

ALMA MATER STUDIORUM- UNIVERSITA' DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN TECNOLOGIE
ALIMENTARI

**Determinazione di acidi grassi liberi in campioni di
Parmigiano Reggiano a ridotto contenuto di sale**

Tesi in

Tecnologie alimentari

Relatore

Prof.ssa Maria Fiorenza Caboni

Presentata da

Ylenia Fedeli

Correlatore

Dott.ssa Silvia Marzocchi

Anno accademico 2018-2019

INDICE

CAPITOLO 1	1
PREMESSA E SCOPO	1
CAPITOLO 2	2
INTRODUZIONE	2
2.1 Parmigiano Reggiano: tecnologia di produzione	2
2.2 Importanza della qualità del latte	3
2.2.1 Gli acidi grassi nel latte vaccino	6
2.2.2 L'origine degli acidi grassi	9
2.2.3 Il legame tra l'alimentazione delle bovine ed il tenore in grasso	9
2.3 Influenza della stagionatura del formaggio sul prodotto finito	10
2.3.1 Processo di lipolisi nel corso della stagionatura del Parmigiano Reggiano	12
CAPITOLO 3	14
MATERIALI E METODI	14
3.1 Campioni	14
3.2 Estrazione del grasso mediante metodo Soxhlet	15
3.3 Determinazione degli acidi grassi liberi mediante estrazione su fase solida (SPE)	16
3.4 Caratterizzazione degli acidi grassi liberi mediante gascromatografia	16
CAPITOLO 4	18
RISULTATI E DISCUSSIONI	18
4.1 Contenuto in grasso	18
4.2 Determinazione di acidi grassi liberi	19
CONCLUSIONI	30
BIBLIOGRAFIA	32
SITOGRAFIA	36
RINGRAZIAMENTI	37

CAPITOLO 1

PREMESSA E SCOPO

Il **Parmigiano Reggiano** (PR) è un formaggio DOP semigrasso a pasta cotta il cui legame con il territorio è imprescindibile; è prodotto esclusivamente nelle province di Parma, Reggio Emilia, Modena e parte delle province di Mantova e Bologna, dove si concentrano i quattromila allevamenti in cui le bovine vengono alimentate con foraggi prodotti in quest'area in osservanza di un regolamento che impedisce l'uso di foraggi insilati e alimenti fermentati, senza impiego di additivi e conservanti. Si tratta di un formaggio a maturazione glicolitica, proteolitica e lipolitica: nella fase glicolitica il lattosio viene trasformato in acido lattico che a sua volta viene in parte metabolizzato e salificato. La fase proteolitica, che avviene per la presenza degli enzimi del caglio e degli endoenzimi dei batteri lattici che si liberano via via che le cellule muoiono e porta alla formazione di polipeptidi, peptidi e aminoacidi. La fase lipolitica determina invece la formazione di acidi grassi liberi per un valore del 4% del grasso totale. Ognuna di queste fasi riveste un ruolo essenziale nel determinare le caratteristiche del prodotto per quanto riguarda la struttura, il sapore e l'aroma, la conservabilità e la tipicità (www.consorzioparmigianoreggiano.com).

Questo lavoro di tesi si inserisce nel Progetto PARENT che punta a innovazioni di prodotto nella filiera del Parmigiano Reggiano attraverso la valorizzazione dei contenuti salutistici e nutrizionali del formaggio e del latte prodotto nel rispetto delle regole della DOP.

Lo scopo di questo lavoro di ricerca sul PR è stato quello di valutare l'attività lipolitica e quindi i cambiamenti nella composizione della frazione lipidica per quanto riguarda il contenuto in acidi grassi liberi di diverse forme di PR provenienti da quattro diversi caseifici in base ai giorni di salatura e dimensione della forma. L'analisi degli acidi grassi liberi è stata effettuata mediante l'utilizzo della gascromatografia accoppiata ad un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

CAPITOLO 2

INTRODUZIONE

2.1 Parmigiano Reggiano: tecnologia di produzione

Le origini del Parmigiano Reggiano (PR) risalgono al XII secolo, al Medioevo, presso i monasteri benedettini e cistercensi caratterizzati dalla localizzazione nei pressi di corsi d'acqua e ampi pascoli, dove il latte veniva lavorato in ampie caldaie, grazie alle quali si ottenne un formaggio a pasta dura. Ancora oggi il PR si ottiene con gli stessi ingredienti di nove secoli fa e con le medesime tecniche tanto che risulta una delle DOP più importanti a livello mondiale e tutelato dal regolamento (CE) n 510\200. E' un formaggio a pasta dura, cotta e a lenta maturazione, prodotto con latte vaccino, crudo, parzialmente scremato per affioramento naturale, proveniente da vacche la cui alimentazione è costituita prevalentemente da foraggi freschi e fieno della zona d'origine. Il latte non può essere sottoposto a trattamenti termici e non è consentito l'utilizzo di additivi e deve essere conforme ai regolamenti di produzione del PR (www.consorzioparmigianoreggiano.com).

Il latte della mungitura della sera consegnato in caseificio viene posto immediatamente in vasche di acciaio aperte profonde solo pochi centimetri (Mucchetti et al., 2006) e viene parzialmente scremato per affioramento naturale del grasso. Il latte della mungitura del mattino, dopo la consegna in caseificio, viene miscelato a quello della sera precedente e trasferito in caldaia per la caseificazione. Il latte deve essere consegnato integro al caseificio entro due ore dalla fine di ciascuna delle mungiture e non può essere sottoposto ad un trattamento di centrifugazione ma può essere solamente raffreddato subito dopo la mungitura e conservato ad una temperatura che non sia inferiore ai 18°C (Bottazzi , 1993).

Al latte viene poi aggiunto il siero innesto, una coltura naturale di fermenti lattici ottenuta dall'acidificazione spontanea del siero residuo della lavorazione del giorno prima (Bottazzi, 1993), avente un'acidità un pH di circa 3,3 (http://www.crpa.it/media/documents/crpa_www/Pubblicazi/Opuscoli-C/Archivio_2010/CRPA_4_2010.pdf).

La coagulazione del latte viene ottenuta esclusivamente con l'uso di caglio di vitello nelle caldaie di rame a forma di campana rovesciata per ottenere fino a due forme per ciascuna caldaia.

Le fasi seguenti alla coagulazione sono la rottura della cagliata e la cottura; si lasciano quindi sedimentare i granuli sul fondo della caldaia in modo da ottenere una massa compatta, dopo di che la massa caseosa è trasferita negli appositi stampi per la formatura, secondo quanto indicato dal disciplinare (www.gazzettaufficiale.it).

Dopo qualche giorno si procede alla salatura per immersione in soluzione salina mentre per quanto riguarda la fase finale di maturazione deve avere una durata di almeno 12 mesi, a partire dalla formatura del formaggio (Bottazzi, 1993).

2.2 Importanza della qualità del latte

Il latte è l'alimento più ricco e completo dal punto di vista nutrizionale; contiene una serie di costituenti principali tra cui acqua (circa l'87%), zuccheri, grassi, proteine sali minerali, ed altri componenti minori la cui concentrazione si può ricondurre ad una serie di fattori come il patrimonio genetico delle bovine, la fase di lattazione, l'ambiente, le tecniche di allevamento e il tipo di alimentazione somministrata (Corradini, 1995).

La qualità del latte, che influenza il processo di caseificazione, è data da un insieme di parametri:

- caratteristiche chimiche
- parametri igienico-sanitari
- requisiti tecnologico-caseari

Le caratteristiche chimiche. Il grasso del latte dal punto di vista nutrizionale ha un elevato potere energetico ed è un parametro fortemente condizionato da fattori sia genetici che ambientali (Alais, 2000). I lipidi si trovano nel latte sottoforma di globuli la cui dimensione varia da 0,1 a 10 μm con prevalenza di globuli di dimensioni inferiori a 3 μm , tenuti in emulsione da materiale interfacciale dello spessore di 10 nm denominato membrana (Lopez et al., 2007).

Come accennato il globulo di grasso presenta all'esterno una membrana, particolarmente complessa composta da una serie di sostanze tra cui proteine, fosfolipidi e colesterolo, e che permette al globulo di restare allo stato di emulsione; invece la parte intermedia sottostante la membrana è costituita da lipidi ad alto punto di fusione mentre, per ultimo, la parte interna da lipidi a basso punto di fusione (Corradini, 1995).

E' possibile distinguere categorie diverse di lipidi all'interno del latte: i gliceridi che rappresentano la parte preponderante, circa il 98% del grasso totale, i fosfolipidi che si trovano in minima concentrazione (circa l'1%) e la frazione insaponificabile tra cui è possibile trovare anche vitamine, presenti in percentuale minore dell'1% (Alais, 2000). La composizione dei trigliceridi del grasso del latte appare particolarmente complessa, basti pensare infatti agli acidi grassi che li compongono e

che risultano essere oltre 400 (Jensen, 2000, Alais, 2000). Accanto a questa categoria, troviamo anche i mono- e digliceridi, presenti però in scarse proporzioni nel grasso del latte, rispettivamente rappresentano l'1,5% e lo 0,25% dei lipidi totali (Alais, 2000).

La determinazione dei lipidi del latte risulta particolarmente importante ai fini della caseificazione: la percentuale di grasso nel latte risulta limitata, tra 3,5-3,7%; mentre nel formaggio questa percentuale sale fino a raggiungere una percentuale del 25% (Alais, 2000) e durante il processo di caseificazione, viene quasi interamente inglobato nella rete della cagliata, ed influenza quindi positivamente la resa in formaggio.

Sostanze azotate. Circa il 95% dell'azoto del latte si trova sotto forma di proteine mentre il 5 % risulta composto da sostanze azotate non proteiche (principalmente urea, circa 55%). Il valore di proteina grezza (frazione azotata di origine proteica e non proteica) risulta di circa 3,2 g/100g di latte (Alais, 2000). Quando il livello di NPN (azoto non proteico) supera la soglia di 1,5 g/L, si va incontro a problemi di caseificazione, ciò induce una modifica sul tempo di presa della cagliata e sulla resa, determinando una cagliata molle e un siero lattiginoso e pregiudica quindi la resistenza delle fibre del reticolo caseinico e di conseguenza la riuscita qualitativa dei formaggi a grande pezzatura (Salvadori Del Prato, 2001).

Le sostanze proteiche vengono suddivise in due grandi gruppi, le caseine che rappresentano circa l'80% del totale e le proteine solubili, costituite da β -lattoglobuline, α -lattoalbumine, siero albumine e immunoglobuline. Dal punto di vista qualitativo le proteine solubili hanno importanza per l'elevato potere biologico mentre le caseine sono fondamentali per le proprietà casearie del latte, in particolare per il rendimento in formaggio (Stefanon et al., 2002).

Un fattore che influenza enormemente il processo di caseificazione è il rapporto tra grasso e proteine del latte che un tempo si attestava intorno a 1.10 ca., oggi invece tende ad aumentare.

Uno scarso contenuto di proteine nel latte influenza, oltre alle rese, anche la cinetica di sineresi. (Salvadori Del Prato, 2001).

Lattosio. Con una percentuale del 4,9% (Alais, 2000) rappresenta lo zucchero principale del latte. Viene sintetizzato all'interno delle cellule dell'epitelio alveolare mammario, a partire dal glucosio dove una molecola di glucosio viene prima isomerizzata a galattosio e poi legata ad un residuo di glucosio. La sintesi del lattosio avviene ad opera dell'enzima galattosiltransferasi con l'ausilio dell' α -lattoalbumina, glicoproteina normalmente presente nel siero di latte (siero-proteina) in grandi quantità. Gli ormoni associati al parto, come la prolattina e i glucocorticoidi, stimolano la trascrizione dei geni che codificano l' α -lattoalbumina che a sua volta interagisce con la galattosiltransferasi per la sintesi del lattosio (www.ruminantia.it).

Le caratteristiche igienico-sanitarie esprimono il concetto di salubrità del latte.

La presenza di cellule somatiche sono un indicatore dello stato sanitario della mammella, quindi di conseguenza anche dell'igiene e della salubrità del latte secreto. La conta delle cellule somatiche serve quindi a misurare il grado di sofferenza della mammella, dovuta a maltrattamenti, infiammazioni, mastiti sub-cliniche o manifeste (Bailoni et al., 2005) quindi può essere considerato un indice dello stato sanitario degli animali e delle condizioni igienico-sanitarie dell'allevamento (Coulon, 1997). Il 95% degli animali sani presenta un numero di cellule somatiche al di sotto delle 100.000 unità/ml (www.mastitalia.org). L'importanza di valutare costantemente tale parametro deriva dal fatto che un'infezione può avere conseguenze sulla qualità microbiologica e sulla composizione chimica del latte, con un impatto tecnologico non indifferente, in particolar modo quando l'obiettivo principale è la trasformazione casearia. Il latte prodotto da bovine affette da mastiti presenta infatti delle alterazioni nella composizione proteica e salina: causa una riduzione della percentuale di caseina e del tasso di proteine solubili e, per contro, un aumento di sieralbumine e immunoglobuline. Inoltre il livello di sodio ed il pH tendono ad aumentare (il pH fino a 7,0-7,2) mentre contemporaneamente il calcio diminuisce. Questo determina un aumento dell'attività proteolitica fino a 10 volte superiore a quella del latte normale.

Anche la carica batterica è indice di qualità del latte. La presenza di germi vivi nel prodotto sono conseguenti ad una contaminazione microbica ed un latte di ottima qualità dovrebbe presentare un contenuto di germi mesofili inferiore a 100.000 unità formanti colonie (u.f.c.) per mL (www.ruminantia.it). Un valore troppo elevato è indice di igiene non ottimale.

I requisiti tecnologico-caseari dipendono strettamente dalla qualità del latte utilizzato per la produzione di un formaggio. A seconda del tipo di trasformazione possono far riferimento alle condizioni per la formazione della cagliata, al grado di acidificazione della massa caseosa sottosiero e ai tempi di stagionatura. (Colin et al., 1992- Martin et Coulon, 1995).

Quindi riassumendo un latte di qualità, idoneo alla trasformazione casearia, deve avere un contenuto di caseina elevato, un bilanciato rapporto grasso/proteine, deve essere povero di NPN e possedere un pH non alterato; deve prevedere poi un moderato contenuto di cellule somatiche e un'ottimale attitudine alla coagulazione, ovvero una buona reattività con il caglio ed una elevata capacità di rassodamento della cagliata, derivato dal fatto che vi sia una efficiente eliminazione del siero (Mariani et al. 1997).

Da ciò si otterrà una massa caseosa che sia omogenea e disidratata in maniera uniforme in tutte le sue parti, in modo tale che si possano avviare in maniera adeguata i processi fermentativi e di maturazione del Parmigiano Reggiano (Battistotti e Corradini, 1993).

2.2.1 Gli acidi grassi nel latte vaccino

Il grasso del latte è composto quasi per il 97% da trigliceridi, e da piccole percentuali di fosfolipidi (0,2-1%), digliceridi (0,28-0,59%) e monogliceridi (0.02-0.04%) (Formigoni et al., 2010, Guerra et al., 2015).

Nel latte bovino sono stati identificati oltre 400 acidi grassi che compongono i trigliceridi (Jensen, 2002), i quali vengono distinti sulla base di due caratteristiche principali: il numero di atomi di carbonio che vanno a comporre la catena carboniosa e la presenza o meno di insaturazioni. Infatti è possibile distinguere acidi grassi a corta catena (da 4 a 12 atomi di carbonio), media (da 14 a 16 atomi) o lunga catena (oltre ai 18 atomi di carbonio). Vengono poi definiti acidi grassi saturi (SFA) quelli che non presentano un doppio legame, monoinsaturi (MUFA) quelli che invece contano la presenza di un solo doppio legame o polinsaturi (PUFA) con più di un doppio legame.

Nel latte vaccino la composizione in acidi grassi dei trigliceridi vede la prevalenza di quelli a corta catena e saturi (Figura 1) ed è carente in acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi (Buccioni, 2002).

I più rappresentati sono l'acido palmitico (C16:0, 25-30% del totale), l'acido stearico (C18:0, 10-12%) e l'acido miristico (C14:0, 11% circa), i quali conferiscono una elevata digeribilità del latte. (Palmquist, 2006).

Agli acidi grassi a corta catena vengono riconosciuti effetti significativi nella riduzione del livello di colesterolo nel siero e nel fegato (Frede et al., 1990); mentre gli acidi grassi a media catena sono responsabili dell'incremento del livello del colesterolo totale a livello del plasma e in maniera particolare il colesterolo di tipo LDL (low density lipoprotein, chiamato anche comunemente come "colesterolo cattivo") che risulta essere il principale fattore di rischio per aterosclerosi (Parodi, 1997).

Fonte: USDA National Nutrient Database for Standard Reference		
Nutrienti	Quantità % sul tal quale	Provenienza
Acqua	88.000	
Proteina	3.280	
Carboidrati	4.650	
Lipidi totali	3.660	
Acidi Grassi Saturi SFA	2.278	
C4:0 Acido butirrico	0.119	Sintesi <i>ex-novo</i> a partire da butirrato, acetato e propionato. Ideale per Frisona: > 0.85%
C6:0 Acido caproico	0.070	
C8:0 Acidi Caprilico	0.041	
C10:0 Acido Caprico	0.092	
C12:0 Acido laurico	0.103	
C14:0 Acido Miristico	0.368	
C16:0 Acido palmitico	0.963	Può derivare dalla dieta o essere sintetizzato dalla mammella a partire dall'acetato
C18:0 Acido Stearico	0.444	
Acidi Grassi monoinsaturi MUFA	1.057	Deriva dalla dieta e dal tessuto adiposo
C16:1 Acido palmitoleico	0.082	
C18:1 Acido vaccenico	0.921	
Acidi Grassi Polinsaturi PUFA	0.136	
C18:2 Acido linoleico	0.083	
C18:3 Acido Linolenico	0.053	

Figura 1. Composizione media di alcuni acidi grassi nel latte bovino (Fonte USDA).

Nella frazione lipidica troviamo poi acidi grassi monoinsaturi (MUFA), tra cui in maniera preponderante l'acido oleico (*cis*-9-C18:1, più del 20%), al quale è riconosciuto un calo del livello di colesterolo LDL; inoltre possiede anche attività antiaterogeniche (Molketin, 1999).

Nel latte vi sono inoltre acidi grassi coniugati dell'acido linoleico (CLA), ovvero una serie di isomeri posizionali e geometrici a 18 atomi di carbonio con due doppi legami coniugati, alla quale si riconosce una comprovata attività anticancerogena e antiaterogena (Formigoni et al., 2010, Guerra et al. 2015). L'isomero più importante è sicuramente il *cis*-9,*trans*-11 (acido rumenico). La dieta somministrata ai ruminanti è in grado di variare in modo rilevante il contenuto di CLA, difatti l'utilizzo di foraggi verdi rappresenta una fonte specifica di sostanza grasse e in particolare di acidi grassi insaturi tra cui predomina l'acido α -linolenico (che rappresenta il 60% degli acidi grassi) ma anche acido linoleico e acido oleico. Questi acidi grassi poi subiscono un processo di bioidrogenazione, ovvero una riduzione dei doppi legami presenti sulla catena carboniosa degli acidi grassi, operata dai batteri cellulosolitici del rumine (Lercker & Cocchi, 2010).

I batteri che operano questa riduzione possono essere distinti in due gruppi, andando ad operare in due step principali (Figura 2): in un primo step il gruppo A va a formare l'intermedio del processo che è l'acido vaccenico (VA) a partire da acido linoleico e acido linolenico, il quale poi verrà ridotto in un secondo step da un gruppo B di batteri ad acido stearico (Harfoot & Hazlewood, 1988).

Come già sottolineato da Parodi (1977), l'acido rumenico (isomero *cis9,trans11*) è naturalmente presente nel latte e la sua presenza è correlata all'acido vaccenico (C18:1, *trans 11*), suo precursore grazie ad una reazione di desaturazione che avviene nella mammella ad opera dell'enzima steaoril-CoA desaturasi (SDC) (Secchiari et al., 2007).

Il tenore di CLA nel latte è compreso tra i 2 e i 50 mg/g di lipidi, e come abbiamo potuto osservare, dipende dall'apporto di acidi grassi polinsaturi presenti nella dieta (Formigoni et al., 2010).

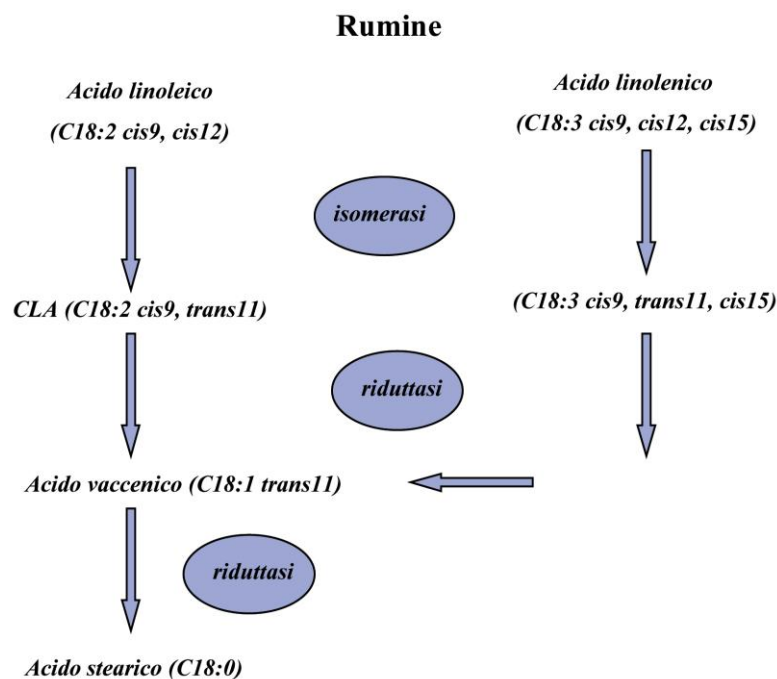


Figura 2. Processo di bioidrogenazione ruminale a carico degli acidi grassi polinsaturi presenti nella dieta (Harfoot & Hazlewood, 1988).

I PUFA presenti nel latte derivano esclusivamente dai grassi presenti negli alimenti (Mc Donald, 1992), e comprendono l'acido α -linolenico (C18:3, *n-3*) e l'acido linoleico (C18:2, *n-6*) con percentuali rispettivamente dello 0,5 e 0,7%.

A questa categoria appartengono due classi di acidi grassi essenziali (EFA), gli omega-3 e omega-6, che non possono essere sintetizzati dall'organismo umano ma, al contrario, devono essere introdotti con la dieta.

Gli omega-3 portano delle modifiche sul metabolismo delle lipoproteine con conseguente riduzione dei trigliceridi totali (circa 30% in meno), la riduzione della formazione dei trombi, la regressione del processo arteriosclerotico e la modulazione della risposta sia infiammatoria che immune (Berra et al., 2003).

Per quanto riguarda gli omega-6, va evidenziata l'importanza dell'acido arachidonico, che è precursore di prostaglandine, trombossani e leucotrieni.

2.2.2 L'origine degli acidi grassi

L'origine di questi acidi grassi è dovuta a due vie differenti. Il 60% degli acidi grassi deriva dal circolo ematico mentre la restante parte è prodotta nelle cellule mammarie a partire dall'acetato e dal β -idrossibutirrato (Bauman & Griinari, 2003), che a loro volta derivano dalla fermentazione della cellulosa, delle emicellulose e degli zuccheri ingeriti con la razione alimentare. La mammella sintetizza gli acidi grassi con numero uguale o inferiore a 14 atomi di carbonio e il 50% dell'acido palmitico (Formigoni et al., 2010).

Questo processo conta la presenza di due enzimi ovvero l'Acetil CoA carbossilasi (ACC) e l'acido grasso sintasi (FAS) (Chilliard et al., 2000).

Gli acidi grassi che hanno invece una catena con più di 16 atomi di carbonio, quindi acidi grassi a lunga catena e acidi grassi insaturi, derivano direttamente dal circolo ematico dove giungono per assorbimento intestinale degli acidi grassi alimentari (circa il 40%) e da quelli liberati dalle riserve adipose (un 10% variabile in funzione del bilancio energetico dell'animale, del suo stadio fisiologico e dell'entità delle sue riserve adipose). Per esempio è utile valutare quest'ultimi nelle prime fasi della lattazione quando le bovine assumono alimenti in quantità inadeguate e ricorrono alle riserve per colmare i deficit di energia (Formigoni et al., 2010).

Gli acidi grassi disponibili all'assorbimento intestinale derivano anche dalla digestione dei batteri ruminali che sono in grado di sintetizzare ex novo gli acidi grassi ed hanno un ruolo di fondamentale importanza nel processo di idrogenazione degli acidi grassi insaturi introdotti con la dieta. Questo processo di bio-idrogenazione ruminale può portare alla modificazione del 90% circa degli acidi grassi insaturi ingeriti con la dieta (Bickerstaffe et al., 1972) e porta alla prevalenza di acidi grassi saturi rispetto agli acidi grassi mono- e poli-insaturi (Chilliard et al., 2007).

2.2.3 Il legame tra l'alimentazione delle bovine ed il tenore in grasso

L'alimentazione che viene somministrata alle bovine è un parametro essenziale per l'ottenimento di un latte di qualità, con un determinato tenore in grasso, nonché di un prodotto così importante come il Parmigiano Reggiano. Secondo il disciplinare di produzione i foraggi devono rappresentare il 50% delle razioni, le quali devono essere di qualità perché influiscono sulle caratteristiche giornaliere e sulla risposta produttiva delle bovine (Formigoni et al., 2010; Guerra et al. 2015).

Inoltre i foraggi utilizzati vanno a marcare la tipicità di questo prodotto (Bertoni et al., 2001), data dal fatto che il disciplinare di produzione esclude l'impiego di insilati che consente anche di limitare una possibile contaminazione ambientale da spore e di esaltare, per contro, la presenza di tutti quei batteri utili alla caseificazione e maturazione del formaggio.

La sintesi del grasso del latte è correlato al controllo delle fermentazioni che avvengono nel rumine e dall'apporto di acidi grassi nella razione (Formigoni et al., 2010).

Le popolazioni batteriche del rumine operano una degradazione dei glucidi e delle proteine con produzione di acetato e butirrato, i quali vengono poi utilizzati dalla mammella per la sintesi di acidi grassi a corta e media catena presenti nel latte. La sintesi di acetato deriva principalmente quando sono fermentate le fibre, come cellulose ed emicellulose, presenti nei foraggi; mentre il butirrato deriva dalla fermentazione delle pectine e degli zuccheri (Formigoni et al., 2010).

Se si vuole garantire una degradazione della fibra efficace, bisogna assicurare condizioni ottimali per i batteri cellulolitici: disponibilità di ammoniaca e pH superiore a 6.2.

Fornire un apporto di fibra "fisicamente efficace" che vada a stimolare la masticazione e l'attività del rumine durante la ruminazione porta ad ottenere valori di pH superiori (Mertens, 1997); infatti l'utilizzo di foraggi di maggiore granulometria e di fibra lentamente digeribile porta alla secrezione di una maggiore quantità di saliva ricca di bicarbonato, fosfato ed urea (Heinrichs et al., 1996), perciò rappresenta una sostanza tampone che è in grado di controllare le fluttuazione del pH (Formigoni et al., 2010).

Quindi da ciò si può affermare che si ha una relazione positiva tra apporto di fibra, induzione alla masticazione e sintesi del grasso del latte.

2.3 Influenza della stagionatura del formaggio sul prodotto finito

La fase di stagionatura è essenziale per garantire al formaggio quei caratteri peculiari e di pregio che gli appartengono; la durata, per il PR, deve essere minimo di 12 mesi e normalmente si protrae fino ai 24 mesi (Malacarne et al., 2006); questo influenza enormemente le caratteristiche di composizione e le proprietà fisico-chimiche del prodotto, anche in funzione della diversa zona della forma (Tosi et al., 2008).

L'umidità diminuisce per evaporazione man mano che il processo di stagionatura procede; questo calo è più repentino nelle fasi iniziali del processo mentre in seguito la perdita di acqua risulta meno rilevante (Tosi et al., 2008). Prendendo in considerazione le varie zone della forma, al centro risulta sempre più umida rispetto al resto e questa differenza si mantiene costante durante tutta la stagionatura (Panari et al., 2003).

Altro parametro che va a variare durante il processo è il pH; come da Figura 3 è possibile notare l'andamento del pH al centro e in quattro zone periferiche della forma tra le 72 ore e i 7 mesi. Risulta un aumento del pH fino ai 6 mesi di stagionatura fino a raggiungere un valore di 5,4 circa, poi inizierà a diminuire col proseguire della maturazione. I valori medi di pH risultano superiori al centro rispetto alle zone esterne e questa diversità rimane pressoché costante per tutto il tempo di maturazione (Tosi et al., 2008).

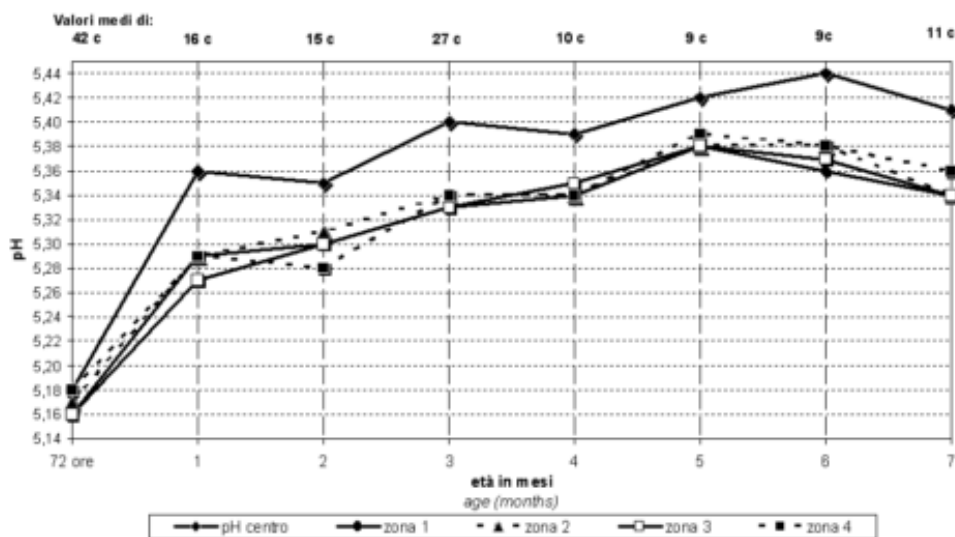


Figura 3. Andamento del pH in funzione dei mesi di stagionatura nel Parmigiano Reggiano (Tosi et al., 2008).

L'aumento di pH secondo Zapparoli & Dugoni (1997) è dovuto alla alcalinizzazione della pasta in seguito a proteolisi, la quale porta alla produzione di ammoniaca mentre il decremento è associabile ad un incremento di acidi grassi liberi che si protrae fino al 55° mese di stagionatura (Malacarne et al., 2006).

La proteolisi infatti rappresenta uno dei processi più importanti nella maturazione dei formaggi e contribuisce alle caratteristiche organolettiche. Legata a fenomeni di natura enzimatica (enzimi naturali, proteasi batteriche) consiste in una prima degradazione delle singole caseine in peptidi ad elevato peso molecolare (Alais, 2000) ad opera di endopeptidasi, che a loro volta vengono degradate da esopeptidasi in peptidi a medio e basso peso molecolare (peptoni e peptidi), compresi gli aminoacidi terminali che si liberano con il procedere delle attività proteolitiche (Addeo et al., 1988). Aminoacidi e peptidi sono i fattori principali che concorrono alle caratteristiche organolettiche, nutrizionali e biologiche - funzionali del formaggio e rappresentano i 4/5 di tutto l'azoto solubile (Malacarne et al., 2006).

E' utile valutare la percentuale di caseina che viene solubilizzata ad opera di enzimi proteolitici: dal 5% della caseina all'estrazione del formaggio dalla caldaia, si passa poi ad un valore del 33% circa nel formaggio di 24 mesi (Malacarne et al., 2006), rimanendo pressoché invariato man mano che si procede con la stagionatura. Questo quindi indica che la proteolisi del Parmigiano Reggiano si completa nei primi due anni del processo (Malacarne et al., 2006).

2.3.1 Processo di lipolisi nel corso della stagionatura del Parmigiano Reggiano

Oltre alla proteolisi nel Parmigiano Reggiano avviene un'altra reazione di tipo enzimatico: la lipolisi.

La lipolisi consiste nella scissione idrolitica dei trigliceridi con liberazione di acidi grassi che sono di per sé componenti importanti del gusto e dell'aroma, ma rappresentano anche dei precursori di altre sostanze (alcoli, aldeidi, metilchetoni, δ -lattoni, acidi) che concorrono alla definizione organolettica del formaggio (Corradini, 1995).

L'evoluzione del grasso durante la maturazione è influenzata dal grado di dispersione del grasso nella pasta e dai trattamenti tecnologici subiti dal latte, oltre naturalmente, dal livello di enzimi lipolitici presenti o aggiunti in lavorazione (Salvadori del Prato, 1998)

Gli agenti responsabili sono le lipasi (glicerol-estere-idrolasi). In aggiunta a quella del latte, che risulta poco attiva a valori di pH inferiori a 6,5 e che viene denaturata facilmente con trattamenti di pastorizzazione blandi (sopra ai 60 °C), sono molto più attive le lipasi prodotte da microrganismi, principalmente derivanti da muffe e micrococchi, le quali al contrario risultano essere più resistenti al calore; risultano infatti ancora attive nel latte pastorizzato a 76 °C (Alais, 2000).

L'azione lipolitica varia di intensità in rapporto a diversi fattori, quali concentrazione dell'enzima, pH, temperatura, attività dell'acqua, contenuto di sale, anche se quest'ultimo non dovrebbe inibire la lipolisi in maniera significativa (Malacarne et al., 2006).

La lipolisi è influenzata inoltre dalla durata di maturazione del formaggio, dalle modalità di conservazione e da tutte le operazioni che interferiscono con i processi di maturazione (Collins et al., 2003). Infatti anche la temperatura e il periodo di immagazzinamento sono essenziali a garantire il processo lipolitico e un aumento della temperatura determina un'accelerazione della maturazione del formaggio e quindi di conseguenza anche della lipolisi (Jin & Park, 1995).

Quindi durante la maturazione del Parmigiano Reggiano, gli enzimi lipolitici, in particolare le lipasi di origine batterica (Caboni et al., 1988), liberano quantità più o meno importanti di acidi grassi, dalla cui degradazione ossidativa si possono formare composti carbonilici a basso peso molecolare (Figura 4) dotati anche di una certa valenza aromatica (Caserio et al., 1972), specialmente se provenienti da acidi grassi insaturi (Malacarne et al., 2006).

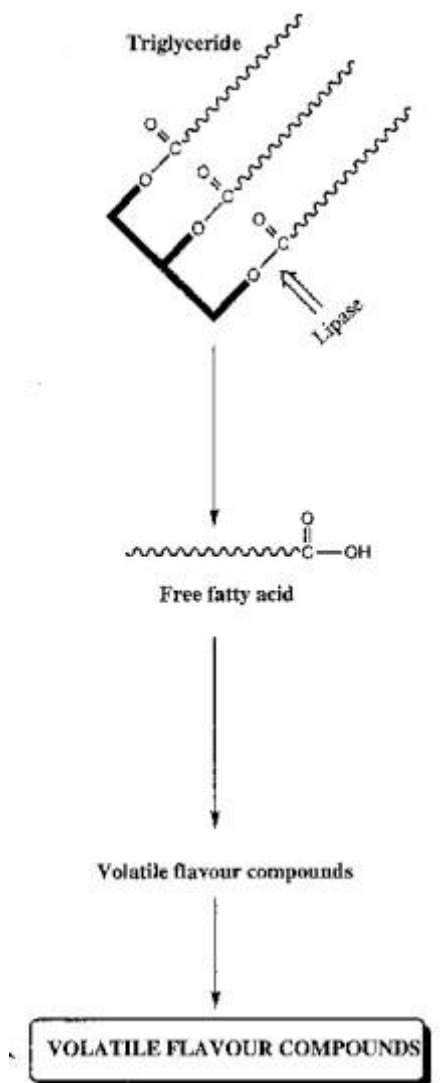


Figura 4. Meccanismo di lipolisi durante l'affinamento del Parmigiano Reggiano (McSweeney & Sousa, 2000)

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Campioni

La composizione in acidi grassi liberi è stata determinata su campioni di Parmigiano Reggiano, a ridotto contenuto di sale, e provenienti da 4 diversi caseifici situati nelle province di Reggio Emilia, Modena e Parma (Tabella 1).

Tabella 1. Campioni di Parmigiano Reggiano provenienti da 4 diversi caseifici.

CASEIFICIO	CAMPIONE	GIORNI	PESO DELLA FORMA (Kg)	% NaCl
Castellazzo	ECMB624	12	47,5	1,02
Castellazzo	ECMB628	18	47,9	1,36
Castellazzo	ECMB677	21	50,5	1,04
Castellazzo	ECMB679	21	42,3	1,14
Frignano	EDFE991	12	44,8	1,03
Frignano	EDFE994	18	44,2	1,24
Frignano	EDFF009	12	48,4	1,05
Frignano	EDFF011	18	47,6	1,28
Frignano	EDFF012	12	46,2	1,04
Frignano	EDFF017	18	46,4	1,17
San Martino	EDTR673	12	42,2	1,28
San Martino	EDTR692	18	45,4	1,59
San Martino	EDTR674	12	43,0	1,22
San Martino	EDTR695	18	45,2	1,52
Sant'Angelo	PFPD858	12	48,9	1,03
Sant'Angelo	PFPD863	18	49,1	1,35
Sant'Angelo	PFPD866	12	46,1	1,07
Sant'Angelo	PFPD871	18	45,4	1,44
Sant'Angelo	PFPD897	12	48,4	1,08

Sant'Angelo	PFPD901	18	49,3	1,22
Sant'Angelo	PFPD905	12	46,6	1,03
Sant'Angelo	PFPD909	18	46,7	1,29
Sant'Angelo	PFPD923	12	45,3	1,04
Sant'Angelo	PFPD927	18	45,2	1,27
Sant'Angelo	PFPD980	18	40,3	1,19
Sant'Angelo	PFPD982	18	46,9	1,10
Sant'Angelo	PFPD985	18	52,1	1,06

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 utilizzati

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 mL, 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, fino al momento dell'analisi.

3.3 Determinazione degli acidi grassi liberi mediante estrazione su fase solida (SPE)

Solventi e reagenti

Acido tridecanoico, cloroformio, isopropanolo, sodio solfato, *n*-esano, acido acetico ed etere dietilico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), soluzione eterea di diazometano (Fieser & Fieser).

Vetreria utilizzata

Provetta troncoconica, vial con riduttore.

Strumenti utilizzati

Colonnine SPE (strata NH₂, 3mL/500mg, Phenomenex Torrance, CA, USA), apparato per SPE (IST, Mid Glamorgan, UK), rotavapor, centrifuga Hettich (Tuttlingen, Germania).

Procedimento

Il metodo di estrazione su fase solida (SPE) descritto da Bonoli et al. (2007) è una tecnica di estrazione che utilizza l'affinità di una sostanza solida (fase solida), generalmente impaccata in colonnine, per una o più sostanze presenti in una matrice. Il campione viene fatto passare attraverso una fase solida, quindi, dopo il lavaggio della colonnina, viene eluito per mezzo di un solvente appropriato (fase mobile).

A 20 mg di grasso estratto sono stati addizionati 50 µL di standard interno (C13:0, 2mg/mL), dopo aver portato a secco il solvente è stato ripreso con 1 mL di cloroformio:isopropanolo 2:1.

Dopo aver condizionato le colonnine con 3 mL di esano, il campione è stato aggiunto e lavato con 6 mL di una soluzione cloroformio:isopropanolo 2:1 (v/v) ed eluito con 10 mL di una soluzione al 2% di acido acetico in etere dietilico. L'eluato è stato portato a secco in rotavapor e ripreso in 3 mL di etere. Una volta fatto evaporare il solvente sotto flusso d'azoto, lavorando sotto cappa e con precauzione, sono stati aggiunti 200 µL di diazometano al fine di metilare tutti gli acidi grassi presenti nel campione, evaporato e ripreso il campione con 200 µL di esano è stato centrifugato a 2500 rpm.

3.4 Caratterizzazione degli acidi grassi liberi mediante gascromatografia

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 10 m x 0,1 mm di diametro interno e 0,2 µm 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 µl e 250°C, il flusso in colonna era di 0,80 ml/min e il rapporto di splittaggio 1:100. L'analisi è stata condotta utilizzando una programmata di temperatura: 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.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Contenuto in grasso

Tabella 2. Valori % del grasso estratto

CAMPIONE	% GRASSO
ECMB624	27,5
ECMB628	28,4
ECMB677	28,7
ECMB679	30,4
EDFE991	29,3
EDFE994	30,3
EDFF009	30,2
EDFF011	27,9
EDFF012	31,8
EDFF017	31,2
EDTR673	33,0
EDTR692	32,9
EDTR674	32,5
EDTR695	34,7
PFPD858	34,0
PFPD863	32,6
PFPD866	31,0
PFPD871	32,4
PFPD897	34,0
PFPD901	33,8
PFPD905	31,2
PFPD909	31,5

PFPD923	30,9
PFPD927	29,0
PFPD980	32,1
PFPD982	32,3
PFPD985	32,1

Dalla tabella 2 possiamo vedere come varia la percentuale del grasso nei vari campioni.

Prendendo in considerazione il caseificio Castellazzo (ECMB), il campione con la percentuale maggiore risulta essere ECMB679 con un valore del 30,4% di grasso, mentre gli altri tre campioni hanno percentuali che vanno da 27,5% a 28,7%.

Per il caseificio Frignano (EDFE\EDFF) invece i due campioni con sigle EDFF012 e EDFF017 risultano avere le percentuali più alte di 31,8% e 31,2% rispettivamente, in confronto agli altri due campioni che hanno valori di 30,2% e 27,9%.

Il caseificio San Martino (EDTR) presenta quattro campioni differenti e quello avente la percentuale più elevata ha la sigla EDTR695 con un valore di 34,7%, rispetto agli altri con percentuali di 33%, 32,9% e 32,5%.

Infine tra i campioni del caseificio Sant'Angelo, il PFPD858 e PFPD897 risultano avere la stessa percentuale di 34,0% di grasso, al contrario degli altri campioni che assumono valori che vanno da 29% a 33,8%.

Quindi è possibile stabilire che tra i quattro caseifici, quello avente il campione con la percentuale maggiore risulta essere il caseificio San Martino con una percentuale di 34,7% di grasso.

4.2 Determinazione di acidi grassi liberi

La caratterizzazione e la quantificazione degli acidi grassi liberi nei vari campioni di Parmigiano Reggiano è stata ottenuta mediante metilazione della frazione lipidica e iniezione in FAST GC-FID. Questa analisi è stata eseguita al fine di valutare quale tra i campioni possiede un profilo da prendere in considerazione per quello che è lo scopo di questo progetto, ovvero valutare se vi sia un cambiamento nella composizione oltre che nella quantità degli acidi grassi liberi dei diversi campioni di Parmigiano Reggiano.

Tra i vari acidi grassi che sono stati identificati sicuramente solo alcuni che hanno percentuali utili alla nostra valutazione. Prendiamo in considerazione infatti solo l'acido palmitico (C16:0) e l'acido

stearico (C18:0) con i loro relativi isomeri, in quanto sono i più rappresentativi e quelli maggiormente presenti.

Tra gli isomeri sono stati presi in considerazione l'acido palmitoleico (C16:1*c*), l'acido oleico (C18:1 *c-9*) e l'acido linoleico (C18:2 *n-6*).

Le tabelle sottostanti fanno riferimento al contenuto di acidi grassi liberi nei vari campioni dei 4 caseifici, tenendo conto dei parametri presi in considerazione (giorni di salatura e dimensione della forma).

Tabella 3. Composizione e contenuto in acidi grassi liberi nei campioni di Parmigiano Reggiano del caseificio Castellazzo (ECMB) in base ai giorni di salatura.

GIORNI DI SALATURA		
FA	12 GG	18 GG
%	ECMB 624	ECMB 628
C16:0	32,0 ± 0,8b	36,5 ± 0,7a
C16:1<i>c</i>	2,0 ± 0,3b	2,7 ± 0,2a
C18:0	9,9 ± 0,4b	11,6 ± 1,0a
C18:1<i>c-9</i>	27,1 ± 1,2a	18,3 ± 0,9b
C18:2<i>n-6</i>	5,8 ± 0,2a	5,8 ± 0,1a
FFA TOTALI (mg\100mg grasso)	9,1 ± 1,4a	5,7 ± 0,03b

I valori con lettere diverse all'interno di ogni coppia di campioni sono significativamente differenti ($p < 0,05$).

Dalla tabella 3 è possibile vedere come per i campioni del caseificio Castellazzo, ci sia un aumento di acido palmitico (C16:0) del 12,5% passando da 12 a 18 giorni di salatura con percentuali che vanno da circa 32% a 36%, rispettivamente. Questo aumento si registra anche per l'acido palmitoleico (C16:1 *c*) e l'acido stearico (C18:0) con aumenti significativi ($p < 0,05$) con l'aumentare dei giorni di salatura del 31% e del 16%, rispettivamente. Al contrario, l'acido oleico (C18:1 *c-9*) mostra una diminuzione significativa del suo contenuto ($p < 0,05$) con l'aumentare dei giorni di salatura del 32%, mentre l'acido linoleico (C18:2 *n-6*) non mostra differenze significative ($p < 0,05$).

Per quanto riguarda il contenuto totale di acidi grassi liberi si può notare come in questa coppia di campioni l'aumento dei giorni di salatura permette una diminuzione significativa della lipolisi all'interno delle forme di Parmigiano. Infatti dopo 12 e 18 giorni di salatura il contenuto di acidi grassi liberi era 9,1 e 5,7 mg\100mg grasso, rispettivamente. Correlando questi valori con la percentuale di sale all'interno dei campioni, si nota come un più basso contenuto di sale (1,02%) permette una lipolisi maggiore (9,13 mg\100g di grasso) nel campione ECMB624; viceversa un più alto contenuto di sale (1,36%) fa sì che la lipolisi sia ridotta fino a 5,72 mg\100mg di grasso nel campione ECMB628.

Tabella 4. Composizione e contenuto in acidi grassi liberi nei campioni di Parmigiano Reggiano del caseificio Castellazzo (ECMB) in base alla dimensione della forma.

DIMENSIONE FORMA		
FA	GRANDE (50,5kg)	PICCOLA (42,3kg)
%	ECMB 677	ECMB 679
C16:0	33,9 ± 1,4a	16,5 ± 2,6b
C16:1c	1,7 ± 0,2b	2,3 ± 0,4a
C18:0	12,4 ± 1,4a	5,3 ± 0,8b
C18:1c-9	23,6 ± 0,8b	38,4 ± 0,02a
C18:2n-6	4,9 ± 0,7a	0,4 ± 0,03b
FFA TOTALI (mg\100mg grasso)	9,1 ± 0,4a	4,5 ± 0,02b

I valori con lettere diverse all'interno di ogni coppia di campioni sono significativamente differenti ($p < 0,05$).

Prendendo in considerazione come parametro la dimensione della forma, invece, è possibile vedere (tabella 4) che per l'acido palmitico (C16:0) vi sia una diminuzione significativa del suo contenuto ($p < 0,05$) del 51% passando dalla forma grande a quella piccola con percentuali che vanno dal 33% al 16,5% rispettivamente. La stessa diminuzione significativa ($p < 0,05$) si ha per l'acido stearico (C18:0) del 57% e l'acido linoleico (C18:2 n-6) del 91%. Invece l'acido oleico (C18:1 c-9) risulta avere un aumento significativo ($p < 0,05$) del 38,5% con percentuali che vanno dal 23% al 38%, passando dalla forma grande a quella piccola. Per ultimo anche per l'acido palmitoleico (C16:1c) si registra un aumento significativo del suo contenuto ($p < 0,05$) del 26% dalla forma grande a quella piccola.

Prendendo in considerazione il contenuto totale di acidi grassi liberi nella coppia di campioni, è possibile vedere come ci sia una riduzione significativa della lipolisi passando dalla forma grande a quella piccola, con una quantità di acidi grassi totali di 9,1 e 4,5 mg\100mg grasso, rispettivamente. Correlando questi valori al contenuto di sale dei campioni è possibile stabilire che con una percentuale minore di sale (1.04%) nella forma grande (campione ECMB677), vi sia una lipolisi maggiore (9,1 mg\100mg grasso); mentre aumentando la percentuale di sale (1,14%) nella forma piccola (campione ECMB679) l'attività lipolitica risulta essere ridotta fino a 4,5 mg\100mg grasso.

Tabella 5. Composizione e contenuto in acidi grassi liberi nei campioni di Parmigiano Reggiano del caseificio Frignano (EDFE/EDFF) in base ai giorni di salatura.

GIORNI DI SALATURA						
FA	12 GG	18 GG	12 GG	18 GG	12 GG	18 GG
%	EDFE991	EDFE994	EDFF009	EDFF011	EDFF012	EDFF017
C16:0	33,9 ± 0,7a	28,7 ± 0,5b	37,9 ± 0,5a	32,3 ± 0,2b	33,5 ± 4,6a	20,9 ± 1,5b
C16:1c	2,2 ± 0,3a	2,0 ± 0,2b	2,2 ± 0,1a	2,2 ± 0,1a	n.d.	1,5 ± 0,1
C18:0	11,4 ± 0,2b	15,2 ± 0,8a	10,3 ± 0,5a	8,1 ± 0,3b	21,4 ± 0,1a	21,1 ± 0,01b
C18:1c-9	26,0 ± 0,9a	8,1 ± 0,9b	23,1 ± 0,7a	21,8 ± 1,1b	11,0 ± 1,1a	10,1 ± 0,1b
C18:2n-6	5,4 ± 0,3a	3,2 ± 0,5b	5,7 ± 0,8a	4,8 ± 0,2b	4,7 ± 0,8a	2,1 ± 0,1b
FFA TOTALI (mg\100mg grasso)	5,0 ± 0,04b	8,9 ± 1,4a	4,9 ± 0,2b	10,2 ± 3,8a	12,1 ± 3,1a	14,9 ± 0,2a

I valori con lettere diverse all'interno di ogni coppia di campioni sono significativamente differenti ($p < 0,05$).

Per quanto riguarda il caseificio Frignano è possibile vedere come per la prima coppia di campioni considerata (EDFE991\EDFE994) si registri un calo significativo ($p < 0,05$) del contenuto di acido palmitico (C16:0) del 15,3% con percentuali che vanno dal 33% al 28% con l'aumentare dei giorni di salatura (da 12 a 18 giorni), e una diminuzione significativa ($p < 0,05$) dell'acido oleico (C18.1 c-9) del 68% con percentuali di 26% e 8% rispettivamente. Anche per altri due acidi grassi si verificano delle diminuzioni significative ($p < 0,05$): per l'acido palmitoleico (C16:1c) del 9% e per l'acido linoleico (C18:1 n-6) del 40%. Al contrario per l'acido stearico (C18:0) si ha un aumento significativo ($p < 0,05$) da 11% a 15% circa con l'aumentare dei giorni di salatura del 25%.

Nell'altra coppia di campioni (EDFF009\EDFF011) si verificano una serie di diminuzioni significative ($p < 0,05$) con l'aumentare dei giorni di salatura (da 12 a 18 giorni): per l'acido palmitico (C16:0) del 15% con percentuali che vanno dal 37% al 32%, per l'acido stearico (C18:0) del 21% , dell'acido oleico (C18:1 *c*-9) del 5,6% e infine dell'acido linoleico (C18:2 *n*-6) del 16%. Invece l'acido palmitoleico (C16:1*c*) non mostra differenze significative ($p < 0,05$).

Infine per la coppia di campioni (EDFF012\EDFF017) è possibile notare come si abbia una diminuzione significativa ($p < 0,05$) del contenuto di acidi grassi presi in considerazione. L'acido palmitico (C16:0) mostra infatti un calo significativo ($p < 0,05$) del 38%, l'acido stearico (C18:0) del 13%, l'acido oleico (C18:1 *c*-9) dell'8% e infine l'acido linoleico (C18:2 *n*-6) del 55%.

Osservando il contenuto di acidi grassi liberi totali nelle prime due coppie di campioni è possibile stabilire che vi è un aumento significativo della lipolisi passando da 12 a 18 giorni di salatura. Infatti nella prima coppia, il campione EDFE991 con 12 giorni di salatura risulta avere una quantità di acidi grassi liberi di 5,0 mg\100mg grasso rispetto al campione EDFE994 che con 18 giorni di salatura ne ha una quantità maggiore, 8,9 mg\100mg grasso.

Anche nella seconda coppia la lipolisi risulta aumentare passando da 12 a 18 giorni di salatura, con quantità di acidi grassi liberi di 4,9 e 10,2 mg\100mg grasso rispettivamente.

Al contrario nell'ultima coppia di campioni non si verifica una variazione significativa della lipolisi passando da 12 a 18 giorni di salatura.

Correlando questi valori alla percentuale di sale nei campioni è possibile stabilire che aumentando la percentuale di sale, aumenta anche l'attività lipolitica per le prime due coppie di campioni. Infatti nel campione EDFE991 con una percentuale di sale di 1,03% corrisponde una quantità di acidi grassi liberi totali di 5,0 mg\100mg grasso, mentre nel campione EDFE994 con 1,24% di sale si abbia una quantità di acidi grassi liberi totali maggiore, di 8,9 mg\100mg grasso.

Lo stesso accade per la seconda coppia, nella quale il campione EDFF009, con una percentuale di sale di 1,05% , ha una lipolisi minore (4,9 mg\100mg grasso) rispetto al campione EDFF011 che ha una percentuale maggiore di sale, di 1,28 %, e una lipolisi maggiore (10,2 mg\100mg grasso).

Infine per l'ultima coppia di campioni, la lipolisi non presenta differenze significative aumentando la percentuale di sale: con l'1,04% di sale nel campione EDFF012 corrisponde una quantità di FFA totali di 12,1 mg\100mg grasso mentre con l'1,17% di sale nel campione EDFF017 ne corrisponde una quantità di 14,9 mg\100mg grasso.

Tabella 6. Composizione e contenuto in acidi grassi liberi nei campioni di Parmigiano Reggiano del caseificio San Martino (EDTR) in base ai giorni di salatura.

GIORNI DI SALATURA				
FA	12 GG	18 GG	12 GG	18 GG
%	EDTR673	EDTR692	EDTR674	EDTR695
C16:0	30,7 ± 1,2a	28,9 ± 0,1b	28,1 ± 0,1a	22,9 ± 1,9b
C16:1c	3,0 ± 0,1a	2,5 ± 0,2b	1,9 ± 0,4a	1,0 ± 0,1b
C18:0	9,7 ± 0,2a	9,4 ± 1,7a	11,5 ± 1,5b	17,5 ± 1,5a
C18:1c-9	23,5 ± 1,3b	25,6 ± 0,1a	20,9 ± 1,4a	12,8 ± 1,6b
C18:2n-6	5,9 ± 0,6a	5,3 ± 0,1a	5,6 ± 0,8a	2,2 ± 0,2b
FFA TOTALI (mg\100mg grasso)	10,2 ± 0,9a	5,1 ± 0,5b	5,9 ± 0,4b	10,7 ± 1,6a

I valori con lettere diverse all'interno di ogni coppia di campioni sono significativamente differenti ($p < 0,05$).

Per il caseificio San Martino sono stati presi in considerazione i giorni di salatura, 12 o 18.

Nella prima coppia di campioni presi in analisi (EDTR673\EDTR692) si verifica una diminuzione significativa ($p < 0,05$) dell'acido palmitico (C16:0) con l'aumentare dei giorni di salatura (da 12 a 18 giorni) del 6% con percentuali di 30% e 28% circa. Questa diminuzione si verifica anche per l'acido palmitoleico (C16:1c) del 16%, per l'acido stearico (C18:0) del 3% e per l'acido linoleico (C18:2 n-6) del 10%. Al contrario per quanto riguarda l'acido oleico (C18:1 c-9) si registra un aumento significativo ($p < 0,05$) del 8% con l'aumentare dei giorni di salatura.

Similmente nella seconda coppia di campioni (EDTR674\EDTR695) si verifica una diminuzione significativa ($p < 0,05$) dell'acido palmitico (C16:0) del 18,5% con percentuali che vanno da 28% a 23% circa passando da 12 a 18 giorni di salatura. Questa diminuzione si verifica anche per l'acido palmitoleico (C16:1c) del 47%, per l'acido oleico (C18:1 c-9) del 39% e per l'acido linoleico (C18:2 n-6) del 60%. Per quanto riguarda l'acido stearico (C18:0) invece, si verifica un aumento significativo ($p < 0,05$) del 60% con percentuali che vanno da 11,5% a 17,5%.

Per quanto riguarda la composizione totale di acidi grassi liberi, nella prima coppia di campioni è possibile stabilire che passando da 12 giorni a 18 giorni di salatura si ha una riduzione significativa della lipolisi con quantità di 10,2 e 5,1 mg\100mg grasso rispettivamente.

Al contrario nella seconda coppia di campioni, aumentando i giorni di salatura da 12 a 18 si verifica un aumento significativo della lipolisi con quantità di 5,9 e 10,7 mg\100mg grasso rispettivamente.

Comparando i valori con la percentuale di sale è possibile vedere che per la prima coppia di campioni si verifica una riduzione della lipolisi: nel campione EDTR673 che ha una percentuale di sale di 1,28% corrisponde una quantità di acidi grassi liberi totali di 10,2 mg\100mg grasso, mentre nell'altro campione in riferimento EDTR692 con una percentuale maggiore di sale (1,59%) si ha una quantità minore di acidi grassi liberi totali fino ai 5,1 mg\100mg grasso.

Al contrario per la seconda coppia di campioni avviene l'effetto opposto, ovvero un aumento significativo dell'attività lipolitica: nel campione EDTR674 che ha una percentuale di sale di 1,22%, corrisponde una quantità di 5,9 mg\100mg grasso, mentre nel campione EDTR695 con una percentuale di sale maggiore (1,52%) si ottiene una quantità di FFA totali di 10,7 mg\100mg grasso.

Tabella 7. Composizione e contenuto in acidi grassi liberi nei campioni di Parmigiano Reggiano del caseificio Sant'Angelo (PFPD) in base ai giorni di salatura.

GIORNI DI SALATURA										
FA	12 GG	18 GG	12 GG	18 GG	12 GG	18 GG	12 GG	18 GG	12 GG	18 GG
%	PFPD 858	PFPD 863	PFPD 866	PFPD 871	PFPD 897	PFPD 901	PFPD 905	PFPD 909	PFPD 923	PFPD 927
C16:0	20,7 ± 4,2a	22,3 ± 3,1a	25,3 ± 2,5a	26,6 ± 1,8a	25,6 ± 3,6a	13,3 ± 0,3b	24,9 ± 2,0b	37,9 ± 0,9a	13,9 ± 0,1b	31,8 ± 0,9a
C16:1c	2,4 ± 0,4a	2,7 ± 0,2a	1,3 ± 0,2a	0,8 ± 0,1b	2,0 ± 0,4a	2,9 ± 0,5a	1,8 ± 0,1b	2,5 ± 0,1a	0,8 ± 0,1b	2,3 ± 0,2a
C18:0	1,3 ± 0,3b	6,0 ± 1,0a	19,9 ± 1,5a	17,3 ± 1,2a	11,5 ± 0,7b	25,8 ± 2,5a	15,4 ± 0,3a	12,0 ± 1,0b	42,0 ± 0,5a	16,4 ± 2,8b
C18:1c-9	36,8 ± 3,7a	31,7 ± 5,1b	17,2 ± 1,2a	19,6 ± 3,0a	35,0 ± 5,2a	12,6 ± 0,6b	21,3 ± 3,0a	14,7 ± 1,6b	8,9 ± 0,3b	19,0 ± 2,1a
C18:2n-6	6,0 ± 0,8	n.d.	3,7 ± 0,1b	4,5 ± 0,2a	4,1 ± 0,0	n.d.	4,4 ± 0,8a	5,1 ± 0,3a	2,2 ± 0,3b	4,5 ± 0,7a
FFA TOTALI (mg\100mg grasso)	18,9 ± 3,3a	8,2 ± 0,5b	12,5 ± 1,2a	8,7 ± 1,1b	7,9 ± 0,1a	2,0 ± 0,1b	11,6 ± 3,6a	3,4 ± 0,1b	6,8 ± 0,1a	4,1 ± 0,8b

I valori con lettere diverse all'interno di ogni coppia di campioni sono significativamente differenti (p<0,05).

Per il caseificio Sant'Angelo sono stati presi in considerazione due differenti periodi di salatura, 12 o 18 giorni.

Per la prima coppia di campioni (PFPD858\PFPD863) si verifica un aumento significativo dell'acido stearico (p<0,05) del 78% con percentuali che vanno da 1,3% al 6% passando dai 12 ai

18 giorni di salatura. Al contrario per l'acido oleico (C18:1c9) si ha una diminuzione significativa ($p < 0,05$) del 14%.

Invece per quanto riguarda la composizione dell'acido palmitico (C16:0) e dell'acido palmitoleico (C16:1c) non si verificano delle variazioni significative ($p < 0,05$).

Nella seconda coppia di campioni (PFPD866\PFPD871) è possibile vedere come per l'acido palmitico (C16:0), per l'acido stearico (C18:0) e per l'acido oleico (C18:1c9) non si verificano delle variazioni significative nelle composizioni ($p < 0,05$). Al contrario per l'acido palmitoleico (C16:1c) si ha una diminuzione significativa ($p < 0,05$) del 38% con percentuali che vanno da 1,3% a 0,8% passando da 12 a 18 giorni di salatura; mentre per l'acido linoleico (C18:2n6) si ha un aumento significativo ($p < 0,05$) del 18%.

Nella terza coppia di campioni (PFPD897\PFPD901) è possibile vedere che per l'acido palmitico (C16:0) si verifica una diminuzione significativa ($p < 0,05$) del 48% con percentuali che vanno da 25% al 13% passando da 12 a 18 giorni di salatura. Questa diminuzione si ha anche per l'acido oleico (C18:1c-9) del 64% con percentuali che vanno da 35% a 12% circa. Al contrario per l'acido stearico (C18:0) si verifica un aumento significativo ($p < 0,05$) del 55% con percentuali che vanno da 11,5% a 25,5% circa. Per l'acido palmitoleico (C16:1c) non si verifica una variazione significativa ($p < 0,05$).

Per la quarta coppia di campioni (PFPD905\PFPD909) si ha un aumento significativo ($p < 0,05$) per l'acido palmitico (C16:0) del 34% con percentuali di 25% e 38% circa, e per l'acido palmitoleico (C16:1c) del 28% con percentuali che vanno da 1,8% a 2,5% passando da 12 a 18 giorni di salatura. Al contrario una diminuzione significativa ($p < 0,05$) si verifica per l'acido stearico (C18:0) del 22% e per l'acido oleico (C18:1 c-9) del 31% circa. Per ultimo l'acido palmitoleico (C18:2 n-6) non presenta una variazione significativa ($p < 0,05$).

L'ultima coppia in analisi (PFPD923\PFPD927) presenta un aumento significativo ($p < 0,05$) dell'acido palmitico (C16:0) del 56%, dell'acido palmitoleico (C16:1c) del 65%, dell'acido oleico (C18:1c-9) del 53% e dell'acido linoleico (C18:2n-6) del 51% con l'aumentare dei giorni di salatura (da 12 a 18 giorni). Al contrario si ha una diminuzione significativa ($p < 0,05$) dell'acido stearico (C18:0) del 61% con percentuali che vanno da 42% a 16%, passando da 12 a 18 giorni di salatura.

In riferimento al contenuto di acidi grassi liberi totali è possibile vedere come per tutte le coppie di campioni del caseificio Sant'Angelo si verifichi una riduzione significativa della lipolisi, aumentando i giorni di salatura da 12 a 18.

Nella prima coppia di campioni si ha una riduzione significativa da una quantità di 18,9 mg\100mg grasso nel campione con 12 giorni di salatura, fino ad una quantità di 8,2 mg\100mg grasso nel campione sottoposto a 18 giorni di salatura. Lo stesso vale per la seconda coppia di campioni dove passando da 12 a 18 giorni di salatura si verifica una riduzione significativa della lipolisi da 12,5 fino a 8,7 mg\100mg grasso, rispettivamente.

Nella terza coppia questa riduzione significativa si verifica passando da 12 a 18 giorni di salatura con quantità di 7,9 e 2,0 mg\100mg grasso rispettivamente; nella quarta coppia con quantità che vanno da 11,6 mg\100mg grasso fino a 3,4 mg\100mg grasso e anche per l'ultima coppia con quantità di 6,8 e 4,1 mg\100mg grasso rispettivamente.

Correlando poi questi valori alla percentuale di sale è possibile vedere che si verifica una riduzione della lipolisi aumentando la percentuale di sale. Nella prima coppia, il campione PFPD858 con una percentuale di sale minore (1,03%) ha una lipolisi maggiore (18,9 mg\100mg grasso) rispetto al campione in riferimento PFPD863, il quale presenta una percentuale di sale maggiore (1,35%) ma al contrario una ridotta lipolisi (8,2 mg\100mg grasso).

Nella seconda coppia il campione PFPD866 con una percentuale di sale di 1,07% presenta una più elevata attività lipolitica (12,5mg\100mg grasso) rispetto al campione PFPD871 con una percentuale maggiore di sale (1,44%) ma una quantità di acidi grassi liberi totali minore (8,7 mg\100mg grasso).

Allo stesso modo è possibile vedere nel campione PFPD897 della terza coppia che una percentuale di sale minore (1,08%) permette una elevata attività lipolitica (7,9 mg\100mg grasso) rispetto al campione PFPD901 che con una percentuale maggiore di sale (1,22%) comporta una riduzione della lipolisi significativa (2,0 mg\100mg grasso). Nella quarta coppia, dal campione PFPD905, che presenta una percentuale di sale di 1,03% e una lipolisi di 11,6 mg\100mg grasso, si arriva ad ottenere questa riduzione di lipolisi fino a 3,4 mg\100mg grasso nel campione PFPD909 con una percentuale di sale maggiore (1,29%). Infine nell'ultima coppia in riferimento, il campione PFPD923 avente una percentuale di sale di 1,04%, presenta una più elevata attività lipolitica (6,8 mg\100mg grasso) rispetto al campione PFPD927 con una percentuale di sale maggiore (1,27%) e lipolisi di 4,1 mg\100mg grasso.

Tabella 8. Composizione e contenuto in acidi grassi liberi nei campioni di Parmigiano Reggiano del caseificio Sant'Angelo (PFPD) in base alla dimensione della forma.

FA	DIMENSIONE FORMA		
	PICCOLA (40,4kg)	MEDIA (46,9kg)	GRANDE (52,1kg)
%	PFPD 980	PFPD 982	PFPD 985
C16:0	31,3 ± 4,3b	37,1 ± 0,1a	19,9 ± 3,9c
C16:1c	2,1 ± 0,2b	2,8 ± 0,3a	n.d.
C18:0	11,5 ± 1,6b	11,8 ± 1,1b	13,7 ± 0,4a
C18:1c-9	19,5 ± 3,0b	24,3 ± 0,4a	24,0 ± 4,2a
C18:2n-6	4,9 ± 0,4b	6,5 ± 0,2a	n.d.
FFA TOTALI (mg\100mg grasso)	5,7 ± 0,03b	3,0 ± 0,2c	14,4 ± 2,3a

I valori con lettere diverse all'interno di ogni coppia di campioni sono significativamente differenti ($p < 0,05$).

La tabella 8 mostra l'andamento delle percentuali di acidi grassi in campioni di Parmigiano Reggiano del caseificio Sant'Angelo, sulla base della dimensione della forma piccola, media o grande. Passando dalla forma piccola e quella media, è possibile vedere come si verifichi un aumento significativo ($p < 0,05$) dell'acido palmitico (C16:0) del 15% circa con percentuali che vanno da 31% a 37%, dell'acido palmitoleico (C16:1c) del 25%, dell'acido oleico (C18:1 c-9) del 20% circa e per ultimo dell'acido linoleico (C18:2 n-6) del 25% circa. Per contro l'acido stearico (C18:0) non mostra variazioni significative ($p < 0,05$).

Valutando invece l'andamento dalla forma media a quella grande è possibile vedere che si ha un calo significativo ($p < 0,05$) dell'acido palmitico (C16:0) del 46% con percentuali che vanno da 37% a 20% circa, e per contro una aumento di acido stearico (C18:0) del 14%. L'acido oleico, invece, non mostra variazione significative ($p < 0,05$).

Prendendo in considerazione il contenuto in acidi grassi liberi totali nelle tre diverse dimensioni delle forme di Parmigiano Reggiano è possibile vedere che la forma grande (52,1kg) presenta la più elevata attività lipolitica di 14,4 mg\100mg grasso, rispetto alla forma piccola (40,4kg) con una quantità di 5,7 mg\100mg grasso e a quella media (46,9kg) con una lipolisi di 3,0 mg\100mg grasso.

Quindi è possibile stabilire che si ha una riduzione significativa della lipolisi passando dalla forma grande a quella piccola e da quella piccola alla dimensione media.

Correlando il contenuto di sale è possibile vedere come passando dalla forma piccola del campione PFPD980 con una percentuale di sale maggiore (1,19%) alla forma media del campione PFPD982

con una percentuale di sale minore (1,10%), si abbia una riduzione significativa della lipolisi da 5,7 a 3,0 mg\100mg grasso, rispettivamente.

Mentre al contrario passando dalla forma media del campione PFPD982, avente una percentuale di sale di 1,10%, a quella di grande dimensione del campione PFPD985, con una percentuale di sale di 1,06%, si verifica un aumento significativo della lipolisi di 3,0 e 14,4 mg\100mg grasso, rispettivamente.

CONCLUSIONI

Questa analisi ha lo scopo di valutare come cambia la composizione qualitativa degli acidi grassi liberi in campioni differenti di Parmigiano Reggiano provenienti da quattro diversi caseifici (Castellazzo, Frignano, San Martino e Sant'Angelo) ed a ridotto contenuto di sale, valutando due differenti periodi di salatura, di 12 o 18 giorni e la diversa dimensione della forma.

Sono stati valutati gli acidi grassi liberi più rappresentativi e maggiormente presenti nei vari campioni e precisamente l'acido palmitico (C16:0) e stearico (C18:0) con i relativi isomeri, ovvero l'acido palmitoleico (C16:1*c*), oleico (C18:1 *c-9*) e linoleico (C18:2 *n-6*).

Dopo opportuna analisi è stato valutato che le percentuali degli acidi grassi nei vari campioni variano in maniera significativa ($p < 0,05$) le une dalle altre nelle varie forme di Parmigiano Reggiano e quindi assumono valori differenti a seconda dei parametri utilizzati.

Anche per quanto riguarda il contenuto in acidi grassi liberi totali (mg/100 mg grasso) è stato stabilito che in alcuni campioni appartenenti ad alcuni dei caseifici come Castellazzo, Sant'Angelo e una coppia di campioni del caseificio San Martino vi sia un rapporto indiretto tra il periodo di salatura e l'attività lipolitica: aumentando il periodo di salatura (da 12 a 18 giorni) e quindi la percentuale di sale, corrisponde una riduzione significativa della lipolisi e del contenuto di acidi grassi liberi totali nei campioni. Al contrario in due coppie di campioni appartenenti al caseificio Frignano e ad una coppia di campioni del caseificio San Martino avviene il processo contrario: aumentando il periodo di salatura (da 12 a 18 giorni) e la percentuale di sale, ne consegue anche un aumento della lipolisi e quindi del contenuto di FFA totali.

Quindi le composizioni in acidi grassi liberi totali dei vari campioni di Parmigiano Reggiano in riferimento ai due periodi diversi di salatura (12 e 18 giorni), mostrano un andamento piuttosto differente, a volte con una più elevata attività lipolitica all'aumentare dei giorni di salatura (da 12 a 18) e a volte esattamente il contrario.

Invece prendendo in considerazione come parametro la dimensione della forma, sia per il caseificio Castellazzo che per il caseificio Sant'Angelo è stato determinato che passando dalla forma piccola con una percentuale di sale maggiore alla forma grande (% di sale minore), corrisponde un aumento significativo dell'attività lipolitica, ad esclusione della forma media del caseificio Sant'Angelo, la cui lipolisi risulta essere ridotta rispetto alla forma di dimensione minore.

Questa disomogeneità può essere causata da tutti quei fattori che entrano in gioco durante la stagionatura delle forme di Parmigiano Reggiano come ad esempio, l'umidità relativa, la composizione del sieroinnesto e quindi l'attività microbica che si va a sviluppare all'interno del

formaggio, l'attività dell'acqua, oltre alle condizioni di caseificazione. Le variabili indicate portano anche a condizioni disomogenee di maturazione del formaggio e certamente la possibilità di avere un campionamento a 24 mesi avrebbe consentito di confermare alcune osservazioni o di poter individuare andamenti lipolitici consolidati.

Quindi è possibile dire che l'analisi del contenuto in acidi grassi liberi risulta un parametro inadatto a valutare l'attività lipolitica proprio perché ogni acido grasso libero ha un proprio andamento all'interno delle varie forme di Parmigiano Reggiano.

Bibliografia

Addeo F, Moio L, Stingo C (1988). Caratteri tipici della proteolisi nel formaggio Parmigiano-Reggiano: composizione della frazione caseinica. Atti giornata studio composizione e caratteristiche del Parmigiano-Reggiano, pp. 21-40. Ed. Consorzio Form. Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia.

Alais Charles (2000). Scienza del latte Principi di tecnologia del latte e dei derivati, 3° edizione. Tecniche nuove.

Ashes J.R., Gulati S.K., Scott T.W. 1997. Symposium: new approaches to changing milk composition. Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *J. Dairy Sci.*, 80: 2204-2212.

Bailoni L., Battaglini L. M., Gasperi S., Mantovani R., Biasioli F., Mimosi A (2005) Qualità del latte e del formaggio d'alpe, caratteristiche sensoriali, tracciabilità, attese del consumatore. *Quaderno sozoalp*, n.2

Battistotti B, Corradini C (1993). Italian cheese. In "Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology". vol. II. Major Cheese Groups (ed. P. F. Fox), 221-243. Chapman & Hall, London, UK.

Bauman DE, Griinari JM (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu Rev Nutr*, 23: 203-27.

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

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

Bertoni G., Calamari L., Maianti M., (2001). Producing specific milks for speciality cheeses. Proc. The Nutr. Soc., 60: 231-246.

Bonoli M., Caboni M.F., Rodriguez-Estrada M.T., Lercker G., (2007). Effect of feeding fat sources on the quality and composition of lipids of precooked ready-to-eat fried chicken patties. Food Chemistry, 101: 1327-1337

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

Bottazzi V (1967). I latt mastitici nei riflessi lattiero-caseari. Ind. Latte, 3: 76-85.

Buccioni A. 2002. Evoluzione del contenuto dei principali isomeri geometrici e posizionali dell'acido linoleico coniugato (CLA) nel liquido ruminale durante I processi fermentativi in vitro. Tesi dottorato Scienze Zootecniche. Università di Udine e di Firenze.

Caboni MF, Zannoni M, Lercker G (1988). Lipolisi del grasso del Parmigiano-Reggiano. Atti giornata studio composizione e caratteristiche Parmigiano-Reggiano, pp. 113-121. Ed. Consorzio Form. Parmigiano- Reggiano, Reggio Emilia.

Caserio G, Senesi E, Bianchi A, Renon P, Beretta G (1972). Rapporti fra temperatura ed attività lipolitica di alcuni ceppi microbici isolati da formaggio Grana Padano. L'Industria del Latte, 8: 89-104.

Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge RM., Doreau M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. Ann Zotech; 49: 181-205.

Chilliard 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

Colin O, Laurent F (1991). Qualité du lait et transformation fromagère. Colloque "Protéines et rendements en Industries Laitières", 159-164, Nancy (France), 2-3 Octobre 1991.

Colin O, Laurent F, Vignon B (1992). Variations du rendement fromager en pâte molle:

relation avec la composition chimique du lait et les paramètres de la coagulation. *Lait*, 72: 307-319.

Collins YF, McSweeney PLH, Wilkinson MG (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy Journal*, 13: 841-866.

Coulon J.B., 1997. Effet de la nature des fourrages sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques du fromage. *Fourrages*, 152: 429-436.

Corradini Cesare (1995). *Chimica e tecnologia del latte, Tecniche nuove*.

Fieser LF, Fieser M (1967). *Reagents for organic synthesis*, 191–192. Wiley, New York, USA.

Formigoni A., Canestrari G., Gramenzi A., Pezzi P., (2009). Una dieta con foraggi verdi può aumentare il latte prodotto. *Inf. Agr.*, 20: 43-46.

Formigoni A., Brogna N., Palmonari A., Panciroli N., Fustini M., (2010) Alimentazione delle bovine, produzione e composizione del grasso del latte, *Progress in Nutrition*, Vol. 12, 2: 172-182. Frede E., Precht D., Timmen H., (1990) Lipide. In Schlimme E. (Ed.). *Kompendium zur milchwirtschaftlichen chemie*. 57-78 Jensen R.G., (2002) The composition of Bovine Milk Lipids: next term January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Sci.*, 85: 295-350

Guerra E., Verardo V., Caboni M.F. (2015) Determination of bioactive compounds in cream obtained as a by-product during cheese-making: Influence of cows' diet on lipid quality, *International Dairy Journal*, 42: 16-25

Jin Y. K., Park Y. W. (1995). Effects of aging time and temperature on proteolysis of commercial goat milk cheeses produced in the United States. *Journal of Dairy Science*, 78: 2598-2608.

Harfoot C.G., and Hazlewood G.P. (1988) - Lipid metabolism in the rumen. In: P.N. Hobson (Ed.) *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Applied Science Publishers, London. 285-322.

Heinrichs AJ, Lammers BP, Bukmaster DR, (1996). A simple method for the analysis of particle sizes of forages and total mixed rations. *J. Dairy Sci.*, 79: 922-928.

Lercker G., Cocchi M., (2010). The Milk Fat: Membranes, composition and structure. Article in *Progress in Nutrition*, 12: 183-194

- Lopez C, Briard-Bion V. The composition, supramolecular organisation and thermal properties of milk fat: a new challenge for the quality of food products. *Lait* 2007; 87: 317-36.
- Malacarne M. Summer A., (2006). Caratterizzazione chimico-fisica della maturazione del Parmigiano-Reggiano. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 57: 215-228.
- Mariani P, Serventi P, Fossa E (1997). Contenuto di caseina, varianti genetiche ed attitudine tecnologico-casearia del latte delle vacche di razza Bruna nella produzione del formaggio grana. *La Razza Bruna Italiana*, 37 (Suppl. 1):, 8-14.
- Martin B, Coulon JB (1995). Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. II. Influence des caractéristiques des laits de troupeaux et des pratiques fromagères sur les caractéristiques du Reblochon de Savoie fermier. *Lait*, 75: 133-149.
- McSweeney P. L. H., Sousa M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait* , 80: 293-324.
- Mertens DR (1997). Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 80: 1463-1481.
- 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*, 2: 43-80
- Panari G, Mariani P, Summer A, Guidetti R, Pecorari M (2003). Variazioni della composizione e andamento della proteolisi del Parmigiano-Reggiano nel corso della maturazione in riferimento al profilo (centro e periferia) della forma. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 54: 199-212.
- Parodi PW. (1977) - Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J. Dairy Sci.* 60: 1550-1553.
- Parodi P. W., (1997) Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *Journal of Nutrition*, 127: 1055-1060
- Redaelli G, Zecconi A (1985). Influenza della mastite bovina sul latte destinato alla caseificazione. *Il Latte*, 10: 42-44, 45-50.

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

Secchiari P., Mele M., Serra A. (2007) L'acido linoleico coniugato nella carne e nel latte dei ruminanti: principali fattori di variazione genetici ed alimentari, progress in nutrition 9, 2: 108-123

Stefanon B., Summer A., Mariani P. (2002). 1° Congresso Nazionale. Fattori alimentari, condizioni di allevamento e qualità del latte bovino.

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: 507-528.

Zapparoli GA, Dugoni F. (1997). Quadro analitico di acidi grassi volatili, pH ed umidità in formaggio Grana scelto da 1 a 20 mesi di stagionatura. Sci. Tecn. Latt.-Cas., 48: 297-304.

SITOGRAFIA

www.consorzioparmigianoreggiano.com

www.mastitalia.org

http://www.crpa.it/media/documents/crpa_www/Pubblicazi/Opuscoli-C/Archivio_2010/CRPA_4_2010.pdf

www.ruminantia.org

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la professoressa Maria Fiorenza Caboni per avermi dato la possibilità di affrontare questo progetto e la dottoressa Silvia Marzocchi per la disponibilità a consigliarmi e la pazienza ad insegnarmi le metodologie affrontate in laboratorio e per avermi seguita in tutti questi mesi.

Ringrazio i miei genitori e mio fratello, da sempre il mio pilastro ed il mio punto di riferimento, per essermi sempre stata vicina e per avermi sostenuto in ogni momento nonostante le difficoltà.

Ringrazio la persona più importante della mia vita, Marco che sin dal primo anno insieme mi è sempre stato accanto, sostenendomi e consigliandomi e che nonostante gli ostacoli non mi ha mai abbandonata.

Ringrazio mia nonna, tutti i miei zii, cugini e i genitori di Marco che ad ogni problema, anche più piccolo sono sempre stati dalla mia parte.

Ringrazio le mie amiche, Milena e Vanessa, che mi hanno sempre consigliato e spronato ad andare avanti e a non arrendermi mai e mi hanno sempre ascoltata. Ringrazio la mie amiche Sara e Giada, che nonostante il poco tempo passato insieme mi sono sempre vicine.

Un grazie anche a tutte le mie compagne di università Valeria e Ilenia per aver alleggerito i nostri momenti di ansia e, Silvia e Simona, per avermi consigliato e aiutato in questo percorso e un grazie per aver reso il tutto più bello nonostante le difficoltà.