

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

**Caratterizzazione di acidi grassi e colesterolo
in campioni di Parmigiano – Reggiano
a diversa stagionatura.**

Tesi in

Modificazioni chimiche e analisi degli alimenti

Relatore

Prof.ssa Maria Fiorenza Caboni

Presentata da

Strologo Giulio

Correlatori

Dott.ssa Silvia Marzocchi

Dott.ssa Ylenia Riciputi

Sessione III

Anno Accademico 2017-2018

Indice

1. Premessa e scopo	5
2. Introduzione	7
2.1 Il Parmigiano Reggiano: prodotto tipico italiano di fama mondiale	7
2.2 Il processo di produzione del Parmigiano Reggiano	8
2.3 Importanza della composizione del latte nella qualità del prodotto finito	9
2.3.1 Composizione in acidi grassi del latte vaccino	13
2.4 Influenza della stagionatura sulle proprietà del prodotto finito	15
2.4.1 Influenza dei composti volatili e non volatili sul gusto e sull'odore del Parmigiano – Reggiano	24
2.5 La composizione lipidica del Parmigiano – Reggiano; effetto sulla qualità organolettica e nutrizionale	24
3. Materiali e metodi	26
3.1 Campioni	26
3.2 Estrazione del grasso mediante metodo Soxhlet	27
3.3 Determinazione mediante gascromatografia capillare degli acidi grassi totali (FAME)	28
3.4 Estrazione della frazione insaponificabile	30
3.5 Determinazione del contenuto in colesterolo	32
4. Risultati e discussioni	33
4.1 Estrazione del grasso con metodo Soxhlet	33

4.2 Determinazione degli acidi grassi	35
4.3 Determinazione del contenuto in colesterolo totale	46
5. Conclusioni	49
Bibliografia	51
Sitografia	54

CAPITOLO 1

PREMESSA E SCOPO

Il Parmigiano Reggiano (PR) DOP è un prodotto della tradizione italiana tramandata nei secoli e tutelato dal *Regolamento (CE) n.510/2006* che non consente variazioni sostanziali relativamente all'alimentazione bovina, né alla tecnologia di produzione. Il latte usato per la produzione di PR proviene da vacche alimentate prevalentemente tramite foraggi freschi e fieno della zona d'origine, ovvero le province di Parma, Reggio Emilia, Modena ed alcuni territori di Bologna e Mantova.

La trasformazione del latte in PR viene effettuata ancora oggi basandosi su una metodica artigianale legata all'esperienza dei casari e rispettando usi e consuetudini secolari. Il latte viene trasformato in un prodotto di elevata complessità e ricchezza dal punto di vista organolettico e nutritivo grazie all'attività enzimatica della flora lattica naturalmente presente nel latte e del siero innesto naturale, sfruttando la tecnologia di produzione che non prevede l'uso di additivi e la lunga fase di stagionatura. Per le sue riconosciute caratteristiche nutrizionali, tra le quali una elevata digeribilità, si può definire il PR come prodotto "naturalmente" funzionale. La tecnologia non prevede la pastorizzazione del latte prima della caseificazione, ma questo non è sinonimo di qualità igienico sanitaria inferiore; ciò che rende sicuro il PR è l'effetto sinergico di sistemi enzimatici antimicrobici che sono attivi nel latte crudo e la lunga fase di stagionatura. Una delle numerose caratteristiche positive del PR è la sua ricchezza in vitamine del gruppo B, importanti

per il nostro metabolismo. E' ricco inoltre di importanti minerali quali calcio, zinco, fosforo, magnesio e potassio; i minerali hanno svariate funzioni benefiche all'interno dell'organismo e l'assenza di uno solo di questi elementi essenziali può essere molto dannoso. Proprio per il suo contenuto in nutrienti e composti funzionali uniti alla sua elevata digeribilità il PR è un alimento consigliato a tutte le fasce d'età.

Questo lavoro di tesi si inserisce nel Progetto PARENT che punta a innovazioni di prodotto nella filiera del formaggio Parmigiano Reggiano attraverso la valorizzazione dei contenuti salutistici e nutrizionali del formaggio e del latte prodotto secondo le regole della DOP; il progetto è cofinanziato dai Fondi europei 2014-2020 della Regione Emilia-Romagna e coinvolge Università di Parma, Università di Bologna, Consorzio Parmigiano Reggiano e CRPA LAB, che coordina le attività. Lo scopo di questo lavoro di ricerca sul PR è stato quello di valutare eventuali cambiamenti nella composizione della frazione lipidica per quanto riguarda il contenuto in acidi grassi e colesterolo di diverse forme di PR provenienti da tre diversi caseifici ed a due differenti stagionature: 24 e 36 mesi.

CAPITOLO 2

INTRODUZIONE

2.1 Il parmigiano Reggiano: prodotto tipico italiano di fama mondiale.

Le origini del PR risalgono al Medioevo e vengono generalmente collocate attorno al XII secolo presso i monasteri benedettini e cistercensi di Parma: grazie all'abbondanza di corsi d'acqua e di ampi pascoli, ben presto in questa zona circoscritta dell'Emilia si diffuse la produzione di un formaggio a pasta dura, ottenuto attraverso la lavorazione del latte in ampie caldaie.

Il PR si produce oggi con gli stessi ingredienti di nove secoli fa, negli stessi luoghi e con i medesimi gesti rituali.

I maestri casari continuano a produrre questo formaggio con il latte pregiato della zona d'origine, caglio naturale, sale e nessun additivo, in tutto in modo artigianale.

Ad oggi il PR è prodotto da circa 350 piccoli caseifici artigianali della zona tipica che hanno ottenuto dalla legge il riconoscimento della loro determinazione a conservare inalterato il metodo di lavorazione e l'altissimo livello qualitativo del formaggio.

Questa è la motivazione per la quale la garanzia di genuinità del PR sia assoluta in forza di norme precise, applicate con rigida autodisciplina di conformità e con rigoroso controllo (www.consorzioparmigianoreggiano.it).

Il PR è un formaggio salvaguardato da più di settant'anni dal Consorzio di tutela, esso è il fiore all'occhiello della gastronomia "made in Italy" e senza dubbio il formaggio più famoso ed imitato nel mondo.

Solo il formaggio italiano prodotto nella zona di origine e secondo regole rigorose può fregiarsi del marchio Parmigiano-Reggiano DOP.

È un formaggio semigrasso a pasta dura, cotta e a lenta maturazione: è il formaggio a più lunga stagionatura nel mondo (fino ad oltre 3 anni), prodotto da latte vaccino riposato e parzialmente scremato per affioramento (www.consorzioparmigianoreggiano.it).

2.2 Il processo di produzione del Parmigiano Reggiano

Tutto il latte introdotto in caseificio deve essere conforme ai Regolamenti di Produzione del PR. Il latte della mungitura della sera e quello della mungitura del mattino sono consegnati integri al caseificio entro due ore dalla fine di ciascuna mungitura. Il latte non può essere sottoposto a processi di centrifugazione, può essere invece raffreddato immediatamente dopo la mungitura con l'obbligo di non conservarlo a temperature inferiori ai 18°C (Bottazzi V., 1993), per non pregiudicarne le prestazioni di caseificazione.

Immediatamente dopo la consegna in caseificio il latte della sera viene posto in vasche d'acciaio aperte profonde solo pochi centimetri (Mucchetti G. et al., 2006) e aerate naturalmente per la parziale scrematura, che avviene per affioramento naturale del grasso.

Il latte del mattino, a seguito della consegna in caseificio, viene miscelato con il latte parzialmente scremato della sera precedente e trasferito nella caldaia, per la caseificazione.

In questa fase della lavorazione il latte proveniente dalle due diverse mungiture (latte di caldaia) deve avere un rapporto grasso/caseina al massimo di 1,1 + 12%.

A questo punto al latte viene addizionato il siero innesto, una coltura naturale di fermenti lattici ottenuta dall'acidificazione spontanea del siero residuo della lavorazione del giorno prima (Bottazzi V., 1993).

La coagulazione del latte, ottenuta con l'uso esclusivo di caglio di vitello è effettuata nelle caldaie troncoconiche di rame, per ottenere fino a due forme per ogni caldaia.

Al processo della coagulazione seguiranno la rottura della cagliata e la cottura. Si lasciano quindi sedimentare i granuli sul fondo della caldaia in modo da ottenere una massa compatta.

A sedimentazione avvenuta, la massa caseosa ottenuta è trasferita negli appositi stampi per la formatura.

Trascorsi alcuni giorni si procede alla salatura per immersione in una soluzione salina.

La maturazione a questo punto deve durare almeno 12 mesi, a partire dalla formatura del formaggio (Bottazzi V., 1993).

2.3 Importanza della composizione del latte nella qualità del prodotto finito

La qualità del latte destinato al caseificio può essere definita come la sua attitudine a dare un buon formaggio, in condizioni di lavorazione normali, senza dimenticare l'importanza di un rendimento soddisfacente. Dal punto di vista tecnologico un latte di buona qualità casearia deve possedere (Salvadori Del Prato , 2001):

- un contenuto elevato in residuo secco magro, grasso e proteine;
- caratteristiche fisico-chimiche, pH, proporzione Ca/N favorevoli;
- bassa carica microbica e assenza di germi patogeni;
- assenza di antibiotici

La qualità del latte, secondo questa definizione, dipende da un certo numero di variabili, tra le quali:

- lo stato di salute delle bovine lattifere (latte “mastitico”);
- la composizione chimica (particolarmente la ricchezza in caseina);
- la tipologia delle caseine (varianti genetiche)
- la carica in cellule somatiche;
- la carica microbica totale e la natura della microflora presente;
- l’attitudine allo sviluppo dei fermenti lattici
- il comportamento del latte in rapporto al caglio

Il latte “mastitico”, proveniente da vacche con mammelle affette da mastite, a causa dell’alterazione dell’attività di sintesi della mammella, ha una composizione proteica e salina alterata: questo causa una riduzione della percentuale di caseina, il tasso di proteine solubili e in particolar modo di sieralbumine e immunoglobuline è elevato. Inoltre, quando il pH risulta alterato e tendente a elevarsi (pH 7,0-7,2), il livello di sodio aumenta mentre contemporaneamente il calcio diminuisce, questo determina l’aumento dell’attività proteolitica a 10 volte superiore a quella del latte normale. Il latte mastitico deve essere tenuto separato anche per la necessità di somministrare farmaci all’animale.

Il latte oggi disponibile nei caseifici si caratterizza a seguito dell’intenso lavoro di miglioramento genetico compiuto negli anni passati e volto prevalentemente ad aumentare la produzione, per variazioni nel contenuto proteico e di grasso piuttosto ampie: mentre il grasso tende sempre ad aumentare, le proteine, e in particolare la caseina, non aumenta conseguentemente e tende quindi a deprimersi. Il

rapporto grasso/proteine del latte, fondamentale ai fini di una corretta caseificazione, che un tempo si attestava intorno a 1.10 ca., oggi tende ad aumentare.

Studi effettuati su latti italiani in relazione alla produzione di formaggi a pasta cotta, hanno messo in rilievo che una diminuzione dello 0,1% di proteina nel latte (100g per q di latte) corrispondono ad una perdita di resa pari allo 0,3% nel formaggio. Uno scarso contenuto di proteine del latte ha riflessi, oltre che sulle rese, sulla cinetica di sineresi (Salvadori Del Prato, 2001)

Allo stesso tempo sempre più frequenti sono latti che presentano elevato contenuto di urea e acetone (fino a 400mg/l), dipendenti da malattie metaboliche e subcliniche di animali, sotto stress per la grande produzione quantitativa di latte alla quale sono costretti e per l'eccessiva concentrazione azotata della razione alimentare. Quando il livello di NPN (sostanze azotate non proteiche) nel latte supera la soglia di 1,5g/l, si va incontro a gravi problemi in caseificazione. Questo dato è molto importante perché determina riflessi sul tempo di presa della cagliata e sulla resa (cagliata molle, siero lattiginoso) e pregiudica la resistenza delle fibre del reticolo caseinico e di conseguenza la riuscita qualitativa dei formaggi a grande pezzatura (Salvadori Del Prato, 2001).

In conclusione, il latte migliore per la trasformazione casearia risulta quindi quello che dispone di un elevato contenuto proteico, bilanciato in un buon rapporto grasso/proteine, povero di NPN e con un pH normale.

La presenza ed il numero di cellule somatiche nel latte, influenzato dalla sanità della mammella, sono un indice severo della qualità tecnologica del latte. Poiché le cellule somatiche posseggono una proteasi alcalina, sono in grado di degradare fortemente la fase protidica del latte.

I tempi di coagulazione e le caratteristiche reologiche del coagulo sono prevalentemente determinate dalla concentrazione in caseina del latte e

dal suo tenore in calcio solubile e in fosfato di calcio colloidale. La concentrazione in caseina è sicuramente uno dei fattori principali per la consistenza del coagulo, anche se la sua influenza sui tempi di coagulazione è relativamente minore. Anche la relazione tra le dimensioni delle micelle di caseina e i tempi di coagulazione è stata messa in evidenza: il tempo di coagulazione si allunga con il diminuire del diametro delle micelle pur registrandosi, per micelle di piccole dimensioni, una maggiore aggregazione del coagulo.

Le varianti di natura esogena, alimentari e ambientali, sono sempre molto influenti. Il passaggio dall'alimentazione invernale al pascolo, portano a volte a severi cambiamenti nell'acidità del latte e nella composizione e attitudine del latte alla coagulazione (Salvadori Del Prato, 2001).

Esistono anche varianti genetiche, sono state scoperte nei tessuti animali delle proteine molto simili tra loro per composizione, peso molecolare e proprietà; rappresentano numerose forme genetiche di una stessa proteina, ovvero si tratta di "varianti" la cui sintesi viene regolata da un particolare gene. Esistono individui omozigoti che producono una sola variante, al contrario, il latte degli individui eterozigoti contiene una miscela di due varianti. Le varianti di una proteina non si distinguono che per minime differenze di composizione. Si tratta in generale della sostituzione di uno o due aminoacidi all'interno delle catene peptidiche (Alais C., 2000).

Le caratteristiche chimico-fisiche del latte per la produzione di PR riguardano principalmente un corretto contenuto in proteine, grasso e lattosio oltre che dei componenti minori, elementi alla base della buona qualità del latte per la produzione del formaggio. Importante a questo proposito è il tenore in caseina ed il rapporto tra le sue frazioni,

dipendente dalla selezione genetica delle lattifere, ma ancora più importante dal punto di vista tecnologico, è il rapporto caseina/proteine totali, che dovrebbe essere il più elevato possibile. Dai dati presenti in letteratura risulta che il valore medio di questo rapporto nei latti per il PR è pari a 0,77, con un intervallo di variabilità compreso tra 0,59 e 0,84 (Salvadori Del Prato, 2001).

2.3.1 Composizione in acidi grassi del latte vaccino

Gli acidi grassi caratteristici del latte vaccino hanno una doppia origine. Gli acidi grassi saturi, aventi catena compresa tra C4:0 e C16:0, con numero pari di atomi di carbonio, vengono sintetizzati dalla flora ruminale nel citoplasma delle cellule secernenti della mammella partendo da acetato e β -idrossibutirrato, sono prodotti per fermentazione della cellulosa, delle emicellulose e degli zuccheri ingeriti con la razione alimentare. Il processo appena descritto necessita dell'intervento di due enzimi essenziali: l'Acetil CoA Carbossilasi (ACC) e l'Acido Grasso Sintasi (FAS) (Evers J.M., 2004).

La restante parte, ovvero gli acidi grassi a lunga catena e gli acidi grassi insaturi, deriva invece direttamente dal circolo ematico dove giungono per assorbimento intestinale degli acidi grassi alimentari (circa 40%) oppure in seguito alla lipolisi dei grassi corporei di riserva (un 10% variabile in funzione del bilancio energetico dell'animale, del suo stadio fisiologico e dell'entità delle sue riserve adipose).

Gli acidi grassi che vengono assorbiti nell'intestino sono derivati anche dall'azione di diversi ceppi batterici presenti nel rumine, ceppi in grado di sintetizzare gli acidi grassi ex novo ed hanno un ruolo di fondamentale importanza nel processo di idrogenazione degli acidi grassi insaturi introdotti con la dieta. Questo processo viene detto

bioidrogenazione ruminale e può portare alla modificazione del 90% circa dei grassi insaturi ingeriti con la dieta (Bickerstaffe et al., 1972). Questo processo porta alla prevalenza di acidi grassi rispetto agli acidi grassi mono- e poli-insaturi (Chillard Y. Et al., 2007).

Gli acidi grassi saturi prevalentemente presenti nel latte vaccino sono l'acido palmitico (C16:0, 25-30% del totale), l'acido stearico (C18:0, pari al 12%) e l'acido miristico (C14:0, circa l'11%), i quali conferiscono un'elevata digeribilità al latte (Palmquist D.L., 2006)

Agli acidi grassi a corta catena vengono riconosciuti effetti significativi nella riduzione del livello di colesterolo nel siero e nel fegato. (Frede E. D. et al., 1990); mentre altri studi hanno dimostrato che gli acidi grassi a media catena rappresentano la frazione dannosa degli acidi grassi saturi, perché responsabili dell'incremento del livello di colesterolo totale a livello del plasma ed in maniera particolare il colesterolo di tipo LDL (low density lipoprotein, o colesterolo "cattivo") che risulta essere il principale fattore di rischio per l'aterosclerosi (Parodi P. W., 1997).

L'acido grasso monoinsaturo più frequente nel latte è sicuramente l'acido oleico (*cis*-9-C18:1) con un valore compreso tra 20,1-20,8% degli acidi grassi totali (Jensen R.G., 2002).

È riconosciuto che diete ad alto apporto di acido oleico portano ad un calo del livello di colesterolo LDL, inoltre esso possiede proprietà antiaterogeniche (Molketin J., 1999).

I PUFA presenti nel latte derivano in maniera esclusiva dai grassi alimentari (Mc Donald D. G., 1992), e comprendono principalmente l'acido α -linolenico (C18:3, n-3) e l'acido linoleico (C18:2, n-6), con percentuali rispettivamente di 0,5 e 0,7%. Al gruppo degli acidi grassi

polinsaturi appartengono due importanti classi di acidi grassi essenziali (EFA), gli omega-3 e gli omega-6, che non potendo essere sintetizzati dal corpo umano assumono un'importanza fondamentale. I vari meccanismi tramite i quali gli EFA intervengono sulla salute dell'uomo sono stati oggetto di numerosi studi negli ultimi anni.

Gli acidi grassi appartenenti alla famiglia omega-3 hanno effetti fisiometabolici di vario tipo tra cui la modifica del metabolismo delle lipoproteine con conseguente riduzione dei trigliceridi totali (circa 30% in meno), la riduzione della formazione di trombi, la regressione del processo arteriosclerotico e la modulazione della risposta sia infiammatoria che immune (Berra et al., 2003).

Considerando invece la serie omega-6, va sottolineata l'importanza dell'acido arachidonico, che, non solo ha un ruolo strutturale e funzionale nelle membrane cellulari e subcellulari ma è anche precursore di prostaglandine, trombossani e leucotrieni.

Un rapporto sbilanciato tra le serie omega-3 e omega-6 a favore di quest'ultimo porta ad una maggiore probabilità di insorgenza di malattie cardiovascolari (Simopoulos A. P., 2002).

2.4 Influenza della stagionatura sulle proprietà del prodotto finito

Durante il lungo processo di maturazione del PR la frazione proteica subisce un'intensa idrolisi.

L'evoluzione dell'azoto solubile a pH 4,6 rispetto all'azoto totale nel corso dei mesi di stagionatura è stata ben accertata nel PR e la Figura 1 offre un'idea dell'andamento generale. La solubilizzazione è molto attiva nei primi 8-10 mesi di stagionatura per poi procedere molto lentamente nei mesi successivi. Simile curva si registra per la

liberazione di azoto solubile in acido fosfotungstico e per azoto ammoniacale.

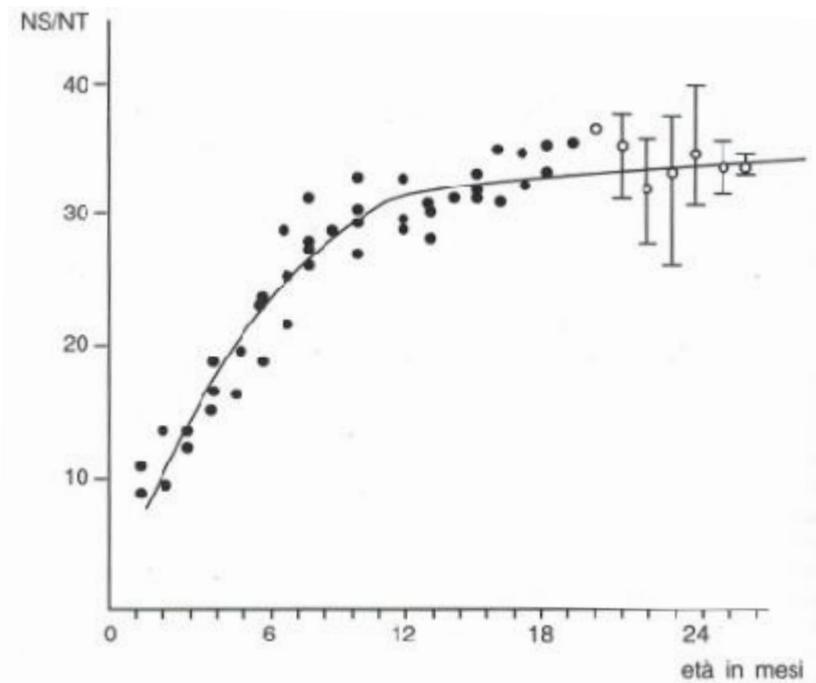


Figura 1: Variazioni dell'azoto solubile nel corso della maturazione del Parmigiano Reggiano. Nella parte finale della curva sono riportati i valori medi, minimi e massimi. NS = azoto solubile; NT = azoto totale (Bottazzi V., 1993).

E' bene ricordare, ai fini anche della differenziazione qualitativa stagionale del PR, che le produzioni estive presentano un processo proteolitico più intenso rispetto alle produzioni invernali da attribuirsi questo ad un diverso contenuto di enzimi di origine microbica (Bottazzi V., 1993).

Spostando l'esame alle frazioni caseiniche si è visto che la β -caseina viene rapidamente idrolizzata nella prima parte del ciclo di maturazione e l'azione idrolitica cala fino ad esaurirsi nell'arco di un anno mentre l' α_{s1} -caseina viene degradata più lentamente (Figura 2).

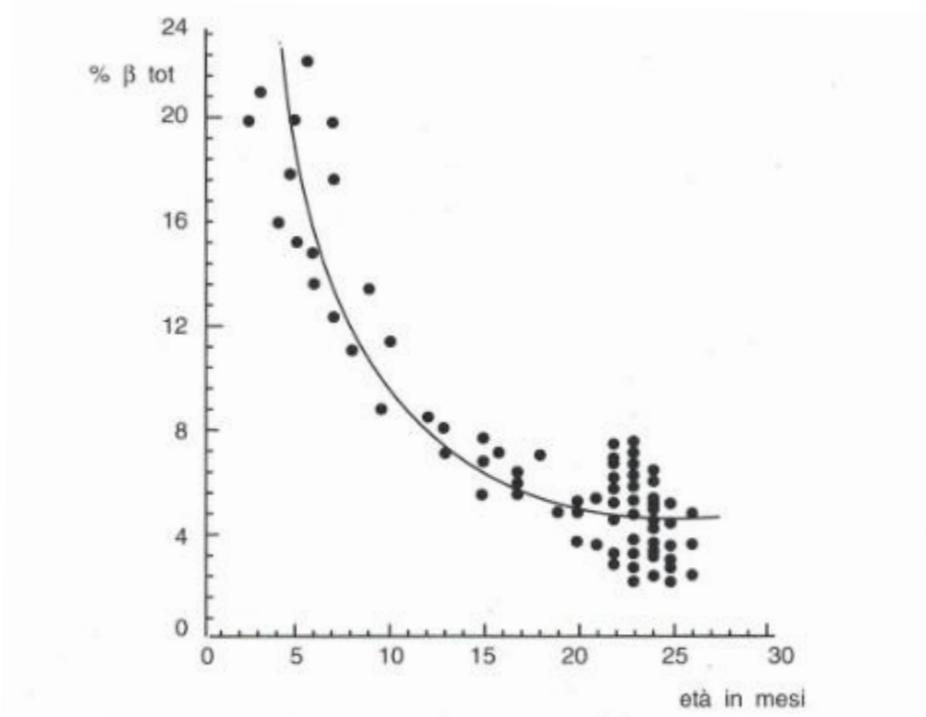


Figura 2: Idrolisi della β -caseina durante il periodo di maturazione del Parmigiano Reggiano (Bottazzi V., 1993).

Rispetto al totale i prodotti della degradazione della β -caseina coprono circa il 30%, quelli invece della α_{s1} -caseina (Figura 3) poco più del 18%. Il processo di degradazione delle caseine non è omogenea all'interno della forma: è meno intenso nelle zone sotto crosta rispetto a quelle centrali.

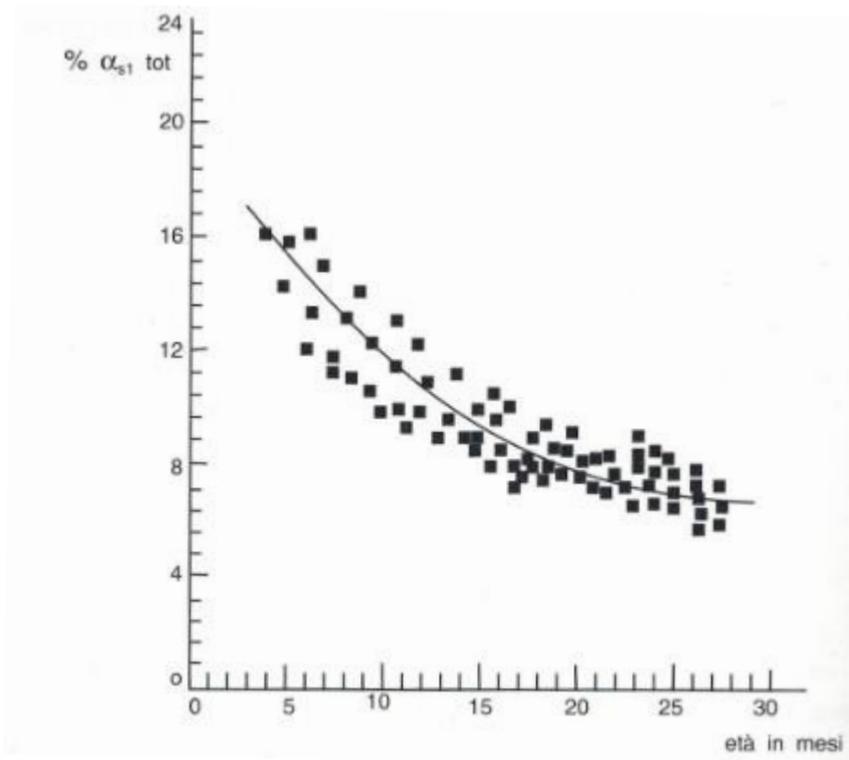


Figura 3: Idrolisi della α_{s1} -caseina durante il periodo di maturazione del formaggio parmigiano-reggiano (Bottazzi V., 1993).

Per quanto riguarda la distribuzione degli aminoacidi liberi la Tabella 1 può offrire un quadro del PR a fine stagionatura. Con riferimento al tempo si può vedere che il contenuto totale di aminoacidi liberi tende ad aumentare progressivamente sino a 15 mesi di stagionatura per poi stabilizzarsi. A fine stagionatura essi occupano, in media, il 23% delle proteine totali ed il 7,6% del formaggio tal quale. La lunga stagionatura porta il PR ad essere un formaggio fra i più ricchi in aminoacidi liberi. Gli aminoacidi liberi raggiungono, ad esempio, solo lo 0,37% in taleggio t.q., il 2,45% in Emmental e il 3,10% in provolone.

Aminoacidi	% delle proteine totali		
	media	minimo	massimo
acido aspartico	0,99	0,73	1,32
acido glutammico	4,41	3,53	5,18
asparagina	0,87	0,59	1,18
serina	1,36	0,96	1,71
glutammina	0,14	0,07	0,24
istidina	0,82	0,17	1,10
glicina	0,64	0,52	0,83
treonina	1,23	0,86	1,66
arginina	0,25	0,00	1,22
alanina	0,69	0,52	0,81
acido- γ -aminobutirrico	0,02	0,00	0,17
tirosina	0,63	0,34	0,88
acido- α -aminobutirrico	0,02	0,00	0,14
metionina	0,72	0,57	0,90
valina	1,84	1,49	2,15
fenilalanina	1,32	1,08	1,57
isoleucina	1,59	1,24	1,89
leucina	2,22	1,85	2,67
ornitina	0,38	0,12	0,67
lisina	3,08	2,43	3,91
<i>somma aminoacidi % proteine totali</i>	23,21	18,91	27,33

Tabella 1: Composizione percentuale in aminoacidi liberi riferita alle proteine totali di grana parmigiano-reggiano stagionato (Bottazzi V., 1993)

La Figura 4 mostra la curva di accumulo degli aminoacidi liberi.

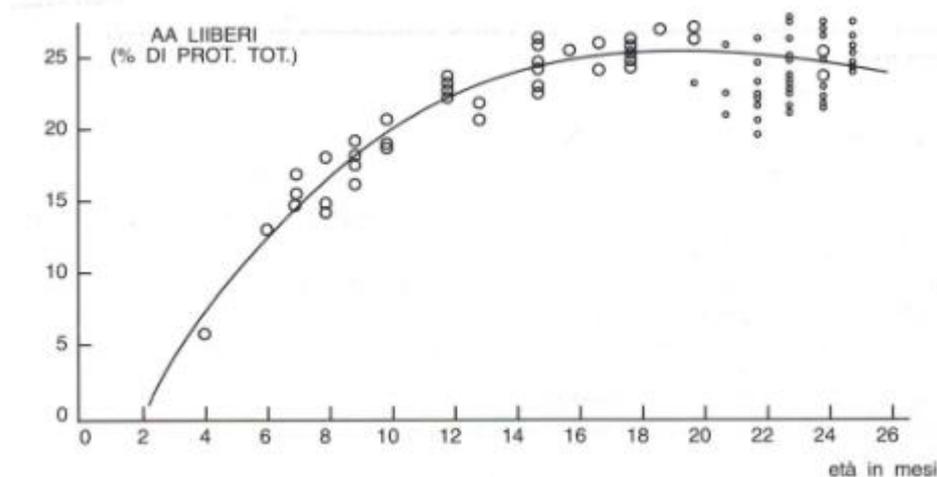


Figura 4: Liberazione di aminoacidi durante il periodo di maturazione del formaggio parmigiano-reggiano (Bottazzi V., 1993).

Basandosi sulle curve di accumulo di singoli aminoacidi è stato descritto un modello chemiometrico nell'intento di tipicizzare il PR, per riconoscere difetti e per poter stabilire lo stadio di maturazione.

L'idrolisi del grasso per attività lipasiche non assume nel formaggio un ruolo significativo nonostante sia lungo il ciclo di maturazione. Gli acidi grassi aumentano durante la stagionatura ma rimangono sempre su valori molto bassi e non influiscono sulle caratteristiche organolettiche del formaggio.

Dal punto di vista microbiologico il discorso è alquanto complesso. Lo sviluppo dei bacilli lattici termofili omofermentanti che incide nella caratterizzazione del formaggio raggiunge la massima intensità subito nelle prime ore successive alla messa in fascera della pasta. Questo sviluppo risulta numericamente il più importante in quanto supera in maniera sensibile quello di qualsiasi altro gruppo di batteri lattici. Le condizioni fisico-chimiche della pasta (contenuto in lattosio, umidità, pH, temperatura) e i trattamenti tecnologici praticati alla pasta fresca di

formaggio nelle prime fasi di maturazione sono senza dubbio molto favorevoli allo sviluppo di questo gruppo di batteri lattici. Come prima e più evidente conseguenza di questo sviluppo si ha la rapida trasformazione del lattosio in acido lattico. La rapida acidificazione che si accompagna a questo rapido sviluppo è necessaria per provocare un adeguato drenaggio del siero dalla massa caseosa nonché per promuovere nella pasta quei cambiamenti fisico-chimici che risultano notevolmente importanti al fine di evitare o favorire lo sviluppo di altri gruppi batterici. Inoltre non è da trascurare che l'inizio dell'idrolisi della caseina e quindi l'inizio del vero e proprio processo di maturazione coincida con il ciclo di sviluppo delle forme lattiche omofermentanti.

Il secondo ciclo batterico che caratterizza le prime fasi della maturazione è dovuto alle specie lattiche eterofermentanti. In normali condizioni di produzione del formaggio PR il rapporto lattobacilli termofili omofermentanti- lattobacilli eterofermentanti deve essere di circa 10/1 formando un giusto equilibrio, che si riflette sull'aspetto fisico della pasta e sui caratteri generali del formaggio.

Il ciclo di sviluppo dei batteri lattici eterofermentanti segue di circa 15-20 ore quello degli omofermentanti.

Nel complesso è molto intenso lo sviluppo batterico delle prime 24-30 ore dalla messa in fascera. Lo sviluppo dei batteri lattici deve essere considerato sotto diversi punti di vista ed in particolar modo per quanto riguarda (Bottazzi V., 1993):

- acidificazione rapida della pasta di formaggio
- regolazione del drenaggio del siero
- inizio dell'idrolisi delle proteine solubili del siero e della caseina
- formazione della piccola occhiatura
- accumulo di prodotti volatili
- contributo alla formazione della struttura fisica della pasta

In seguito durante il rimanente periodo di maturazione, la microflora lattica che partecipa in maggior misura ai processi di idrolisi è rappresentata da forme mesofile sia cocciche che bacillari.

Altre microflore possono sviluppare durante il periodo della stagionatura, ed in modo particolare quelle composte dai batteri propionici e dai clostridi, esse possono essere responsabili di fermentazioni indesiderate (Bottazzi V., 1993).

Un altro valore importante che si modifica nel corso della maturazione del PR è il pH. Questo infatti diminuisce in maniera progressiva nelle prime ore, influenzato dal graduale ma difforme calo della temperatura della forma e, di conseguenza, con diversa dinamica tra “centro” e “periferia”. Una volta superate le prime 48-72 ore, se l’acidificazione avviene in maniera regolare, si raggiungono valori di pH quasi analoghi all’esterno come all’interno della forma (Tosi et al., 2008).

In Figura 5 è rappresentato l’andamento del pH al centro ed anche in 4 zone periferiche della forma di PR, tra le 72 ore e i 7 mesi di stagionatura

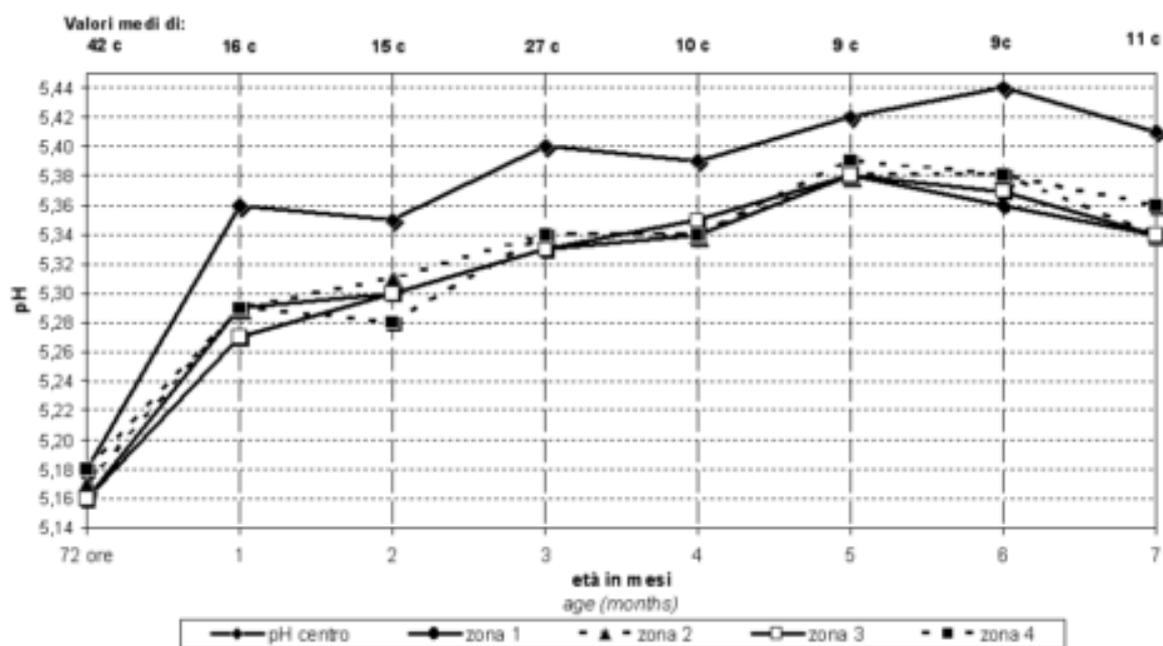


Figura 5. Variazioni del pH al centro e in 4 zone periferiche della forma di Parmigiano-Reggiano nel corso dei primi sette mesi di stagionatura. (Tosi et al., 2008)

L'andamento del pH che possiamo osservare nei diversi punti esaminati, si presenta crescente da 72 ore fino al 6° mese di stagionatura; da questo punto in poi risulta diminuire. I valori medi di pH ricavati dalle misurazioni effettuate nel centro della forma appaiono costantemente superiori rispetto a quelli delle zone più esterne. Questa è una differenza importante che si evidenzia nelle forme a seguito dell'uscita dalla salamoia e che rimane poi pressoché costante per tutto il periodo di tempo di maturazione. (Tosi et al., 2008).

2.4.1 Influenza dei composti volatili e non volatili sul gusto e sull'odore del Parmigiano-Reggiano

Gli sforzi per descrivere la qualità sensoriale del formaggio in termini di composizione e cambiamenti microbici sulla maturazione hanno dimostrato che gli abbondanti aminoacidi liberi dovuti alla degradazione delle proteine e gli acidi grassi liberi dovuti alla degradazione dei lipidi contribuiscono a caratteristiche distintive del gusto. Nell'ultimo decennio l'ampia applicazione di tecniche multivariate come l'analisi discriminante e la regressione multipla hanno prodotto un nuovo approccio all'interpretazione dei descrittori di qualità del formaggio; tuttavia non è stato effettuato alcuno studio predittivo quantitativo sul Parmigiano-Reggiano. Nello studio di Virgili e collaboratori (1994) i composti volatili e non volatili del formaggio PR erano correlati ad un gruppo selezionato di descrittori del gusto e dell'odore. Anche le differenze sensoriali e chimiche tra i campioni trattati in stagioni diverse sono state prese in considerazione. Le componenti analitiche e gli attributi di sapore in questo studio sono indicatori del fatto che la qualità sensoriale del formaggio PR è principalmente influenzata da alcune importanti famiglie chimiche che mostrano relazioni significative con le proprietà sensoriali del prodotto e con i cambiamenti durante l'anno. (Virgili et al., 1994)

2.5 La composizione lipidica del Parmigiano Reggiano; effetto sulla qualità organolettica e nutrizionale

Analizzando la composizione lipidica del PR (circa il 28%) possiamo dire che tale formaggio può essere definito formaggio semigrasso, la percentuale di lipidi è associata all'utilizzo di latte parzialmente

scremato ed il rapporto tra grassi saturi ed insaturi è nettamente a favore dei primi (più del doppio). Il contenuto di colesterolo è relativamente modesto e varia tra 83-91 mg per 100 g di formaggio (INRAN, 2008).

La composizione lipidica totale e la frazione di trigliceridi è rappresentata da un'elevata concentrazione di acidi grassi a media e corta catena, essi vengono assorbiti direttamente dall'intestino ed in maniera molto rapida verranno poi utilizzati come fonte energetica.

Durante il periodo di stagionatura del formaggio, la componente lipidica andrà a subire consistenti modifiche causate dalla parziale lipolisi che produce una frazione di acidi grassi liberi disponibili, facilitandone l'assorbimento (Pancaldi et al., 2008).

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Campioni

La composizione in acidi grassi e il contenuto in colesterolo sono stati determinati su 6 diversi campioni di PR, provenienti da 3 diversi caseifici facenti parte del consorzio del Parmigiano Reggiano (mat. 245, mat. 788 e mat. 1567). Ogni caseificio ha fornito un PR stagionato 24 mesi ed un PR stagionato 36 mesi

I campioni sono stati nominati con le seguenti sigle:

-24M mat.245

-36M mat 245

-24M mat 788

-36M mat 788

-24M mat 1567

-36M mat 1567

3.2 Estrazione del grasso mediante metodo Soxhlet

Solventi e reagenti

n-esano, isopropanolo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Vetreria utilizzata

Ditali in cellulosa diametro 2 cm (Behr, Germania), palloni di vetro da 100 ml, spatola, pinze.

Strumenti

Bilancia analitica (Scaltec, Goettingen, Germania), Soxhlet ech System HT 1046 Service Unit Tecator (Gemini BV, Apeldoorn, Paesi Bassi), Mixer vortex (Usmate, MB, Italia), Rotavapor Laborota 4001 – efficient (Heidolph, Germania).

Procedimento

Circa 10 grammi di Parmigiano Reggiano sono stati pesati in ditali di cellulosa e successivamente posizionati all'interno dell'apparato Soxhlet. Nelle piastre riscaldanti, impostate alla temperatura di 60°C, sono stati posizionati i palloni di vetro da 100 m, precedentemente pesati, con 60 ml di *n*-esano.

Il solvente riscaldato sale attraverso il tubo di bypass e raggiunge la parte superiore del sistema arrivando al condensatore. Il vapore, a contatto con la serpentina in cui circola acqua fredda, condensa gocciando nel ditale che contiene il campione.

Quando il livello di solvente nella parte in cui è inserito il ditale raggiunge il livello della parte superiore del sifone, il solvente contenente il grasso ricade nuovamente nel pallone per essere ri-evaporato.

L'estrazione del grasso dalla matrice è, quindi, avvenuta per continua evaporazione e condensazione dell'*n*-esano attraverso i ditali. Dopo 180 minuti, il sistema è stato raffreddato e quindi i ditali sono stati rimossi e

il solvente con il grasso disciolto contenuto nei palloni è stato evaporato sottovuoto mediante rotavapor.

Per una completa eliminazione del solvente, i palloni sono stati posti sotto flusso di azoto per alcuni minuti e ripesati con grasso estratto recuperato. Infine, il grasso è stato recuperato con 2/3 ml di esano/isopropanolo 4/1 (v/v) e stoccato in freezer a -18°C in provette di vetro.

3.3 Determinazione mediante gascromatografia capillare degli acidi grassi totali (FAME)

Solventi e reattivi

Metanolo, *n*-esano, idrossido di potassio (KOH) e acido tridecanoico (C13:0) sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), miscela GLC standard (GLC-463 Nu-Check. Elysian, MN, USA). L'azoto tecnico presentava una purezza maggiore al 95% ed è stato acquistato dalla ditta Sapio Industrie (Monza, Italia).

Vetrieria Utilizzata

Bottiglie Sovirel® da 250 e 500 ml, provette troncoconiche in vetro, pipette Pasteur, vials.

Apparecchiature utilizzate

Micropipette automatiche da 1000 e 50 µl tipo Gilson (California, USA), bagno ad ultrasuoni Starsonic 90 Liarre (Bologna, Italia), bilancia analitica della KERN & SOHN GmbH mod. ABJ 220-4M (Balingen, Germany), agitatore Vortex tipo RX3 della VELP Scientifica (Usmate (MB), Italia), centrifuga DJB Labcare mod. ALC-PK 110 (Buckinghamshire, England), gascromatografo GC-2010 Plus dotato di autocampionatore AOC-20s e autoiniettore AOC-20i della Shimadzu (Kyoto, Giappone).

Procedimento

Per la valutazione della composizione in acidi grassi sono stati pesati 20 mg di grasso ai quali sono state aggiunte 3 gocce di diazometano per poter determinare anche gli eventuali acidi grassi liberi presenti. Dopo averli lasciati sotto azoto per circa 15 minuti, ad ogni campione sono stati aggiunti 500 μ l di *n*-esano e 500 μ l di standard interno (C13:0 metil estere) alla concentrazione di 2 mg/ml.

La miscela, dopo essere stata agitata per qualche secondo, è stata addizionata di 40 μ l di etilacetato e 40 μ l di sodio metossido in metanolo 1N; dopo aver agitato nuovamente per 30 secondi, la miscela è stata lasciata a riposo per 20 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 30 μ l di soluzione satura di acido ossalico in etere dietilico e dopo aver agitato, la miscela è stata centrifugata a 1500 giri per 2 minuti.

Il surnatante ottenuto contenente i FAME di interesse, in seguito ad opportuna diluizione, è stato iniettato in GC-FID. La separazione cromatografica è stata condotta con l'impiego di una colonna BPx 70 della SGE Analytical Science (Melbourne, Australia) di dimensioni 10m x 0,1 mm di diametro interno e 0,2 μ m di spessore del film con fase stazionaria cianopropilica (polarità equivalente al 70% di cianopropil-silossano). Il volume e la temperatura di iniezione erano rispettivamente 0,30 μ l e 250°C, il flusso in colonna era di 0,80 ml/min e il rapporto di splittaggio 1:100. La temperatura iniziale del forno era di 50°C per 0,2 minuti, poi saliva di 120°C/min fino alla temperatura di 175°C, mantenuta per 2 minuti, e infine saliva a 20°C/min fino a 220 °C.

Gli acidi grassi sono stati identificati sulla base dei tempi di ritenzione noti di una miscela standard di acidi grassi (GLC-463 Nu-Check. Elysian, MN, USA). Per ogni campione di grasso estratto sono state

condotte due repliche ed i risultati sono stati espressi in mg FA/100 mg FAME.

3.4 Estrazione della frazione insaponificabile

Solventi e reattivi: Metanolo, *n*-esano, etere dietilico, isopropanolo, idrossido di potassio (KOH), cloruro di sodio (NaCl), sodio solfato anidro, diidrocolesterolo (I.S.), sono stati forniti dalla Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). L'acqua bidistillata è stata prodotta in situ con sistema Elix 10 della Millipore (Billerica, MA, USA).

Vetreteria utilizzata: Provette in vetro tipo Sovirel® con tappo a vite in plastica, cilindro graduato in vetro da 10 ml, beute con collo smeriglio da 150 ml, imbuti separatori da 250 e 500 ml, palloni con collo a smeriglio da 250 ml, pipette Pasteur.

Apparecchiature utilizzate: Micropipette automatiche da 1000 µl tipo Gilson (California, USA), bilancia analitica KERN & SOHN GmbH ABJ 220-4M (Balingen, Germania), agitatore orizzontale IKA tipo KS 260 basic (Staufen, Germania), rotavapor Heidolph "LABOROTA 4001 – efficient" (Heidolf, Germania).

Procedimento: Sono stati pesati 250 mg di grasso in una provetta Sovirel® munita di tappo a vite, a cui è stato aggiunto come standard interno il diidrocolesterolo (500 µl di una soluzione a concentrazione 2,02 mg/ml). Dopo aver posto la provetta sotto flusso di azoto per eliminare il solvente, sono stati aggiunti 10 ml di una soluzione 1N di KOH in metanolo. A questo punto la provetta, una volta tappata e ricoperta con carta argentata, è stata lasciata in agitazione continua a

temperatura ambiente per 18-20 ore. Successivamente, per poter ottenere la frazione dell'insaponificabile, la soluzione saponificata in provetta è stata trasferita in un imbuto separatore e sono state effettuate tre estrazioni in successione:

- la prima aggiungendo 10 ml di etere dietilico, prima nella provetta (per lavarla accuratamente al fine di non avere perdite) quindi nell'imbuto separatore, e 10 ml di acqua distillata per favorire la separazione della fase acquosa (idroalcolica) e organica (eterica);

-la seconda e la terza estrazione sono state effettuate aggiungendo in successione solo 10 ml di etere dietilico direttamente nell'imbuto separatore contenente la fase acquosa.

Ad ogni lavaggio la fase eterica è stata raccolta a parte. Al termine dei tre lavaggi, la fase idroalcolica è stata eliminata mentre le tre frazioni eteriche unite, contenenti la frazione insaponificabile di interesse, sono state riposte nel pallone per ulteriori lavaggi:

-2 lavaggi con 10 ml di una soluzione acquosa di KOH 0,5N

-2 lavaggi con 10 ml di acqua bidistillata.

Nel caso in cui durante il primo lavaggio si formavano emulsioni veniva addizionata direttamente nell'imbuto mezza spatola di NaCl.

La frazione eterica così purificata è stata trasferita in una beuta da 150 ml con collo smeriglio e sono state aggiunte 5 spatole abbondanti di sodio solfato anidro per eliminare l'eventuale acqua rimasta; il tutto è stato lasciato a riposo per 2 ore agitando periodicamente.

Infine l'estratto è stato filtrato su filtro a pieghe (\varnothing 12 cm) nel quale precedentemente erano state poste due spatole di sodio solfato anidro inumidite con etere dietilico. L'estratto filtrato è raccolto in un pallone da 100 ml è stato portato a secco con rotavapor, ripreso con 1 ml di esano:isopropanolo 4:1 (v/v) e stoccato a -18°C fino al momento delle

analisi. Per ogni campione estratto sono state condotte due repliche ed i risultati sono stati espressi in mg/100g.

3.5 Determinazione del contenuto in colesterolo

Dalla frazione insaponificabile in soluzione *n*-esano:isopropanolo 4:1 (v/v) ottenuta, è stata prelevata un'aliquota di 100 µl, la quale è stata collocata in un'altra provetta, che è stata a sua volta portata a secco sotto flusso di azoto e derivatizzata tramite l'aggiunta di 1 ml di miscela silanizzante costituita da: piridina anidra: esametildisiliziano: trimetilclorosilano nel rapporto 5:2:1 (Sweeley C.C. et al., 1963).

Il campione, chiuso, è stato agitato in vortex e lasciato nel termoblock per 20 minuti a 40°C. Infine, dopo aver portato a secco sotto il flusso di azoto, il campione è stato ripreso in 500 ml di *n*-esano, agitato con vortex e centrifugato per 5 minuti a 400 rpm. Il surnatante ottenuto è stato prelevato e posto in vial per l'esecuzione dell'analisi cromatografica.

La separazione cromatografica è stata condotta con l'impiego di una colonna Restek RXi-5ms di dimensioni 10 m x 0,1 mm di diametro interno e 0,2 µm di spessore del film. Il volume e la temperatura di iniezione erano rispettivamente pari a 0,30µl e 325 °C; il flusso in colonna era di 0,40 ml/min e il rapporto di splittaggio 1:50.

La temperatura del FID era di 325 °C e la separazione è stata condotta in isoterma alla temperatura di 240 °C per 12 minuti.

Per ogni campione di grasso estratto sono state condotte due repliche ed il contenuto di colesterolo è stato quantificato con l'impiego dello standard interno (diidrocolesterolo) esprimendo i risultati in mg di colesterolo/100 mg di grasso.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1. Estrazione del grasso con metodo Soxhlet

La frazione lipidica, estratta dai campioni oggetto di studio come descritto nel capitolo 3 (paragrafo 3.2), è stata valutata su tutti i campioni di PR descritti nel paragrafo 3.1. Nella tabella 4.1 sono riportati i valori medi delle percentuali in grasso nei campioni provenienti dai diversi caseifici a diverse stagionature. I valori medi, espressi come percentuale in grasso sul campione tal quale, con lettere diverse sono tra loro significativamente differenti.

Campione	%
24M mat 245	29,38 ± 1,58 bc
36M mat 245	29,15 ± 0,61 c
24M mat 788	30,89 ± 1,04 abc
36M mat 788	33,93 ± 0,22 a
24M mat 1567	29,98 ± 3,92 bc
36M mat 1567	32,32 ± 0,38 ab

Tabella 4.1. Percentuale in grasso dei diversi campioni provenienti da tre diversi caseifici (mat 245, mat 788 e mat 1567) e a due differenti stagionature (24 e 36 mesi). Le lettere diverse denotano valori medi significativamente diversi tra loro ($p \leq 0,05$).

Mettendo a confronto il contenuto lipidico dei diversi campioni di PR analizzati, la percentuale più elevata, in valore assoluto, di grasso è stata rilevata nel campione 36M mat 788 e nel campione 36M mat 1567 che, infatti, non mostrano differenze significative tra loro. Le percentuali di questi due campioni si attestano rispettivamente a 33,93 e

32,32%. Le analisi che mostrano risultati significativamente minori in percentuale di grasso estratto riguardano il campione stagionato 36 mesi proveniente dal caseificio con matricola 245 (29.38 %).

La ragione dell'aumento percentuale, in valore assoluto, in grasso nei campioni stagionati 36 mesi rispetto a quelli stagionati 24 mesi può essere legata alla maggiore perdita di umidità in questi due caseifici (mat 788 e mat 1567) rispetto al mat 245. In generale, considerando le due diverse epoche di stagionatura del PR, non si sono riscontrati valori significativamente differenti tra loro; come ovvio, il tempo di stagionatura non modifica la quantità di grasso; il contenuto in grasso è probabilmente più legato al territorio, alle modalità di affioramento e alla stagione.

Risultati simili derivano da un precedente studio sulla composizione di formaggi a denominazione di origine protetta (Manuelian C. L. et al., 2017); nello studio infatti risulta che la percentuale di grasso estratta dal PR è del 31,37%.

Altri risultati in linea con questi dati provengono dallo studio di Panari e collaboratori (2003); in questo studio la percentuale di grasso estratta a 24 mesi di stagionatura è del 30,49%.

Nel grafico 4.1 è possibile vedere in modo più chiaro l'andamento della percentuale di grasso estratto dai diversi campioni.

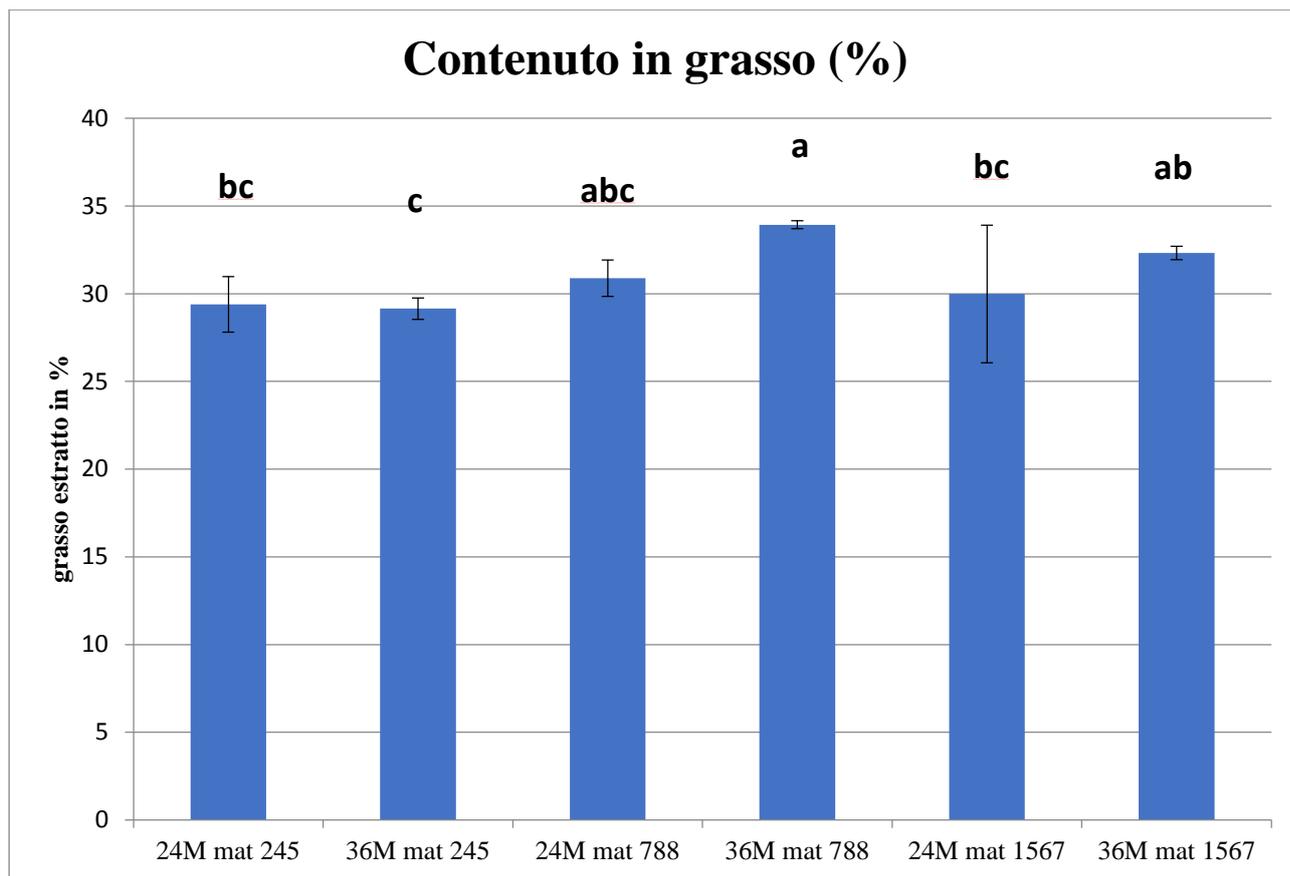


Grafico 4.1. Percentuali di grasso estratto dai campioni provenienti da diversi caseifici (mat 245, mat 788, mat 1567) nelle due diverse stagionature (24 e 36 mesi). Le lettere diverse denotano valori medi significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

4.2. Determinazione degli acidi grassi

La caratterizzazione e quantificazione degli acidi grassi totali presenti nei diversi campioni di Parmigiano Reggiano è stata effettuata tramite trans-metilazione della frazione lipidica e iniezione in FAST GC-FID. Tale analisi è stata eseguita al fine di valutare quali tra i campioni oggetto di studio presentano un profilo interessante da tenere in considerazione per quello che è lo scopo di questo progetto, ovvero, la valutazione del cambiamento nella composizione della frazione lipidica

per quanto riguarda il contenuto in acidi grassi dei diversi campioni di PR.

In tutti i campioni a nostra disposizione sono stati individuati 31 acidi grassi i cui valori medi sono riportati nella Tabella 1, espressi in mg/100mg di FAME.

I risultati ottenuti e visibili in tabella 4.2 mostrano come in tutti i campioni di PR esaminate l'acido grasso principale sia l'acido palmitico (C16:0) con un range che oscilla dal 30 al 32%. A seguire in ordine decrescente, troviamo l'acido oleico (C18:1 α) con una percentuale oscillante tra il 22 ed il 24,5%. L'acido miristico (C14:0) invece è il terzo acido grasso per quantità all'interno dei nostri campioni, il suo range varia dall'11 al 12%. Un altro acido grasso presente in quantità rilevanti è l'acido stearico (C18:0) che oscilla tra il 9 e l'11%. Dopo questi acidi grassi, anche se in percentuali diverse a seconda del campione analizzato, gli acidi grassi contenuti in quantità maggiori sono l'acido laurico (C12:0), linoleico (C18:2 $n-6$), caprico (C10:0) e palmitoleico (C16:1 $n-7$).

Non è stato riscontrato, al contrario, in alcun campione l'Acido Linoleico Coniugato (CLA).

Risultati simili emergono da studi precedenti atti a valutare la composizione in acidi grassi di formaggi a denominazione di origine protetta (Manuelian C.L. et al., 2017); nello studio risulta infatti che gli acidi grassi presenti in maggiori quantità all'interno del Parmigiano Reggiano sono l'acido palmitico, l'oleico, il miristico e lo stearico nello stesso ordine decrescente dei nostri risultati.

In uno studio di Guerra e collaboratori (2014), su creme ottenute da latte proveniente dalla zona del Parmigiano Reggiano, sono stati determinati gli stessi acidi grassi prevalenti. Infatti, l'acido palmitico è presente con una percentuale del 30,5%, l'acido oleico invece si ferma al 23%. A

seguire, in ordine decrescente l'acido stearico e l'acido miristico con le percentuali rispettivamente di 12,4 e 10,21%.

Anche i risultati di uno studio di Verardo et al. (2013), su campioni di burro prodotto nelle zone del Parmigiano Reggiano sono conformi ai nostri. Infatti, il pattern acidico era in questo ordine: acido palmitico (30,33%), acido oleico (24,57%), acido miristico (10,53%) e acido stearico (10,25%).

Per quanto riguarda l'acido palmitico, il valore significativamente maggiore si riscontra nel campione con matricola 245 stagionato 36 mesi (32,19%) mentre i valori significativamente minori nei campioni 24M mat 245 (30,13%) e 24M mat 788 (30,64%). Situazione diversa invece per quanto riguarda l'acido oleico, infatti, è il campione 24M mat 1567 a presentare la percentuale significativamente maggiore con il 24,43%. In questo caso però il valore significativamente minore appartiene al campione con matricola 245 stagionato per 36 mesi (22,61%). La percentuale più alta di acido miristico è riscontrata nel campione 36M mat 245 con un valore di 12,27%, mentre il valore significativamente più basso è nel campione 1567 stagionato 24 mesi (11,35%). Infine, per l'acido stearico il valore significativamente più alto è riscontrato nel 24M mat 788 (11,20%), mentre il più basso deriva dal campione 245 stagionato 36 mesi (9,85%).

Acido Grasso	24M mat 245	36M mat 245	24M 788	36M 788	24M 1567	36M mat 1567
C6:0	1,88±0,00a	1,80±0,03ab	1,81±0,00ab	1,72±0,04b	1,79±0,04ab	1,76±0,02b
C8:0	1,25±0,02a	1,19±0,01ab	1,19±0,00ab	1,11±0,02c	1,17±0,03bc	1,16±0,03 bc
C10:0	2,97±0,03a	2,92±0,02a	2,88±0,01abc	2,65±0,04d	2,77±0,04bc	2,77±0,02 cd
C12:0	3,48±0,04a	3,52±0,03a	3,45±0,02a	3,20±0,00c	3,30±0,00b	3,32±0,00 b
C12:1	0,12±0,01a	0,13±0,02 a	0,10±0,00a	0,09±0,00a	0,10±0,01a	0,12±0,01 a
C13:0	0,14±0,04a	0,16±0,02 a	0,19±0,02 a	0,18±0,01 a	0,16±0,00 a	0,15±0,00 a
C14:0	11,53±0,03bc	12,27±0,05 a	11,67±0,04b	11,60±0,06b	11,35±0,04c	11,37±0,01 c
C14:1	1,24±0,03b	1,29±0,01 ab	1,22±0,01b	1,27±0,01ab	1,25±0,00ab	1,32±0,03 a
C15:0	1,22±0,02 bc	1,34±0,01 a	1,17±0,04c	1,28±0,00 ab	1,17±0,02c	1,19±0,00 c
C15:1C	0,30±0,02 a	0,29±0,00 a	0,27±0,01a	0,28±0,01a	0,28±0,00a	0,29±0,01 a
C16:0	30,13±0,12 d	32,19±0,18 a	30,64±0,14c	31,86±0,06a	31,06±0,06bc	31,21±0,06 b
C16:1C	2,79±0,03 b	2,88±0,09ab	2,57±0,05c	2,86±0,02ab	2,73±0,03bc	3,01±0,00 a
C17:0	0,69±0,02a	0,67±0,05 a	0,70±0,03 a	0,74±0,00 a	0,65±0,04 a	0,65±0,03 a
C17:1	0,33±0,01ab	0,32±0,02 b	0,39±0,06 ab	0,45±0,01 ab	0,41±0,02 ab	0,37±0,03 a
C18:0	10,14±0,02 c	9,85±0,08d	11,20±0,03a	10,38±0,03b	10,27±0,04bc	10,14±0,00c
C18:1C9	24,10±0,03 c	22,61±0,01e	23,78±0,04d	23,79±0,04d	24,43±0,01a	24,24±0,05 b
C18:1	0,51±0,04 a	0,42±0,02ab	0,35±0,03b	0,38±0,03b	0,39±0,01b	0,39±0,03b
C18:2TT	0,88±0,09 a	0,81±0,09 ab	0,59±0,02b	0,76±0,03ab	0,73±0,01ab	0,92±0,01 a
C18:2N6	3,39±0,02 a	2,55±0,04c	2,72±0,02bc	2,27±0,00d	2,92±0,10b	2,82±0,07b
C18:3N6	0,29±0,01a	0,29±0,04 a	0,40±0,05 a	0,40±0,01 a	0,41±0,03 a	0,38±0,03 a
C18:3N3	0,61±0,00 b	0,64±0,00 a	0,60±0,00b	0,59±0,00bc	0,59±0,01bc	0,57±0,00 c
C20:0	0,87±0,00 b	0,77±0,00e	0,82±0,00c	0,92±0,01 a	0,86±0,00b	0,81±0,00 d
C20:1	0,24±0,01 ab	0,19±0,01b	0,20±0,02b	0,26±0,01 a	0,23±0,00ab	0,23±0,02 ab
C20:2N6	0,07±0,01 a	0,07±0,01 a	0,07±0,00 a	0,08±0,01 a	0,07±0,00 a	0,08±0,00 a
C20:3N6	0,29±0,09 a	0,27±0,05 a	0,41±0,11 a	0,36±0,03 a	0,39±0,05 a	0,25±0,01 a
C20:4N6	0,17±0,01 a	0,16±0,00ab	0,15±0,00bc	0,14±0,00c	0,16±0,00ab	0,16±0,00 ab
C22:1	0,07±0,00 a	0,09±0,01 a	0,08±0,01a	0,08±0,00 a	0,07±0,00a	0,07±0,00 a
C22:2	0,05±0,01 ab	0,07±0,00 a	0,04±0,01b	0,03±0,01b	0,04±0,00ab	0,03±0,00b
C22:3+C22:4	0,06±0,02 a	0,06±0,01 a	0,10±0,02 a	0,09±0,02 a	0,09±0,01a	0,06±0,00 a
C24:0	0,07±0,01 ab	0,07±0,01 ab	0,09±0,01 a	0,08±0,00 ab	0,08±0,00ab	0,06±0,01 b
C24:1	0,11±0,01 c	0,12±0,00 ab	0,13±0,00a	0,13±0,00 a	0,11±0,00abc	0,11±0,00 bc

Tabella 4.2 Composizione in acidi grassi espressi come % sul contenuto totale (mg/100mg FAME) dei diversi campioni di PR analizzati provenienti da tre diversi caseifici (mat 245, mat 788 e mat 1567) nelle due diverse stagionature (24 e 36 mesi).

Lettere differenti nella stessa riga denotano valori significativamente differenti ($p \leq 0,05$) per quanto riguarda il singolo acido grasso.

Considerando i principali gruppi nei quali si raggruppano gli acidi grassi, saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA), quelli predominanti nei campioni di PR sono nettamente i saturi (SFA), essi hanno sempre percentuali che superano il 60 % del totale, il campione con matricola 245 stagionato 24 mesi presenta la percentuale di acidi grassi saturi significativamente minore (64,38%); il campione 36M mat 245 invece, la maggiore (66,75%). A seguire, in ordine decrescente, i MUFA ed infine i PUFA con percentuali significativamente differenti.

Questo perché i bovini sono ruminanti e la microflora del rumine svolge un processo di idrogenazione degli acidi grassi insaturi facendoli diventare saturi. (Mapiye C. et al., 2012). Nel campione mat 245 si evidenzia una diminuzione di MUFA e PUFA dal PR stagionato 24 mesi a quello stagionato 36 (da 29,81% a 28,34% e da 5,81% a 4,91% rispettivamente) (Tabella 4.3); tale diminuzione è risultata essere significativa nel caso dei MUFA e non significativa, invece, nel caso dei PUFA ($p \leq 0,05$).

Nel caso invece degli SFA si registra un aumento significativo del loro contenuto passando da 24 a 36 mesi di maturazione (Tabella 4.3) da 64,38% a 66,75%.

Campione mat 245		
	24M	36M
SFA	64,38 ± 0,32 b	66,75 ± 0,34 a
MUFA	29,81 ± 0,07 a	28,34 ± 0,12 b
PUFA	5,81 ± 0,25 a	4,91 ± 0,22 a

Tabella 4.3 Composizione in acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA) del campione mat 245 nelle due diverse stagionature (24 e 36 mesi) espressi come % sul contenuto totale (mg/100mg FAME). Le lettere diverse denotano valori medi significativamente diversi ($p \leq 0,05$)

Nel Grafico 4.2 è possibile vedere più chiaramente l'andamento del contenuto in acidi grassi del campione mat 245.

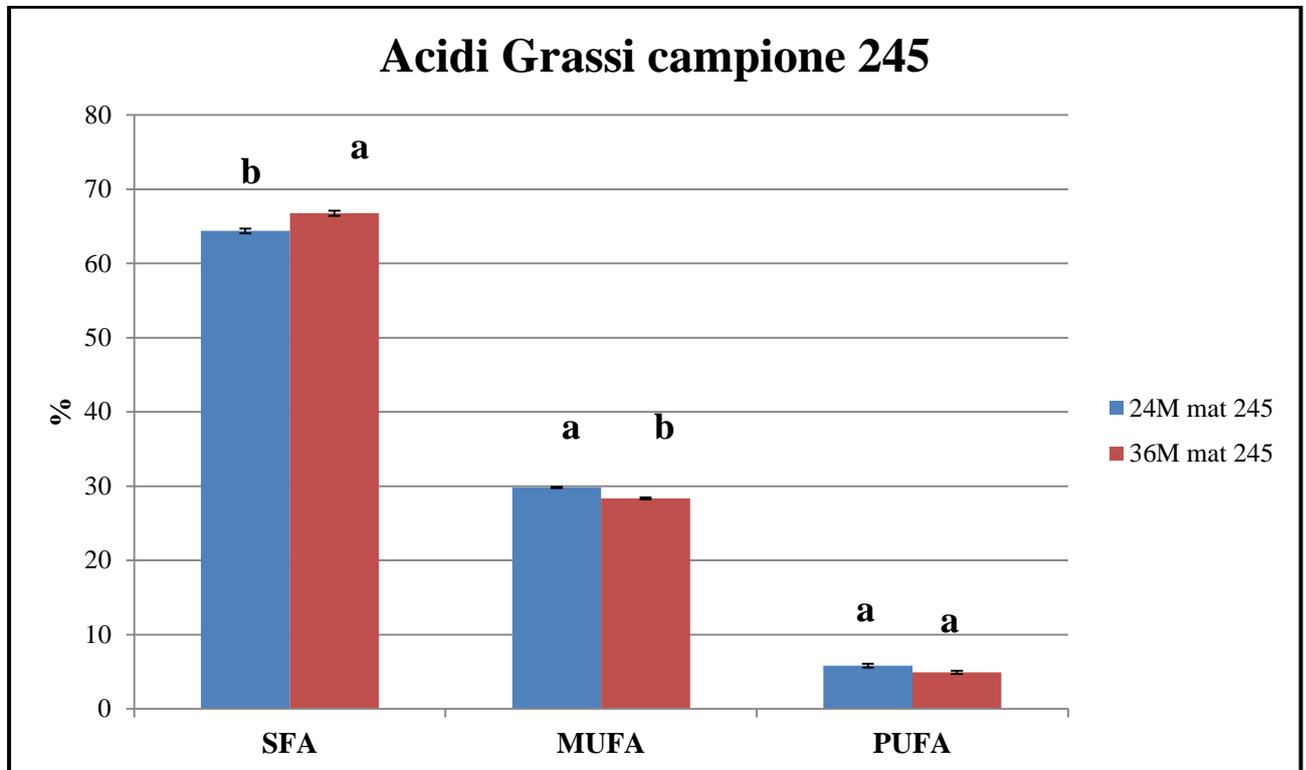


Grafico 4.2. Andamento della composizione in acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi del campione mat 245 nelle due diverse stagionature (24 e 36 mesi) espressi come % sul contenuto totale (mg/100mg FAME). Le lettere diverse denotano valori medi significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

Nel campione mat 788 invece sono i SFA e i PUFA a diminuire, mentre i MUFA subiscono un leggero aumento (Tabella 4.4).

I SFA e PUFA diminuiscono da 65,81 a 65,70 % e da 5,09 a 4,73% rispettivamente, dal campione stagionato 24 mesi fino a quello stagionato 36 mesi; entrambi senza mostrare differenze significative ($p \leq 0,05$). I MUFA al contrario aumentano significativamente ($p \leq 0,05$) il loro contenuto con l'aumento della maturazione, da 29,19 a 29,58 %.

Campione mat 788		
	24M	36M
SFA	65,81 ± 0,19 a	65,70 ± 0,00 a
MUFA	29,10 ± 0,03 b	29,58 ± 0,01 a
PUFA	5,09 ± 0,16 a	4,73 ± 0,01 a

Tabella 4.4. Composizione in acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA) del campione mat 788 nelle due diverse stagionature (24 e 36 mesi) espressi come % sul contenuto totale (mg/100mg FAME). Le lettere diverse denotano valori medi significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

Nel grafico 4.3 è possibile visualizzare in modo più chiaro l'andamento del contenuto in acidi grassi del campione mat 788.

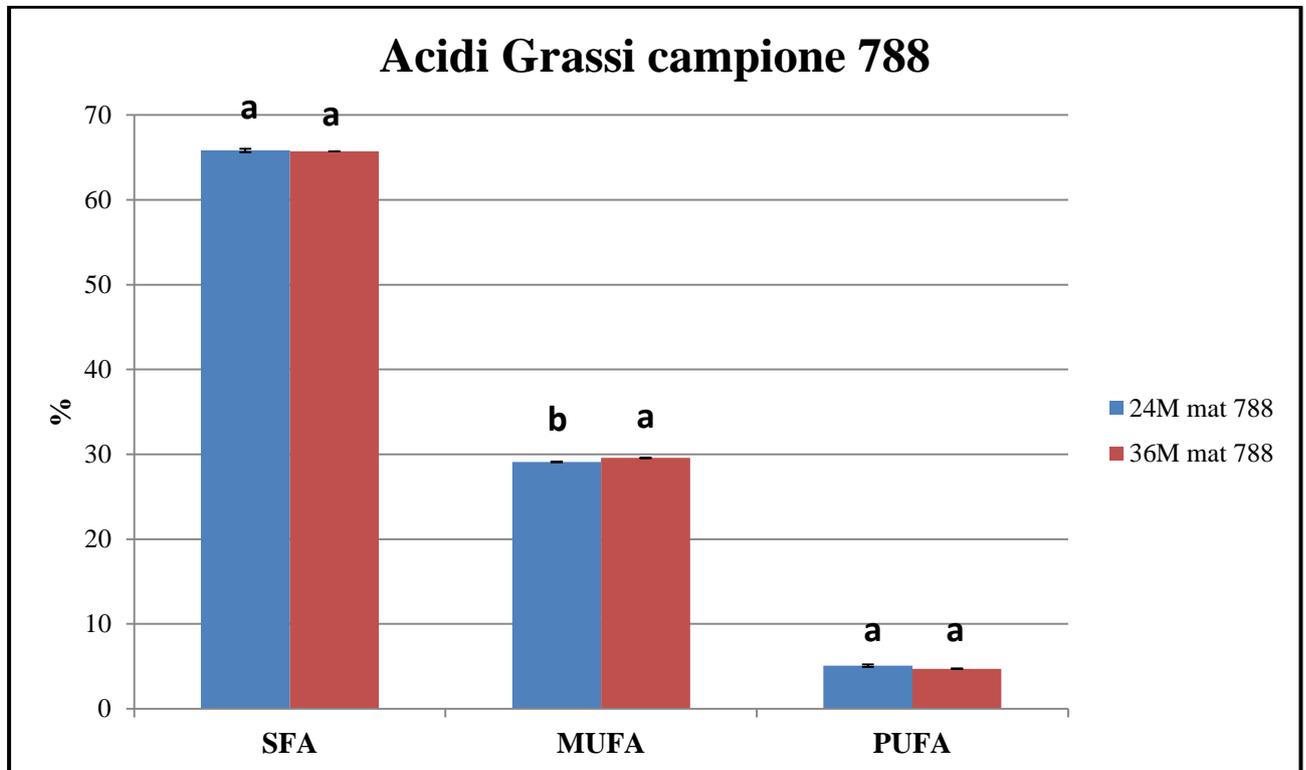


Grafico 4.3. Andamento della composizione in acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi del campione mat 788 nelle due diverse stagionature (24 e 36 mesi) espressi come % sul contenuto totale (mg/100mg FAME). Le lettere diverse denotano valori medi significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

Infine, nel campione mat 1567, si è registrato un aumento dei soli MUFA tra le classi di acidi grassi con l'aumento dell'epoca di stagionatura.

Essi hanno avuto un aumento significativo ($p \leq 0,05$) della loro percentuale da 30,01 a 30,16%.

Per quanto riguarda gli SFA e i PUFA hanno subito entrambi una diminuzione, significativa solo nel secondo caso ($p \leq 0,05$), con l'aumentare della maturazione da 24 a 36 mesi. Gli SFA sono passati da 64,60 a 64,58% mentre i PUFA da 5,39 a 5,26%.

Campione mat 1567		
	24M	36M
SFA	64,60 \pm 0,01 a	64,58 \pm 0,08 a
MUFA	30,01 \pm 0,02 b	30,16 \pm 0,04 a
PUFA	5,39 \pm 0,01 a	5,26 \pm 0,03 b

Tabella 4.5. Composizione in acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA) del campione 1567 nelle due diverse stagionatura (24 e 36 mesi) espressi come % sul contenuto totale (mg/100mg FAME).Le lettere diverse denotano valori medi significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

Nel grafico 4.4 è possibile vedere con maggiore chiarezza l'andamento del contenuto in acidi grassi del campione mat 1567.

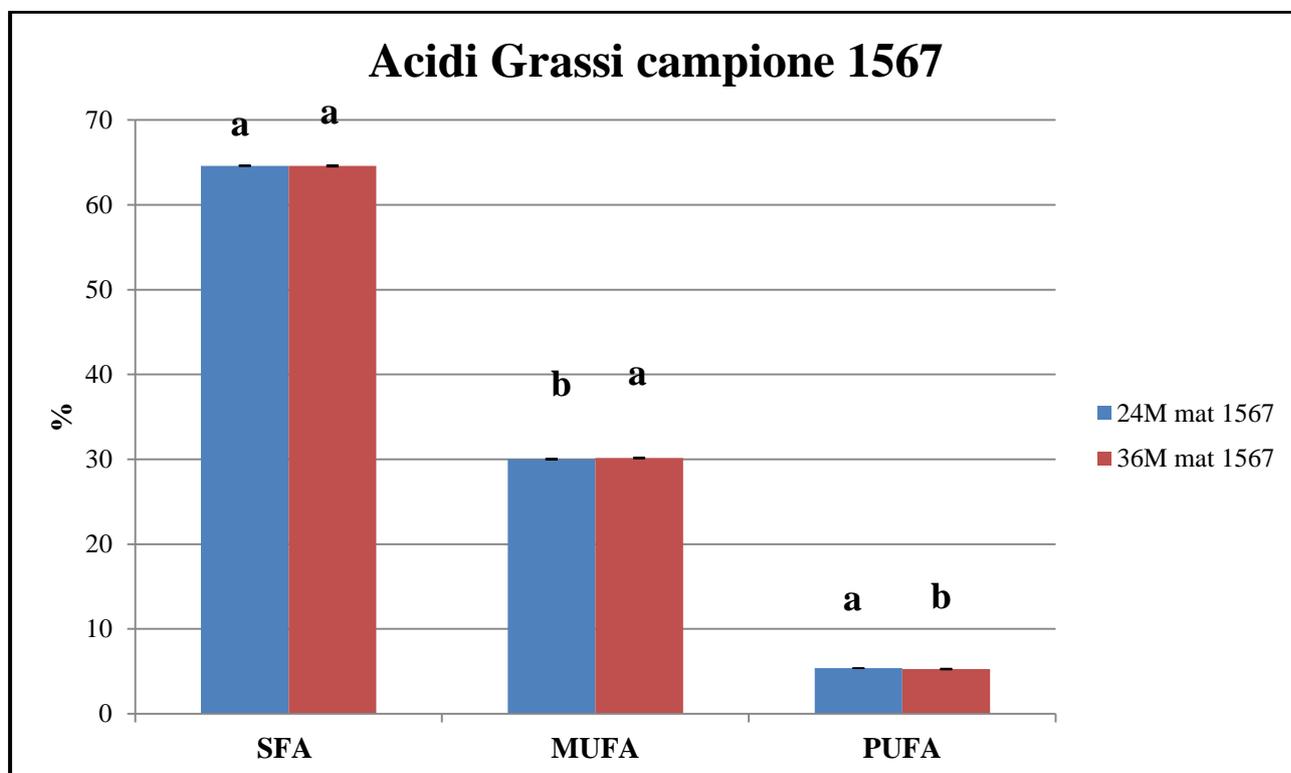


Grafico 4.4. Andamento della composizione in acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA) e polinsaturi (PUFA) del campione mat 1567 nelle due diverse stagionature (24 e 36 mesi) espressi come % sul contenuto totale (mg/100mg FAME). Le lettere diverse denotano valori medi significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

4.3. Determinazione del contenuto in colesterolo totale

Il colesterolo, è uno sterolo di origine animale e quindi rientra nella frazione lipidica insaponificabile. Lo si ritrova localizzato principalmente a livello della membrana del globulo ed è un componente fondamentale delle nostre membrane cellulari, influenzandone la fluidità (Boselli E. et al., 2009).

La quantità giornaliera necessaria corrisponde a 1-1,4 g e deriva quasi completamente dalla biosintesi effettuata dall'organismo stesso, la percentuale che deriva dall'apporto della dieta si aggira intorno al 10-20%. La quantità di colesterolo totale viene mantenuta costante variando l'equilibrio fra l'assorbimento intestinale della quota esogena introdotta con la dieta, la produzione endogena e l'eliminazione del colesterolo stesso. La biosintesi del colesterolo è inversamente proporzionale alla quantità introdotta con la dieta. (Ros E., 2000).

Nella seguente tabella (Tabella 4.6) sono riportati i contenuti in colesterolo all'interno dei campioni di PR, espresso in g su 100 g. I tre campioni che presentano la maggior quantità di colesterolo (36M mat 245, 36M mat 1567 e 24M mat 245) hanno valori molto simili tra loro; la quantità più elevata in valore assoluto è contenuta nei campioni stagionati 36 mesi dei caseifici con matricola 245 e 1567 con un valore di 0,27 g/100g. Il contenuto più basso in valore assoluto di colesterolo si riscontra invece nel campione di PR 24M mat 788, esso presenta un valore di 0,26 g/100 g. In generale, però, tutti i campioni non dimostrano differenze significative tra loro ($p \leq 0,05$)

Confrontando questi risultati con quelli di uno studio precedente di Manuelian C.L e collaboratori (2017) nei campioni da noi analizzati il contenuto in colesterolo è maggiore; infatti in questo studio il

colesterolo determinato in campioni di PR stagionati risultava essere 0,08 g/100 g di formaggio.

Campioni	Colesterolo g/100g
24M 245	0,27±0.04 a
36M 245	0,27±0.06 a
24M 788	0,26±0.01 a
36M 788	0,27±0.07 a
24M 1567	0,27±0.07 a
36M 1567	0,27±0.04 a

Tabella 4.6. Contenuto in colesterolo dei vari campioni di PR provenienti da tre diversi caseifici (mat 245, mat 788 e mat 1567) ed a differenti stagionature (24 e 36 mesi), espressi in g/100 g. Le lettere diverse denotano valori medi significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

Di seguito nel grafico 4.5 è possibile visualizzare con maggiore chiarezza il contenuto in colesterolo dei vari campioni.

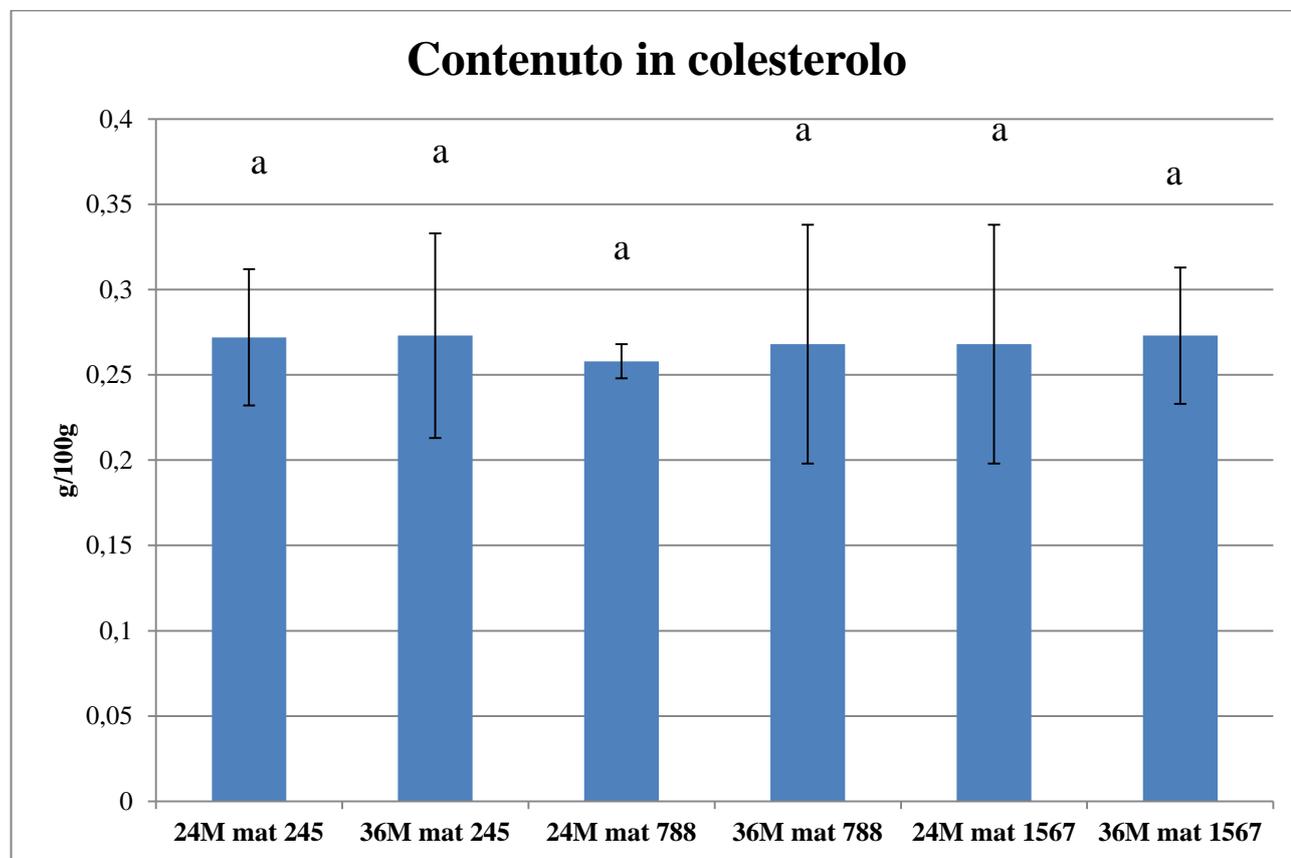


Figura 4.5. Andamento del contenuto in colesterolo nei vari campioni provenienti da tre caseifici diversi (mat 245, mat 788 e mat 1567) e a due differenti epoche di maturazione, 24 mesi e 36 mesi. Le lettere diverse denotano valori medi significativamente diversi ($p \leq 0,05$).

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

Questo studio ha lo scopo di valutare come cambia la composizione della frazione lipidica del Parmigiano Reggiano per quanto riguarda il contenuto in acidi grassi e colesterolo di diversi campioni di PR provenienti da tre diversi caseifici (mat 245, mat 788 e mat 1567) ed a due differenti stagionature, 24 e 36 mesi.

La percentuale di grasso estratto nei diversi campioni oscillava in un range da 29 a 32 %, senza mostrare alcuna differenza significativa ($p < 0,05$) all'interno di uno stesso campione con l'aumentare del tempo di maturazione.

Per quanto riguarda la composizione in acidi grassi è stato riscontrato che il predominante nei campioni di PR risulta essere l'acido palmitico (30-32%), seguito in percentuali minori ed in ordine decrescente dall'acido oleico, stearico e miristico.

Considerando invece i gruppi nei quali si raggruppano gli acidi grassi emerge come predominino i saturi (SFA) in tutti i campioni analizzati; a seguire si trovano i monoinsaturi (MUFA) ed infine i polinsaturi (PUFA). Comparando i risultati che emergono dai 6 campioni provenienti dai 3 diversi caseifici si può affermare che solo per i PUFA abbiamo una tendenza costante a diminuire con l'avanzare della maturazione. Nei campioni provenienti dai caseifici mat 245 e 788 non si sono riscontrate differenze significative per le due diverse epoche di maturazione (da 5,81 a 4,91 % e da 5,09 a 4,73 %, rispettivamente); una diminuzione significativa, invece, è stata rilevata nel campione proveniente dal caseificio mat 1567 (da 5,39 a 5,26 %).

Per SFA e MUFA invece con l'avanzare della stagionatura si hanno risultati discordanti tra i vari campioni.

Gli SFA diminuiscono passando da 24 a 36 mesi di maturazione nei campioni provenienti dai caseifici mat 788 e 1567 (da 65,81 a 65,70 % e da 64,60 a 64,58 %, rispettivamente) ma senza mostrare differenze significative ($p < 0,05$); mentre aumentano nel campione proveniente dal caseificio mat 245 con differenze significative (da 64,38 a 66,75 %).

I MUFA invece aumentano significativamente la loro percentuale nel tempo nei campioni provenienti dai caseifici mat 788 e 1567 (da 29,10 a 29,58 % e da 30,01 a 30,16 %, rispettivamente); mentre diminuiscono significativamente nel campione proveniente dal caseificio mat 245 (da 29,81 a 28,34 %).

Il colesterolo risulta in maggior quantità nei campioni stagionati a 36 mesi dai campioni provenienti dai caseifici mat 245 e 1567, entrambi con un valore di 0,27 g su 100g. In generale però non ci sono differenze significative nei valori di colesterolo tra i diversi campioni di PR ($p \leq 0,05$).

In conclusione, il tempo di maturazione non è in grado di influenzare la percentuale di grasso e il contenuto in colesterolo; mentre incide, anche se in piccola parte, sulla qualità di acidi grassi.

Bibliografia

Alais C., (2000) **Scienza del latte** *Tecniche nuove*

Berra B., Bellia G., Montorfano G., (2003) **Acidi grassi n-3, nutrienti, alimenti funzionali, farmaci.** *Progress In Nutrition*, 2, 149-159

Bickerstaffe R., Noakes D. E., Annison E. F., (1972) **Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption and transfer into milk fat in the lactating goat, with special reference to the cis- and trans-isomers of octadecenoate and linoleate.** *Biochemical Journal.*, 130, 607-617

Boselli E., Rodriguez-Estrada M. T., Fedrizzi G. and Caboni M.F., (2009) **Cholesterol photosensitized oxidation of beef meat under standard and modified atmosphere at retail conditions.** *Meat Science*, Vol 81, pag. 224-229

Bottazzi V., (1993) **Microbiologia e Biotecnologia lattiero-casearia.** *Bologna: Edagricole*

Chillard Y., Glasser F., Ferlay A., Bernard L., Rouel J., Doreau M., (2007) **Duet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat.** *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 828-855

Di Cagno R., Banks J., Sheehan L., Fox P., Brechany E. Y., Corsetti A., Gobbetti M., (2003) **Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses.** *International Dairy Journal*, 13, 961-972

Disciplinare di produzione del formaggio Parmigiano Reggiano
(www.parmigianoreggiano.it)

Evers J.M. (2004). **The milk fat globule membrane — compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell.** *International Dairy Journal*, 14, 661-674.

Frede E., Precht D., Timmen H., (1990) **Lipide.** In Schlimme E. (Ed.). *Kompendium zur milchwirtschaftlichen chemie.* 57-78

Guerra E., Gori A., Cevoli C., Losi G., Caboni M.F., (2014) **Lipid fraction of creams collected in the Parmigiano-Reggiano cheese production area in response to extruded linseed supplementation of dairy cows' diets: GC-FID and FT-MIR evaluation.** *International Journal of Dairy Technology, Society of Dairy Technology* 67, 510-520

Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione – INRAN (2008) **Il Parmigiano Reggiano: un prodotto naturalmente funzionale.** *Dossier*, 2-27.

Jensen R.G., (2002). **The composition of Bovine Milk Lipids: next term January 1995 to December 2000.** *Journal of Dairy Sci.*,85, 295-350.

Malacarne M., Summer A., Panari G., Pecorari M., Mariani P., (2006) **Caratterizzazione Chimico-Fisica della maturazione del Parmigiano-Reggiano.** *Scienza e tecnica lattiero casearia*, 57, 215-228

Manuelian C.L., Currò S., Penasa M., Cassandro M., De Marchi M., (2017) **Characterization of major and trace minerals, fatty acid composition, and cholesterol content of Protected Designation of Origin cheeses.** *American Dairy Science Association*, 100, 3384-3395

Mapiye C., Aldai N., Turner T.D., Aalhus J.L., Rolland D.C., Kramer J.K.G. and Dugan M.E.R., (2012) **The labile lipid fraction of meat: From perceived disease and waste to health and opportunity.** *Meat Science*, Vol 92, pag. 210-220

Mc Donald D. G., Milligan C. L., (1992) **2 Chemical Properties of the Blood.** *Fish Physiology*, volume 12, 55-133

Molketin J., (1999). **Bioactive lipids naturally occurring in bovine milk.** *Nahrung*, 43(3), 185-189

Mucchetti G., Neviani E., (2006) **Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza.** *Tecniche nuove*

Palmquist D.L., (2006) **Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon.** In Fox P.F., & McSweeney (Eds.). *Advanced Dairy Chemistry : Lipids*, Vol 2, 43-80

Pancaldi M., Mariotti I., Balli F., (2008) **Intestinal inflammation in nursing infants: different causes and a single treatment but of protected origin.** *Acta Biomedica*, 79

Parodi P. W., (1997) **Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents.** *Journal of Nutrition*, 127, 1055-1060

Ros E., (2000) **Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk.** *Atherosclerosis*, Vol. 151, 357-579

Salvadori Del Prato O., (2001) **Trattato di tecnologia casearia.** *Bologna : Edagricole*

Simopoulos A. P., (2002) **Overview of Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids.** *World Review of Nutrition and Dietetics*, 83, 1-11

Sweeley C.C., Bentley R., Makita M., Wells W.W., (1963) **Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances.** *Journal of the American Chemical Society*, Vol 85., 2497-2507

Tosi F., Sandri S., Tedeschi G., Malacarne M., Fossa E., (2008) **Variazioni di composizione e proprietà fisico-chimiche del parmigiano-reggiano durante la maturazione e in differenti zone della forma.** *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 59(6), 507-528

Verardo V., Gomez-Caravaca A.M., Gori A., Losi G., Caboni M.F., **Bioactive lipids in the butter production chain from Parmigiano Reggiano cheese area.** *Society of Chemical Industry*, 93, 3625-3633

Zock P. L., De Vries J. H., De Fouw N. J., Katan M. B., (1995) **Positional distribution of fatty acids in dietary triglycerides: effects on fasting blood lipoprotein concentrations in humans.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 61, 48-55

Sitografia

www.parmigianoreggiano.it

