



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di laurea in Produzioni Animali Innovative e Sostenibili

**DETERMINAZIONE DI AMMINOACIDI LIBERI NEL PARMIGIANO REGGIANO:
CORRELAZIONE CON PARAMETRI TECNOLOGICI, COMPOSITIVI, SENSORIALI E
ZONA DI PRODUZIONE**

**CHARACTERISATION OF FREE AMINO ACIDS IN PARMIGIANO REGGIANO:
CORRELATION WITH TECHNOLOGICAL, COMPOSITIONAL, SENSORY
PARAMETERS AND PRODUCTION AREA**

Relatrici:

Chiar.ma Prof.ssa Augusta Caligiani

Correlatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Veronica Lolli

Dr.ssa Valentina Pizzamiglio

Laureanda:

Camilla Speranza

ANNO ACCADEMICO

2022 / 2023

INDICE

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	4
1. La proteolisi e la produzione di amminoacidi liberi nel processo produttivo del formaggio	4
2. Il processo produttivo del Parmigiano Reggiano	10
SCOPO DELLA RICERCA	14
MATERIALI E METODI	15
1. Campionamento	15
2. Analisi compositive e sensoriali, e parametri tecnologici di lavorazione	15
2.1 Analisi compositiva e sensoriale	15
2.2 Parametri tecnologici di lavorazione.....	16
3. Determinazione degli amminoacidi liberi.....	18
4. Determinazione del contenuto proteico	21
5. Analisi statistica	23
RISULTATI E DISCUSSIONE	24
1. Analisi del profilo in amminoacidi liberi nei campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi	24
2. Elaborazione statistica	25
2.1 Analisi preliminare: PCA e analisi di correlazione	25
2.2 Analisi sul processo produttivo.....	27
2.2.1 Fasi della lavorazione del latte (pre-coagulazione).....	28
2.2.2 Fase di coagulazione e salatura	35
2.2.3 Fase di stagionatura.....	41
2.3 Analisi sul periodo di produzione	43
2.4 Analisi sulla zona altimetrica di produzione	50
2.5 Riepilogo dei risultati ottenuti	53
2.5.1 Analisi sul processo produttivo.....	53

2.5.2 Analisi sul periodo di produzione	53
2.5.3 Analisi sulla zona altimetrica di produzione.....	54
CONCLUSIONI	55
BIBLIOGRAFIA.....	56
APPENDICE	61

ABSTRACT

In questo studio si è voluto determinare la composizione in amminoacidi liberi di 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi prelevati da 57 caseifici con l'obiettivo di definire la presenza di correlazioni e differenze statisticamente significative legate al profilo e contenuto in amminoacidi liberi, considerando diversi fattori che potessero influenzare il processo proteolitico, come il periodo (stagione) e la zona altimetrica di produzione, e alcuni parametri del processo di caseificazione del Parmigiano Reggiano. Inoltre, si è anche analizzata la presenza di correlazioni tra la zona e il periodo di produzione con il profilo sensoriale e la composizione centesimale dei campioni e si è voluto determinare se la composizione in amminoacidi liberi dei campioni analizzati influenzasse queste due componenti.

I risultati ottenuti dimostrano la presenza di correlazioni e differenze statisticamente significative relativamente al profilo in amminoacidi liberi con il profilo sensoriale, la composizione centesimale e la tecnologia di produzione, in particolare in relazione alla fase di stagionatura, al periodo e alla zona altimetrica di produzione.

In this study, we aimed to determine the free amino acid composition of 62 samples of 24-month Parmigiano Reggiano samples from 57 manufacturers with the objective of defining the presence of correlations and statistically significant differences related to the free amino acid profile and parameters, that potentially affect the proteolytic process; in particular, the season and altimetric area of production, and some selected parameters of the Parmigiano Reggiano cheese-making process were analysed. In addition, the presence of correlations among the area and period of production and the sensory profile and proximate composition of the samples was also investigated. Then, it was intended to determine whether the free amino acid composition of the analysed samples influenced these two components.

The results obtained showed significant correlations and statistically significant differences with respect to the free amino acid profile, sensory profile, proximate composition, and technology parameters, especially based on ripening stage, period and altimetric area of production.

INTRODUZIONE

1. La proteolisi e la produzione di aminoacidi liberi nel processo produttivo del formaggio

La proteolisi è un processo biochimico che comporta la degradazione delle proteine in composti più piccoli come peptidi e peptoni e successivamente in aminoacidi liberi. Questo processo può essere di natura enzimatica o batterica ed è influenzato da molteplici parametri, in particolare pH e temperatura dell'ambiente [1,2].

In Figura 1 è riportato lo schema relativo ai vari passaggi del processo proteolitico.

Per quanto riguarda i formaggi, in particolare per quelli a lunga stagionatura come il Parmigiano Reggiano, questo processo è fondamentale in quanto contribuisce allo sviluppo di aroma e consistenza del formaggio.

P.F. Fox nel suo articolo "Proteolysis during cheese manufacture and ripening" [1] pubblicato sul Journal of Dairy food science nel 1989 afferma che la proteolisi è l'evento biochimico maggiore che avviene nel formaggio durante il periodo di stagionatura.

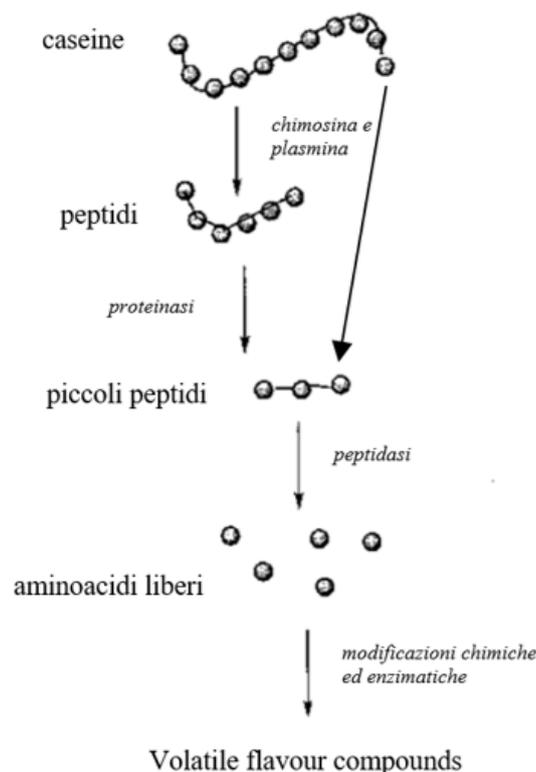


Figura 1: Schema raffigurante i diversi passaggi del processo proteolitico dalle proteine fino alla produzione di aminoacidi liberi.

"F. Tateo e M. Bononi, Food environment research laboratories (UNIMI), 2021 – La maturazione dei formaggi: processo biochimico multifattoriale" [2].

Il processo di proteolisi nel formaggio è influenzato dai diversi elementi, in particolar modo da pH e temperatura nelle fasi del processo di lavorazione, i quali sono in grado di influenzare gli enzimi e i batteri lattici coinvolti in questa attività proteolitica.

In particolare, la temperatura influisce sull'azione enzimatica delle popolazioni microbiche, soprattutto per i formaggi a pasta cotta, come il Parmigiano Reggiano. Infatti, successivamente alla cottura, a causa dell'elevata temperatura e la grossa dimensione della forma, si instaura un gradiente di temperatura decrescente dall'interno verso l'esterno della massa caseosa, che determina un effetto significativo sull'intensità e specificità della proteolisi durante la stagionatura [3]; inoltre, la temperatura è fondamentale per attivare gli enzimi endogeni del latte che contribuiscono al processo proteolitico [4,5].

Relativamente al pH, anch'esso incide sull'attività enzimatica, in quanto se eccessivamente acido può portare a una denaturazione degli enzimi inattivandoli; in aggiunta, esso influenza la vitalità dei batteri lattici e la conseguente lisi che determina il rilascio di enzimi proteolitici endogeni e può determinare una maggiore o minore azione degli enzimi che costituiscono il caglio [5].

Recentemente è stato studiato nei formaggi tipo Cheddar, come anche il contenuto di sale e il contenuto di grasso, influiscano sulla produzione di amminoacidi liberi; in particolare, il sale, influenzando sulla vitalità dei microrganismi, determina una maggiore o una minore lisi cellulare e conseguente rilascio di enzimi proteolitici endogeni. Invece, è stato osservato che in presenza di un elevato contenuto di grasso, questo comporta una riduzione del processo proteolitico e la formazione di amminoacidi liberi [6,7].

Nello studio di Loffi et al., 2021 [8], effettuato sulla riduzione del contenuto di sale nel formaggio Parmigiano Reggiano 30 mesi, è risultato un contenuto lievemente maggiore di amminoacidi liberi nei campioni a ridotto contenuto di sale. Questo indicherebbe una proteolisi più accentuata in questi campioni dovuta a una minore inibizione degli enzimi e dei microrganismi [8]. Tuttavia, nello stesso studio è stato affermato che queste lievi differenze non pregiudicassero il profilo sensoriale del prodotto, in quanto, nonostante la proteolisi risultasse leggermente più spinta, non si è riscontrato lo sviluppo di aromi amari caratteristici degli amminoacidi liberi; inoltre, non è stata riscontrata nessuna differenza per quanto riguarda l'umidità [8]. Questi risultati sono in accordo con un altro studio relativo sempre al contenuto di sale, il quale afferma che un ridotto contenuto di sale può portare ad una maggiore attività enzimatica non controllata ed un effetto ritardante sulla lipolisi, ma che a livello sensoriale nel Parmigiano Reggiano non comporti cambiamenti significativi rispetto al prodotto tradizionale [9].

Infine, un altro elemento che può influenzare la proteolisi è l'ambiente di stalla, in quanto il grado di pulizia della sala di mungitura e della mammella influenza il livello di contaminazione iniziale del latte, determinando una differente popolazione microbica endogena del latte; questo vale soprattutto per i formaggi prodotti con latte crudo e non sottoposti a cottura durante il processo produttivo, in quanto sarà proprio la flora batterica naturalmente presente nel latte a determinare i processi di proteolisi e lipolisi che avvengono durante il periodo di stagionatura del formaggio [10].

I fattori che sono direttamente collegati alla proteolisi nel formaggio sono le proteinasi naturalmente presenti nel latte, la flora microbica endogena del latte e quella aggiunta mediante gli starters selezionati o naturali e gli enzimi che costituiscono il caglio. In particolare, relativamente agli enzimi endogeni del latte, il processo proteolitico è svolto principalmente dalla plasmina, un enzima che è naturalmente presente nel latte nella sua forma inattiva, il plasminogeno, e che successivamente ai trattamenti termici viene attivato. Oltre alla plasmina, un ruolo importante è ricoperto dalla flora lattica naturalmente presente nel latte e dalle colture starter che vengono aggiunte durante il processo di caseificazione; entrambi per effetto della fermentazione lattica portano a un'acidificazione della cagliata che comporta una denaturazione proteica; inoltre, i batteri lattici sono in grado di utilizzare i peptidi, precedentemente ottenuti dall'azione della plasmina e degli enzimi del caglio, come substrato di crescita, in quanto sono in grado di sintetizzare proteasi e peptidasi, producendo peptoni e, in maniera minore, amminoacidi liberi [1,5].

I batteri lattici contribuiscono al processo proteolitico e alla formazione di amminoacidi liberi anche durante la fase di maturazione e stagionatura, in quanto durante questo periodo i fattori intrinseci del prodotto (pH, acqua libera (aw), temperatura e potenziale redox) si modificano portando a un cambiamento nel substrato di crescita dei microrganismi che non è più ottimale. Infatti, il processo di acidificazione determinato dalla fermentazione lattica svolta dagli stessi batteri causa un abbassamento del pH; allo stesso tempo, si verifica una riduzione della quantità di acqua libera (aw), dovuta al processo di stagionatura, che comporta una graduale riduzione dell'umidità, e all'azione del sale, che lega l'acqua libera restante, inibendo la proliferazione batterica sia patogena che no. Questo determina l'instaurarsi di condizioni di stress nei microrganismi presenti nel prodotto, i quali vanno incontro ad autolisi e morte cellulare determinando il rilascio di enzimi endogeni che contribuiscono al processo proteolitico [11-13]. Si può inoltre affermare che la lisi cellulare dei batteri presenti nel formaggio durante la fase di stagionatura contribuisca alla rottura dei peptidi in amminoacidi liberi e alla formazione di acidi grassi che contribuiscono alla formazione di composti volatili coinvolti nello sviluppo del gusto e dell'aroma del formaggio [14].

Un altro elemento che influenza direttamente l'attività proteolitica, anche se in maniera minore, è il caglio, dato che una parte degli enzimi che lo costituiscono rimangono intrappolati nel reticolo caseinico dopo la precipitazione della cagliata. Anche se la maggior parte degli enzimi del caglio viene rilasciata nel siero, la piccola quantità che rimane nella cagliata svolge un'attività proteolitica verso le caseine contribuendo al processo proteolitico, che va dalla formazione della cagliata fino al periodo di stagionatura [5,15].

L'attività di proteolisi, di lipolisi e di fermentazione sono quindi una serie di processi biochimici responsabili della formazione dei caratteri tipici del Parmigiano Reggiano e risultano influenzati dalla combinazione di diversi fattori, tra cui ambiente, tecnologia e microflora [16,17]. In particolare, la proteolisi nel formaggio è un processo mediato da enzimi (vedi Figura 1), come la chimosina e la pepsina del caglio, la plasmina del latte e di starters e non starters microbici, che conducono all'idrolisi della frazione proteica del latte in peptidi e amminoacidi liberi. La formazione di peptidi e amminoacidi liberi contribuisce alla formazione dell'aroma tipico del formaggio e al suo valore nutrizionale [18,19].

Per quanto riguarda la produzione di aromi, si può affermare che la proteolisi ha un effetto diretto e uno indiretto su questo evento; come citato sopra, il primo è legato alla produzione di amminoacidi liberi e peptidi, mentre il secondo è legato al catabolismo degli amminoacidi in ammine, acidi organici e tioli; composti organici con peso molecolare ancora più basso e quindi più facilmente percepibili dai recettori olfattivi e gustativi [20,21].

Relativamente agli amminoacidi liberi, inoltre, si può affermare che questi, insieme agli acidi grassi liberi, determinino l'individualità e la tipicità del formaggio; questo perché gli amminoacidi liberi derivano da reazioni cataboliche che possono o non possono avvenire in funzione dei processi produttivi e delle caratteristiche del latte stesso. Secondo alcuni autori [22], si può parlare di un vero e proprio pattern caratteristico di amminoacidi liberi, derivante dalla degradazione enzimatica dei peptidi e dal catabolismo degli amminoacidi stessi in acidi organici in grado di differenziare i diversi tipi di formaggio, e non solo di contribuire al valore nutrizionale [23], ma anche di permettere di riconoscerne l'autenticità.

Inoltre, il contenuto di amminoacidi liberi può anche permettere di stabilire il grado di stagionatura del formaggio [24], dato che la loro quantità si modifica nel tempo; per esempio, è risultato che, per quanto riguarda il Parmigiano Reggiano, formaggi più giovani presentassero un contenuto più elevato di leucina e isoleucina, mentre formaggi più vecchi presentassero un contenuto maggiore di treonina [21].

Sono stati condotti diversi studi relativi al contenuto di amminoacidi liberi e al processo di stagionatura e maturazione [25,26]. Gli autori hanno riscontrato un aumento graduale del contenuto di amminoacidi liberi con un andamento analogo alla maturazione. In particolare, è stato notato che la serina tende sempre ad aumentare durante la stagionatura, la glutammina invece si riduce drasticamente e l'arginina tende a trasformarsi in ornitina.

Relativamente al loro contributo aromatico si è notato che i differenti amminoacidi liberi conferiscono note gustative diverse [27]: ad esempio, gli amminoacidi ramificati, come isoleucina e valina, sono precursori chiave per lo sviluppo dell'aroma del formaggio; l'arginina è associata al gusto amaro, la prolina, la serina e l'asparagina invece sono associate al gusto dolce. Il metabolismo dell'aspartato genera acetoino e diacetile, responsabili dell'aroma di burro. Gli amminoacidi aromatici, soprattutto la fenilalanina (Phe) e, anche se in minor parte, la tirosina (Tyr) e il triptofano (Trp) sono precursori di composti responsabili dell'aroma fruttato e floreale [24].

Un'altra associazione rilevante nei formaggi a pasta dura stagionati, come il Parmigiano Reggiano, è quella tra il gusto umami e l'amminoacido glutammato; relativamente a questa associazione, da un precedente lavoro di tesi [28], è emersa una correlazione significativa tra la zona e il periodo di produzione e la quantità di acido glutammico; inoltre, si è notato che una quantità maggiore di questo amminoacido esalti le note speziate, il gusto salato e il piccante.

Infine, un'inibizione dell'attività proteolitica, di conseguenza un ridotto contenuto di amminoacidi liberi, può causare una perdita di aroma nel prodotto finale o al contrario, un'eccessiva attività proteolitica può contribuire maggiormente al gusto amaro [8].

Riguardo ai parametri di lavorazione del Parmigiano Reggiano, nello studio di Malacarne et al., 2006 [3] gli autori affermano che tra i fattori tecnologici che maggiormente influenzano le attività enzimatiche responsabili dell'attività proteolitica nel formaggio siano la temperatura dell'ambiente (inclusa la stagione di produzione), il contenuto di sale e l'umidità della pasta. È stato inoltre notato che la proteolisi è spinta nei primi sei mesi di stagionatura e che successivamente ai 24 mesi questo fenomeno si arresta, raggiungendo una fase di plateau, come riportato nel grafico sottostante (Figura 2).

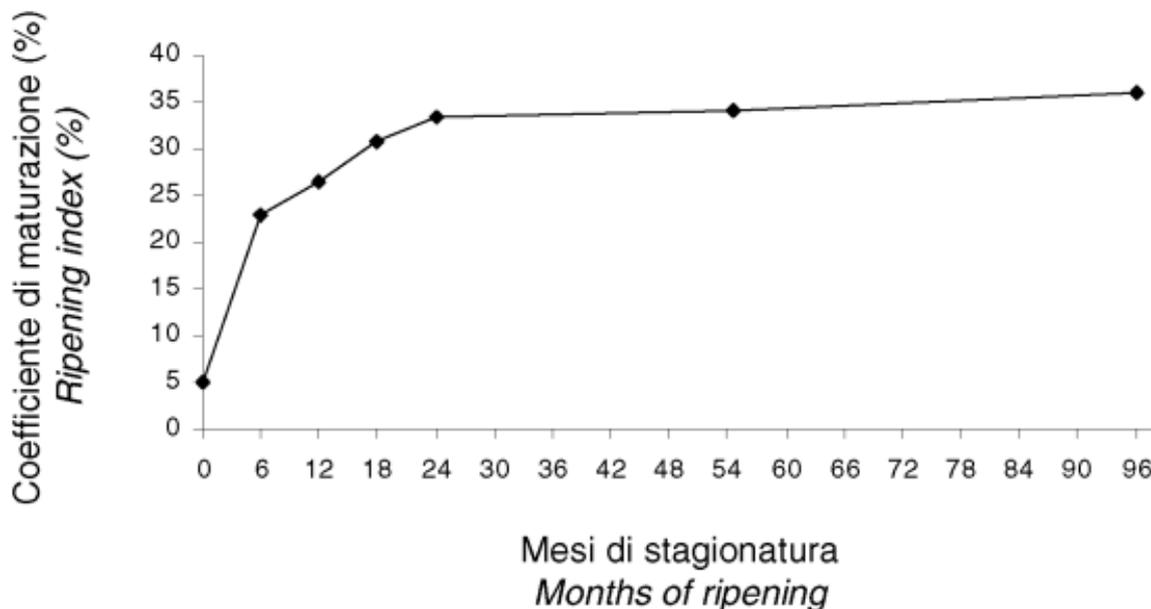


Figura 2: Coefficiente di maturazione del Parmigiano Reggiano durante il periodo di stagionatura. "M. Malacarne et al., Scienza e tecnica lattiero-casearia, 2006 - Caratterizzazione chimico-fisica della maturazione del Parmigiano Reggiano" [3].

Nel paragrafo successivo si riportano i passaggi principali del processo produttivo del Parmigiano Reggiano, evidenziando per alcune fasi il loro potenziale effetto sull'attività enzimatica e qualità del prodotto finale.

2. Il processo produttivo del Parmigiano Reggiano

Le basi fondamentali della produzione del Parmigiano Reggiano sono: (1) l'utilizzo di latte crudo, (2) la parziale scrematura del latte della sera per affioramento naturale del grasso in vasca, (3) l'assenza di aggiunta di additivi e conservanti e (4) l'aggiunta di fermenti da colture naturali in siero [17].

Il Parmigiano Reggiano è prodotto in un'area geografica ben definita, essendo una DOP, che corrisponde alle province di Parma, Reggio Emilia, Modena, Bologna a sinistra del fiume Reno e Mantova a destra del fiume Po; qui si concentrano gli allevamenti in cui le bovine vengono alimentate con foraggi prodotti anch'essi in quest'area (almeno il 75% della sostanza secca del foraggio in comprensorio). L'alimentazione segue precise specifiche dettate dal disciplinare che impediscono l'uso di insilati, farine di origine animale ed alimenti fermentati [29].

La tecnologia di caseificazione [3,29], prevede la lavorazione di circa 1100 kg di latte crudo per ottenere, a fine stagionatura, due forme del peso di circa 38-40 kg. Il processo produttivo del Parmigiano Reggiano avviene a partire dal latte crudo che si suddivide in latte del mattino intero e latte della sera precedente, parzialmente scremato per affioramento naturale delle panne in vasche di affioramento, che permettono la risalita naturale dei globuli di grasso (affioramento naturale).

Il mattino successivo entrambi i latti vengono versati nelle tipiche caldaie di rame a forma di campana rovesciata. L'utilizzo di latte intero mescolato a latte parzialmente scremato è necessaria per ottenere un corretto rapporto caseina: grasso (che deve essere di 1,1), influenzando sulla resa del latte e la qualità del prodotto finito.

Successivamente viene aggiunto il siero innesto, uno starter naturale derivante dall'acidificazione spontanea del siero residuo della caseificazione del giorno precedente. Il siero innesto svolge un ruolo fondamentale nel processo di acidificazione della pasta del formaggio che, insieme alla lavorazione del latte in caldaia, influenza lo sviluppo di una microflora lattica, che, durante il periodo di stagionatura, è responsabile dei processi biochimici che determinano le specifiche proprietà strutturali e organolettiche del Parmigiano Reggiano [17].

Di seguito al siero innesto viene aggiunto il caglio, nel caso del Parmigiano Reggiano può essere esclusivamente di vitello, che è principalmente composto da chimosina, un enzima che ha azione proteolitica specifica sulla k-caseina e permette di destabilizzare le micelle di caseina portando alla formazione, inizialmente, di fiocchi e poi di un reticolo di paracaseina definito coagulo, il quale raccoglie al suo interno la parte acquosa, i globuli di grasso e i batteri; l'insieme di queste componenti vien definito cagliata.

Con l'aggiunta del caglio ha inizio il processo di coagulazione. La coagulazione del Parmigiano Reggiano è definibile di tipo misto acido-presamico, in quanto si ha l'azione enzimatica del caglio e l'abbassamento del pH ad opera del siero innesto con una lieve acidificazione del latte.

La cagliata, dopo che si è formata, tende a contrarsi naturalmente attraverso un processo che viene denominato sineresi e di conseguenza tende a espellere il siero che si trova tra le sue maglie; è un processo molto lungo e per accelerare questo fenomeno vengono attuate alcune operazioni tecnologiche, che sono la rottura o spinatura della cagliata e la cottura.

Attraverso il processo di spinatura la cagliata viene frammentata dal casaro in granuli della dimensione di un chicco di riso grazie ad un antico attrezzo detto spino. È a questo punto che si effettua il processo di cottura formato da due fasi: il "primo fuoco" in cui si passa da una temperatura di 32°C a una di 43°C, successivamente si effettua una sosta a questa temperatura e si procede con il "secondo fuoco" in cui la temperatura raggiunge i 55°C. Durante questo processo i granuli della cagliata vengono mantenuti in agitazione mediante sistemi meccanici.

Al termine della cottura il valore dell'umidità dei granuli si è ridotto di circa il 55%. Al termine di questo processo quindi si ha la fase di giacenza in cui i granuli caseosi precipitano sul fondo della caldaia formando un'unica massa caseosa aggregandosi; anche in questa fase si ha una riduzione del contenuto di acqua ad opera del processo di sineresi con un contenuto di umidità finale pari al 45%. Dopo circa cinquanta minuti, il casaro estrae la massa caseosa che darà vita a due forme gemelle. La massa viene tagliata in due parti e avvolta nella tipica tela di lino, successivamente il formaggio viene immerso in una fascera per 48-72 ore, che gli darà la sua forma definitiva. È in questo periodo temporale che avvengono i fenomeni microbiologici e le conseguenti reazioni enzimatiche che determinano l'acidificazione della pasta. L'acidificazione è un processo fondamentale della caseificazione in quanto determina le caratteristiche sensoriali, strutturali ed organolettiche del prodotto finale.

L'acidificazione conseguente al processo enzimatico di tipo glicolitico in cui per opera della fermentazione lattica, svolta dalla flora microbica termofila del siero innesto, produce acido lattico che determina un abbassamento del pH. Durante la messa in fascera ad ogni forma viene assegnata una placca di caseina con un codice alfanumerico unico e progressivo, che corrisponde alla "carta d'identità" che in ogni momento e in ogni luogo rende possibile identificare l'origine della forma.

Le forme, nel corso della formatura, vengono capovolte più volte per favorire uno spurgo uniforme del siero, che altrimenti si accumulerebbe solo in corrispondenza della parte sulla superficie di appoggio. Dopo pochi giorni, le forme vengono immerse in una soluzione satura di acqua e sale: si

tratta di una salatura per osmosi; il sale è fondamentale per inibire la crescita dei patogeni specialmente all'esterno della forma che è rimasta a temperature elevate per un periodo di tempo minore, inoltre regola l'attività enzimatica nel corso della stagionatura, in quanto si diffonde nella forma gradualmente, determinando un'inattivazione dapprima degli enzimi presenti nelle zone periferiche e successivamente di quelli nelle zone interne. Questo determina caratteristiche diverse del formaggio a seconda della zona considerata [3]. Con questo passaggio si conclude il processo di caseificazione del Parmigiano Reggiano e inizia il periodo di stagionatura.

La stagionatura avviene in magazzini con parametri di temperatura e umidità relativa controllati, che determinano il raggiungimento delle caratteristiche di prodotto desiderate.

Durante la stagionatura, gli enzimi dei batteri lattici non starters e starters naturali, insieme all'attività residua del caglio, inducono il processo di proteolisi che aumenta nel corso del tempo di stagionatura [30] e che porta alla continua formazione di oligo-peptidi e amminoacidi liberi (15-25% del contenuto proteico) [20], oltre che a composti derivati amminoacidici non proteolitici (NPAD), i quali potenzialmente contribuiscono all'aroma del prodotto finale [31].

Per il Parmigiano Reggiano, la stagionatura minima è di 12 mesi, la più lunga tra tutti i formaggi DOP, ed è solo in questo momento che si potrà dire se ogni singola forma potrà essere identificata con il marchio a fuoco e conservare il nome che le è stato impresso all'origine e continuare così la stagionatura fino a 24, 36, 40 mesi e oltre. Trascorsi 12 mesi, gli esperti del Consorzio controllano tutte le forme attraverso un esame chiamato "espertizzazione": la forma viene percossa con il martelletto e l'orecchio attento dell'esperto battitore riconosce eventuali difetti interni che possono interferire con la qualità. Le forme risultate idonee in seguito al controllo vengono marchiate con l'apposito bollo a fuoco, a quelle che non presentano i requisiti della DOP vengono asportati i contrassegni e i marchi di riconoscimento.

In Figura 3 è riportato lo schema di produzione del Parmigiano Reggiano.

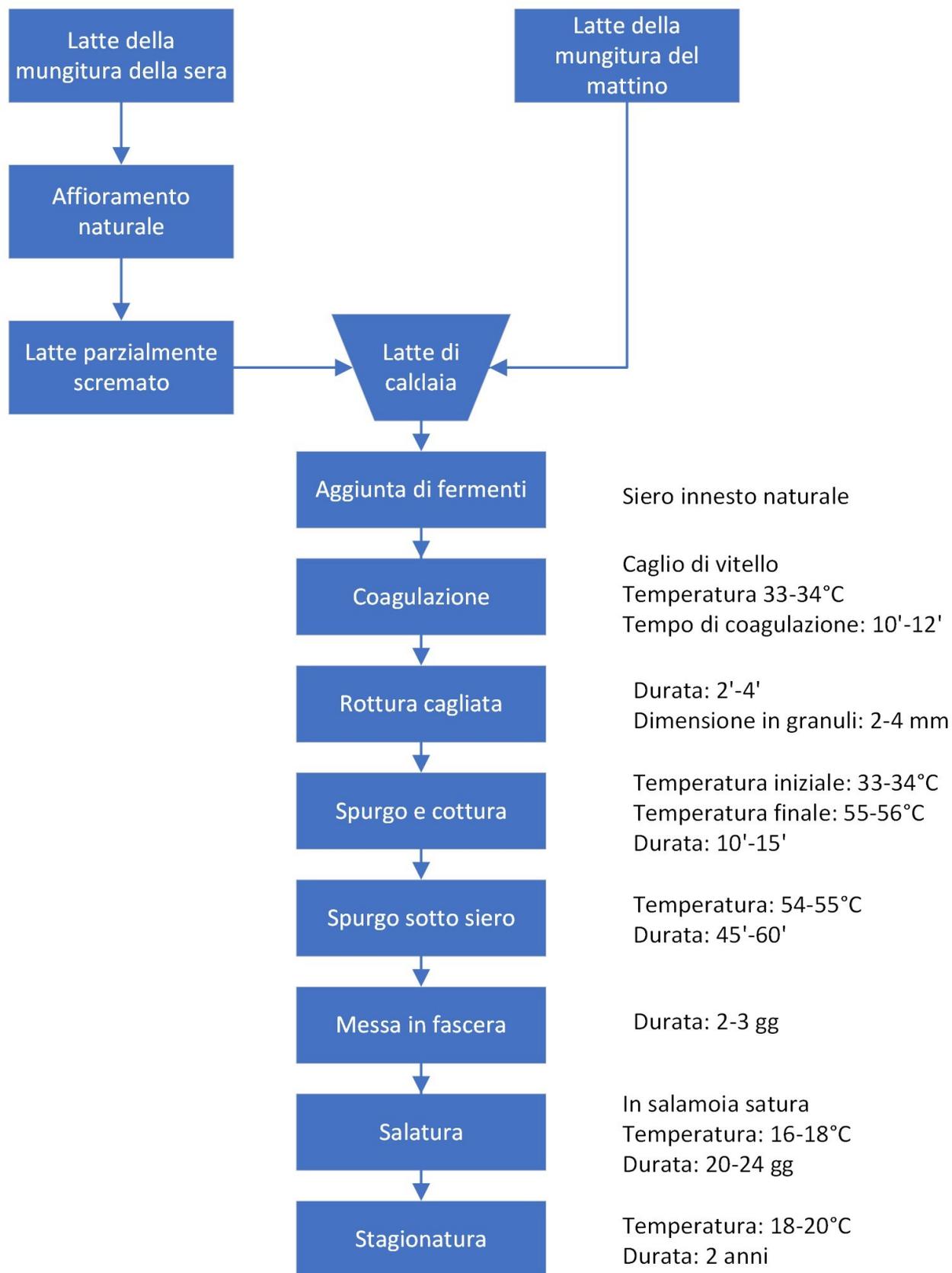


Figura 3: Fasi del processo produttivo del Parmigiano Reggiano. "A. Galvani, Osservatorio medioambientale, 2022 - I prodotti tipici agroalimentari nel quadro della valorizzazione ambientale" [32].

SCOPO DELLA RICERCA

La proteolisi nel formaggio è il più importante evento biochimico che avviene durante la produzione e maturazione del formaggio, che, attraverso la degradazione delle proteine del latte, contribuisce alla formazione di peptidi e amminoacidi liberi responsabili dell'aroma tipico del formaggio e del suo valore nutrizionale [18,19].

Dallo stato dell'arte della sezione introduttiva, emerge che l'andamento del processo proteolitico e, di conseguenza il profilo in amminoacidi liberi del prodotto finale, è in funzione di diversi fattori legati alle fasi di lavorazione del formaggio, inclusi fattori ambientali (come temperatura, pH, umidità) che sono in grado di influenzare l'attività enzimatica della microflora residente.

Nel presente lavoro di tesi, è stato analizzato il profilo in amminoacidi liberi di campioni di formaggio Parmigiano Reggiano 24 mesi, prodotti nel corso dell'anno 2019-2020 da diversi caseifici localizzati in zone altimetriche differenti (pianura, collina e montagna) nella zona di produzione del Parmigiano Reggiano. Il dataset ottenuto è stato elaborato statisticamente al fine di indagare, in primo luogo, le potenziali correlazioni esistenti tra profilo in amminoacidi liberi e caratteristiche di lavorazione, includendo determinati parametri del processo di produzione del Parmigiano Reggiano che, basandosi sui dati in letteratura [1], potessero influenzare il processo proteolitico del formaggio: (i) fase della lavorazione del latte prima della coagulazione (parametri pre- e post- caldaia); (ii) fase di coagulazione e salatura; (iii) fase di stagionatura (sosta e ambiente del magazzino).

Successivamente, sono state esplorate eventuali differenze nel profilo in amminoacidi liberi sulla base di stagionalità (mesi di produzione) e altimetria (montagna, collina e pianura), correlando questi fattori anche alle caratteristiche sensoriali (ad esempio gusto, aroma e colore) e di composizione centesimale (contenuto proteico, di lipidi, umidità e sale) dei campioni analizzati.

MATERIALI E METODI

1. Campionamento

In questo elaborato di tesi sono stati analizzati 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi provenienti da 57 caseifici in zone di produzione differenti (montagna, collina e pianura) e prelevati dal Consorzio del Parmigiano Reggiano da luglio 2021 a luglio 2022, classificabili nel periodo primavera/estate (aprile-agosto) e autunno/inverno (settembre-marzo).

I dati relativi ai parametri tecnologici di processo, i risultati delle analisi compositive centesimali e delle analisi sensoriali sono stati gentilmente forniti, in via confidenziale, dal Consorzio del formaggio Parmigiano Reggiano, come descritto di seguito nel dettaglio.

In “Appendice” si riporta la lista completa dei parametri considerati durante le analisi statistiche suddivisi per categoria (anagrafica – tecnologia – composizione – sensoriale (Tabella I) e il dataset completo del profilo degli amminoacidi liberi (mg/g proteine) e % proteine dei campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi raggruppati per codice campione e mese/anno di produzione (Tabella II).

2. Analisi compositive e sensoriali, e parametri tecnologici di lavorazione

2.1 Analisi compositiva e sensoriale

I parametri di composizione correlati al profilo in amminoacidi liberi dei campioni analizzati sono stati: contenuto di acqua (umidità), contenuto di grassi, proteine e contenuto di cloruro di sodio.

L’analisi del contenuto proteico è stata condotta sperimentalmente mediante metodo Kjeldahl, come descritto in dettaglio nel paragrafo 4. I dati sui restanti parametri di composizione centesimale (umidità, lipidi e contenuto di sale) sono stati condotti dal Consorzio del Parmigiano Reggiano secondo i metodi descritti in Loffi et al., 2021 [8].

I parametri sensoriali che sono stati selezionati per l'analisi sono: il colore, l'intensità dell'odore, l'odore di burro, l'odore di crosta, l'odore vegetale, l'odore di frutta, "altri odori", l'aroma di burro, l'aroma di crosta, l'aroma di frutta, l'aroma di brodo di carne, l'aroma speziato, "altri aromi", il gusto dolce, il gusto salato, il gusto amaro, il gusto piccante, l'elasticità, la friabilità, l'umidità, la solubilità ed infine la granulosità. Ai parametri dell'analisi sensoriale è stato assegnato un punteggio considerando una scala da 1 a 7, assegnati da panelisti esperti del Consorzio del Parmigiano Reggiano, secondo la procedura descritta in Garavaldi et al., 2010 [33].

2.2 Parametri tecnologici di lavorazione

I dati relativi ai parametri tecnologici di lavorazione sono stati gentilmente concessi dal Consorzio del Parmigiano Reggiano.

In Figura 4, si riporta uno schema relativo ai parametri tecnologici analizzati in relazione alle fasi del processo produttivo del Parmigiano Reggiano. La scelta dei parametri da correlare con il profilo in amminoacidi liberi è stata in funzione dei parametri di processo per i quali sono disponibili maggiori fondamenti scientifici con il processo proteolitico [1,5], che saranno discussi di seguito nella sezione di Risultati e Discussione.

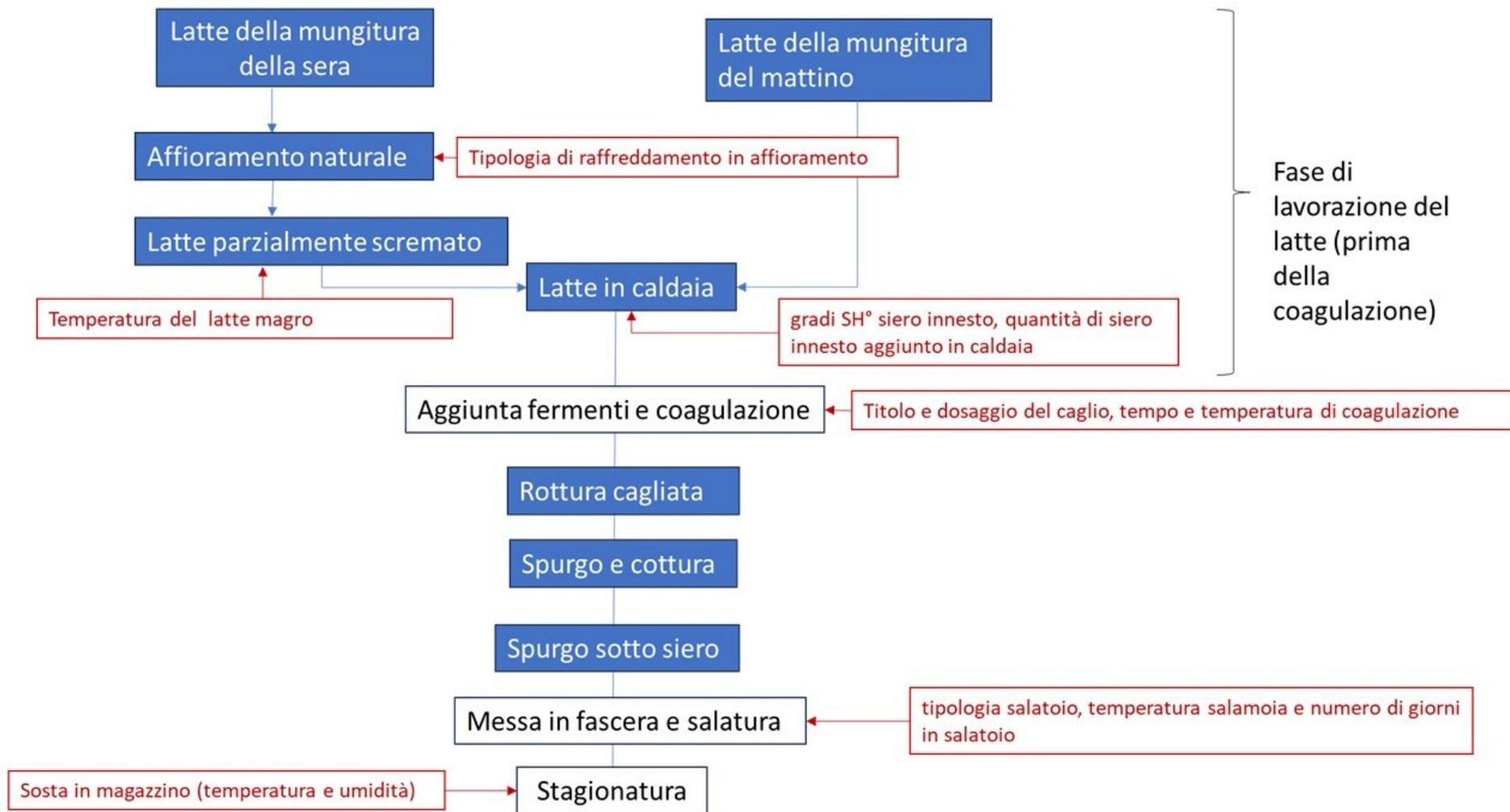


Figura 4: Schema relativo alle principali fasi del processo produttivo del Parmigiano Reggiano e (in rosso) i parametri selezionati per l'elaborazione statistica dei dati.

3. Determinazione degli amminoacidi liberi

Strumentazione:

- IKA Ultraturrax T25
- Agitatore meccanico (Biosan)
- Centrifuga Eppendorf 5810R
- UPLC-MS Waters Acquity

Reagenti:

- Soluzione standard di DL- norleucina (4,92 mM) in HCl 0,1 M
- Soluzione H (soluzione standard di amminoacidi 2,5 mM)
- Soluzione mix di amminoacidi in HCl 0,1 M con concentrazione di 5 mM (amminoacidi standard (Sigma-Aldrich) utilizzati: glutammina, asparagina, triptofano, idrossi-prolina e cisteina)
- kit di derivatizzazione AccQ•Tag, Waters (polvere reagente: 6-aminoquinolyN-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC))

Estrazione:

Sono stati pesati 0,5 g di campione in duplicato, a cui sono stati aggiunti 1 mL di soluzione di standard interno DL- norleucina 4,92 mM e 10 mL di acqua bidistillata, sottoposti a ultraturrax per 2 min e, successivamente, si è portato a volume di 15 mL con acqua bidistillata. I campioni sono stati posti sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 h e in centrifuga a 4°C per 30 min.

In seguito a questi trattamenti, i campioni sono stati filtrati ed è stato trasferito 1 mL della soluzione in eppendorf. L'estratto è stato congelato a -20°C.

Preparazione della retta di calibrazione:

Per la determinazione della concentrazione degli amminoacidi liberi nei campioni analizzati, è stata preparata una soluzione di calibrazione contenente un mix di amminoacidi standard e lo standard interno a concentrazione nota.

Per ottenere la soluzione madre di mix di amminoacidi è stata stabilita la quantità di ogni amminoacido da inserire in soluzione a partire dal peso molecolare di ogni amminoacido e dalla molarità della soluzione finale; una volta stabilita la quantità gli amminoacidi sono stati pesati e inseriti in un matraccio, è stato aggiunto HCL 0,1 M per sciogliere gli amminoacidi e si è portato a

volume. La retta è stata costruita calcolando 5 punti della retta, con concentrazioni differenti della soluzione H di aminoacidi e della soluzione mix di aminoacidi, le concentrazioni utilizzate sono: 1,5 mM– 1 mM– 0,1 mM– 0,05 mM– 0,01 mM, mentre per la DL- norleucina la concentrazione è rimasta costante (0,1 mM).

Derivatizzazione:

È stata eseguita l'analisi mediante UPLC-MS con l'obiettivo di quantificare il contenuto di aminoacidi liberi; questa tecnica accoppia la cromatografia liquida ad alte pressioni alla spettrometria di massa, la quale si basa sulla determinazione degli analiti di interesse in base al loro rapporto massa/carica (m/z). Prima dell'analisi UPLC-MS, si esegue un passaggio preliminare di derivatizzazione mediante l'utilizzo del kit di derivatizzazione AccQ-Fluor, con l'obiettivo di aumentare la massa degli aminoacidi in modo da farli rientrare nel range m/z analizzabile in UPLC-MS.

Per la reazione, sono stati prelevati 10 µL di campione e sono stati inseriti in una provetta a cui sono stati aggiunti 70 µL di buffer borato in modo da stabilizzare il pH della soluzione, si è vortexato e sono stati aggiunti 20 µL di reagente (reagent diluent b), si è vortexato per 1 minuto e successivamente si è fatta riposare la soluzione per 1 minuto a temperatura ambiente, poi per 10 minuti a 55°C su piastra con bagnetto ad acqua; al termine della reazione, sono stati aggiunti 200 µL di acqua bidistillata per arrivare a un volume finale di 300 µL. Infine, la soluzione ottenuta è stata prelevata e trasferita in vials di vetro per effettuare l'analisi strumentale.

Analisi UPLC-MS:

Tutti i campioni ottenuti sono stati analizzati attraverso UPLC-MS. Per l'analisi sono state applicate le seguenti condizioni:

- Fase stazionaria: colonna Acquity BEH C18, 300 Å, 1,7 µm, 2,1 mm* 150 mm (Waters)
- Eluente A: acqua bidistillata con 0,1% di acido formico e 0,2% di acetonitrile (ACN)
- Eluente B: acetonitrile con 0,1% di acido formico
- Temperatura colonna: 35°C
- Volume iniettato: 5µL, per i bianchi 10 µL
- Flusso: 0,2 mL/min
- Tempo analisi: 45 minuti
- Lavaggi: in MeOH-ACN

Il gradiente di eluizione per determinare gli amminoacidi totale e solforati delle due miscele di solventi A e B è riportato in tabella:

tempo (min)	7	28	29	32	33	45
% A	100,0	75,6	0,0	0,0	100,0	100,0
% B	0,0	24,4	100,0	100,0	0,0	0,0

Parametri di rivelazione (spettrometro di massa a singolo quadrupolo, Waters SQ):

- Modalità di ionizzazione ESI (+)
- Capillary voltage 3.2 kV e cone voltage 30 V
- Temperatura sorgente 150° C
- Temperatura desolvatazione 300 °C, cone gas flow (N2) 100 L/h, desolvation gas flow (N2) 650 L/h
- Acquisizione full scan (270–518 m/z), 1 s.

(Inlet file: peptidi_AAshort45)

Elaborazione dei dati:

L'area di ciascun picco, determinato estraendo lo ione avente m/z corrispondente alla somma del PM di ciascun amminoacido di interesse e 171 m/z (PM del gruppo reagente), corrisponde alla quantità del relativo amminoacido. I dati acquisiti sono stati processati in automatico dal programma Waters® MassLynx™.

4. Determinazione del contenuto proteico (metodo Kjeldahl, ISO 1871:2009)

Strumentazione:

- DKL heating digester
- Distillatore semiautomatico (UDK 139, VELP)

Reagenti:

- Acido solforico concentrato (98%)
- Pastiglie di agente catalizzatore (Kjeldahl tablets 3,5g/tablet)
- Pastiglie di agente antischiuma (Kjtabs VS)
- Ossido di rame (II)
- Soluzione di viraggio (acido borico 0,65 M con l'1% di verde bromocresolo, 1 mg/mL in metanolo e 0,7% di rosso di metilene 1 mg/mL in metanolo)
- Idrossido di sodio 32%
- HCl 0,1 M

I reagenti, i sali, acidi e basi utilizzati sono di grado analitico e sono forniti da Merk-Sigma Aldrich o Carlo Erba.

Scopo dell'analisi:

Questo metodo di analisi è stato utilizzato per poter stimare la percentuale di proteine contenute nei campioni di grattugiato di Parmigiano Reggiano analizzati. È un metodo composto da tre fasi: digestione, distillazione e titolazione. La quantità di campione analizzato è stata di 0,3 g.

Fase 1 digestione:

Nelle apposite provette sono stati inseriti 0,3 g di campione a cui sono stati aggiunti 15 mL di acido solforico concentrato, 1 pastiglia di catalizzatore, 1 pastiglia di antischiuma e una punta di spatola di ossido di rame (II). Le provette sono state poste all'interno dell'heating digester ed è stato selezionato il programma di "digestione latticini" (secondo AOAC methods 991.21), la durata del processo di digestione è di 30 minuti.

Al termine di questa fase i campioni devono essere di colore blu/verde brillante, questo indica che la digestione è avvenuta correttamente.

Fase 2 distillazione:

Viene preparata una beuta con 25 mL di soluzione di viraggio costituita da acido borico 0,65 M con l'1% di verde bromocresolo, 1 mg/mL in metanolo e lo 0,7% di rosso di metilene 1 mg/mL in metanolo. Viene prima effettuato un lavaggio e una prima distillazione a vuoto. Successivamente si effettua la distillazione del campione, inserendo la provetta nel distillatore, dove viene aggiunto idrossido di sodio al 32% e viene posta la beuta contenente la soluzione di viraggio sotto l'ugello da dove esce il campione distillato.

Fase 3 titolazione:

Viene condizionata una buretta con HCl 0,1 M, si pone la beuta contenente la soluzione di viraggio e il campione distillato al di sotto e si fa sgocciolare lentamente il titolante, agitando lentamente il campione. Deve essere individuato il punto di fine titolazione per poter calcolare la percentuale di azoto totale contenuta nel campione. La titolazione avviene quindi quando il colore vira da verde a rosa acceso.

La formula che viene utilizzata per calcolare la % di azoto nel campione è la seguente:

$$\%N \text{ tot} = (14,008 * VHCl * NHCl / gC) * 100$$

dove VHCl indica il volume in L di HCl sgocciolato durante la titolazione, NHCl indica la normalità dell'HCl utilizzato (0,1N) e gC rappresenta il peso in g del campione.

La percentuale di proteine si ottiene moltiplicando la percentuale di azoto totale per il fattore di correzione del formaggio che è F= 6,38.

5. Analisi statistica

Softwares:

- SPSS versione 26.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA)
- Metaboanalyst 5.0 Platform (McGuill University, Montreal, Canada, <https://www.metaboanalyst.ca>)
- Microsoft® Excel

Scopo ed analisi:

Lo scopo della ricerca è stato quello di indagare l'effetto sul contenuto di amminoacidi liberi in riferimento alle differenze osservate nel processo produttivo adottato dai diversi caseifici, incluso il periodo e la zona altimetrica di produzione, l'aspetto compositivo e sensoriale del prodotto finito.

A questo scopo, l'elaborazione dei dati è stata eseguita mediante: analisi descrittive (calcolo della media e della deviazione standard), analisi di statistica multivariata non supervisionata (analisi delle componenti principali, PCA), analisi multivariata supervisionata, come PLSDA accoppiata a VIP score (sono state considerate le variabili con punteggio maggiore di 1), analisi di correlazione (correlazione di Pearson's) ed analisi della varianza (ANOVA accoppiata da post hoc Tukey test e t Student's test in base ai gruppi di interesse).

Il numero dei campioni del dataset, costituito dalle variabili relative alle concentrazioni di amminoacidi liberi (ottenute mediante metodo UPLC-MS, come descritto al paragrafo 3 della sez. di M&M) e le % di proteine totali (ottenuti tramite metodo Kjeldahl, come descritto al paragrafo 4 della sez. di M&M), varia in funzione del tipo di parametro esaminato, in quanto, in alcuni casi, in base al parametro esaminato, sono stati individuati nel dataset di 62 campioni di Parmigiano Reggiano degli outliers, relativi a campioni anomali del dataset individuati dall'analisi multivariata oppure mancanti di informazioni/dati (quindi esclusi a priori).

Il p-value è stato impostato a 0,05 (livello di significatività α al 5%) e sono state considerate differenze statisticamente significative quelle che presentavano un intervallo di confidenza inferiore al valore del p-value.

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Analisi del profilo in aminoacidi liberi nei campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi

Come mostrato in Tabella 1, il metodo UPLC-MS adottato ha permesso di rilevare e quantificare 18 aminoacidi liberi nei 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi.

Tabella 1: Aminoacidi liberi (mg/g proteine) rilevati in 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi mediante UPLC-MS.

AA liberi (mg/g proteine)	media	dev.std.	minimo	massimo
Acido glutammico (Glu)	49	5	32	61
Prolina (Pro)	26	3	20	33
Lisina (Lys)	25	5	2	39
Leucina (Leu)	22	2	17	31
Valina (Val)	19	2	15	24
Serina (Ser)	17	2	13	23
Isoleucina (Ile)	17	2	13	27
Fenilalanina (Phe)	13	2	9	25
Asparagina (Asn)	11	2	7	15
Acido aspartico (Asp)	10	2	4	13
Treonina (Thr)	9	1	5	12
Alanina (Ala)	7	1	5	9
Istidina (His)	6	1	5	10
Glicina (Gly)	6	1	4	10
Tirosina (Tyr)	6	2	3	16
Metionina (Met)	6	1	4	9
Triptofano (Trp)	2	1	1	5
Glutamina (Gln)	1,4	0,4	1	3
Totale AA liberi (g/100 g proteine)	26	2	21	33
Proteine totali (g/100g)*	29	3	23	36

Note: L'arginina è stata esclusa dal dataset per errore nel metodo strumentale. *Proteine totali determinate mediante metodo Kjeldahl.

Di questi amminoacidi liberi, acido glutammico (Glu), prolina (Pro), lisina (Lys) e leucina (Leu) sono gli amminoacidi che presentano una concentrazione media maggiore a 20 mg/g proteine, in linea con i profili riportati in letteratura [21,34].

Il valore medio di amminoacidi liberi totali (di tutti i campioni (n=62) risulta $26\pm 2\%$, conforme a quanto indicato dal Disciplinare di Produzione, che deve essere maggiore del 15% delle proteine totali [29].

In generale, considerando il profilo in amminoacidi liberi dell'intero dataset relativo a campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi, non si nota una elevata variabilità. Infatti, come anticipato, il rilascio di amminoacidi liberi nel Parmigiano Reggiano, oltre che al microbiota del formaggio, è un processo strettamente correlato al tempo di stagionatura [3,20].

Tuttavia, in questo studio, si è voluto indagare più nel dettaglio, e verificare a parità di mesi di stagionatura (24 mesi), la presenza di eventuali differenze nel profilo in amminoacidi liberi e contenuto proteico di questi campioni sulla base di parametri tecnologici, compositivi e fattori ambientali, correlando infine i parametri sensoriali al periodo e alla zona di produzione.

A tale scopo, si è proceduto combinando un approccio statistico multivariato, sia non supervisionato (Analisi delle Componenti Principali, PCA) che supervisionato (PLSDA), all'analisi di correlazione e all'analisi della varianza, come descritto di seguito.

2. Elaborazione statistica

2.1 Analisi preliminare: PCA e analisi di correlazione

In primo luogo, come anticipato sopra, è stata condotta un'analisi statistica multivariata non supervisionata (Analisi delle Componenti Principali, PCA) sul dataset costituito dalle concentrazioni di amminoacidi liberi (mg/g proteine) e contenuto proteico totale (%) di tutti i 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi, con lo scopo di rilevare eventuali raggruppamenti tra i campioni sugli assi delle componenti principali.

Come analisi preliminare, è stata effettuata anche un'analisi di correlazione (correlazione di Pearson's) tra le variabili dello stesso dataset.

Dai risultati della PCA, non è emerso nessun raggruppamento significativo.

Dall'analisi di correlazione (Figura 5) emerge una debolissima correlazione negativa tra % di proteine totali e concentrazione di alcuni amminoacidi liberi, quali acido aspartico ($r = -0,002$), asparagina ($r = -0,074$), serina ($r = -0,097$) e alanina ($r = -0,076$), ma non statisticamente significativa ($p > 0,05$).

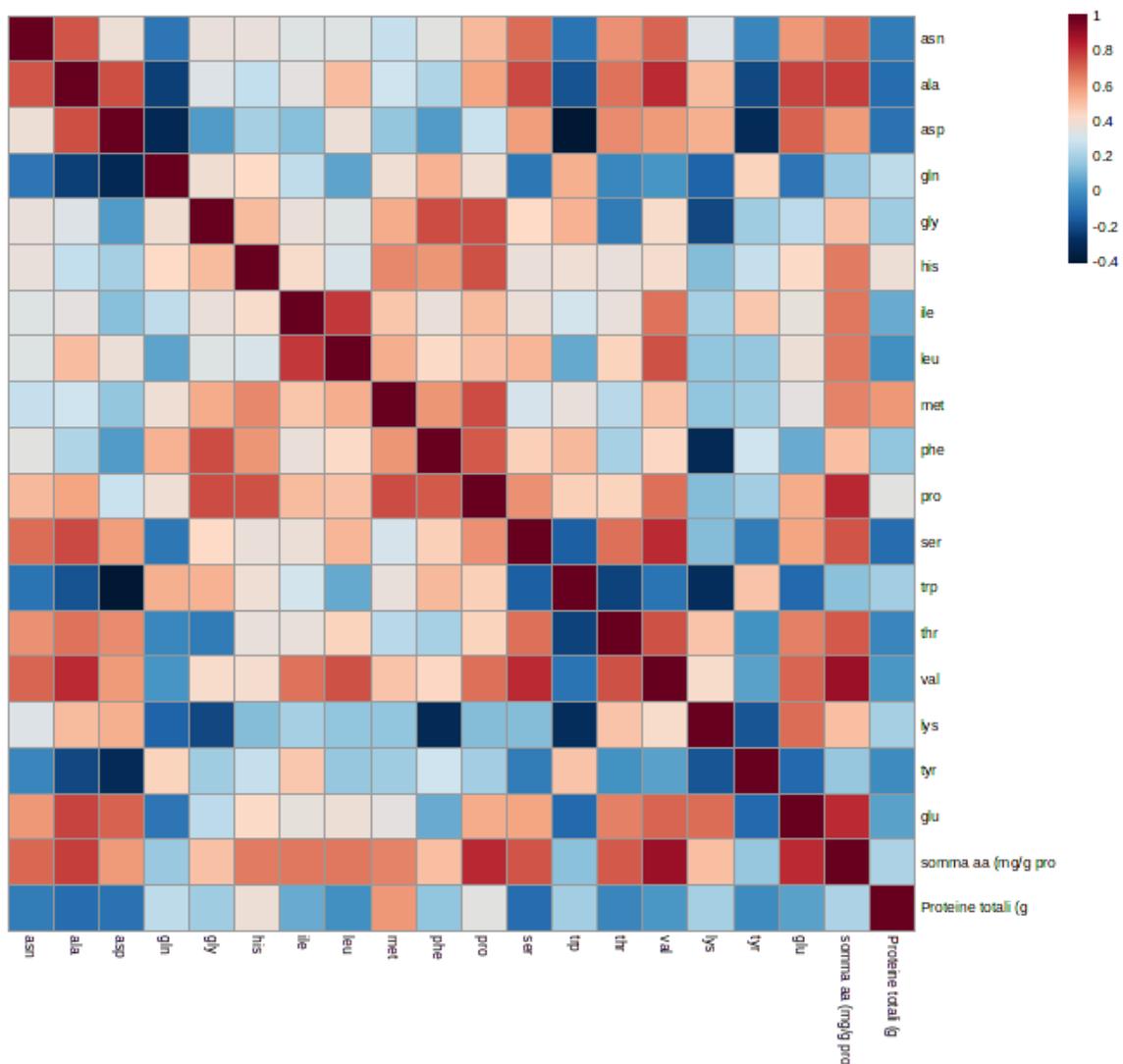


Figura 5: Heatmap di correlazione di amminoacidi liberi (mg/g proteine) e contenuto proteico totale (%) di 59 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi. (Esclusi 3 outliers individuati dall'analisi multivariata).

2.2 Analisi sul processo produttivo

Come anticipato nella sezione di Introduzione, le diverse fasi di lavorazione del formaggio possono influire sul processo proteolitico mediato dagli enzimi, derivanti da agenti coagulanti (caglio) o dalla flora batterica del siero innesto, del latte crudo e da popolazioni batteriche secondarie che si sviluppano durante la lavorazione, i quali determinano un profilo in amminoacidi liberi caratteristico del prodotto finale [18,35]. Il processo proteolitico del formaggio può essere suddiviso in tre fasi [1,5]: (i) proteolisi del latte prima del processo produttivo; (ii) proteolisi enzimatica indotta nella fase di coagulazione; (iii) proteolisi durante la stagionatura.

Quindi, nel presente lavoro di tesi, i parametri del processo produttivo forniti dal Consorzio del Parmigiano Reggiano (vedi Tabella I sez. Appendice) e analizzati in funzione del profilo proteico (profilo in amminoacidi liberi e contenuto di proteine), sono stati raggruppati in tre fasi:

(i) lavorazione del latte (fase pre-coagulazione);

(ii) fase coagulazione e salatura;

(iii) fase di stagionatura.

Di seguito sono riportate i risultati ottenuti in relazione alle diverse fasi selezionate discusse nel dettaglio.

2.2.1 FASI DELLA LAVORAZIONE DEL LATTE (PRE-COAGULAZIONE)

Le fasi della lavorazione del Parmigiano Reggiano descritte in questa sezione sono molto distanti dal prodotto finito. Tuttavia, il latte di partenza è un elemento in grado di influenzare la qualità e le rese di formaggio [36]. Quindi nella fase di "pre-coagulazione", si sono voluti considerare alcuni parametri che, potenzialmente, possono determinare delle differenze, in particolare nello sviluppo della popolazione microbica e nella frazione caseinica, fattori che contribuiscono al processo proteolitico [18,19] e che, di conseguenza, possono influenzare il profilo in amminoacidi liberi dei campioni analizzati, come descritto di seguito.

A) FASE PRE-CALDAIA

Per questa fase del processo produttivo, si sono considerati due parametri relativi al latte magro. Come anticipato nel paragrafo 2 della sezione di Introduzione, l'aggiunta di latte parzialmente scremato (per affioramento naturale) al latte intero, è un passaggio fondamentale che determina un corretto rapporto caseine/grasso, che può influire sulla composizione della flora lattica e di conseguenza sulla proteolisi durante la fase di stagionatura [18]. In particolare, sul profilo in amminoacidi liberi, in questa fase è stato valutato l'effetto dell'affioramento delle panne e la temperatura del latte magro.

- Affioramento delle panne (tipo di raffreddamento in affioramento)

Dall'analisi PLSDA della tipologia di raffreddamento in affioramento (condizionato, n=12; intercapedine, n=27; ambiente, n=13 e serpentina, n=4), (Figura 6), si può osservare come i campioni appartenenti alle diverse tipologie si distribuiscano uniformemente nel grafico a due componenti, senza clusterizzare in aree differenti.

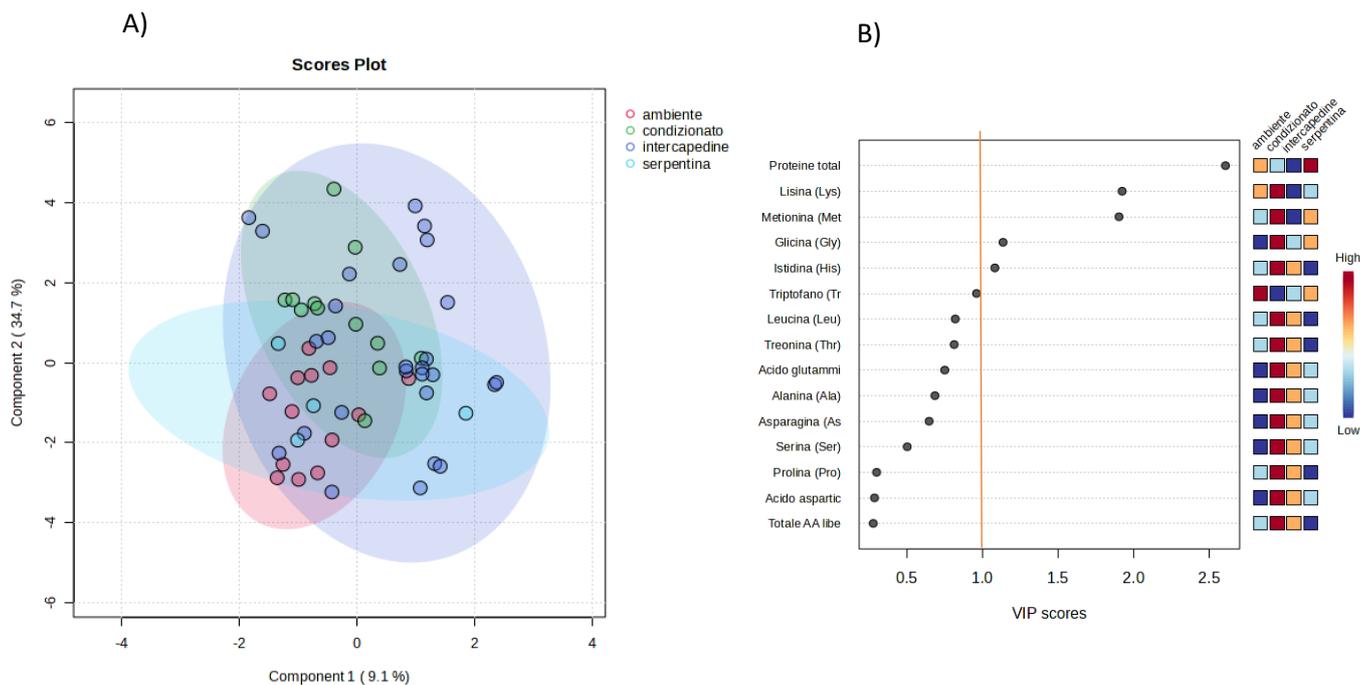


Figura 6: A) Score plot di PLSDA ottenuto dal dataset costituito dalle concentrazioni di amminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine totali (%) classificato per tipologia di raffreddamento in affioramento (condizionato, n=12; intercapedine, n=27; ambiente, n=13; serpentina, n=4) di 56 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi e B) VIP score (si sono considerate le variabili con valore maggiore di 1).

In seguito, è stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) con post-hoc Tukey test, da cui è risultato che gli amminoacidi asparagina, alanina, serina, treonina, valina e l'acido glutammico presentassero delle variazioni statisticamente significative in base alla tipologia di raffreddamento ($p < 0,05$). In Tabella 2, sono riportate le lettere di significatività relative ai gruppi osservati.

Dalla Tabella 2, si può osservare come il contenuto medio degli amminoacidi liberi sopra indicati sia risultato essere maggiore nella tipologia di affioramento "condizionato"; tuttavia, bisogna considerare una situazione di sbilanciamento nella numerosità dei clusters della variabile considerata.

Tabella 2: Concentrazioni (mg/g proteine) degli amminoacidi liberi selezionati dall'ANOVA ($p < 0,05$) dei 56 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi suddivisi per tipologia di raffreddamento in affioramento. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (ANOVA, Tukey HSD, $p < 0,05$).

Tipo di raffreddamento in affioramento		Asn	Ala	Ser	Threo	Val	Glu
Condizionato (n=12)	Media	13 ^b	7,7 ^b	19 ^b	10 ^b	20 ^b	53 ^b
	dev.std.	1	0,5	2	1	2	4
Intercapedine (n=27)	Media	10 ^a	7 ^{ab}	17 ^{ab}	9 ^{ab}	19 ^{ab}	49 ^{ab}
	dev.std.	1	1	2	1	2	5
Ambiente (n=13)	Media	9 ^a	6,5 ^a	16 ^a	8 ^a	18 ^a	46 ^a
	dev.std.	1	0,9	2	1	1	4
Serpentina (n=4)	Media	9,5 ^a	6,9 ^{ab}	16 ^a	8 ^a	18 ^a	48 ^{ab}
	dev.std.	0,4	0,5	1	2	2	3

- Temperatura del latte magro

Dal grafico a due componenti relativo all'analisi PLSDA, è risultato che, nonostante l'ampio range di temperature (12-20°C: 12°C, n=3; 13°C, n=4; 14°C, n=3; 15°C, n=5; 16°C, n=12; 17°C, n=9; 18°C, n=9; 19°C, n=6; 20°C, n=3), i differenti gruppi si distribuissero nella stessa zona del grafico, come riportato in Figura 7.

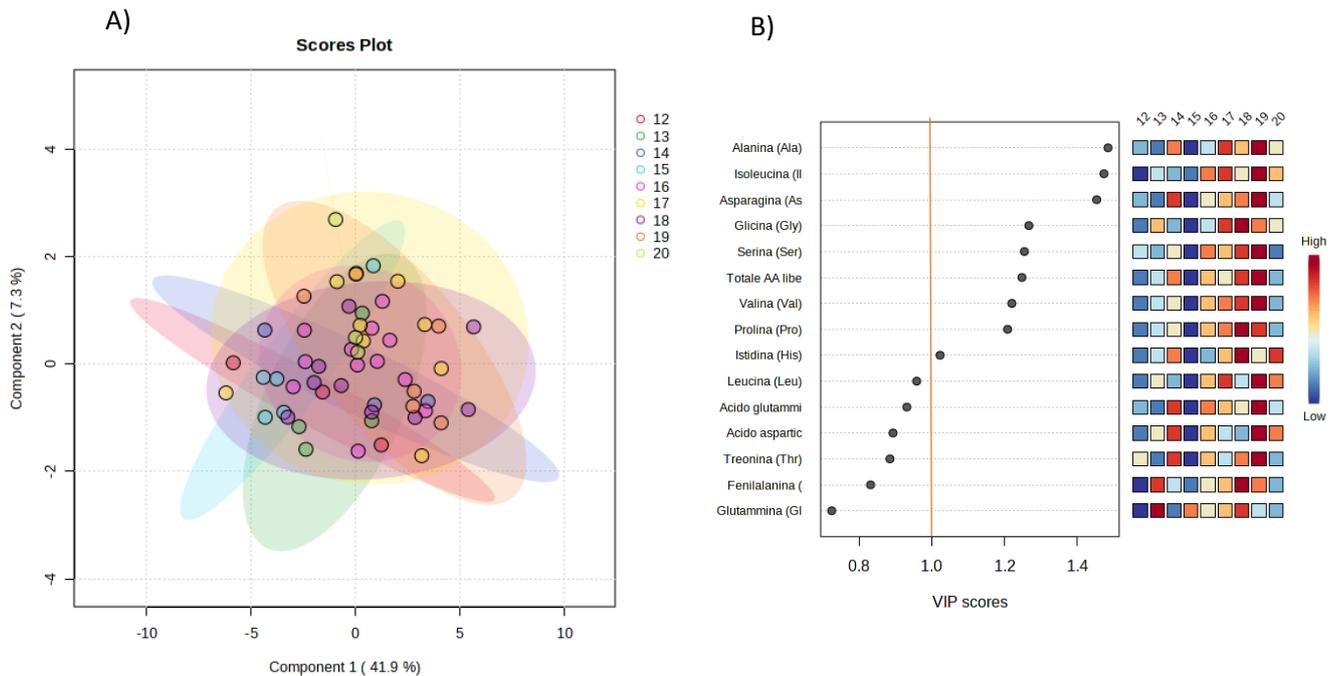


Figura 7: A) Score plot di PLSDA ottenuto dal dataset costituito dalle concentrazioni di amminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine totali (%) classificato in base alla temperatura del latte magro (12°C, n=3; 13°C, n=4; 14°C, n=3; 15°C, n=5; 16°C, n=12; 17°C, n=9; 18°C, n=9; 19°C, n=6; 20°C, n=3) di 54 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi e B) VIP score (si sono considerate le variabili con valore maggiore di 1).

Se si considera il grafico del VIP score (Figura 7B), l'istidina, la prolina, la valina, la serina, la glicina, l'asparagina, l'isoleucina l'alanina, e gli amminoacidi liberi totali sono tra le variabili con una concentrazione maggiore per i campioni di formaggio prodotti dal latte magro ad una temperatura di 18-19°C.

Dai risultati dell'analisi di correlazione, l'asparagina, la serina e l'isoleucina sono risultate le uniche variabili moderatamente correlate positivamente in modo significativo ($p < 0,05$) con la temperatura del latte magro (asparagina, $r = 0,267$, serina, $r = 0,258$; isoleucina, $r = 0,280$). Tuttavia, dall'analisi della varianza, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le loro concentrazioni medie (ANOVA, $p > 0,05$), come riportato in Figura 8.

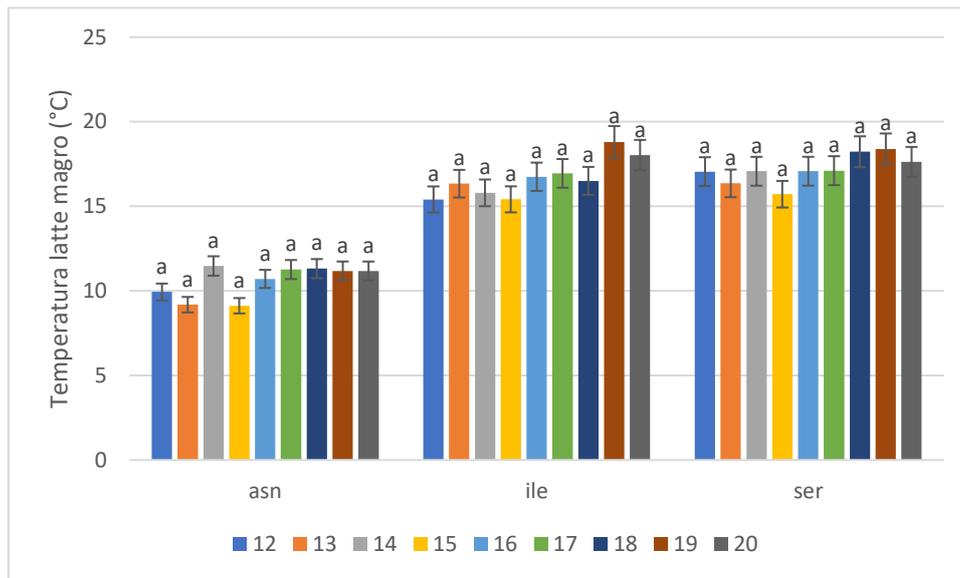


Figura 8: istogramma relativo alle concentrazioni medie di amminoacidi liberi (mg/g di proteine) moderatamente correlati positivamente alla temperatura del latte magro: Asn, Ile e Ser (Pearson's r , $p < 0,05$) di 54 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi. Non si evidenziano differenze significative nelle concentrazioni medie (ANOVA, Tukey HSD, $p > 0,05$).

B) PARAMETRI DEL LATTE IN CALDAIA

- Gradi SH° del siero innesto e quantità di siero innesto aggiunto in caldaia

Come anticipato nella sezione di Introduzione, la qualità del siero innesto per il Parmigiano Reggiano è di fondamentale importanza [17]. Infatti, l'acidità determinata dal siero innesto influenza la vitalità dei batteri lattici, di conseguenza i processi biochimici, come il rilascio di enzimi proteolitici [5,15], che determinano le specifiche caratteristiche del prodotto finito.

L'acidità titolabile (°SH) è il primo tra i parametri di qualità del siero innesto rilevati dal Consorzio del Parmigiano Reggiano, mentre nella fase di preparazione, tra i fattori che possono influenzarne la

composizione, è inclusa la quantità di siero posto in fermentazione, che determina il valore corretto del titolo di acidità del latte in caldaia [17].

In una prima elaborazione, è stata condotta l'analisi discriminante PLS-DA e l'analisi della varianza ANOVA (ad una via) per il dataset raggruppato per le singole variabili (gradi °SH del siero innesto e quantità di siero innesto aggiunto in caldaia in Kg).

In relazione ai gradi SH° del siero innesto (28°C, n=7; 29°C, n=6; 30°C, n=16; 31°C, n=18; 32°C, n=6; 33°C, n=3), dal grafico relativo all'analisi multivariata supervisionata PLS-DA (Figura 9), non si evidenziano raggruppamenti significativi.

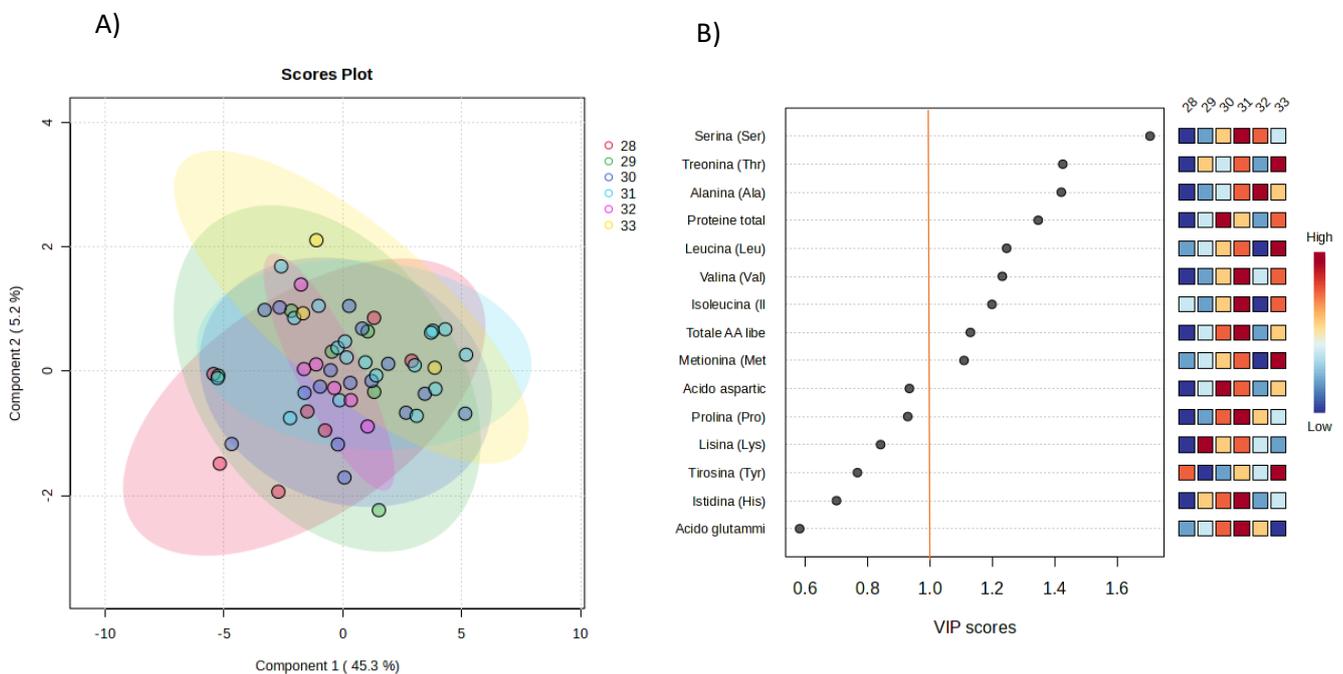


Figura 9: A) Score plot di PLS-DA ottenuto dal dataset costituito dalle concentrazioni di aminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine totali (%) classificato in riferimento ai gradi SH° del siero innesto (28°C, n=7; 29°C, n=6; 30°C, n=16; 31°C, n=18; 32°C, n=6; 33°C, n=3) di 56 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi e B) VIP score (si sono considerate le variabili con valore maggiore di 1).

Le concentrazioni delle variabili con VIP score maggiore di 1, quali serina, treonina, alanina, leucina, valina, isoleucina, metionina, aminoacidi liberi totali e proteine totali (%), risultano generalmente minori a 28° SH, mentre risultano ad una concentrazione maggiore a 31° SH. Di conseguenza l'intero dataset (n totale = 62 campioni) è stato rielaborato considerando tre clusters relativi ai range di valore di gradi °SH: minore di 28° SH, n= 9, range 28-31° SH, n=41 e maggiore di 31° SH, n=12. Tuttavia, neanche con questo raggruppamento, l'analisi discriminata ha evidenziato dei clusters

significativi. Lo stesso risultato è stato ottenuto in seguito ad analisi della varianza ANOVA e analisi di correlazione, le quali non hanno evidenziato risultati statisticamente significativi ($p > 0,05$).

Per l'elaborazione dei dati relativi alla variabile "quantità di siero innesto aggiunto in caldaia (Kg)", il dataset (n totale= 62 campioni) è stato prima raggruppato in 4 gruppi relativi ai seguenti range di valori: < 26 Kg, n=6; range 26-29,9 Kg, n= 21; 30-34 Kg, n= 26; \geq 35 Kg, n=9 e successivamente in due clusters più ampi: < 30 Kg, n= 27 e \geq 30 Kg, n=35, al fine di considerare due gruppi costituiti da una numerosità più omogenea. Tuttavia, i risultati ottenuti dall'analisi multivariata non hanno evidenziato raggruppamenti significativi per questa variabile in nessuno dei due raggruppamenti considerati. È riportato di seguito lo score plot (Figura 10) relativo all'analisi PLSDA relativo al primo raggruppamento dei campioni relativo alla quantità di siero innesto aggiunto al latte in caldaia.

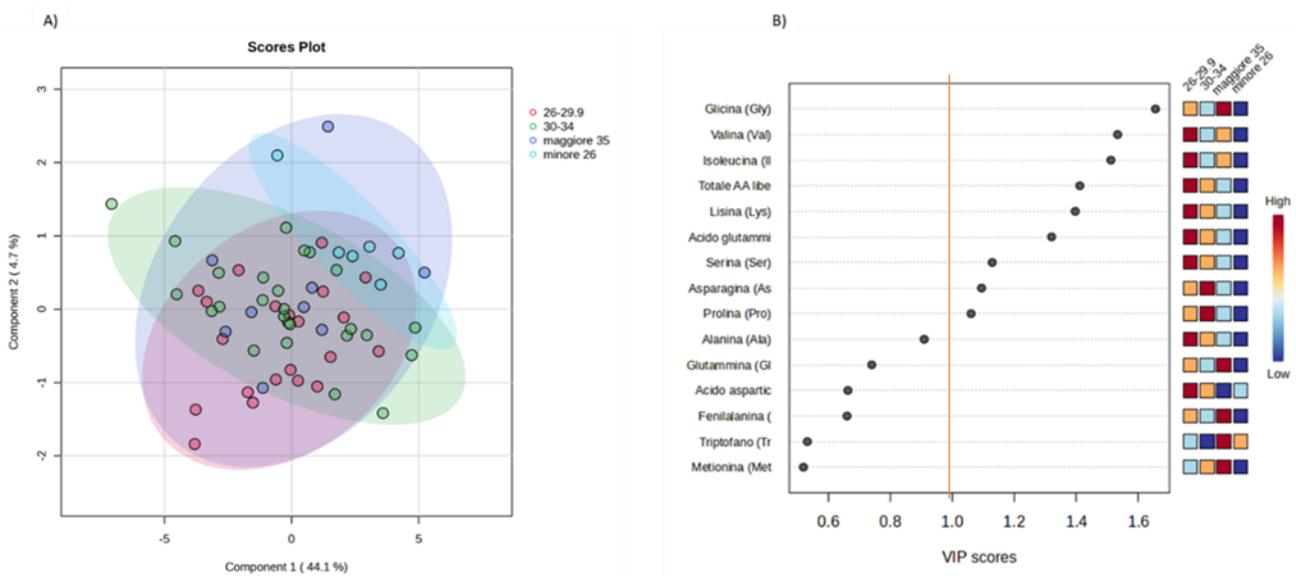


Figura 10: A) Score plot di PLSDA ottenuto dal dataset costituito dalle concentrazioni di aminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine totali (%) classificato in riferimento alla quantità del siero innesto aggiunto al latte in caldaia < 26 Kg, n=6; range 26-29,9 Kg, n= 21; 30-34 Kg, n= 26; \geq 35 Kg, n=9, di 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi e B) VIP score (si sono considerate le variabili con valore maggiore di 1).

Dalle variabili con VIP score maggiore di 1 (Figura 10B), si è potuto osservare che glicina, valina, isoleucina lisina, acido glutammico, serina, asparagina, prolina e il totale degli aminoacidi liberi tendono a concentrazioni minori quando la quantità di siero innesto aggiunto è minore di 26 Kg.

Tuttavia, queste concentrazioni non hanno mostrato differenze statisticamente significative dall'analisi della varianza ANOVA ($p > 0,05$).

In conclusione, non è stato verificato alcun effetto significativo sul profilo in amminoacidi liberi per nessuna delle due variabili esaminate.

2.2.2 FASE DI COAGULAZIONE E SALATURA

A) COAGULAZIONE

Durante il processo di lavorazione del Parmigiano Reggiano, in seguito alla fase di aggiunta del siero innesto, viene aggiunto il caglio (vedi Figura 3), che può essere esclusivamente di vitello e che è principalmente composto dall'enzima chimosina. La chimosina è un enzima proteolitico appartenente al gruppo delle "aspartico-proteasi", generalmente con una bassa attività proteolitica [37]. Nel processo produttivo del formaggio, la chimosina interviene come un agente coagulante la caseina, essendo la proteina del latte più sensibile alla sua azione enzimatica, che consiste in particolare nell'idrolisi dei residui amminoacidici Phe₁₀₅-Met₁₀₆, stabilizzanti le micelle di k-caseina [18].

La solubilità, di conseguenza l'attività enzimatica, della chimosina è influenzata dal pH, dalla temperatura e dalla concentrazione ionica della soluzione. In particolare, la temperatura ottimale di solubilizzazione della chimosina deve essere \geq di 20°C [38] e aumenta in funzione della forza ionica della soluzione di reazione [39].

In questo elaborato di tesi, in relazione all'attività proteolitica della chimosina durante il processo di lavorazione del Parmigiano Reggiano, è stato esaminato l'effetto sul profilo in amminoacidi liberi delle variabili temperatura e tempo di coagulazione, il dosaggio e il titolo del caglio.

- **Temperatura di coagulazione** (26°C, n=11; 27°C, n=41; 28°C, n=4)

Dall'analisi PLSDA (Figura 11) non sono risultati raggruppamenti significativi. Tra le variabili con VIP score maggiore di 1, glicina, metionina, serina, valina, leucina, asparagina, prolina e isoleucina hanno mostrato concentrazioni minori alla temperatura di 26 °C e maggiori a temperatura di 28 °C; l'andamento contrario è stato osservato per l'acido aspartico. Tuttavia, non sono emerse dal dataset differenze statisticamente significative in seguito ad analisi della varianza (ANOVA, $p > 0,05$) nel profilo e contenuto di amminoacidi liberi.

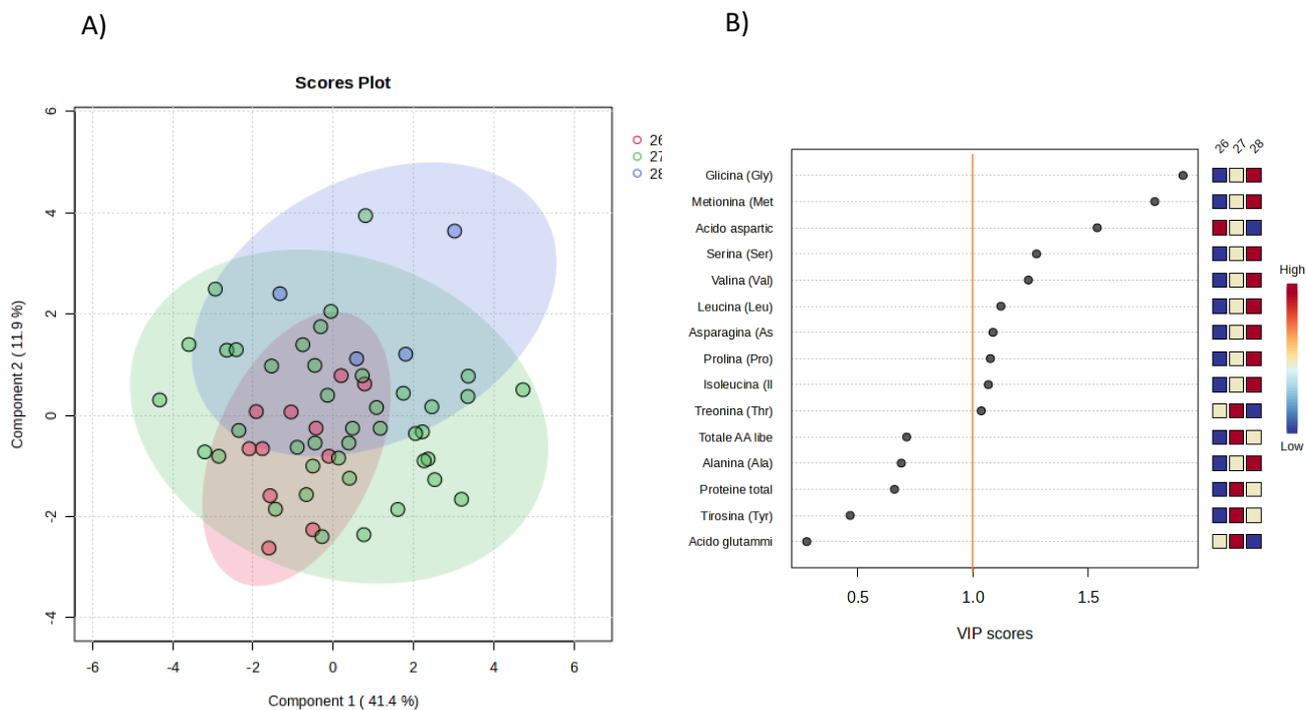


Figura 11: A) Score plot di PLSDA ottenuto dal dataset costituito dalle concentrazioni di aminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine totali (%) classificato in riferimento alla temperatura di coagulazione (26°C, n=11; 27°C, n=41; 28°C, n=4) di 56 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi e B) VIP score (si sono considerate le variabili con valore maggiore di 1).

Il mancato effetto della temperatura di coagulazione sul profilo in aminoacidi liberi osservato probabilmente è dovuto al fatto che il range di valori considerato (26-28°C) non si discosti in maniera significativa dal valore ottimale di attività della chimosina (25°C) [39], fino ad un massimo di 40-52°C [38], quindi in accordo con quanto riportato in letteratura.

- Tempo di coagulazione

Per il tempo di coagulazione sono stati rilevati 7 clusters relativi ai seguenti range (s): 60-65 s, n=8; 70-75 s, n=11; 80-85 s, n=7; 90-95 s, n=13; 100-105 s, n=6; 120-125 s, n=6; >130 s, n=8; n totale= 59 (esclusi dal dataset 2 campioni relativi al tempo di 10 s e un campione relativo ad un tempo di 50 s).

Dall'analisi PLS-DA, non emergono raggruppamenti significativi per i clusters selezionati (Figura 12A). Dal grafico del VIP score (Figura 12B), alcuni amminoacidi (acido glutammico, glicina, istidina, leucina, prolina) tendono ad una concentrazione maggiore per valori di tempo di coagulazione maggiori di 120 s. Quindi si è provato a suddividere il dataset in due clusters principali, stabilendo come soglia i 120 s: **(1)** <120 s (n= 45) e **(2)** ≥ 120 s (n=14). Tuttavia, anche questo raggruppamento non ha portato ad una clusterizzazione significativa dei campioni del dataset esaminato. Anche l'analisi della varianza non ha evidenziato differenze statisticamente significative per le concentrazioni relative al profilo in amminoacidi liberi dei campioni testati (t-test, p>0,05).

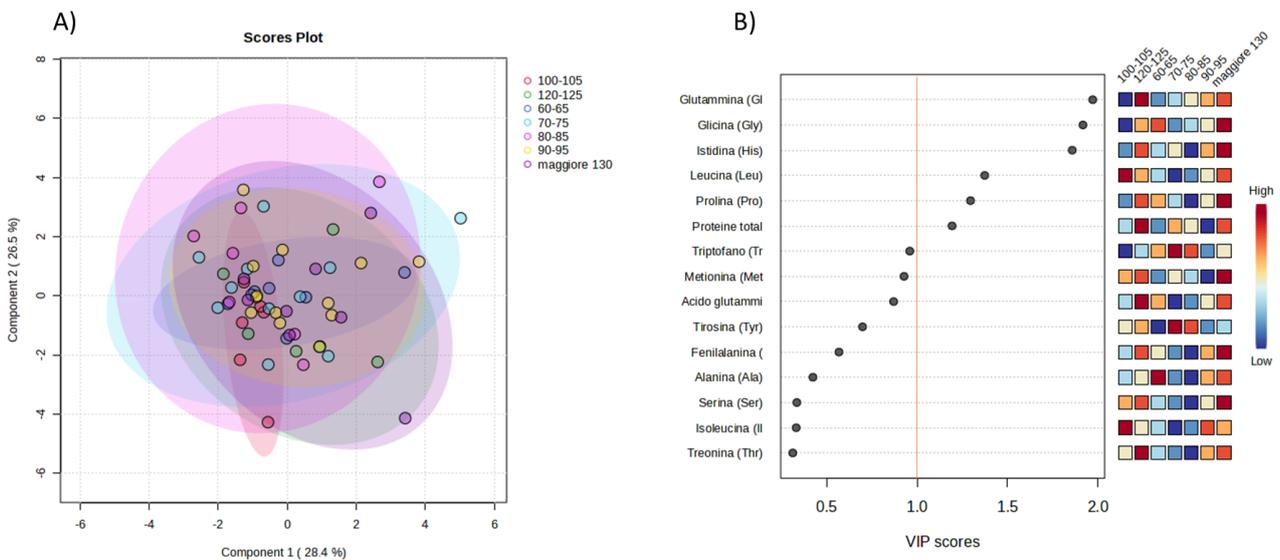


Figura 12: A) Score plot di PLS-DA ottenuto dal dataset costituito dalle concentrazioni di amminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine totali (%) classificato in riferimento al tempo di coagulazione (60-65 s, n=8; 70-75 s, n=11; 80-85 s, n=7; 90-95 s, n=13; 100-105 s, n=6; 120-125 s, n=6; >130 s, n=8) di 59 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi e B) VIP score (si sono considerate le variabili con valore maggiore di 1).

- Titolo e dosaggio del caglio

Per il titolo del caglio sono stati rilevati 7 clusters relativi ai seguenti range: 1:100000, n=4; 1:113000, n=3; 1:125000, n=32; 1:130000, n=7; 1:135000, n=6; 1:145000, n=4; 1:150000, n=3; n totale= 59 (esclusi dal dataset tre campioni relativi a titolo 1:155000, 1:160000 e 1:165000 per mancanza di replicati). Per il dosaggio del caglio il dataset è stato raggruppato in 3 clusters relativi a g o mL di caglio aggiunto: 22-32, n= 34; 33-39, n= 20; ≥ 40 , n=8; n totale= 62.

Dall'analisi PLS-DA, non emergono raggruppamenti significativi per i clusters selezionati per nessuna delle due variabili considerate, come evidenziato nelle figure di seguito (Figura 13 e Figura 14).

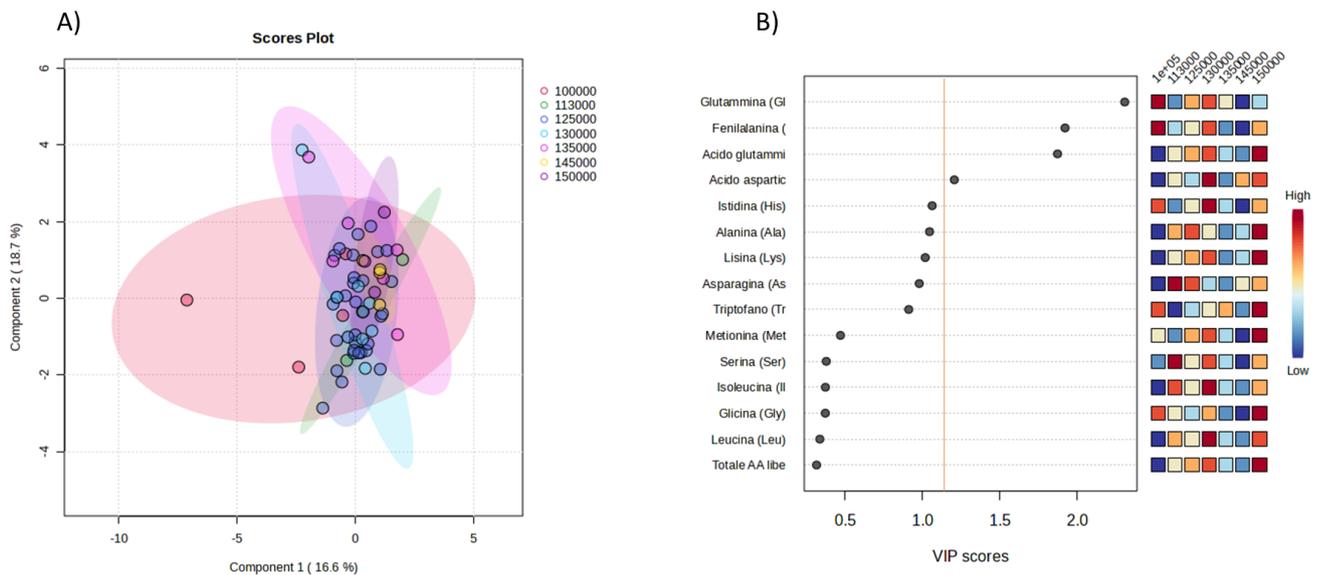


Figura 13: A) Score plot di PLS-DA ottenuto dal dataset costituito dalle concentrazioni di aminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine totali (%) classificato in riferimento al titolo del caglio (1:100000, n=4; 1:113000, n=3; 1:125000, n=32; 1:130000, n=7; 1:135000, n=6; 1:145000, n=4; 1:150000, n=3) di 59 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi e B) VIP score (si sono considerate le variabili con valore maggiore di 1).

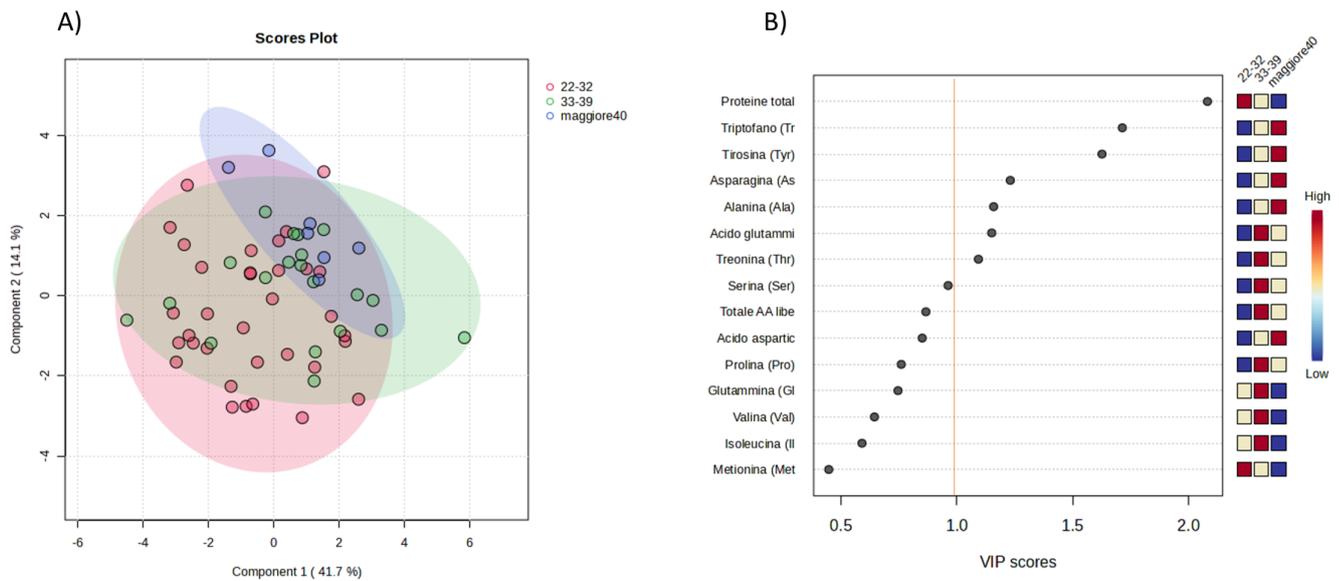


Figura 14: A) Score plot di PLSDA ottenuto dal dataset costituito dalle concentrazioni di aminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine totali (%) classificato in riferimento al dosaggio del caglio (g o mL) (22-32, n= 34; 33-39, n= 20; ≥ 40 , n=8) di 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi e B) VIP score (si sono considerate le variabili con valore maggiore di 1).

Anche l'analisi della varianza non ha evidenziato differenze statisticamente significative nelle concentrazioni relative al profilo in aminoacidi liberi dei campioni testati (ANOVA, $p > 0,05$) in relazione al titolo e dosaggio del caglio.

B) MESSA IN FASCERA E SALATURA

Il processo di salatura può influenzare il contenuto finale di sale del prodotto finito. A sua volta il contenuto finale di sale può influenzare i processi proteolitici, dovuti ad un effetto sul rilascio di aminopeptidasi [8] e sull'idrolisi della caseina, determinando differenze nel profilo e contenuto di aminoacidi liberi.

Nel presente lavoro di tesi, è stata eseguita l'analisi multivariata discriminante (PLSDA) dell'intero dataset (62 campioni) relativo alla concentrazione di cloruro di sodio, proteine e profilo in aminoacidi liberi per evidenziare un eventuale raggruppamento in funzione di:

- **Tipo di salatoio** (galleggiante, n=21 e ad immersione, n=37; n totale= 58).
- **Temperatura salamoia** (range 12-17°C; 12°C, n=3; 14°C, n=6; 15°C, n=19; 16°C, n=14; 17°C, n=11; n totale= 53).
- **Numero di giorni in salatoio** (range 16-27 gg; 16gg, n=5; 17gg, n=8; 18gg, n=12; 19gg, n=10; 20gg, n=14; >20gg, n=5; n totale = 54).

Tuttavia, la PLSDA non ha evidenziato alcun raggruppamento significativo per nessuno dei parametri selezionati. Allo stesso tempo, dall'analisi di correlazione, non sono state evidenziate correlazioni significative ($p > 0,05$) tra il contenuto di cloruro di sodio con il profilo in amminoacidi liberi dei campioni del dataset esaminato.

Dall'analisi di correlazione, è risultata, invece, una correlazione positiva tra la % di NaCl e il n° di giorni in salatoio ($r = +0,50$) e una debole correlazione con la tipologia di salatoio; in particolare, una concentrazione media maggiore di sale è stata rilevata in seguito a salatura per "galleggiamento" ($1,61 \pm 0,04\%$) rispetto alla tipologia ad "immersione" ($1,51 \pm 0,04\%$), ma non statisticamente significativa (t-test, $p = 0,07$).

Invece, sono state rilevate delle differenze statisticamente significative (ANOVA, Tukey HSD, $p < 0,05$) nel contenuto % di NaCl nei campioni raggruppati per la variabile "giorni in salatoio", come evidenziato in Figura 15.

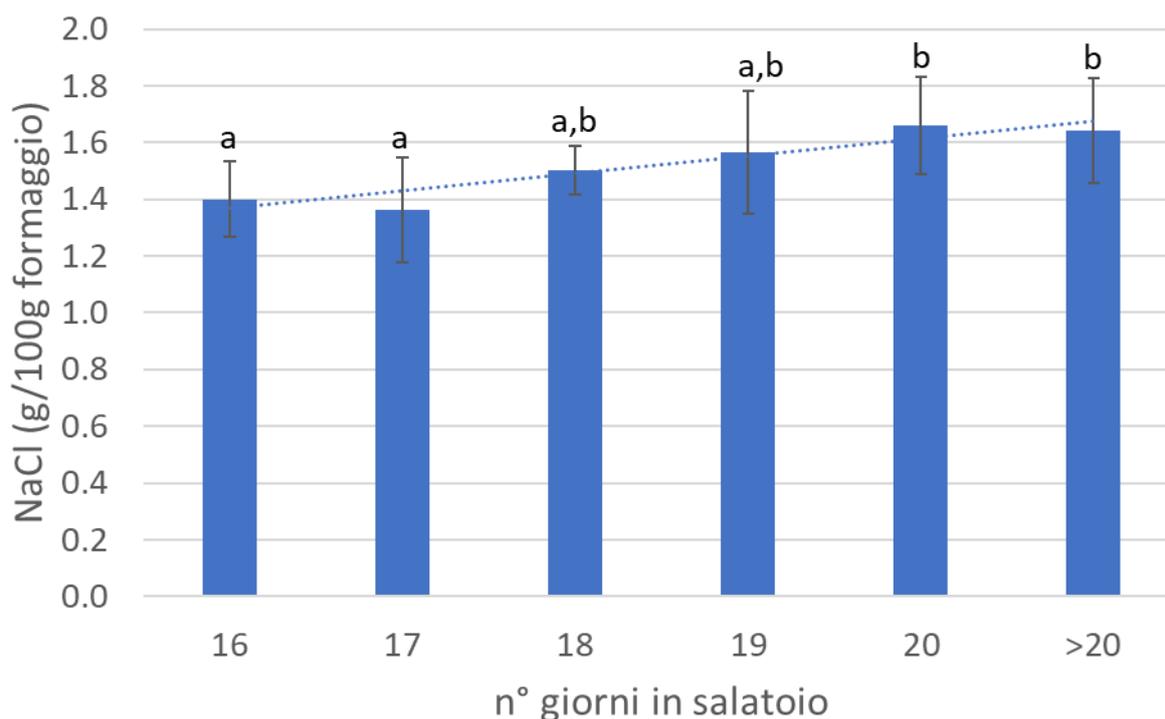


Figura 15: Concentrazione (g/100 g formaggio) di NaCl in campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi classificati in base al numero di giorni in salatoio. Lettere diverse indicano differenza statisticamente significativa (ANOVA, Tukey HSD, $p < 0,05$).

In particolare, si rileva una tendenza crescente della % di sale in funzione del numero di giorni in salatoio (in linea con l'analisi di correlazione) e una concentrazione significativamente maggiore nei campioni sostati in salatoio dai 20 giorni in su. Tuttavia, come anticipato sopra e in accordo con

precedenti dati in letteratura su campioni di Parmigiano Reggiano stagionati 30 mesi [8], dall'elaborazione statistica del dataset non emerge alcun effetto significativo del contenuto di sale né del processo di salatura sul profilo in amminoacidi liberi dei campioni del dataset esaminato.

2.2.3 FASE DI STAGIONATURA

SOSTA IN MAGAZZINO

Il periodo di stagionatura è una fase fondamentale per lo sviluppo dei prodotti proteolitici derivanti dall'attività enzimatica nel formaggio [20]. Quindi, l'ambiente dove si svolge questa fase finale di lavorazione svolge un ruolo molto importante sul processo proteolitico [40].

Per l'elaborazione dei dati, è stato considerato l'ambiente del magazzino, in particolare la temperatura e l'umidità e il loro effetto combinato. Sono stati esclusi a priori dal dataset i campioni provenienti da un ambiente non condizionato, poiché al momento del rilievo dei parametri, l'ambiente non condizionato poteva rendere questi campioni maggiormente suscettibili a variabilità nella misura.

Per quanto riguarda la temperatura di magazzino, i campioni sono stati suddivisi in 7 gruppi relativi ai diversi valori di temperatura: $\leq 16^{\circ}\text{C}$ (min $9,5^{\circ}\text{C}$), $n=9$; 16°C , $n=7$; $16,5^{\circ}\text{C}$, $n=5$; 17°C , $n=12$; $17,5^{\circ}\text{C}$, $n=7$; 18°C , $n=13$; $\geq 18,5^{\circ}\text{C}$ (max 22°C), $n=5$; n totale= 58.

I campioni appartenenti al gruppo relativo alla temperatura di magazzino inferiore ai 16°C , sono stati prodotti nella stagione invernale; quindi, risultano conformi all'obbligo del Disciplinare di Produzione [29], che impone di non condizionare gli ambienti di magazzino al di sotto dei 16°C nei mesi estivi.

Per quanto riguarda l'umidità, i dati a disposizione non sono di rilievo strumentale; tuttavia, secondo quanto dichiarato dal casaro, il range di valori di umidità di magazzino è costituito dal 70 all'85%, quindi i campioni sono stati suddivisi in tre gruppi relativi ai range di umidità: 70-75%, $n=11$; 76-80%, $n=28$; 81-85%, $n=17$; n totale = 56 campioni.

Per quanto riguarda i risultati dell'elaborazione statistica, dall'analisi multivariata (PLSDA), non sono emersi raggruppamenti significativi per nessuno dei parametri considerati. Dall'analisi di correlazione, invece, una moderata correlazione positiva è risultata tra il contenuto totale in amminoacidi liberi e la temperatura ($r= + 0,41$) e l'umidità del magazzino ($r= + 0,36$).

L'ANOVA a due vie è stata eseguita per la valutazione dell'effetto combinato temperatura/umidità del magazzino sul contenuto totale in amminoacidi liberi. Dai risultati ottenuti, emerge che solo la temperatura ha un effetto significativo sulle variabili del dataset, come evidenziato in Tabella 3.

Tabella 3: Coefficienti di significatività ottenuti dall'analisi della varianza a due fattori (ANOVA a due vie) per le variabili temperatura e umidità del magazzino in relazione all'effetto sul profilo in amminoacidi liberi dei campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi.

Parametro	F	Valore di significatività (p value)
Umidità (%)	0,40	0,95
Temperatura (°C)	6,41	0,0004

In particolare, dall'analisi post hoc (Tukey HSD), è risultata, una concentrazione inferiore di amminoacidi liberi (come somma totale) nei campioni relativi ad una temperatura del magazzino <17°C (Tabella 4), suggerendo una ridotta attività proteolitica per effetto della bassa temperatura [41].

Tabella 4: Concentrazione media (mg/g proteine) di amminoacidi liberi totali nei campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi classificati in base alla temperatura del magazzino rilevata dal Consorzio del Parmigiano Reggiano. *Sig. = ANOVA, Tukey HSD, $p < 0,05$.

Temperatura magazzino (°C)	n	Media AA liberi totali (mg/g proteine)	Dev. Std.	Sig.*
<16	9	235	20	a
16	7	262	20	a
16,5	5	257	19	a
17	12	254	21	a
17,5	7	281	23	b
18	13	266	26	a,b
>18,5	5	266	19	a,b

2.3 Analisi sul periodo di produzione

I fattori ambientali, come la stagione di produzione, possono influenzare le caratteristiche compositive del latte di partenza e l'attività proteolitica della microflora batterica durante la lavorazione del formaggio [42].

Quindi, dopo aver esaminato il potenziale effetto di alcuni parametri tecnologici relativi alla fase di produzione, si è proceduto con il lavoro di elaborazione statistica, per evidenziare eventuali clusters in riferimento al periodo di produzione (stagione e mesi) nel corso dell'anno 2019-2020 dei campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi analizzati per il profilo proteico.

In primo luogo, i campioni sono stati raggruppati in 2 gruppi relativi alla stagione di produzione: **(1)** primavera/estate (campioni di formaggio relativi al periodo di produzione dall'11/07/2019 al 26/09/2019 e dal 06/05/2020 al 17/07/2020, n=29) e **(2)** autunno/inverno (campioni di formaggio relativi al periodo di produzione dal 01/10/2019 al 05/03/2020, n=33).

In Figura 16A, si può notare come, in base alla stagione del periodo di produzione, i campioni si suddividano nei due clusters, specialmente sulla Componente 1; questo significa che a livello di contenuto in amminoacidi liberi si hanno delle differenze in relazione al periodo produttivo.

In particolare, le concentrazioni di alcuni amminoacidi liberi (Figura 16B), risultano maggiori nei campioni "primavera/estate" (che si raggruppano principalmente sull'asse positivo della Componente 1), mentre la concentrazione delle proteine totali (%) risulta maggiore nei campioni "autunno/inverno", i quali si raggruppano sull'asse negativo della stessa Componente (Figura 16A).

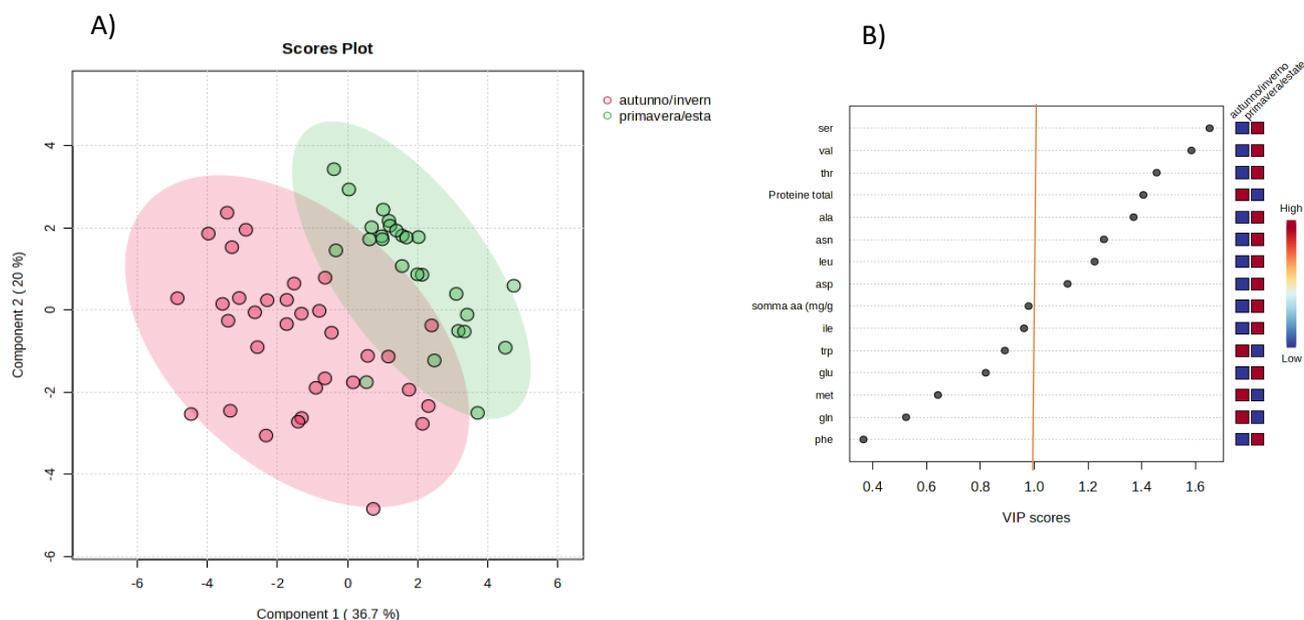


Figura 16: (A) Score plot di PLSDA ottenuto dal dataset costituito dalle concentrazioni di aminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine totali (%) classificato per stagione di produzione (primavera/ estate, n= 26 (campioni prodotti tra luglio-agosto 2019 e maggio-luglio 2020) e autunno/inverno, n= 33 (campioni prodotti tra settembre 2019-marzo 2020) di 59 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi (individuati 3 outliers nel gruppo primavera/estate dall'analisi multivariata) e (B) VIP score (si sono considerate le variabili con valore VIP maggiore di 1: Ser, Val, Threo, Ala, Asn, Leu, Asp e % proteine totali).

In Tabella 5, sono riportati gli aminoacidi liberi che presentano differenze significative (t-test, $p < 0,05$) in base al periodo di produzione dei campioni del dataset dei campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi precedentemente elaborato dall'analisi PLSDA (n totale=59).

In particolare, si può notare come nel periodo primavera-estate si abbia una concentrazione media maggiore sia di alcuni aminoacidi liberi (ad esclusione del triptofano) che di aminoacidi liberi totali, rispetto al periodo autunno-inverno, suggerendo una maggiore attività proteolitica. Inoltre, viene messo in evidenza dalle analisi statistiche effettuate che, nel periodo estivo, solo alcuni aminoacidi contribuiscono all'aumento di aminoacidi liberi totali (vedi Figura 16 e Tabella 5), questo ad indicare che la proteolisi sembrerebbe risultare selettiva verso determinati aminoacidi, come suggerito in letteratura [43].

Tabella 5: Concentrazioni medie degli amminoacidi liberi (mg/g proteine) con differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) relative al periodo di produzione primavera/estate e autunno/inverno.

AA liberi (mg/g proteine)	primavera/estate (n=26)	autunno/inverno (n= 33)	dev.std. ¹	dev. std. ²
Asn	11	10	1	2
Ala	7,5	7	0,5	1
Asp	10	9	1	2
Ile	17	16	1	2
Leu	23	21	2	2
Ser	19	16	2	2
Trp	1,6	2	0,2	1
Threo	10	9	1	1
Val	20	18	1	2
Glu	51	48	3	6
Totale AA liberi	266	250	18	23
% proteine*	27	30	3	2

Note: ¹ deviazione standard relativa al periodo di produzione primavera/estate; ² deviazione standard relativa al periodo di produzione autunno/inverno; *ottenuta tramite metodo Kjeldahl.

In seguito ad una classificazione del dataset degli amminoacidi liberi (mg/g proteine) e contenuto proteico (%) in riferimento al periodo di produzione, si è voluto analizzare se vi fossero delle differenze anche in base al mese di produzione.

È risultato (vedi Tabella 6) che si hanno differenze statisticamente significative sul profilo amminoacidico anche in base al mese di produzione (Tukey HSD, $p < 0,05$), in particolare per le concentrazioni di asparagina, acido aspartico, istidina, prolina, serina, treonina, valina, per la somma totale di amminoacidi liberi e per la % di proteine, in accordo con quanto riportato in letteratura [44].

Tabella 6: Concentrazioni medie di amminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine (% ottenuta mediante metodo Kjeldahl) calcolate in base al mese di produzione di 61 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi (eliminato il campione 13740, perché l'unico relativo al mese di agosto). Lettere diverse in colonna (quando riportate) indicano differenze statisticamente significative (ANOVA, Tukey HSD, $p < 0,05$).

Mese/anno	n	Profilo in amminoacidi liberi (mg/g proteine)																			
		asn	ala	asp	gln	gly	his	ile	leu	met	phe	pro	ser	trp	thr	val	lys	tyr	glu	AA liberi totali	%Prot
lug-19	5	12 ^b	8	11 ^{ab}	1,5	7	8 ^c	18	23	6	15	31 ^b	21 ^c	1,5 ^a	11 ^c	21 ^c	24	6	54	287 ^{ab}	32 ^e
dev.sd		1	1	2	0,1	1	1	1	1	1	1	2	2	0,2	1	1	2	1	2	11	3
set-19	2	9 ^{ab}	6	7 ^a	2	7	5 ^a	16	21	6	13	26 ^{ab}	15 ^a	3 ^b	8 ^{ab}	16,9 ^{ab}	23	6	47,6	245 ^b	29 ^{bcde}
dev.sd		2	1	3	1	2	1	1	1	1	2	3	2	2	2	0,4	2	4	0,5	2	1
ott-19	10	11 ^{ab}	7	9,3 ^{ab}	1,7	7	8 ^{bc}	17	21	6	15	28 ^{ab}	17 ^{ab}	3 ^{ab}	9 ^{abc}	19 ^{abc}	26	7	51	271 ^{ab}	31 ^{de}
dev.sd		2	1	0,4	1	1	1	4	2	1	4	2	2	1	1	2	10	3	8	20	3
nov-19	3	11 ^{ab}	7	11,4 ^b	2	7	7 ^{abc}	17	23	7	15	28 ^{ab}	17 ^{abc}	1,9 ^{ab}	9,2 ^{abc}	19 ^{abc}	28	3,8	52	271 ^{ab}	31,6 ^b
dev.sd		1	1	0,4	1	1	1	2	3	1	2	2	1	0,2	0,3	2	3	0,4	2	14	0,1
dic-19	5	10 ^{ab}	6	8,45 ^{ab}	1	6	6 ^{ab}	15	21	6	12	23 ^a	16 ^{ab}	1,6 ^{ab}	8 ^a	17 ^a	20	7	48	240 ^a	26 ^{abc}
dev.sd		2	1	1	0,3	2	2	4	6	2	4	6	3	0,5	2	4	4	3	6	49	1
gen-20	7	9 ^a	6,3	8 ^{ab}	1,5	5,2	6 ^{ab}	16	21	5,8	12	23 ^a	16 ^{ab}	2 ^a	9 ^{abc}	17 ^{abc}	25	7	44	240 ^a	30 ^{de}
dev.sd		1	0,5	1	0,2	0,5	1	1	1	0,4	1	1	1	1	1	1	1	2	3	8	1
feb-20	6	9 ^a	6	8 ^{ab}	1,2	6	5,6 ^{ab}	16	21	6	12	24	16 ^{ab}	1,8 ^{ab}	8 ^{ab}	18 ^{abc}	24	4	46	239 ^a	31 ^{de}
dev.sd		1	1	1	0,3	1	0,4	1	2	1	1	3	2	0,3	1	1	2	1	2	4	2
mar-20	2	10 ^{ab}	7,7	10 ^{ab}	0,9	7	6,6 ^{abc}	17,3	24	6,8	13,76	27,7 ^{ab}	18 ^{abc}	2,5 ^{ab}	10 ^{abc}	20 ^{abc}	27	5	51	272 ^{ab}	30 ^{cde}
dev.sd		1	0,3	1	0,4	1	0,3	0,2	1	0,3	0,05	0,4	1	0,3	1	1	2	1	2	9	1
mag-20	5	11 ^{ab}	7,8	11 ^b	1,3	7	6,1 ^{abc}	18	24	6	14	26 ^{ab}	19 ^{bc}	1,8 ^{ab}	10 ^{bc}	21 ^{bc}	26	7	52	275 ^{ab}	27 ^{abcd}
dev.sd		1	0,3	1	0,4	1	0,3	1	2	1	1	1	1	0,2	1	1	2	1	2	4	2
giu-20	8	11 ^{ab}	7,4	10 ^{ab}	1,3	6	6 ^{ab}	17	22	5	13	24 ^a	18 ^{abc}	1,6 ^a	19 ^{abc}	10 ^{abc}	26	6	50	260 ^{ab}	26 ^{ab}
dev.sd		1	0,4	1	0,3	1	1	1	2	1	1	2	1	0,2	1	2	2	1	4	19	2
lug-20	8	11 ^{ab}	7,2	10 ^{ab}	1,3	6	6 ^{ab}	17	22,3	5,1	13	24 ^a	17 ^{abc}	1,6 ^a	9 ^{abc}	19 ^{abc}	25	6	48	253 ^{ab}	25 ^a
dev.sd		1	0,5	2	0,2	1	1	1	0,5	0,3	1	1	1	0,2	1	1	2	1	2	9	1

Dai risultati ottenuti emerge che anche considerando il dataset suddiviso per mese singolo, sono i campioni prodotti nei mesi invernali (in particolare dic-19, gen-20 e feb-20) ad avere una concentrazione significativamente minore ($p < 0,05$) di amminoacidi liberi totali rispetto ai mesi estivi. Infatti, nei mesi estivi, l'attività fermentativa della microflora batterica del latte è più spiccata, la quale può essere responsabile di cambiamenti nella composizione quantitativa del latte e un'attività proteolitica più intensa, determinando lo sviluppo di un profilo aromatico differente del prodotto finale, spesso associato ad un aroma più amaro [42]. Tuttavia, non sono presenti studi specifici in letteratura che correlino la stagione di produzione del Parmigiano Reggiano al profilo in amminoacidi liberi e alle caratteristiche sensoriali. Quindi, è stato considerato il potenziale effetto della stagione di produzione sul profilo in amminoacidi liberi e sul profilo sensoriale, tenendo in considerazione la composizione centesimale, quindi oltre che alla componente proteica, sono stati considerati i valori di umidità, contenuto di grassi e sale.

Dai risultati ottenuti, in base al periodo "primavera-estate" ed "autunno-inverno" sono risultate delle differenze significative in riferimento al profilo sensoriale (t-test, $p < 0,05$), come evidenziato in Tabella 7; è stato notato infatti che, il gusto dolce, l'intensità dell'odore, così come gli odori e aromi di crosta e frutta presentano punteggi medi significativamente più elevati nel Parmigiano Reggiano prodotto nel periodo autunno/inverno rispetto al periodo primavera/estate, i quali invece presentano note più spiccate di gusto salato, indipendentemente dal contenuto di sale, per il quale non sono emerse differenze significative per questo raggruppamento (t-test, $p > 0,05$) [42].

Tabella 7: Variabili del profilo sensoriale risultate statisticamente significative (t-test, $p < 0,05$) dei 59 campioni di Parmigiano Reggiano raggruppati per stagione (primavera/estate vs autunno/inverno). Le lettere diverse in colonna indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

Gruppo campioni		Analisi Sensoriale							
		Dolce	Salato	Odore intensità	Odore crosta	Odore frutta	Altri aromi	Aroma crosta	Aroma frutta
primavera/estate (n= 26)	media	2,0 ^a	2,4 ^b	4,3 ^a	1,4 ^a	1,7 ^a	1,6 ^a	1,5 ^a	1,90 ^a
	dev.std.	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,09
autunno/inverno (n= 33)	media	2,1 ^b	2,2 ^a	4,4 ^b	1,6 ^b	1,8 ^b	1,7 ^b	1,6 ^b	2,0 ^b
	dev.std.	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Dall'analisi di correlazione, è risultato che il parametro "intensità dell'odore" sia debolmente correlato negativamente con l'amminoacido treonina ($r = -0,282$), che "l'odore di crosta" sia debolmente correlato negativamente con gli amminoacidi treonina ($r = -0,360$) e valina ($r = -0,286$).

E' risultato invece che il gusto salato, oltre ad essere correlato positivamente con il contenuto di NaCl ($r = + 0,627$), esso è moderatamente correlato positivamente con l'acido aspartico ($r = +0,337$), in accordo con quanto suggerito in letteratura [45]; la concentrazione di acido aspartico è risultata significativamente maggiore nei campioni del gruppo "primavera-estate" (Tabella 5), che come descritto sopra, sono caratterizzati da un aroma più salato, senza però evidenziare differenze significative nel contenuto di sale rispetto ai mesi invernali (Tabella 7). Al contrario, il gusto salato risulta debolmente correlato negativamente con l'amminoacido triptofano ($r = - 0,299$), il quale presenta valori di concentrazione maggiori nel periodo "autunno-inverno", caratterizzati maggiormente da note di aroma fruttato, come mostrato in Tabella 7.

Dall'elaborazione statistica del dataset raggruppato in base al singolo mese di produzione, non si evincono differenze significative (ANOVA, $p > 0,05$) nel profilo sensoriale; tuttavia, si evidenzia una tendenza interessante per l'aroma di frutta, in linea con i risultati sopra descritti. Come evidenziato in Figura 17, si può notare infatti che i punteggi massimi relativi all'aroma di frutta siano stati ottenuti per i campioni prodotti nel periodo di novembre e gennaio.

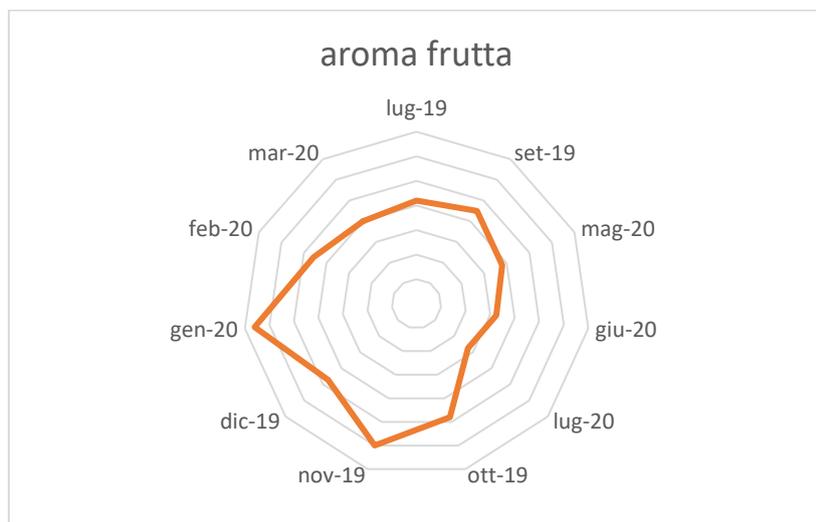


Figura 17: Spider plot relativo alla media dei punteggi assegnata ai campioni di Parmigiano Reggiano suddivisi per mese di produzione per il parametro "aroma di frutta".

In seguito alle analisi della varianza relative alla composizione, è risultato un contenuto proteico significativamente maggiore nei campioni prodotti nei mesi invernali rispetto ai mesi estivi (come riportato sopra in Tabella 5), in accordo con i risultati della PLSDA e con quanto riportato in

letteratura [42]. La diversa proporzione dei nutrienti, come lipidi e proteine nel formaggio, può essere dovuta ad una differenza nel contenuto di umidità [46]. Infatti, in linea con questo risultato, raggruppando i campioni per mese di produzione, si nota una tendenza interessante per quanto riguarda il contenuto di umidità dei campioni (vedi Figura 18). In particolare, si nota un trend decrescente da luglio 2019 a marzo 2020 nel contenuto di acqua (con un contenuto di acqua significativamente maggiore nei campioni relativi a luglio 2019 e significativamente inferiore a partire da gennaio 2020), per poi risalire nel periodo primaverile (maggio-giugno 2020) ed estivo (luglio 2020).

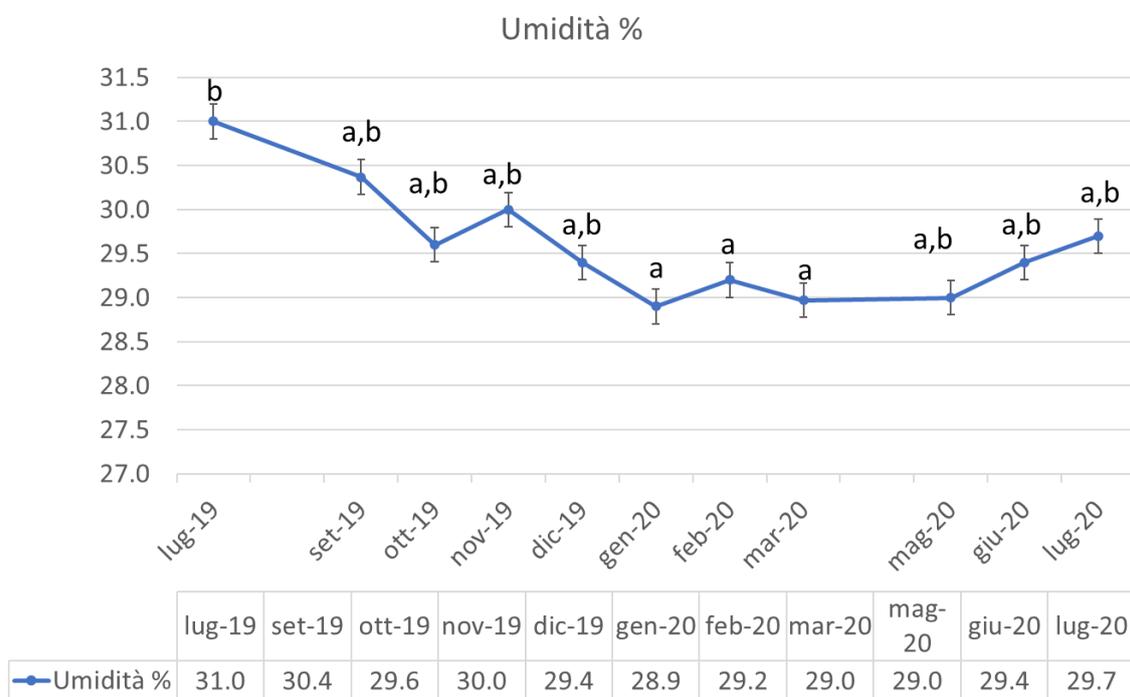


Figura 18: Grafico relativo al contenuto medio di acqua (%), in relazione al mese di produzione dei 61 campioni di Parmigiano Reggiano. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (ANOVA, $p < 0,05$).

L'umidità dei campioni è un processo correlato all'attività proteolitica, infatti durante la maturazione del formaggio proprio grazie alla proteolisi, avviene un rilascio di acqua legata dovuto alla scomposizione delle proteine in amminoacidi liberi [47,20]. Allo stesso tempo il contenuto di acqua determina una differente concentrazione di nutrienti, come proteine e lipidi [46]; il contenuto di acqua nei campioni è risultato correlato specialmente al contenuto lipidico in modo negativo ($r = -0,67$); tuttavia, non sono emerse differenze significative nel contenuto di lipidi sulla base della stagione/mese di produzione dei campioni analizzati (ma solo per quello proteico).

2.4 Analisi sulla zona di produzione

In seguito alla caratterizzazione in base al periodo produttivo, si è proseguita l'analisi in riferimento alla zona altimetrica di produzione. Si sono identificate tre zone di produzione tra i 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi: pianura, n=23; collina, n= 21 e montagna, n=18.

Quindi, si è proceduto ad effettuare un'analisi discriminante (PLSDA) e un'analisi ANOVA con post hoc Tukey test per verificare se vi fossero differenze significative tra i campioni in relazione alla zona di produzione e al profilo degli amminoacidi liberi. Successivamente si è indagata l'eventuale influenza della zona di produzione in relazione alla composizione e al profilo sensoriale dei campioni.

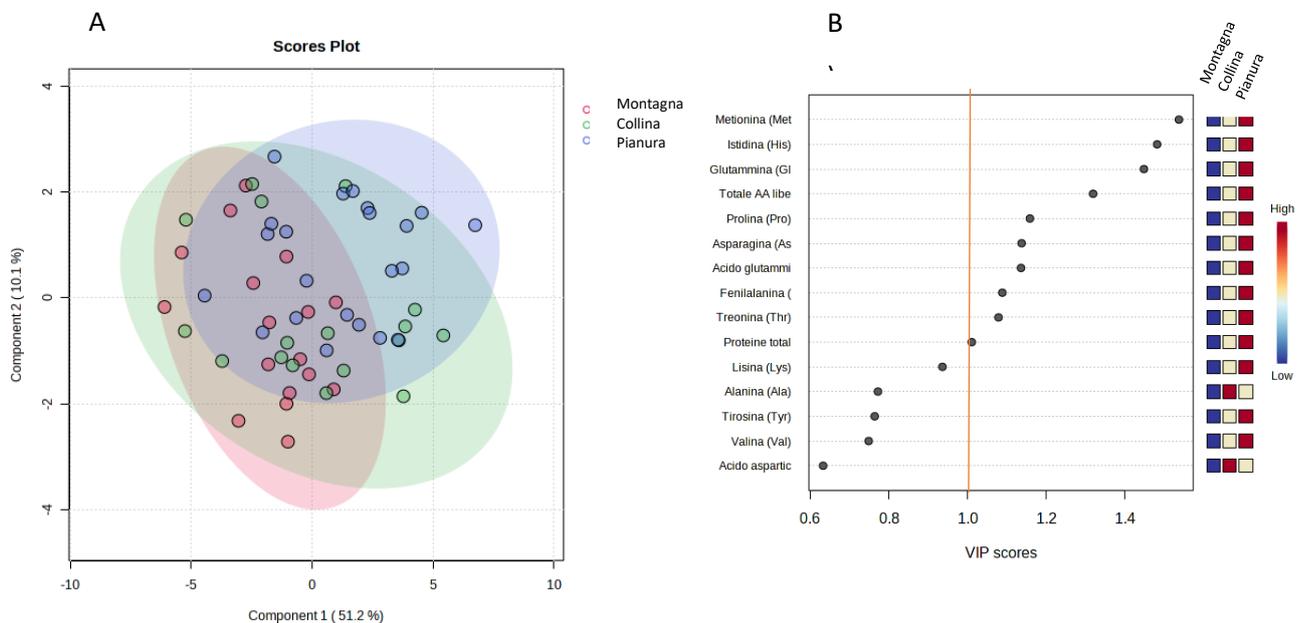


Figura 19: A) Score plot di PLSDA ottenuto dal dataset costituito dalle concentrazioni di amminoacidi liberi (mg/g proteine) e proteine totali (%) classificato per zona di produzione di 56 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi (individuati 6 outliers dall'analisi multivariata) e B) VIP score (si sono considerate le variabili con valore superiore a 1).

Dal grafico relativo all'analisi PLSDA (Figura 19A) si può osservare come i campioni non si suddividano in tre gruppi relativi alle differenti zone altimetriche di produzione, occupando la stessa area del grafico delimitata dalla Componente 1 e Componente 2.

Di seguito (Figura 20), si sono riportati i risultati dell'analisi della varianza (ANOVA), seguita dal Tukey post hoc test, per evidenziare differenze significative tra i gruppi del dataset elaborato precedentemente dalla PLSDA (n totale= 56).

Come si può osservare in Figura 20, i contenuti medi degli amminoacidi liberi (prolina, metionina, istidina e asparagina), insieme al contenuto medio di amminoacidi liberi totali e alla percentuale di proteine totali risultano significativamente maggiori nella zona di produzione pianura rispetto alla zona di montagna ($p < 0,05$), mentre per la zona di produzione montagna, i contenuti medi tendono ad essere generalmente minori rispetto alle altre due zone di produzione.

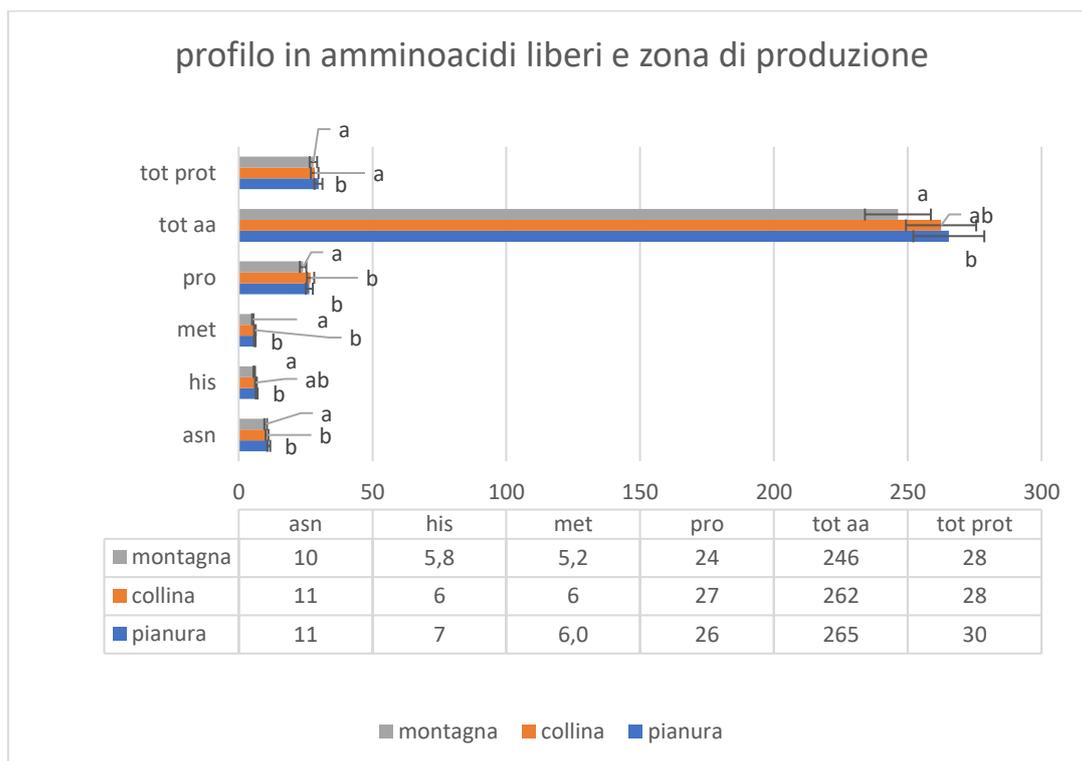


Figura 20: Rappresentazione grafica delle variabili del dataset di amminoacidi liberi e contenuto % proteico (determinato tramite Kjeldahl) di 56 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi risultate significative dall'ANOVA (Tukey HSD, $p < 0,05$); lettere diverse, quando riportate, indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi (ANOVA, Tukey HSD, $p < 0,05$).

Lo stesso approccio statistico è stato applicato sul dataset costituito dal profilo sensoriale e la composizione dei campioni suddivisi per zona di produzione.

Per quanto riguarda altri parametri di composizione (umidità, lipidi e contenuto di sale), quindi oltre al contenuto proteico, non sono risultate differenze statisticamente significative correlate alla zona di produzione ($p > 0,05$), mentre sono state rilevate per quanto riguarda due parametri relativi al profilo sensoriale, in particolare il colore e il gusto amaro. I risultati sono mostrati in Figura 21.

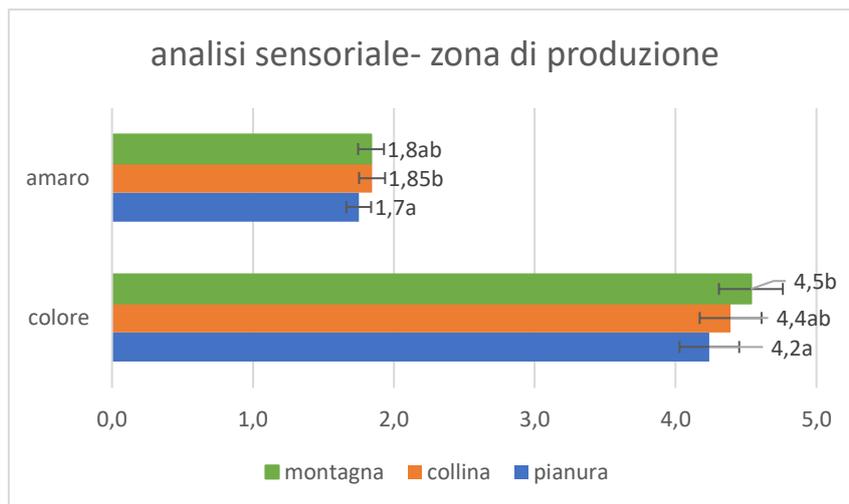


Figura 21: Rappresentazione grafica delle 2 variabili del dataset del profilo sensoriale (gusto amaro e colore) risultate significative dall'analisi della varianza (ANOVA, Tukey HSD, $p < 0,05$) dei 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi raggruppati sulla base della zona altimetrica di produzione.

Dal grafico si può notare che il colore sia più intenso nei campioni appartenenti alla zona di produzione di montagna rispetto a quelli appartenenti alla pianura ($p < 0,05$) e che il gusto amaro sia meno intenso nei campioni appartenenti alla zona di produzione della pianura rispetto a quelli appartenenti alla collina ($p < 0,05$).

Da quanto suggerito in letteratura, il colore nel formaggio è un fattore che dipende principalmente dai mesi di stagionatura, dal periodo di produzione e alcuni parametri di composizione, principalmente dal contenuto di umidità [48]. Dall'analisi di correlazione, tuttavia, non sono risultate correlazioni significative con questi parametri. L'unica correlazione che emerge dall'elaborazione statistica è una debole correlazione negativa, ma significativa, tra colore e somma totale di amminoacidi liberi ($r = -0,288$, $p = 0,023$), i quali si ritrovano infatti a livelli inferiori nei campioni prodotti nella zona di montagna, caratterizzati da un colore più intenso, soprattutto rispetto ai campioni prodotti in pianura (Figura 21). Tuttavia, non ci sono evidenze scientifiche che supportino la correlazione tra colore e profilo proteico nel formaggio. Piuttosto, un recente studio [49] suggerisce che l'aroma (caratterizzato da intense note piccanti, umami e aromi vegetali) e l'intensità del colore tipici dei campioni di Parmigiano Reggiano prodotti nelle zone di montagna siano conseguenze dell'alimentazione delle bovine (soprattutto alimentate con erba medica).

2.5 Riepilogo dei risultati ottenuti

I risultati dell'elaborazione statistica del dataset analizzato nel presente lavoro di tesi relativo al profilo in amminoacidi liberi in funzione dei parametri tecnologici, compositivi e sensoriali analizzati (Tab I, sez. Appendice) sono riassunti come di seguito:

2.5.1 Analisi sul processo produttivo

Considerando i parametri di lavorazione del formaggio presentati in questo lavoro di tesi (vedi Figura 4) non sono emerse differenze significative per il profilo in amminoacidi liberi nei campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi del dataset analizzato, soprattutto per i parametri della fase di lavorazione del latte (pre-coagulazione) né per i parametri della fase di coagulazione. Nonostante le premesse supportate dalla letteratura per la fase di lavorazione del latte pre- e post caldaia o per la fase di coagulazione, fatta eccezione per qualche differenza emersa nel profilo in amminoacidi dei campioni raggruppati per “affioramento condizionato” o sulla base della “temperatura del latte magro”, non sono state rilevate differenze o correlazioni significative tra i parametri esaminati e il profilo in amminoacidi liberi del dataset dei campioni di questo studio; tuttavia, come ci si aspettava per i parametri relativi alla fase di lavorazione del latte, si tratta di una fase di lavorazione molto distante dal prodotto finale. Invece, per la fase di stagionatura, è emerso che l'unico parametro responsabile di una differenza significativa nel profilo in amminoacidi liberi, in particolare nel contenuto di amminoacidi liberi totali, è la temperatura del magazzino, suggerendo una ridotta attività proteolitica alle temperature inferiori, in accordo con quanto riportato in letteratura [41].

2.5.2 Analisi sul periodo di produzione

I risultati delle analisi statistiche in relazione al periodo di produzione hanno suggerito una più intensa attività proteolitica nei campioni dei mesi estivi, in accordo con quanto riportato in letteratura [42]. Come discusso sopra (paragrafo 2.3), la più intensa attività proteolitica dipende da un maggiore sviluppo della microflora batterica del latte e del formaggio, responsabile quindi di una maggiore attività enzimatica (idrolitica) sulla componente proteica del formaggio, determinando il rilascio di una quantità maggiore di amminoacidi liberi, i quali possono influenzare le caratteristiche organolettiche del prodotto finale. In generale, maggiori livelli di amminoacidi liberi possono determinare una maggiore percezione del gusto amaro e lo sviluppo di aromi sgradevoli a causa dello sviluppo di prodotti secondari del metabolismo amminoacidico [20,8]. Tuttavia, i campioni analizzati in questo lavoro, relativi al periodo estivo, sono risultati caratterizzati da una nota maggiore

di gusto salato, rispetto ai mesi invernali, caratterizzati invece da un gusto più dolce e fruttato (campioni relativi al periodo dic-19, gen-20 e feb-20), probabilmente dovuto a differenze dell'attività proteolitica precedentemente descritta, essendo il contenuto di sale confrontabile tra i due gruppi ($p > 0,05$).

Il periodo di produzione ha infine influenzato alcuni dei parametri compositivi del formaggio, come il contenuto proteico (maggiore nei campioni relativi al gruppo "autunno inverno") e di umidità (maggiore nei mesi primaverili ed estivi, come i campioni prodotti a lug-19), i quali si ritrovano in rapporto inverso, in linea con quanto riportato in letteratura [44,46].

2.5.3 Analisi sulla zona di produzione

Dall'analisi del dataset raggruppato per zona di produzione (montagna, collina e pianura), non sono stati evidenziati raggruppamenti significativi dall'analisi multivariata PLS-DA. Sono state rilevate, invece, alcune differenze statisticamente significative nel profilo in amminoacidi liberi e nel contenuto di proteine nei campioni prodotti nella zona di pianura, i quali risultano caratterizzati da livelli inferiori per queste variabili (ANOVA, $p < 0,05$). Inoltre, è risultato che i campioni di montagna presentassero un colore più intenso (ANOVA, $p < 0,05$), soprattutto rispetto ai campioni prodotti nella zona di pianura. Il profilo in amminoacidi liberi e le caratteristiche organolettiche che caratterizzano i campioni di montagna sono principalmente dovuti all'alimentazione delle bovine (basata principalmente sull'utilizzo di erba medica), che probabilmente rappresenta, in questa classificazione dei campioni, il fattore che influisce maggiormente sulla composizione del latte e sull'andamento del processo proteolitico durante la fase di produzione del Parmigiano Reggiano [49].

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi sono stati analizzati 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi prodotti nel corso dell'anno 2019-2020 da 57 diversi caseifici per il loro profilo proteico. In particolare, mediante metodo UPLC-MS, è stato ottenuto il profilo in amminoacidi liberi che è stato utilizzato per l'elaborazione statistica in funzione delle fasi di lavorazione del Parmigiano Reggiano, il periodo e la zona altimetrica di produzione, con l'obiettivo di evidenziarne eventuali differenze.

Tra le fasi del processo produttivo considerate, solo la temperatura del magazzino durante la fase di stagionatura ha dimostrato un effetto significativo sul contenuto totale in amminoacidi liberi dei campioni analizzati. Le caratteristiche organolettiche e di composizione (in particolare nel contenuto di umidità e di proteine) e il profilo in amminoacidi liberi sono risultati principalmente influenzati dal periodo di produzione (in particolare la stagione) che possono essere attribuiti alla diversa attività enzimatica della microflora batterica del latte e del formaggio. Sono state rilevate anche delle differenze nel profilo in amminoacidi e caratteristiche organolettiche (colore) in base alla zona altimetrica di produzione, tuttavia, la correlazione tra questi due fattori non è documentata dalla letteratura.

In conclusione, l'analisi del profilo in amminoacidi liberi combinata all'analisi statistica possono fornire importanti informazioni circa i parametri che influenzano la qualità e la composizione del formaggio.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Fox P. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379-1400.
- [2] La maturazione dei formaggi: processo biochimico multifattoriale. Brazzale Science Center. <https://www.brazzalesc.com/la-maturazione-dei-formaggi-processo-biochimico-multifattoriale>. Accesso: 30-06-2023.
- [3] Malacarne M. & Summer A. (2006). Caratterizzazione chimico-fisica della maturazione del Parmigiano Reggiano. *Scienza e tecnica lattiero-casearia*, 57(4), 215-228.
- [4] Fox P. & McSweeney, P. L. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Review International*, 12(4), 457-509.
- [5] Grappin R., Rank T. & Olson, N. (1985). Primary proteolysis of cheese during ripening. *Journal of Dairy science*, 68 (3) 531-540.
- [6] McCarthy C. M., Kelly P. M., Wilkinson M. G. & Guinee, T. P. (2017). Effect of fat and salt reduction on the changes in the concentrations of free amino acids and free fatty acids in Cheddar-style cheeses during maturation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 59 132-140.
- [7] Solieri L., Baldaccini A., Martini S., Bianchi A., Pizzamiglio V. & Tagliazucchi D. (2020). Peptideprofiling and biological activities of 12 month ripened Parmigiano Reggiano cheese . *Biology*, 9 (170), 4-18.
- [8] Loffi C., Bortolazzo E., Garavaldi A., Musi V., Reverberi P., Galaverna G., Sforza S. & Tedeschi T. (2021). Reduction in the Brining Time in Parmigiano Reggiano Cheese production minimally affects proteolysis, with no effect on sensory properties. *Foods*, 10-770.
- [9] Salaberria F., Marzocchi S., Bortolazzo E., Carrin M.E. & Caboni, M.F (2021). Study of the effect of NaCl on lipolysis in Parmigiano Reggiano cheese. *ACS Food Sci. Technol.* 1, 54-59.
- [10] Tavaría F. K., Franco I., Carballo J. & Malcata F. (2003). Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra de Estrela . *International Dairy Journal*, 13 (7) 537-545.
- [11] Gatti M., Bottari B., Lazzi C., Neviani E., & Mucchetti G . (2013). Microbial evolution in raw milk, long ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy science*, 97 (4) 573-591.

- [12] Lazzi C., Provolo M., Locci F., Bernini V., Neviani E. & Gatti M. (2016). Can the development and autolysis of Lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction? The case of Grana Padano. *International Journal of Food Microbiology* , 233 20-28.
- [13] Lindner J. D., Bernini V., De Lorentiis A. & Al, (2008). Parmigiano Reggiano cheese: evolution of cultivable and total lactic microflora peptidase activities during manufacture and ripening. *Dairy Sci. Technol.*, 88 511-523.
- [14] Hickey C. D., Auty M.A.E., Wilkinson M.G. & Sheehan J.J. (2015). The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review. *Food science and technologies*, 41 135-148.
- [15] Rank T. C., Grappin, R. & Olson, N. F. (1985). Secondary proteolysis of cheese during ripening. *Journal of Dairy science*, 68 (4) 801-805.
- [16] De Dea Lindner J., Bernini V., De Lorentiis A., Pecorari A., Neviani E. & Gatti M. (2008). Parmigiano Reggiano cheese: Evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening. *Dairy Sci. Tech.*, 88, 511–523.
- [17] CRPA. Il siero innesto per Parmigiano Reggiano (2010). www.crpa.it. Accesso: 08/06/2023.
- [18] Sousa M.J., Ardö Y. & McSweeney P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 11, 327–345
- [19] Summer A., Formaggioni P., Franceschi P., Di Frangia F., Righi F. & Malacarne M. (2017). Cheese as functional food: The example of parmigiano reggiano and grana Padano. *Food Technol. Biotechnol.* 55, 277–289.
- [20] Sforza S., Cavatorta V., Lambertini F., Galaverna G., Dossena A. & Marchelli R. (2012). Cheese peptidomics: A detailed study on the evolution of the oligopeptide fraction in Parmigiano-Reggiano cheese from curd to 24 months of aging. *Journal of Dairy Science*, 95, 3514-3526.
- [21] Consonni R. & Cagliani L. R. (2008). Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by HNMR spectroscopy. *Talanta*, 76, 200-205.
- [22] Cattaneo S., Hogenboom J. A., Masotti F., Rosi V., Pellegrino L. & Resmini P. (2008). Grated Grana Padano cheese: new hints on how to control quality and recognize imitations. *Dairy Sci. Tecnol.*, 88, 595-605.

- [23] Mcsweeney P. L. & Sousa M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: a Review. *Lait*, 80, 293-324.
- [24] Tekin A. & Guler Z. (2019). Glycolysis, lipolysis and proteolysis in raw sheep milk Tulum cheese during production and ripening: Effect of ripening materials. *Food Chemistry*, 286, 160-169.
- [25] Resmini P., Pellegrino L., Pazzaglia C. & Hogenboom J.A, (1985). Gli amminoacidi liberi nella tipizzazione del Parmigiano Reggiano ed in particolare del prodotto grattugiato. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 36, 557-592.
- [26] Pellegrino P. & Hogenboom J. A. (2007). Verifica della validità del quadro degli amminoacidi liberi a quindici anni della sua introduzione per la caratterizzazione del Parmigiano Reggiano. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 58, 5-16.
- [27] Freitas A. C., Fresna J. M., Prieto B., Franco I, Malcata F. X. & Carballo J. (1998). Influence of milk source and ripening time on free amino acid profile of Picante cheese. *Food Control*, 9 (4) 187-194.
- [28] Nishimura A. (2021). "Gusto umami nel Parmigiano Reggiano 24 mesi: correlazione tra amminoacidi liberi e analisi sensoriale". Tesi di laurea triennale in "Scienze Gastronomiche", Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma.
- [29] *Disciplinare di produzione del formaggio Parmigiano Reggiano*. Tratto da <https://www.parmigianoreggiano.com/it/consorzio-disciplinare-normative>. Accesso 03/07/2023.
- [30] Bottari B., Quartieri A., Prandi B., Raimondi S., Leonardi A., Rossi M., & Al. (2017). Characterization of the peptide fraction from digested Parmigiano Reggiano cheese and its effect on growth of lactobacilli and bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 255, 32–41.
- [31] Sforza S., Cavatorta V., Galaverna G., Dossena A. & Marchelli R. (2009). Accumulation of non-proteolytic aminoacyl derivatives in Parmigiano-Reggiano cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 453 19, 582–587.
- [32] Galvani A. (2022). I prodotti tipici agroalimentari nel quadro della valorizzazione ambientale. *Observatorio medioambiental*, vol. 5, 127-148.
- [33] Garavaldi A., Zannoni M., Giussani B., Roncoroni S., Galassi L. & Turrini M. (2010). Scheda sensoriale per il Parmigiano Reggiano: scelta dei descrittori e messa a punto del profilo. *Sci Tecn Latt-Cas* 61 367-379.

- [34] Bellesia F., Pinetti A., Simon-Sakadi L., Zucchi C. J., Caspò B. W., Caglioti I. & Palyi G. (2017). Amino acids as Food Quality Factors in Parmigiano Reggiano Hard Cheese. In G. Palyi, R. Kurdi, & C. Zucchi, *Advances in Asymmetric Autocatalysis and Related Topics* (p. 357-367).
- [35] CRPA 2011. Batteri lattici mesofili e Parmigiano Reggiano.
- [36] Il rapporto grasso/caseine nel latte di caldaia. Antico e nuovo parametro qualitativo per la caseificazione. Dr. Giuseppe Bolzoni – Centro Referenza Nazionale Qualità del Latte Bovino Istituto Zooprofilattico Sp. della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (B. Ubertini).
- [37] McSweeney, P. (2022). Rennets and Coagulants. *Enciclopedia of Dairy Science*. 316-320.
- [38] Hayes M., Oliveira J., McSweeney P. & Kelly A. (2002). Thermal inactivation of chymosin during cheese manufacture. *Journal of Dairy Research*, 69(2), 269-279.
- [39] Crabbe M.J.C. (2004). Rennets: General and Molecular Aspects. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* Volume 1, 2004, Pages 19-45.
- [40] Sihufe G. A., Zorrilla S. E. & Rubiolo A. C. (2010). The influence of ripening temperature and sampling site on the proteolysis in Reggianito Argentino cheese. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 43, Issue 2, 247-253, ISSN 0023-6438.
- [41] Ceruti R. J., Zorrilla S. E. & Sihufe, G. A. (2012). The influence of elevated initial ripening temperature on the proteolysis in Reggianito cheese, *Food Research International*, Volume 48, Issue 1, 34-40.
- [42] Mendia C., Ibañez F.C., Torre P., Barcina Y., (2000). Influence of the Season on Proteolysis and Sensory Characteristics of Idiazabal Cheese, *Journal of Dairy Science*, Volume 83, Issue 9, 1899-1904.
- [43] Visser S. (1993). Enzymes and their relation to cheese ripening ad flavour: an overview. *Journal of Dairy science*, 76 (1) 329-350.
- [44] Careri M., Spagnoli S., Panari G., Zannoni M. & Barbieri G. (1996). Chemical parameters of the non-volatile fraction of ripened Parmigiano Reggiano Cheese. *Int. Dairy Journal*, 6 (2) 147-155.
- [45] Nakagawa T., Kohori J., Koike S., Katsuragi Y. & Shoji T. (2014). Sodium Aspartate as a Specific Enhancer of Salty Taste Perception—Sodium Aspartate Is a Possible Candidate to Decrease Excessive Intake of Dietary Salt, *Chemical Senses*, 39, 781–786.

- [46] Malacarne M., Summer A., Franceschi P., Formaggioni P. & Pecorari M., 435 Panari, G., et al. (2009). Free fatty acid profile of Parmigiano-Reggiano cheese throughout ripening: Comparison between the inner and outer regions of the wheel. *International Dairy Journal*, 19, 637–641.
- [47] Curtis S. D., Curini R., Delfini M., Brosio E., D'Ascenzo F. & Bocca B. (2000). Amino acid profile in the ripening of Grana Padano cheese: an NMR study. *Food Chemistry*, 71, 495-502.
- [48] Colour of hard cheese 2. Factors of influence and relation to compositional parameters (1997).
- [49] Becchi P.P, Rocchetti G., Vezzulli F., Lambri M. & Lucini, L. (2023). The integrated metabolomics and sensory analyses unravel the peculiarities of mountain grassland-based cheese production: The case of Parmigiano Reggiano PDO, *Food Chemistry*, Volume 428, 136803.

APPENDICE

Tabella I: Lista dei parametri considerati durante le analisi statistiche suddivisi per categoria (anagrafica – tecnologia – composizione – sensoriale).

Tabella II: Dataset completo del profilo degli amminoacidi liberi (mg/g proteine) e % proteine dei 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi raggruppati per codice campione e mese/anno di produzione.

Tabella 1: Lista dei parametri considerati durante le analisi statistiche suddivisi per categoria (anagrafica – tecnologia – composizione – sensoriale).

No	Categoria	Parametro	Note
1	Anagrafica	Produzione	mesi di produzione
2	Anagrafica	Zona Altimetrica	pianura, collina, montagna
3	Tecnologia	Tipologia di raffreddamento in affioramento	intercapedine, serpentina, condizionato, ambiente
4	Tecnologia	Temperatura del latte magro (°C)	
5	Tecnologia	Gradi SH del siero innesto (°SH/50)	
6	Tecnologia	Volume di siero innesto aggiunto in caldaia (kg)	
7	Tecnologia	Titolo del caglio	
8	Tecnologia	Dosaggio del caglio (ml) o (g)	
9	Tecnologia	Durata della coagulazione r (secondi)	
10	Tecnologia	Temperatura di coagulazione (°R)	
11	Tecnologia	Numero di giorni in salatoio	
12	Tecnologia	Tipologia del salatoio	
13	Tecnologia	Temperatura della salamoia (°C)	
14	Tecnologia	Ambiente magazzino	condizionato/non condizionato
15	Tecnologia	Temperatura del magazzino (°C)	
16	Tecnologia	Umidità del magazzino (%)	
17	Composizione	Acqua	
18	Composizione	Grassi	
19	Composizione	Cloruro di sodio	
20	Sensoriale	Colore	scala 1-7
21	Sensoriale	Odore intensità	scala 1-7
22	Sensoriale	Odore burro	scala 1-7
23	Sensoriale	Odore crosta	scala 1-7

24	Sensoriale	Odore vegetale/verdura lessa	scala 1-7
25	Sensoriale	Odore frutta/frutta secca	scala 1-7
26	Sensoriale	Altri odori	scala 1-7
27	Sensoriale	Aroma burro	scala 1-7
28	Sensoriale	Aroma crosta	scala 1-7
29	Sensoriale	Aroma frutta/frutta secca	scala 1-7
30	Sensoriale	Aroma brodo di carne	scala 1-7
31	Sensoriale	Aroma speziato	scala 1-7
32	Sensoriale	Altri aromi	scala 1-7
33	Sensoriale	Dolce	scala 1-7
34	Sensoriale	Salato	scala 1-7
35	Sensoriale	Amaro	scala 1-7
36	Sensoriale	Piccante	scala 1-7
37	Sensoriale	Elasticità	scala 1-7
38	Sensoriale	Friabilità	scala 1-7
39	Sensoriale	Umidità	scala 1-7
40	Sensoriale	Solubilità	scala 1-7
41	Sensoriale	Granulosità	scala 1-7

Tabella II: Dataset completo del profilo in amminoacidi liberi (mg/g proteine) e % proteine dei 62 campioni di Parmigiano Reggiano 24 mesi raggruppati per codice campione e mese/ anno di produzione.

Prot, 24 Mesi	Mese/anno produzione	Alanina (Ala)	Acido aspartico (Asp)	Glutamina (Gln)	Glicina (Gly)	Istidina (His)	Isoleucina (Ile)	Leucina (Leu)	Metionina (Met)	Fenilalanina (Phe)	Prolina (Pro)	Serina (Ser)	Triptofano (Trp)	Treonina (Thr)	Valina (Val)	Lisina (Lys)	Tirosina (Tyr)	Acido glutammico (Glu)	Totale AA liberi (mg/g)	Proteine totali (g/100 g)*
13336	lug-19	7,8	9,5	1,6	7,6	9,0	18,8	24,4	7,4	17,1	33,4	20,7	1,8	11,9	22,5	22,2	7,6	55,9	299,7	32,4
13338	lug-19	7,6	10,1	1,4	7,2	7,9	17,0	22,1	6,1	14,5	29,8	21,3	1,5	11,0	20,6	23,8	6,1	53,8	286,9	33,2
13339	lug-19	7,2	9,1	1,5	6,6	7,4	16,3	20,7	5,8	13,4	28,4	18,6	1,3	10,4	19,7	25,7	5,4	50,6	273,1	36,1
13348	lug-19	8,7	13,1	1,5	7,8	8,6	18,1	23,4	6,3	15,2	32,0	22,8	1,8	11,2	22,0	26,4	6,6	56,4	295,5	28,6
13350	lug-19	8,2	12,9	1,5	7,9	7,3	17,4	22,8	6,1	14,5	31,4	21,7	1,6	10,7	21,1	23,7	6,6	52,9	280,6	29,6
13704	ago-19	6,9	9,6	1,5	7,0	8,1	16,3	22,4	6,5	13,0	27,2	14,4	2,1	8,6	17,3	27,3	4,2	49,5	254,4	32,0
13749	set-19	7,3	9,3	0,9	5,1	5,9	15,2	21,0	5,1	11,3	23,9	15,9	2,0	9,6	17,2	24,8	3,9	48,0	246,2	28,6
13750	set-19	5,5	4,9	2,5	8,1	5,0	16,3	20,2	6,0	14,2	28,7	13,4	4,4	6,9	16,7	22,2	8,8	47,3	243,5	30,0
13889	ott-19	5,2	4,1	2,4	7,3	8,7	26,6	24,0	6,4	14,0	28,2	13,7	4,9	7,7	18,6	22,7	15,6	45,2	272,6	32,5
13891	ott-19	8,2	10,3	1,2	5,8	7,1	15,1	18,7	5,5	12,8	27,9	16,2	2,2	11,5	19,7	32,0	6,9	53,8	276,9	31,1
13892	ott-19	7,6	9,9	1,7	7,0	5,8	15,7	19,8	6,1	13,3	27,9	16,5	3,6	9,0	17,7	26,2	7,5	49,0	260,3	30,8
13893	ott-19	8,1	11,3	1,6	6,8	7,4	16,9	19,7	6,5	13,4	28,6	18,0	1,6	10,8	20,9	39,1	4,3	58,5	294,3	32,1
13894	ott-19	7,6	10,3	1,5	6,7	7,3	18,2	21,8	7,1	14,7	28,1	18,0	1,8	10,2	20,6	29,7	6,6	54,3	280,3	30,3
13898	ott-19	6,9	10,7	1,6	6,9	7,8	14,6	19,1	5,6	13,4	27,0	15,9	2,4	9,2	17,2	30,5	5,5	53,1	262,9	30,0
13902	ott-19	7,8	10,8	1,7	7,3	9,5	17,8	23,9	7,2	14,2	31,8	16,8	4,0	9,6	19,2	33,5	7,7	60,7	296,9	31,6
13903	ott-19	6,4	10,4	1,0	5,8	5,8	14,9	19,7	5,4	11,7	23,5	15,9	1,7	8,2	16,9	23,0	3,4	45,4	237,7	35,6
13956	ott-19	5,6	4,6	2,4	10,0	8,3	15,9	22,2	6,8	24,9	31,8	18,0	5,3	7,0	17,1	1,7	8,7	31,6	242,2	28,8
14139	nov-19	7,6	11,7	1,0	5,8	6,3	17,2	24,8	6,4	12,3	25,5	16,6	2,0	9,6	18,1	29,0	3,3	50,5	267,1	31,6
14155	nov-19	8,4	11,6	1,4	7,7	6,4	18,4	24,4	7,2	14,8	30,3	18,5	1,7	9,0	21,1	30,1	4,1	54,0	286,7	31,7
14157	nov-19	6,4	11,0	2,5	7,3	8,1	14,8	19,3	6,0	17,3	26,9	16,9	2,1	9,2	17,6	25,2	4,0	51,4	259,7	31,8
14394	ott-19	7,6	11,5	1,7	6,7	7,8	16,3	21,2	6,0	14,7	29,0	19,5	2,4	10,4	20,2	24,9	6,2	56,1	284,9	25,0
14483	dic-19	6,6	7,9	0,9	6,7	4,9	13,5	18,4	5,0	10,7	21,2	14,4	1,1	5,1	15,3	21,0	5,4	45,8	221,5	26,4
14485	dic-19	5,3	7,5	0,9	4,3	4,9	13,6	17,9	4,4	9,1	20,2	14,6	1,6	8,1	15,1	20,1	4,5	47,2	216,9	26,1
14527	dic-19	5,8	9,1	1,0	6,0	6,0	13,6	18,9	4,9	11,5	21,3	15,6	1,9	6,6	15,0	15,4	7,6	46,6	223,3	24,8

14528	dic-19	5,6	7,0	1,6	6,0	5,1	12,6	17,3	4,6	9,8	19,8	15,4	1,4	8,2	14,7	19,5	5,9	43,6	212,0	26,9
14530	dic-19	8,7	10,7	1,0	9,0	8,9	22,5	30,9	9,0	18,6	33,1	21,9	2,3	10,4	23,7	25,7	11,4	59,2	326,9	25,5
14752	gen-20	5,9	9,1	1,1	5,8	6,5	16,3	22,5	6,5	13,2	23,0	16,1	1,3	8,3	17,6	24,1	8,3	42,0	245,8	31,7
14754	gen-20	6,4	8,0	1,6	4,9	5,8	15,5	20,8	5,4	11,7	24,0	16,4	1,3	9,3	17,7	25,8	5,3	44,7	240,6	28,7
14759	gen-20	6,5	10,1	1,6	4,5	5,4	16,2	22,3	6,1	11,9	23,7	14,9	1,1	9,6	17,9	22,7	6,5	44,2	240,0	30,8
14760	gen-20	5,9	7,6	1,8	4,8	5,7	15,7	21,2	5,6	12,3	22,6	15,3	0,9	8,7	17,1	25,4	8,3	46,4	240,8	30,9
14761	gen-20	7,1	8,2	1,6	5,6	6,1	16,4	21,9	6,0	12,1	26,0	17,8	2,3	9,7	18,8	25,4	2,8	48,6	253,0	29,4
14762	gen-20	5,9	8,3	1,5	5,4	5,5	14,5	19,7	5,3	10,9	21,2	15,1	1,8	7,4	16,2	26,4	6,1	42,0	227,8	30,4
14763	gen-20	6,3	7,3	1,6	5,6	4,5	14,8	19,9	5,6	11,9	22,9	15,3	2,1	7,7	17,0	25,6	8,8	39,8	232,7	30,3
14833	feb-20	5,3	8,6	1,6	4,6	6,1	15,8	21,8	5,9	12,6	22,0	14,7	1,6	9,2	16,9	25,5	5,2	43,9	236,3	29,8
14834	feb-20	5,8	9,3	1,5	4,5	5,8	14,6	19,7	5,3	11,5	21,6	14,1	1,9	8,7	16,8	25,9	6,4	44,0	232,1	32,5
14867	feb-20	5,3	6,5	0,9	5,5	5,5	13,7	18,3	5,0	11,2	20,2	13,0	1,4	6,7	15,8	23,4	4,4	40,0	215,0	32,0
14868	feb-20	6,9	7,8	1,4	6,5	5,0	16,0	21,7	5,7	12,4	24,9	16,4	1,7	8,0	18,5	22,7	3,0	48,3	243,9	30,3
14869	feb-20	7,5	9,7	1,0	8,3	5,4	18,1	24,1	7,2	13,7	28,6	17,5	2,0	7,4	20,6	21,6	2,9	49,5	261,5	32,2
14870	feb-20	6,9	8,1	0,8	6,1	6,0	15,4	20,0	5,5	11,7	26,1	17,9	2,4	9,2	18,4	24,1	3,0	49,2	246,7	29,5
15082	mar-20	7,5	11,3	1,0	7,3	6,4	17,4	23,5	7,0	13,8	27,4	17,0	2,3	9,4	20,7	27,9	5,8	52,4	274,7	31,3
15083	mar-20	7,9	9,5	0,7	5,8	6,9	17,2	24,2	6,6	13,7	28,0	18,7	2,7	11,2	19,8	25,4	4,8	49,1	268,7	28,4
15430	mag-20	7,6	10,4	1,3	5,8	5,8	17,3	22,0	6,2	14,0	25,8	18,0	1,8	10,8	19,5	23,9	8,5	49,3	261,8	25,9
15431	mag-20	7,4	11,6	0,7	6,4	5,5	16,8	21,9	5,0	12,6	25,3	17,9	1,6	9,3	19,2	25,8	5,7	52,6	263,1	25,6
15439	mag-20	7,8	12,3	1,2	6,8	6,6	18,7	25,1	6,5	14,4	27,8	19,4	2,0	11,0	21,6	28,0	8,1	53,8	287,5	28,3
15440	mag-20	7,9	10,5	1,5	6,8	6,3	18,8	25,0	5,9	14,2	27,2	18,4	1,8	10,9	21,6	28,3	5,8	52,4	278,7	27,6
15441	mag-20	8,1	11,1	1,6	7,3	6,7	19,5	26,1	7,0	15,9	27,6	19,3	1,8	10,4	21,4	24,9	7,6	54,1	286,0	28,3
15787	giu-20	8,1	11,6	1,1	6,2	6,1	19,9	26,4	6,0	14,1	27,3	21,0	1,8	11,8	22,3	29,9	7,0	56,6	299,0	29,1
15788	giu-20	7,0	9,1	1,0	4,7	4,6	15,2	20,2	4,4	10,9	21,8	16,1	1,6	9,8	17,0	23,8	6,4	46,2	233,0	23,1
15789	giu-20	7,6	9,5	1,1	6,4	5,1	15,7	19,5	4,6	13,2	25,1	18,4	2,0	9,8	19,1	26,0	7,3	50,3	255,6	25,3
15790	giu-20	7,1	9,6	1,1	6,8	5,6	17,7	22,3	5,2	13,1	24,3	18,2	1,5	8,7	19,4	24,6	4,9	47,6	256,7	25,7
15791	giu-20	7,5	9,9	1,4	5,8	6,4	17,6	23,0	5,6	13,7	25,6	17,5	1,6	10,9	20,3	27,7	5,8	53,3	270,4	26,6
15792	giu-20	7,0	11,8	1,8	6,0	5,6	17,2	21,8	4,9	12,5	24,1	17,0	1,2	9,3	18,8	25,2	5,1	50,3	252,8	25,3
15793	giu-20	7,6	10,5	1,5	6,8	5,8	18,0	22,7	5,2	13,5	21,5	18,4	1,6	9,4	20,3	27,3	6,1	49,9	265,8	25,9
15876	giu-20	7,4	9,4	1,4	5,5	5,7	16,9	22,1	4,8	12,8	24,2	17,4	1,5	10,2	18,8	24,1	5,8	46,2	249,1	24,6
16106	lug-20	7,4	10,2	1,1	5,3	6,3	16,9	22,2	5,1	12,7	24,1	16,5	1,5	10,1	18,7	24,3	5,7	45,9	254,0	24,5

16107	lug-20	6,9	9,4	1,4	5,7	6,3	17,2	22,1	5,2	13,0	24,8	18,8	1,6	10,7	19,1	23,5	7,6	45,9	256,6	25,7
16159	lug-20	8,2	10,2	1,2	7,7	6,2	17,1	22,4	5,3	13,9	27,3	18,4	1,7	8,2	20,8	26,0	6,1	51,6	266,7	26,4
16160	lug-20	7,5	8,6	1,1	6,6	5,3	16,4	22,0	4,3	12,0	23,3	16,7	1,7	7,7	18,0	21,5	4,5	46,3	236,8	23,5
16161	lug-20	7,2	8,2	1,3	6,0	6,1	17,3	22,3	5,3	12,7	24,8	19,4	1,5	9,7	19,4	24,2	4,7	47,8	252,0	25,2
16193	lug-20	7,1	10,7	1,2	5,8	5,0	17,4	23,2	5,3	13,4	24,6	17,6	1,6	10,3	20,2	26,7	6,0	51,3	260,3	26,0
16194	lug-20	6,5	8,5	1,7	5,8	6,5	15,8	21,6	5,2	12,5	24,1	15,4	1,3	9,1	18,8	25,0	5,7	47,1	245,2	24,5
16266	lug-20	7,1	12,8	1,0	5,7	6,3	17,2	22,6	5,0	12,6	24,3	16,9	1,8	10,0	19,1	25,0	6,0	50,4	254,5	25,5

* Valore ottenuto tramite analisi

Kjeldahl