

# Studio di un indice di maturazione del Pecorino Siciliano D.O.P. mediante Spettroscopia NIR

Mario Manenti\*, Giovanni Farina\*, Stefania Carpino\*, Giuseppe Licitra\*, Giovanni Campolongo\*\*

\* *CoRFiLaC., Ragusa*

\*\* *BÜCHI Italia S.r.l., Assago (MI)*

## Riassunto

L'evoluzione proteolitica di un formaggio è strettamente correlata alla maturazione per effetto dell'azione enzimatica esercitata sulla caseina.

I metodi di frazionamento chimico per la valutazione dell'indice proteolitico del Ragusano e del Pecorino Siciliano D.O.P., effettuate presso i laboratori del *CoRFiLaC*, riguardano la determinazione dell'azoto solubile in tampone acetico a pH 4,6 ed in acido tricloroacetico (TCA) al 12 %. Nel presente studio preliminare è stato verificato che la tecnica NIR può essere applicata allo studio dell'indice di maturazione calcolato per il formaggio Pecorino Siciliano D.O.P. a diversi stadi di maturazione. In particolare è stata valutata la correlazione tra i risultati ottenuti dalle analisi ottenute utilizzando uno spettrometro FT-NIR e quelli relativi ai metodi utilizzati per la determinazione dell'indice proteolitico, tenendo conto dei coefficienti di maturazione calcolati come rapporto percentuale tra le proteine solubili e le proteine totali.

Questa prima fase della ricerca ha dato esiti positivi in termini di correlazione per il formaggio Pecorino Siciliano D.O.P., tra il dato ottenibile mediante analisi NIR e le due metodiche di determinazione dell'indice proteolitico. Tra le due metodiche, inoltre, quella che ha portato ai risultati più convincenti, con un coefficiente di regressione (R) pari a 0,98 e un SEP pari a 0.95%, è quella che prevede la determinazione dell'indice di proteolisi mediante l'utilizzo del TCA.

## Introduzione

I parametri utilizzati per effettuare il monitoraggio delle fasi di maturazione di un formaggio sono solitamente i parametri relativi alla sua composizione chimica: umidità, sale, proteine, grassi, lattosio etc. . Durante la stagionatura, questi parametri cambiano e cambiano in modo differente non solo a seconda della tipologia di formaggio, ma anche della zona e delle tecniche utilizzate per produrlo. Monitorando questi cambiamenti è possibile cercare di standardizzare e quindi caratterizzare una produzione in modo da ottenere risultati di qualità più elevata. Questo discorso ha senso tanto più quando si parla di prodotti D.O.P.. Per monitorare in modo più accurato la stagionatura di prodotti di qualità è possibile pensare di implementare l'informazione relativa alla

composizione chimica dei campioni secondo i parametri classici, determinando parametri nuovi come, ad esempio, degli indici di maturazione. Uno di questi indici potrebbe essere, ad esempio, il rapporto percentuale tra l'azoto solubile e le proteine totali presenti in un campione, inteso. In particolare il valore di azoto solubile a pH 4,6 indica l'azione proteolitica degli enzimi del caglio mentre il valore di azoto solubile in acido tricloroacetico (TCA) al 12 % è correlato all'azione degli enzimi provenienti dalla microflora spontanea nel latte che degrada ulteriormente la catena proteica producendo peptidi a basso peso molecolare e amminoacidi liberi. Il rapporto tra l'azoto solubile determinato con questi due metodi e la proteina totale può dunque essere utilizzato come parametro per monitorare come l'attività proteolitica enzimatica evolve durante la maturazione. Ad esempio, in linea generale e a seconda del tipo di formaggio, un valore alto di questo rapporto all'inizio della stagionatura può essere spia di una situazione anomala.

La spettroscopia NIR è già impiegata come tecnica rapida e non distruttiva per quanto riguarda la determinazione dei parametri di composizione chimica di un formaggio<sup>(1)</sup>. In questo studio che si vuole considerare come preliminare, si è voluto iniziare a valutare se, utilizzando la stessa tecnica, sia possibile determinare anche gli indici di maturazione relativi alla proteolisi che avviene durante la stagionatura di un formaggio e aumentare quindi le informazioni ricavabili con un'analisi NIR di un formaggio. Utilizzando dei campioni di formaggio Pecorino Siciliano D.O.P. a diversi stadi di maturazione e provenienti da diversi produttori, sono stati sviluppati pertanto dei modelli di calibrazione quantitativi NIR. Questi modelli sono stati sviluppati innanzitutto per il contenuto di proteine totale, quindi per il contenuto di azoto solubile in tampone acetato a pH 4.6 che in TCA al 12% e, da ultimo, direttamente l'andamento della proteolisi utilizzando il rapporto tra i valori di azoto solubile secondo i due metodi e il contenuto proteico totale.

## **Materiali e metodi**

Utilizzando uno spettrometro FT-NIR, il NIRFlex N-500 (Büchi Labortechnik AG, Svizzera) e lavorando in riflettanza diffusa, sono stati acquisiti gli spettri di 113 campioni di formaggio pecorino siciliano D.O.P., a diverso grado di stagionatura e provenienti da produttori diversi. Il range di lunghezze d'onda impiegato è quello che va da 4.000 a 10.000  $\text{cm}^{-1}$ , con una risoluzione di 8  $\text{cm}^{-1}$ . L'analisi NIR dei campioni è stata effettuata lavorando in riflettanza diffusa su campioni posti in piastre di Petri, (Schott Glass GmbH, Germania), alla temp. di 20°C. Si è operato effettuando 3 acquisizioni spettrali per ogni campione, (ciascuna media di 64 scansioni con la piastra in rotazione), per un totale di spettri acquisiti pari a 339.

Su ciascuno degli stessi 113 campioni sono stati determinati o calcolati 5 valori di riferimento utilizzando le metodiche di analisi distruttive classiche: proteine totali; azoto solubile in tampone

acetico a pH 4,6; azoto solubile in acido tricloroacetico (TCA) al 12 %; rapporto tra azoto solubile in tampone acetico e proteine totali (proteolisi pH 4,6); rapporto tra azoto solubile in TCA e proteine totali (proteolisi TCA). La metodica di riferimento utilizzata per l'analisi delle proteine totali è il metodo Kjeldhal. La proteina solubile in TCA al 12% è la quota di proteina del formaggio che risulta solubile in una soluzione acquosa al 12% di acido tricloroacetico: il campione viene omogeneizzato in una soluzione al 12% di TCA, filtrato e sul percolato viene effettuata la determinazione dell'azoto totale tramite metodo Kjeldhal. Similmente a quanto avviene con il TCA, la proteina solubile in tampone acetico a pH 4.6 è la quota di proteina del formaggio che risulta solubile in un tampone acetico con pH 4.6: il campione viene omogeneizzato in un tampone acetico con pH 4.6, filtrato e sul percolato viene effettuata la determinazione dell'azoto totale sempre col metodo Kjeldhal. Tramite il software chemometrico NIRCal 5.0 (Büchi Labortechnik AG, Svizzera) e usando la metodica del set di calibrazione/ set di validazione, i dati spettrali e i valori di riferimento determinati sono stati utilizzati per sviluppare cinque calibrazioni di tipo quantitativo, una per ciascuno dei parametri descritti.

## Risultati e discussione

Utilizzando il software chemometrico, i dati relativi a circa 2/3 dei campioni cioè 228 spettri (3 acquisizioni per 76 campioni) con i relativi valori delle analisi di riferimento, sono stati utilizzati per costruire i 5 modelli di calibrazione, successivamente validati contro i dati relativi ai campioni rimasti: la parte rimanente pari a 111 spettri (3 acquisizioni per 37 campioni). La calibrazioni trovate utilizzando il software chemometrico prevedono di utilizzare, per i 5 parametri da determinare, di utilizzare come dato spettrale quello ottenuto pretrattando prima con una correzione di scattering (MSC), quindi con una derivata prima, gli spettri originali dei campioni analizzati (Fig. 2 e 3).

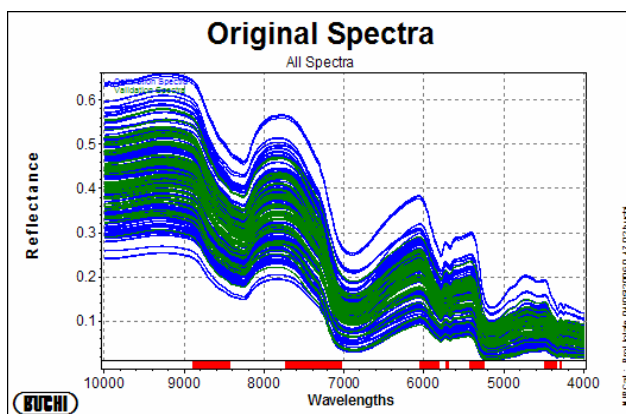


Fig. 2 - Spettri NIR originali dei campioni

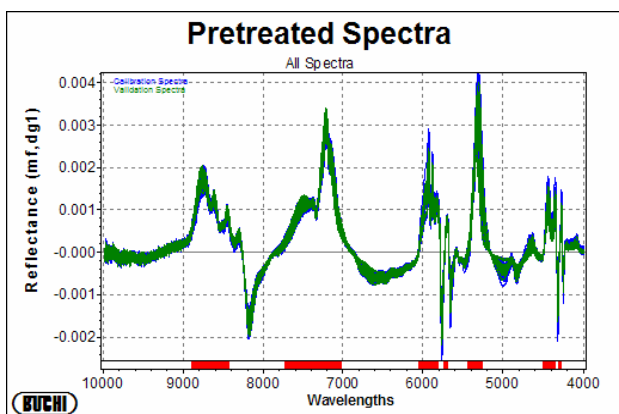


Fig. 3 – Spettri NIR pretrattati dei campioni

Per quanto riguarda il parametro proteine totali, utilizzando i due set di calibrazione e validazione, è stato elaborato, il modello di calibrazione riportato in figura 4, che utilizza la metodica PLS. I parametri statistici relativi alle performance del modello elaborato sono riportati nella Tabella 1.

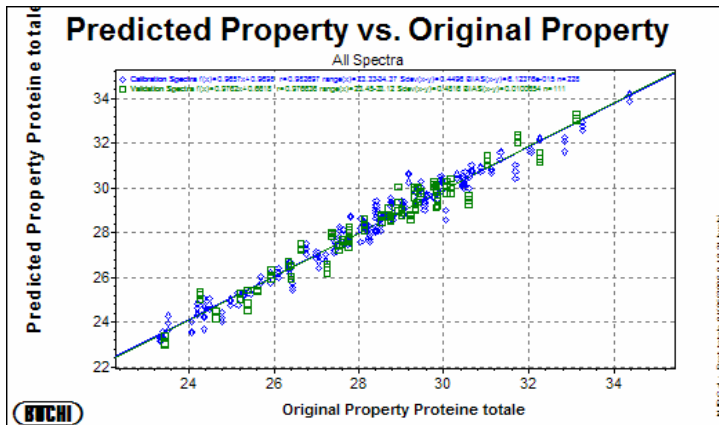


Fig. 4 – Curva di calibrazione del parametro “Proteine totali”. In blu sono riportati i campioni del set di calibrazione e in verde i campioni del set di validazione interno.

Set di campioni	Numero di spettri	Intervallo [%]	Coefficiente di correlazione (R)	SEC/SEP [%]
C-set	228	23,33 – 34,37	0,98	0,45
V-Set	111	23,45 – 33,12	0,98	0,48

Tab. 1 – Riassunto dei risultati relativi alla calibrazione per la determinazione del parametro “Proteine totali”

Per quanto riguarda i parametri proteina solubile a pH 4,6 e proteolisi a pH 4,6, utilizzando gli stessi set di calibrazione e validazione, sono stati elaborati, i modello di calibrazione riportati in figura 5 e 6, ed entrambe utilizzano la metodica PLS. I parametri statistici relativi alle performance dei modelli elaborati sono riportati nella Tabella 2.

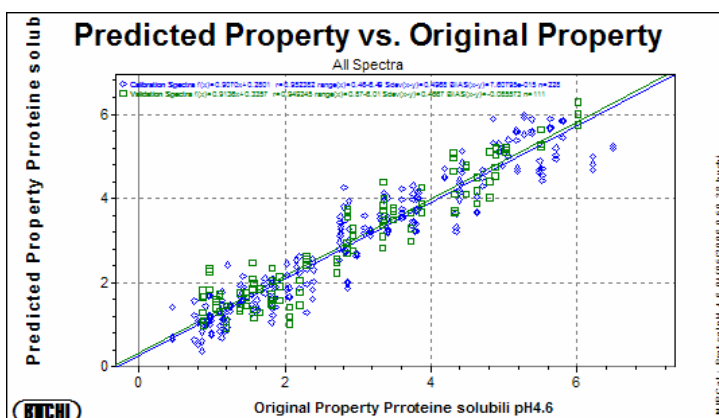


Fig. 5 – Curva di calibrazione del parametro “Proteina solubile pH 4,6”. In blu sono riportati i campioni del set di calibrazione e in verde i campioni del set di validazione interno.

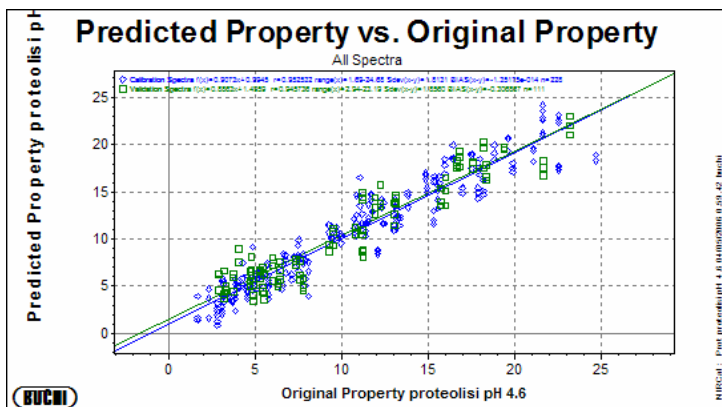


Fig. 6 – Curva di calibrazione del parametro “Proteolisi pH 4,6”. In blu sono riportati i campioni del set di calibrazione e in verde i campioni del set di validazione interno.

Parametro	Set di campioni	Numero di spettri	Intervallo [%]	Coefficiente di correlazione (R)	SEC/SEP [%]
Proteina solubile pH 4,6	C-set	228	0,46 – 6,49	0,95	0,49
	V-Set	111	0,87 – 6,01	0,95	0,47
Proteolisi pH 4,6	C-set	228	1,69 – 24,68	0,95	1,81
	V-Set	111	2,94 – 23,19	0,95	1,86

Tab. 2 – Riassunto dei risultati relativi alla calibrazione per la determinazione del parametro “Proteine solubili pH 4,6” e “Proteolisi pH 4,6”

Per i parametri proteina solubile in TCA 12% e proteolisi TCA, il lavoro è stato analogo: utilizzando gli stessi set di calibrazione e validazione, sono stati elaborato, i modello di calibrazione riportati in figura 7 e 8, ed entrambe utilizzano ancora la metodica PLS. I parametri statistici relativi alle performance dei modelli elaborati sono riportati nella Tabella 3.

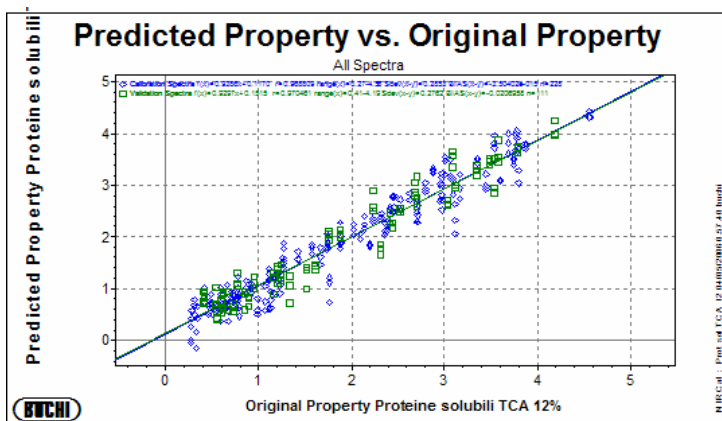


Fig. 7 – Curva di calibrazione del parametro “Proteina solubile TCA 12%”. In blu sono riportati i campioni del set di calibrazione e in verde i campioni del set di validazione interno.

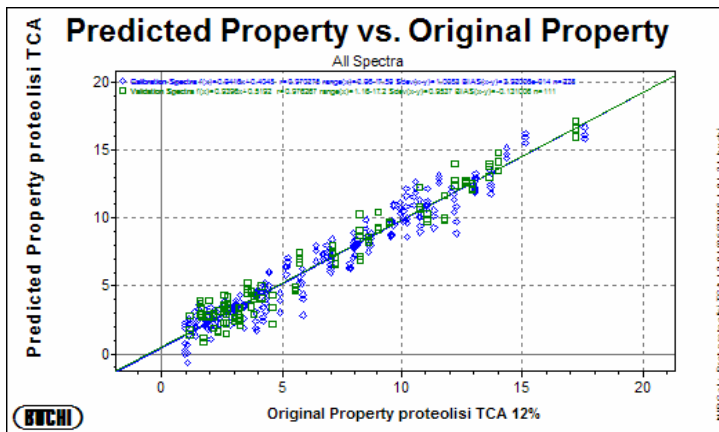


Fig. 8 – Curva di calibrazione del parametro “Proteolisi TCA 12%”. In blu sono riportati i campioni del set di calibrazione e in verde i campioni del set di validazione interno.

Parametro	Set di campioni	Numero di spettri	Intervallo [%]	Coefficiente di correlazione (R)	SEC/SEP [%]
Proteina solubile TCA 12%	C-set	228	0,27 – 4,56	0,98	0,28
	V-Set	111	0,41 – 4,19	0,98	0,28
Proteolisi TCA 12%	C-set	228	0,96 – 17,59	0,97	1,01
	V-Set	111	1,16 – 17,20	0,97	0,95

Tab. 2 – Riassunto dei risultati relativi alla calibrazione per la determinazione del parametro “Proteine solubili TCA 12%” e “Proteolisi TCA”

## Conclusioni

Lo scopo del presente studio preliminare era valutare se tramite la metodica di analisi NIR fosse possibile determinare degli indici di maturazione relativi al grado di proteolisi della parte proteica di un formaggio. I risultati ottenuti sulle due tipologie di indici di proteolisi, mostrano che le misure ottenibili tramite lo spettrometro FT-NIR sui parametri di interesse sono sufficientemente correlate ai valori delle analisi di riferimento: per la metodica con tampone acetico a pH 4,6 il coefficiente di regressione è pari a 0,95, mentre per l’analisi con TCA al 12% è pari allo 0,97. Per quanto riguarda i valori del errore di stima (SEP), è da mettere in rilievo che l’analisi NIR volta a determinare l’indice di proteolisi relativo all’azione della microflora spontanea del latte (TCA 12%) ha un SEP di 0,95% , cioè circa la metà dell’errore che si ha utilizzando il parametro relativo alla proteolisi generata dagli enzimi del caglio (tampone acetico a pH 4,6), pari a 1,85%. La metodica NIR pertanto risulta sufficientemente adeguata alla determinazione dell’indice di maturazione desiderato, ma mostra performance migliori se si lavora con la metodica che prevede l’utilizzo dell’acido Tricloroacetico al 12%.

## **Bibliografia**

- (1) R. Gianagiacomo; T. M. P. Cattaneo, *Near Infrared Spectroscopy in Agriculture, cap. 20 Analysis of Dairy and Eggs*, p. 559-592, American Society of Agronomy.