

PROTEOLYSIS AND LIPOLYSIS OF PARMIGIANO-REGGIANO CHEESE AT DIFFERENT RIPENING PERIODS: 12, 24, 55 AND 96 MONTHS

PROTEOLISI E LIPOLISI DEL FORMAGGIO PARMIGIANO- REGGIANO IN DIFFERENTI PERIODI DI STAGIONATURA: 12, 24, 55 E 96 MESI

Massimo Malacarne, Paolo Formaggioni, Piero Franceschi, Andrea Summer, Primo Mariani

KEY WORDS:

Parmigiano-Reggiano cheese, ripening, proteolysis, lipolysis.

PAROLE CHIAVE:

Parmigiano-Reggiano, stagionatura, proteolisi, lipolisi.

Acknowledgements: the research was carried out in collaboration with the Consortium of Parmigiano-Reggiano cheese (Reggio Emilia).

Ringraziamenti: la ricerca è stata condotta in collaborazione con il Consorzio del Formaggio Parmigiano-Reggiano (Reggio Emilia).

Summary

A characterisation of the ripening phase of Parmigiano-Reggiano cheese has been reported in this note. The trend of physico-chemical characteristics and of indices descriptive of lipolytic and proteolytic processes of cheese have been illustrated. Data were obtained from 17 wheels of Parmigiano-Reggiano cheese of different age, ranging from the cheeses of 24-48 hours to cheeses of 8 years of ripening (96 months). Proteolysis and lipolysis trends showed distinctive peculiarities throughout ripening. Proteolysis resulted significant in the first 24 months of ripening, particularly in the first 6 months. Beyond two years the proportion of pH 4.6 soluble nitrogen remains unvaried. Lipolysis processes were characterised by a more regular trend: the proportion of free fatty acids (summation of FFA * 100 / cheese fat) increase till the 55th month of ripening. Afterwards, the values of FFA/cheese fat *ratio* was almost constant. Furthermore, a higher degree of lipolysis towards *medium* chain (C10÷C14) and, particularly, short chain (C4÷C8) fatty acids was observed.

Sezione di Scienze Zootecniche e Qualità delle Produzioni Animali,
Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti,
Università degli Studi di Parma, Via del Taglio 8, 43100 Parma, ITALY.
Phone +39 0521 032615; massimo.malacarne@unipr.it

Riassunto

In questa nota, la maturazione del Parmigiano-Reggiano viene illustrata attraverso l'esame dell'andamento di alcuni parametri chimico-fisici di base e di indici descrittivi dei processi proteolitici e lipolitici. I dati sono stati ricavati dall'analisi di 17 forme di Parmigiano-Reggiano a differenti epoche di stagionatura, a partire dall'estrazione dalla caldaia (0 mesi) fino a 96 mesi (8 anni di maturazione). Nel corso della stagionatura del Parmigiano-Reggiano, gli andamenti della proteolisi e quelli della lipolisi hanno mostrato peculiarità distintive. La proteolisi è risultata significativa nel corso dei primi 24 mesi di maturazione e, in modo particolare, nei primi 12 mesi. Dopo i due anni di stagionatura, il grado di solubilizzazione della caseina si arresta e, di conseguenza, la percentuale di azoto solubile a pH 4,6 tende a mantenersi costante. Il processo di lipolisi ha mostrato invece un andamento più regolare: la percentuale di acidi grassi che si liberano (sommatoria AGL * 100 / grasso del formaggio) aumenta in maniera continua fino a 55 mesi; successivamente questo valore tende a stabilizzarsi. Nel corso della maturazione, inoltre, si è potuta evidenziare una maggiore lipolisi a carico degli acidi grassi a corta catena (C4÷C8), una lipolisi intermedia per quelli a media catena (C10÷C14) ed una minore per gli acidi grassi a lunga catena (C16÷C18).

Introduction

The ripening of cheese is a complex *phenomenon*, a concatenation of physico-chemical, biochemical and biologic events strictly connected among themselves. During ripening, the curd, characterised by light taste and flavour, undergoes deeper changes until it assumes the typical rheological and sensory characteristics of the final product. The whole process of ripening consists essentially in an enzymatic "digestion" of the curd. The substrate is represented by the casein, but the process involves also the soluble components (sugar, lactic acid, citric acid, *etc.*) and, according to cheese variety, lipids. The physico-chemical and biochemical modifications evolve according to the characteristics of the substrate and to the nature of the numerous agents responsible for the transformation, and in relation to a great variety of primary and secondary products that originate throughout ripening, to their interaction and synergism. Essentially, these deeper changes consist in the loss of moisture, the fermentation of lactose, the partial metabolisation of the lactic acid and the citric acid, the more or less intense solubilisation of the casein and intermediate products, the hydrolysis of fat and the formation of the cheese rind. The main agents responsible for transformation (glycolysis, proteolysis, lipolysis) are represented by the milk enzymes, the starter, rennet preparation or substitutive, polluting microflora, secondary starter cultures used in specific dairy productions. The determinism of biotransformations is under the influence of several physico-chemical conditions which are able to influence the growth of microorganisms (bacteria, yeasts, mould), their capability to synthesize enzymes and, finally, the enzymatic activity: pH, water activity, redox potential, composition of the soluble phase, temperature, *etc.* The physico-chemical structure of the curd, of the cheese mass, exert a primary role with reference to the

state and degree of dispersion of bounded water, properties of the casein *reticulum*, structure of the paracasein, physical state of fat, size of fat globules and degree of integrity of milk fat globules membrane, *etc.*

The ripening of Parmigiano-Reggiano cheese take a *minimum* period of 12 months, but, in most cases, it last until 24 months. This period represents the basic characterising element of the cheese, imparting its peculiar qualities. In fact, during this phase the cheese develops its typical flavour and aroma properties. This is related to the enzymatic activities present in the cheese which are related to the peculiarities of the cheesemaking process, such as the use of raw milk, the addition of natural whey starter culture and the use of calf rennet. The intensity and the specificity of the enzymatic action seems to be strictly conditioned by the cheesemaking technology. The higher cooking temperature and the dimension of the cheese are able to determine the formation of a temperature gradient, which decrease from the inner to outer side of the cheese mass, and which remains for about 24 hours after the extraction of the cheese mass from the vat. This temperature gradient affects the development of microbial populations and, consequently, of their connected enzymatic activities, with important repercussions on the evolution of glycolytic and proteolytic processes in the outer and in the inner zones of the cheese during ripening. On the various "external" factors that are able to affect the processes of cheese ripening, previous research has underlined the significant role exert by the season of production.

Nowadays, the main research concerning the ripening of Parmigiano-Reggiano cheese were focused on the commercial ripening product, *e.g.* 24 months. Conversely, scarce information on cheese ripened over a period longer than 24 months are reported.

In this note, the ripening of Parmigiano-Reggiano cheese will be illustrated by the examination of some physico-chemical parameters and of some indexes descriptive of the proteolytic and the lipolytic processes. The data showed were obtained by analysis of 17 cheese wheels of different age, ranging from extraction from the vat (0 months) to 96 months (8 years of ripening).

Materials and methods

The research was carried out on 17 Parmigiano-Reggiano cheese wheels produced in 12 cheese factories distributed in the provinces of Parma, Reggio-Emilia, Modena and Mantova.

The cheese wheels were selected according to their age, to cover to whole ripening cycle of Parmigiano-Reggiano cheese. In particular, 4 cheese wheels (one sample for season of production) were selected for each of the following age of ripening: 1, 12 and 24 months. Furthermore, 2 cheeses of 24-48 hours (defined as cheese mass at extraction from the vat), 2 cheeses of 55 months and 1 cheese of 96 months were sampled. For each cheese, the agreement to structural standard requirements was verified. Cheese was sampled according to standard FIL-IDF methods [1].

On cheese samples the following analyses were performed: pH with potentiometer; moisture by drying the sample at 102°C [2]; fat according to Gerber method modified by Siegfeld [3]; sodium chloride by titration with AgNO₃ [4]; for total nitro-

gen determination the Kjeldahl method was used; nitrogen soluble at pH 4.6 (SN), 12% trichloroacetic acid-soluble nitrogen (TCASN) and 5% phosphotungstic acid-soluble nitrogen (PTASN) were separated using the procedure proposed by Gripon *et al.* [5] and determined by the Kjeldahl method; ammonia nitrogen (NNH₃) according to Savini [3]. From nitrogen fractions, the values relative to the components of high molecular weight (Peptones N = NS - TCASN) and peptides of low molecular weight (Peptides N = TCASN - PTASN - NNH₃) were obtained. Free fatty acids were determined according to De Jong and Bandings [6] by means of capillary gas chromatography.

The data collected were subject to univariate ANOVA (SPSS 14.1, Chicago, IL), considering as a fixed factor the effect of the age of cheese (6 levels: 0, 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening).

Results and discussion

Physico-chemical characteristics of Parmigiano-Reggiano cheeses of different age - 0 (corresponding to the extraction of the cheese mass from the vat), 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening - are reported in table 1.

Table 1:

Basic composition of Parmigiano-Reggiano cheese at different age of ripening. Mean value±SD.

Tabella 1:

Composizione di base del formaggio Parmigiano-Reggiano a differente età di stagionatura. Media±DS.

| Months of ripening <i>Mesi di stagionatura</i> | 0 ⁽¹⁾ | 1 | 12 | 24 | 55 | 96 |
|---|------------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| No. of cheeses <i>N. di formaggi</i> | 2 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 |
| Moisture (g/100g) <i>Umidità</i> | 39.30±0.44 | 37.00±0.49 | 33.25±0.65 | 31.06±0.67 | 26.40±2.33 | 25.10 |
| Dry matter (g/100g) <i>Sostanza secca</i> | 60.70±0.44 | 63.00±0.49 | 66.77±0.65 | 68.94±0.67 | 73.60±2.55 | 74.90 |
| Fat (g/100g) <i>Grasso</i> | 27.45±0.21 | 27.30±0.50 | 28.87±0.69 | 30.49±1.01 | 32.47±3.00 | 28.43 |
| Protein (g/100g) <i>Proteina</i> | 29.50±0.69 | 30.89±0.61 | 31.47±0.77 | 32.65±0.96 | 34.66±1.14 | 40.92 |
| NaCl (g/100g) | 0.04±0.02 | 0.97±0.19 | 1.36±0.22 | 1.48±0.32 | 1.64±0.08 | 1.97 |
| NaCl/Moisture (g/100g) <i>NaCl/Acqua</i> | 0.10±0.05 | 2.64±0.52 | 4.11±0.67 | 4.80±1.12 | 6.26±0.92 | 7.84 |
| pH | n.d. | 5.32±0.02 | 5.36±0.02 | 5.36±0.05 | 5.22±0.01 | 5.34 |

(1) Cheese mass extract from the vat (24-48 hours); *Massa caseosa estratta dalla caldaia (24-48 ore)*

n.d. not determined; *n.d. non determinato*

Moisture content of cheese decreased significantly from the extraction of the cheese mass from the vat (39.30 g/100g) to 96 months ripened cheese (25.10 g/100g). An accentuated decrease of cheese moisture was observed during the first 12 months of ripening; in this period the loss of 6.05 g/100g of moisture was registered ($P<0.05$), corresponding to 43% of the whole cheese moisture variation from 0 to 96 months of age. In the following 12 months of ripening the loss of moisture resulted less accentuated and corresponded to 2.19 g/100g (15% of 0-96 months variation; $P<0.05$). From the cheeses of 24 months to those of 55 months, the moisture value recorded a further drop ($P<0.05$), corresponding to 4.66 g/100g (33% of the whole variation). No significant differences ($P>0.05$) of cheese moisture were observed between 55 months ripened cheeses and 96 months ripened cheese.

In general, the content of cheese protein and fat has underlined an increasing trend as the age of cheese increased. This trend has to be related to the corresponding variations of cheese moisture. The protein content is varied between 29.50 g/100g as observed in the cheese mass after the extraction from the vat to 40.92 g/100g reported for the 96 months ripened cheese ($P<0.05$). Concerning the cheese fat, the increase of its content with cheese age was observed until 55 months of ripening ($P<0.05$). On the other hand, the 96 months ripened cheese (data obtained from a single cheese sample) showed a fat value (28.43 g/100g) clearly lower than that observed in 55 months ripened cheeses ($P<0.05$) but no different ($P>0.05$) with respect to 0-1-12 and 24 months ripened cheeses (27.24-27.30-28.87 and 30.49 g/100g).

The content of sodium chloride (NaCl) is reported both on 100 g of cheese and on 100 g of cheese moisture. This latter value represents an indication of the saltiness of the aqueous phase in which cheese enzymes are present. These enzymes are involved in the chemical and biochemical reactions that are the basis of cheese ripening. The content of NaCl on 100 g of cheese moisture is markedly increased ($P<0.05$) from the extraction of the cheese mass from the vat (0.10 g/100g) to one month ripened cheese (2.64 g/100g), in correspondence with the end of the brining phase. Even if less accentuated, a clear increase of salt to cheese moisture was observed as cheese age increased: in 12, 24, 55 and 96 months ripened cheeses, it reached values, respectively, of 4.11-4.80-6.26 and 7.84 g/100g of cheese moisture. This trend is related to the loss of moisture during the ripening of cheese.

The pH values of cheeses varied significantly according to cheese age ($P<0.05$). An increase of pH values was observed from 1 to 12 months ripened cheeses (5.32 vs 5.36). No differences ($P>0.05$) were registered between 12 and 24 months ripened cheeses. Then, after 55 months of ripening, the pH value of cheese (5.22) was clearly lower ($P<0.05$) than in 24 months ripened cheese. Ninety-six months ripened cheese showed a pH value (5.34) markedly higher ($P<0.05$) than 55 months ripened cheese. The increase of pH values in the firsts months of ripening was reported in other studies carried out on hard and semi-hard cheeses, such as Cheddar, Gouda and Gruyère, ranging from 5 to 6 months of age [7, 8]. According to McSweeney and Fox [9], pH tended to increase during ripening because of the formation of alkaline nitrogen compounds (*e.g.* ammonia) and the catabolism of lactic acid. Zapparoli and Dugoni [10], in a study carried out on 60 Parmigiano-Reggiano cheese wheels of different age, had reported a decrease of cheese pH after 9 months of ripening They

concluded that this was probably due to the accumulation of free fatty acids during ripening. In our study, the decrease of cheese pH was observed after 24 months of ripening. Actually, as reported in the follows paragraphs, proteolysis, in general, and the production of ammonia, in particular, seems to stop after the 24th month of ripening, while the production of free fatty acids continue progressively until the 55th month of ripening.

Proteolysis

Proteolysis is a basilar *phenomenon*, which is able to characterise the whole ripening process of cheese [11-14]. The biochemical reactions of proteolysis, which, starting from the curd, deeply modify the casein *reticulum*, is determined by an enzymatic system composed of proteases of different origin: milk (plasmin), rennet (chymosin), milk natural microflora (proteases from mesophilic lactic bacteria) and whey starter bacteria (proteases from thermophilic lactic bacteria). The cheese proteolysis is based essentially on enzymatic processes and its evolution depend on the action and interaction of those factors which are able to influence the specific enzymatic activities that take place during the whole ripening, such as the moisture content of cheese, pH values, salt content, free fatty acids, temperature, *etc.* The degradation of protein does not proceed necessarily from high to low molecular weight substances. The first step concerns the break down of single caseins by endopeptidase with the formation of small units (peptides of elevated molecular weight) which are, however, insoluble at pH 4.6, as the undigested casein [15]. These peptides are the substrate of esopeptidase, carboxipeptidases and aminopeptidases leading to the formation of medium-low molecular weight peptides and free aminoacids, all entities soluble at pH 4.6 [16].

a) *Ripening index* - The ripening index is represented by the percentage of pH 4.6 soluble nitrogen on the total nitrogen of cheese. This index is descriptive of the proportion of casein which is progressively digested by proteolytic enzymes. The values of the ripening index of Parmigiano-Reggiano cheeses of different age - 0, 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening - are reported in table 2.

Table 2:

Ripening index and soluble nitrogen composition of Parmigiano-Reggiano cheese at different age of ripening. Mean value \pm SD.

Tabella 2:

Coefficiente di maturazione e composizione dell'azoto solubile del formaggio Parmigiano-Reggiano a differente età di stagionatura. Media \pm DS.

| | | | | | | |
|---|------------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| Months of ripening <i>Mesi di stagionatura</i> | 0 ⁽¹⁾ | 1 | 12 | 24 | 55 | 96 |
| No. of cheeses <i>N. di formaggi</i> | 2 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 |
| Ripening index ⁽²⁾ <i>Coefficiente di maturazione⁽²⁾</i> | 5.10±0.18 | 9.16±1.34 | 26.47±2.50 | 33.22±0.61 | 33.55±1.65 | 35.90 |
| pH 4.6 soluble nitrogen composition (%) <i>Composizione dell'azoto solubile a pH 4,6 (%)</i> | | | | | | |
| Peptones N/SN <i>N peptoni/NS</i> | 51.05±2.08 | 26.48±5.33 | 9.33±1.17 | 10.65±1.37 | 10.23±1.71 | 10.12 |
| Peptides N/SN <i>N peptidi/NS</i> | 21.67±9.85 | 22.34±2.75 | 14.91±5.87 | 17.34±4.09 | 15.66±3.21 | 18.80 |
| AA N/SN <i>N aa/NS</i> | 24.74±7.79 | 47.65±5.10 | 69.04±5.37 | 63.70±3.00 | 66.03±3.33 | 62.14 |
| NH ₃ N/SN <i>N NH₃/SN</i> | 2.54±0.03 | 3.53±0.70 | 6.72±1.26 | 8.30±1.00 | 8.07±1.60 | 8.94 |

SN = pH 4.6 soluble nitrogen; NS = Azoto solubile a pH 4,6

AA N = free amino acids nitrogen; N aa = azoto degli amminoacidi liberi

NH₃ N = ammonia nitrogen; N NH₃ = azoto ammoniacale

(1) Cheese mass extract from the vat (24-48 hours); *Massa caseosa estratta dalla caldaia (24-48 ore)*

(2) SN *100/Total nitrogen - NS *100/Azoto totale

At the extraction of the cheese mass from the vat, 5% of cheese casein was solubilised. The degree of casein solubilisation increased progressively with cheese age ($P < 0.05$). The values of the ripening index were 9.16-26.47-33.22-33.55 and 35.90%, respectively, in 1-12-24-55 and 96 months ripened cheeses. The solubilisation of casein was particularly remarkable during the first period of ripening, e.g. from the extraction of the cheese mass from the vat to 12 month aged cheeses (+21.37 percentage unit, $P < 0.05$). Then, from 12 to 24 months ripened cheeses, the degradation of casein resulted as reduced in intensity (+6.75 percentage unit; $P < 0.05$). After 2 years of ripening (24 months) no significant variation ($P > 0.05$) of the ripening index was observed. When compared to shorter ripening cheeses, ranging from some months to one year, such as Emmental, Gruyère, Sbrinz, etc., Parmigiano-Reggiano cheese had showed an intense solubilisation of casein, comparable to that in Emmental cheese one, but lower than that reported for an Asiago cheese, a semi-hard cheese [17, 18].

b) *Composition of pH 4.6 soluble nitrogen* - The composition of pH 4.6 soluble nitrogen of Parmigiano-Reggiano cheeses of different age - 0, 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening - is reported in table 2.

The proportion of peptones - among soluble nitrogen fractions, the primary substrate of the proteolytic activity - was decreased throughout the first 12 months of ripening, from a value of 51.05% in the cheese mass, to a value of 9.33% in 12 months ripened cheese ($P < 0.05$). No further variations ($P > 0.05$) of the peptone pro-

portion were observed in 24, 55 and 96 months ripened cheeses.

On the contrary, the proportion of phosphotungstic acid (PTA) soluble nitrogen - which represent the free amino acids contents of cheese - showed a sudden increase in the first month of ripening ($P < 0.05$), from a value of 24.74% in the cheese mass extracted from the vat, to a value of 47.65% in one month ripened cheese. A further increase ($P < 0.05$) of PTA nitrogen proportion was recorded between 1 and 12 months ripened cheese (+21.39 percentage unit). No differences ($P > 0.05$) of PTA nitrogen proportion were registered among 12, 24, 55 and 96 months ripened cheeses. Actually, free amino acids are the final products of the proteolytic processes and, consequently, they accumulate during the ripening of cheese.

No significant variations of the peptide proportion was reported amongst cheese of different age (average value 18.34%; $P > 0.05$). Actually, peptides represents an intermediate product of the proteolytic process: they are produced from the break down of peptones and are hydrolysed to produce smaller peptides and free amino acids. Amino acids and peptides affect sensory, nutritional and biological function properties of cheese. They represent over the 4/5 of the whole soluble nitrogen of commercial ripened cheese (24 months).

The proportion of ammonia nitrogen was increased progressively during the first 12 months of ripening, from 2.54 to 6.72%, respectively, in 0 (cheese mass extraction from the vat) and 12 months ripened cheeses. No variations ($P > 0.05$) were observed among 12-24-55 and 96 months ripened cheeses (6.72-8.30-8.07 and 8.94%).

In conclusion, the ripening "cycle" of Parmigiano-Reggiano cheese is characterised by a relevant solubilisation of the casein, with deep modifications of the rheological properties of the cheese. This *phenomenon* concurs to define the peculiar organoleptic attributes of commercial ripened cheese (24 months). The proteolysis of casein - mainly due to natural milk enzymes [16] - was particularly accentuated during the first 6 months of ripening, whereas it decreased in intensity during the intermediate and, above all, final phases of ripening. Proteolytic degradation of intermediate substrate and production of free aminoacids, with the contribution of bacterial proteases [19], results earlier and just as intense. From the third month of ripening, in fact, most of cheese soluble nitrogen is represented by amino acids and smaller peptides. However, after a deep modification in the first phase of ripening, from the 6th month of ripening an equilibrium among peptones, peptides, amino acids in the soluble nitrogen of cheese was observed. Ammonia nitrogen is the final product of nitrogen catabolism and its content is increased progressively until the 24th month of ripening. After this period, no further variation of ammonia nitrogen were reported.

Lipolysis

The hydrolysis of lipids does not affect the rheological and textural properties of cheese. However, it plays a relevant role in the development of cheese flavour. This phenomenon is much more marked in blue and in soft cheeses, while it is considered of moderate entity in hard cheeses [15]. The biochemical agents responsible for lipolysis are essentially represented by lipases. Besides the lipoprotein lipase of milk (LPL, which is less active at pH below 6.5), lipases produced by several micro-

organisms, such as those from mould and micrococci [15], seem to play a key role in cheese lipolysis throughout the ripening process. LPL is denatured by the effect of milk pasteurisation (above 60°C). On the contrary, most of microorganism lipases are still active in milk pasteurised at 76°C [15]. The specificity of the lipolysis is strictly dependent on the cheesemaking technology [20]. Moreover, it may vary in intensity in relation to several factors, such as the enzyme concentration, temperature, water activity, salt content, *etc.* However, as opposed to proteolysis, lipolysis should not be inhibited significantly by the salt content of cheese. In general, lipolysis is influenced by storage conditions and by all those operations that interfere with cheese ripening [21]. During Parmigiano-Reggiano cheese ripening lipolytic enzymes, particularly those of bacterial origin [22], produce variable amounts of free fatty acids, which are subjected to oxidative degradation and form low molecular weight carbonilic compounds characterised by certain aromatic properties [23], particularly if derived from unsaturated fatty acids. Besides this, cheese fat, by means of direct and derived products of lipolysis contribute to the rheological properties and concur in the formation of organoleptic and flavour characteristics of cheese as well, either in medium and in long ripened cheeses; minor or not well defined should be their role in the formation of cheese taste. However, free fatty acids seems to exert a meaningful role in the definition taste in some cheeses like Gouda, Gruyère de Comté and Emmental.

a) *Lipolysis index* - The progress of lipolysis during Parmigiano-Reggiano cheese ripening was analysed considering the *ratio* between the content of free fatty acids and that of cheese fat (lipolysis index). The values of the lipolysis index of Parmigiano-Reggiano cheese of different age - 0, 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening - are reported in table 3.

Table 3:

Lipolysis index and free fatty acids composition of Parmigiano-Reggiano cheese at different age of ripening. Mean value±SD.

Tabella 3:

Indice di lipolisi e composizione degli acidi grassi liberi del formaggio Parmigiano-Reggiano a differente età di stagionatura. Media±DS.

| Months of ripening <i>Mesi di stagionatura</i> | 1 | 12 | 24 | 55 | 96 |
|---|------------|------------|------------|------------|-------|
| No. of cheeses <i>N. di formaggi</i> | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 |
| Lipolysis index ⁽¹⁾ <i>Indice di lipolisi⁽¹⁾</i> | 0.75±0.20 | 2.35±1.00 | 4.15±0.99 | 7.84±2.19 | 8.80 |
| Free fatty acids composition (%) <i>Composizione degli acidi grassi liberi (%)</i> | | | | | |
| C4÷C8 | 1.58±0.98 | 5.12±2.00 | 6.01±1.12 | 10.84±4.13 | 14.83 |
| C10÷C14 | 10.17±1.44 | 13.29±1.62 | 13.67±1.85 | 18.22±5.44 | 23.72 |
| C16÷C18 | 88.25±0.56 | 81.58±3.02 | 80.31±2.58 | 70.93±9.58 | 61.44 |

(1) Free fatty acids content* 100/cheese fat; *Contenuto degli acidi grassi liberi*100/grasso del formaggio*

During the first two years of ripening, free fatty acids had represented a higher proportion of fat as cheese age increased ($P < 0.05$), reaching values of 0.75-2.35 and 4.15% in 1-12 and 24 month ripened cheese, respectively. Fifty-five months ripened cheese was characterised by a lipolytic index (7.84%) higher than the value observed in 24 months ripened cheese ($P < 0.05$). The value reported for 96 months ripened cheese was not different ($P > 0.05$) with respect to 55 months ripened cheese. Trends and values observed here agree with the results of previous studies [24]

b) *Free fatty acids composition* - The composition of free fatty acids of Parmigiano-Reggiano cheese of different age - 0, 1, 12, 24, 55 and 96 months of ripening - is reported in table 3.

Single free fatty acids were grouped according to their number of carbon atoms: short chain fatty acids, C4÷C8, *medium* chain fatty acids C10÷C14, long chain fatty acids C16÷C18.

As cheese ripening progressed, a sensible increase in the proportion of short chain free fatty acids was observed ($P < 0.05$). In fact, the values observed in 1-12-24-55 and 96 months ripened cheeses were 1.58-5.12-6.01-10.84 and 14.84%, respectively.

Even the proportion of *medium* chain free fatty acids registered an increased with cheese age ($P < 0.05$). The values reported in 1-12-24-55 and 96 months ripened cheese were 10.17-13.29-13.67-18.22 and 23.72%, respectively.

Conclusion

The trends of the proteolytic and lipolytic showed distinctive peculiarities during Parmigiano-Reggiano cheese ripening.

The cheese proteolysis resulted significant in the first 24 months of ripening and, particularly, in the first 6 months. After 2 years of ripening, no more solubilisation of casein was observed, consequently, the proportion of 4.6 pH soluble nitrogen tends to be constant. From a qualitative point of view, amino acids and peptides represent about 4/5 of the soluble nitrogen of the commercial ripened cheese (24 months). Both fractions concur, in a significant measure at the determination of organoleptic, nutritional and biological properties of cheese.

On the other hand, cheese lipolysis was characterised by a more regular trend: the proportion of free fatty acid on cheese fat increased progressively until 55 months, then it tended to stabilise. A higher degree of lipolysis toward short fatty acids (C4÷C8) than *medium* (C10÷C14), and, particularly, than long chain fatty acids (C16÷C18), was observed during ripening.

Differences observed between the trends of the two enzymatic processes are probably related to the different activity that the respective group of enzymes show in relation to physico-chemical variation of the cheese paste throughout ripening. In this concern, a main role is exert by the salt content of cheese. The activity of proteolytic enzymes, in fact, is negatively affected by the increase the salt concentration of the water.

Our results clearly showed that the cheese fat undergoes important modifications even after 24 months of ripening. This is an “objective” data that allows for a

differentiation of long ripened (>24 months) from commercial ripened (\leq 24 months) cheeses from a chemical point of view.

Introduzione

La maturazione del formaggio è un fenomeno complesso, una concatenazione di eventi chimico-fisici, biochimici e biologici tra loro strettamente connessi. La cagliata, contraddistinta da gusto e aroma tenui, si trasforma più o meno rapidamente, ma in misura profonda, fino ad assumere l'aspetto esteriore tipico del formaggio, la cui pasta acquisisce peculiari e marcate proprietà reologiche, nonché sapore ed aroma tali da caratterizzare definitivamente e in modo riconoscibile il prodotto finale. L'intero processo di trasformazione si configura essenzialmente in una vera e propria "digestione" enzimatica della cagliata. La materia prima è rappresentata sostanzialmente dalla caseina, dal reticolo caseinico, ma il processo coinvolge anche le componenti solubili (zuccheri, acido lattico, acido citrico, *etc.*) e, a seconda dei casi, in misura più o meno importante, anche le sostanze lipidiche. Le modificazioni fisico-chimiche e biochimiche, molto articolate, si evolvono in rapporto alle caratteristiche del substrato ed alla natura dei molteplici agenti responsabili delle trasformazioni, nonché della grande varietà dei prodotti primari e secondari che via via si formano, delle loro interazioni e dei sinergismi. Tali profonde modificazioni sostanzialmente consistono nella perdita di umidità, nella fermentazione del lattosio, nella parziale metabolizzazione dell'acido lattico e dell'acido citrico, nella solubilizzazione più o meno intensa della caseina con degradazione più o meno spiccata dei prodotti intermedi, nella idrolisi parziale del grasso e nella formazione della crosta. Gli agenti principali delle trasformazioni (glicolisi, proteolisi, lipolisi) sono rappresentati dagli enzimi naturali del latte, dai batteri e relativi enzimi dello starter, dagli enzimi del caglio e sostituitivi, dagli enzimi della microflora inquinante e dagli enzimi di starter secondari eventualmente impiegati nelle specifiche produzioni casearie. Il determinismo delle biotrasformazioni è sotto l'influenza di numerose condizioni chimico-fisiche del mezzo e dell'ambiente, vale a dire di tutti quei fattori che di volta in volta sono in grado di influire sullo sviluppo dei microrganismi (batteri, lieviti, funghi), sulla loro capacità di produrre enzimi e sulla efficienza delle attività enzimatiche: pH, attività dell'acqua, potenziale di ossidoriduzione, composizione della fase solubile (sale), temperatura ambiente, *etc.* La struttura fisico-chimica della cagliata, della massa caseosa fresca, svolge un ruolo specifico di primaria importanza con riferimento a stato e grado di dispersione dell'acqua legata, proprietà del reticolo caseinico e delle micelle di paracaseina, stato fisico del grasso, dimensioni dei globuli e grado di integrità della membrana, *etc.*

La "maturazione" del Parmigiano-Reggiano, che deve durare un periodo minimo di almeno 12 mesi, ma che normalmente si protrae fino a 24 mesi, rappresenta l'elemento basilare che caratterizza questa DOP conferendole peculiari qualità di pregio. È nel corso di questa lunga maturazione, infatti, che il formaggio sviluppa gli aromi e i sapori tipici che lo contraddistinguono. Ciò in virtù dell'azione specifica delle attività enzimatiche presenti nel formaggio, la cui origine è legata anche alle peculiarità distintive della tecnologia di trasformazione, che prevede l'impiego di

latte crudo, l'aggiunta di sieroinnesto naturale e di caglio di vitello. L'intensità e la specificità dell'azione enzimatica appare fortemente condizionata dalla tecnologia di lavorazione. L'elevata temperatura di cottura e la grossa dimensione della forma, infatti, sono tali da determinare un gradiente di temperatura, decrescente dall'interno verso l'esterno della massa caseosa, gradiente che permane per circa 24 ore dopo l'estrazione della stessa dalla caldaia. Tale gradiente influisce sullo sviluppo delle specifiche popolazioni microbiche e delle connesse attività enzimatiche, con importanti ripercussioni sull'evoluzione dei processi glicolitici e proteolitici, nella zona interna ed esterna del formaggio, nel corso della stagionatura. Anche la lenta ma progressiva "diffusione" del sale, dall'esterno verso l'interno della forma, è in grado di condizionare l'attività dei processi enzimatici, in particolare quelli di natura proteolitica. Tra i fattori "esterni", che possono influenzare i processi di maturazione del formaggio, precedenti ricerche hanno messo in evidenza il ruolo significativo esercitato dalla stagione di produzione.

Ad oggi, le principali ricerche riguardanti la caratterizzazione chimico-fisica della maturazione del Parmigiano-Reggiano si sono interessate al prodotto di stagionatura commerciale, vale a dire di circa 24 mesi di età. Scarse sono, invece, le informazioni riguardanti il formaggio a più lunga stagionatura.

In questa nota, la maturazione del Parmigiano-Reggiano sarà descritta attraverso l'esame dell'andamento di alcuni parametri chimico-fisici di base e di indici specifici dei processi proteolitici e lipolitici. I dati illustrati sono stati ricavati dall'analisi di 17 forme di Parmigiano-Reggiano di differente età, a partire dall'estrazione dalla caldaia (0 mesi) fino a 96 mesi (8 anni di maturazione).

Materiali e metodi

La ricerca è stata condotta su 17 forme di Parmigiano-Reggiano prodotte presso 12 caseifici ubicati nelle provincie di Parma, Reggio Emilia, Modena e Mantova.

Le forme sono state prelevate in modo da rispecchiare le principali fasi dell'intero ciclo di stagionatura del formaggio, nonchè differenti periodi stagionali di produzione. Precisamente sono state campionate 4 forme per ciascuna delle seguenti età di stagionatura: 1, 12 e 24 mesi. In aggiunta, sono state prelevate 2 forme di 24-48 ore di età, definite come massa caseosa all'estrazione dalla caldaia (0 mesi), 2 forme di 55 mesi di stagionatura ed una di 96 mesi di età. Per tutti i formaggi, al momento del prelievo, si è verificata la rispondenza dei requisiti strutturali. I campioni sono stati prelevati secondo le metodiche FIL-IDF [1].

Sul formaggio sono state effettuate le seguenti determinazioni: umidità mediante essiccazione in stufa a 102°C [2]; grasso secondo il metodo Gerber modificato da Siegfeld [3]; cloruro di sodio per titolazione con AgNO_3 [4]; azoto totale mediante il metodo Kjeldahl; separazione delle frazioni azotate secondo lo schema di frazionamento proposto da Gripon *et al.* [5]. Si sono così ottenuti i valori dell'azoto solubile a pH 4,6 (NS), dell'azoto solubile in acido tricloroacetico 12% (NTCA) e dell'azoto solubile in acido fosfotungstico (NPTA); azoto ammoniacale secondo Savini [3]. Dalle frazioni azotate ottenute come descritto si sono ricavati i valori relativi ai composti a più alto peso molecolare (N peptoni = NS - NTCA) e ai peptidi a

basso peso molecolare insolubili in acido fosforotungstico (N peptidi = NTCA - NPTA - N-NH₃). Acidi grassi liberi mediante gas cromatografia capillare secondo De Jong e Bandings [6].

I dati raccolti sono stati sottoposti ad ANOVA univariata, considerando come fattore fisso l'età del formaggio (6 livelli: 0, 1, 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura).

Risultati e discussione

Caratteristiche chimico-fisiche

Nella tabella 1 sono mostrate le caratteristiche del Parmigiano-Reggiano a diverse età di stagionatura: 0 (corrispondente alla massa caseosa all'estrazione dalla caldaia), 1, 12, 24, 55 e 96 mesi.

Il contenuto di umidità del formaggio si riduce in maniera statisticamente significativa ($P < 0,05$) dall'estrazione della massa caseosa dalla caldaia (39,30 g/100g) fino a 96 mesi di età (25,10 g/100g). La diminuzione di umidità è risultata particolarmente importante nel corso dei primi 12 mesi di stagionatura, periodo durante il quale è stato osservato un calo di 6,05 g/100g, corrispondente al 43% della variazione complessiva di umidità del formaggio osservata dall'estrazione dalla caldaia ai 96 mesi di età. Nei seguenti 12 mesi il calo di umidità del formaggio è risultato decisamente meno accentuato, pari a 2,19 g/100g (15% della variazione complessiva; $P < 0,05$). Dal formaggio di 24 mesi di età a quello di 55 mesi di età, il valore di umidità ha fatto registrare un ulteriore calo ($P < 0,05$), corrispondente a 4,66 g/100g (33% della variazione complessiva). Le variazioni di umidità tra i formaggi di 55 mesi e quello di 96 mesi sono risultate statisticamente non significative ($P > 0,05$).

In generale, i valori di grasso e di proteina del formaggio hanno evidenziato un tendenziale aumento con l'aumentare dell'età di stagionatura del formaggio, andamento da porre in stretta relazione con la diminuzione del contenuto di umidità. Il contenuto di proteina è risultato variare tra i 29,50 g/100g registrati nella massa caseosa all'estrazione, e i 40,92 g/100g osservati nel formaggio di 96 mesi di stagionatura ($P < 0,05$). Per quanto riguarda il grasso, il tendenziale incremento dei valori con il procedere della stagionatura è stato osservato dalla massa caseosa all'estrazione dalla caldaia (27,45 g/100g) fino ai formaggi di 55 mesi di età (32,47 g/100g); il formaggio di 96 mesi di età (dato relativo ad una sola forma) ha mostrato, invece, un valore di grasso (28,43 g/100g) più basso rispetto a quello rilevato per i formaggi di 55 mesi di età, ma statisticamente non diverso rispetto ai valori osservati nei formaggi di 0-1-12 e 24 mesi di stagionatura (27,45-27,30-28,87 e 30,49 g/100g).

Il contenuto di cloruro di sodio del formaggio viene riportato sia sul tal quale (in rapporto a 100g di formaggio), che in relazione a 100 parti di acqua del formaggio; quest'ultimo valore fornisce un'indicazione circa la salinità della fase acquosa nella quale si trovano gli enzimi coinvolti nei processi chimici e biochimici, responsabili della maturazione del formaggio. Il contenuto di NaCl riferito a 100 parti di acqua del formaggio aumenta ($P < 0,05$) in maniera repentina nel passaggio dalla massa caseosa all'estrazione dalla caldaia (0,10 g/100g) al formaggio di un mese di età (2,64 g/100g), cioè poco dopo l'uscita dalla salamoia. All'aumentare dell'età del formaggio si osserva un incremento della concentrazione del sale nella fase acquosa,

fino a raggiungere valori di 4,11-4,80-6,26 e 7,84 g/100g di acqua del formaggio, rispettivamente, a 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura. L'andamento osservato è legato alla perdita di umidità che il formaggio subisce nel corso della stagionatura.

Il valore pH del formaggio è variato significativamente con l'età del formaggio ($P < 0,05$). In particolare, è stato osservato un incremento del pH dal mese 1 (5,32) al mese 12 (5,36) di età di stagionatura del formaggio ($P < 0,05$). Tra il formaggio di 12 e quello 24 mesi di età, invece, non sono state osservate differenze statisticamente significative. Dopo i 55 mesi di stagionatura, il valore pH del formaggio (5,22) è risultato più basso ($P < 0,05$) di quello osservato nel formaggio di 24 mesi di età. Il formaggio di 96 mesi ha evidenziato un valore pH (5,34) significativamente più elevato ($P < 0,05$) rispetto a quello del formaggio di 55 mesi. L'incremento dei valori pH, nei primi mesi di stagionatura, è stato rilevato in alcuni studi condotti su formaggi a pasta dura e semi-dura, quali Cheddar, Gouda e Gruyère, di età compresa tra 5 e 6 mesi [7, 8]. Secondo McSweeney e Fox [9], nel corso della stagionatura, il pH tende ad aumentare per la formazione di composti azotati a carattere alcalino (e.g. ammoniaca) e/o per il catabolismo dell'acido lattico. Nella ricerca di Zapparoli e Dugoni [10], condotta su 60 forme di Parmigiano-Reggiano e 40 forme di Grana Padano di diversa età, i valori di pH, osservati nelle forme di età superiore a 9 mesi, tendono a diminuire con l'avanzamento della stagionatura. Nella presente ricerca, invece, il "calo" dei valori pH è stato osservato a partire dal 24° mese. Secondo le osservazioni di Zapparoli e Dugoni [10] il decremento di pH, rilevato a partire dal 10° mese, sarebbe verosimilmente legato all'aumento più che proporzionale degli acidi grassi liberi. In effetti, come sarà detto qui di seguito, la proteolisi, in generale, e la produzione di ammoniaca, in particolare, sembrano arrestarsi dopo il 24° mese di stagionatura; mentre la liberazione degli acidi grassi prosegue in maniera "costante" fino al 55° mese di stagionatura.

Proteolisi

La proteolisi rappresenta un fenomeno di basilare importanza, in grado di caratterizzare l'intero processo di maturazione del formaggio [11-14]. Il complesso biochimismo proteolitico, che a partire dalla cagliata interessa e modifica profondamente il reticolo caseinico, è governato da un sistema enzimatico (endoproteasi e esopeptidasi) costituito da entità in parte native o endogene (plasmina - proteasi alcalina) e in parte esogene (chimosina - proteasi acida), nonché da proteasi di origine batterica, sia esogene (da batteri lattici termofili - sieroinnesto), sia endogene (mesofili inquinanti), *etc.* che, in definitiva, coinvolge tutti gli enzimi specifici del latte e del caglio, nonché quelli della microflora naturale del sieroinnesto e della microflora inquinante del latte.

L'evolversi della proteolisi, legata a fenomeni di natura essenzialmente enzimatica, dipende in misura variabile e dinamica, da tutti quei fattori, propri del mezzo ed ambientali, che, presi singolarmente o tra loro interagenti, sono in grado di influenzare le specifiche attività biochimico-enzimatiche che via via si innescano nel corso dell'intero processo di maturazione del formaggio: umidità della pasta (attività dell'acqua), pH, contenuto di sale, acidi grassi insaturi liberi, temperatura, *etc.*

La degradazione della proteina non procede necessariamente in modo regolare dalle unità ad elevato peso molecolare alle sostanze di piccolo o piccolissimo peso molecolare. La prima tappa è rappresentata dalla degradazione delle singole caseine ad opera delle endopeptidasi (peptide-peptido-idrolasi o proteinasi) con formazione di unità più piccole (“peptidi” ad elevato peso molecolare), ma pur sempre insolubili a pH 4,6 al pari della caseina integra [15]. Su questi prodotti (albumose e proteosi) intervengono le esopeptidasi che determinano la formazione di peptidi a medio e basso peso molecolare (peptoni e peptidi p.d.), tutte entità solubili a pH 4,6 ivi compresi gli amminoacidi terminali che si liberano con il procedere delle attività (carbossi-peptidasi e ammino-peptidasi) proteolitiche [16].

a) *Coefficiente di maturazione* - Nella tabella 2 vengono mostrati i valori del coefficiente di maturazione del formaggio Parmigiano-Reggiano di differente età: 0, 1, 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura. Tale indice è ricavato dal rapporto percentuale tra l’azoto solubile a pH 4,6 e l’azoto totale del formaggio. Si tratta di un parametro descrittivo della proporzione di caseina che viene progressivamente solubilizzata ad opera degli enzimi proteolitici.

Nel formaggio all’estrazione dalla caldaia risulta solubilizzata il 5% circa della caseina. Il grado di solubilizzazione della caseina aumenta ($P < 0,05$) in maniera progressiva con l’età. I valori dell’indice di maturazione osservati nei formaggi di 1-12-24-55 e 96 mesi sono risultati pari, rispettivamente, a 9,16-26,47-33,22-33,55 e 35,90%. La solubilizzazione della caseina è risultata particolarmente importante nel corso del primo periodo di stagionatura, vale a dire dall’estrazione della massa caseosa, al formaggio di 12 mesi (+21,37 unità percentuali; $P < 0,05$). Successivamente, dai 12 ai 24 mesi di stagionatura, il grado di solubilizzazione della caseina è risultato meno intenso (+6,75 unità percentuali; $P < 0,05$). Dopo due anni di stagionatura, le variazioni dell’indice di maturazione sono risultate statisticamente non significative.

Il Parmigiano-Reggiano, a paragone di altri formaggi, quali Emmental, Gruyère, Sbrinz, etc., - caratterizzati da tempi di stagionatura dell’ordine di alcuni mesi massimo 1 anno - manifesta una intensa solubilizzazione della caseina, comparabile a quella dell’Emmental, inferiore soltanto a quella di un non meglio precisato Asiago, a pasta semicotta al pari del formaggio Fontina [17, 18].

b) *Composizione azoto solubile a pH 4,6* - Nella tabella 2 viene riportata la composizione dell’azoto solubile a pH 4,6 del formaggio Parmigiano-Reggiano a diverse età: 0, 1, 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura.

La proporzione dei peptoni, substrato primario dell’azione proteolitica nell’ambito delle frazioni dell’azoto solubile, diminuisce in maniera drastica nel corso dei primi 12 mesi di stagionatura, passando dal 51,05%, in corrispondenza dell’estrazione dalla caldaia, al 9,33% circa nel formaggio di 12 mesi di età ($P < 0,05$). Non sono state osservate variazioni statisticamente significative della percentuale di peptoni tra i formaggi di 24, 55 e 96 mesi di stagionatura.

Per contro, la proporzione di azoto solubile in acido fosforotungstico (azoto PTA) - frazione che rappresenta il contenuto di amminoacidi liberi - aumenta in maniera repentina nel primo mese, passando dal 24,74% all’estrazione dalla caldaia, fino al 47,65% nel formaggio di 1 mese. Un ulteriore incremento ($P < 0,05$) della percentuale di azoto PTA è stato registrato tra il formaggio di 1 mese e quelli di 12 mesi

di stagionatura (+21,39 unità percentuali). Le differenze della percentuale di azoto PTA tra i formaggi di 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura sono risultate statisticamente non significative. Tale andamento è dovuto al fatto che gli amminoacidi liberi rappresentano il prodotto “finale” del processo proteolitico e, di conseguenza, tendono ad accumularsi nel corso della maturazione del formaggio.

La proporzione dei peptidi resta pressoché invariata per un lungo periodo e a 24 mesi di stagionatura si attesta su un valore pari al 17%. In effetti, i peptidi rappresentano un prodotto intermedio del processo di proteolisi, che si origina dalla degradazione dei peptoni e che, a sua volta, viene sottoposto ad ulteriore idrolisi per dare origine a piccoli peptidi e ad amminoacidi liberi.

Amminoacidi e peptidi, fattori che concorrono in misura importante alla determinazione delle proprietà organolettiche, nutrizionali e biologico-funzionali del formaggio, rappresentano oltre i 4/5 di tutto l'azoto solubile del prodotto a stagionatura commerciale (24 mesi).

La proporzione di azoto ammoniacale aumenta in maniera progressiva da 0 a 12 mesi, passando dal 2,54% al 6,72%, rispettivamente, nei formaggi di 0 e 12 mesi. Le variazioni della percentuale di azoto ammoniacale tra i formaggi di 12-24-55 e 96 mesi (6,72-8,30-8,07 e 8,94%) sono risultate statisticamente non significative.

In conclusione, il ciclo di maturazione del Parmigiano-Reggiano tende a caratterizzarsi per una rilevante solubilizzazione della caseina, con profonde modificazioni reologiche della pasta, fenomeni che concorrono in misura importante alla definizione delle peculiari caratteristiche organolettiche del formaggio stagionato. La proteolisi della caseina, principalmente ad opera degli enzimi naturali [16], risulta particolarmente intensa nel corso dei primi 12 mesi di stagionatura, mentre si attenua sensibilmente durante le fasi intermedie e soprattutto in quelle finali del ciclo di maturazione. Altrettanto precoce ed intensa risulta la degradazione proteolitica dei prodotti intermedi e la liberazione degli amminoacidi, con il concorso determinante delle proteasi batteriche [19], con “accumulo” rilevante di amminoacidi e di peptidi a basso peso molecolare che, insieme, già dopo il 1° mese rappresentano oltre la metà dell'azoto solubile totale. In ogni caso, la composizione della frazione solubile, dopo una profonda evoluzione iniziale, tende a stabilizzarsi, almeno a partire dal 12° mese, configurando una sorta di equilibrio tra peptoni, peptidi e amminoacidi liberi, mentre l'azoto ammoniacale, essendo l'anello terminale del catabolismo azotato, tende progressivamente ad aumentare, in misura moderata, fino alla fine del ciclo di stagionatura.

Lipolisi

L'idrolisi del grasso non determina importanti modificazioni a livello di tessitura e di proprietà reologiche del formaggio, ma gioca un ruolo di un certo rilievo nella formazione dell'aroma. Il fenomeno è molto più marcato nei formaggi a pasta blu (erborinati) e in quelli a pasta molle, mentre si ritiene sia di moderata entità nei formaggi a pasta dura [15]. Gli agenti della lipolisi sono rappresentati essenzialmente dalle lipasi (glicerol-estere-idrolasi). In aggiunta a quella naturale del latte (poco attiva a valori di pH inferiori a 6,5), nel formaggio sono molto attive le lipasi prodotte da

diversi microrganismi, principalmente quelle provenienti da muffe e da micrococchi [15]. La lipasi naturale del latte è soggetta a denaturazione anche per effetto di blandi trattamenti termici (sopra i 60°C); mentre gran parte delle lipasi di origine microbica sono piuttosto resistenti al calore, ancora attive nel latte pastorizzato a 76°C [15]. L'azione lipolitica - selettiva o meno a seconda della precipua attività enzimatica e della tipologia del formaggio [20] - può variare di intensità anche in rapporto a diversi fattori, quali concentrazione dell'enzima, pH, temperatura, attività dell'acqua, contenuto di sale, *etc.* In linea di massima, però, il sale non dovrebbe inibire la lipolisi in maniera significativa, al contrario di quanto si verifica per la proteolisi. Più in generale, la lipolisi risulta influenzata dalla durata di maturazione del formaggio, dalle modalità di conservazione e da tutte le operazioni che interferiscono con i processi di maturazione [21]. Nel corso della maturazione del Parmigiano-Reggiano gli enzimi lipolitici, soprattutto le lipasi di origine batterica [22], liberano quantità più o meno importanti di acidi grassi, dalla cui degradazione ossidativa si possono formare composti carbonilici a basso peso molecolare dotati anche di una certa valenza aromatica [23], specie se provenienti da acidi grassi insaturi. Nei formaggi a medio e a lungo periodo di stagionatura, il grasso, oltre che partecipare alla definizione delle proprietà reologiche della pasta, attraverso i prodotti diretti e derivati della lipolisi concorre anche alla formazione delle caratteristiche organolettiche, sicuramente dell'aroma; mentre minore o quanto meno non ben definita risulterebbe la sua partecipazione alla formazione del sapore. Tuttavia, in alcuni formaggi, quali Gouda, Gruyère de Comté ed Emmental, gli acidi grassi liberi sembrano in grado di svolgere un certo ruolo anche nella definizione del sapore.

a) *Acidi grassi liberi (AGL)* - L'andamento della lipolisi nel formaggio Parmigiano-Reggiano, vale a dire il processo di idrolisi dei trigliceridi che determina la liberazione degli acidi grassi, è stato valutato attraverso i valori del rapporto percentuale tra il contenuto totale degli acidi grassi liberi e il contenuto di grasso del formaggio (indice di lipolisi). Nella tabella 3 sono riportati i valori dell'indice di lipolisi del formaggio Parmigiano-Reggiano di differente età: 0, 1, 12, 24, 55 e 96 mesi di stagionatura. I dati evidenziano chiaramente che nel corso dei primi due anni di età gli acidi grassi liberi rappresentano una quota percentuale via via maggiore, registrando valori di 0,75-2,35 e 4,15%, rispettivamente, nei formaggi di 1-12 e 24 mesi di età. Nei mesi successivi il processo di lipolisi prosegue in maniera continua fino a 55 mesi di stagionatura, età in corrispondenza della quale il contenuto totale di acidi grassi liberi rappresenta il 7,84% del grasso; valore, questo ultimo, significativamente più elevato rispetto a quello osservato nel formaggio di 24 mesi, pari a 4,15%. Il valore della lipolisi osservato a 96 mesi, pari a 8,80% è risultato non differente, rispetto a quello di 55 mesi. Gli andamenti e i valori sono in accordo con quanto visto in precedenti ricerche [24].

b) *Composizione acidi grassi liberi* - Nella tabella 3 è riportata la composizione degli acidi grassi liberi del formaggio Parmigiano-Reggiano di 0-1-12-24-55 e 96 mesi di stagionatura. I singoli acidi grassi liberi sono stati raggruppati in base al numero di atomi di carbonio: acidi grassi a catena corta, frazioni da C4 a C8; acidi grassi a media catena, frazioni da C10 a C14; acidi grassi a lunga catena, da C16 a C18. Con il progredire della stagionatura è stato osservato un incremento significa-

tivo ($P < 0,05$) della percentuale degli acidi grassi liberi a catena corta, registrando valori di 1,58-5,12-6,01-10,84 e 14,83, rispettivamente, nei formaggi di 1-12-24-55 e 96 mesi di stagionatura. Anche la proporzione degli acidi grassi liberi a media catena è aumentata nel corso della stagionatura del formaggio ($P < 0,05$). I valori osservati nei formaggi di 1-12-24-55 e 96 mesi sono risultati pari, rispettivamente, a 10,17-13,29-13,67-18,22 e 23,72%.

Conclusioni

Nel corso della stagionatura del formaggio Parmigiano-Reggiano, gli andamenti della proteolisi e quelli della lipolisi, hanno mostrato peculiarità distintive.

La proteolisi risulta significativa nel corso dei primi 24 mesi di maturazione e, in modo particolare, nei primi 6 mesi. Dopo due anni di stagionatura, il grado di solubilizzazione della caseina si arresta e, di conseguenza, la percentuale di azoto solubile a pH 4,6 tende a mantenersi costante. Sotto il profilo qualitativo, la frazione solubile dell'azoto del Parmigiano-Reggiano, amminoacidi e peptidi, fattori che concorrono in misura importante alla determinazione delle proprietà organolettiche, nutrizionali e biologico-funzionali del formaggio, rappresenta oltre i 4/5 di tutto l'azoto solubile del prodotto stagionato.

Il processo di lipolisi mostra, invece, un andamento più regolare: la percentuale di acidi grassi che si liberano (AGL/grasso) aumenta in maniera continua fino a 55 mesi; successivamente questo valore tende a stabilizzarsi. Nel corso della maturazione si è potuto evidenziare un maggior grado di lipolisi a carico degli acidi grassi a catena corta (C4÷C8), intermedio per quelli a media catena (C10÷C14) e minore per gli acidi grassi a lunga catena (C16÷C18).

Le differenze osservate circa gli andamenti dei due processi enzimatici sono, molto probabilmente, da mettere in relazione con la diversa attività che i rispettivi gruppi enzimatici mostrano in rapporto alle condizioni chimico-fisiche che si vengono ad instaurare nella pasta nel corso della maturazione del formaggio. Sotto questo profilo, un ruolo rilevante viene esercitato dal contenuto di sale del formaggio; l'attività degli enzimi proteolitici, infatti, si riduce in maniera sensibile all'aumentare della concentrazione salina dell'ambiente acquoso nel quale essi si trovano ad operare. Appare evidente, da quanto qui osservato, come il grasso del formaggio subisca importanti modificazioni oltre i 24 mesi di stagionatura. Ciò fornisce uno dato "oggettivo" che permette di differenziare, almeno sotto il profilo chimico, i formaggi "vecchi" e "stravecchi" rispetto a quelli a stagionatura commerciale.

References

1. Emmons D.B. (1999) Sampling and analysis. Practical Guide for control of cheese yield, s.i. 0001, 74-86. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
2. Norma internazionale FIL-IDF 4/A:1982 Fromages e fromages fondus - Détermination de l'extrait sec totale.
3. Savini E. (1946) Analisi del latte e dei latticini. Ed. Hoepli, Milano.

4. Norma internazionale FIL-IDF 88/A:1988 Fromages e fromages fondus - Détermination de la teneur en chlorures (méthode par titrage potentiométrique).
5. Gripon J.C., Desmazeaud M.J., Le Bars D., Bergère J.L. (1975) Étude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Lait*, 55: 502-516.
6. De Jong C, Bandings HT (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese: procedure for extraction, clean up and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Resolution Chromatography*, 13, 94-98.
7. Zerfiridis G.K., Vafopoulou-Mastrogiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E. (1994) Ripening changes of Gruyère cheese. *J Dairy Sci*, 67: 1397-1405.
8. Lawrence R.C., Creamer L.K., Gilles J. (1987) Texture development during cheese ripening. *J Dairy Sci*, 70: 1748-1760.
9. McSweeney P.L.H., Fox P.F. (1993) Cheese: methods of chemical analysis. In: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, Ed. Fox P.F., second edition, Vol 2, 341-388. Chapman & Hall, London, UK.
10. Zapparoli G.A., Dugoni F. (1997) Quadro analitico di acidi grassi totali, pH ed umidità in formaggio Grana "scelto" da 1 a 20 mesi di stagionatura. *Sci Tecn Latt-Cas*, 48: 297-304.
11. Desmazeaud J.M., Gripon J.C. (1977) General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 32: 731-734.
12. Péliissier J.-P. (1984) Protéolyse des caséines. *Sciences des aliments*, 4: 1-35.
13. Grappin R., Rank T.C., Olson N.F. (1985) Primary proteolysis of cheese proteins during ripening: a review. *J Dairy Sci*, 68: 531-540.
14. Fox P.F. (1989) Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J Dairy Sci*, 72: 1379-1400.
15. Alais C. (1984) *Scienza del latte*. Ed. Tecniche Nuove, Milano, Italy.
16. Addeo F., Moio L., Stingo C. (1988) Caratteri tipici della proteolisi nel formaggio Parmigiano-Reggiano: composizione della frazione caseinica. *Proceedings: Giornata studio composizione e caratteristiche del Parmigiano-Reggiano*, pp. 21-40. Ed. Consorzio Form. Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia, Italy.
17. Panari G., Mongardi M., Nanni M. (1988) Determinazione con metodi chimici delle frazioni azotate del Parmigiano-Reggiano. *Proceedings: Giornata studio composizione e caratteristiche Parmigiano-Reggiano*, pp. 85-95. Ed. Consorzio Form. Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia, Italy.
18. Bütikofer U., Rüegg M., Ardö Y. (1993) Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 26: 271-275.
19. Bottazzi V. (1993) I batteri lattici nella maturazione del formaggio Grana. *L'Industria del Latte*, 29(2): 73-88.
20. Benassi R. (1964) Sui processi lipolitici del formaggio. *Il Latte*, 38: 335-338.
21. Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int Dairy*

- Journal, 13: 841-866.
22. Caboni M.F., Zannoni M., Lercker G. (1988) Lipolisi del grasso del Parmigiano-Reggiano. Proceedings: Giornata studio composizione e caratteristiche Parmigiano-Reggiano, pp. 113-121. Ed. Consorzio Form. Parmigiano-Reggiano, Reggio Emilia, Italy.
 23. Caserio G., Senesi E., Bianchi A., Renon P., Beretta G. (1972) Rapporti fra temperatura ed attività lipolitica di alcuni ceppi microbici isolati da formaggio Grana Padano. *L'Industria del Latte*, 8: 89-104.
 24. Sandri S., Fossa E., Pecorari M., Summer A., Mariani P. (1997) Osservazioni sull'andamento della lipolisi nel corso della maturazione del Parmigiano-Reggiano. *Sci Tecn Latt-Cas*, 48: 243-252.