

---

## VALUTAZIONE DEL CONTENUTO IN ACIDI ORGANICI, ZUCCHERI, DIACETILE E ACETOINO DI FORMAGGI DOP PIEMONTESE

Zeppa G., Gerbi V., Rolle L.

Università degli Studi di Torino, Dipartimento di Valorizzazione e Protezione Risorse Agroforestali - Settore Microbiologia e Industrie agrarie, Via L. da Vinci 44, 10095, Grugliasco, Torino, Italy, e-mail: giuseppe.zeppa@unito.it

### INTRODUZIONE

Il settore lattiero caseario costituisce per il Piemonte uno dei principali comparti dell'agro-alimentare. Infatti dei trentuno formaggi DOP italiani ben dieci interessano il Piemonte e di questi sette sono prodotti esclusivamente in Piemonte, ma le conoscenze sulle loro caratteristiche compositive sono scarse ed in genere relative solo ai macrocomponenti od a composti di interesse igienico-sanitario (Coisson *et al.*, 2000; Pattono *et al.*, 2001; Zeppa *et al.*, 2003; Zeppa *et al.*, 2003; Zeppa *et al.*, 2005).

Fra gli elementi di caratterizzazione di un formaggio il flavour è sicuramente uno dei principali in quanto altamente specifico e definito da numerosi composti quali acidi organici, composti solforati, lattoni e chetoni derivanti dall'idrolisi dei grassi del latte durante la lipolisi, dalla crescita batterica, dal normale processo ruminale o dall'aggiunta di composti acidificanti durante la caseificazione. Pertanto il flavour di un prodotto lattiero-caseario risulta strettamente connesso alla materia prima (natura, composizione, microflora) ed alla tecnologia produttiva (Adda *et al.*, 1982; Urbach, 1993; Fox *et al.*, 2004) e la sua valutazione in termini qualitativi e quantitativi, generalmente ottenuta mediante HPLC, è particolarmente importante quale indice di classificazione dei prodotti stessi (Adda *et al.*, 1982; Urbach, 1993; Akalin *et al.*, 2002; Faccia *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2004; Papadakis e Polychroniadou, 2005; Manolaki *et al.*, 2006).

Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di quantificare mediante HPLC alcuni fra questi composti ed in particolare zuccheri (lattosio, glucosio, galattosio), acidi (citrico, orotico, piruvico, lattico, urico, formico, acetico, propionico, butirrico e ippurico) e chetoni (diacetile e acetoino) nei sette formaggi DOP prodotti esclusivamente sul territorio piemontese.

### MATERIALI E METODI

#### Campioni

Lo studio è stato effettuato su 285 campioni di formaggi DOP piemontesi. Di questi 7 erano di Bra duro (BD), 12 di Bra tenero (BT), 20 di Castelmagno (CA), 44 di Robiola di Roccaverano (RR), 9 di Murazzano, 174 di Toma Piemontese (TP) e 19 di Raschera (RA). I campioni sono stati forniti dall'INOQ (Istituto Nord Ovest Qualità), l'ente accreditato dal Ministero per il controllo delle DOP ai sensi del Regolamento CE 2081/92.

Ogni campione è stato prelevato da una forma intera alla stagionatura prevista dal rispettivo disciplinare di produzione e congelato sino al momento dell'analisi.

#### Analisi chimica

Gli acidi organici (citrico, orotico, piruvico, lattico, ossalico, ippurico, formico, acetico, propionico, butirrico, isobutirrico, valerico ed isovalerico), gli zuccheri (lattosio, glucosio e galattosio) ed i chetoni (diacetile ed acetoino) sono stati determinati mediante cromatografia liquida (Zeppa *et al.*, 2001). Cinque grammi di formaggio sono stati uniti a 25 mL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.013 N ed estratti per 10 minuti con uno Stomacher (PBI, Milano, Italy). L'estratto così ottenuto è stato quindi centrifugato per 5 minuti a 7000 rpm ed il surnatante filtrato mediante un filtro monouso in acetato di cellulosa da 0.20 µm (Sartorius AG,

Göttingen, Germany). Il sistema HPLC utilizzato (Thermo Quest, San Jose, CA, USA) era equipaggiato con una pompa isocratica P1000, un campionatore automatico AS3000 con un loop da 20  $\mu$ L, un rivelatore UV100 settato a 210 e 290 nm ed un rivelatore rifrattometrico RefractoMonitor IV. I rivelatori erano collegati in serie ed i dati sono stati raccolti mediante un sistema ChromQuest™ (ThermoQuest, Inc, San Jose, CA, USA). Le analisi sono state eseguite in condizioni isocratiche con un flusso di 0.8 mL/min a 65 °C mediante una colonna a scambio cationico Aminex HPX-87H 300 $\times$ 7.8 mm i.d. dotata di una precolonna Cation H<sup>+</sup> Microguard (Bio-Rad Laboratories, C, USA). La fase mobile utilizzata è stata H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.013 N. Ogni campione è stato esaminato in triplo.

#### Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza con successivo test di Duncan mediante il software Statistica ver. 6 (Statsoft, OK, USA).

### RISULTATI

Nella Tabella 1 vengono riportati i valori medi e le relative deviazioni standard calcolate per ciascuno dei composti determinati sui sette formaggi DOP piemontesi esaminati.

E' possibile evidenziare una elevata variabilità che interessa tutti i parametri compositivi ed ascrivibile alle diverse tecnologie produttive utilizzate ed alle differenze compositive e microbiologiche nella materia prima. Nonostante ciò molti di questi parametri presentano differenze statisticamente significative fra i prodotti.

La concentrazione di lattosio è risultata compresa fra 0 e 22.8 mg/g di formaggio, ma questo zucchero risulta assente in ben 165 campioni e solo in 81 campioni è stata determinata una concentrazione di lattosio superiore ad 1 mg/g.

Il lattosio viene infatti metabolizzato dai batteri lattici (LAB) durante la caseificazione e la stagionatura ad un velocità che è largamente determinata dalla temperatura e dalla concentrazione salina nella cagliata (Fox *et al.*, 2004). Quindi in questo studio il lattosio è stato rilevato principalmente nei formaggi freschi e poco salati quali la Robiola di Roccaverano DOP ed il Murazzano DOP e la sua quantità è risultata inversamente correlata al tempo di stagionatura. In tutti i campioni con lunghi periodi di stagionatura il lattosio è risultato infatti generalmente assente.

Le concentrazioni degli altri due zuccheri determinati, il glucosio ed il galattosio, che costituiscono i primi prodotti di idrolisi del lattosio sono in genere molto basse. Il glucosio risulta assente in quanto rapidamente metabolizzato dai LAB (Fox *et al.*, 2004) ed il massimo di concentrazione è stato di circa 4 mg/g di formaggio. Il galattosio evidenzia invece significative differenze fra i prodotti con un valore massimo di circa 7.7 mg/g di formaggio. Alcune LAB così come alcuni batteri non-starter possono utilizzare il galattosio ed è stata evidenziata una correlazione fra l'aumento di questa microflora nei prodotti e la scomparsa del galattosio (Michel e Martley, 2001). Poiché questi formaggi sono prodotti in genere da latte crudo le differenze esistenti possono essere interpretate sulla base della diversa entità della microflora presente.

Diacetile ed acetoino sono prodotti a partire dal lattosio e dall'acido citrico e sono composti molto importanti per l'aroma dei formaggi. La loro concentrazione varia da 0 a 4.2 mg/g di formaggio per il diacetile e da 0 a 0.1 mg/g di formaggio per l'acetoino. Questi valori sono strettamente correlati con il tempo di stagionatura, ma anche con l'attività batterica e quindi i valori più elevati si hanno per formaggi quali il Bra tenero DOP, la Toma piemontese DOP od il Bra duro DOP ottenuti in genere con l'aggiunta di starter.

Fra gli acidi organici l'acido lattico risulta il più abbondante e varia fra 1.9 e 39.1 mg/g di formaggio. Prodotto per idrolisi dai carboidrati, la sua concentrazione risulta strettamente correlata al tempo di stagionatura, aumentando nelle fasi iniziali per poi decrescere nei

prodotti più stagionati (Akalin *et al.*, 2002; Faccia *et al.*, 2004). Questa riduzione è probabilmente dovuta alla attività di batteri fermentanti il lattato come suggerito dalle evoluzioni nelle concentrazioni di acido formico, propionico e butirrico che risultano particolarmente abbondanti nei formaggi lungamente stagionati.

Molto importante risulta anche l'acido citrico con un massimo di 4.1 mg/g di formaggio. Questo composto è inserito nel ciclo di Krebs dove funge sia da substrato che da prodotto e la sua concentrazione risulta maggiore nei formaggi lungamente stagionati. Il citrato può anche essere utilizzato dai batteri starter per produrre acido piruvico ed acido acetico. Questi composti variano da 0 a 0.6 mg/g di formaggio e da 0 a 3.3 mg/g di formaggio rispettivamente e le loro concentrazioni risultano maggiori nei formaggi a lunga stagionatura.

**Tabella 1** – Valori medi (X) espressi in mg/g di formaggio e relative deviazioni standard ( $\sigma$ ) calcolate per i diversi composti chimici determinati nei sette formaggi DOP piemontesi. Per ogni composto sono altresì riportati i risultati dell'analisi della varianza e del test di Duncan.

	Analisi della varianza	Bra duro		Bra tenero		Castelmagno		Murazzano		Raschera		Robiola di Roccaverano		Toma piemontese	
		X	s	X	s	X	s	X	s	X	s	X	s	X	s
Lattosio	***	nr	-	0.002 <sup>b</sup>	0.005	0.001 <sup>b</sup>	0.003	1.1 <sup>b</sup>	1.2	0.014 <sup>b</sup>	0.045	11.2 <sup>a</sup>	4.8	0.144 <sup>b</sup>	0.546
Glucosio	ns	nr	-	nr	-	nr	-	nr	-	0.001	0.005	0.037	0.076	0.108	0.586
Galattosio	***	0.011 <sup>a</sup>	0.021	2.4 <sup>a</sup>	2.6	0.007 <sup>a</sup>	0.023	0.513 <sup>a</sup>	0.782	0.836 <sup>bc</sup>	1.7	0.238 <sup>a</sup>	0.187	1.8 <sup>ab</sup>	2.1
Diacetile	***	0.438 <sup>ab</sup>	0.306	0.701 <sup>a</sup>	0.559	0.375 <sup>ab</sup>	0.369	0.318 <sup>ab</sup>	0.238	0.463 <sup>ab</sup>	0.438	0.031 <sup>b</sup>	0.091	0.838 <sup>a</sup>	0.999
Acetoino	ns	0.003	0.003	0.006	0.008	0.004	0.004	0.009	0.010	0.005	0.006	0.003	0.004	0.004	0.006
Acido ossalico	***	0.046 <sup>bc</sup>	0.122	0.086 <sup>bc</sup>	0.086	0.007 <sup>a</sup>	0.031	0.273 <sup>a</sup>	0.176	0.096 <sup>bc</sup>	0.171	0.117 <sup>b</sup>	0.118	0.103 <sup>bc</sup>	0.133
Acido citrico	***	0.311 <sup>bc</sup>	0.641	0.946 <sup>a</sup>	1.1	0.017 <sup>a</sup>	0.053	0.725 <sup>ab</sup>	1.2	0.696 <sup>ab</sup>	0.848	0.040 <sup>a</sup>	0.141	0.880 <sup>ab</sup>	0.915
Acido orotico	ns	0.010	0.008	0.019	0.012	0.012	0.006	0.016	0.010	0.031	0.038	0.028	0.036	0.026	0.040
Acido piruvico	***	0.117 <sup>ab</sup>	0.071	0.025 <sup>a</sup>	0.012	0.093 <sup>bc</sup>	0.083	0.157 <sup>a</sup>	0.163	0.101 <sup>ab</sup>	0.127	0.060 <sup>bc</sup>	0.044	0.044 <sup>cd</sup>	0.059
Acido lattico	***	26.1 <sup>a</sup>	6.7	17.9 <sup>a</sup>	4.9	14.8 <sup>a</sup>	3.8	24.6 <sup>ab</sup>	3.8	22.7 <sup>ab</sup>	5.3	9.7 <sup>a</sup>	1.9	17.8 <sup>a</sup>	5.2
Acido formico	ns	nr	-	nr	-	0.007	0.026	0.010	0.030	0.039	0.136	0.032	0.112	0.036	0.146
Acido acetico	***	0.835 <sup>a</sup>	0.352	0.331 <sup>bc</sup>	0.271	0.737 <sup>a</sup>	0.386	0.195 <sup>a</sup>	0.403	0.583 <sup>ab</sup>	0.657	0.158 <sup>a</sup>	0.142	0.316 <sup>bc</sup>	0.316
Acido propionico	***	1.7 <sup>a</sup>	1.1	0.435 <sup>a</sup>	0.281	0.433 <sup>b</sup>	0.401	0.380 <sup>b</sup>	0.948	0.448 <sup>b</sup>	0.479	0.034 <sup>a</sup>	0.027	0.295 <sup>bc</sup>	0.303
Acido isobutirrico	-	nr	-	nr	-	nr	-	nr	-	nr	-	nr	-	nr	-
Acido butirrico	***	0.154 <sup>b</sup>	0.119	0.118 <sup>bc</sup>	0.083	0.320 <sup>a</sup>	0.296	0.064 <sup>bc</sup>	0.071	0.112 <sup>bc</sup>	0.100	0.013 <sup>a</sup>	0.043	0.124 <sup>bc</sup>	0.163
Acido isovalerico	***	0.043 <sup>a</sup>	0.114	0.188 <sup>bc</sup>	0.154	0.425 <sup>a</sup>	0.437	0.334 <sup>ab</sup>	0.729	0.186 <sup>bc</sup>	0.191	0.020 <sup>a</sup>	0.047	0.153 <sup>bc</sup>	0.185
Acido valerico	ns	0.798	1.5	0.647	0.731	0.789	1.1	0.483	0.622	0.329	0.673	0.289	0.604	0.739	1.2
Acido ippurico	ns	nr	-	nr	-	nr	-	nr	-	nr	-	0.004	0.003	0.001	0.001
Acido urico	ns	0.001	0.001	0.003	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001

nr – non rilevato; ns – non significativo; \*\*\*  $P \leq 0.001$ ; a,b,c,d Medie sulle linee con uguale apice risultano uguali per  $p < 0.05$

La presenza di acidi grassi liberi a corta catena quali formico, acetico, propionico, butirrico, valerico ed isovalerico è strettamente dipendente dalla intensità delle fermentazioni batteriche che si sviluppano durante la stagionatura.

In particolare questi composti sono il risultato delle attività lipolitiche degli starter e della microflora secondaria del formaggio e ciò spiega la scarsa relazione nei formaggi esaminati fra questi composti ed il tempo di stagionatura.

L'acido formico presenta i valori maggiori nella Toma Piemontese DOP, nel Raschera DOP e nella Robiola di Roccaverano DOP il che può essere spiegato sia con la stagionatura sia con l'utilizzo di latte crudo da parte di quasi tutti i produttori. Il valore massimo di acido acetico risulta essere invece di 3.3 mg/g di formaggio fatto rilevare dalla Raschera DOP. Per quanto concerne invece gli acidi propionico, butirrico, valerico ed iso-valerico i valori massimi sono stati rispettivamente di 7.1, 1.4, 5.4 e 2.3 mg/g di formaggio.

Per quanto concerne l'acido urico la sua concentrazione massima raggiunge gli 0.1 mg/g di formaggio e quindi in accordo a quanto riportato da altri Autori (Lues *et al.*, 1998; Akalin *et al.*, 2002; Tormo e Izco, 2004; Park e Drake, 2005; Manolaki *et al.*, 2006; Park e Lee, 2006; Kinik e Gürsoy, 2004).

L'acido orotico oscilla invece fra gli 0 ed i 0.3 mg/g di formaggio e mentre la sua concentrazione nel latte dipende dalle origini delle vacche, dalla dieta e dallo stadio di lattazione nei formaggi non è stata definita una relazione con il tempo di stagionatura. Per alcuni Autori la concentrazione di acido orotico diminuirebbe nei prodotti stagionati a causa della sua utilizzazione da parte di numerosi batteri (Bouzas *et al.*, 1991; Park e Drake, 2005; Manolaki *et al.*, 2006) mentre per altri Autori la concentrazione aumenterebbe con la stagionatura (Akalin *et al.*, 2002). Infine per altri Autori la concentrazione di acido orotico sarebbe indipendente dal periodo di stagionatura (Lues *et al.*, 1998; Califano e Bevilacqua, 1999; Park e Drake, 2005). In questo lavoro sembra confermarsi questa terza ipotesi in quanto la concentrazione di acido orotico risulta non influenzata dal periodo di stagionatura.

Infine la concentrazione di acido ossalico varia da 0 a 0.7 mg/g di formaggio ed oltre a risultare simile a quelle riportate in bibliografia non evidenzia alcun legame con il tempo di stagionatura.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti oltre a confermare la grande importanza che hanno tutti i componenti esaminati nella caratterizzazione dei formaggi hanno evidenziato che, mentre l'evoluzione degli zuccheri è direttamente correlata al tempo di stagionatura, per gli altri composti le concentrazioni sono maggiormente dipendenti dalla tecnologia produttiva ed in particolare dall'utilizzo di colture starter. Molto elevata, nonostante si tratti di DOP, la variabilità compositiva che peraltro non impedisce la discriminazione dei prodotti stessi ed ascrivibile sia alla presenza di campioni artigianali sia ai Disciplinari di Produzione spesso troppo poco restrittivi nella definizione delle tecnologie utilizzabili.

## BIBLIOGRAFIA

- Adda J., Gripon J.C., Vassal L. (1982), *Food Chem.*, 9, 115-129.  
 Akalin A.S., Gönç S., Akbaş Y. (2002), *J. Dairy Sci.*, 85, 1670-1676.  
 Bouzas J., Kantt C.A., Bodyfelt F., Torres A.J. (1991), *J. Food Sci.*, 56, 276-278.  
 Califano A.N., Bevilacqua A.E. (1999), *Food Chem.*, 64, 193-198.  
 Coisson J.D., Arlorio M., Martelli A. (2000), *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 51(1), 38-49.  
 Faccia M., Gambacorta G., Lamacchia C., Di Luccia A. (2004), *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 55(1), 53-62.  
 Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guinee T.P. (2004), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, 3rd ed. Elsevier Ltd, London, UK.  
 Kinik Ö., Gürsoy O. (2004), *Milchwissenschaft*, 59(3/4), 169-171.  
 Lues J.F.R., Botha W.C., Smit E.J. (1998), *Food Res. Int.*, 31, 441-447.  
 Manolaki P., Katsiari M.C., Alichanidis E. (2006), *Food Chem.*, 98, 658-663.  
 Michel V., Martley F.G. (2001), *J. Dairy Res.*, 68, 317-325.  
 Papadakis E.N., Polychroniadou A. (2005), *Int. Dairy J.*, 15, 165-172.  
 Park Y.W., Drake M.A. (2005), *Small Rumin. Res.*, 58, 291-298.  
 Park Y.W., Lee J.H. (2006), *Small Rumin. Res.*, 63, 58-65.  
 Pattono D., Grassi M.A., Civera T., Turi R.M. (2001), *Industrie Alimentari*, 40, 1351-1355.  
 Tormo M., Izco J.M. (2004), *J. Chrom. A*, 1033, 305-310.  
 Urbach G. (1993), *Int. Dairy J.*, 3, 389-422.  
 Zeppa G., Conterno L., Gerbi V. (2001), *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2722-2726.  
 Zeppa G., Giordano M., Gerbi V., Arlorio M. (2003), *Lait*, 83, 167-173.  
 Zeppa G., Tallone G., Giordano M., Rolle L., Gerbi V. (2003), *Sci. Tecn. Latt. Cas.*, 54(2), 95-109.  
 Zeppa G., Tallone G., Rolle L., Bertolino M., Gerbi V. (2005), *Quaderni IASMA*, 1, 37-49.