau M., Nuvoli G., Podda F. & Ledda, A. (1977). Influenza del metodo di preparazione del caglio d'agnello sulla conservazione delle sue proprietà coagulanti, proteolitiche e lipolitiche. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 28: 101-114.

Pfeuffer M., Schrezenmeir J. (2001). Sphingolipids : metabolism and implications for health. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 363: 46-51.

Pinho O., Ferreira I. M. P. L. V. O., Mendes E., Oliveira B. M., Ferreira M. (2001). Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese. *Food Chemistry*, 75: 287-291.

Piredda G. & Addis M. (1998). Effect of diet on enzyme activity in lamb rennet paste. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 49: 129-138.

Pirisi A., Pinna G., Addis M., Piredda G., Mauriello R., De Pascale S., Caira S., Mamone G., Ferranti P., Addeo F., Chianese L. (2007). Relationship between enzymatic composition of lamb rennet paste and proteolytic, lipolytic pattern and texture of PDO Fiore Sardo ovine cheese. *International Dairy Journal*, 17: 143-156.

Pirisi A., Comunian R., Urgeghe P.P., Scintu M.F. (2011). Sheep's and goat's dairy products in Italy: technological, chemical, microbiological, and sensory aspects. *Small Ruminants Research*, 101: 102-112.

Pisanu M.B., Fadda M.E., Deplano M., Corda A., Cosentino S. (2006). Microbiological and chemical characterisation of Fiore Sardo, a traditional Sardinian cheese made from ewe's milk. *International Journal of Dairy Technology*, 59: 171-179.

Pitas R.E. & Jensen J.H. (1970). Action of pregastric esterase on synthetic triglycerides containing butyric acid. *Journal of Dairy Science*, 53: 1083.

Povolo M., Contarini G., Mele M., Secchiari P. (2007). Study on the Influence of Pasture on Volatile Fraction of Ewes' Dairy Products by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 90: 556–569.

Puchades R., Lemieux L., Simard R.E. (1989). Evolution of free amino acids during ripening of Cheddar cheese containing added lactobacilli strains. *Journal of Food Science*, 54: 885-888, 946.

Rank T.C., Grappin R., Olson N.F. (1985). Secondary proteolysis of cheese during ripening: a review. *Journal of Dairy Science*, 68: 801-805.

Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 Gennaio 2002.

Regolamento (CEE) N. 2081/92 del Consiglio del 14 Luglio 1992.

Regolamento (CEE) N. 510/2006 del Consiglio del 20 Marzo 2006.

Regolamento (CE) N. 509/2006 del Consiglio del 20 Marzo 2006.

Regolamento (CE) N. 1236/96 della Comunicazione del 1 Luglio 1996.

Rice S., Eitenmiller R., Koehler P. (1976). Biologically active amines in food: a review. *Journal of Milk and Food Technology*, 39: 353-358.

Roig-Sagués A. X., Molina A. P. & Hernández-Herrero M. M. (2002). Histamine and tyramine forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology*, 215: 96-100.

Rothe G.A.L., Harboe M.K., Mactiny S.C. (1977). Quantification of milk-clotting enzymes in 40 commercial bovine rennets, comparing rocket immunoelectrophoresis with an activity ratio assay. *Journal of Dairy Research*, 44: 73-77.

Rubino R., Morand-Fehr P., Renieri C., Peraza C., Sarti F.M. (1999). Typical products of the small ruminant sector and the factors affecting their quality. *Small Ruminant Research*, 34: 289-302.

Ruiz-Jiménez J. & Luque de Castro M. D. (2006). Pervaporation as interface between solid samples and capillary electrophoresis: Determination of biogenic amines in food. *Journal of Chromatography A*, 1110: 245–253.

Rychlik M., Warmke R., Gorsch W. (1997). Ripening of Emmental cheese wrapped in foil with and without addition of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. III. Analysis of character impact flavour compounds. *Lebensm. Wiss. u. Technology*, 30: 471-478.

Schmid-Bondzynski-Ratzlaff, IDF 5: 2005/ISO 1735:1999.

Schirone M., Tofalo R., Mazzone G., Corsetti A., Suzzi G. (2011). Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. *Food Microbiology* 28, 128-136.

Shalabi A.R. (1996) Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29: 675-690.

Skoog D.A. & Leary J.J. (2000). *Chimica Analitica Strumentale*, EdiSES.

Spanjer M.C., van Roode B.A.S.W. (1991) Towards a regulatory limit for biogenic amines in fish, cheese and sauerkraut, (cited by Shalabi, 1996).

Stratton S.S., Hutkins R.W., Taylor S.L. (1991). Biogenic amines in cheese and in other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, 54: 460-470.

Sun X., Yang X., Wang E. (2003). Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1005: 189–195.

Tornadijo M. E., Fresno J. M., Martín Sarmiento R., and Carballo J. (1998). Study of the yeasts during the ripening process of Armada cheeses from raw goat's milk. *Le lait*, 78: 647-659.

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000 – 30/11/2000 (Norma) Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura

Urbach G. (1993). Relation between cheese flavour and chemical composition. *International Dairy Journal*, 3: 389-422.

Urgeghe P.P., Piga C., Addis M., Di Salvo R., Piredda G., Scintu M.F., Wolf I.V., Sanna G. (2011). SPME/GC-MS Characterization of the Volatile Fraction of an Italian PDO Sheep Cheese to Prevalent Lypolitic Ripening: the Case of Fiore Sardo. *Food Analytical Methods*, in press, DOI 10.1007/s12161-011-9302-5.

Vale S. R. & Glòria M. B. A. (1997). Determination of biogenic amines in cheese. *Journal of AOAC International*, Vol. 80. No. 5: 1006-1012.

Valsamaki K., Michaelidou A., Polychroniadou A. (2000). Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*, 71: 259-266.

- Vedamuthu** E.R. (1994). The dairy Leuconostoc: use in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 77: 2725-2737.
- Visser** F.M.W. & deGroot-Mostert A.E.A. (1977). Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gouda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretic study. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 31: 247-264.
- Vitova** E., Loupancova B., Stoudkova H., Zemanova J. (2007). Application of SPME-GC method for analysis of the aroma of white surface mould cheeses. *Journal of Food and Nutrition Research*, 46 (2): 84-90.
- Voigt** M.N., Eitenmiller R.R., Koehler P.E., Hamdy M.K. (1974). Tyramine, histamine, and tryptamine content of cheese. *Journal of Milk Food Technology*, 37: 377.
- Wijesundera** C., Drury L., Muthuku-marappan K., Gunasekaran S, Everett D.W. (1998). Flavour development and distribution of fat globule size and shape in Cheddar-type cheeses made from skim milk homogenised with AMF or its fractions. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53: 107.
- Woo** A.H. & Lindsay R.C. (1984). Concentration of major free fatty acids and flavour development in Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 67: 960-968.
- Yvon** M., Chabanet C., Pélissier J.P. (1989). Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 34: 166-176.
- Zhang** L.Y. & Sun M.X. (2004). Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1040: 133-140.
- Zhang** L. Y., Tang X.C., Sun M.X. (2005). Simultaneous determination of histamine and polyamines by capillary zone electrophoresis with 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 820: 211-219.
- Ziino** M., Conduro C., Romeo V., Giuffrida D., Verzera A. (2005). Characterization of "Provola dei Nebrodi", a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. *International Dairy Journal*, 15: 585–593.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Gavino Sanna per avermi guidato con la sua precisione e professionalità e per tutti i suoi preziosi insegnamenti.

Un sentito grazie alla Dott.ssa Margherita Addis per avermi sostenuto in questo lavoro di tesi con la sua esperienza, ma soprattutto per l'aiuto e la pazienza dimostratami in ogni momento.

Ringrazio la Dott.ssa Francesca Scintu e il Dott. Giovanni Piredda per aver messo a mia disposizione i laboratori di chimica dell'Agenzia AGRIS Sardegna.

Un doveroso grazie (e non basta) a Myriam e Pierluigi per la preziosissima collaborazione e per il sostegno datomi per questo lavoro di tesi, e per la loro amicizia.

Grazie ai colleghi del settore di chimica Daniele Petretto (con la sua Ardia), Adriano Porcu (se non ci fosse bisognerebbe inventarlo) e Marzia Picinelli (con le sue tisane), per i loro insegnamenti e la loro disponibilità ma soprattutto per aver allietato questi tre anni con la loro allegria.

Ringrazio Marco Ciulu per essere sempre presente, per i consigli indispensabili che mi ha saputo dare ma soprattutto per la sua amicizia, e Carlo Piga, che con la sua esperienza ha saputo guidarmi alla fine di questo percorso.

Ringrazio inoltre alcuni compagni di questo viaggio, come Simona Spada per la sua simpatia ed amicizia, Daniele Nuvoli, Sara Ielmini e Marco Caredda, per i loro utili consigli e la loro amicizia, e Marco Serra grazie al quale ho acquisito il dono dell'ubiquità ed ho imparato a coniare nuove terminologie.

Ringrazio ancora Giuseppe Scanu e Riccardo Di Salvo per le belle chiacchierate costruttive, e Antonella Sanna, per le passeggiate costruttive!

Dedico infine un ringraziamento particolare ai miei genitori, alla mia famiglia e a tutti gli amici che sono sempre pronti a sostenermi, ma il ringraziamento più grande va a Tommaso, compagno di vita e amico sincero, per la sua pazienza infinita nello starmi affianco in tutti i momenti.

Grazie