



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELL'ELABORATO

Formaggi a Caglio Vegetale: Caratterizzazione del
profilo volatile

*Cheeses with a Vegetable Rennet: Characterization of the volatile
profile*

TIPO TESI: Sperimentale

Studente:

ALESSANDRO REMIA

Relatore:

DOTT.SSA ROBERTA FOLIGNI

Correlatore:

DOTT.SSA CINZIA MANNOZZI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

SOMMARIO

SOMMARIO	1
ELENCO DELLE TABELLE	3
ELENCO DELLE FIGURE.....	4
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	5
CAPITOLO 1 FORMAGGI PORTOGHESI COAGULATI CON CAGLIO VEGETALE	7
1.1 <i>Il latte di pecora</i>	7
1.2 <i>Processo produttivo del formaggio</i>	7
1.3 <i>Le diverse tipologie di coagulanti</i>	8
1.3.1 Il caglio di origine vegetale:.....	8
1.3.2 Il caglio di origine animale:.....	9
1.3.3 Caglio microbico	9
1.4 <i>La nascita delle denominazioni di origine</i>	10
1.4.1 <i>Costi e benefici delle denominazioni di origine</i>	11
1.5 <i>Le molecole aromatiche</i>	12
1.6 <i>Microestrazione in fase solida, gascromatografia, spettrometria di massa (SPME/GC/MS)</i>	12
1.6.1 <i>Microestrazione in fase solida (SPME)</i>	12
1.6.2 <i>La gascromatografia</i>	13
1.6.3 <i>Il cromatogramma</i>	16
1.6.4 <i>Il fattore di capacità o di ritenzione (K):</i>	17
1.6.5 <i>Gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS)</i>	18
1.6.6 <i>Spettrometro di massa (GC)</i>	19
1.6.7 <i>L'analizzatore quadrupolo</i>	20
CAPITOLO 2 PROVA SPERIMENTALE	22
2.1 <i>Materiali e metodi</i>	22
2.1.1 <i>Preparazione del campione</i>	22

2.1.2 Fase di analisi	23
2.1.3 Risultati finali	24
2.2 <i>Caratteristiche delle molecole individuate.</i>	28
2.2.1 Acidi carbossilici:.....	28
2.2.2 Esteri:	29
2.2.3 Composti carbonilici:	30
2.2.4 Alcoli:.....	31
CONCLUSIONI	32
BIBLIOGRAFIA	34

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1 Campioni analizzati e relativi pesi.....	23
Tabella 2 Composti volatili individuati nello spazio di testa nei campioni di formaggio "Castelo Branco".....	27

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1Foto di <i>Cynara cardunculus</i>	9
Figura 1-2: Simbolo delle Denominazioni d'origine protetta.	10
Figura 1-3SPME con la fibra in esposizione nello spazio di testa della vial.....	13
Figura 1-4 SPME nelle fasi di adsorbimento e desorbimento nel blocco iniettore. ..	13
Figura 1-5 Struttura forno del gascromatografo con all'interno la colonna.....	15
Figura 1-6 Schema semplificato della struttura di un gascromatografo.	16
Figura 1-7 Picco cromatografico con in evidenza: base, altezza e area totale.....	16
Figura 1-8 Tempo di ritenzione (t_r) e tempo morto (t_m) del picco.	17
Figura 1-9 Confronto tra due cromatogrammi. Sulla sinistra è possibile osservare come i picchi siano caratterizzati da bassa selettività ed efficienza, a destra viceversa osserviamo dei picchi ad alta selettività ed efficienza.....	18
Figura 1-10Gascromatografo accoppiato allo spettrometro di massa.	18
Figura 1-11 Rappresentazione del funzionamento di un detector a quadrupolo	21
Figura 1-12 Schema semplificato dello spettrometro di massa.	21
Figura 2-3 Struttura base acido carbossilico.....	28
Figura 2-4 Molecola di Acido Betulinico	29
Figura 2-5 Struttura base estere.	29
Figura 2-6 Aldeidi e chetoni con evidenziato il gruppo carbonilico in rosso.....	30
Figura 2-7 Molecola: 2-metil-1-propanolo. Figura 2-8 Molecola: 2-metil-1-propanolo.	31

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare il profilo volatile di 22 campioni di formaggi Portoghesi coagulati con caglio vegetale attraverso una microestrazione in fase solida e successiva analisi attraverso la gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa. I 22 campioni sono stati prelevati da 3 tipologie di formaggi: “Queijo da Beira Baxa Dop (Castelo branco)”, “Queijo de Nisa Dop” e “Queijo Serra da Estrela”. Tra queste 3 tipologie il seguente studio è maggiormente incentrato sul formaggio “Queijo da Beira Baxa Dop (Castelo branco)”.

Il formaggio “Castelo Branco” è un formaggio tradizionale portoghese DOP, stagionato 40 giorni, a base di latte crudo che viene fatto coagulare con l’estratto di *Cynara cardunculus*. La differenza tra i vari tipi di caglio è relativa alle origini e alle modalità di estrazione; il caglio animale, ad esempio viene ricavato dallo stomaco di animali ruminanti (lattanti), prevalentemente agnelli e vitelli, questo perché gli esemplari di giovane età posseggono alte concentrazioni di chimosina, necessaria loro per la digestione del latte materno, il caglio vegetale invece viene ricavato da alcune piante come il fico ed il cardo selvatico. Dopo la coagulazione del latte con l’estratto di *Cynara cardunculus*, ad una temperatura di 30°C per 15-25 minuti, la cagliata viene scolata leggermente e posta in stampi per la pressatura, successivamente verrà salata attraverso un metodo tradizionale. La lipolisi del formaggio da parte di microrganismi e lipasi autoctone è un fenomeno importante per lo sviluppo del sapore e dell’aroma durante la stagionatura del formaggio. Questo prodotto ha ottenuto la Dop (Denominazione di origine protetta) nel 1994, essa designa un prodotto originario di una regione e di un paese le cui qualità e caratteristiche sono essenzialmente, o esclusivamente, dovute all’ambiente geografico (Ferreira et al., 2009). L’acquisizione delle denominazioni da parte dei prodotti alimentari, secondo l’articolo 4 del regolamento (CE) 1151/2012, hanno come obiettivo di garantire una giusta remunerazione per le qualità dei propri prodotti, garantendo una protezione dei nomi in quanto diritto di proprietà intellettuale sul territorio dell’unione fornendo così anche informazioni chiare al consumatore sulle proprietà che conferiscono valore aggiunto ai prodotti. I formaggi prodotti con latte di pecora e capra coagulati con caglio vegetale hanno ancora una nicchia di mercato importante in Portogallo e sono sempre più richiesti per la loro unicità organolettica. I più eccezionali sono: Castelo Branco, Évora, Nisa, Serpa e Serra da Estrela, per i quali il latte viene coagulato con un coagulante vegetale senza aggiunta deliberata di alcuna coltura microbica starter (sono definite colture starter, l’inoculo di microrganismi intenzionalmente aggiunto alla materia prima, che hanno il ruolo di avviare e guidare, il processo di trasformazione e assicurarne l’esito tecnologico producendo principalmente acido lattico) o non starter (il loro scopo è quello di produrre dei cambiamenti organolettici e biochimici nel formaggio). Il coagulante viene ricavato dall’estratto acquoso dei fiori di *Cynara*

cardunculus, una specie di cardo imparentato con il carciofo, che si trova nelle zone aride e pietrose a sud del Portogallo (Pintado et al., 2010). Durante la preparazione di questo caglio, sono molti i fattori che possono influenzare la sua attività di coagulazione. L'eccessiva natura proteolitica dei coagulanti vegetali può influire negativamente sul processo di caseificazione e causare una riduzione della resa del formaggio. Le sue proteasi (aspartiche) hanno una specificità molto ampia nella scissione di legami peptidici, permettendo una proteolisi delle caseine del latte in peptidi di medie e piccole dimensioni (Tripaldi et al., 2021).

Capitolo 1

FORMAGGI PORTOGHESI COAGULATI CON CAGLIO VEGETALE

1.1 *Il latte di pecora*

Per la preparazione del formaggio portoghese “Castelo branco” viene utilizzato il latte di pecora (razza Merino).

Le pecore vengono allevate in condizioni controllate e secondo metodi tradizionali.

Aliquote di latte di ciascuna razza sono state prelevate prima della produzione del formaggio per analisi chimico-fisiche e microbiologiche (Ferreira et al., 2009).

Le produzioni casearie ovine vengono considerate di altissima qualità, principalmente per l'utilizzo del latte ovino prodotto seguendo metodi tradizionali tramandati negli anni.

Le caratteristiche indistinguibili di questo latte rispecchiano quelle dell'ambiente naturale in cui pascolano le pecore, che garantisce un'elevata qualità del nutrimento, esso influisce positivamente sulla salute degli animali, trasmettendo tali benefici al prodotto finale.

1.2 *Processo produttivo del formaggio.*

Il formaggio “Castelo branco” viene prodotto attraverso una prima fase di coagulazione, dove solitamente vengono fatti coagulare 25 litri di latte con l'estratto vegetale (di origine artigianale) di *Cynara cardunculus*.

Per la produzione artigianale dell'estratto vegetale, vengono mescolati 5 grammi di fiori con 95 millilitri di acqua, con una successiva fase di riposo (di circa 1 ora) per consentire un aumento della porzione estratta.

Solitamente l'estratto vegetale viene utilizzato in proporzione di 5 millilitri di estratto ogni 25 litri di latte.

La cagliata risultante da tale processo viene tagliata, scolata leggermente e poi posta in stampi, dove viene pressata per favorire lo spurgo del siero residuo. I formaggi vengono successivamente salati dopo la sformatura, lasciandoli per circa 20 ore all'interno di una soluzione satura di NaCl.

1.3 *Le diverse tipologie di coagulanti.*

Il caglio anche definito “presame”, viene utilizzato per la produzione di formaggio. Esso è ricco di enzimi che permettono la coagulazione delle caseine. La coagulazione “presamica” è una coagulazione determinata dall’aggiunta del caglio. Può avere diverse origini: animale, vegetale e microbica. Nel corso degli ultimi anni si sta cercando un caglio alternativo a quello di origine animale, nonostante risulti essere ancora il migliore dal punto di vista della coagulazione.

1.3.1 *Il caglio di origine vegetale:*

Il caglio di origine vegetale sta diventando un prodotto sempre più richiesto per la produzione di varie tipologie di formaggi, per una crescente richiesta di prodotti vegetariani, ma anche perché la continua richiesta di caglio di origine animale che rende difficile la sua reperibilità in commercio. Nonostante il suo utilizzo sia stato rivalutato da poco, quella della coagulazione a partire da matrici vegetali è una metodologia antica, tradizionale dell’area mediterranea. Gli antichi Romani utilizzavano il caglio vegetale per produrre dei formaggi freschi da consumare in pochi giorni. Lo studio (Tripaldi et al., 2021) si è occupato di verificare la qualità e le tempistiche di coagulazione del latte a partire dal caglio vegetale attraverso l’utilizzo del “Formagraph”.

Il formagraph è uno strumento capace di misurare l’attitudine alla coagulazione del latte, il suo funzionamento si basa sul movimento di piccoli pendoli che oscillano linearmente mentre sono immersi in un campione di latte. A partire dalle piante: Fico, Papaya e Cardo utilizzando le loro radici, semi e fiori sono state estratte diverse tipologie di proteasi tra cui ficina, cardosina e papaina. Il caglio vegetale ha la capacità di idrolizzare la κ -caseina portando alla formazione della cagliata.

Il caglio vegetale viene maggiormente utilizzato per la produzione di formaggi prodotti a partire da latte di pecora e di capra. Analizzando il caglio ottenuto dal cardo si è venuti a conoscenza che la sua capacità coagulante è molto simile a quella del caglio animale. La frazione proteica del latte è costituita da caseine che si aggregano fra di loro e formano le micelle, tra le principali caseine troviamo le β caseine che sono altamente idrofobiche e le κ caseine che sono leggermente idrofile.

L’estratto del cardo possiede due enzimi: la cardosina A e cardosina B che in termini di idrolisi hanno proprietà simili a quelle della chimosina e della pepsina trovate nel caglio animale.

La produzione di formaggio a partire dal caglio vegetale non è ancora molto diffusa a livello industriale, per cui per assaggiare un formaggio totalmente vegetariano è necessario recarsi presso piccoli produttori artigianali e locali, che spesso conservano ricette antiche.

L’articolo (Tripaldi et al., 2021) ci fornisce delle informazioni sul metodo di preparazione del caglio vegetale a partire dai fiori di *Cynara cardunculus*, raccolti in delle piante che sono state coltivate a Roma. I fiori di *Cynara cardunculus* vengono raccolti nel periodo di maturazione, essiccati in un ambiente fresco ed asciutto per un periodo di circa 3 settimane (metodo di essiccazione lenta), i pistilli, vengono separati

dai fiori e sottoposti ad un trattamento termico a 120°C per circa 15, definito come tostatura. Secondo l'articolo (Cardinali et al., 2021) l'utilizzo del caglio derivante dal cardo, oltre a stimolare la coagulazione del latte, può anche migliorare le proprietà aromatiche e tecnologiche dei formaggi esercitando un'azione antimicrobica e antiossidante. Viene anche evidenziato che i formaggi prodotti con caglio vegetale sono più digeribili e aromatizzati rispetto a quelli ottenuti con caglio animale.



Figura 1-1 Foto di *Cynara cardunculus*.

1.3.2 Il caglio di origine animale:

Il caglio in pasta, d'agnello e di capretto, è utilizzato nella produzione di alcuni formaggi. Nel caso dei formaggi "tradizionali" il caglio in pasta utilizzato può essere di produzione artigianale.

Le caratteristiche sensoriali, quali gusto ed aroma, che contribuiscono alla tipicità di questi prodotti, vengono influenzate dal corredo enzimatico del caglio in pasta utilizzato, in particolare dal contenuto in enzimi lipolitici. Nei ruminanti gli enzimi lipolitici sono secreti nella regione retrolinguale, nella regione pancreatica, in quella epatica e sono presenti anche sulla parete dell'abomaso.

Le conoscenze attuali sulla composizione e sulle caratteristiche della frazione enzimatica sono ancora parziali e riguardano soprattutto quella proteolitica, composta principalmente da chimosina e pepsina.

La presenza, la quantità e la composizione degli enzimi presenti nel caglio in pasta risentono di molti fattori. In particolare, le caratteristiche del caglio in pasta di produzione artigianale sono strettamente correlate alle tecniche d'allevamento e di macellazione degli animali, nonché al metodo di preparazione, stagionatura, conservazione ed utilizzazione del caglio.

Inoltre, il sistema lipolitico, proprio del caglio in pasta, è unico nel determinare un'evoluzione del gusto e dell'aroma del formaggio tipica ed armonica, che non è riproducibile utilizzando miscele di caglio liquido e/o lipasi di diversa natura. Emerge con chiarezza quindi l'importanza che questo tipo di coagulante ha nel determinare la tipicità dei prodotti che ne prevedono l'impiego (Carbone et al., 2008).

1.3.3 Caglio microbico

Esso rappresenta una valida alternativa al caglio animale, è un prodotto più economico e facilmente reperibile rispetto al caglio di origine vegetale, poiché viene prodotto attraverso un semplice processo fermentativo che consente di ottenere un quantitativo elevato di prodotto ad un prezzo molto più conveniente, senza tralasciare che la sua origine viene maggiormente apprezzata dai consumatori vegetariani e vegani. Le proteasi vengono estratte principalmente dalle muffe: una delle prime utilizzate come sostituto al caglio di origine vegetale è stata *Rhizomucor miehei* (muffa termofila del suolo); *Rhizomucor pusillu* (muffa mesofila del suolo) e *Cryphonectria parasitica*. Tali preparati commerciali vengono venduti sterili, e per la loro commercializzazione

è necessario superare rigidi controlli tossicologici per verificare la possibile presenza indesiderata di antibiotici e aflattossine. Possiamo trovare anche i cagli microbici modificati che prevedono l'utilizzo di microrganismi geneticamente modificati come *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Kluyveromyces lactis* ed *Escherichia coli* da cui si riescono a ricavare ottimi coagulanti (Fiorucci et al. 2021).

1.4 La nascita delle denominazioni di origine.



Figura 1-2: Simbolo delle Denominazioni d'origine protetta.

Le nazioni che godono di maggiori tradizioni gastronomiche insieme alla comunità europea hanno introdotto da tempo le indicazioni geografiche al centro delle proprie politiche ambientali, consumeristiche e di consumo rurale arricchendo gli istituti giuridici di base con funzioni differenti da quelle proprie dell'area privatistica da cui sono nate.

Oltre che dare una distinzione importante ai prodotti sul mercato, le denominazioni danno delle disposizioni dedicate alle indicazioni geografiche attribuendo ai singoli prodotti il compito di comunicare valori storici, culturali e ambientali favorendo attraverso il così detto *premium price* il riconoscimento da parte del consumatore della conservazione di tradizioni antiche.

La crescente necessità di tutelare il consumatore nel momento dell'acquisto ha incentivato ulteriormente lo sviluppo di forme di comunicazione che garantiscono maggiore trasparenza sull'origine degli alimenti, sui loro contenuti intrinseci e sulla loro storia produttiva.

La convenzione d'Unione di Parigi del 1883 inserisce per la prima volta le indicazioni geografiche in uno strumento pattizio di ampio respiro, finalizzato alla tutela dei diritti di proprietà industriale.

La protezione accordata a questa tipologia di diritti è debole e contraddittoria: infatti il testo mostra delle incertezze sulla qualificazione giuridica di questi strumenti di comunicazione, omettendo di darne una definizione.

Citando le "*indications of source*" e le "*appellations of origin*" tra quelli che sono gli ambiti di tutela delle proprietà industriali la convenzione mostra poca sensibilità per le caratteristiche di istituti in realtà molto differenti tra di loro.

Le prime diciture riportate in etichetta come il *made in* non dovrebbero essere incluse nelle proprietà intellettuale/industriale, essendo del tutto inadatte a costituirne i diritti ed esplicitarne le funzioni.

Il loro unico scopo era infatti quello di informare il consumatore sul luogo di fabbricazione del prodotto o sull'origine della materia prima, senza tuttavia investire la natura intrinseca del prodotto o il suo legame con il territorio.

Contrariamente le denominazioni di origine propriamente dette forniscono informazioni più complete e dettagliate al consumatore sulla qualità del prodotto che sta acquistando, legandosi a dei fattori ambientali o tradizionali che hanno riscosso un elevato interesse sul mercato.

Esse hanno quindi una vera e propria funzione distintiva nei confronti di altri prodotti simili, costituendone il nucleo comune di tutti i diritti di proprietà intellettuale/industriale connessi all'identificazione del prodotto o dell'azienda. (Vittorio et al., 2007).

1.4.1 *Costi e benefici delle denominazioni di origine*

Le Denominazioni hanno dei costi che possono essere suddivisi in diverse categorie:

- *Costi preliminari*: insieme di costi sostenuti per ottenere la protezione della Denominazione, sono dei costi fissi che non dipendono dal numero delle imprese e dal volume di produzione.
- *Costi diretti*: sono dei costi che sono collegati alle attività di controllo per verificare la corretta esecuzione del disciplinare, la cui entità è funzione di molte variabili, come la tipologia del prodotto e del processo produttivo, volumi prodotti dalle singole imprese e struttura della filiera.
- *Costi indiretti*: Sono dei costi legati all'adattamento strutturale e operativo che bisogna sostenere per il rispetto del disciplinare, che riguardano l'impresa (es. aumento del costo delle materie prime) e il sistema nel suo complesso (es. creazione di sistemi collettivi di supporto).
- *Costi di non conformità*: Sono dei costi legati al mancato collocamento sul mercato dei prodotti non conformi allo standard qualitativo.

Bisogna considerare anche dei *costi complementari*, derivanti dalla realizzazione di attività promozionali e di verificare il corretto uso della denominazione. Questi sono dei costi sostenuti da delle organizzazioni collettive e/o istituzioni pubbliche, inoltre troviamo i *costi di esclusione*, ovvero, costi che derivano dal fatto che alcune imprese che producevano in passato il prodotto tipico prima dell'ottenimento della denominazione non hanno la possibilità di adattarsi al disciplinare.

Naturalmente l'adattamento alle denominazioni porta anche degli aspetti positivi.

Infatti l'ottenimento della denominazione porta un aumento del prezzo di vendita del prodotto grazie alla presenza del logo di riconoscimento che costituisce una sorta di protezione per il consumatore, evitando di comprare prodotti analoghi ma non riconosciuti a livello disciplinare. Un'indagine condotta su 45 imprese nel 2005 ha smentito tale beneficio, infatti è stata valutata la reale redditività derivante dal marchio Dop; oltre il 25% delle imprese dichiara che l'impiego della Denominazione non è remunerativo nel breve periodo, mentre un terzo delle imprese sostiene che i ricavi riescano solo a pareggiare i costi.

Tra gli altri effetti positivi troviamo:

- Garanzia fornita sulle caratteristiche del prodotto verso coloro che hanno una conoscenza del sistema sottostante il Reg. CE 510/06, a oggi diffusa maggiormente presso i clienti intermedi “professionali” piuttosto che finali;
- Crescita della qualità aziendale grazie all’adozione dei disciplinari di produzione;
- Qualificazione complessiva dell’offerta che utilizza il prodotto Dop come una medaglia.

Tutto questo può portare all’apertura di nuovi mercati per l’azienda o anche il consolidamento dei canali commerciali esistenti.

Bisogna non sottovalutare che si avranno anche dei vantaggi dal punto di vista collettivo, poiché le denominazioni sono uno strumento atto a sostenere dei processi di sviluppo locale, dando una maggiore visibilità al territorio e accrescendo il senso di consapevolezza dei soggetti che fanno parte della filiera del prodotto (Giovanni et al., 2007).

1.5 *Le molecole aromatiche*

Gli “aromi” sono quella classe di molecole che abbiamo la capacità di percepire in maniera specifica per via olfattiva e retro nasale, mentre i “sapori”, vanno a determinare la consistenza e permanenza di tali sostanze, presenti all’interno di un ingrediente, cibo o bevanda.

Alcuni studi sulle note odorose, in particolare sui terpenoidi, hanno stimolato l’interesse di molti paesi. Attraverso delle analisi specifiche si può determinare la concentrazione delle molecole che caratterizzano il tipico odore di formaggio e anche i fattori che ne determinano il suo aspetto qualitativo. Il problema nel determinare, quale di quelle molecole contribuisca in maniera più o meno significativa nell’odore finale del formaggio, è derivante dal fatto che ci sono centinaia di molecole con una soglia di percezione molto diversa, spesso anche nell’ambito di una stessa molecola. La dieta degli animali, risulta essere un fattore determinante per ottenere delle caratteristiche sensoriali migliori nel prodotto finale (Rubino, 2019).

1.6 *Microestrazione in fase solida, gascromatografia, spettrometria di massa (SPME/GC/MS)*

1.6.1 *Microestrazione in fase solida (SPME)*

Sviluppata da Janusz Pawliszyn e alcuni suoi collaboratori presso l’Università di Waterloo in Ontario, è una tecnica che si basa sull’adsorbimento e desorbimento di molecole volatili provenienti da un campione solido o liquido, prelevate dallo spazio di testa di vials con tappo perforabile.

L’SPME è costituita da un filamento corto e sottile di silice fusa (lunga solitamente un centimetro) rivestita da un polimero con proprietà adsorbente fissata ad un supporto di metallo, la fibra presenta un’elevata fragilità, per tale motivo è necessario, durante le operazioni di inserimento e estrazione, mantenerla all’interno del supporto.

Ogni fibra presenta il massimo rendimento intorno alle 100 iniezioni, la sua continua esposizione ad elevate temperature e manipolazione, ne determineranno l'usura e la continua diminuzione delle proprietà adsorbenti.

Il tempo d'esposizione viene determinato in base al tipo di campione e analisi da effettuare, solitamente, le vials vengono mantenute in un bagnetto ad una determinata temperatura per agevolare la volatilizzazione delle molecole e favorire maggiormente il fenomeno dell'adsorbimento.

Essa verrà successivamente inserita nel blocco iniettore del gascromatografo, che permetterà, grazie all'elevate temperature, il desorbimento delle molecole volatili e successiva immissione in circolo nella colonna gascromatografica, trasportata attraverso l'ausilio della fase mobile (Sparkman et al., 2011)

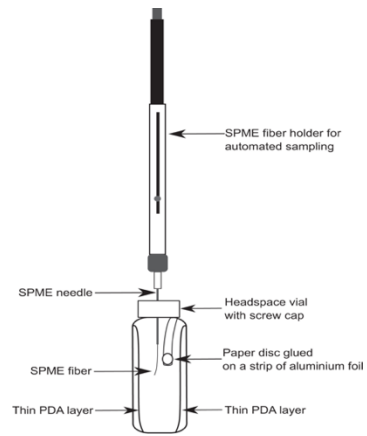


Figura 1-3 SPME con la fibra in esposizione nello spazio di testa della vial.

1.6.2 La gascromatografia

La gascromatografia è una tecnica introdotta da James nel 1952.

Permette effettuare le analisi gascromatografiche attraverso l'utilizzo di uno strumento chiamato gascromatografo, costituito da diversi componenti.

Nel nostro caso, il suo scopo era quello di desorbire le molecole aromatiche dalla fibra dell'SPME all'interno del blocco iniettore, una volta che le molecole si saranno separate seguirà la ripartizione dei componenti in una colonna gascromatografica.

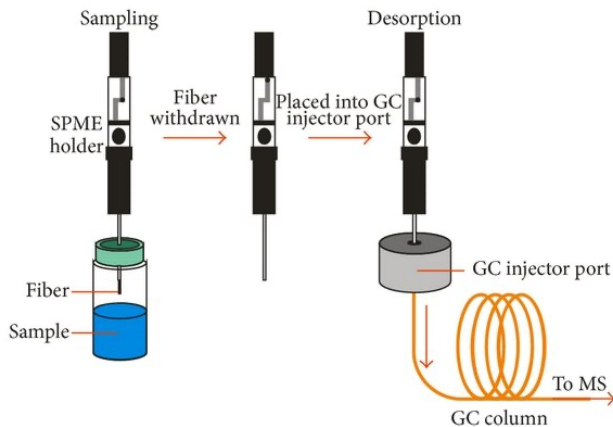


Figura 1-4 SPME nelle fasi di adsorbimento e desorbimento nel blocco iniettore.

Grazie alle elevate temperature che vengono raggiunte all'interno del blocco iniettore (superiori a 150 C°) le molecole precedentemente adsorbite dalla fibra, vengono desorbite per poi andare in circolo nella colonna gascromatografica grazie all'ausilio della fase mobile gassosa (Elio, Argon, Azoto o Idrogeno).

Vi sono diverse tipologie di iniettori:

- *Split*: Il campione ancora adeso alla fibra viene vaporizzato, una parte del campione entra nella colonna trasportato dalla fase mobile ed in parte viene mandato in una camera polmone, situata lateralmente, attraverso una valvola

di split regolabile e espulso all'esterno. Solitamente esso viene usato per alte concentrazioni di campione.

Tra i diversi vantaggi nell'utilizzare questo tipo di iniettore: permette di usare un campione più termolabile poiché il tempo di permanenza del campione nell'iniettore è molto basso, si devono ottimizzare pochi parametri e i tempi di analisi tendono ad essere più brevi.

- *Splitless*: con questo tipo di iniettore il campione viene vaporizzato e veicolato direttamente in colonna dalla fase mobile. Differentemente dal precedente la valvola di split è chiusa. Solo dopo un determinato periodo di tempo (chiamato tempo di spurgo, solitamente 30/60 secondi) viene aperta la valvola per spurgare il solvente dall'iniettore.

Gli analiti del campione vengono depositati sulla testa della colonna e la maggior parte del solvente volatile viene scaricato. Per evitare la perdita del nostro analita volatile, il punto di ebollizione del solvente deve essere di almeno 20°C al di sotto della temperatura più bassa di ebollizione del componente volatile. All'aumentare della temperatura della colonna, gli analiti iniziano a muoversi dalla fase stazionaria.

Tra i diversi svantaggi che caratterizzano questo tipo di iniettore è l'elevato tempo di permanenza dell'analita nell'iniettore, questo comporterà una degradazione delle molecole più termolabili, inoltre, bisogna utilizzare un solvente compatibile con la colonna per evitare analisi inefficienti.

- *Split/splitless*: è uno degli iniettori più antichi e più comunemente utilizzato. Esso funziona in due modi differenti: *metodo split e splitless*. La scelta del metodo più idoneo è dipesa dalla concentrazione del campione sull'SPME. Entrambi i metodi sono basati su di un'iniezione a caldo in condizioni isoterme, ovvero, l'iniettore è impostato ad una temperatura sufficientemente alta per favorire il desorbimento degli analiti dalla fibra. Questo tipo di iniettore permette di utilizzare entrambe le tecniche precedentemente citate, variando solo il montaggio di un inserto (liner in vetro).

La separazione dei componenti durante la corsa cromatografica dipende dalla distribuzione (ripartizione) di ciascun componente tra la fase mobile (gas vettore) e la fase stazionaria. Un componente che spende poco tempo nella fase stazionaria si dice che eluisce rapidamente.

Una volta che il campione è stato desorbito dalla fibra e trasportato in circolo dalla fase mobile, arriva alla colonna cromatografica che è situata all'interno di una camera termostata che mantiene cicli di durata variabile a temperatura fissa.

La colonna gascromatografica permette, grazie alla fase stazionaria contenuta al suo interno, la separazione dei componenti volatili, che vengono trasportati dalla fase mobile, essi durante la corsa interagiranno con la fase stazionaria aumentando la durata del loro percorso. La fase stazionaria tende a dividere i composti in base al loro punto di ebollizione.

Le temperature raggiunte durante la corsa cromatografica e i tempi di mantenimento di tali temperature, vengono precedentemente impostate attraverso l'ausilio di un software dedicato, che consente una serie di cicli di lavoro in condizioni isoterme, facendo dei salti di 4/20 °C al minuto, permettendo ai composti con temperatura di ebollizione più alta di venire rilasciati dalla fase stazionaria.

Le temperature di lavoro sono molto importanti, poiché comportano una riduzione dei tempi di ritenzione (tempo impiegato da ciascuna sostanza per eluire dalla colonna, che viene misurato a partire dal momento in cui la miscela viene introdotta nello strumento, fino al momento in cui si misura il picco massimo) e aumenta la velocità di raggiungimento dell'equilibrio tra la fase stazionaria e quella mobile, inoltre, la velocità con cui si passa da una temperatura ad un'altra può causare una riduzione dei tempi di analisi e un cambiamento nell'ordine di uscita degli analiti.

Esistono due tipologie di colonne utilizzate nella gascromatografia:

- *Impaccate*: solitamente di vetro o acciaio con un diametro variabile tra i 2 e 4 millimetri e una lunghezza massima di 4 metri, riempite di un materiale inerte che funge da supporto per la fase stazionaria, sul quale è distribuita una pellicola sottile
- *Capillari*: presentano un diametro di circa 0.1/0.8 millimetri, con una lunghezza di anche 100 metri, costruite in acciaio inox, vetro o silice.



Figura 1-5 Struttura forno del gascromatografo con all'interno la colonna.

Una volta giunti al termine della colonna cromatografica, gli analiti vengono rivelati da un detector che li determina grazie alla variazione di un parametro ottico o elettrico oppure come nel nostro caso può ritrovarsi accoppiato ad uno spettrometro di massa che avrà la funzione di un detector.

I rilevatori maggiormente utilizzati sono:

- *Rilevatori a termoconduttività*: costituiti da delle resistenze elettriche la cui conducibilità elettrica dipende dalla temperatura a cui si trovano, l'analita viene determinato in seguito ad uno sbilanciamento elettrico.
- *Rilevatore a ionizzazione di fiamma*: basato sulla capacità di ionizzazione delle sostanze uscenti dalla colonna da parte di una microfiamma.
- *Rilevatore a cattura di elettroni*: Basato sulle proprietà di isotopi radioattivi (Nichel 63) di emettere degli elettroni ad elevata energia.

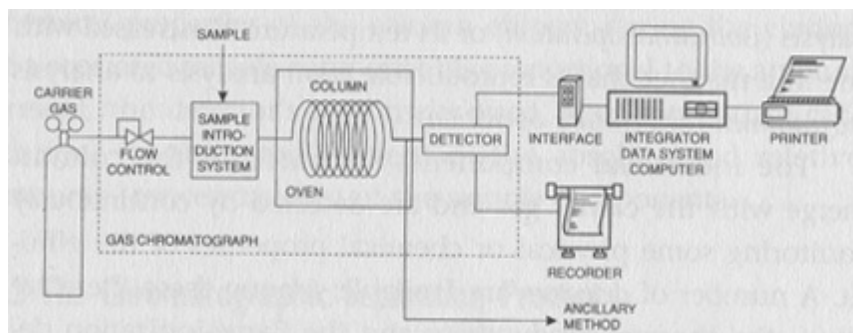


Figura 1-6 Schema semplificato della struttura di un gascromatografo.

Il risultato della corsa gascromatografica verrà fornita sottoforma di cromatogramma, ovvero, descrive l'andamento del segnale del rivelatore in funzione del tempo, partendo dall'istante in cui l'analita viene introdotto nella colonna. Ogni cromatogramma è formato da dei precisi picchi cromatografici che descrivono molecole specifiche (Sparkman et al., 2011).

1.6.3 Il cromatogramma

A seguito dell'uscita delle varie sostanze dalla colonna, viene generato un cromatogramma caratterizzato da una successione di picchi specifici.

Viene descritto l'andamento del segnale da parte del rivelatore in funzione del tempo. Una volta che l'analita è stato captato dal rivelatore il segnale si definirà in uno specifico picco cromatografico.

Idealmente un picco ha una forma gaussiana, che viene definita da tre aspetti:

- Altezza del picco: determinata dal segmento tangente alla linea di base fino al punto di massimo del picco
- Area totale: ne definisce la concentrazione
- Larghezza (W): definita dal segmento che va tra i 2 flessi della curva e la linea di base

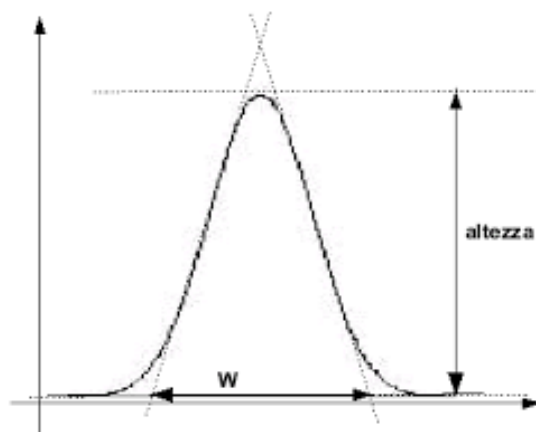


Figura 1-7 Picco cromatografico con in evidenza: base, altezza e area totale.

Le sostanze durante la corsa gascromatografica vengono ripartite tra le due fasi, quella mobile e quella stazionaria, secondo una costante che prende il nome di *costante di distribuzione o ripartizione* ($K = C_s/C_m$):

- C_s : concentrazione analitica molare del soluto nella fase stazionaria.
- C_m : concentrazione analitica molare nella fase mobile.

La costante ν a determinare la velocità di migrazione degli analiti.

Naturalmente due analiti differenti avranno coefficienti diversi e questo determina un tempo di permanenza in colonna completamente differente (K_z diverso da K_x).

Ogni colonna ha un proprio *fattore di separazione* che ne definisce la propria tendenza a dare dei picchi ben separati, esso è il rapporto tra il tempo di ritenzione delle 2 sostanze ($F_s = K_z/K_x = T_z/T_x$).

Il *tempo di ritenzione* è definito come il tempo impiegato da ciascuna sostanza per eluire dalla colonna, viene misurato partendo dal tempo zero, ovvero, dal momento in cui la sostanza viene introdotta nella colonna, fino al momento della registrazione del picco massimo.

Possiamo definire anche il *tempo morto*, ovvero, il tempo di ritenzione di una sostanza non trattenuta dalla fase stazionaria.

La differenza tra il tempo di ritenzione e il tempo morto ne definisce il *tempo di ritenzione corretto* di un certo componente in una colonna.

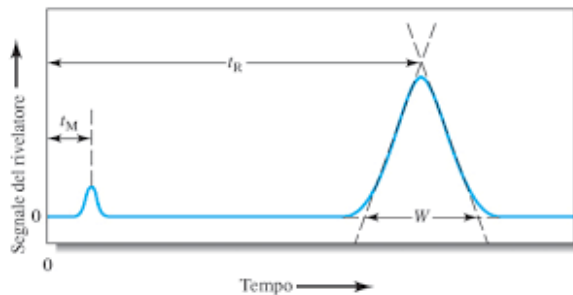


Figura 1-8 Tempo di ritenzione (t_r) e tempo morto (t_m) del picco.

1.6.4 Il fattore di capacità o di ritenzione (K):

$$K = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Per dei valori piccoli di K , risulta che i composti eluiscono in prossimità del volume morto e di conseguenza la separazione risulta essere scarsa.

Elevati valori di K invece indicano una buona separazione, ma anche dei tempi lunghi di analisi con una riduzione di sensibilità e allargamento del picco.

Viene definita come *risoluzione* (R_s) di un cromatogramma, il grado di separazione dei picchi, che dipende dalla **selettività** (intesa come distanza tra i picchi) e dall'**efficienza** (larghezza dei picchi).

La risoluzione tra due picchi vicini tra di loro, si definisce attraverso il rapporto fra la differenza delle loro distanze e la semisomma delle rispettive larghezze.

Un metodo per incrementare la risoluzione è quello di aumentare la lunghezza della colonna e di conseguenza il numero dei piatti teorici.

Un fattore importante legato alla separazione dei componenti è il numero dei piatti teorici di una colonna cromatografica.

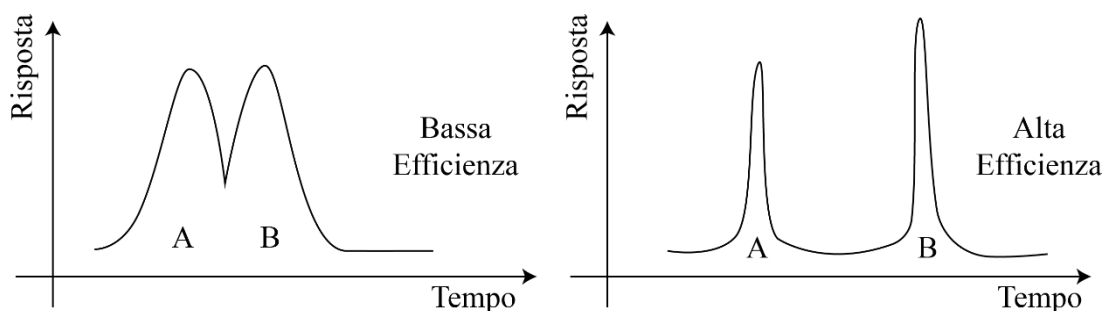


Figura 1-9 Confronto tra due cromatogrammi. Sulla sinistra è possibile osservare come i picchi siano caratterizzati da bassa selettività ed efficienza, a destra viceversa osserviamo dei picchi ad alta selettività ed efficienza

Il piatto teorico è la sezione dove si ottiene un equilibrio di ripartizione completo fra la fase mobile e quella stazionaria. Il numero di piatti teorici ne definisce la sua efficienza separativa.

1.6.5 Gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS).

L'interfaccia GC/MS avviene attraverso il collegamento del gascromatografo con lo spettrometro di massa, partendo dal termine della colonna gascromatografica fino all'ingresso nella camera di ionizzazione dello spettrometro di massa. Nella maggior parte dei casi, l'interfaccia che consente il collegamento del GC/MS è un tubo metallico riscaldato dotato di un termoregolatore.

Quindi il gas per passare dal gascromatografo allo spettrometro di massa, dovrà attraversare l'interfaccia riscaldata (Sparkman et al., 2011).

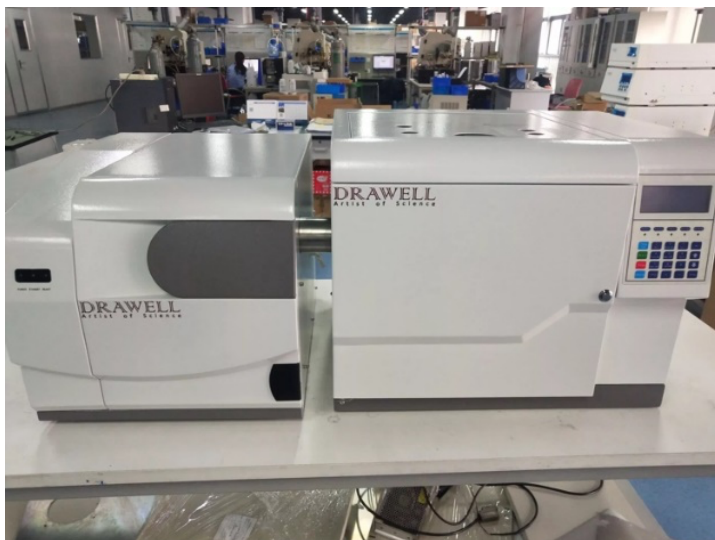


Figura 1-10 Gascromatografo accoppiato allo spettrometro di massa.

1.6.6 Spettrometro di massa (GC)

Lo spettrometro di massa descritto nei minimi dettagli nel libro (Sparkman et al., 2011) ha la capacità di frammentare le molecole volatili in uscita dal gascromatografo attraverso delle tecniche differenti a seconda della camera di ionizzazione utilizzata. Successivamente alla frammentazione si avrà la formazione di ioni caratteristici della molecola volatile, andando a costituire una sorta di impronta digitale della molecola. Lo spettrometro di massa separerà gli ioni in base al loro rapporto massa/carica (m/z). Tali ioni hanno la stessa composizione elementare della molecola di partenza, con un elettrone in più o in meno rispetto alla molecola originale. La loro successiva caratterizzazione comporterà la formazione del caratteristico spettro di massa, che vengono acquisiti uno dopo l'altro ad una velocità costante. Lo spettro di massa viene disegnato su di un piano cartesiano, che presenta lungo l'ascisse il rapporto della massa sulla carica (m/z) mentre sull'asse delle ordinate, troviamo la concentrazione relativa. Uno degli aspetti fondamentali per il corretto funzionamento della macchina, è che il percorso e la direzione di marcia degli ioni, dev'essere caratterizzato solo da campi elettrici o magnetici, per tale motivo è importante che il sistema lavori in condizioni di vuoto. Gli ioni durante il loro percorso non devono entrare in collisione con nessun'altra particella che possa far cambiare la loro direzione o frantumarli ulteriormente.

L'abbinamento del gascromatografo con lo spettrometro di massa, crea un sistema dinamico con una introduzione continua della fase mobile, per poter garantire il vuoto è necessario che la fase mobile introdotta venga continuamente rimossa mantenendo la pressione costante.

Il meccanismo che mantiene il vuoto è costituito da 2 componenti separati: la pompa a basso vuoto e la pompa ad alto vuoto.

Generalmente, minore è la pressione che si crea all'interno dello spettrometro di massa e migliori saranno le prestazioni del sistema.

Esistono diverse tipologie di ionizzazione utilizzabili con lo spettrometro di massa, il compito di una camera di ionizzazione è quello di investire la molecola in fase gassosa con un fascio di elettroni con una notevole energia cinetica con un conseguente urto e successiva ionizzazione in molecole cariche positivamente e negativamente. Spesso le macchine sono impostate per lavorare unicamente con ioni carichi positivamente, che si possono frammentare spontaneamente o per urto in una serie di frammenti di massa inferiore. Ogni molecola ha la sua frammentazione caratteristica. Il fascio di elettroni viene prodotto da una specifica sorgente ionica che varia in funzione della tecnica utilizzata, spesso prodotti da un filamento di tungsteno o renio. Le molecole non ionizzate vengono allontanate dalla pompa per il vuoto, mentre quelle ionizzate sono accelerate e convogliate verso l'analizzatore.

Diverse le tecniche di ionizzazione, divise tra *frammentazioni ad alta energia* e *frammentazioni a bassa energia*.

In base alla sorgente ionica utilizzata possiamo incontrare:

- Impatto elettronico (E.I.): è una delle tecniche più utilizzate. Il filamento di tungsteno produce un fascio di elettroni che viene accelerato da un anodo posto dalla parte opposta del filamento. Essi vanno ad urtare contro la sfera elettronica di una molecola, trasferendo loro energia, provocando l'espulsione

di un elettrone con la formazione di uno ione molecolare. È una tipologia di ionizzazione ad alta energia.

- Ionizzazione chimica (C.I.): utilizzata quando gli ioni molecolari prodotti con il metodo dell'impatto elettronico sono troppo poco stabili e si frammentano completamente. Essa si basa sull'interazione del campione gassoso con un reagente ionizzato.
- Electrospray (E.S.I.): in questo caso il campione viene sciolto in un solvente polare, poi nebulizzato a pressione atmosferica dentro la camera di ionizzazione attraverso un ago mantenuto con un alto potenziale elettrico. Le goccioline di spray, cariche positivamente per azione del campo elettrico, sono attratte verso una "lente di estrazione di ioni", che grossolanamente è costituito da un capillare mantenuto sotto vuoto e a potenziale negativo; in tal modo il solvente evapora e gli ioni carichi sono accelerati verso l'analizzatore.

L'analizzatore consente invece di differenziare gli ioni in base al loro rapporto massa/carica.

Tra i diversi tipi di analizzatori:

- Analizzatore magnetico
- Analizzatore a doppia focalizzazione
- Analizzatore a trappola ionica
- Analizzatore a quadrupolo

1.6.7 *L'analizzatore quadrupolo*

Questa tipologia di analizzatore è quello che è stato utilizzato per effettuare le analisi. Esso è costituito da quattro barre cilindriche metalliche, lunghe circa 20 cm, che fungono da limite per il cammino percorso dagli ioni provenienti dalla camera di ionizzazione e diretti al detector.

Le barre sono mantenute ad un potenziale elettromagnetico oscillante, ovvero, quando le due barre verticali hanno potenziale positivo le due barre orizzontali hanno potenziale negativo e viceversa.

Gli elettroni, vengono accelerati dalle piastre acceleratrici, entrano nel tunnel delimitato dalle piastre e vengono respinti dai poli positivi ed attratti dai negativi.

Tuttavia, a causa dell'oscillazione del quadrupolo gli ioni assumono una traiettoria a zig zag e finiscono con lo scaricarsi su una delle sbarre, tranne quelli che, per un certo valore di frequenza di oscillazione, hanno un certo quantitativo di energia cinetica che acquisiscono una traiettoria sinusoidale, uscendo dal tunnel fino ad entrare nel sistema di rivelazione (fotomoltiplicatore).

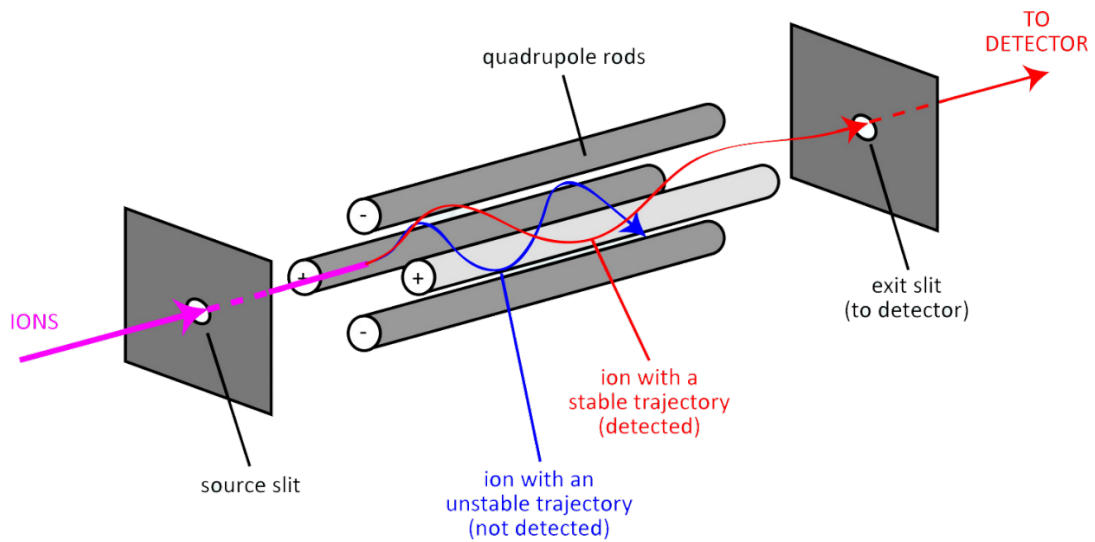


Figura 1-11 Rappresentazione del funzionamento di un detector a quadrupolo

Attraverso una scansione di frequenza di oscillazione del campo è possibile far uscire ioni a massa molecolare crescente.

Come collettore e rilevatore degli ioni viene utilizzato comunemente un moltiplicatore elettronico, costituito da una serie di elettrodi in cascata.

Quando uno ione interagisce con il primo elettrodo, esso emetterà un fascio di elettroni che colpiranno il secondo elettrodo e così faranno anche gli elettrodi successivi.

Il segnale amplificato, verrà poi digitalizzato ed elaborato da un calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa (Sparkman et al., 2011).

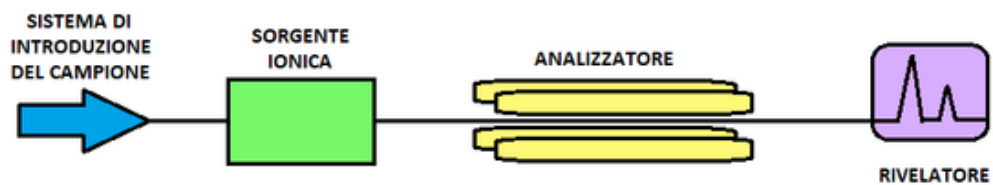


Figura 1-12 Schema semplificato dello spettrometro di massa.

Capitolo 2

PROVA SPERIMENTALE

Lo scopo della ricerca era quello determinare le componenti volatili, in diverse tipologie di formaggi portoghesi prodotti con caglio vegetale.

L'analisi è iniziata campionando 22 campioni, prelevati da 3 tipologie di formaggi differenti. I primi 6 campioni, sono stati prelevati dal formaggio *Queijo de Beira Baxa Dop – Castelo Branco* (denominati: CB1a, CB1b, CB2a, CB2b, CB3a, CB3b) sono derivanti da 3 produttori differenti, 8 campioni sono stati prelevati dal formaggio *Queijo de Nisa Dop* (denominati: N1a, N1b, N2a, N2b, N3a, N3b, N4a, N4b) sono derivanti da 4 produttori differenti e gli ultimi 8 campioni appartengono al formaggio *Queijo Serra da Estrela* (denominati: SE1a, SE1b, SE2a, SE2b, SE3a, SE3b, SE4a, SE4b).

Tutte le analisi sono state rese possibili attraverso la strumentazione fornita dal laboratorio del D3A-area Tecnologie Alimentari dell'Università Politecnica delle Marche.

Il nostro scopo è stato quello di determinare le molecole aromatiche presenti nei nostri campioni di formaggio Portoghesi coagulati con caglio vegetale.

2.1 Materiali e metodi

2.1.1 Preparazione del campione.

Da ogni campione viene prelevata un'aliquota dal peso di circa 0,50 g (Tabella 1 Campioni analizzati e relativi pesi).

Ogni aliquota è stata introdotta all'interno di vials in vetro (da 10 ml), chiuse con un tappo con guaina perforabile per la successiva introduzione dell'SPME equipaggiata con una fibra DVB/PDMS 65 (Supelco/Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Ogni vial è stata appositamente etichettata con la sigla del corrispettivo campione ad essa associato.

Durante il periodo di non utilizzo, le vials venivano mantenute a -20°C.

Tabella 1 Campioni analizzati e relativi pesi.

Formaggio	Produttore	Campione	Peso (g)
Queijo de Beira Baxa Dop	<i>Sabores da Soalheira</i>	<i>CB1a</i>	<i>0,52 g</i>
		<i>CB1b</i>	<i>0,52 g</i>
	<i>Damar - Produtora de Quijos, Lda</i>	<i>CB2a</i>	<i>0,50 g</i>
		<i>CB2b</i>	<i>0,51 g</i>
	<i>Beiralacte - lacticinos Artesana Beira Baixa Lda</i>	<i>CB3a</i>	<i>0,51 g</i>
		<i>CB3b</i>	<i>0,50g</i>
Queijo de Nisa Dop	<i>O Chocalho</i>	<i>N1a</i>	<i>0,52 g</i>
		<i>N1b</i>	<i>0,51 g</i>
	<i>Pingo Doce</i>	<i>N2a</i>	<i>0,50 g</i>
		<i>N2b</i>	<i>0,50 g</i>
	<i>Queijos Santiago</i>	<i>N3a</i>	<i>0,52 g</i>
		<i>N3b</i>	<i>0,51 g</i>
	<i>Queijos Fortunato</i>	<i>N4a</i>	<i>0,51 g</i>
		<i>N4b</i>	<i>0,52 g</i>
Queijo Serra da Estrela	<i>Quinta de Sao Cosme</i>	<i>SE1a</i>	<i>0,52 g</i>
		<i>SE1b</i>	<i>0,51 g</i>
	<i>Manteigria Silva queijaria</i>	<i>SE2a</i>	<i>0,51 g</i>
		<i>SE2b</i>	<i>0,51 g</i>
	<i>Vale da Estrela queijaria</i>	<i>SE3a</i>	<i>0,51 g</i>
		<i>SE3b</i>	<i>0,51 g</i>
	-----	<i>SE4a</i>	<i>0,52 g</i>
		<i>SE4b</i>	<i>0,50 g</i>

2.1.2 Fase di analisi

L'analisi consiste in 3 fasi:

- 1- Operazioni preliminari: ottimizzazione del metodo analitico strumentale, per questo motivo sono state effettuate diverse prove per determinare i tempi e le temperature di pretrattamento del campione in vials. Le combinazioni di tempo e temperatura utilizzate sono state:
 - 40°C come temperatura di preriscaldamento del campione per 15, la fibra messa in esposizione solo dopo 5 minuti.
 - 50°C come temperatura di preriscaldamento del campione con 45 minuti di esposizione diretta della fibra (metodo risultato più idoneo).
 - 55°C come temperatura di preriscaldamento del campione con 1 ora di esposizione diretta della fibra.

Prima di ogni corsa cromatografica si è proceduto alla pulizia della fibra SPME, garantendo così che le eventuali molecole contaminanti ancora adsorbite sulla fibra, venissero rimosse prima di cominciare la vera e propria fase di analisi.

Il bagnetto termostato è stato mantenuto ad una temperatura costante di 50°C. Il gascromatografo (Trace 1300) precedentemente equipaggiato con una colonna capillare (30 m x 0,25 mm) Zebron ZB-5ms con un film di 0,25 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) accoppiato con lo spettrometro di massa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) utilizza una fase mobile (He) che veniva introdotta con un flusso costante di 1 ml al minuto, con l'ausilio del software dedicato, è stata impostata una temperatura del blocco iniettore di 250°C, mentre per il forno è stata impostata una temperatura di partenza di 40°C con un incremento di 6°C al minuto e mantenuta costante ogni 5 minuti, fino al raggiungimento di una temperatura di 220°C.

- 2- Fase di esposizione dell'SPME: per ottimizzare le fasi di analisi, i tempi di esposizione sono stati cronometrati

La vial veniva messa nel bagnetto termostato per circa $\frac{3}{4}$ della sua altezza, evitando l'ingresso di acqua al suo interno. Subito dopo veniva inserita l'SPME attraverso il tappo perforabile nello spazio di testa della vial con ancora la fibra chiusa all'interno della protezione metallica. Una volta inserita, veniva esposta la fibra (senza toccare il campione) nello spazio di testa per 45 minuti, questa combinazione di tempo e temperatura di esposizione risultava essere il più efficace in termini di risultati.

- 3- Fase di iniezione dell'SPME nel blocco iniettore: subito dopo aver terminato la fase di esposizione, l'SPME veniva inserita nel blocco iniettore del gascromatografo, e per evitare eventuali adsorbimenti estranei da parte della fibra, risultava essenziale far passare il minor tempo possibile tra la fase di fine esposizione e quella d'iniezione.

Il tempo di esposizione della fibra nel blocco iniettore era di 3,5 minuti, tempo necessario a far desorbire tutte le molecole dalla fibra, avendo così la possibilità di riutilizzo istantaneo per la successiva fase esposizione su di un nuovo campione.



Figura 2-1 Vials con setto perforabile.



Figura 2-2 Bagnetto termostato.

2.1.3 Risultati finali.

Gli spettri di massa sono stati analizzati attraverso i seguenti criteri:

- Indice di Kovats: dal momento che il fattore di capacità "K" (sopra citato) è un parametro che dipende da numerosi fattori (tipo di liquido di partizione, temperatura, ecc), esso è valido soltanto se si riproducono le stesse condizioni

con le quali è stato calcolato, eventualità che a volte non è possibile. Questa difficoltà oggettiva può essere superata introducendo una scala *relativa dei tempi di ritenzione*, mediante la quale si possono confrontare i valori di K ottenuti in condizioni gascromatografiche diverse. Questa scala convenzionale, che non si basa sui tempi di ritenzione di n-paraffine, si ottiene moltiplicando per 100 il numero di atomi di carbonio.

La scala convenzionale è la scala degli indici di Kovats (I).

Una sostanza con $I = 450$ ha un comportamento gascromatografico corrispondente (in modo convenzionale) ad una struttura idrocarburica con un numero frazionato (= 4,5) atomi di carbonio.

Se si cambiassero tutti i parametri gascromatografici (lunghezza colonna, temperature, flusso, ecc), mantenendo però la stessa fase stazionaria, i tempi di ritenzione effettivi della serie di n-paraffine sarebbero completamente diversi da quelli precedenti. Se, però si assegnano alle n-paraffine i valori convenzionali 300, 400, 500... anche la sostanza avrebbe l'indice di ritenzione precedente.

Il valore dell'indice di ritenzione di Kovats per una sostanza A si ricava dai tempi di ritenzione corretti $t'r (= t_r - t_0)$ dei due idrocarburi omologhi (x e x + 1) e della sostanza A:

$$IA = 100x + 100 \frac{\log \frac{t'R(A)}{t'R(x)}}{\log \frac{t'R(x+1)}{t'R(x)}}$$

Esiste una relazione logaritmica lineare tra il tempo di ritenzione e il numero di atomi di carbonio dei membri di una serie omologa.

L'indice di Kovats è utile anche per determinare la polarità relativa a due fasi stazionarie diverse, attraverso il calcolo del ΔI di una sostanza A (ad esempio n-ottanolo) nei due cromatogrammi (Sparkman et al., 2011).

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno definito che i composti predominanti nello spazio di testa del campione di formaggio "Castelo Branco" sono i composti carbossilici, che costituiscono circa il 61% delle sostanze volatili totali (acido 2-metil propanoico, acido butanoico, acido 2-metil butanoico, acido 3-metil butanoico, acido esanoico, acido eptanoico, acido ottanoico, acido decanoico, acido dodecanoico).

Gli esteri rappresentano circa il 20% delle sostanze volatili (acetato di isobutile, butirato di 2-butile, esanoato di etile, ottanoato di etile, decanoato di etile, dodecanoato di etile).

I composti carbonilici definiscono circa il 12% delle sostanze volatili totali (2-butanone, 3-metilbutanale, 3-idrossibutan-2-one, 2-eptanone, benzaldeide, fenilacetaldeide, 2-nonanone, dodecanale).

Per finire troviamo gli alcoli che costituiscono solo il 5% delle sostanze volatili (etanolo, 2-propanolo, 3-metil-butanolo).

Tra gli acidi grassi volatili più rappresentativi troviamo acido esanoico, acido butanoico e tra quelli a catena ramificata acido 3-metil-butanoico e acido 2-metil-

butanoico. Essi hanno una bassa soglia di percezione, questo li caratterizza importanti contributori del profilo aromatico in un'ampia varietà di formaggi (Delgado et al., 2011).

Le lipolisi sono responsabili della formazione degli acidi lineari, anche se le fermentazioni microbiche, possono contribuire in modo abbastanza significativo per quanto riguarda la produzione di acido butirrico. La loro attività causa anche la produzione di acidi grassi a catena ramificata come l'acido 2-metilpropanoico (isobutirrico), l'acido 3-metilbutanoico (isovalerico) e l'acido 2-metilbutanoico, attraverso la loro attività di metabolismo amminoacidico della valina, leucina e isoleucina (McSweeney and Sousa, 2000).

Alcune note fruttate, floreali e di muffa sono associate ad altri metilchetoni, come 2-eptanone e 2-nonanone, che contribuiscono positivamente all'aroma del prodotto.

Tra le diverse aldeidi, come il 3-metilbutanale, vengono rapidamente ridotte ad alcoli o ossidate agli acidi corrispondenti. I composti aldeidici con una maggiore concentrazione come la fenilacetaldeide e benzaldeide provengono dal metabolismo microbico del triptofano e della fenilalanina (Zheng et al., 2021).

Gli acidi carbossilici sono dei precursori di altri composti sensoriali, come metilchetoni, aldeidi e esteri (Collins et al., 2003). Il 2-butanone, con odore di caramello, è considerato il metilchetone più abbondante nello spazio di testa dei campioni. Era stato identificato come molecola aromatica principale nel formaggio Cheddar (Arora et al., 1995).

L'etanolo (derivante dal metabolismo del lattato da microrganismi eterofermentanti come *Arthrobacter*, *Lacticaseibacillus zeae* o *Lactococcus piscium*) ha un ruolo diretto limitato nell'aroma dei formaggi, ma contribuisce alla formazione degli esteri.

L'alcool a catena ramificata 3-metil-1-butanolo deriva dalla riduzione del 3-metilbutanale, a sua volta derivante dal catabolismo della leucina (Carbonell et al., 2002).

Grazie allo studio effettuato da (Ferreira et al., 2009) è stato evidenziato che la presenza dell'alcool prima citato, nel formaggio Castelo Branco sia derivante dal caglio vegetale che presenta un'attività altamente proteolitica. Alcuni alcoli secondari come il 2-propanolo derivano dalla riduzione enzimatica ad opera dell'enzima alcool deidrogenasi dei corrispondenti metilchetoni (acetone).

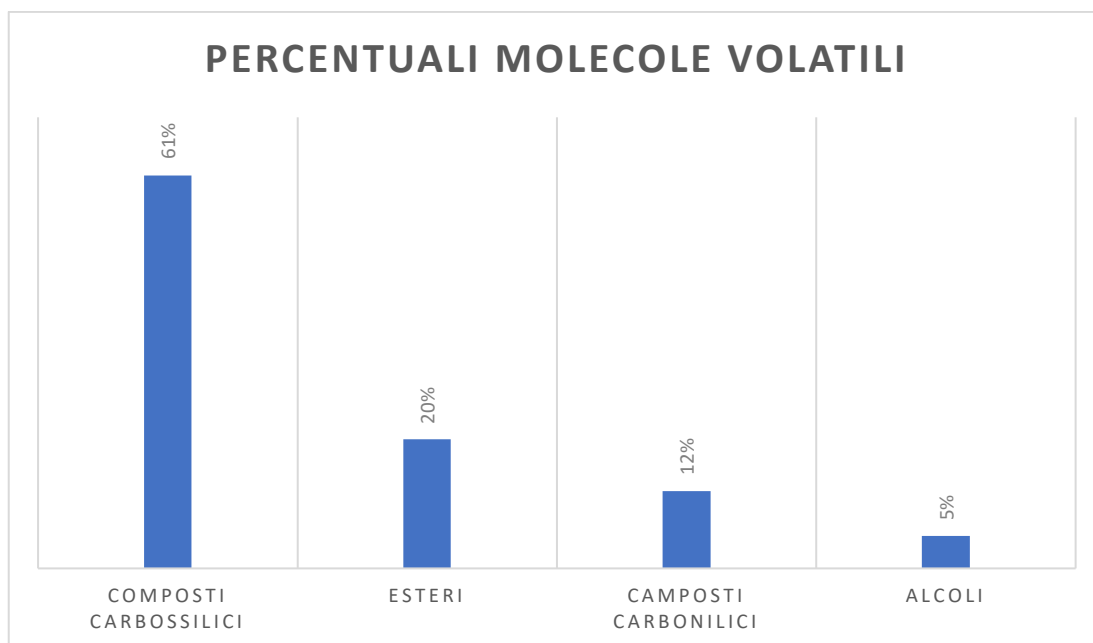


Grafico 1 Istogramma con le relative percentuali della frazione volatile.

Tabella 2 Composti volatili individuati nello spazio di testa nei campioni di formaggi "Castelo Branco"

Name	CAS-NUMBER	Category	Flavour note	Producer 1	Producer 2	Producer 3
ethanol	64-17-5	Alcohol	Alcohol, mild	2178 ± 325	1431 ± 1326	385 ± 71
propan-2-ol	67-63-0	Alcohol	rubbing alcohol	1494 ± 1378	1047 ± 1052	297 ± 69
2-butanone	78-93-3	Ketone	Acetone, etheric	11672 ± 7469 ^b	17277 ± 1199 ^{ab}	37031 ± 5780 ^a
butanal, 3-methyl	590-86-3	Aldehyde	Dark chocolate, malt, green	10 ± 11 ^b	83 ± 16 ^{ab}	43 ± 21 ^a
isobutyl acetate	110-19-0	Ester	fruity, floral banana-like	56 ± 18	380 ± 510	152 ± 45
3-hydroxybutan-2-one	5077-67-8	Ketone	Buttery	2962 ± 3946	6847 ± 8538	4273 ± 3040
1-butanol, 3-methyl	123-51-3	Alcohol	Fruity, alcohol	3255 ± 3044	287 ± 187	214 ± 49
propanoic acid, 2-methyl	79-31-2	Acid	rancid butter	895 ± 839	379 ± 374	2354 ± 283
butanoic acid	107-92-6	Acid	Rancid, cheesy, putrid, sweaty	3995 ± 2217	8206 ± 7546	4865 ± 146
butanoic acid, 3-methyl	503-74-2	Acid	Swiss, cheese, waxy, sweaty,	5845 ± 3245	5606 ± 4668	15379 ± 2959
butanoic acid, 2-methyl	116-53-0	Acid	Fruity, sour, sweaty	1375 ± 360	4344 ± 5804	950 ± 977
2-heptanone	110-43-0	Ketone	Floral, fruity	85 ± 24	212 ± 194	368 ± 357
butanoic acid, 1-methylpropyl ester	819-97-6	Ester		20 ± 8	259 ± 318	143 ± 47
benzaldehyde	100-52-7	Aldehyde	sweet, strong almond odour	117 ± 72	261 ± 245	313 ± 222

ethyl hexanoate	123-66-0	Ester	Pineapple, apple	669 ± 62 ^b	432 ± 69 ^b	4447 ± 1126 ^a
hexanoic acid	142-62-1	Acid	powerful Pungent, blue cheese, goat-like	39382 ± 10844	22839 ± 2077	22706 ± 6100
phenylacetaldehyde	122-78-1	Aldehyde	pungent green floral and sweet odour of hyacinth type	151 ± 90	383 ± 300	172 ± 33
heptanoic acid	111-14-8	Acid	rancid, sour, fatty odour	280 ± 154	190 ± 37	162 ± 3
2-nonanone	821-55-6	Ketone	Musty, fruity, floral	73 ± 19	1290 ± 672	372 ± 279
octanoic acid	124-07-2	Acid	Goaty, waxy, soapy, rancid	34 ± 24	451 ± 568	56 ± 40
octanoic acid ethyl ester	106-32-1	Ester		25034 ± 12143	9692 ± 3558	3314 ± 2485
dodecane	112-40-3	Alkane		1745 ± 2203	764 ± 270	3146 ± 2480
1,3-di-tert-butylbenzene	1014-60-4	Aromatic hydrocarbon		119 ± 94	89 ± 63	189 ± 250
nonanoic acid	112-05-0	Acid	Coconut, fatty odour	243 ± 178	130 ± 41	582 ± 691
decanoic acid	334-48-5	Acid	rancid	20043 ± 16507	5263 ± 416	2294 ± 672
decanoic acid ethyl ester	110-38-3	Ester		280 ± 178	503 ± 269	73 ± 42
dodecanal	112-54-9	Aldehyde	fatty odour	24 ± 11	24 ± 7	68 ± 58
dodecanoic acid	143-07-7	Acid	like oil of bay	839 ± 913	374 ± 252	99 ± 42
dodecanoic acid ethyl ester	106-33-2	Ester	fruity, floral	28 ± 31	60 ± 28	13 ± 4

¹GC-FID Area dei picchi [(pA×min)×10⁴].

2.2 Caratteristiche delle molecole individuate.

2.2.1 Acidi carbossilici:

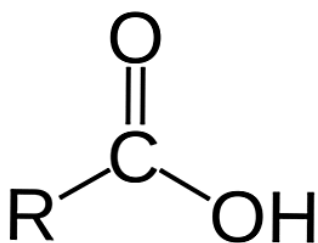


Figura 2-1 Struttura base acido carbossilico.

Gli acidi carbossilici si trovano ampiamente in natura e sono considerate sostanze importanti dal punto di vista nutrizionale. Gli acidi grassi sono componenti dei gliceridi, che a loro volta sono componenti dei grassi. Gli acidi idrossilici, come l'acido lattico (presente nei prodotti a base di latte acido) e l'acido citrico (presente negli agrumi), e molti chetoacidi sono importanti prodotti metabolici presenti nella maggior parte delle cellule viventi.

Tra i diversi acidi carbossilici, quelli di maggior interesse sono gli acidi grassi (comunemente chiamati così gli acidi carbossilici con almeno 4 atomi di carbonio) in quanto sono delle sostanze nutritive essenziali presenti negli alimenti e nei prodotti metabolici di importanti attività vitali.

Gli acidi grassi sono ottenuti principalmente da fonti alimentari.

Gli Idrossi-acidi Pentaciclici Triterpenici come ad esempio l'acido ursolico o betulinico sono un gruppo di composti aventi un carbossile, che sono spesso riportati in molti campioni di cibo.

Essi negli ultimi anni hanno attirato l'attenzione in campo scientifico per la loro attività antinfiammatoria, antimicrobica, antiossidante e antitumorale (Sun et al., 2011).

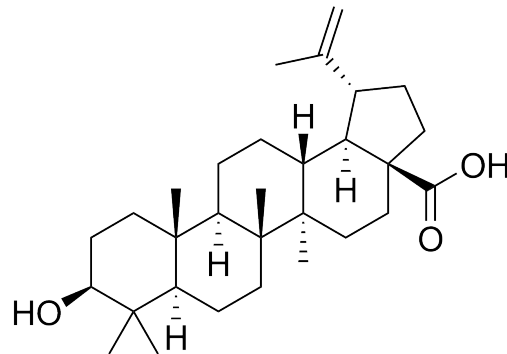


Figura 2-2 Molecola di Acido Betulinico

Secondo l'articolo (Ferreira et al., 2009) viene descritto che la principale fonte di acidi grassi liberi nel formaggio "Castelo Branco" è causata dalla lipolisi, ma può anche derivare dal metabolismo del lattosio, essere sintetizzato direttamente dall'acetil-Coenzima A o possono formarsi dalla conversione degli aminoacidi come valina e leucina.

Gli acidi grassi liberi danno un elevato contributo all'aroma del formaggio, sia direttamente che indirettamente attraverso la produzione di composti carbonilici, alcoli, alcani e esteri. Gli acidi grassi possono rilasciare un aroma rancido nel caso di elevate concentrazioni e la loro caratteristica strutturale può portare alla formazione di moltissime combinazioni differenti, che denotano caratteristiche odorose diverse e specifiche.

Essendo presenti in elevate concentrazioni nel formaggio "Castelo Branco" (costituiscono circa il 61% della sua frazione volatile totale) tali molecole ne vanno a definire quasi completamente il suo aroma caratteristico.

2.2.2 Esteri:

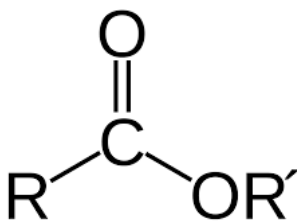


Figura 2-3 Struttura base estere.

Derivano dagli acidi carbossilici attraverso la sostituzione del gruppo -OH con il gruppo -OR

La maggior parte degli esteri dona al formaggio delle note floreali e fruttate e può contribuire a ridurre al minimo la piccantezza e l'amaro conferito rispettivamente da acidi grassi e ammine (Ferreira et al., 2009).

Secondo l'articolo (Carbonell et al., 2002) i formaggi di pecora, come nel caso del "Castelo Branco" presentano quantità superiori di esteri e acidi grassi liberi.

2.2.3 Composti carbonilici:

ALDEIDI e CHETONI Gruppo carbonilico

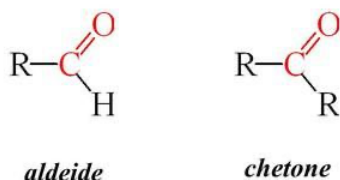


Figura 2-4 Aldeidi e chetoni con evidenziato il gruppo carbonilico in rosso.

Le aldeidi e i chetoni sono dei composti contenenti entrambi il gruppo carbonilico C=O, la loro differenza risiede nel posizionamento del gruppo funzionale, poiché, nel caso di un'aldeide il gruppo carbonilico è legato ad almeno un atomo di idrogeno, mentre i chetoni (che possono essere ridotti ad alcoli secondari) hanno il gruppo carbonilico legato a due atomi di carboni (come evidenziato nella foto 2-6).

A causa della loro tipicità aromatica, i metilchetoni (prodotti a partire dagli acidi grassi) hanno un ruolo chiave nel determinare il sapore dei formaggi stagionati a causa delle loro basse soglie di percezione (Ferreira et al., 2009). Secondo lo studio (Carbonell et al., 2002) le aldeidi tendono a ritrovarsi in maggiori concentrazioni in formaggi prodotti durante il periodo primaverile ed estivo. L'acetaldeide (aldeide a 2 atomi di carbonio) è risultata una molecola presente in molte tipologie di formaggi, come ad esempio nel formaggio "La serena". Nel corso della maturazione gli enzimi lipolitici (soprattutto le lipasi di origine batterica) liberano quantità più o meno importanti di acidi grassi, dalla cui degradazione ossidativa si possono formare composti carbonilici a basso peso molecolare dotati anche di una certa valenza aromatica, specie se provenienti da acidi grassi insaturi (Malacarne et al., 2006).

Gli alcoli, composti carbonilici e gli acidi organici presenti in un prodotto agroalimentare sono soggetti a trasformazioni fermentative come nel caso degli zuccheri, influenzando sulle proprietà organolettiche dell'alimento. La natura di tali processi fermentativi, gli organismi coinvolti e il ruolo svolto nella trasformazione, variano a seconda dei casi, ma in generale si tratta di processi collaterali o consecutivi che rientrano nella generalità dei fenomeni connessi alla maturazione e alla stagionatura del prodotto stesso.

Tra le diverse fermentazioni che coinvolgono questi prodotti troviamo:

- Fermentazione propionica: processo di fermentazione fondamentale per molti formaggi (Asiago, Emmental, Edam, Groviera, Gouda, ecc) producendo le tipiche occhiature e proprietà organolettiche associate.
- Fermentazione butirrica: secondaria di un'alterazione, causando il gonfiore tardi nei formaggi stagionati (Grana).

- Fermentazioni aromatiche: attuate dai fermenti eterolattici, sono dei processi secondari che portano allo sviluppo di composti carbonilici, in particolare acetaldeide e diacetile. Conferiscono il classico aroma di burro (Cherubin, 2021).

2.2.4 Alcoli:

Gli alcoli derivano da aldeidi e chetoni, attraverso delle reazioni che coinvolgono l'enzima alcool deidrogenasi. Essi, nonostante i loro livelli abbastanza elevati, contribuiscono in maniera limitata alle variazioni delle proprietà aromatiche del formaggio, ma partecipano a reazioni di formazione degli esteri.

Gli alcoli a catena ramificata 2-metil-1-propanolo e 3-metilbutanolo provengono dalla riduzione delle aldeidi a catena ramificata e si trovano nei formaggi a latte crudo con proteolisi intensa. La loro presenza è favorita nel formaggio "Castelo Branco" grazie all'utilizzo del caglio vegetale altamente proteolitico (Ferreira et al., 2009).

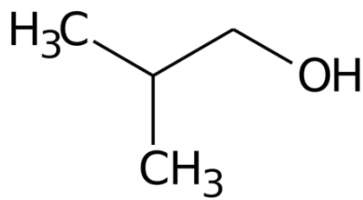


Figura 2-5 Molecola: 2-metil-1-propanolo.

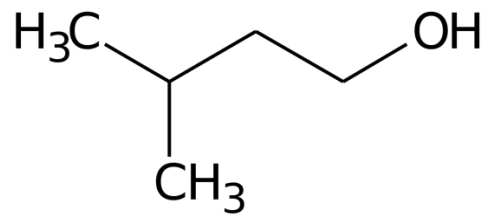


Figura 2-8 Molecola: 2-metil-1-propanolo.

CONCLUSIONI

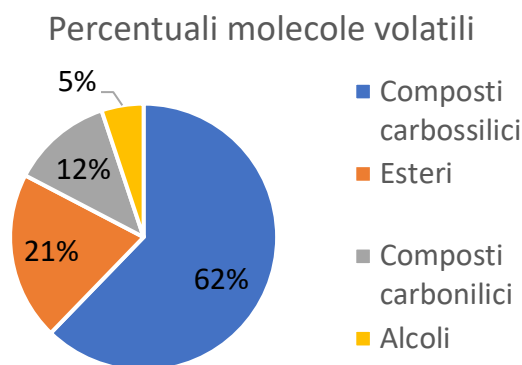


Grafico 2 Percentuali della frazione volatile.

derivanti dall'uso del caglio vegetale. A seguito dello studio dei cromatogrammi risultanti, è risultato come la concentrazione maggiore di molecole è rappresentata da composti carbossilici che costituiscono circa il 61% della frazione volatile, la loro elevata concentrazione è risultante da un processo lipolitico e in base a tipologia e concentrazione delle stesse, il profilo aromatico cambia radicalmente.

La lipolisi è responsabile della formazione di acidi grassi lineari che contribuiscono alla formazione di acido butirrico che conferisce il classico aroma di burro.

Oltre al processo lipolitico, gli acidi grassi possono formarsi anche attraverso: il metabolismo del lattosio, direttamente dall'acetil-coenzima A o attraverso la conversione degli aminoacidi come valina e leucina.

Tra gli acidi grassi volatili più rappresentativi troviamo l'acido esanoico, acido butanoico e tra quelli a catena ramificata acido 3-metil-butanoico e acido-2-metil-butanoico.

La seconda tipologia di molecole che più contribuiscono all'aroma del formaggio sono gli esteri che derivano dagli acidi carbossilici a seguito della sostituzione del gruppo -OH con il gruppo -OR e rappresentano circa il 20% della frazione volatile, tali molecole donano al formaggio delle note fruttate e floreali, riducendo al minimo il senso di piccantezza e l'amaro che solitamente è conferito da acidi grassi e ammine.

Le ultime due categorie che contribuiscono in maniera minore (dal punto di vista quantitativo ma non necessariamente dal punto di vista qualitativo) alla frazione volatile del formaggio sono i composti carbonilici come aldeidi e chetoni (molecole che presentano un gruppo carbonilico C=O) e i composti alcolici. Nonostante la loro bassa concentrazione, danno un timbro importante all'aroma finale del formaggio a causa della loro bassa soglia di percezione.

L'analisi eseguita sui diversi campioni di formaggio ha portato alla caratterizzazione del suo profilo volatile. Tali molecole costituiscono l'odore sprigionato dal prodotto e variano da campione a campione in qualità e concentrazione. Grazie allo studio dimostrato in questa tesi, è stato possibile, attraverso la caratterizzazione delle molecole, distinguere la qualità dei differenti formaggi mettendo in risalto le molecole

Per concludere è stato dimostrato come il caglio vegetale abbia un'influenza positiva sul profilo aromatico dei formaggi analizzati in quanto aiuta nelle reazioni responsabili della formazione di diversi composti volatili e caratteristici.

Questo studio è solo un punto di partenza, il numero di campioni analizzati era infatti non elevato. Sfruttando la gascromatografia accoppiata alla massa è possibile determinare i profili aromatici di tantissimi prodotti garantendone la qualità e l'appartenenza alle DOP limitando l'immissione in commercio di prodotti non originali.

BIBLIOGRAFIA

- Arora, G., Cormier, F., Lee, B., 1995. Analysis of Odor-Active Volatiles in Cheddar Cheese Headspace by Multidimensional GC/MS/Sniffing. *J. Agric. Food Chem.* 43, 748–752. <https://doi.org/10.1021/jf00051a035>
- Carbone, K., B, F., Tripaldi, C., Palocci, G., D, S., 2008. The rennet paste: the effects of the production techniques on the enzymatic activity and the role of the lipolytic fraction. *Sci. E Tec. Latt. Casearia* 59, 39–53.
- Carbonell, M., Nuñez, M., Fernández-García, E., 2002. Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics. *Le Lait* 82, 683–698. <https://doi.org/10.1051/lait:2002042>
- Cardinali, F., Ferrocino, I., Milanović, V., Belleggia, L., Corvaglia, M.R., Garofalo, C., Foligni, R., Mannozi, C., Mozzon, M., Coccolin, L., Osimani, A., Aquilanti, L., 2021. Microbial communities and volatile profile of Queijo de Azeitão PDO cheese, a traditional Mediterranean thistle-curdled cheese from Portugal. *Food Res. Int.* 147. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110537>
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13, 841–866. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00109-2)
- Costi e benefici delle denominazioni geografiche (DOP e IGP) | Agriregionieuropa [WWW Document], n.d. URL <https://agriregionieuropa.univpm.it/it/content/article/31/8/costi-e-benefici-delle-denominazioni-geografiche-dop-e-igp?page=0%252C0%252C1%2C0%2C1> (accessed 5.8.22).
- Delgado, F.J., González-Crespo, J., Cava, R., Ramírez, R., 2011. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chem.* 129, 1156–1163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.096>
- Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pinho, O., Sampaio, P., 2009. Volatile fraction of DOP “Castelo Branco” cheese: Influence of breed. *Food Chem.* 112, 1053–1059. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.048>
- Fiorucci, E., Di Berardino A., la coagulazione del latte e le tipologie di caglio, n.d. . Ruminantia - Web Mag. Mondo Dei Ruminanti. URL <https://www.ruminantia.it/la-coagulazione-del-latte-e-le-tipologie-di-caglio/> (accessed 4.8.22).
- 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. <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>
- monografia_DENOMINAZIONI_DI_ORIGINE-with-cover-page-v2.pdf, n.d.
- Pintado, A.I., Tavares, T.G., Tavora, F.K., Malcata, F.X., 2010. Tradition versus modernism in cheesemaking technology: A Portuguese case study encompassing plant coagulant, non-bovine milks and adventitious microflora. *Aust. J. Dairy Technol.* 65, 128–134.

- Rubino, R., 2019. Quali sono le molecole che determinano il sapore del latte e dunque dei formaggi? E da cosa dipendono? Uno studio. Roberto Rubino. URL <https://robertorubino.eu/quali-sono-le-molecole-che-determinano-il-sapore-del-latte-e-dunque-dei-formaggi-e-da-cosa-dipendono-uno-studio/> (accessed 4.17.22).
- Sparkman, O.D., Penton, Z.E., Kitson, F.G., 2011. Gas Chromatography, in: *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Elsevier, pp. 15–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373628-4.00002-2>
- Sun, Z., You, J., Song, C., Xia, L., 2011. Identification and determination of carboxylic acids in food samples using 2-(2-(anthracen-10-yl)-1H-phenanthro[9,10-d]imidazol-1-yl)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (APIETS) as labeling reagent by HPLC with FLD and APCI/MS. *Talanta* 85, 1088–1099. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.05.019>
- Tripaldi, C., Palocci, G., Di Giovanni, S., Iacurto, M., Steri, R., Campagna, M.C., Di Russo, C., Zottola, T., 2021. Effects of the drying method for flowers of *Cynara cardunculus* var. *Altilis* on milk coagulating properties. *Ital. J. Food Sci.* 33, 57–66. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v33i4.2026>
- Zheng, X., Xu, X., Ma, Y., Zhu, L., Xiao, J., Deng, L., Shi, X., Wang, B., 2021. Diversity and potential function of bacterial communities during milk fermentation of Kazak artisanal cheese. *Process Biochem.* 111, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.11.005>