



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MORFOLOGICHE**

XXIII ciclo

**UTILIZZO DELLA TECNICA DI ULTRAFILTRAZIONE PER  
LA PRODUZIONE DI PRODOTTI CASEARI FRESCHI *LOW-  
FAT* E A VALENZA FUNZIONALE**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/09

Presentata da:	Dr. Enrico Salvatore
Coordinatore Dottorato:	Prof.ssa Valeria Sogos
Relatore:	Dr. Antonio Pirisi

Esame finale anno accademico 2009 – 2010

Desidero ringraziare il Dr. Antonio Pirisi per avermi dato la possibilità di svolgere il Dottorato di Ricerca presso l'Agencia Agris Sardegna, e per i suoi preziosi consigli durante il periodo dell'attività di ricerca.

Un ringraziamento particolare va ai miei colleghi del Settore di Tecnologia: Massimo Pes, Stefano Furesi e Luigi Tidore, con i quali ho lavorato fianco a fianco condividendo lo svolgimento di buona parte di questo lavoro.

Sono particolarmente grato alla Prof. Milena Corredig per avermi dato l'opportunità di fare una preziosa esperienza formativa e di arricchimento personale presso il Dipartimento di Food Science dell'Università di Guelph, e a tutti gli amici del laboratorio 129, che hanno contribuito a rendere più caldo il gelido inverno canadese.

Un caloroso grazie al Prof. Vittorio Mazzarello per il prezioso contributo prestato nelle analisi al microscopio elettronico a scansione.

Un sincero grazie a Riccardo Di Salvo per il supporto offerto nell'esecuzione dei test di analisi sensoriale.

Un sentito grazie a tutti i colleghi del Laboratorio di Chimica dell'Agencia Sardegna per avere creato un ambiente piacevole durante lo svolgimento delle analisi chimiche oggetto del presente lavoro.

Un doveroso grazie al prezioso contributo dato dalla Porto Conte Ricerche s.r.l. nell'esecuzione delle analisi di proteomica dell'ultima parte sperimentale della tesi.

Desidero esprimere un grazie di cuore anche ai miei genitori, mia zia e mia sorella che, hanno sempre mostrato per quello che faccio una fiducia cieca e priva di incertezze, spronandomi sempre ad andare avanti per la mia strada.

Ma soprattutto un profondo grazie va a Maria Antonietta che ha condiviso con infinita pazienza e non senza sacrifici i tre anni di questo Dottorato di Ricerca.

# INDICE GENERALE

<b>PREFAZIONE .....</b>	<b>7</b>
<b>OBIETTIVI GENERALI.....</b>	<b>8</b>
<b>1. IL LATTE.....</b>	<b>9</b>
1.1 DEFINIZIONE E STRUTTURA DEL LATTE .....	10
1.2 COMPOSIZIONE DEL LATTE DI DIVERSE SPECIE.....	11
1.3 I GLUCIDI (LATTOSIO).....	14
1.4 LE PROTEINE .....	15
1.4.1 <i>Le caseine</i> .....	15
1.4.2 <i>Le micelle caseiniche</i> .....	17
1.4.3 <i>Le proteine del siero</i> .....	18
1.4.4 <i>Le sostanze azotate non proteiche (NPN)</i> .....	20
1.5 LA FRAZIONE LIPIDICA.....	20
1.6 I SALI MINERALI E GLI OLIGOELEMENTI .....	22
1.7 GLI ENZIMI .....	24
1.8 LE VITAMINE.....	25
<b>2. I PRODOTTI CASEARI.....</b>	<b>27</b>
2.1 IL FORMAGGIO.....	27
2.1.1 <i>I Formaggi freschi</i> .....	29
2.2 LA FERMENTAZIONE LATTICA E IL METABOLISMO DELL'ACIDO CITRICO .....	31
2.3 I PRINCIPI DELLA COAGULAZIONE ACIDA.....	34
2.4 I PRINCIPI DELLA COAGULAZIONE PRESAMICA.....	36
2.5 COAGULAZIONE MISTA ACIDO-PRESAMICA.....	38
2.6 LA RICOTTA FRESCA .....	38
2.6.1 <i>Scelta e preparazione della materia prima</i> .....	39
2.6.2 <i>Denaturazione termica e aggregazione delle proteine denaturate</i> .....	39
2.6.3 <i>Separazione della ricotta dalla scotta</i> .....	42
2.6.4 <i>Confezionamento a caldo</i> .....	42
2.6.5 <i>Resa e composizione fisico-chimica della ricotta ovina</i> .....	43

<b>3. LE TECNOLOGIE DI FILTRAZIONE A MEMBRANA .....</b>	<b>45</b>
3.1 DEFINIZIONE DEI PROCESSI DI SEPARAZIONE A MEMBRANA .....	45
3.2 TECNICHE SPECIFICHE DI FILTRAZIONE TANGENZIALE .....	49
3.3 PRINCIPALI APPLICAZIONI DEI PROCESSI A MEMBRANA NELL'INDUSTRIA CASEARIA.....	50
3.3.1 Ultrafiltrazione della cagliata.....	51
3.3.2 Filtrazione su membrana del latte .....	52
3.3.3 Ultrafiltrazione del siero.....	56
<b>4. I PRODOTTI FUNZIONALI .....</b>	<b>58</b>
4.1 CHE COSA SI INTENDE PER PRODOTTI FUNZIONALI? .....	58
4.2 IL MERCATO DEI PRODOTTI FUNZIONALI .....	60
4.3 I "PRODOTTI LATTIERO-CASEARI FUNZIONALI" .....	62
4.3.1 Il latte come "alimento funzionale" .....	63
4.3.2 L'aggiunta di ingredienti funzionali al latte: l'esempio dell'inulina e dell'oligofruttosio.....	65
<b>PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>69</b>
<b>5. PROPRIETA' DELLE MICELLE CASEINICHE NEL CORSO DELLA COAGULAZIONE MISTA ACIDO-PRESAMICA: EFFETTO DELLA CONCENTRAZIONE DEL LATTE TRAMITE ULTRAFILTRAZIONE .....</b>	<b>70</b>
5.1 INTRODUZIONE .....	70
5.2 MATERIALI E METODI.....	73
5.2.1 Preparazione dei campioni .....	73
5.2.2 Formazione dei gels.....	73
5.2.3 Contenuto proteico e misurazione del pH .....	74
5.2.4 Proprietà reologiche del latte nel corso della coagulazione mista .....	74
5.2.5 Esperimenti di Diffusing wave spectroscopy (DWS) .....	75
5.2.6 Misurazione della concentrazione di calcio nei campioni .....	76
5.2.7 Rilascio del caseinomacropetide (CMP) dalle micelle di caseina .....	77
5.2.8 Microscopia confocale a scansione laser (CLSM).....	78
5.2.9 Analisi statistica .....	79
5.3 RISULTATI .....	79

5.3.1 Effetto della concentrazione del latte sugli stadi iniziali della coagulazione: esperimenti di <i>diffusing wave spectroscopy</i> (DWS) e rilascio di CMP.....	80
5.3.2 Effetto della concentrazione del latte sulle proprietà di coagulazione del latte durante la fermentazione: proprietà reologiche, rilascio del calcio dalle micelle, e microstruttura dei gel.....	85
5.4 DISCUSSIONE .....	91
5.4.1 L'effetto dell'attività del caglio sugli stadi iniziali della fermentazione nei campioni di latte controllo e nel latte ultrafiltrato.....	91
5.4.2 Effetto dell'acidificazione sulla formazione del coagulo per il latte non concentrato e i retentati da UF.....	93
5.5 CONCLUSIONI .....	96

## **6. EFFETTI DELL'UTILIZZO DI INULINA COME FAT-REPLACER NELLA PRODUZIONE DI UN FORMAGGIO FRESCO OTTENUTO DA LATTE DI CAPRA CONCENTRATO TRAMITE ULTRAFILTRAZIONE ..... 98**

6.1 INTRODUZIONE .....	98
6.2 MATERIALI E METODI.....	99
6.2.1 Livelli sperimentali.....	99
6.2.2 Preparazione delle componenti del latte .....	99
6.2.3 Preparazione delle miscele.....	102
6.2.4 Preparazione del formaggio .....	102
6.2.5 Determinazioni fisico-chimiche.....	103
6.2.6 Analisi colorimetriche.....	104
6.2.7 Test di penetrometria.....	104
6.2.8 Determinazione della microstruttura .....	105
6.2.9 Analisi sensoriale .....	105
6.2.9.1 Pairwise ranking test.....	105
6.2.9.2 Simple ranking test.....	106
6.2.10 Analisi statistica.....	106
6.3 RISULTATI E DISCUSSIONE .....	107
6.3.1 Composizione chimica dei formaggi .....	107
6.3.2 Misure colorimetriche.....	109
6.3.3 Test di penetrometria.....	111
6.3.4 Microstruttura .....	113
6.3.5 Analisi sensoriale .....	116
6.3.5.1 Pairwise ranking test per l'attributo "cremoso" .....	116
6.3.5.2 Simple ranking test per l'attributo "goaty" .....	118
6.4 CONCLUSIONI .....	120

<b>7. PRODUZIONE DI RICOTTA OVINA A RIDOTTO CONTENUTO DI GRASSO A PARTIRE DA SIERO CONCENTRATO PER ULTRAFILTRAZIONE .....</b>	<b>121</b>
7.1 INTRODUZIONE .....	121
7.2 MATERIALI E METODI.....	122
7.2.1 <i>Livelli sperimentali</i> .....	122
7.2.2 <i>Preparazione delle componenti delle miscele</i> .....	122
7.2.3 <i>Preparazione delle miscele</i> .....	124
7.2.4 <i>Produzione della ricotta</i> .....	124
7.2.5 <i>Analisi fisico-chimiche di macrocomposizione</i> .....	125
7.2.6 <i>Calcolo delle rese e dei recuperi materia</i> .....	126
7.2.7 <i>SDS-PAGE e quantificazione delle proteine</i> .....	127
7.2.8 <i>Idrolisi in situ delle bande proteiche e identificazione tramite LC-MS/MS</i> .....	127
7.2.9 <i>Analisi Statistica</i> .....	128
7.3 RISULTATI E DISCUSSIONE .....	128
7.3.1 <i>Composizione chimica delle miscele e delle ricotte</i> .....	128
7.3.2 <i>Rese e recuperi materia</i> .....	134
7.4 CONCLUSIONI .....	137
<b>CONCLUSIONI GENERALI.....</b>	<b>138</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>140</b>

## PREFAZIONE

Negli ultimi decenni, la richiesta dei consumatori nel campo della produzione alimentare è cambiata considerevolmente. I consumatori sono sempre più interessati ai potenziali benefici degli alimenti e sempre di più credono che il cibo possa contribuire direttamente alla loro salute.

A tal proposito il ruolo della nutrizione, negli ultimi trent'anni, è progredito passando dai concetti classici, consistenti nella prevenzione di patologie carenziali e nell'adeguatezza dell'alimentazione di base, alla promozione di uno stato di benessere e salute e di riduzione del rischio di malattia, arrivando così al concetto di alimentazione "positiva" od "ottimale". In questo contesto si inseriscono gli "alimenti funzionali" o "nutraceutici", i quali come vedremo nel corso del presente lavoro sono caratterizzati dall'avere differenti definizioni. Essi possono essere prodotti naturali, o prodotti che hanno subito un intervento tecnologico migliorativo, sempre in funzione salutistica.

L'alimento oggetto di questa tesi è il latte, e più in particolare i prodotti caseari cosiddetti freschi, quali formaggi e ricotta. Da più parti il latte viene considerato di per sé un alimento funzionale, per le potenzialità salutistiche degli elementi che lo costituiscono. Tuttavia, al giorno d'oggi, il consumatore è sempre più attratto da prodotti innovativi, i quali possono essere ottenuti, ad esempio, attraverso l'arricchimento del latte con ingredienti funzionali. A tal proposito, sono in aumento le ricerche mirate all'incorporazione nel latte di sostanze con potenziali effetti benefici sulla salute, quali: fitosteroli, prebiotici, probiotici, omega 3, ecc. Spesso l'aggiunta di tali ingredienti al latte è finalizzata alla produzione di derivati come, ad esempio, lo yogurt. Un'altra via che viene perseguita nella fabbricazione di prodotti a carattere salutistico è la riduzione del contenuto di grasso. Negli ultimi 20 anni la commercializzazione di prodotti caseari a ridotto contenuto di grasso ha subito una forte accelerazione in tutto il mondo, seguendo sempre più l'enfasi del controllo dell'*intake* calorico, specialmente nelle popolazioni dei Paesi maggiormente sviluppati.

## OBIETTIVI GENERALI

Nel presente lavoro di tesi, la tecnica di ultrafiltrazione del latte e del siero di latte è stata utilizzata come strumento tecnologico per ottenere prodotti caseari freschi *low-fat* e caratterizzati da potenziali effetti benefici per la salute. La tecnica di ultrafiltrazione applicata al latte o al siero magro permette infatti di incrementare e/o standardizzare il contenuto di proteine di questi prodotti. Il latte o il siero concentrato possono così essere utilizzati in combinazione con altre frazioni del latte (come la crema), e/o con ingredienti funzionali, al fine di ottenere prodotti estremamente interessanti da un punto di vista tecnologico e nutrizionale.

Pertanto nel corso della **prima parte sperimentale** di questa tesi, viene riportato, in maniera dettagliata, l'effetto della concentrazione del latte (vaccino, scremato) tramite ultrafiltrazione sulle proprietà reologiche e chimiche di gels a coagulazione acido-presamica (la modalità di coagulazione del latte tipica dei formaggi freschi), con lo scopo di migliorare la comprensione dei fenomeni che avvengono durante la produzione dei formaggi freschi tipo-*quark*.

Una **seconda parte sperimentale** è dedicata allo studio degli effetti dell'utilizzo di un ingrediente funzionale quale l'inulina (fibra dietetica a carattere prebiotico), utilizzata in sostituzione al grasso, su alcune proprietà reologiche, microstrutturali e sensoriali di formaggi caprini freschi ottenuti a partire da latte concentrato per ultrafiltrazione.

Infine la **terza parte sperimentale** è finalizzata allo studio del comportamento del siero ovino concentrato per ultrafiltrazione, nelle condizioni di produzione tradizionali della ricotta, con particolare riguardo alla valutazione della composizione del prodotto, in particolare proteica, e della sua resa di trasformazione.

# 1. IL LATTE

Il latte è il prodotto fluido derivante dalla secrezione delle ghiandole mammarie delle femmine dei mammiferi. La funzione naturale del latte è quella di essere l'alimento esclusivo dei giovani mammiferi (e quindi anche dell'uomo), durante il periodo critico della loro esistenza, subito dopo la nascita, quando la crescita è rapida e non possono essere utilizzati altri alimenti sostitutivi. Infatti, esso fornisce tutte le sostanze necessarie alla fase di intenso accrescimento del neonato, mediante l'apporto di proteine, lipidi, zuccheri, minerali e vitamine, e costituisce il principale mezzo di trasmissione delle difese immunitarie dalla madre al figlio. Anche per l'uomo adulto, il latte di un animale lattifero è un eccellente alimento, anche se non può coprire interamente i fabbisogni con le quantità normalmente ingerite. Tuttavia occorre notare che un litro di latte intero di vacca apporta circa 650 calorie e copre circa la metà dei fabbisogni energetici del bambino di cinque anni e circa un terzo, nel caso dell'adulto. Per l'uomo, l'importanza alimentare del latte risiede principalmente nelle proteine, nel calcio e nelle vitamine A, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Alais, 2000).

Per poter disporre di questo prezioso alimento in quantità sufficiente, fin dall'antichità si è sviluppata la pastorizia quale prima attività produttiva dell'uomo, e numerose sono state le specie animali individuate come idonee a produrre latte nelle più diverse condizioni ambientali, che hanno anche determinato la scelta dei sistemi di conservazione, implicanti più o meno profonde modifiche dello stato iniziale del latte. Al giorno d'oggi, vacche, bufale, pecore e capre sono gli animali lattiferi la cui produzione rappresenta un rilevante interesse economico, e forniscono la materia prima per una vasta gamma di prodotti alimentari ognuno dei quali con peculiari caratteristiche sensoriali, nutrizionali e di conservabilità (Corradini, 1995).

## 1.1 Definizione e struttura del latte

Dal punto di vista normativo il latte alimentare è definito come “il prodotto ottenuto dalla mungitura regolare, ininterrotta e completa della mammella di animali in buono stato di salute e di nutrizione”. Con la sola parola «latte» deve intendersi il latte proveniente dalla vacca. Il latte di altri animali deve portare la denominazione della specie cui appartiene l'animale che lo fornisce, così per esempio «latte di capra», «latte di asina», ecc.” (R.D. 9/5/1929 n. 994). Il latte è un liquido di complessa composizione, bianco e torbido, dal sapore dolce e con una reazione ionica (pH) vicina alla neutralità (Alais, 2000).

Come riportato da Corradini (1995), il latte è costituito da diversi elementi strutturali che stabiliscono con la fase disperdente (l'acqua) rapporti di emulsione, dispersione o soluzione colloidale e soluzione vera.

Alcuni di questi elementi strutturali possono essere evidenziati osservando il latte a diversi ingrandimenti. Al microscopio ottico si possono notare delle goccioline sferiche che ruotano in un liquido torbido che viene definito plasma. Aumentando l'ingrandimento, avvalendosi del microscopio elettronico, si può vedere come nel plasma siano presenti delle particelle proteiche sferiche (micelle e submicelle caseiniche). Sempre a questo livello di ingrandimento, ma con particolari tecniche, è possibile osservare i globuli di grasso ed in particolare la membrana che esternamente, in superficie, li riveste. Con la rimozione dei globuli di grasso, delle micelle e submicelle caseiniche, nel latte è possibile osservare il siero: un liquido ancora opalescente in quanto contiene disperse altre particelle, sia pure di dimensioni molto piccole; esse sono le proteine globulari e le particelle lipoproteiche. Sempre nel siero, ma in soluzione vera, vi sono gli altri componenti del latte: i glucidi (essenzialmente il lattosio), composti azotati non proteici, sali minerali, vitamine idrosolubili ed altri costituenti presenti in quantità minime: enzimi, lecitine, nucleotidi, gas disciolti; alcuni di essi hanno tuttavia una grande importanza per la loro attività biologica.

In rapporto con l'acqua, i globuli di grasso sono in stato di emulsione, le micelle caseiniche in dispersione pseudocolloidale, le proteine del siero e le particelle lipoproteiche, rispettivamente, in soluzione e dispersione colloidale.

Il colore bianco del latte è conferito soprattutto dalle micelle di caseina, mentre le sfumature giallastre sono da attribuire alla frazione lipidica.

In **Tabella 1.1** sono riportate alcune proprietà dei principali elementi strutturali del latte.

**Tabella 1.1 - Proprietà dei principali elementi strutturali del latte (da Corradini, 1995)**

	<b>latte</b>			
	Globuli di grasso	<b>plasma</b>		
		Micelle caseiniche	<b>siero</b>	
			Proteine globulari	Particelle lipoproteiche
Componenti principali	Grasso	Caseine, acqua, sali	Proteine del siero	Lipidi e proteine
Stato fisico	emulsione	Sospensione pseudocolloidale	Soluzione colloidale	Dispersione colloidale
Diametro delle particelle	0,1-10 $\mu\text{m}$	10-300 nm	3,6 nm	10 nm
Densità a 20°C (g/mL)	0,92	1,11	1,34	1,1
Separabile con	scrematrice	Centrifuga ad alta velocità	Filtrazione su gel	Filtrazione su gel
Flocculazione	Per aggregazione	Con acidi o coagulanti	Col calore	

## 1.2 Composizione del latte di diverse specie

Le differenti specie di mammiferi producono latte che possiede una struttura simile, ma che può presentare degli scarti rilevanti nella composizione centesimale, determinando di conseguenza proprietà a volte molto diverse. Anche nell'ambito della stessa specie la composizione del latte può mostrare variazioni importanti a carico dei suoi costituenti. A seconda della loro origine, i fattori intraspecifici di variazione della composizione del latte possono essere riassunti come segue:

- Cause di origine genetica (razza, individuo);
- Influenza dello stato fisiologico degli animali (età, periodo di lattazione, funzioni sessuali, lavoro, stato di salute);

- Fattori ambientali (condizioni igieniche, stagione, clima, altitudine, costituzione geomorfologica del suolo);
- Influenze dell'alimentazione (quantità e qualità degli alimenti, loro stato fisico, composizione e stato di conservazione);
- Fattori tecnologici (mungitura, trattamenti di conservazione).

Tralasciamo tuttavia la trattazione nel dettaglio di questi aspetti e incentriamo l'attenzione sui dati analitici medi relativi al latte di diverse specie (**Tabella 1.2**). Tutti i tipi di latte contengono caseina (proteina che precipita a pH 4,6) e altre proteine del gruppo delle albumine. Queste ultime, in termini percentuali rispetto alle sostanze azotate totali, sono rappresentate dal valore che residua dalla somma della caseina e delle sostanze azotate non-proteiche. Alcuni tipi di latte contengono molta più caseina che albumina, come quelli dei ruminanti il cui latte per tale motivo è detto "caseinoso". Altri latti sono, al contrario, "albuminosi", soprattutto quelli dei carnivori e dell'uomo; infatti sono ricchi in sieroproteine e molto più poveri in caseina, e ciò implica ovviamente proprietà molto differenti tra loro. Il latte dei ruminanti si distingue non solo per un'elevata proporzione di caseina nel totale azotato, ma anche per un altissimo tenore in acidi organici con basso peso molecolare nel grasso (acidi volatili). Il latte di vacca e di capra sono i più equilibrati dal punto di vista della distribuzione dei tre maggiori componenti; essi contengono circa il 4% di proteine, grasso e lattosio. In linea generale è possibile affermare che i differenti tipi di latte sono tanto più ricchi, soprattutto in sostanze azotate e in sali (materiali plastici) quanto più è rapida la crescita dell'animale subito dopo la nascita. Il tenore in lattosio segue un ordine inverso, ma si comporta in modo parallelo allo sviluppo del cervello (i tessuti nervosi sono ricchi in galattosidi). Ciò spiega la maggiore ricchezza in lattosio nel latte umano, che al contrario è piuttosto povero negli altri elementi nutritivi. La sostanza grassa è soprattutto una fonte energetica; essa si trova in proporzione elevata nel latte dei mammiferi delle regioni fredde e degli oceani per effetto della reazione climatica (Alais, 2000).

**Tabella 1.2 - Composizione centesimale del latte di diverse specie (da Alais, 2000)**

	Composizione g/100 g						
	Estratto secco totale	Materia grassa	Lattosio	Sali	Sostanze azotate		
					Totale	Caseina %	N.P.N.* %
Latte umano	11,7	3,5	6,5	0,2	1,5	28	17
Equini:							
Giumenta	10	1,5	5,9	0,4	2,2	50	-
Asina	10	1,5	6,2	0,54	1,8	45	-
Ruminanti:							
Vacca	12,5	3,5	4,7	0,8	3,5	78	5
Capra	13,6	4,3	4,5	0,8	4	75	7
Pecora	19,1	7,5	4,5	1,1	6	77	5
Bufala	17,8	7,5	4,7	0,8	4,8	80	-
Renna	31,9	17,5	2,5	1,5	10,4	80	-
Suini:							
Scrofa	18,3	6	5,4	0,9	6	50	8
Carnivori:							
Gatto	20	5	5	1	9	33	-
Cane	24,2	10	3	1,2	10	50	-
Roditori:							
Coniglio	29,3	12	1,8	2	13,5	70	-
Cetacei:							
Focena	59,9	46	1,3	0,6	12	55	-
Balena	46,3	35	0,8	0,5	10	-	-

\* N.P.N. Sostanza azotata non-proteica

Pertanto, ogni specie lattifera fornisce un latte con una composizione chimica caratteristica in relazione alle diverse abitudini, condizioni ambientali ed esigenze nutrizionali; queste differenze determinano caratteristiche nutritive, biologiche e tecnologiche tra loro molto differenti. Sono poche tuttavia le specie animali dalle quali si ricava il latte destinato all'alimentazione umana o alla trasformazione (vacca, bufala, pecora e capra). Nel corso di questo capitolo sarà fatta una descrizione di tutte le

componenti del latte, prendendo come riferimento il latte vaccino che nell'ambito lattiero-caseario è indubbiamente quello maggiormente studiato.

### 1.3 I glucidi (lattosio)

Il lattosio è il principale glucide contenuto nel latte dei mammiferi. Gli altri zuccheri come glucosio e galattosio sono contenuti solamente in tracce. E' uno zucchero piuttosto raro in natura se si esclude la "matrice" latte. Il lattosio è poco solubile ed ha un basso potere dolcificante (rispettivamente 10 e 6 volte meno rispetto al saccarosio). Viene sintetizzato essenzialmente a livello della ghiandola mammaria a partire dal glucosio ematico, e in minima parte dagli aminoacidi glucogenetici non essenziali. E' un disaccaride composto da due esosi semplici (il glucosio e il galattosio) legati tra loro da un legame di tipo  $\beta$ -glicosidico. Il lattosio ha una formula bruta  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , ed esiste in due isomeri ( $\alpha$  e  $\beta$ ) oltre che in una forma idrata. Nel latte le tre forme sono in equilibrio tra loro. Il latte a 20°C contiene circa il 62,2% di lattosio  $\beta$  e il 37,8% di lattosio  $\alpha$  (Alais, 2000; Salvadori del Prato, 2001).

Oltre alla grande importanza dal punto di vista nutrizionale, tale zucchero è rilevante dal punto di vista tecnologico per varie ragioni:

- influisce sulla solubilità e la tessitura di alcuni derivati del latte;
- è tra le molecole responsabili delle alterazioni di colore, sapore e aroma che avvengono nel latte in seguito a riscaldamento dello stesso;
- è la sostanza fermentescibile per eccellenza del latte, e pertanto il substrato principale di molte fermentazioni microbiche. La più importante di esse è la fermentazione lattica, che conduce all'acidificazione del latte attraverso la conversione del lattosio in acido lattico.

## 1.4 Le Proteine

Nel latte dei principali ruminanti di interesse caseario (vacca, pecora e capra), le proteine del latte costituiscono circa il 95% delle sostanze azotate totali e possono essere suddivise fondamentalmente in due gruppi:

- le caseine, complesso di proteine fosforilate che costituiscono la componente azotata più caratteristica del latte; infatti non esiste nessuna sostanza simile nel sangue o nei tessuti dei mammiferi. Questa classe di proteine rappresenta circa il 75-80% delle sostanze azotate totali; vengono elaborate esclusivamente a livello della ghiandola mammaria;
- le sieroproteine che costituiscono circa il 17% della frazione azotata del latte e vengono anche denominate *proteine solubili*. Sono caratterizzate da un elevato contenuto in amminoacidi solforati (cistina, cisteina, metionina), di gran lunga superiore rispetto alla caseina; ciò le rende altamente nutritive per l'uomo. Alcune di esse (lattoglobuline e lattoalbumine) sono di sintesi mammaria, mentre altre (albumina del siero di sangue, e le immunoglobuline) sono filtrate direttamente dal sangue.

### 1.4.1 Le caseine

Le caseine sono definite come la frazione proteica che, nel latte, precipita a pH 4,6 alla temperatura di 20°C (Fox, 2003). La denominazione al plurale indica che la caseina non è costituita da una singola proteina, ma bensì da quattro componenti principali (le caseine  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ , e  $\kappa$ ), ciascuna caratterizzata da un peso molecolare di 20-25 kDa. Esse rappresentano, rispettivamente, il 38, 10, 35 e 15 % dell'intera frazione caseinica (Fox, 2003). Sono presenti in tracce altre 2 frazioni caseiniche, la  $\gamma$  e la  $\lambda$  che derivano dalle frazioni precedenti. Le caseine vengono differenziate in base alla loro composizione aminoacidica, al loro grado di fosforilazione e glicosilazione, oltre che al polimorfismo genetico, sulla base del quale esistono diverse varianti di ogni singola componente caseinica.

La struttura primaria è caratterizzata da un'elevata quantità di prolina, che interrompendo le strutture secondarie  $\alpha$ -elica e foglietto- $\beta$ , ostacola la formazione di strutture ordinate nella caseina. Per tale ragione le caseine sono estremamente flessibili e con una conformazione aperta e vengono definite reomorfiche, in quanto possono adattare la loro conformazione ai cambiamenti delle condizioni dell'ambiente circostante (Holt and Sawyer, 1993). Ciò le rende particolarmente suscettibili alla proteolisi e stabili al calore (Fox, 2003). In generale, le caseine presentano scarse quantità di amminoacidi solforati. Tutte contengono metionina nella loro struttura primaria (Swaisgood, 2003). Solamente le caseine  $\alpha_{s2}$  e  $\kappa$  contengono residui di cisteina, e pertanto possono formare legami intermolecolari tramite ponti disolfuro (Fox, 2003). Tutte le caseine sono fosforilate attraverso legami estere tra i gruppi fosfato e i residui dell'amminoacido serina; la quantità di residui fosforilati decresce nel seguente ordine:  $\alpha_{s2} > \alpha_{s1} > \beta > \kappa$ . Le prime tre caseine sono definite calcio-sensibili poiché precipitano ad alte concentrazioni di calcio; al contrario la  $\kappa$ -caseina non è sensibile al calcio, rimanendo solubile in presenza di questo ione a qualsiasi temperatura (Fox, 2003).

La sequenza amminoacidica delle caseine sensibili al calcio ( $\alpha_{s2}$ ,  $\alpha_{s1}$ , e  $\beta$ ) contiene regioni che sono concentrate nei residui di fosfoserina. Tali regioni sono chiamate *centri-fosfato* (de Kruif & Holt, 2003). I *centri-fosfato* permettono la solubilizzazione del calcio entro le micelle come calcio-fosfato colloidale (*colloidal calcium phosphate*, CCP), che permette il collegamento tra le caseine e stabilizza la parte interna della micella caseinica (de Kruif & Holt, 2003). Nella  $\kappa$ -caseina gli amminoacidi fosforati non sono concentrati in un *centro-fosfato*, e pertanto essa è solubile in presenza di calcio. Solamente la  $\kappa$ -caseina è glicosilata. I gruppi glucidici sono legati ai residui di treonina nella regione C-terminale idrofilica che si estende dalla superficie della micella caseinica verso la fase serica del latte (Swaisgood, 2003).

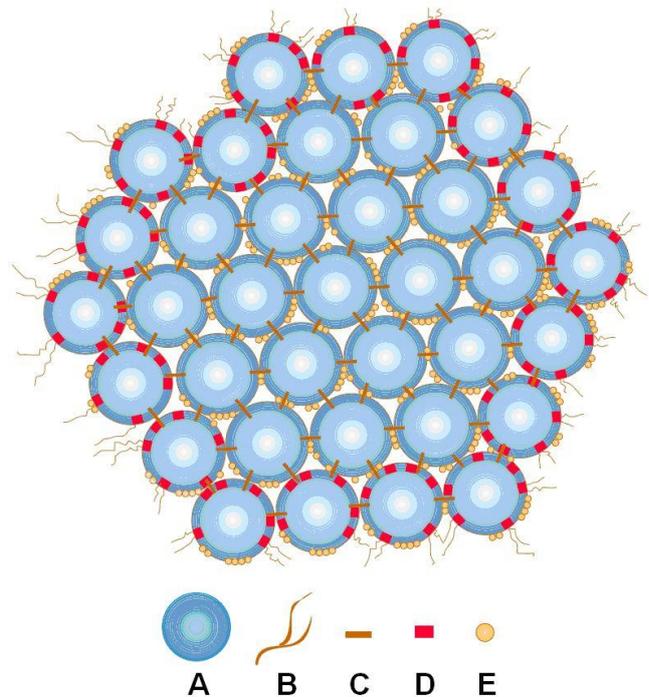
Le caseine sono proteine anfipatiche, caratterizzate da una distribuzione non uniforme dei residui idrofobici e idrofilici; ciò ha grande importanza nell'aggregazione delle caseine in micelle, nonché nella coagulazione del latte. La  $\beta$ -caseina è la più idrofobica e presenta due estremità idrofobiche ed un centro idrofilico. La  $\kappa$ -caseina presenta invece un'estremità idrofobica (la regione N-terminale) detta para- $\kappa$ -caseina e come accennato precedentemente l'estremità C-terminale idrofilica, detta caseinomacropetide (CMP). Alla  $\kappa$ -caseina si attribuisce il ruolo di stabilizzare le micelle di caseina. In particolare il legame 105-106 (fenilalanina-metionina) è

particolarmente sensibile all'azione dell'enzima chimosina, e come vedremo in seguito la sua rottura dà inizio alla coagulazione enzimatica del latte. Il distacco della componente glucidica (il caseinomacropeptide) fa perdere alla  $\kappa$ -caseina la funzione di colloidale protettore delle micelle caseiniche, e lo stato di idratazione delle micelle decresce notevolmente, permettendo interazioni reciproche tra i gruppi idrofobi che portano alla coagulazione del latte.

#### **1.4.2 Le micelle caseiniche**

Il 95% delle caseine è presente nel latte sotto forma di particelle colloidali note come micelle. Le micelle caseiniche hanno un diametro di 50-500 nm (diametro medio 150 nm), e contengono il 94% di componente proteica e il 6% di componenti a basso peso molecolare (principalmente calcio e fosfato, ma anche magnesio e citrato) che sono collettivamente noti come calcio-fosfato colloidale (CCP). Le micelle sono estremamente idratate; legano 3,7 g di acqua per g di proteina. Nelle condizioni normali del latte, le micelle hanno una distanza media di 240 nm l'una dall'altra (Fox, 2003) e possono essere considerate come "sfere che diffondono liberamente" (Tuinier & de Kruif, 2002). Sono stati proposti differenti modelli per descrivere la struttura delle micelle caseiniche. Tutti i modelli attuali sono oramai d'accordo nel ritenere che le micelle sono una rete porosa ed espansa di caseine tenute insieme da un equilibrio di interazioni elettrostatiche ed idrofobiche, con i *nanoclusters* di CCP che "cementano" la rete (**Figura 1.1**). Le caseine sono distribuite in maniera differente nella struttura delle micelle; la  $\kappa$ -caseina si trova principalmente nella porzione più esterna delle micelle e quindi all'interfaccia con la componente serica del latte, mentre le caseine sensibili al calcio si trovano principalmente all'interno delle micelle e sono tenute insieme da interazioni idrofobiche e ponti-calcio. Le micelle caseiniche sono stabilizzate dalla  $\kappa$ -caseina. La stabilizzazione sterica è conferita dalla regione idrofila C-terminale della  $\kappa$ -caseina che protrude dalla superficie delle micelle come una sorta di "strato di capelli" e forma una "spazzola polielettrolitica" spessa circa 12 nm (de Kruif, 1999). Comunque la  $\kappa$ -caseina è distribuita in maniera eterogenea sulla superficie delle micelle, e ciò permette ad altre proteine, come la chimosina o sieroproteine di avvicinarsi alla superficie delle micelle stesse (Dalglish, 1998). L'eliminazione della repulsione sterica

dovuta all'attività proteolitica di enzimi specifici come la chimosina, alla precipitazione isoelettrica in seguito all'acidificazione del latte, all'aggiunta di un eccesso di ioni calcio o etanolo (de Kruif, 1999), annulla le forze stabilizzanti tra le micelle rendendole suscettibili all'aggregazione. La destabilizzazione delle micelle è pertanto alla base di molti processi caseari.



**Figura 1.1 - Modello di micella caseinica**  
A: sub-micella; B: catena che protrude all'esterno;  
C: calcio-fosfato; D:  $\kappa$ -caseina; E: gruppi fosfato

### 1.4.3 Le proteine del siero

Le sieroproteine costituiscono circa il 17% delle sostanze azotate del latte vaccino e vengono anche denominate proteine solubili. Sono rappresentate dalla  $\beta$ -lattoglobulina ( $\beta$ -Lg; 45%),  $\alpha$ -lattalbumina ( $\alpha$ -La; 20%), sieralbumina bovina (BSA; 10%), immunoglobuline (Ig; 10%) e proteoso-peptoni (10%). Vi sono inoltre altri componenti proteici presenti in piccole quantità, quali la lattoferrina, transferrina, ceruloplasmina. Le sieroproteine hanno un contenuto in amminoacidi solforati (cistina, cisteina, metionina)

molto superiore rispetto alla caseina, il che le rende particolarmente importanti da un punto di vista nutrizionale per l'uomo. A differenza delle caseine, non precipitano per azione enzimatica, ma solo per riscaldamento intenso o per salatura. Per questo motivo nella produzione tradizionale dei formaggi, le sieroproteine vengono normalmente perse con il siero. Per garantire il recupero di queste componenti a fini sia nutrizionali che di resa casearia sono state sviluppate delle tecnologie (ad esempio l'ultrafiltrazione del latte) che ne consentono un notevole recupero.

Le sieroproteine possiedono un alto livello di organizzazione strutturale. La struttura estremamente compatta e stabile è data da legami disolfuro intramolecolari, formati tra la grande quantità di residui di cisteina.

Tra le sieroproteine, la  $\beta$ -lg è la componente quantitativamente maggiore secreta nel latte bovino. Al pH del latte essa è un dimerico di peso molecolare pari a 36,4 kDa. Contiene 162 residui amminoacidici per monomero (Fox, 2003), e ciascun monomero ha un diametro di 3,6 nm circa (Fox, 2003). La  $\beta$ -Lg è ricca in amminoacidi solforati e contiene due legami disolfuro intramolecolari e una cisteina per monomero (Fox, 2003). Il residuo di cisteina (Cys121) libero fornisce un gruppo sulfidrilico che può, in certe condizioni, andare incontro ad una trasformazione da gruppo sulfidrilico a ponte disolfuro, formando polimeri con altre proteine (Singh & Havea, 2003). Il punto isoelettrico della  $\beta$ -Lg è circa 5,2 (Fox, 2003); la sieroproteina nativa è solubile al suo punto isoelettrico a causa della sua alta idrofilicità di superficie.

La  $\beta$ -lg è denaturata sopra i 65°C, allorchè la proteina va incontro ad un'ampia modificazione conformazionale ed espone il gruppo sulfidrilico sulla Cys121. Il cambiamento conformazionale è reversibile sotto i 70°C, ma diviene irreversibile a temperature superiori a causa della formazione di legami disolfuro intermolecolari, che conducono alla polimerizzazione. Nel latte trattato termicamente ad alte temperature si verifica inoltre la formazione di ponti disolfuro tra la  $\beta$ -lg e la  $\kappa$ -caseina. Tale interazione ostacola la coagulazione enzimatica del latte, e quando il latte è sottoposto ad ebollizione esso diviene non coagulabile.

L'  $\alpha$ -lattalbumina ( $\alpha$ -La) è un monomero di 123 residui amminoacidici; contiene otto residui di cisteina che formano tutti legami disolfuro (non è presente il gruppo sulfidrilico libero della cisteina), (Fox, 2003). L' $\alpha$ -La è sensibile al calore e, al pH del latte, essa viene denaturata reversibilmente ad una temperatura superiore ai 60°C. E' in grado di legare  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , o altri ioni metallici. Uno ione  $\text{Ca}^{2+}$  è fortemente legato in una tasca

circondata da tre residui di aspartato. La presenza di questo ione stabilizza la sua conformazione; infatti la rimozione del  $\text{Ca}^{2+}$  determina un aumento della sensibilità dell' $\alpha$ -La alla denaturazione termica, e riduce la sua abilità a ritornare alle condizioni native con il raffreddamento (Relkin, 1996).

Le frazioni minori di sieroproteine includono la BSA, le Ig e il proteoso-peptone. La struttura primaria della BSA (69000 Da) include numerosi ripiegamenti stabilizzati da ponti disolfuro (Fox, 2003). Le Ig (180000 Da) sono le più grosse molecole presenti nel latte, le meno cariche, le più lente all'elettroforesi e sono le prime a destabilizzarsi e precipitare a seguito dei fenomeni che alterano la stabilità del siero (Alais, 2000). Esse assicurano la trasmissione dell'immunità dalla madre al giovane animale perché, in alcune specie, il nuovo essere vivente non possiede anticorpi.

#### **1.4.4 Le sostanze azotate non proteiche (NPN)**

Nel latte vaccino le sostanze azotate non proteiche (NPN) non rappresentano che una piccola parte del totale azotato (circa il 5%). La sostanza più abbondante di questa frazione è l'urea, seguita da creatina, creatinina, e ammoniaca. Il latte contiene inoltre alcuni amminoacidi liberi, tra i quali l'acido glutammico e la glicina sono i più abbondanti (Alais, 2000).

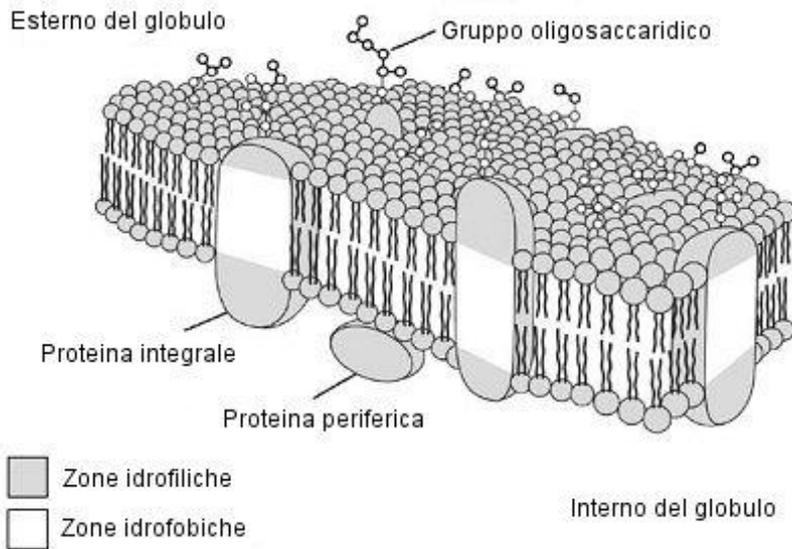
### **1.5 La frazione lipidica**

Il componente più rappresentato nei lipidi dei vari tipi di latte è la frazione trigliceridica, che, nel latte vaccino, rappresenta il 98 % del totale. I costituenti minori del grasso del latte sono i fosfolipidi (circa 1%), ed una serie di altre sostanze presenti in piccolissime quantità, quali mono e digliceridi, acidi grassi liberi, steroli (principalmente colesterolo), e vitamine liposolubili (Vitamina A, E, D, K) (Alais, 2000).

Il grasso costituisce un importante frazione del latte; esso risulta organizzato in goccioline sferiche sospese nel siero di latte. I globuli di grasso nativi hanno un diametro piuttosto variabile, da meno di 0,2 a 15  $\mu\text{m}$ , con una misura media intorno ai 3-4  $\mu\text{m}$  (Mulder & Walstra, 1974).

Il grasso del latte è una miscela di trigliceridi a diverso peso molecolare e a diverso grado di insaturazione, le cui proporzioni possono variare; a causa di tale variabilità i globuli di grasso del latte presentano punti di fusione medi compresi tra 29 e 34°C (Huppertz & Kelly, 2006). Inoltre è stato osservato che la differente dimensione dei globuli di grasso si ripercuote su una differente composizione in trigliceridi (Huppertz & Kelly, 2006). I globuli di grasso possono essere divisi in tre classi in termini di dimensione: i globuli più piccoli rappresentano la frazione maggiore (80% del numero di particelle), ma essi coprono solamente il 3% del peso totale del grasso. La frazione principale ha una dimensione intermedia e comprende il 95% della massa totale del grasso, mentre pochi globuli più grandi (>10 µm di diametro) coprono il rimanente 2% (Huppertz & Kelly, 2006).

Allo stato naturale i globuli di grasso risultano circondati da una membrana, la *milk fat globule membrane* (MFGM), uno strato proteico sottile (circa 10 nm), che rappresenta dal 2 al 6% della massa del globulo. La composizione della MFGM è simile a quella delle membrane cellulari; essa contiene principalmente trigliceridi, fosfolipidi (il 60% del totale presente nei globuli di grasso), glicoproteine, ed enzimi (quali la xantina-ossidasi, e la fosfatasi alcalina), ed una quantità inferiore di colesterolo, mono e digliceridi e acidi grassi liberi (Keenan & Mather, 2006). La funzione principale della membrana è quella di proteggere i lipidi dall'attività enzimatica delle lipasi presenti normalmente nel latte crudo, nonché di determinare il comportamento della fase lipidica del latte in alcuni processi. Infatti, come tutte le emulsioni, anche quella dei globuli di grasso nel plasma del latte tende alla separazione delle fasi; pertanto la matrice grassa tende ad affiorare e a stratificarsi in superficie sotto forma di crema; questo processo è detto scrematura spontanea ed è collegato alla dimensione dei globuli, alla presenza di proteine quali le agglutinine sulla MFGM, e al fatto che la densità dei globuli è inferiore a quella del liquido in cui sono dispersi. Le funzioni svolte dalla membrana implicano che i suoi componenti presentino una disposizione ordinata ma asimmetrica sulla base delle loro proprietà funzionali. Ciò è conseguente al fatto che la membrana non è altro che lo strato interfacciale tra una fase grassa e una fase acquosa. Sulla superficie interna della MFGM dovranno prevalere quindi i siti idrofobici, mentre nella superficie esterna quelli idrofilici. Questa considerazione, e le osservazioni conseguenti a numerose studi effettuati nel corso degli ultimi 90 anni, hanno portato a proporre alcuni modelli sull'organizzazione e struttura della membrana.



**Figura 1.2** - Schema del modello a mosaico fluido della MFGM (da Evers, 2004)

Ormai il modello ampiamente accettato è quello cosiddetto a “mosaico fluido” (**Figura 1.2**), in cui i fosfolipidi sono disposti su un doppio strato; la catena idrocarburica apolare è orientata verso l'interno ed è libera di ruotare così da costituire uno stato continuo idrocarburico; la regione idrofilica invece è rivolta verso l'esterno ed è relativamente rigida. In questo doppio strato, ogni molecola lipidica può muoversi lateralmente, conferendo fluidità e flessibilità allo stesso. Alcune delle proteine globulari sono parzialmente inserite nella membrana, mentre altre la attraversano completamente; l'entità della penetrazione è data dalla composizione amminoacidica e dalla struttura secondaria e terziaria delle proteine. Questo rende le proteine simili a dei pezzi di mosaico inseriti in uno strato lipidico fluido (Evers, 2004).

## 1.6 I sali minerali e gli oligoelementi

I sali minerali rappresentano una delle componenti minoritarie del latte. Infatti le ceneri del latte, spesso considerate come indice rappresentativo dei sali in esso contenuti, costituiscono circa lo 0,6-0,8% (latte vaccino). I sali minerali sono costituiti principalmente da cloruri, fosfati, citrati, potassio, sodio, calcio e magnesio e in misura

minore da solfati e bicarbonato. Inoltre nel latte sono presenti degli elementi presenti in piccolissime quantità: gli oligoelementi. La concentrazione degli oligoelementi è dovuta, in gran parte, al tipo di alimentazione dell'animale, e pertanto è direttamente legata alla composizione del suolo e dell'acqua. Nel latte sono presenti oligoelementi sia di interesse nutrizionale (Se, Cu, Fe, I, F, ecc.), sia potenzialmente dannosi qualora la loro concentrazione diventasse importante (Pb, Cd, Ni, ecc.) (Mucchetti e Neviani, 2006).

La composizione minerale del latte di vacca è riportata in **Tabella 1.3**. Sodio, fosfato e cloruri sono in forma di ioni liberi, mentre calcio, magnesio, fosforo e citrati sono presenti nel latte in forme diverse (associati alla caseina o allo stato libero). Dal momento che una gran parte del calcio e fosforo del latte si trova in forma colloidale associata alle caseine, il latte delle specie che contiene più caseina (ad esempio la pecora e la bufala) risulterà più ricco in questi due elementi. Nel latte vaccino il rapporto tra calcio solubile e calcio colloidale è circa del 31% (Gaucheron, 2005).

La distribuzione del fosforo appare più complessa di quella del calcio, poiché il fosforo è presente anche in forma legata in modo covalente alla caseina ed è parte integrante dei fosfolipidi e delle fosfolipoproteine della membrana del globulo di grasso. Circa il 54% del fosforo nel latte vaccino si trova in forma solubile (Gaucheron, 2005); di questa frazione la maggior parte è nella forma inorganica come sali di calcio, potassio e magnesio ed una parte minore è in forma organica come esteri fosforici. Il restante 46% del fosforo si trova nella forma insolubile (il 28% è in forma inorganica come calcio trifosfato, il 15,7% come complesso con la caseina, e il 2,3% come fosfolipidi). Il magnesio, nel latte vaccino, si trova in gran parte nella forma solubile (65%) (Gaucheron, 2005). I sali minerali presenti in soluzione vera o legati agli elementi strutturali del latte (proteine e grassi) in forma dispersa o colloidale, si trovano in uno stato di equilibrio mobile nel latte. In particolare le modifiche degli equilibri salini a carico del calcio e del fosforo, elementi fondamentali nella struttura delle micelle caseiniche sotto forma di calcio-fosfato colloidale, rivestono una notevole importanza nella condotta delle operazioni tecnologiche che precedono la caseificazione del latte e nella caseificazione stessa.

**Tabella 1.3 - Composizione minerale del latte di vacca (da Gaucheron, 2005)**

<b>Minerale</b>	<b>Concentrazione (mg.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentrazione (mmol.kg<sup>-1</sup>)</b>
Calcio	1043 - 1283	26 - 32
Magnesio	97 - 146	4 - 6
Fosfato inorganico	1805 - 2185	19 - 23
Fosforo totale	930 - 992	30 - 32
Citrati	1323 - 2079	7 - 11
Sodio	391 - 644	17 - 28
Potassio	1212 - 1681	31 - 43
Cloro	772 - 1207	22 - 34

Infatti alla realizzazione dei diversi equilibri salini è affidata, in buona parte, la realizzazione di un tipo di cagliata più o meno demineralizzata, e quindi più o meno consistente e capace di trattenere acqua e grasso. Differenti condizioni fisico-chimiche determinano delle modifiche degli equilibri salini. In particolare il raffreddamento del latte, l'aggiunta di chelatanti e l'acidificazione determinano il passaggio del calcio e del fosfato dalla forma colloidale alla forma solubile (Gaucheron, 2005).

## **1.7 Gli enzimi**

Il latte vaccino allo stato nativo contiene un gran numero di enzimi (circa 70), presenti in piccole quantità. A questi enzimi, che possiamo definire endogeni del latte, debbono poi aggiungersi gli enzimi prodotti dai batteri presenti nel latte nelle fasi successive alla mungitura. Tuttavia, questi ultimi spesso sono dello stesso tipo di quelli nativi del latte, e pertanto, risulta talvolta difficile determinare la loro origine. Gli enzimi nativi del latte derivano essenzialmente da quattro distinte fonti:

- dal plasma sanguigno attraverso le “leaky junctions” tra le cellule mammarie;
- dal citoplasma delle cellule secretorie;

- dalla membrana del globulo di grasso del latte, il cui strato esterno deriva dalla membrana apicale delle cellule mammarie. Questa è, con tutta probabilità, la fonte principale degli enzimi nativi del latte;
- Dalle cellule somatiche (leucociti), le quali entrano nella ghiandola mammaria dal sangue per combattere le infezioni batteriche (mastiti), e da essa arrivano nel latte (Fox & Kelly, 2006).

Il latte non contiene substrati favorevoli per la maggior parte degli enzimi presenti, mentre altri ancora sono inattivi a causa delle condizioni ambientali sfavorevoli, quali pH, temperatura o potenziale redox. La loro distruzione è, generalmente, rapida al di sopra di 70°C, tuttavia vi sono degli enzimi che vengono distrutti solo a temperature superiori ai 90°C, quali il lisozima e la ribonucleasi (Alais, 2000). Molti enzimi nativi del latte sono importanti per i seguenti aspetti (Fox & Kelly, 2006):

- per il deterioramento della qualità del latte; tra essi possiamo citare la lipasi lipoproteica, responsabile dell'irrancidimento idrolitico del latte, le proteinasi, la fosfatasi acida e la xantina ossidasi;
- per la conservazione della qualità del latte (lattoperossidasi, e superossidodismutasi);
- come indici dei trattamenti termici subiti dal latte (fosfatasi alcalina,  $\gamma$ -glutamilttransferasi, lattoperossidasi e catalasi);
- come indici di infezione mastitica (catalasi, fosfatasi acida e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasi);
- per la loro attività antimicrobica (lisozima e lattoperossidasi);
- come fonte commerciale di enzimi (ribonucleasi e lattoperossidasi).

## 1.8 Le vitamine

Nel latte è presente, pur se in piccola quantità, un importante corredo vitaminico (Tabella 1.4).

**Tabella 1.4 – Vitamine presenti nel latte di vacca (da Mucchetti e Neviani, 2006)**

Vitamine	Concentrazione ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
<b>Liposolubili</b>	
A	270 - 468
Carotene	140 - 220
D	0,20 - 1,25
E	410 - 1000
K	0 - 330
<b>Idrosolubili</b>	
C	10000 - 24000
B1	300 - 550
B2	1400 - 2200
B6	220 - 700
B12	3 - 7,6
Niacina	700 - 1100
Acido pantotenico	2800 - 4200
Acido folico	2,8 - 68
Biotina	20 - 50
Colina	121000
Inositolo	110000

Le vitamine, a seconda della loro solubilità, sono distribuite in modo diverso nelle fasi del latte, e pertanto sono distinte in liposolubili e idrosolubili. Le vitamine rivestono ovviamente una notevole importanza dal punto di vista nutrizionale, tuttavia è importante considerare che il consumo del latte crudo è estremamente ridotto e che i trattamenti termici di risanamento del latte possono modificare il quadro vitaminico (Mucchetti e Neviani, 2006). Tuttavia la causa predominante di riduzione del titolo vitaminico del latte sono i processi ossidativi e fotolitici (Corradini, 1995).

## 2. I PRODOTTI CASEARI

### 2.1 Il Formaggio

Il formaggio rappresenta il più antico e valido metodo conosciuto dall'uomo per concentrare e preservare nel tempo il valore nutritivo del latte; è il derivato di una serie complessa di operazioni tecnologiche, che partendo dalla stessa materia prima, il latte, conducono, attraverso una serie di differenziazioni, a prodotti che sono quanto più diverso l'uno dall'altro si possa immaginare. La differenziazione tra le diverse tipologie di formaggio è tale che ne sono state descritte fino a 1400 varietà (Fox & McSweeney, 2004). Tuttavia, queste varietà sono spesso talmente simili tra loro che sarebbe meglio parlare di varianti, piuttosto che di varietà in senso stretto. Sono stati fatti notevoli sforzi per classificare le varietà di formaggio in gruppi facilmente esplicativi. Il più comune criterio per la classificazione dei formaggi è basato sulla struttura (molto duro, duro, semiduro, molle). Sulla base di questa classificazione sono stati introdotti altri parametri in grado di differenziare ulteriormente tra le diverse varietà: in particolare, la specie dalla quale deriva il latte, il metodo di coagulazione del latte, il rapporto umidità/proteina e/o la temperatura di cottura della cagliata, il tipo di microflora utilizzata, ecc.

Tuttavia il formaggio non può essere definito solamente come “prodotto tecnologico”, ma deve avere una definizione che racchiuda anche gli aspetti alimentari, commerciali e di natura legale.

Secondo una definizione oramai storica, dettata dal Congresso internazionale per la repressione delle frodi alimentari svoltosi a Ginevra nel 1908, il formaggio viene definito come: “... il prodotto della maturazione della cagliata, ottenuta mediante coagulazione presamica o acida del latte intero o scremato parzialmente o totalmente, con o senza aggiunta di coloranti e di sale, sufficientemente liberato dal siero di latte”. Lievemente diversa e decisamente più attuale è la definizione dettata dal Codex Alimentarius (FAO / WHO, CODEX STAN 283-1978), secondo la quale: “Formaggio è il prodotto fresco o stagionato, molle, semiduro, duro, o extraduro, in cui il rapporto siero proteine / caseina non eccede quello del latte. Questo può essere ottenuto attraverso:

- la coagulazione totale o parziale delle proteine del latte, del latte scremato, parzialmente scremato, della crema, della crema di siero, del latticello, o una combinazione di questi materiali, attraverso l'azione del caglio o di altri coagulanti adatti, e con parziale drenaggio del siero risultante dalla coagulazione. Tutto ciò rispettando il principio, secondo il quale la fabbricazione del formaggio risulta dalla concentrazione delle proteine del latte (in particolare la frazione caseinica), e come conseguenza, il contenuto proteico del formaggio dovrà essere nettamente superiore rispetto al livello proteico delle miscele dei materiali sopracitati dalle quali il formaggio sarà prodotto;
- e/o i procedimenti tecnici che coinvolgono la coagulazione delle proteine del latte e/o prodotti ottenuti dal latte che permettono di ottenere un prodotto finale con caratteristiche fisiche, chimiche, e organolettiche simili al prodotto definito nel punto precedente.

Sulla base di questa definizione, i prodotti ottenuti dalla sola coagulazione delle proteine del siero non possono essere considerati come formaggi. Così un prodotto come la ricotta, prodotta attraverso la coagulazione per via termica delle proteine del siero non è definibile in termini normativi come formaggio.

Altre interessanti definizioni classificative che possono essere estratte dal Codex Alimentarius (FAO / WHO, CODEX STAN 283-1978), riguardano la definizione di alcune tipologie di formaggi:

- un formaggio è da considerarsi stagionato, se non è pronto per il consumo immediatamente dopo la produzione, ma deve essere mantenuto per un certo tempo a temperature e condizioni determinate, tali da risultare in cambiamenti biochimici e fisici capaci di caratterizzare il formaggio in questione;
- invece, un formaggio è non stagionato (formaggi freschi), quando è pronto per il consumo immediatamente dopo la fabbricazione.

Dobbiamo sottolineare che la produzione dei formaggi si basa in linea generale su una serie di passaggi, che sono fondamentalmente riconducibili a 6 fasi: la coagulazione, l'acidificazione, la sineresi (spurgo del coagulo), la formatura, la salatura, e la maturazione. Queste fasi vengono sempre applicate nella produzione dei formaggi

molliti, semiduri e duri. L'unica eccezione è rappresentata dai formaggi freschi, che non contemplano le fasi di salatura e maturazione.

Merita inoltre un certo rilievo la distinzione tra formaggi a pasta molle e formaggi freschi, in quanto queste due tipologie vengono spesso confuse. I formaggi a pasta molle rappresentano un gruppo eterogeneo, caratterizzato da una percentuale di umidità superiore al 45-50%, e da un periodo di stagionatura breve o medio (da pochi giorni fino a sei mesi). La coagulazione del latte è prevalentemente presamica (enzimatica, attraverso l'utilizzo del caglio), il processo di acidificazione della cagliata è di intensità medio-alta e i formaggi presentano sempre una crosta più o meno marcata.

Viceversa i formaggi a pasta fresca si ottengono per coagulazione prevalentemente acida del latte, e come detto sono pronti al consumo immediatamente dopo la produzione (Schulz-Collins & Senge, 2004).

Comunque, in questo capitolo, non sarà fatta una classificazione delle varie tipologie di formaggio, che è particolarmente complessa, ma la trattazione sarà limitata alle tipologie casearie oggetto di questa tesi, ovvero i formaggi freschi e la ricotta. Inoltre verranno approfonditi gli aspetti inerenti le tipologie di coagulazione (acida, presamica, acido-presamica e quella termica relativamente alle proteine del siero) attraverso le quali si ricavano i prodotti in questione.

### ***2.1.1 I Formaggi freschi***

Nella concezione merceologica dei prodotti lattiero-caseari, le paste fresche possono essere definite come prodotti a pasta morbida, granulosa, umida, spalmabile, di solito bianca, senza crosta, a sapore fresco leggermente acidulo e dotati di un gradevole aroma di latte o panna fresca, confezionati in contenitori o avvolti in fogli di carta (Salvadori Del Prato, 2001). Sono sempre caratterizzati da limitata conservabilità, e per tale motivo la loro distribuzione deve risultare rapida e avvenire in condizioni di refrigerazione controllate e costanti.

I formaggi freschi derivati dalle cagliate magre possono essere considerati dei prodotti dietetici, con un basso apporto calorico e ricchi di proteine ad elevato valore biologico, di calcio e fosforo. La tecnologia di produzione di questi formaggi prevede la coagulazione prevalentemente acida, per fermentazione lattica, del latte intero,

parzialmente scremato o magro. Di seguito, a titolo esemplificativo, è riportata la tecnologia di fabbricazione di un formaggio fresco tra i più diffusi a livello mondiale: il *quark*. Si tratta di un formaggio fresco a coagulazione prevalentemente acida originario della Germania. Viene prodotto in tutto il mondo con denominazioni differenti (Bakers cheese, Neufchatel, Topfen, ecc.). Presenta un sapore lievemente acidulo, ed una pasta di colore bianco, uniformemente molle, priva di occhiature, pastosa e spalmabile. Non deve presentare separazione liquida e granulosità, considerate un difetto per questo prodotto (Salvadori Del Prato, 2001). Il processo tecnologico prevede l'utilizzo di latte magro o parzialmente scremato.

Il latte viene sottoposto ad un processo di risanamento, attraverso un trattamento di pastorizzazione a temperature comprese tra 72°C (per 15 s) e 85°C con differenti combinazioni tempo-temperatura. Le alte temperature determinano anche la parziale denaturazione delle sieroproteine, che in tale condizione, vengono trattenute nella cagliata acida.

Una volta pastorizzato, il latte viene raffreddato a temperature comprese tra 20°C e 30°C e inoculato con una coltura lattica mesofila e piccole quantità di caglio, che in genere sono comprese tra 0,2 e 2 ml/100L, in base al tipo di caglio e soprattutto alla sua forza. Nel processo di acidificazione sono generalmente utilizzati batteri lattici mesofili, appartenenti a specie omo-eterofermentanti. In particolare le specie omofermentanti sono rappresentate da *Lactococcus lactis sub. lactis* e *Lactococcus lactis sub. cremoris*, mentre quelle eterofermentanti da *Lactococcus lactis sub. lactis biovar. diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides sub. cremoris* e *Leuconostoc lactis*. Le specie omofermentanti hanno la specifica funzione acidificante, mentre le eterofermentanti sono importanti per la loro capacità di produrre sostanze aromatiche (etanolo, diacetile e acetoino), che conferiscono a questi formaggi il tipico aroma di burro (Bottazzi, 1993), (vedi paragrafo 2.2).

Nell'ambito delle specie citate, sono preferiti i ceppi caratterizzati da un elevato potere acidificante, aromatizzante, e da una scarsa capacità proteolitica. Infatti nel *quark* e nei formaggi freschi in genere, per i quali non è prevista la maturazione, l'eccessiva proteolisi potrebbe causare la comparsa del difetto di amaro. L'aggiunta del caglio, per la fabbricazione di questi prodotti, determina vantaggi ben precisi: rende il coagulo più compatto, permettendo di raggiungere un'idonea consistenza della cagliata senza la necessità di acidificarla eccessivamente (in assenza di caglio è necessario raggiungere

valori di pH più bassi per ottenere un eguale grado di consistenza del coagulo); ed inoltre riduce la perdita di grasso e soprattutto di caseine nella successiva separazione del siero (Schulz-Collins & Senge, 2004).

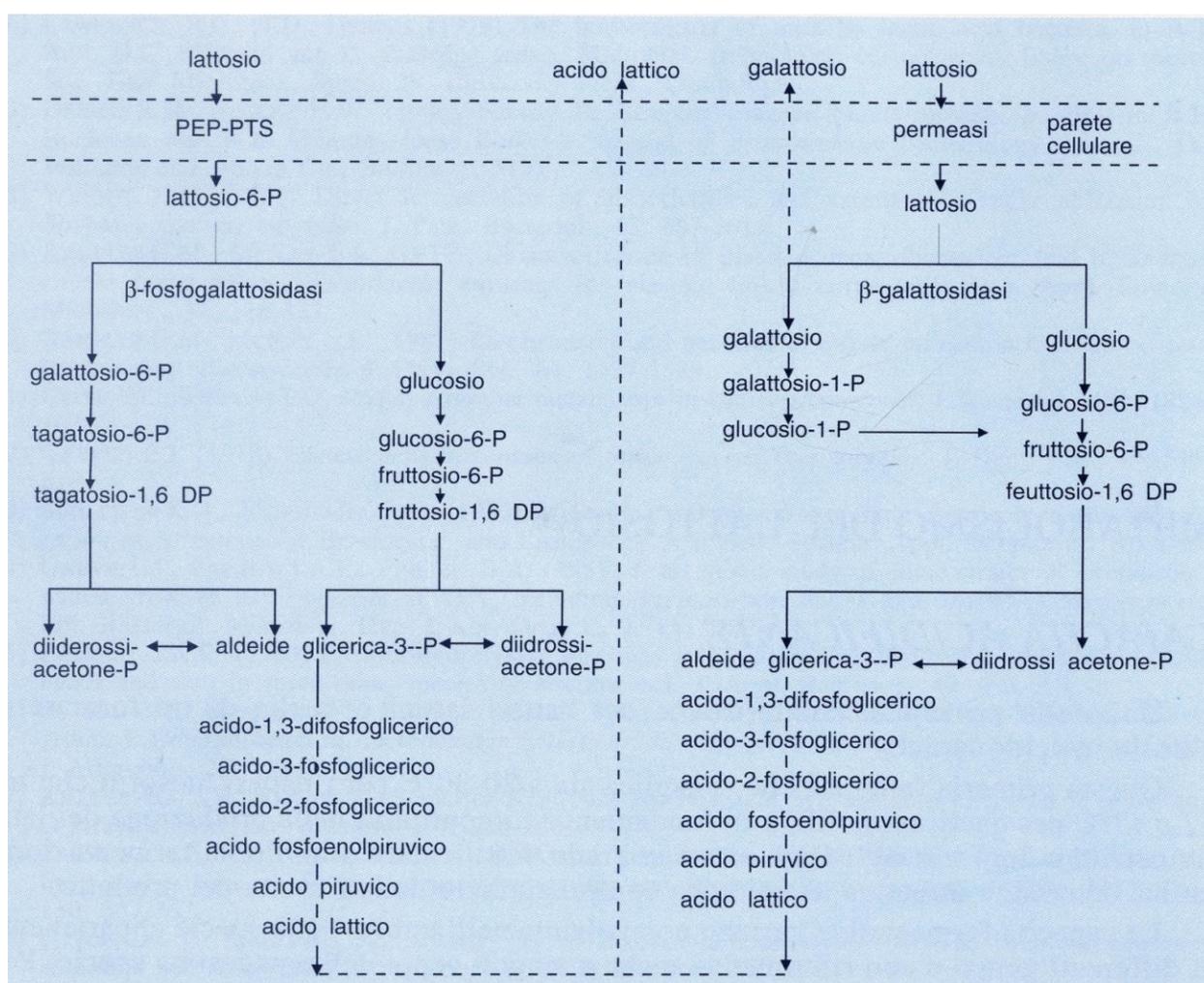
Il latte addizionato di fermenti e caglio sosta alla temperatura di 20° - 30°C fino al raggiungimento dell'acidità richiesta (pH 4,6-5,0). Sebbene i tempi di sosta siano variabili, in quanto strettamente influenzati dalla quantità della coltura aggiunta e dalla temperatura di processo, generalmente l'acidificazione si conclude in un intervallo di tempo di 8-16 ore. Al termine di tale periodo, segue la rottura della cagliata e la separazione del siero. Quest'ultima fase è particolarmente importante, in quanto da essa dipende la stabilità del prodotto nella fase di commercializzazione. Infatti, come detto in precedenza, per questo formaggio è considerato un difetto la separazione di siero nella confezione. La separazione del siero dal coagulo può avvenire mediante l'utilizzo di varie tecniche. Nel passato era applicata la tecnica che prevedeva la separazione del siero attraverso l'utilizzo di teli o sacchi di fibra naturale. Attualmente tale tecnica viene utilizzata principalmente a livello artigianale, mentre a livello industriale è stata sostituita dall'uso dei separatori centrifughi, e dall'ultrafiltrazione della cagliata.

L'esigenza di sostituire le tecniche di separazione tradizionali nasce dalla necessità di ridurre i tempi di processo e di migliorarne le condizioni igieniche. Infatti l'utilizzo di teli e sacchi in fibra naturale non fornisce sufficienti garanzie in termini di sicurezza igienica, a causa delle difficoltà relative alla perfetta sanitizzazione dei filtri.

## **2.2 La fermentazione lattica e il metabolismo dell'acido citrico**

La fermentazione del lattosio è il processo biochimico fondamentale nella produzione dei derivati fermentati del latte. I prodotti ottenuti dalla fermentazione del latte sono caratterizzati da popolazioni batteriche estremamente diverse per numero, cinetiche di sviluppo, composizione in specie e biotipi. Il tipo di microorganismi presenti e la loro selezione, in relazione alla tecnologia di produzione sono fattori determinanti per la riuscita della trasformazione. A tale proposito sono state citate in precedenza le colture batteriche che vengono comunemente utilizzate per la produzione dei formaggi freschi e del *quark* in particolare.

In linea generale si può dire che il processo fermentativo derivante dallo sviluppo della microflora lattica comporta la totale o parziale utilizzazione degli zuccheri fermentescibili presenti, e induce la modificazione delle caratteristiche chimico-fisiche della matrice conseguenti all'accumulo di metaboliti primari quali l'acido lattico, l'acido acetico, l'alcol etilico e la CO<sub>2</sub>. In **Figura 2.1** è riportato lo schema della fermentazione lattica operata dai batteri omofermentanti. Esistono due vie riguardanti il sistema di trasporto del lattosio, per cui vi è una differenza negli enzimi per l'idrolisi del lattosio stesso.

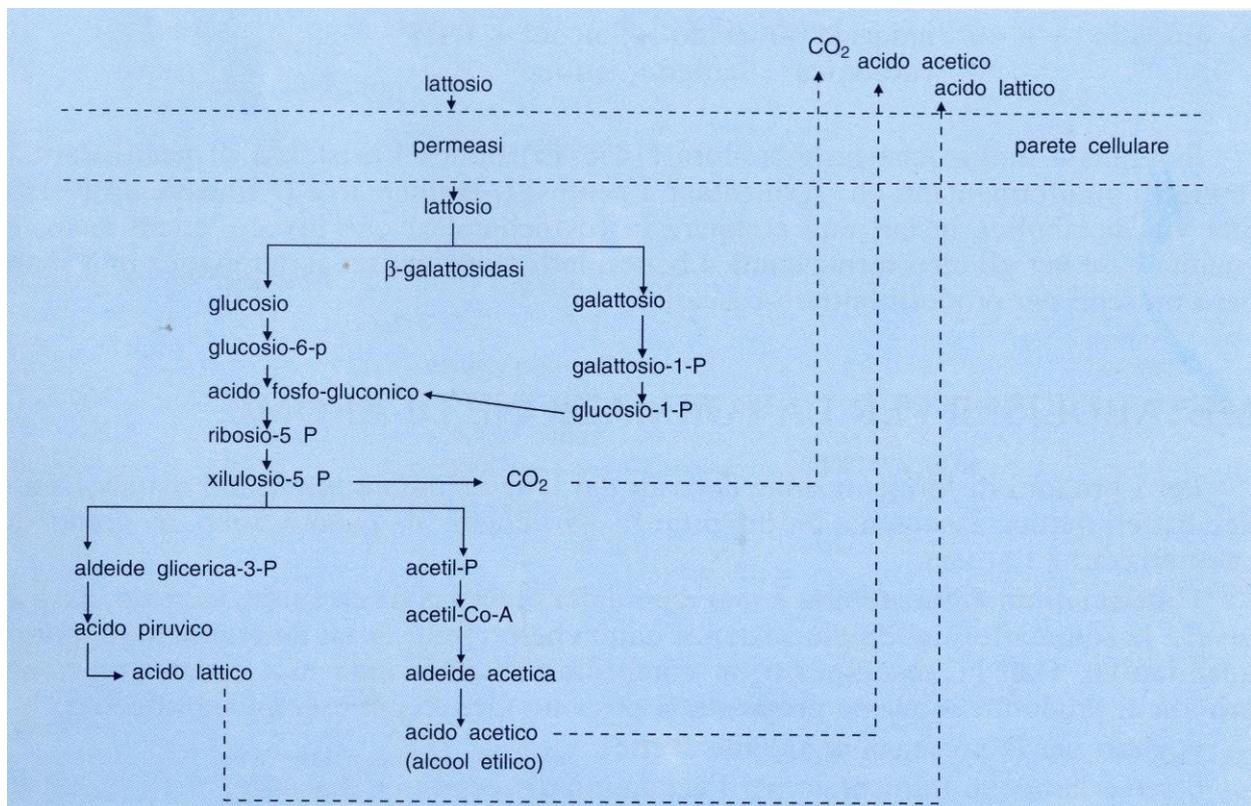


**Figura 2.1** - Fermentazione omolattica (da Bottazzi, 1993)

Dalla figura si può notare che una prima via prevede la fosforilazione del lattosio a livello della parete cellulare per opera del sistema enzimatico fosfoenolpiruvato

fosfotransferasi (PEP-PTS), mentre una seconda via consente il trasporto del lattosio all'interno della cellula batterica attraverso una permeasi. Quindi da una parte si ha lattosio-6-P e dall'altra lattosio, e su queste due molecole interverranno rispettivamente gli enzimi  $\beta$ -fosfogalattosidasi (P- $\beta$ -Gal) e  $\beta$ -galattosidasi ( $\beta$ -Gal). A questo punto la produzione finale di acido lattico può avvenire attraverso la via del tagatosio-6-P (a partire da galattosio-6-P), la via di Leloir (a partire da galattosio), o la via di Embden-Meyerhof-Parnas (a partire da glucosio).

Nei batteri lattici eterofermentanti la via metabolica seguita per la metabolizzazione del lattosio è in buona parte differente rispetto a quella che caratterizza gli omofermentanti. Con i batteri eterofermentanti i prodotti finali della via metabolica del lattosio sono: acido lattico, acido acetico e CO<sub>2</sub> in un rapporto costante di 1:1:1 (**Figura 2.2**).



**Figura 2.2** - Fermentazione eterolattica (da Bottazzi, 1993)

Di particolare interesse è il metabolismo dell'acido citrico responsabile della produzione di composti aromatici, particolarmente apprezzati nei formaggi freschi e nello yogurt.

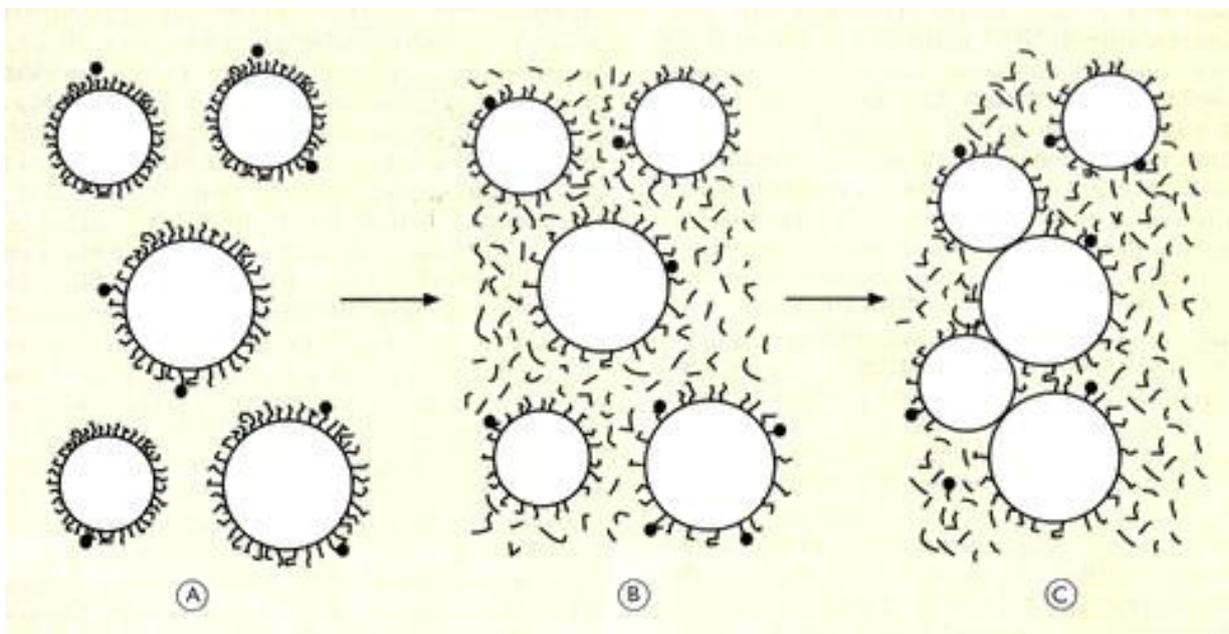


di acidificazione, per addizione di acidi o per fermentazione da parte di batteri lattici, determinano differenze nelle caratteristiche del coagulo: nel primo caso, infatti, non si hanno modificazioni enzimatiche della caseina, mentre nel secondo caso tale possibilità è funzione del tipo di batteri lattici coinvolti nel processo e della durata della fermentazione. Inoltre le differenze nelle cinetiche di acidificazione potrebbero condurre a differenze nelle proprietà fisiche e reologiche dei gel risultanti (Lucey, Tamehana, Singh, & Munro, 1998). La progressiva riduzione del pH del latte determina la protonazione dei gruppi carbossilici nella sequenza amminoacidica delle proteine. Ciò determina una riduzione della carica superficiale delle micelle caseiniche, che presentano una ridotta repulsione elettrostatica e tendono a precipitare quando il pH si avvicina al loro punto isoelettrico (~pH 4,6) (Damodaran, 2008). Inoltre il calcio-fosfato colloidale viene progressivamente solubilizzato con il progredire dell'acidificazione. Questo contribuisce a determinare la disgregazione delle micelle caseiniche, che si disaggregano in submicelle. Se il latte non è sottoposto ad alcuna agitazione le submicelle si aggregano tra loro con legami di tipo elettrostatico ed idrofobico e formano un reticolo proteico che ingloba nelle sue maglie la fase acquosa ed il grasso, presentando tuttavia una struttura debole e friabile. Il fenomeno della coagulazione acida è influenzato dalla temperatura: mentre a 4°C è infatti necessario acidificare il latte fino a pH 4,6 per osservare la flocculazione della caseina, a 20°C e a 37°C il pH del latte a cui si osserva la flocculazione sale, rispettivamente, a circa 5,0 e 5,2 (Mucchetti e Neviani, 2006).

Il coagulo acido non ha capacità spontanea di contrarsi e la limitata separazione di siero, tipica delle cagliate acide che hanno elevata umidità (70-85%), è regolata dalle proprietà di permeabilità di una struttura fortemente demineralizzata. La separazione progressiva del siero determina a sua volta il riavvicinamento delle submicelle e/o delle caseine, restringendo progressivamente le maglie del reticolo e riducendo le proprietà di permeabilità: il risultato complessivo è una cagliata molto umida. Nella pratica casearia, come tra l'altro precedentemente riferito a proposito della tecnologia di produzione del *quark*, la separazione del siero avviene solo in piccola parte attraverso i meccanismi spontanei che seguono il fenomeno della coagulazione. Esistono pertanto tutta una serie di azioni meccaniche che hanno la finalità di ottenere lo spurgo del coagulo fino al raggiungimento dei valori di umidità desiderati.

## 2.4 I principi della coagulazione presamica

La coagulazione indotta dal caglio (o presame) viene comunemente applicata nella produzione dei formaggi. La quantità di caglio aggiunta al latte varia a seconda delle differenti tipologie di formaggio, e come detto risulta piuttosto ridotta nel caso della produzione dei formaggi freschi, mentre aumenta notevolmente nel caso dei prodotti caratterizzati da una fase di stagionatura. Come già accennato nel capitolo 1, il fenomeno della coagulazione enzimatica (o presamica) del latte è conseguente ad una destabilizzazione delle micelle caseiniche operata dal caglio, che è un complesso enzimatico proteolitico contenente la chimosina. In particolare, si tratta di un processo che comprende due fasi, che non sono tuttavia completamente separate, ma in parte si sovrappongono (**Figura 2.4**) (Hyslop, 2003).



**Figura 2.4** – Schema della fase primaria e secondaria della coagulazione presamica; A) le micelle di caseina stabilizzate dal caseinomacropeptide (“barbe” esterne alle micelle); B) la chimosina (pallini neri) provoca il distacco del caseinomacropeptide; C) le micelle di caseina non più stabilizzate dal caseinomacropeptide possono unirsi (da Salvadori del Prato, 2001)

Le micelle caseiniche sono stabilizzate dalla k-caseina, che, attraverso la porzione idrofila C-terminale che protrude verso l'esterno, carica negativamente la superficie micellare esterna, impedendo l'aggregazione delle micelle e mantenendole stabili in

fase colloidale. La fase primaria della coagulazione presamica è rappresentata dall'azione specifica della chimosina, contenuta nella soluzione coagulante, sul legame 105-106 (fenilalanina-metionina) della  $\kappa$ -caseina. L'idrolisi di tale legame determina che la para- $\kappa$ -caseina (porzione idrofobica) resti ancorata alle micelle, mentre la parte idrofilica (il caseinomacropeptide; CMP) venga rilasciata nel siero. Come conseguenza di ciò, la  $\kappa$ -caseina perde la sua funzione di "colloide protettore". Infatti la rimozione del CMP determina una riduzione della repulsione sterica ed elettrostatica tra le micelle caseiniche, e così si verifica un incremento delle interazioni idrofobiche sulla superficie delle stesse (Dalgleish, 1979; Horne & Banks, 2004). Quando, al pH nativo del latte, l'85-90% (Sandra, Alexander, & Dalgleish, 2007) di caseina è stata idrolizzata, le micelle destabilizzate iniziano ad aggregarsi tra loro, dando origine alla seconda fase della coagulazione presamica, e formando un gel a viscosità crescente. Le interazioni tra le micelle sono di natura sia idrofobica che elettrostatica, grazie all'intervento di ponti di calcio tra le micelle stesse. L'acidità del latte influisce su questo processo, in quanto contribuisce ad abbassare la carica superficiale delle micelle caseiniche tanto che, a valori di pH molto più bassi di quelli normali del latte (pH 6,6), si ha la coagulazione anche quando l'idrolisi della  $\kappa$ -caseina, non raggiunge i valori sopra indicati.

La temperatura di reazione influenza in modo nettamente distinto la fase enzimatica e quella aggregativa della coagulazione. Mentre la fase primaria, per quanto rallentata, procede anche a temperature di 5°C, temperature inferiori ai 15°C ostacolano l'aggregazione delle micelle e consentono al latte di restare nello stato di *sol*. Tuttavia una volta che la fase primaria è completata, riportando la temperatura sopra i 30°C, la coagulazione avviene immediatamente.

Il coagulo presamico ha caratteristiche molto diverse rispetto a quello acido. In particolare ha la capacità di contrarsi, e quindi di espellere siero in misura molto maggiore rispetto al coagulo acido. L'incremento progressivo del numero dei legami tra le micelle di caseina con il procedere della fase secondaria della coagulazione, grazie alla struttura mineralizzata del coagulo presamico, induce la contrazione del coagulo e la conseguente liberazione del siero. La separazione del siero dal coagulo, a sua volta, avvicina ulteriormente le micelle, fino ad esaurire l'attitudine alla sineresi spontanea. Nelle maglie del reticolo proteico sono trattenuti, oltre al grasso e a frazioni del siero, tutti i componenti (tra i quali microrganismi ed enzimi) indispensabili per trasformare, durante la stagionatura, la cagliata nel formaggio desiderato.

## **2.5 Coagulazione mista acido-presamica**

Nella maggior parte delle produzioni casearie viene adoperata sia la fermentazione batterica che la coagulazione presamica, e la coagulazione del latte è indotta principalmente dall'attività della chimosina, seguita poi dalla produzione di acido lattico che altera le proprietà del gel intervenendo sui processi di spurgo spontaneo del coagulo. In questo tipo di produzioni, la quantità di caglio aggiunta al latte è dell'ordine dei 20 - 40 mL / 100 L. Al contrario, nella produzione dei formaggi freschi vengono aggiunte al latte piccole quantità di caglio (0,2-2 mL / 100 L), (Schulz-Collins & Senge, 2004), e il processo di acidificazione del latte è piuttosto lungo (8-16 ore). In queste condizioni di lenta acidificazione e ridotte quantità di caglio, il processo di coagulazione mista acido-presamica risulta essere piuttosto complesso dal momento che numerose modifiche a carico del sistema latte avvengono in maniera simultanea. Inoltre la variabilità nelle quantità di caglio aggiunte al latte, così come nei tempi di acidificazione, può causare notevoli differenze che si riflettono sulle proprietà reologiche del gel finale. In linea generale è possibile affermare che le proprietà reologiche di gel misti acido-presamici formati a valori di  $pH > 5,2$  sono simili a quelle dei gel formati prevalentemente grazie all'azione del caglio, mentre quelli formati sotto  $pH 5,2$  hanno proprietà più simili ai gel acidi (Schulz-Collins & Senge, 2004).

## **2.6 La Ricotta fresca**

La ricotta è il prodotto della coagulazione al calore delle proteine del latte, principalmente sieroproteine. La ricotta fresca è un latticino non sottoposto a processi di maturazione, caratterizzato da un elevato contenuto in acqua, con gusto delicatamente dolce, profumo di latte e crema, e con una struttura granulosa, ma non sabbiosa (Mucchetti, Carminati, e Pirisi, 2002). In termini normativi non è possibile definirla come formaggio, in quanto ottenuta da siero di latte e non dal latte, e perché la coagulazione delle proteine non è determinata dall'azione del caglio.

In Italia, sulla base dei dati riportati da Mucchetti et al. (2002), la produzione annua di ricotta vaccina e bufalina si attesta intorno alle 32000-40000 tonnellate annue. A questa produzione vanno ad aggiungersi le circa 5000 tonnellate di ricotta ovina prodotta

principalmente in Sardegna. La tecnologia di produzione della ricotta può essere sintetizzata in 4 passaggi chiave:

- scelta e preparazione della materia prima;
- denaturazione termica e aggregazione delle proteine denaturate;
- separazione della ricotta dalla scotta;
- raffreddamento e confezionamento

### **2.6.1 Scelta e preparazione della materia prima**

Per quanto concerne la materia prima di produzione della ricotta, essa deve essere individuata nel siero di latte. Tuttavia spesso il siero viene addizionato con latte (dal 5 al 25%) e/o crema. Tra gli altri ingredienti che possono essere aggiunti nel prodotto, possiamo citare il sale (0,1-1%). Altre pratiche consistono nell'aggiunta di siero in polvere, caseine, caseinati, o proteine del latte ricavate tramite ultrafiltrazione (Mucchetti et al., 2002).

### **2.6.2 Denaturazione termica e aggregazione delle proteine denaturate**

Il processo chiave di produzione della ricotta è rappresentato dalla termocoagulazione delle proteine (coagulazione al calore delle sieroproteine, e delle caseine qualora venga aggiunto del latte al siero) contenute nella materia prima.

Le sieroproteine sono estremamente sensibili al fenomeno di denaturazione termica. Il calore determina il processo di "unfolding", responsabile dell'esposizione degli amminoacidi idrofobici e contenenti zolfo presenti nella porzione interna delle proteine native (Singh & Havea, 2003). La resistenza delle sieroproteine alla denaturazione termica diminuisce nel seguente ordine:  $\alpha$ -La >  $\beta$ -Lg > BSA > Ig (Singh & Havea, 2003). Lo stadio primario della denaturazione termica della  $\beta$ -Lg implica la dissociazione dei dimeri a monomeri, che sono successivamente "srotolati" e si aggregano attraverso i gruppi reattivi esposti (Singh & Havea, 2003). Un'interazione tra  $\alpha$ -La e  $\beta$ -Lg potenzia la denaturazione termica dell' $\alpha$ -La (Dalgleish, Senaratne, & Francois, 1997).

Nel caso del siero ovino, che rappresenta la materia prima utilizzata in una delle parti sperimentali di questa tesi, la tecnologia di produzione della ricotta prevede una temperatura di riscaldamento del siero compresa tra 78 e 80°C, fino ad un massimo di 85°C. Inoltre in genere non si effettua alcuna correzione del pH del siero, mentre può essere effettuata la correzione della forza ionica del mezzo tramite aggiunta di NaCl. Infatti la correzione di queste 3 variabili (pH, temperatura, forza ionica) è spesso fondamentale in termini di quantità e qualità della denaturazione proteica. In linea generale la sequenza di processo vede dapprima la denaturazione delle sieroproteine solubili, seguita dalla formazione di aggregati solubili, e infine di aggregati insolubili. La forza ionica del mezzo è importante per consentire l'aggregazione proteica e per determinare la struttura dell'aggregato. Infatti la repulsione di carica tra le sieroproteine può impedirne l'aggregazione anche se esse sono denaturate a livelli superiori al 95%, qualora il trattamento termico avvenga in ambiente con forza ionica < 20 mM, in assenza di ioni calcio e con pH > 6,5. In modo particolare lo ione  $Ca^{2+}$  assume un ruolo fondamentale in quanto neutralizzando parte delle cariche negative, induce una riduzione della repulsione di carica tra le sieroproteine, incrementando il recupero delle stesse. Il valore di pH al quale avviene il trattamento termico è importante per la struttura del coagulo. A pH vicini alla neutralità, le sieroproteine denaturate generano un coagulo di tipo elastico. Al contrario, a valori di pH inferiori a 6,0 la struttura del coagulo diventa poco elastica. Il pH ottimale sembra essere compreso tra 5,7 e 6,3. La differenza nella struttura può inoltre essere determinata dai differenti rapporti di  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La presenti nella frazione denaturata in funzione della temperatura (**Tabella 2.1**) e del pH a cui è realizzato il trattamento termico. In particolare Addeo e Coppola (1983), studiando la ricotta bufalina notarono come il rapporto tra  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La pari a 57:43 nel siero, diventasse di 80:20 nella ricotta. Essi collegarono il fenomeno al differente punto isoelettrico delle due proteine ( $\beta$ -lattoglobulina = 6,02;  $\alpha$ -lattalbumina = 5,54) e al valore di pH del siero al momento della termocoagulazione (6,26).

L'aggregazione delle sieroproteine denaturate al calore è regolata da meccanismi differenti a seconda che il trattamento termico avvenga a valori di pH prossimi o lontani dal loro punto isoelettrico. Mentre nel primo caso il meccanismo è regolato dalla diminuzione della repulsione di carica, nel secondo l'aggregazione proteica è modulata da interazioni di tipo idrofobico e dalla formazione di ponti disolfuro. Inoltre, come indicato in **Tabella 2.1**, intorno alla temperatura di 80°C avviene una svolta importante

sul piano quantitativo relativamente ai meccanismi che governano l'aggregazione delle sieroproteine (idrofobicità, dimensione delle particelle, concentrazione di  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La). Fino a questo momento abbiamo descritto il fenomeno della denaturazione delle sieroproteine facendo riferimento unicamente a  $\beta$ -lattoglobulina e  $\alpha$ -lattalbumina.

**Tabella 2.1 – Valutazione dell'effetto di trattamenti termici progressivi sulla modificazione di alcune proprietà di un concentrato sieroproteico (WPC 80% proteine), (da Mucchetti e Neviani, 2006)**

<b>Trattamento termico</b>	<b>Nessuno</b>	<b>76,7°C</b>	<b>79,4°C</b>	<b>82,2°C</b>
Solubilità a pH 4.6	98,0	69,2	53,0	46,3
$\beta$ -lattoglobulina (mg/g proteina)	512	324	117	77
$\alpha$ -lattalbumina (mg/g proteina)	147	135	111	122
Idrofobicità (ANS)	307	460	658	757
Dimensione delle particelle ( $\mu$ m)	2,9	7,8	36,3	44,5

WPC = whey protein concentrate (concentrato sieroproteico);  
ANS = 1-anilino-8-naphtalene-sulphonate

Tuttavia il siero oltre a queste due componenti principali presenta altre frazioni sieroproteiche, nonché peptidi derivanti dalla coagulazione presamica (il caseinomacropetide, e frammenti dell' $\alpha_{S1}$ -caseina), frammenti della  $\beta$ -caseina (derivanti dall'attività della plasmina) e parte delle proteine della membrana del globulo di grasso. Tuttavia parleremo in dettaglio di queste componenti e del loro recupero nella parte sperimentale di questa tesi relativa alla produzione di ricotta da siero ovino concentrato per ultrafiltrazione (vedi capitolo 7).

### **2.6.3 Separazione della ricotta dalla scotta**

Il reticolo formato dalle proteine denaturate e aggregate ingloba il grasso, dando origine ad un coagulo di tenue consistenza che affiora spontaneamente. L'affioramento completo della ricotta alla superficie e il suo rassodamento per renderne agevole ed efficace la successiva estrazione, richiedono tempi di sosta che vanno indicativamente dai 5 ai 20 minuti. Il processo di estrazione della ricotta, e quindi la sua separazione dalla scotta (la componente liquida che residua dalla lavorazione), può avvenire in modo manuale o attraverso una meccanizzazione che è stata resa sempre più efficiente a partire dagli anni ottanta del secolo scorso. Il procedimento manuale di "cavatura" della ricotta dalla superficie richiede l'utilizzo di un mestolo forato o di una "spannarola", e richiede una certa attenzione da parte dell'operatore nell'eseguire l'estrazione. Infatti la resa di trasformazione in ricotta è legata non solo alla corretta aggregazione delle sieroproteine, ma anche al modo in cui la ricotta è estratta. Una volta terminata la procedura di estrazione la ricotta è posta a drenare dalla scotta residua in fiscelle o in tela, e normalmente lo sgrondo della scotta termina in poche ore. Nelle pratiche tradizionali, e anche in quelle industriali del settore ovino, la ricotta in fiscella o in cassette su tela viene lasciata spurgare a temperatura ambiente per tempi compresi tra 20 minuti e 4 ore; successivamente è trasferita in cella frigorifera (Mucchetti e Neviani, 2006).

### **2.6.4 Confezionamento a caldo**

Il momento del drenaggio della scotta costituisce il punto classico di possibile post-contaminazione microbica della ricotta, con conseguente riduzione della *shelf-life* a causa di alterazioni di vario genere (acidificazione, formazioni di odori o gusti sgradevoli, produzione di gas e bombatura delle confezioni, ecc). Vengono, pertanto, applicati degli accorgimenti per ridurre tali rischi:

- riduzione della durata del periodo di sgrondo della scotta;
- immissione anticipata della ricotta in cella frigorifera;

- miglioramento delle condizioni igieniche degli ambienti ove viene condotto lo spurgo;
- impiego di fiscelle monouso.

Tuttavia anche con l'utilizzo di tali soluzioni, la ricotta difficilmente raggiunge una vita commerciale superiore ai 20-30 giorni. Per ovviare al problema della limitata conservabilità della ricotta è stata introdotta la pratica del confezionamento a caldo della stessa, che viene attuato di norma nel prodotto sottoposto preventivamente ad uno spurgo rapido (Mucchetti e Neviani, 2006).

### ***2.6.5 Resa e composizione fisico-chimica della ricotta ovina***

La resa di trasformazione ponderale in ricotta ovina (kg ricotta / 100 kg di materia prima) è estremamente variabile, in quanto il processo come detto precedentemente risulta fortemente condizionato da un gran numero di parametri, tra cui i più rilevanti sono la temperatura utilizzata per la denaturazione delle sieroproteine, e la tecnica di estrazione. I valori di resa riportati in letteratura per la ricotta ovina oscillano tra 4,5 e 12% (Mucchetti e Neviani, 2006). In **Tabella 2.2** è mostrata la composizione fisico-chimica di ricotte ovine di produzione industriale (Mucchetti et al., 2002).

**Tabella 2.2 – Composizione fisico-chimica di ricotte ovine di produzione industriale (da Mucchetti et al., 2002)**

	<b>Media</b>	<b>Deviazione standard</b>	<b>Min.</b>	<b>Max</b>
Residuo secco	29,97	3,72	23,05	36,94
Grasso	18,21	4,91	9,00	28,20
Proteine	7,82	0,69	6,68	8,92
Azoto non proteico (NPN)	0,06	0,01	0,05	0,07
Ceneri	0,53	0,14	0,33	0,70
NaCl	0,17	0,05	0,13	0,27
Lattosio	3,74	0,30	3,16	4,36
Rapporto grasso/proteine	2,38	0,74	1,01	3,61
pH			6,39	6,66

## 3. LE TECNOLOGIE DI FILTRAZIONE A MEMBRANA

### 3.1 Definizione dei processi di separazione a membrana

I processi a membrana si basano sull'impiego di filtri semipermeabili o ione-selettivi per mezzo dei quali è possibile ottenere la separazione a livello molecolare e ionico dei soluti organici ed inorganici e dei solventi in cui sono disciolti (Cheryan, 1998). L'operazione di filtrazione consiste nella separazione di determinate componenti da un fluido. Nell'uso convenzionale è riferita alla separazione di un solido da un liquido o da un gas. Il ruolo primario della membrana è quello di agire come barriera selettiva, che può permettere il passaggio di alcune componenti e trattenere le altre che compongono la miscela di partenza.

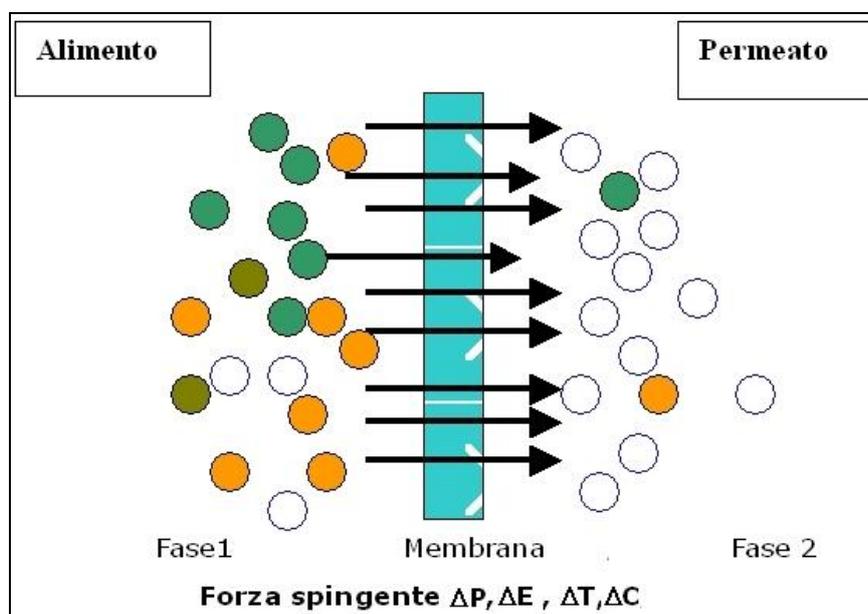
Le tecnologie di membrana consentono di separare soluti fra loro senza apporto di calore, cioè senza passare attraverso processi di evaporazione e condensazione.

La possibilità di effettuare separazioni di composti disciolti in acqua è particolarmente importante nel settore agro-alimentare, dove i trattamenti termici ad esempio di evaporazione del solvente, hanno effetti dannosi sulle sostanze nutrienti termolabili, come le vitamine idrosolubili.

Le particelle di soluto in acqua sono separate sulla base delle dimensioni e della struttura molecolare, sotto la spinta di una "driving force" che può essere: la pressione, il potenziale elettrico, la tensione di vapore, la concentrazione. Una rappresentazione schematica della separazione a membrana è riportata in **Figura 3.1**. La fase 1 è costituita dall'alimento o "feed" e può essere composta da diverse specie molecolari, mentre la fase 2 è considerata permeato o "downstream".

La separazione fra le molecole avviene perché la membrana ha la capacità di trasportare, in maniera selettiva, un componente dalla fase 1 alla fase 2. La membrana non è una barriera ideale, ma è una barriera non perfetta; essa lascia passare anche molecole indesiderate. Le prestazioni di una membrana e la sua efficienza sono misurate da due parametri fondamentali: la selettività ed il flusso di permeato. La selettività esprime la capacità della membrana di separare le molecole fra loro, mentre il flusso esprime la produzione, cioè il volume che passa attraverso una superficie unitaria di membrana per unità di tempo. Per introdurre i fenomeni che regolano la permeazione

attraverso le membrane è necessario anche definire e sottolineare gli aspetti salienti della tecnologia di filtrazione tangenziale per liquidi, controllata dalla pressione.



**Figura 3.1** – Rappresentazione schematica della separazione a membrana. La forza spingente può essere rappresentata dalla differenza di:  $\Delta P$ , pressione;  $\Delta E$ , potenziale elettrico;  $\Delta T$ , temperatura;  $\Delta C$ , concentrazione.

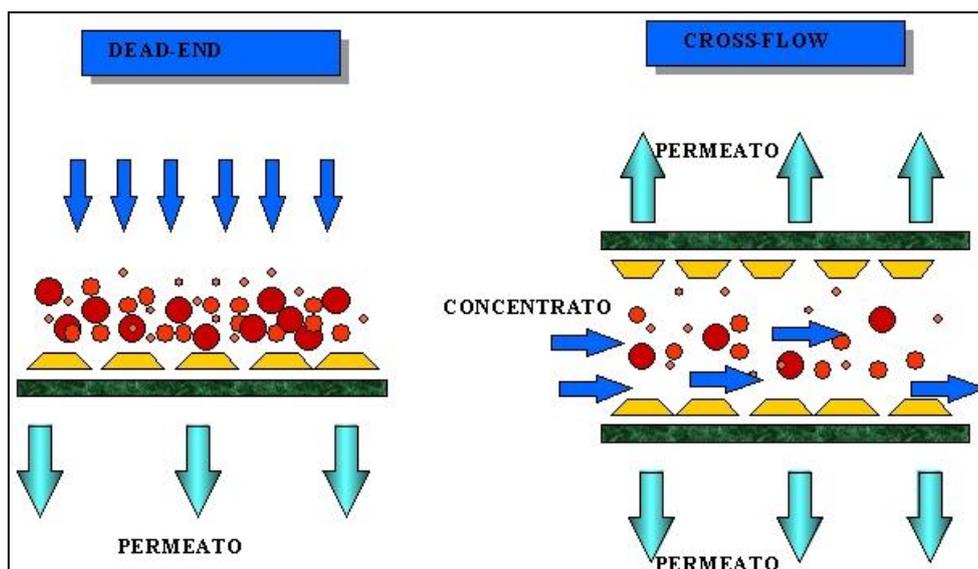
Essa è concettualmente differente dalla filtrazione tradizionale (dead end) che avviene perpendicolarmente al filtro. Questo processo genera un rapido intasamento dei pori, e conseguentemente si registra una caduta di produttività del sistema separativo (schema di sinistra della **Figura 3.2**).

Nella filtrazione tangenziale il liquido trattenuto dal filtro viene spinto ad alta velocità di scorrimento da una pompa, che quindi rimuove in continuo il deposito che viene a formarsi sulla membrana. Il risultato di questa condizione si traduce in una produttività più alta della membrana (schema di destra della **Figura 3.2**). La filtrazione tangenziale offre quindi l'opportunità di operare in condizioni stazionarie, con un flusso di permeato piuttosto costante a parità di pressione idraulica applicata.

Pertanto, ciò che distingue i processi a membrana rispetto ad altre tecniche separative, è l'applicazione della pressione idraulica che aumenta la velocità di trasporto dei soluti e del solvente (Cheryan, 1998). Sarà poi la natura della membrana e la sua conformazione strutturale ad influenzare, insieme ai parametri chimico-fisici, il

meccanismo di trasporto dei soluti e quindi la selettività del processo. In un processo separativo che opera in condizioni di flusso tangenziale, è possibile sempre distinguere le seguenti tre correnti di fluido:

- un alimento che viene pompato nel modulo a membrana;
- un permeato, che costituisce la corrente che fluisce attraverso il filtro;
- un concentrato o retentato formato da tutto ciò (soluzione e soluti) che è respinto dal filtro.



**Figura 3.2** – Confronto tra filtrazione tradizionale (dead-end) e tangenziale (cross-flow)

La **Figura 3.3** mostra lo schema di un processo separativo in cui entra un alimento e escono due correnti, rispettivamente permeato e concentrato.

Il processo a membrana consente quindi il recupero delle correnti di permeato e concentrato che possono costituire, entrambe, prodotti d'interesse pratico e commerciale.

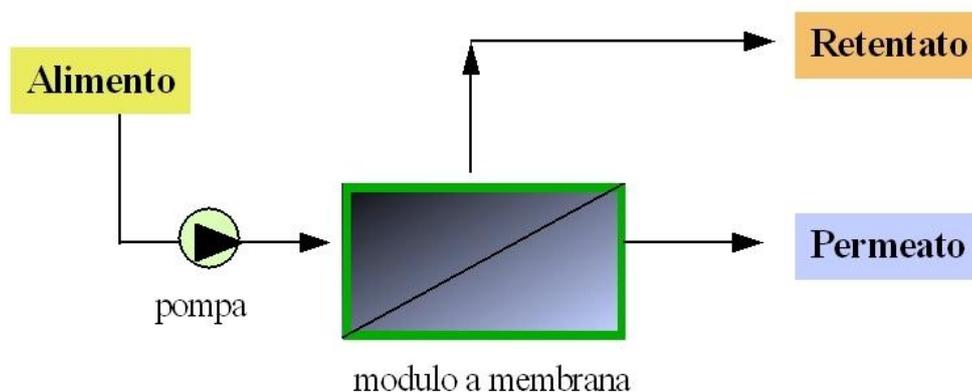
Gli impianti a membrana sono facilmente dimensionabili per grandi strutture aziendali e si caratterizzano per un basso impatto ambientale. Infatti le membrane a fine ciclo d'uso possono essere lavate e rigenerate con acqua e soluzioni chimiche che costituiscono gli unici effluenti residui del processo.

Il filtro-membrana è assemblato in un sistema ingegnerizzato, detto modulo, che permette di sfruttare le proprietà di permeabilità e selettività della membrana stessa. Le membrane non devono intendersi come strutture filtranti inerti rispetto alle specie chimiche in soluzione, poiché possono essere chimicamente o fisicamente modificate per permettere il passaggio di alcune specie chimiche, attraverso meccanismi di scambio ionico e di canale ionico preferenziale. Così le membrane possono essere passive o reattive, in funzione della loro proprietà di alterare la natura chimica delle specie permeanti. Un'altra classificazione riguarda la natura chimica della membrana che può essere costituita:

- da polimeri naturali o da sostanze polimeriche di sintesi;
- da materiali ceramici e metallici.

Inoltre, sulla base della struttura conformazionale si classificano in porose, compatte, composite, ecc. (Cheryan 1998).

La composizione del materiale che costituisce la membrana deve essere compatibile con la chimica del processo considerato. Infatti, bisogna considerare che anche la composizione chimica del materiale che compone la membrana non è indifferente al processo separativo considerato, poiché la stessa polarità della membrana diventa determinante per i fenomeni di trasporto dei soluti o dell'acqua. Inoltre il materiale utilizzato per la costruzione delle membrane deve essere compatibile con le condizioni dei lavaggi con cui si rigenera la produttività dei filtri dopo un periodo di funzionamento.

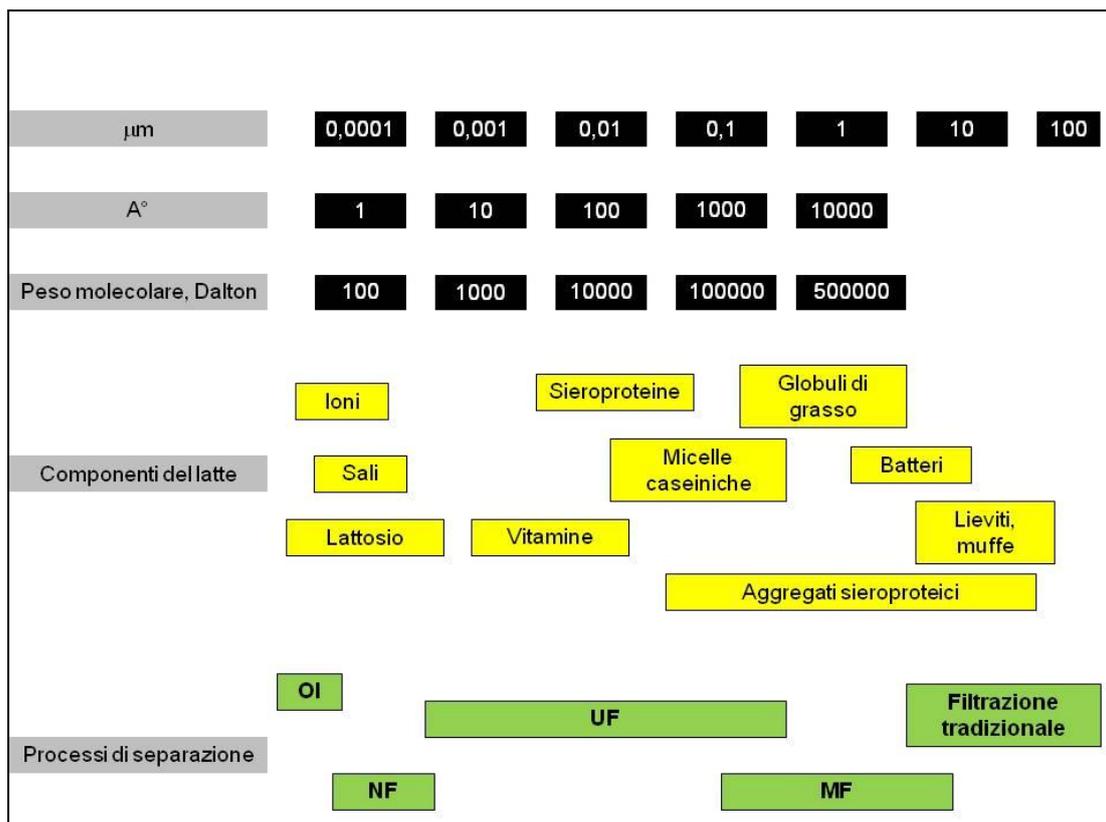


**Figura 3.3** – Principio operativo delle tecnologie di filtrazione a membrana

## 3.2 Tecniche specifiche di filtrazione tangenziale

La **Figura 3.4** indica gli intervalli dimensionali delle specie chimiche interessate ai processi separativi a membrana controllati dalla pressione idraulica.

Esistono quattro principali processi separativi a membrana controllati dalla pressione idraulica: l'osmosi inversa (OI), la nanofiltrazione (NF), l'ultrafiltrazione (UF), e la microfiltrazione (MF). Ognuno di essi è specifico nel permettere la ritenzione o la permeazione di specifiche componenti chimiche nel corso del loro passaggio attraverso la membrana semipermeabile. Si può affermare che l'OI ritiene tutte le componenti chimiche escluso il solvente "acqua"; la NF ritiene i sali bivalenti, i glucidi e gli acidi dissociati; l'UF ritiene le macromolecole o le particelle con dimensioni comprese fra 10 e 200 Å (0,001-0,02 µm). Il processo di MF si colloca nell'intervallo di ritenzione delle particelle con diametro dell'ordine dei micron (intervallo 0,1-10 µm). Le particelle più grandi dei 10 µm sono facilmente eliminabili attraverso processi di filtrazione convenzionale. Per questo motivo la maggior parte degli impianti di filtrazione tangenziale, compresi quelli di MF, sono accoppiati ad un pre-filtro che ha lo scopo di rimuovere le particelle e le impurezze di dimensioni maggiori per salvaguardare così anche l'integrità strutturale delle membrane. Mentre l'OI è definita come una tecnica di "dewatering", e per tale motivo, è utilizzata soprattutto nei processi di dissalazione delle acque, la MF può essere considerata come una tecnica di chiarificazione; infatti, rimuove le particelle sospese rispetto alle sostanze disciolte in soluzione: quindi è una tecnica che permette di trasformare una sospensione in una soluzione. L'ultrafiltrazione invece può essere considerata una tecnica che permette, simultaneamente, di purificare, concentrare e frazionare macromolecole o fini sospensioni colloidali. Semplificando, per trattenere batteri e grassi si deve utilizzare una tecnica di MF, per le proteine un processo di UF, per il lattosio la NF e per i sali minerali l'OI (Cheryan, 1998). Dal momento che le molecole che vengono separate nei processi di MF e UF sono piuttosto grandi, la pressione osmotica coinvolta in questi processi è trascurabile. Al contrario la pressione osmotica nel caso dell'OI è piuttosto elevata (7-30 bar), a causa delle elevate pressioni osmotiche dei piccoli soluti. Di conseguenza le pressioni idrauliche di esercizio applicate avranno il seguente ordine: MF (< 2 bar) < UF (1-10 bar) < NF (10-20 bar) < OI (10-70 bar).



**Figura 3.4** – Spettro dimensionale delle particelle (con particolare riferimento al latte) in relazione alle caratteristiche separative dei diversi processi di filtrazione

### 3.3 Principali applicazioni dei processi a membrana nell'industria casearia

Le tecnologie di separazione su membrana hanno avuto negli ultimi anni un vertiginoso incremento applicativo nei settori più disparati, che vanno dal biomedico (dialisi renale), all'industria agro-alimentare, al trattamento delle acque reflue, alle applicazioni nell'industria metalmeccanica e tessile, alla produzione di acqua potabile da quella marina. In ambito alimentare e, più specificamente, nell'industria casearia, le tecnologie di filtrazione su membrana vengono ormai utilizzate da più di quarant'anni.

Queste tecniche trovano il loro impiego negli aspetti relativi alla concentrazione del latte e del siero, e quindi nella produzione dei formaggi e dei prodotti caseari in genere (Mistry & Maubois, 2004).

In particolare, per la produzione di formaggi fermentati, le tecniche di filtrazione su membrana possono essere utilizzate con varie modalità e su substrati differenti (latte, siero o direttamente sulla cagliata), nell'ambito del processo produttivo (Hinrichs, 2001). Tra i principali vantaggi relativi all'utilizzo di tali tecniche, per la produzione dei formaggi fermentati, vi è indubbiamente un miglioramento delle condizioni igieniche in confronto alle tecnologie di produzione tradizionali (Cheryan, 1998).

Inoltre l'utilizzo delle tecnologie di filtrazione su membrana consente di ottenere retentati con elevate concentrazioni di calcio e minerali legati alle caseine in forma colloidale. Questo aspetto può essere particolarmente importante nella produzione di formaggi freschi, in cui la cagliata subisce una demineralizzazione spinta in seguito alla fermentazione, e il coagulo acido può essere aiutato nella sua formazione dall'abbondanza di queste componenti (Carminati, 2001).

La tecnica più diffusa per la produzione di questa categoria di prodotti consiste nell'applicazione dell'UF alla cagliata acida, in sostituzione dello spurgo del siero mediante l'utilizzo di sacchi, teli o separatori centrifughi per cagliata. Un'altra applicazione delle tecniche di filtrazione su membrana (UF, NF), consiste nel concentrare le componenti del latte prima della coagulazione, eliminando la fase di spurgo del siero dalla cagliata. Inoltre è possibile concentrare mediante UF il siero di latte, ed utilizzarlo successivamente nel corso del processo di lavorazione (addizionato al latte o alla cagliata), allo scopo di migliorare la resa e la consistenza dei formaggi.

### **3.3.1 Ultrafiltrazione della cagliata**

La tecnica di UF applicata alla cagliata acida per la produzione di *quark* (Ottosen, 1996) consiste nella produzione di un concentrato (retentato) costituito dalle componenti del latte coagulato per acidificazione. Le fasi della tecnologia per la produzione di questi formaggi non variano fino al momento del drenaggio del siero, dove l'UF sostituisce le tecniche di separazione tradizionali.

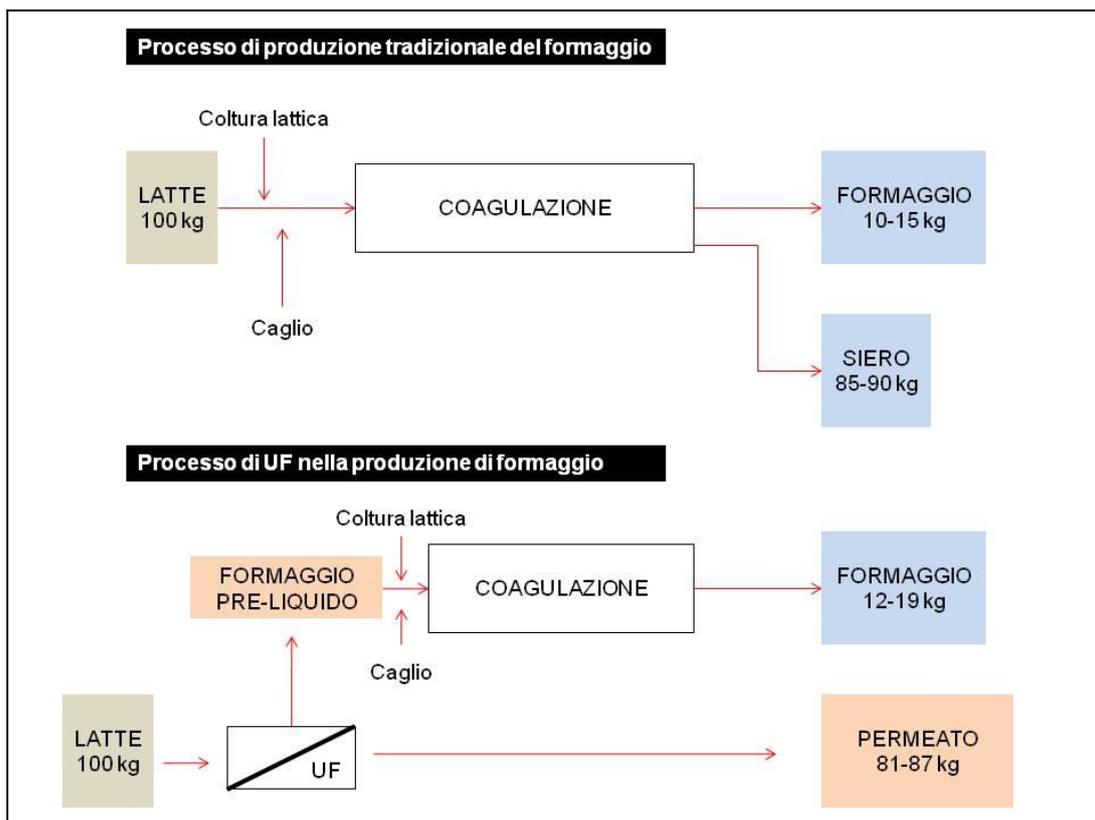
La concentrazione per UF procede fino al raggiungimento del livello desiderato di solidi nel formaggio. Il processo basato sull'UF della cagliata determina dei vantaggi rispetto a quello che prevede la separazione centrifuga, soprattutto in termini di resa casearia. Gli incrementi di resa sono dovuti al fatto che le sieroproteine sono trattenute nel

formaggio, nel quale fra l'altro, migliorano la capacità di trattenere l'acqua. A questo proposito è stato riscontrato che con l'applicazione dell'UF nella produzione di quark (a partire da latte vaccino scremato) al 18% di solidi totali, gli incrementi di resa risultano superiori del 22-24% rispetto al processo tradizionale in cui il formaggio viene drenato in sacchi (Ottosen, 1996).

### **3.3.2 Filtrazione su membrana del latte**

Già alla fine degli anni '60 Maubois, Mocquot, & Vassal (1969) pensarono ad una tecnologia che consentisse il drenaggio del siero prima della coagulazione del latte in modo da concentrarne le componenti principali, e rimuovere la necessaria quantità di acqua, lattosio e minerali prima della caseificazione. Essi raggiunsero questo risultato con l'applicazione della tecnica di UF. Il processo prevedeva la concentrazione del latte sino a 5 volte, fino ad ottenere un prodotto, il pre-formaggio liquido (retentato), che aveva la stessa composizione del formaggio drenato (Maubois & Mocquot, 1971). Successivamente, gli stessi autori (Maubois & Moquot, 1975), misero a punto un processo che prevedeva la concentrazione del latte per UF allo scopo di produrre un formaggio fresco. In questo caso, al termine del processo di concentrazione, il pre-formaggio liquido veniva addizionato di fermenti e caglio (in piccole quantità) e mantenuto a 18-20°C per una notte. Quando il pH raggiungeva il valore di 4,7, la cagliata veniva rimescolata, e addizionata di crema. Completata la miscelazione, il prodotto veniva omogeneizzato a basse pressioni, raffreddato a 4-6°C, e quindi confezionato (**Figura 3.5**).

Il principale vantaggio di questo processo è rappresentato dall' aumento della resa di trasformazione, che in questo prodotto corrisponde al 16-20% in più rispetto allo stesso formaggio fabbricato in maniera tradizionale. Tali incrementi di resa sono dovuti alla ritenzione nel formaggio di proteine "nobili", quali le proteine solubili del latte. Infatti, con l'UF solo l'azoto non proteico passa attraverso la membrana (ovvero circa il 5% delle sostanze azotate del latte vaccino), mentre tutte le proteine del latte, siano esse caseine o proteine solubili, rimangono nel retentato, e quindi nel formaggio. Al contrario, nel processo di produzione tradizionale (nella coagulazione presamica), le sieroproteine vengono rilasciate nel siero.



**Figura 3.5** – Confronto tra il processo tradizionale di produzione del formaggio ed il processo di UF proposto da Maubois & Moquot (1975), (rielaborato da Cheryan, 1998)

Più di recente è stata valutata l'opportunità di migliorare il recupero dei costituenti del latte nei formaggi freschi, studiando in maniera approfondita l'applicazione della NF.

Tale tecnica, applicata al latte, dà origine a retentati con caratteristiche differenti, rispetto a quelli prodotti con l'UF. A tal proposito, in **Tabella 3.1** vengono riportate alcune differenze relativamente alla concentrazione di alcune componenti nel latte scremato e nei retentati di UF e NF, ottenuti con un fattore di concentrazione pari a 2. Uno degli aspetti più interessanti riguarda la concentrazione maggiore di minerali e lattosio nel retentato di NF, rispetto a quello di UF. Questo elevato recupero di lattosio rappresenta spesso un limite all'utilizzo della NF nella tecnologia casearia. Infatti l'eccesso di questo glucide può determinare difetti organolettici nel formaggio, a causa di un'aumentata fermentazione lattica.

Mucchetti, Zardi, Orlandini, e Gostoli (2000), hanno messo a punto una tecnologia basata sulla pre-concentrazione del latte tramite NF, per la produzione di un formaggio fresco *tipo-quark*. Il processo sperimentale prevedeva la produzione del formaggio a

partire da latte scremato concentrato 2 volte, tramite NF. Il formaggio è stato prodotto secondo la seguente tecnologia: il retentato di NF veniva riscaldato a 70°C per 5 min e poi raffreddato a 25°C. A questo punto venivano aggiunti i fermenti lattici mesofili e una piccola quantità di caglio. La coagulazione e la fermentazione avvenivano nelle 18 ore successive alla temperatura di 25°C. Al termine di questo periodo la cagliata acida (pH 4,5) veniva sottoposta a lieve agitazione e, quindi, separata dal siero tramite teli di lino, alla temperatura di 5°C, e per circa 24h.

**Tabella 3.1 – Differenze di composizione tra latte scremato, e retentati di UF e NF con fattore di concentrazione pari a 2, (da Schkoda, 2003)**

Componenti (%)	Latte scremato	Retentato di NF (2X)	Retentato di UF (2X)
Acqua	90,8	83,4	87,0
Proteine	3,50	7,00	7,00
Lattosio	4,80	8,30	4,80
Calcio	0,12	0,24	0,22
Minerali	0,75	1,35	1,10

Il recupero delle componenti del latte nel formaggio sperimentale era pari al 70,6%, e la resa era pari al 28%. Tali valori risultavano superiori a quelli ottenibili con l'utilizzo di altre tecnologie. Gli aspetti più rilevanti dell'applicazione della NF in questo lavoro, riguardavano la concentrazione nel *quark* di componenti come lattosio e calcio. Infatti il lattosio, nel *quark* ottenuto per concentrazione del latte tramite NF, era presente in concentrazioni elevate (6,1%, contro il 2,5-3,4% che si riscontra nel *quark* prodotto con altre tecnologie), così come il calcio (2 g.kg<sup>-1</sup> contro 0,03-1,9 g.kg<sup>-1</sup> riscontrati nel *quark* prodotto con altre tecnologie). Per quanto riguarda il contenuto in calcio, i valori riscontrati nel *quark* da NF sono tuttavia simili a quelli riscontrabili nel *quark* da UF (Nakazawa, Furusawa, Hohno, Shida, 1991), in quanto questo elemento, essendo associato alle caseine, si concentra in massima parte nel retentato (**Tabella 3.1**).

Nonostante l'elevata concentrazione di calcio, questo formaggio ottenuto da latte nanofiltrato, non presentava difetti di amaro, che invece sono spesso associati al quark prodotto da latte ultrafiltrato. Secondo gli autori, tale aspetto potrebbe essere correlato all'elevata concentrazione di lattosio, che rende il prodotto più dolce e, nel contempo, al differente rapporto tra ioni multivalenti/monovalenti nel quark da NF rispetto al quark da UF (Mucchetti et al., 2000).

Un altro studio relativo alla possibile applicazione della tecnica di NF nella produzione di un formaggio fresco tipo quark è stato presentato da Schkoda (2003). L'autore ha esaminato un processo ad un singolo stadio di concentrazione, in cui il latte viene sottoposto al processo di NF e la cagliata acida ottenuta dalla fermentazione del retentato, non necessita di alcuna separazione di siero. Il latte scremato viene nanofiltrato, fino al raggiungimento di una quantità di proteine pari al 10%. Successivamente il retentato viene miscelato con latte intero (e/o crema), sottoposto al trattamento termico (80°C per 7 minuti), e avviato alla trasformazione. La scelta della coltura batterica veniva effettuata tenendo conto del differente comportamento all'acidificazione del latte concentrato per NF, rispetto al latte tal quale, a causa dell'elevata concentrazione di proteine e sali minerali, che condizionano il potere tampone del substrato. Per lo stesso motivo anche la quantità dei fermenti aggiunti risultava più elevata rispetto al processo tradizionale (2-5%, contro 1-2%).

Dal punto di vista strutturale il formaggio presentava una struttura cremosa ed una notevole capacità di trattenere il siero, rispetto al formaggio prodotto in maniera tradizionale. Questo risultato può essere attribuito alla migliore integrazione dei globuli di grasso nella struttura del gel, in considerazione del fatto che la crema, in questo esperimento, è aggiunta direttamente al concentrato prima della fermentazione, contrariamente a quanto avviene nei processi tradizionali dove la crema viene solitamente aggiunta alla cagliata.

Tuttavia tali aspetti, relativi alla struttura del formaggio, sono da attribuire con maggiore probabilità, al processo di NF. Infatti i formaggi freschi fabbricati con retentato di NF presentano spesso una struttura cremosa ed una notevole capacità di trattenere il siero, in particolare se confrontati con i formaggi prodotti in maniera tradizionale o con quelli prodotti da retentato di UF (**Tabella 3.2**). Inoltre, rispetto a questi ultimi, i formaggi fabbricati da retentato di NF risultano meno viscosi e consistenti.

**Tabella 3.2 – Differenze nelle proprietà strutturali di lattici fermentati ottenuti a partire da latte scremato, e retentati di UF e NF con fattore di concentrazione pari a 2, (da Schkoda, 2003)**

<b>Proprietà</b>	<b>Latte scremato</b>	<b>Retentato di NF (2X)</b>	<b>Retentato di UF (2X)</b>
pH	4,7	4,7	4,7
Viscosità (PAS)	0,05	0,15	0,20
Capacità di trattenere il siero (%)	25	70	53
Consistenza (N)	0,9	2,4	2,7
Proprietà sensoriali	Troppo fluido	Cremoso	Gelatinoso Piatto

### **3.3.3 Ultrafiltrazione del siero**

Generalmente, il siero derivato dalla trasformazione del latte in formaggio non viene adeguatamente valorizzato, e spesso costituisce uno scarto di produzione. La tecnica di UF rappresenta un valido metodo per la valorizzazione di questo sottoprodotto, in quanto consente di recuperare, in maniera completa, le proteine ad alto valore biologico in esso contenute, riducendo nel contempo il suo carico inquinante.

Come vedremo nel Capitolo 7 del presente lavoro, la concentrazione del siero tramite UF può essere applicata con successo nella produzione di ricotta caratterizzata da un elevato contenuto in sieroproteine denaturate ed un ridotto contenuto in grasso.

L'utilizzo in caseificazione del retentato di siero in quantità variabili (aggiunto al latte o alla cagliata), consente di migliorare la resa e le caratteristiche nutrizionali del prodotto. Un'applicazione di questa tecnica prevede l'aggiunta del siero, preventivamente concentrato e denaturato, al formaggio fresco derivato da un processo di trasformazione tradizionale. In particolare il siero acido, ottenuto dal drenaggio della cagliata viene concentrato per UF, sottoposto a trattamento termico, e quindi aggiunto al formaggio. In questo caso il recupero delle sieroproteine nel formaggio oscilla tra il 50% e il 100%, in base alla quantità di retentato che viene aggiunta al prodotto. Hinrichs

(2001) riporta che eccessive aggiunte di retentato di siero potrebbero determinare l'insorgere di sapori anomali nei formaggi freschi.

Anche altri autori (Tratnik, Benkovic, Borovic, Subaric, 1996) hanno svolto alcuni studi allo scopo di verificare la possibilità di utilizzare le sieroproteine concentrate, nella produzione di formaggio fresco. In particolare, le finalità del lavoro erano quelle di individuare una procedura che consentisse l'aggiunta della maggior quantità possibile di sieroproteine, senza influire negativamente sulle proprietà sensoriali e reologiche del prodotto. Nel caso specifico il retentato di siero dolce, denaturato termicamente, veniva aggiunto al latte in trasformazione prima e dopo la fermentazione. Inoltre nell'ambito della stessa prova, il retentato di siero denaturato e drenato, veniva aggiunto direttamente al formaggio fresco in dosi crescenti.

In questo lavoro è stato riscontrato che la quantità di sieroproteine trattenute nel formaggio è indipendente dal momento in cui viene aggiunto il retentato (prima o dopo la fermentazione). Tutti i formaggi addizionati di retentato di siero, nelle differenti modalità, presentavano incrementi medi di resa del 20% rispetto al formaggio tradizionale. Per quanto riguarda la consistenza, i formaggi sperimentali sono risultati lievemente meno compatti rispetto al formaggio tradizionale, a causa di una struttura meno omogenea della pasta.

Da un punto di vista sensoriale non sono state riscontrate grosse differenze tra i formaggi sperimentali ed il controllo, fino a quando la quantità di retentato aggiunto non superava una certa concentrazione. In particolare si è visto che quando le percentuali di retentato aggiunte erano superiori al 50%, i formaggi perdevano il loro caratteristico gusto fresco-acido, assumevano sapore di cotto, fino a divenire insapore e gessosi nel caso di aggiunte di retentato ancora più elevate.

## 4. I PRODOTTI FUNZIONALI

### 4.1 Che cosa si intende per prodotti funzionali?

Nelle ultime decadi, la domanda del consumatore in ambito alimentare è cambiata in maniera considerevole. I consumatori credono in misura sempre maggiore che il cibo abbia un notevole impatto sul mantenimento di un buon stato di salute. Così oggi i cibi non sono intesi solo come veicolo di nutrienti necessari per il sostentamento, ma soprattutto come prodotti in grado di prevenire malattie legate alla nutrizione e migliorare il benessere fisico e mentale. In questo contesto, i prodotti alimentari funzionali giocano un ruolo rilevante. Il termine “alimento funzionale” o “functional food” fu introdotto per la prima volta in Giappone negli anni '80, per indicare alimenti fortificati con specifici costituenti che garantivano effetti fisiologici benefici. I “functional foods” possono migliorare le condizioni generali dell'organismo (pre-probiotici), ridurre il rischio legato ad alcune malattie (prodotti che riducono il colesterolo ematico), e possono anche essere utilizzati per curare alcuni stati patologici.

In linea generale, un alimento etichettato come funzionale contiene ingredienti ad esso addizionati che derivano da un procedimento tecnologico, e che sono in grado di determinare uno specifico effetto benefico sulla salute (Niva, 2007). Sebbene il termine “alimento funzionale” sia stato definito innumerevoli volte, ad oggi non esiste una definizione accettata in modo univoco. In molti Paesi non esiste una definizione legislativa del termine, ed il tracciare una linea di confine tra prodotti convenzionali e “functional foods” sta diventando una sfida anche per esperti della nutrizione e delle tecnologie alimentari (Niva, 2007). Si passa da definizioni piuttosto semplici ad altre via via più complesse di cui riportiamo due esempi di seguito: “alimenti che possono fornire effetti salutistici benefici, che vanno oltre la nutrizione di base”, e “alimenti simili nell'aspetto ai prodotti convenzionali che devono essere consumati come parte di una normale dieta, ma sono stati modificati per favorire attività fisiologiche, che vanno al di là del veicolare semplici nutrienti”. L'Azione Concertata della Commissione Europea sulla Scienza degli Alimenti Funzionali in Europa (FuFoSE), coordinata dall'International Life Science Institute (ILSI) ha redatto un documento di consenso sui concetti scientifici

degli alimenti funzionali in cui si definisce “funzionale” un “alimento per il quale è stato dimostrato, in modo soddisfacente, che esso influenza positivamente una o più funzioni biologiche dell’organismo, al di là degli adeguati effetti nutrizionali, migliorando lo stato di salute e benessere e/o riducendo il rischio di malattie” (Diplock, Aggett, Ashwell, Bornet, Fern, Roberfroid, 1999). Nello stesso documento si specifica che l’effetto benefico di un “alimento funzionale” deve essere conseguente ad un consumo quotidiano dello stesso ed in dosi considerate normali nella dieta. Un "alimento funzionale" può essere tale o per l'intera popolazione (es. bevande probiotiche) o per segmenti specifici di essa (es. lattici fermentati ipotensivi per individui ipertesi). Come requisiti fondamentali, per essere definito “funzionale” un alimento dovrebbe mostrare le seguenti caratteristiche:

- Essere un alimento (non una pillola, una capsula, o un integratore alimentare);
- Manifestare effetti riconosciuti dalla Comunità Scientifica;
- Esplicare, oltre ad adeguate caratteristiche nutrizionali, effetti benefici sulle funzioni dell’organismo, che possono migliorare il benessere e la salute o ridurre il rischio di malattie;
- Esercitare la sua funzione nelle quantità normalmente previste da una dieta equilibrata.

Da un punto di vista pratico, i “functional foods”, come enunciato anche nella definizione, possono essere prodotti di diverso tipo e si possono classificare nel modo seguente:

- **prodotti naturali**, in cui uno dei componenti è stato naturalmente migliorato attraverso speciali condizioni di crescita di un animale, oppure attraverso una nuova composizione alimentare somministrata ad esso, o ancora attraverso la manipolazione genetica, o altre possibilità (un esempio è rappresentato dall’incremento del contenuto di acido linoleico coniugato nel latte di ruminanti alimentati al pascolo);
- **prodotti trattati**, cioè alimenti che di base non contengono, o contengono solo piccole quantità di componenti bioattivi, e che per diventare “functional foods”

hanno subito interventi tecnologici di diverso tipo che ne hanno in qualche modo modificato la composizione. In particolare si può intervenire nei seguenti modi:

- eliminazione di uno o più componenti aventi effetti negativi sullo stato di salute (ad esempio eliminazione parziale o completa del grasso);
- addizione di nuovi componenti con effetti benefici, che non si trovano naturalmente nel prodotto di partenza o che vi si trovano in piccole quantità; in questo caso si parla di arricchimento (un esempio è rappresentato dall'aggiunta di fitosteroli nella margarina, i quali svolgono la funzione di ridurre i livelli di colesterolo e lipidi nel sangue);
- incremento del contenuto di uno o più nutrienti già esistenti nella materia prima di partenza, senza modificare il contenuto energetico dell'alimento; si parla di fortificazione (ad esempio, succhi di frutta fortificati con vitamina C);
- parziale sostituzione di uno o più componenti aventi effetti negativi sulla salute con altri ingredienti bioattivi (ad esempio, fibre utilizzate in sostituzione del grasso nelle carni o nei gelati);
- qualsiasi combinazione delle precedenti possibilità.

Gli ingredienti funzionali possono essere: 1) composti naturali, come ad esempio fibre prebiotiche, sostanze antiossidanti, acidi grassi polinsaturi, fitosteroli, minerali e vitamine, che si trovano in prodotti naturali, soprattutto di origine vegetale, e si ricavano da questi attraverso processi di separazione di tipo chimico o fisico; 2) composti sintetici, ottenuti ex-novo attraverso la sintesi chimica; oppure 3) composti prodotti attraverso l'applicazione di biotecnologie, come ad esempio l'uso di particolari enzimi o microrganismi capaci di sintetizzare un composto specifico.

## **4.2 Il mercato dei prodotti funzionali**

Come detto precedentemente, non è stato ancora chiaramente definito cosa si intende per "prodotti funzionali". Ciò rende piuttosto complicato stimare il mercato di questi prodotti. Comunque sulla base della definizione di "alimenti funzionali", secondo la quale essi sono prodotti tramite l'aggiunta di ingredienti che possiedono proprietà

benefiche per lo stato di salute e benessere (e questo viene annunciato al consumatore), il mercato globale di alimenti funzionali è stimato tra 33 e 61 miliardi di dollari americani. Il mercato più importante e dinamico è rappresentato dagli USA (superiore al 50% del totale), seguito da Europa e Giappone. Questi tre mercati contribuiscono ad oltre il 90% delle vendite totali. Negli USA il mercato degli “alimenti funzionali” rappresenta circa il 2-3% del mercato alimentare totale. Nel 2006 il mercato europeo dei “prodotti funzionali” era stimato essere pari a circa 15 miliardi di dollari, ed al momento non supera l’1% del mercato totale di cibi e bevande. Comunque, deve essere sottolineato che il mercato europeo è piuttosto eterogeneo, ed in linea generale l’interesse del consumatore verso gli “alimenti funzionali” è superiore nei Paesi dell’Europa centrale e del nord, rispetto ai Paesi dell’area mediterranea, dove i consumatori apprezzano i prodotti naturali e freschi e li considerano migliori in termini salutistici (Siró, Kápolna, Kápolna, Lugasi, 2008). In base a quanto riportato da Euromonitor (2004), i maggiori mercati europei sono rappresentati da: Regno Unito (2,6 miliardi di dollari), Germania (2,4 miliardi di dollari), Francia (1,4 miliardi di dollari) e Italia (1,2 miliardi di dollari). In Italia la domanda di “prodotti funzionali” sta crescendo grazie al supporto della validazione scientifica riguardo l’efficacia dei prodotti, e grazie all’invecchiamento generale della popolazione ed al cambiamento degli stili di vita.

Inoltre, gli italiani negli ultimi 40 anni hanno ridotto in maniera consistente l’*intake* calorico giornaliero (da 2600 kcal a 2200 kcal al giorno, in maniera particolare grazie al minor consumo di cibi grassi, di proteine animali, e vino; dati ufficiali Ministero della Salute, 2007, [www.salute.gov.it](http://www.salute.gov.it)), e stanno riponendo sempre maggiore attenzione verso i prodotti alimentari che combinano nutrizione e salute.

Oltre 4000 prodotti sono stati riformulati attraverso la riduzione o l’eliminazione del NaCl, dei grassi, ed in particolare degli acidi grassi saturi e del colesterolo, al fine di soddisfare la domanda dei consumatori nazionali; in base ai dati Censis (2007) il 17% della vendita di prodotti alimentari in Italia è occupato dai “prodotti funzionali”.

Molti studi su scala nazionale hanno inoltre mostrato che le famiglie italiane, specialmente quelle con bambini, vanno alla ricerca della qualità e del valore salutistico dei cibi a dispetto dei prezzi, in contrasto con la riduzione generale negli acquisti alimentari. Alla fine del 2007 il 30% delle famiglie italiane dichiarava di consumare “alimenti funzionali” (ISMEA, 2007).

Inoltre, i “prodotti funzionali” stanno avendo sempre un maggiore successo grazie alla recente introduzione di nuove direttive dell’Unione Europea che hanno avuto l’effetto di aumentare il livello di fiducia degli italiani nell’etichettatura dei prodotti, in cui vengono riportate le informazioni validate su base scientifica delle virtù nutrizionali e salutistiche degli alimenti. Ovviamente, la crescente domanda di “prodotti funzionali” sta sempre più stimolando le grosse compagnie e le associazioni di produttori ad offrire nuovi prodotti. A titolo d’esempio possiamo citare Barilla, il più grande marchio alimentare italiano, che alla fine del 2007 ha deciso di lanciare “Alixir”, una linea di prodotti interamente dedicata alla salute e al benessere. L’offerta include diversi prodotti che dovrebbero avere la specifica funzione di aiutare il sistema cardiovascolare, il sistema immunitario, la funzionalità intestinale, e rallentare l’invecchiamento cellulare. Attualmente nel mercato italiano, i soli “alimenti funzionali” degni di nota, in termini di valore economico, sono gli yogurt, i prodotti caseari, le bevande e gli energy drinks. Al momento il mercato è dominato dalle grandi multinazionali, che possono permettersi grossi investimenti in termini di ricerca e sviluppo e marketing, tuttavia c’è un crescente numero di piccole compagnie italiane che si stanno concentrando su prodotti specifici per determinati bisogni salutistici, e stanno ottenendo importanti risultati in chiave economica (Annunziata & Vecchio, 2010).

### **4.3 I “prodotti lattiero-caseari funzionali”**

In linea generale, i prodotti lattiero-caseari possono essere divisi in tre grandi gruppi:

- prodotti di base (latte, latte fermentato, formaggi, gelati, ecc);
- prodotti a valore aggiunto, in cui la composizione del latte è stata modificata; ad esempio i prodotti in cui il grasso o il lattosio sono stati rimossi completamente o il loro contenuto è stato ridotto; oppure i prodotti arricchiti in calcio o vitamine; o ancora formule ipoallergeniche con proteine idrolizzate per bambini ipersensibili al latte; questi prodotti sono mirati a specifici gruppi di consumatori, ed in base alle opinioni individuali possono essere inclusi nella categoria dei “prodotti funzionali” o meno;

- “prodotti lattiero-caseari funzionali” in cui è scientificamente provato un effetto benefico sulla salute; tali prodotti sono basati sull’arricchimento del latte con un componente funzionale, oppure il prodotto è basato su ingredienti che originano dal latte. I più comuni e diffusi “prodotti lattiero-caseari funzionali” sono quelli con batteri probiotici, spesso arricchiti con carboidrati prebiotici (Saxelin, Korpela, & Mäyrä-Mäkinen, 2003).

#### **4.3.1 Il latte come “alimento funzionale”**

Il latte e i prodotti lattiero-caseari vengono spesso considerati dei “functional foods” naturali, dal momento che contengono molti componenti di natura diversa importanti nel ridurre il rischio di certe malattie e disturbi. A tal riguardo, la composizione del latte è stata già discussa in dettaglio nel Capitolo 1, ma è opportuno sottolineare l’importanza di alcune sue componenti nello svolgimento di importanti funzioni biologiche dell’organismo. Il latte è una fonte importante di diversi micronutrienti, in particolare di calcio e vitamina B2, ma anche di vitamina A e D, e di acidi grassi essenziali. La frazione lipidica del latte ha riscosso, e riscuote tuttora, grande interesse nella comunità scientifica. In particolare, negli ultimi anni sono stati approfonditi gli studi riguardanti gli acidi linoleici coniugati per i loro effetti positivi sull’organismo.

Comunque la componente più importante del latte, in termini salutistici, è rappresentata dalle proteine. Infatti, il latte è una matrice ricca in proteine di elevata qualità, che provvedono all’apporto di tutti gli amminoacidi essenziali; le caseine e le sieroproteine differiscono nelle loro proprietà fisiologiche e biologiche. Alcune delle proprietà biologiche delle proteine del latte vaccino sono mostrate in **Tabella 4.1**.

Le sieroproteine esplicano in maniera diretta tutta una serie di importanti funzioni fisiologiche a vantaggio dell’organismo, oltre ad essere delle proteine ad alto valore biologico per la loro composizione amminoacidica ricca in cisteina, triptofano e lisina, e la loro elevata digeribilità.

Invece, le caseine rappresentano soprattutto una ricca sorgente di precursori di peptidi biologicamente attivi (**Tabella 4.2**). I peptidi bioattivi si formano attraverso l’idrolisi enzimatica delle proteine o tramite l’attività proteolitica dei batteri lattici nel corso delle fermentazioni microbiche (Saxelin et al., 2003).

**Tabella 4.1 – Attività biologiche delle principali proteine del latte vaccino (modificato, da Saxelin et al., 2003)**

<b>Proteina</b>	<b>Funzioni</b>
Caseine ( $\alpha$ , $\beta$ , $\kappa$ )	Trasportatore di ioni (Ca, Fe, Zn, Cu); precursore di peptidi bioattivi
$\alpha$ -lattalbumina	Sintesi di lattosio nella ghiandola mammaria; trasportatore di calcio; proprietà anticarcinogeniche
$\beta$ -lattoglobulina	Trasportatore di retinolo; possibile antiossidante
Immunoglobuline (A, M, G)	Protezione immunitaria
Caseinomacropptide	Proprietà antivirali, bifidogeniche, e antibatteriche; rilascia peptidi che causano sazietà?
Lattoferrina	Legante delle tossine; proprietà antivirali, antimicrobiche; interviene nell'immunomodulazione; proprietà anticarcinogeniche, antiossidanti; facilita l'assorbimento del ferro
Lattoperossidasi	Antimicrobico
Lisozima	Antimicrobico; attività sinergica con immunoglobuline e lattoferrina

**Tabella 4.2 – Peptidi bioattivi derivati dalle proteine del latte vaccino (da Saxelin et al., 2003)**

<b>Peptidi bioattivi</b>	<b>Precursore proteico</b>	<b>Attività biologica</b>
Casomorfine	$\alpha$ , $\beta$ -caseina	Agonisti oppioidi
$\alpha$ -lattorfina	$\alpha$ -lattalbumina	Agonisti oppioidi
$\beta$ -lattorfina	$\beta$ -lattoglobulina	Agonisti oppioidi
Lattoferroxine	Lattoferrina	Antagonisti oppioidi
Casoxine	$\kappa$ -caseina	Antagonisti oppioidi
Casochinine	$\alpha$ , $\beta$ -caseina	Antipertensivo
Casoplateline	$\kappa$ -caseina, transferrina	Antitrombotico
Casecidina	$\alpha$ , $\beta$ -caseina	Antimicrobico
Isracidina	$\alpha$ -caseina	Antimicrobico
Immunopeptidi	$\alpha$ , $\beta$ -caseina	Immunostimolante
Fosfopeptidi	$\alpha$ , $\beta$ -caseina	Trasportatore di minerali
Lattoferricina	Lattoferrina	Antimicrobico
Casinomacropptide	Caseine	Anti-stress

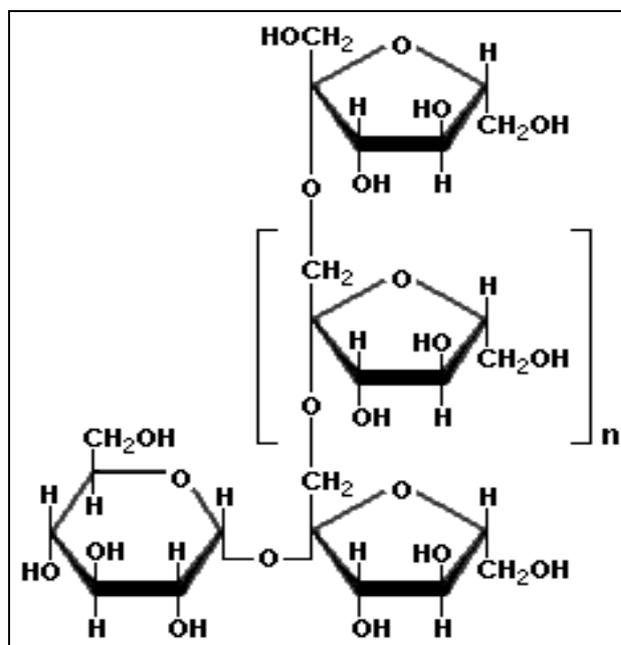
Molti di essi sono resistenti al passaggio nel tratto intestinale, ed alcuni vengono anche formati *in vivo* dall'idrolisi enzimatica degli enzimi digestivi.

#### **4.3.2 L'aggiunta di ingredienti funzionali al latte: l'esempio dell'inulina e dell'oligofruttosio**

L'inulina e l'oligofruttosio sono ingredienti naturali presenti in percentuali variabili nei vegetali. Sono presenti in più di 36000 specie del regno vegetale, di cui le principali sono rappresentate dalla cicoria, ma anche da carciofo, aglio, banana e cipolla.

Chimicamente appartengono alla famiglia dei fruttani, polisaccaridi costituiti da catene lineari di D-fruttosio. Infatti per azione di acidi diluiti o dell'enzima inulasi, l'inulina e i frutto-oligosaccaridi (FOS) sono idrolizzati a D-fruttosio. Si tratta quindi di polimeri di riserva costituiti da unità fruttosidiche legate tra loro con legami  $\beta$ -2,1 e caratterizzati dalla presenza di un residuo di glucosio terminale (**Figura 4.1**). Il legame  $\beta$ -2,1 rende queste molecole uniche, in quanto previene la loro digestione come avviene invece per i semplici carboidrati, e questo aspetto le rende particolarmente importanti da un punto di vista nutrizionale, in quanto caratterizzate da un ridotto valore calorico e in grado di esplicare effetti benefici come fibre dietetiche. La lunghezza delle molecole dipende dal vegetale da cui sono estratte e dal ciclo vitale della pianta. In genere la lunghezza varia da 2 a 250 unità di fruttosio. Il numero di unità di fruttosio che costituiscono la molecola è indicato come grado di polimerizzazione (DP). I FOS sono costituiti dalle catene più corte, generalmente fino a 10 DP (Niness, 1999). L'inulina e i FOS sono in grado di esercitare un gran numero di proprietà nutrizionali che determinano benefici per la salute umana. Per quanto riguarda i dati relativi ai livelli di introduzione giornalieri di inulina/oligofruttosio, la stima per l'Europa è di 3,2-11,3 g, mentre nel Nord America, l'intake giornaliero è di 1-4 g (van Loo, Coussement, De Leenheer, Hoebregs, Smits, 1995). Non esistono attualmente in Europa raccomandazioni relativamente ai livelli massimi assumibili di inulina e oligosaccaridi, tuttavia è sconsigliato superare i 20 g/giorno per evitare disordini di natura intestinale. Tra le proprietà benefiche esercitate dall'inulina e dai FOS è possibile citare effetti positivi sulla salute di intestino, ossa e sulla gestione del peso corporeo. A livello intestinale l'inulina, essendo una fibra,

consente un maggiore movimento viscerale e riduce il tempo di transito delle feci come conseguenza dell'aumentata biomassa (Kaur & Gupta, 2002).



**Figura 4.1** – Struttura chimica dei fruttani

Inoltre essa agisce come un prebiotico, in quanto favorisce la crescita e/o l'attività di un limitato numero di microrganismi benefici per la salute, quali i probiotici (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*), normalmente presenti in quantità non elevate nell'intestino, (Gibson & Roberfroid, 1995). L'aumento nel numero di tali microrganismi e i prodotti che derivano dalla fermentazione dell'inulina operata da essi possono portare ad una varietà di effetti fisiologici benefici (Jenkins, Kendall, & Vuksan, 1999). Tra i prodotti della fermentazione che possono apportare degli effetti positivi sull'organismo è possibile citare sia alcune vitamine (in particolare quelle del gruppo B) che gli acidi grassi a corta catena (acido acetico, acido propionico e acido butirrico). Tali molecole possono esercitare la loro funzione benefica sia a livello locale (intestino), che a livello sistemico (attraverso il loro assorbimento nel flusso sanguigno ed il trasferimento ad altri organi). Inoltre la maggior produzione di acido acetico e acido lattico è in grado di inibire lo sviluppo di *Salmonelle*, *Escherichia coli*, *Clostridium*, e altri batteri patogeni, riducendo così possibili infezioni (Kaur & Gupta, 2002). I prebiotici possono combinarsi molto bene con i probiotici negli alimenti, sviluppando un interessante effetto detto simbiotico (Holzapfel & Schillinger, 2002), che viene ampiamente sfruttato dal comparto caseario. Ad esempio, i prebiotici e

i probiotici, una volta associati, possono costituire un'interessante strategia per ridurre gli impatti negativi degli antibiotici a livello della flora intestinale.

Per quanto riguarda l'azione dell'inulina sulla salute delle ossa, essa si esplica attraverso la stimolazione dell'assorbimento dei minerali a livello dell'intestino cieco e del colon (risultati più evidenti su studi animali). Infatti la fermentazione dell'inulina nell'intestino crasso risulta, come detto, in un'aumentata produzione di acidi grassi a corta catena, i quali determinano una riduzione del pH a livello intestinale, rendendo il calcio ed il magnesio più prontamente assorbibili nel flusso sanguigno. Questo effetto può contribuire ad aumentare la forza delle ossa (Scholz-Ahrens & Schrezenmeir, 2002).

L'inulina oltre agli effetti benefici su indicati, può svolgere un'azione positiva sulla gestione e sul controllo del peso corporeo. Essa infatti appartiene alla categoria delle fibre dietetiche, dal momento che fornisce una quantità di energia pari a solo 1,5 Kcal/g (Roberfroid, 1999).

Inoltre l'inulina non viene idrolizzata nell'intestino tenue, e per tale motivo non essendo convertita in zuccheri circolanti nel flusso sanguigno, non provoca l'innalzamento del tasso glicemico né insulinemico ed è pertanto compatibile con l'alimentazione dei soggetti diabetici. Il basso valore calorico dell'inulina, associato come vedremo di seguito, alle eccellenti proprietà tecnologiche relative alla sostituzione di grasso e zucchero nei prodotti alimentari, rende questa sostanza un ottimo ingrediente a basso potere calorico. Tale proprietà è molto utile nello sviluppo di prodotti dietetici, utili nella gestione ottimale del peso corporeo.

L'inulina può essere utilizzata in un ampio range di prodotti alimentari. Essa non è classificata come un additivo, ma è identificata come un ingrediente naturale, e presenta due aspetti unici che offrono l'opportunità di migliorare le caratteristiche reologiche dei cibi:

- l'abilità di formare un gel con proprietà che simulano perfettamente il grasso;
- l'interferenza nei legami idrogeno in sistemi alimentari complessi in cui sono presenti idrocolloidi. Ciò può influenzare la viscosità, la stabilità, e la forza o struttura del gel del prodotto finale.

L'inulina influenza il *mouthfeel* (corposità, intesa come sensazione al palato) di molti prodotti alimentari, attraverso la struttura del gel che genera. In particolare le tipiche

caratteristiche reologiche dei gel costituiti da inulina (spalmabilità e plasticità) mostrano una forte somiglianza con burro o margarina. Ciò rende l'inulina un perfetto *fat-replacer* (sostituto del grasso) o parte di un sistema di sostituzione del grasso applicabile a vari tipi di prodotti.

L'inulina estratta dalla radice della cicoria, caratterizzata da un elevato DP può sostituire le sostanze grasse nel cioccolato, nei prodotti caseari fermentati (ad esempio lo yogurt) e nei prodotti da forno determinando una riduzione dell'apporto calorico e mantenendo l'aspetto cremoso di questi prodotti. I FOS caratterizzati da un minor grado di polimerizzazione, e quindi da una maggiore solubilità, possono essere invece utilizzati come *sugar-replacer* (sostituti dello zucchero).

In letteratura sono presenti alcuni lavori relativi all'utilizzo dell'inulina in ambito lattiero-caseario; tali studi riguardano principalmente lo studio delle proprietà sensoriali e strutturali dello yogurt in seguito all'aggiunta di inulina (Guggisberg, Cuthbert-Steven, Piccinali, Bütikofer, Eberhard, 2009; Paseephol, Small, Sherkat, 2008; Kip, Meyer, Jellema, 2006; Dello Staffolo, Bertola, Martino, Bevilacqua, 2004). Sono anche presenti alcuni studi relativi all'utilizzo di inulina e oligosaccaridi nei formaggi freschi (Cardarelli, Buriti, Castro, Saad, 2008; Koca & Metin, 2004).

## **PARTE SPERIMENTALE**

## 5. PROPRIETA' DELLE MICELLE CASEINICHE NEL CORSO DELLA COAGULAZIONE MISTA ACIDO-PRESAMICA: EFFETTO DELLA CONCENTRAZIONE DEL LATTE TRAMITE ULTRAFILTRAZIONE

### 5.1 Introduzione

L'Ultrafiltrazione del latte (UF) è ampiamente utilizzata nell'industria casearia per standardizzare o incrementare il contenuto proteico del latte. La membrana di UF è in grado di trattenere i globuli di grasso, le proteine del latte, e i sali insolubili, mentre permette all'acqua, al lattosio, all'azoto non proteico, e ad alcuni sali solubili e vitamine di diffondere nel permeato. Questa tecnologia permette l'utilizzo del latte concentrato per la produzione di formaggio. In particolare l'impiego del latte ultrafiltrato per la fabbricazione dei formaggi ha avuto origine alla fine degli anni '60, con il concetto di un formaggio pre-liquido (Maubois et al., 1969). Questo tipo di approccio prevedeva che il formaggio fosse concentrato tramite UF fino alla composizione della cagliata drenata prima dell'aggiunta del caglio, con il vantaggio che la maggior parte delle sieroproteine veniva incorporata nella cagliata, garantendo un incremento in termini di resa casearia. La tecnologia di UF è impiegata nella produzione di un'ampia varietà di formaggi (Henning, Baer, Hassan, & Dave, 2006; Pouliot, 2008), ed è stata applicata con particolare successo nella produzione di formaggi freschi, che risultano competitivi o anche migliori in termini di qualità rispetto a quelli preparati secondo le tecnologie tradizionali.

I formaggi freschi, tipo *quark*, sono prodotti generalmente per fermentazione del latte tramite l'impiego di colture lattiche mesofile, fino al raggiungimento di un valore di pH compreso tra 4,4 e 5,0. In questo tipo di prodotti, la coagulazione del latte può essere indotta dalla sola fermentazione, oppure da un'azione combinata di acidificazione e piccole quantità di caglio (Schulz-Collins & Senge, 2004). Nella coagulazione del latte tramite acidificazione il lattosio è fermentato grazie ai corredi enzimatici dei batteri lattici, e la conseguente riduzione di pH causa un "collasso" dello strato poli-elettrolitico

della  $\kappa$ -caseina, conducendo ad una riduzione della stabilizzazione sterica delle micelle caseiniche (de Kruif, 1997). Inoltre, nel corso dell'acidificazione, il calcio-fosfato colloidale, presente all'interno delle micelle caseiniche, inizia a dissolversi e a diffondere nel siero (Laligant, Famelart, Brulè, Piot, & Paquet, 2003; Le Graët & Gaucheron, 1999). La riduzione del pH porta ad una conseguente diminuzione del potenziale elettrostatico ed il  $\text{Ca}^{2+}$  liberato, aiuterà a fare da schermo alla carica di superficie delle micelle, conducendo all'aggregazione delle stesse ad un valore di pH vicino al punto isoelettrico della caseina (pH 4,6) (de Kruif, 1999; Horne, 1999).

Il caglio è costituito da un enzima proteolitico, la chimosina (E.C.3.4.23.4), che idrolizza in maniera specifica il legame Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> della  $\kappa$ -caseina. Nella fase primaria, quella enzimatica, la porzione idrofila della  $\kappa$ -caseina, il caseinomacropeptide (CMP), che protrude dalla superficie delle micelle, è rilasciata nel siero, e le interazioni idrofobiche sulla superficie delle micelle di caseina risultano potenziate (Dalglish, 1979; Horne & Banks, 2004). La fase non-enzimatica secondaria inizia quando una sufficiente quantità (80-95%) di CMP è stata idrolizzata (Sandra et al., 2007), in modo tale che le repulsioni steriche ed elettrostatiche sono ridotte e le micelle, destabilizzate, si aggregano per formare un gel (Lucey, 2002).

Quando un formaggio viene prodotto tramite una coagulazione di tipo misto acido-presamica, il processo è piuttosto complesso dal momento che numerose modificazioni di tipo chimico avvengono simultaneamente nel sistema latte, con meccanismi differenti di destabilizzazione che entrano in gioco.

Tuttavia, nonostante l'importanza dello studio della coagulazione mista come un valido modello per simulare la produzione dei formaggi freschi, pochi studi sono stati condotti sullo sviluppo dei gel prodotti da una combinazione di acidificazione e piccole dosi di caglio (Castillo, Lucey, & Payne, 2006; Li & Dalglish, 2006; Lucey, Tamehana, Singh, & Munro, 2000, 2001; Tranchant, Dalglish, & Hill, 2001). Tali lavori erano basati sull'investigazione delle proprietà reologiche e fisiche dei gel ottenuti da latte scremato in polvere ricostituito, attraverso l'utilizzo di piccole quantità di caglio e glucono- $\delta$ -lattone (GDL) o colture batteriche per ottenere la coagulazione del latte.

Comunque, quando la concentrazione di caseina nel latte viene aumentata, le proprietà fisico-chimiche e di coagulazione del latte sono destinate a cambiare. In particolare, è ben noto che i gel presamici ottenuti da latte ultrafiltrato presentano un rapido aumento della consistenza e della forza del gel, e quindi del suo modulo elastico ( $G'$ ), in

confronto a quelli ottenuti da latte non concentrato. In letteratura, sono stati riportati risultati contraddittori circa i tempi necessari alla coagulazione del latte scremato confrontato con quello ultrafiltrato (Karlsson, Ipsen, & Ardö, 2007; Sharma, Hill, & Mittal, 1993; Waungana, Singh, & Bennett, 1998). La coagulazione indotta dall'acidificazione nel latte concentrato è stata anch'essa studiata, con particolare attenzione ai cambiamenti nelle proprietà reologiche dei gel ed al rilascio del  $\text{Ca}^{2+}$  dalle micelle di caseina durante la fermentazione lattica (Biliaderis, Khan, & Blank, 1992; Ozer, Robinson, Grandison, & Bell, 1998). E' stato chiaramente dimostrato che durante l'acidificazione, all'aumentare del contenuto di proteine nel latte, il rapporto  $\text{Ca}^{2+}$  solubile /  $\text{Ca}^{2+}$  totale diminuisce linearmente con la concentrazione della caseina (Le Graët & Gaucheron, 1999).

Sebbene esistano numerosi lavori sulla coagulazione acida e su quella presamica nel latte concentrato, un numero ristretto di ricerche sono state eseguite sulla coagulazione indotta da una combinazione di acidificazione e piccole quantità di caglio nel latte concentrato tramite UF.

Il processo della coagulazione del latte è stato studiato tramite un certo numero di metodi complementari uno all'altro. Nella maggior parte dei casi, le investigazioni erano basate sulle determinazioni reologiche (in particolare misure reologiche dinamiche), e sul rilascio di CMP e  $\text{Ca}^{2+}$  dalle micelle di caseina. Tuttavia, altri approcci sono stati usati per monitorare il processo di coagulazione, in particolare tecniche basate sulle misure cosiddette di *light scattering* (Alexander & Dalgleish, 2004; Castillo et al., 2006; Donato, Alexander, & Dalgleish, 2007), e sull'utilizzo del microscopio confocale (confocal laser scanning microscopy, CLSM; Guyomarc'h, Jemin, Le Tilly, Madec, & Famelart, 2009; Karlsson et al., 2007; Lucey et al., 2001).

In questo studio, è stato valutato l'effetto della concentrazione del latte tramite UF sulle proprietà reologiche e chimiche di gels acido-presamici, utilizzando differenti tecniche tra loro complementari, con lo scopo di migliorare la comprensione dei fenomeni che avvengono durante la produzione dei formaggi freschi tipo-*quark*.

## **5.2 Materiali e Metodi**

### **5.2.1 Preparazione dei campioni**

Il latte scremato pastorizzato (74°C, 23 s), utilizzato come controllo (1X) per tutti gli esperimenti descritti in seguito, era fornito da Agropur Division Natrel (Markham, ON, Canada). Aliquote (1L) di latte scremato erano concentrate tramite UF alla temperatura di 25°C per produrre retentati con rapporti di concentrazione volumetrica pari a 2, e a 3 (2X, e 3X, rispettivamente), mediante l'impiego di una cartuccia di UF su scala da laboratorio (Millipore CDUF001LG, Fisher Scientific), avente un cut-off nominale di 10 kDa ed un'area nominale pari a 0,095 m<sup>2</sup>. Il latte scremato e i retentati erano immediatamente utilizzati per tutte le prove, in modo da prevenire la crescita di batteri indesiderati.

### **5.2.2 Formazione dei gels**

La coagulazione del latte scremato (1X) e concentrato (2X e 3X) era ottenuta mediante acidificazione del mezzo e utilizzo di caglio. Una coltura starter mesofila (liofilizzata) e caglio liquido (100% chimosina) erano aggiunti al latte alla temperatura di 30°C, nell'arco di pochi secondi l'uno dall'altra. Subito dopo, la miscela veniva agitata per 15 s circa. La coltura starter (Chr-Hansen CH-N19, Hoersholm, Denmark) era dissolta (10% p/v) in acqua per HPLC (Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada), e poi addizionata al latte ad una concentrazione finale di 0,01% (v/v). Il coagulante enzimatico (Chy-max Ultra; 790 IMCU/mL; Chr-Hansen, Milwaukee, WI, USA) era diluito (0,25% v/v) pochi minuti prima dell'esecuzione di ciascun test in acqua per HPLC (Fisher Sci.), e utilizzato in latte ad una concentrazione finale di 0,00296 IMCU/mL. Questa quantità di caglio viene normalmente aggiunta al latte nella produzione di formaggi freschi tipo-*quark* (Schulz-Collins & Senge, 2004). Tutti i test condotti nel presente lavoro erano eseguiti in parallelo, considerando come tempo zero il momento in cui starter e caglio erano aggiunti al latte.

### **5.2.3 Contenuto proteico e misurazione del pH**

Il contenuto proteico del latte scremato e dei retentati di UF era calcolato, determinando l'azoto totale, l'azoto non-caseinico, e l'azoto non-proteico in accordo ai metodi standard dell'International Dairy Federation (IDF, 1993). Il contenuto di caseina e sieroproteine era determinato per differenza. Il contenuto in solidi totali era determinato tramite il metodo IDF (IDF, 1987). Il pH del latte era misurato immediatamente dopo l'aggiunta dello starter e del caglio a 30°C con un pHmetro AR15 (Fisher Sci.), connesso ad un computer tramite un software (pH-store, Mediavention Inc., Guelph, ON, Canada) che registrava il pH ogni 10 s nel corso degli esperimenti (8 h).

### **5.2.4 Proprietà reologiche del latte nel corso della coagulazione mista**

La reologia studia la deformazione e/o il flusso di un materiale attraverso la risposta fornita dallo stesso quando viene sottoposto ad un determinato stress o deformazione. Quando viene applicata una piccola deformazione di natura oscillante e sinusoidale, viene generato uno stress nel materiale. Nei materiali viscoelastici, come il latte, lo stress ha due componenti che vengono quantificate tramite il modulo viscoso ed elastico: l'energia che viene recuperata costituisce il modulo elastico ( $G'$ ), mentre quella che è dissipata costituisce il modulo viscoso ( $G''$ ). Il contributo relativo delle componenti elastiche e viscosi è quantificato dall'angolo di fase ( $\delta$ ), attraverso la relazione  $\tan \delta = G''/G'$ . Quando  $\delta = 0^\circ$  il materiale è perfettamente elastico, mentre per  $\delta = 90^\circ$  il materiale è perfettamente viscoso. Nella transizione sol-gel, il punto di coagulazione è definito come il tempo corrispondente all'incrocio tra modulo elastico ( $G'$ ) e modulo viscoso ( $G''$ ), ovvero  $G' = G''$  e  $\delta = 45^\circ$ , che corrisponde a  $\tan \delta = 1$ . Questo punto coincide di solito con un rapido aumento del modulo elastico.

I campioni di latte scremato (controllo) e di latte concentrato erano analizzati, nel corso del periodo di coagulazione, tramite un reometro a stress controllato (AR-1000; equipaggiato con il software Rheology Advance Data Analyses Version 5.0.38, TA Instruments Ltd., New Castle, De, USA), utilizzando cilindri concentrici (i cilindri interni ed esterni avevano un diametro di 28 e 30 mm, rispettivamente). 20 mL di latte erano caricati nel cilindro concentrico entro 5 minuti dall'aggiunta degli agenti gelificanti. I

cilindri erano poi coperti per minimizzare l'evaporazione. La temperatura era controllata attraverso un bagnetto esterno (Isotemp 3016, Fisher Sci.) mantenuto a 30°C. Ciascun campione veniva sottoposto ad un time sweep test, con strain pari a 0,01 e frequenza di 1 Hz, continuamente per 8 h.

### **5.2.5 Esperimenti di Diffusing wave spectroscopy (DWS)**

Il processo di coagulazione era anche monitorato attraverso l'utilizzo della tecnica di diffusing wave spectroscopy (DWS) con modalità in trasmissione. Si tratta di una tecnica cosiddetta di *light scattering* che può essere applicata a sistemi concentrati, permettendo l'osservazione *in situ* delle particelle colloidali. Attraverso la tecnica di DWS è possibile studiare il comportamento statico e dinamico delle particelle colloidali nel latte senza la necessità che il campione venga diluito. Le proprietà statiche dei campioni sono misurate dal parametro di torbidità,  $1/l^*$ . Il valore di  $l^*$  rappresenta la via libera media di trasporto dei fotoni, ovvero la scala di lunghezza sopra cui la direzione della luce che passa attraverso il campione diviene completamente randomizzata. Nelle sospensioni concentrate  $l^*$  è dipendente dalle proprietà ottiche delle particelle. Le proprietà dinamiche del sistema possono essere derivate dalla misura del coefficiente di diffusione, ottenuto analizzando la mobilità delle particelle su una scala di lunghezza estremamente ridotta. Nei sistemi a libera diffusione come il latte, a partire dal coefficiente di diffusione può essere calcolato il raggio ( $R$ ) delle particelle attraverso l'equazione di Stokes-Einstein:  $D = kT/6\pi\eta R$ , dove  $k$  è la costante di Boltzman,  $T$  è la temperatura, ed  $\eta$  è la viscosità del mezzo. Nel sistema latte, la viscosità utilizzata per calcolare il raggio era  $1,021 \times 10^{-3}$  Pa.s. Negli esperimenti, il tempo di coagulazione era definito come il punto in cui il raggio aumentava rapidamente. Ulteriori dettagli sulla teoria della tecnica di DWS sono consultabili in Weitz & Pine (1993).

I campioni di latte (1,5 mL) addizionati di starter e caglio erano immediatamente trasferiti in una cuvetta ottica di vetro (Hellma Canada Limited, Concord, ON, Canada); essa presentava una lunghezza di percorso ottico pari a 5 mm, ed era immersa in un bagnetto da 1 L mantenuto a 30°C.

La sorgente luminosa era costituita da un laser a stato solido con una lunghezza d'onda di 532 nm ed una potenza di 100 mW (Coherent, Santa Clara, CA, USA).

L'intensità della luce diffusa che veniva trasmessa, e la corrispondente funzione di autocorrelazione erano misurate ogni 2 minuti (118 secondi di registrazione e 2 secondi di pausa) in continuo finché il sistema latte gelificava, in quanto la tecnica di DWS può essere applicata solo nel caso di particelle che sono libere di diffondere.

I dati erano analizzati mediante i software DWS-Fit (Mediavention Inc., Guelph, ON, Canada) e Sigma Plot 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### **5.2.6 Misurazione della concentrazione di calcio nei campioni**

La concentrazione di calcio totale e quella di calcio libero (nel corso del processo di acidificazione) erano determinate utilizzando tecniche basate sulla cromatografia ionica (Rahimi-Yazdi, Ferrer, & Corredig, 2010). Per la determinazione del  $\text{Ca}^{2+}$  libero durante il processo di coagulazione mista (fino al raggiungimento di un valore di pH pari a 4,9), aliquote (7,5 mL) di campione addizionato di starter e caglio erano trasferite in numerose provette per ultracentrifuga, e poste immediatamente in un bagnetto mantenuto a 30°C. A specifici intervalli di tempo, i campioni venivano centrifugati per 30 minuti a 30°C e ad una velocità pari a 61000 x g con un'ultracentrifuga (Beckman Coulter Optima LE-80K) equipaggiata con il rotore tipo 70.1 Ti (Beckman Coulter Canada Inc., Mississauga, ON, Canada). Al termine della centrifugazione veniva prelevato un surnatante limpido (3 mL), che veniva immediatamente congelato alla temperatura di -20°C fino al momento della procedura di determinazione del  $\text{Ca}^{2+}$  libero. I campioni per la determinazione del calcio totale (1X, 2X, 3X) e i loro surnatanti erano preparati come descritto da Rahimi-Yazdi et al. (2010), ma i livelli di diluizione utilizzati nel presente lavoro erano modificati sulla base della concentrazione di calcio attesa. La separazione degli anioni citrato, che interferisce con la quantificazione del calcio in questa procedura, era ottenuta attraverso uno *step* preliminare basato sull'utilizzo di una resina a scambio anionico (tipo I) fortemente basica (Amberlite IRA958 chloride, Fluka, Steinheim, Germany). Uno standard contenente calcio (1000 mg.L<sup>-1</sup> di  $\text{Ca}^{2+}$  in  $\text{HNO}_3$ ; Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) era utilizzato per preparare 5 soluzioni di standard esterno a differente concentrazione di calcio (da 1 a 10 mg.L<sup>-1</sup>). L'acido piridin-2, 6-dicarbossilico (99%; Acros Organics, Geel, Belgium) e l'acido nitrico al 70% (Fisher Scientific) erano utilizzati per preparare la fase mobile (una soluzione

acquosa di 0,7 mmol.L<sup>-1</sup> di acido piridin-2, 6-dicarbossilico e 1,7 mmol.L<sup>-1</sup> di acido nitrico). Una soluzione di 2 mmol.L<sup>-1</sup> di acido nitrico era utilizzata come sistema accettore. Tutte le soluzioni, gli standard e i campioni erano preparati con acqua per HPLC (submicron filtered water, Fisher Sci.). Il sistema cromatografico consisteva di un cromatografo ionico 861 advanced compact (Metrohm ion analysis, Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland), equipaggiato con una valvola di iniezione, una pompa ad alta pressione, un detector a conduttività, tutti controllati dal 838 advanced sample processor (Metrohm IC net 2.3, Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland). La colonna di separazione utilizzata era una Metrosep C4/150, impaccata con un gel di silice (5 µm, Metrohm Ltd, Herisau, Switzerland), e utilizzata ad una velocità di flusso pari a 0,9 mL.min<sup>-1</sup>.

### ***5.2.7 Rilascio del caseinomacropetide (CMP) dalle micelle di caseina***

L' HPLC a fase inversa era utilizzata per quantificare il rilascio del CMP dalla κ-caseina nei campioni di latte scremato controllo e concentrato, nel corso della coagulazione mista acido-presamica. Il rilascio di CMP conseguente all'attività del caglio è stato misurato nel tempo con l'utilizzo di metodiche precedentemente descritte in letteratura (López-Fandiño, Olano, San José, & Ramos, 1993; van Hooydonk & Olieman, 1982). Aliquote (4 mL) di campione addizionato di caglio e fermenti erano trasferite in numerose provette, e poste in un bagnetto a 30°C. La reazione primaria operata dal caglio veniva bloccata a specifici intervalli di tempo tramite l'aggiunta e successivo "vortexing" di acido tricloroacetico al 4% (TCA; Fisher Sci.), in modo da arrivare ad una concentrazione finale del 2% nei campioni. Esperimenti preliminari avevano mostrato che tale concentrazione di TCA era ottimale per i recuperi del CMP in tutti i campioni analizzati. Dopo una notte a 4°C, un'aliquota pari ad 1 mL di surnatante veniva prelevata dai campioni e trasferita in provette per microcentrifuga, e centrifugata a 4500 x g per 15 minuti a 20°C, in una microcentrifuga Eppendorf (Fisher Sci.). Il surnatante era quindi filtrato attraverso filtri da 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). L'identificazione del CMP era ottenuta con l'utilizzo di un'unità HPLC (Thermo Electron Corp., San José, CA, USA) equipaggiata con un detector UV. Il campione (100 µL) veniva iniettato su una colonna µRPC C2/C18 ST 4.6/100 (GE Healthcare, Piscataway,

NJ, USA), mantenuta a 40°C e dotata di una colonna di guardia Vydac C4 (Mandel, USA). La fase mobile consisteva di un gradiente non-lineare di una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico (TFA) allo 0,1% ed una soluzione di TFA allo 0,1% in acetonitrile al 90% (entrambi Fisher Sci.). L'area totale sotto i picchi veniva integrata utilizzando il software Chromquest v. 4.1 (ThermoFinnigan, Burlington, ON, Canada), e confrontata con il valore corrispondente alla massima area sotto i picchi per i campioni corrispondenti (latte scremato e retentati), trattati con elevate quantità di caglio (0,0710 IMCU/mL).

### **5.2.8 Microscopia confocale a scansione laser (CLSM)**

La microstruttura dei gels ottenuti veniva osservata al valore di pH di 4,9 utilizzando un upright confocal laser scanning microscope (Leica DM 6000B connesso con un sistema Leica TCS SP5; Leica Micro-systems, Heidelberg, Germany).

Un colorante fluorescente per proteine (Rodamina B; Fisher Sci.) era dissolto (1% p/p) in permeato di latte ed aggiunto ai campioni di latte 1X, 2X e 3X in una proporzione di 7, 8,5, e 10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , rispettivamente. Dopo un minuto di agitazione, la miscela era equilibrata alla temperatura di 30°C in un bagnetto e poi addizionata con la coltura starter ed il caglio. Alcune gocce di campione venivano poste su un vetrino concavo e coperte con un coprivetrino, che veniva sigillato per prevenire l'evaporazione del campione. Ciascun vetrino era posto in una piastra Petri e mantenuto a 30°C nello stesso bagnetto in cui veniva misurato il pH dei campioni. Appena questi ultimi raggiungevano pH 4,9, i vetrini erano osservati immediatamente al microscopio. Le lenti utilizzate erano obiettivi ad immersione in glicerolo (63x). La velocità di scansione era 400 Hz e il diaframma 102,8  $\mu\text{m}$ . La struttura del gel era visualizzata nella modalità in fluorescenza. Immagini di 512x512 pixels venivano catturate con il software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF; versione 1.6.0, Leica Micro-systems). Molte immagini venivano salvate per ogni campione, e nel presente lavoro sono state presentate solo quelle più rappresentative.

### 5.2.9 Analisi statistica

Per ciascun esperimento sono state eseguite 3 repliche. L'analisi della varianza ed il test comparativo multiplo delle medie (Tukey) sono stati eseguiti sulle misurazioni sperimentali, utilizzando la procedura General Linear Model del software statistico Minitab 12 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

## 5.3 Risultati

La **Tabella 5.1** mostra la composizione chimica del latte scremato e dei retentati ottenuti tramite UF. Come era atteso, il contenuto in caseina, sieroproteine, e conseguentemente in solidi totali aumentava quasi linearmente con la concentrazione del latte. Era possibile osservare una lieve riduzione nel valore di pH tra i campioni di latte controllo e i retentati di UF, in accordo con precedenti osservazioni (Karlsson et al., 2007; Waungana et al., 1998).

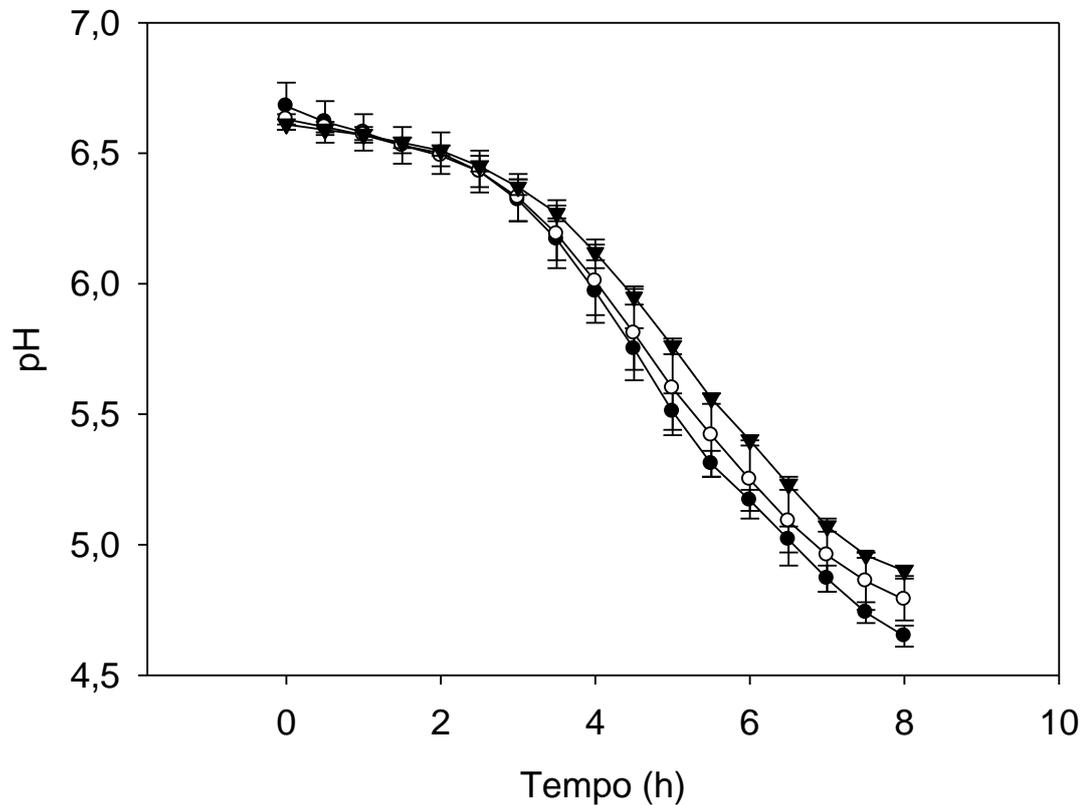
**Tabella 5.1 – Composizione dei campioni di latte scremato e dei retentati 2X e 3X<sup>a</sup>**

	Latte scremato	UF 2X	UF 3X
pH (30°C)	6,68 ± 0,09	6,63 ± 0,02	6,61 ± 0,02
Solidi totali (g.100 g <sup>-1</sup> )	9,20 ± 0,02	12,31 ± 0,10	14,78 ± 0,22
Caseina (g.100 g <sup>-1</sup> )	2,76 ± 0,04	5,48 ± 0,10	7,77 ± 0,13
Sieroproteine (g.100 g <sup>-1</sup> )	0,52 ± 0,03	0,98 ± 0,02	1,37 ± 0,05

<sup>a</sup> I valori riportati rappresentano la media e deviazione standard di tre repliche.

La **Figura 5.1** mostra le curve di acidificazione dei campioni. Nel latte 3X un valore di pH pari a 4,9 era raggiunto in 8 h, mentre il campione controllo (1X) raggiungeva nello stesso arco di tempo un valore di pH di 4,6. Il profilo di acidificazione era simile per i tre trattamenti durante le prime 3 h di fermentazione, ma successivamente la diminuzione del pH risultava più lenta nei campioni da latte concentrato, specialmente a valori di pH

< 5,5, a causa della maggiore capacità tampone dei retentati (Mistry & Kosikowski, 1985).



**Figura 5.1** – Curve di acidificazione per i campioni di latte non concentrato (●), 2X (○) e 3X (▼). Le barre di errore indicano la deviazione standard di 3 repliche.

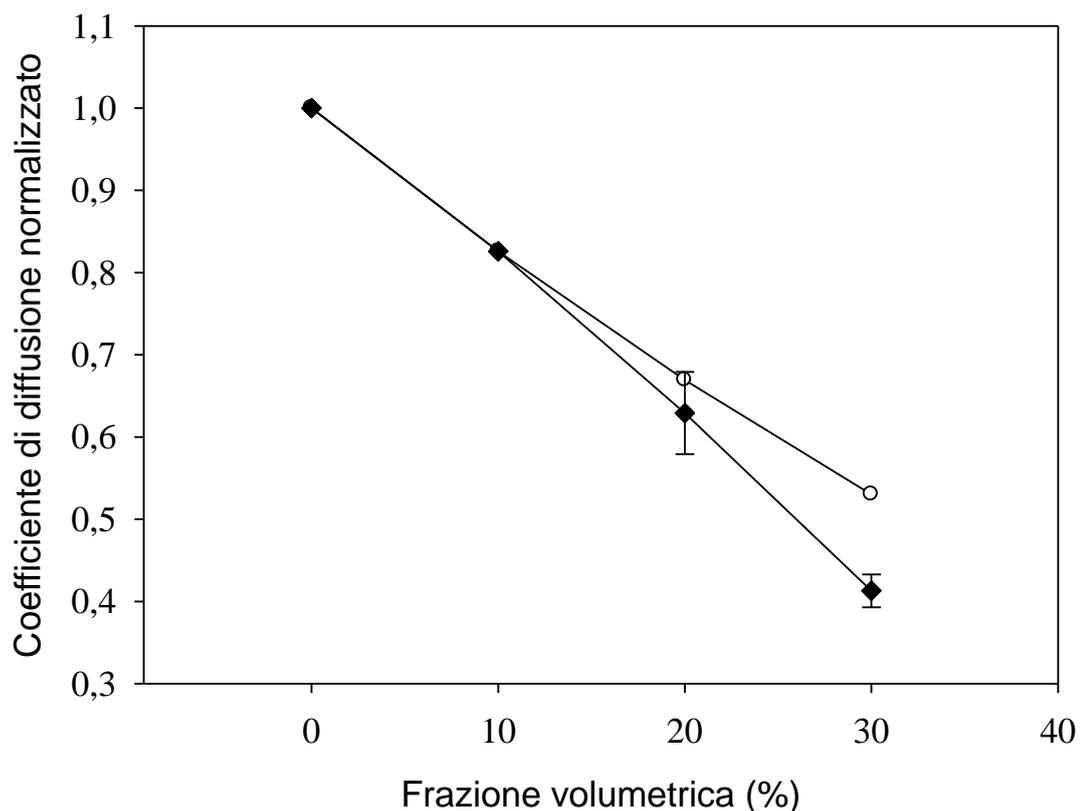
### **5.3.1 Effetto della concentrazione del latte sugli stadi iniziali della coagulazione: esperimenti di diffusing wave spectroscopy (DWS) e rilascio di CMP**

Dal momento che la diffusività delle micelle di caseina, così come le loro proprietà ottiche, cambiano in base alla loro frazione volumetrica, il coefficiente di diffusione misurato sperimentalmente tramite DWS (espresso come funzione della frazione volumetrica della caseina) era confrontato (**Figura 5.2**) con quello ottenuto dalla relazione teoretica riguardante il comportamento alla libera diffusione delle sfere (Beenakker & Mazur, 1983; 1984). Infatti, la relazione che indica come il coefficiente di

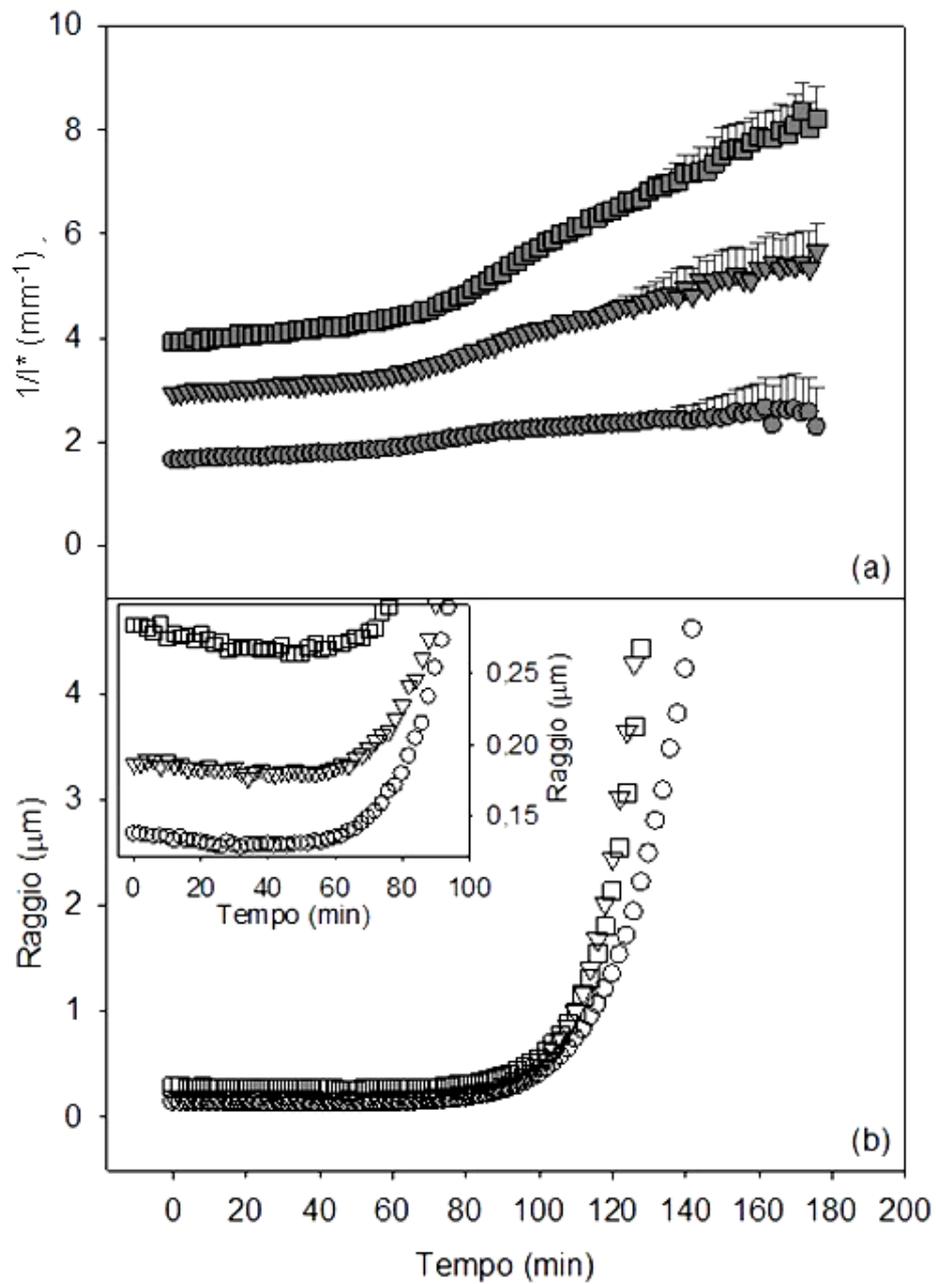
diffusione dipenda dalla concentrazione può essere scritta nella sua forma approssimata come segue:

$$D_s/D_0 = 1 - 1,83\phi + 0,88\phi^2, \quad [\text{Eq. 1}]$$

dove  $D_s$  è il coefficiente di diffusione misurato sperimentalmente,  $D_0$  è il coefficiente di diffusione di una particella nel caso di una diluizione infinita, e  $\phi$  rappresenta la frazione volumetrica (Alexander, Rojas-Ochoa, Leser, & Schurtenberger, 2002).



**Figura 5.2** – Effetto della concentrazione sulla diffusività delle micelle di caseina. Confronto tra i valori del coefficiente di diffusione misurato tramite DWS (◆) e i valori che derivano dall’equazione di Beenakker-Mazur (1983; 1984) (○). Vedere [Eq. 1] nel testo. Le barre di errore indicano la deviazione standard di 3 repliche.



**Figura 5.3** – Coagulazione del latte misurata tramite DWS. (a) Valori di  $1/I^*$  per i campioni di latte non concentrato (●), 2X (▼) e 3X (■), e (b) raggio delle micelle di caseina per i campioni di latte non concentrato (○), 2X (▽) e 3X (□) in funzione del tempo. Il riquadro in (b) mostra una visione in dettaglio del raggio durante le prime fasi della coagulazione. Le curve mostrano repliche rappresentative. Le barre di errore in (a) indicano l'errore di  $1/I^*$  per una replica rappresentativa.

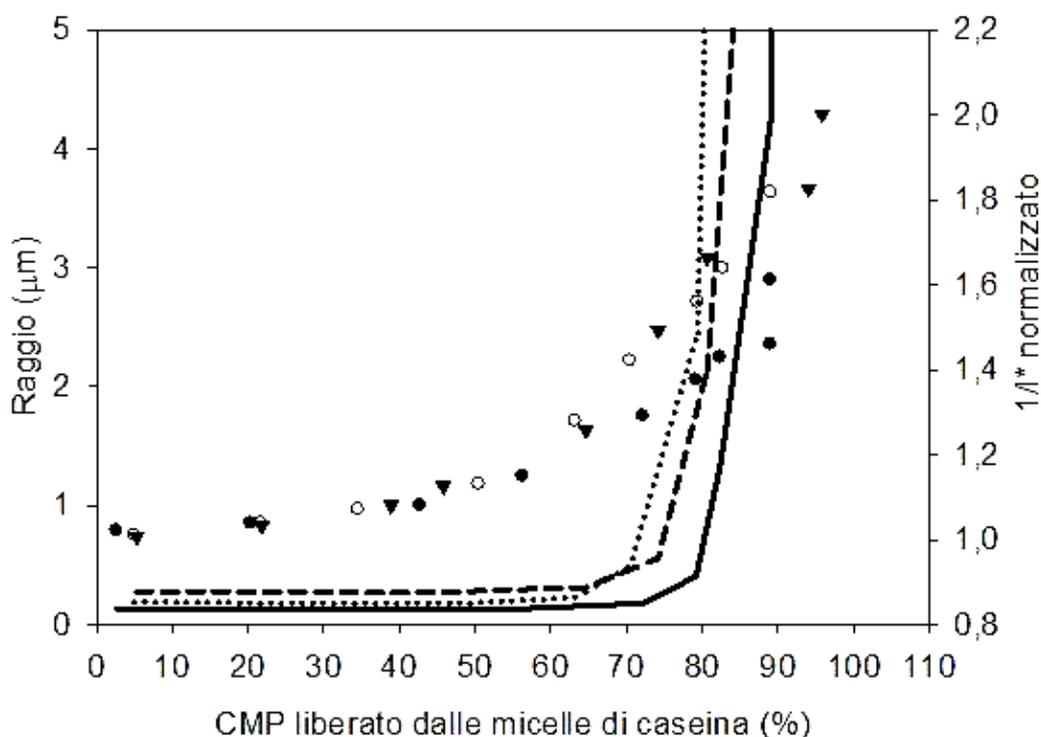
Il coefficiente di diffusione normalizzato ( $D_s/D_0$ ) delle micelle di caseina decresce gradualmente con la frazione volumetrica. Nel caso della frazione di volume al 20% (2X), il valore sperimentale del coefficiente di diffusione normalizzato combaciava, all'interno dell'errore sperimentale, con quello calcolato in maniera teoretica, (0,67 per il valore teoretico, e  $0,63 \pm 0,05$  per il valore sperimentale).

Comunque, quando il latte veniva concentrato al 30% della frazione volumetrica (3X), la diminuzione nella diffusività delle micelle non poteva essere più spiegata con la sola considerazione degli effetti idrodinamici, dal momento che i dati sperimentali deviavano dalla teoria di circa il 23% ( $0,53$  per il valore teoretico contro  $0,41 \pm 0,02$  del valore sperimentale). La riduzione può essere dovuta ai cambiamenti nelle condizioni ambientali (viscosità del siero) ed alle maggiori interazioni steriche ed elettrostatiche, dovute alla più stretta vicinanza tra le particelle.

L'aggregazione delle micelle di caseina era seguita, utilizzando la tecnica di DWS, dal momento in cui la coltura starter e il caglio erano aggiunti al latte, come mostrato in **Figura 5.3**. Il valore iniziale di  $1/l^*$  (**Figura 5.3 a**) aumentava in maniera evidente con l'incremento della frazione volumetrica delle micelle caseiniche. Dopo un periodo iniziale di circa 60 minuti nel quale  $1/l^*$  era costante, si verificava, per tutti i trattamenti, un cambiamento evidente nella pendenza delle curve, fino al raggiungimento di un plateau dopo circa 120 minuti, allorchè l'errore per il valore di  $1/l^*$  aumentava rapidamente, indicando la formazione del gel. Questo comportamento, tipico dell'aggregazione delle micelle caseiniche indotta dal caglio, è stato precedentemente descritto in grande dettaglio (Sandra et al., 2007).

La **Figura 5.3 b** mostra il comportamento delle micelle di caseina all'aggregazione in funzione del tempo, dopo l'aggiunta al latte di coltura starter e caglio. Sia nel campione controllo che nei campioni sperimentali, si verificava un rapido aumento del raggio delle micelle di caseina in un tempo corrispondente al raggiungimento del valore di plateau osservato per il parametro  $1/l^*$ . Il riquadro in **Figura 5.3 b** mostra lo sviluppo del raggio nelle fasi iniziali della reazione. Il raggio delle micelle di caseina mostrava una riduzione di circa 10-20 nm per tutti i campioni analizzati durante i primi 50 minuti, e poi aumentava lentamente finchè una rapida crescita poteva essere notata intorno ai 120 minuti. Questo rapido aumento nel raggio corrispondeva al punto di coagulazione, come precedentemente descritto da altri autori (Alexander & Dalgleish, 2004; Sandra et al., 2007).

Le cinetiche di rilascio di CMP dalle micelle di caseina nei campioni di latte concentrato (2X, 3X) non erano differenti da quelle misurate per il latte controllo. In **Figura 5.4**, sono mostrati i cambiamenti nel raggio e nei valori di  $1/l^*$  normalizzati, in funzione del rilascio del CMP. In corrispondenza del punto di coagulazione (quando il raggio aumenta rapidamente) circa il 78-82% di CMP era rilasciato dalle micelle in tutti i campioni.



**Figura 5.4** – Raggio (asse sinistro, linee), e valori di  $1/l^*$  normalizzato (asse destro, simboli) in funzione del caseinomacropetide (CMP) rilasciato dalle micelle di caseina per i gels acido-presamici ottenuti da latte non concentrato (● \_\_\_), 2X (○ ...) e 3X (▼ ---) nel corso del periodo di coagulazione. Le curve mostrano repliche rappresentative.

Nessuna differenza significativa veniva notata tra i campioni controllo ed esperimento. Inoltre, quando circa il 60% di CMP era rilasciato dalle micelle, si verificava un visibile aumento nel valore normalizzato di  $1/l^*$ . Questo punto corrisponde al primo cambiamento nella pendenza di  $1/l^*$  descritto in **Figura 5.3 a**, ed implica un aumento delle interazioni delle micelle caseiniche, in accordo con quanto riferito da altri autori (Alexander & Dalgleish, 2004).

I risultati mostrati in **Figura 5.3** e **5.4** indicano chiaramente che in presenza di una coltura mesofila, che determina una lenta acidificazione, i tre trattamenti (latte scremato controllo, 2X, e 3X) mostrano un comportamento all'aggregazione piuttosto simile, e delle interazioni che si verificano ad un livello simile di rilascio di CMP.

### ***5.3.2 Effetto della concentrazione del latte sulle proprietà di coagulazione del latte durante la fermentazione: proprietà reologiche, rilascio del calcio dalle micelle, e microstruttura dei gel***

Lo sviluppo della struttura durante la coagulazione mista acido-presamica del latte controllo e dei campioni di latte concentrato era monitorato anche tramite esperimenti di reologia in condizioni di piccola deformazione, fino al raggiungimento di un valore di pH pari a 4,9. Inoltre è stata determinata la quantità di calcio rilasciata dalle micelle di caseina durante la fermentazione, ed è stata osservata la microstruttura dei campioni al pH finale di 4,9 attraverso l'utilizzo della microscopia confocale. Lo sviluppo del modulo elastico in funzione del tempo è illustrato in **Figura 5.5 a**, dove sono anche indicati i valori medi di pH in corrispondenza di valori temporali specifici. In **Tabella 5.2**, sono invece riportati i valori medi dei parametri reologici con la relativa analisi statistica.

In accordo con i dati delle misure fatte mediante DWS, non erano presenti differenze significative in relazione ai tempi di coagulazione dei campioni (corrispondenti al valore di  $\tan \delta = 1$ ). Lo sviluppo del modulo elastico nel tempo mostrava il comportamento tipico di un gel ottenuto tramite coagulazione mista acido-presamica. Fino al punto di coagulazione (corrispondente al punto in cui  $\tan \delta$  rapidamente scendeva fino al valore di 0,25 circa, ovvero dopo 2 h circa), non si verificava alcun aumento nel valore di  $G'$ . Invece, dopo la coagulazione,  $G'$  mostrava dei valori massimi differenti in maniera significativa, raggiunti a valori di pH di 5,64, 5,92, e 6,18 per 1X, 2X e 3X rispettivamente. (**Figura 5.5 a**). Questi valori di pH e i corrispondenti valori di  $G'$  sul punto massimo dei picchi erano differenti in maniera significativa tra i trattamenti ( $p < 0,05$ ; **Tabella 5.2**). Il valore di  $G'$  poi diminuiva marcatamente, mentre si registrava un aumento corrispondente nel valore di  $\tan \delta$ . Il valore di  $G'$  diminuiva fino ad un minimo corrispondente a valori di pH di 4,90-5,00 circa. Tale minimo era raggiunto

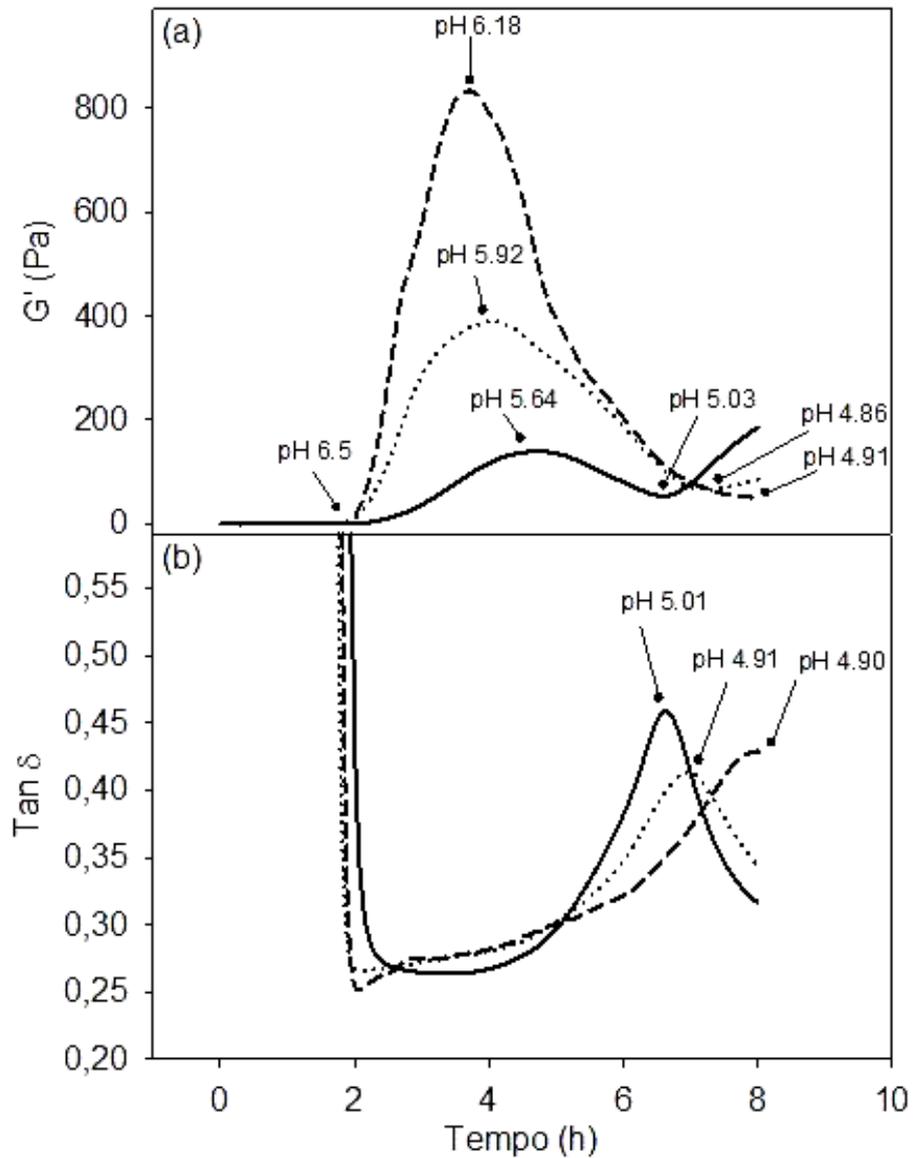
prima, ed in maniera significativa ( $p < 0,05$ ), per il campione controllo in confronto ai campioni da latte ultrafiltrato (**Tabella 5.2**).

**Tabella 5.2 – Effetto della coagulazione mista sui parametri reologici e su alcuni valori corrispondenti di pH per i gels da latte scremato e da retentati 2X e 3X<sup>a</sup>**

	Latte scremato	UF 2X	UF 3X
Tempo di coagulazione (min) <sup>b</sup>	109 ± 8 <sup>a</sup>	105 ± 11 <sup>a</sup>	109 ± 4 <sup>a</sup>
G' max (Pa) <sup>c</sup>	138,8 ± 6,6 <sup>a</sup>	456,8 ± 112,6 <sup>b</sup>	912,1 ± 173,4 <sup>c</sup>
pH a G' max <sup>d</sup>	5,64 ± 0,07 <sup>a</sup>	5,92 ± 0,09 <sup>b</sup>	6,18 ± 0,05 <sup>c</sup>
pH a G' min <sup>e</sup>	5,03 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,86 ± 0,03 <sup>b</sup>	4,91 ± 0,01 <sup>b</sup>
pH a tan δ max <sup>f</sup>	5,01 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,91 ± 0,02 <sup>b</sup>	4,90 ± 0,02 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> I valori riportati rappresentano la media e deviazione standard di tre repliche. I valori che, nella stessa riga, presentano in apice una lettera differente sono differenti in maniera significativa ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Tempo di coagulazione ottenuto quando  $\tan \delta = 1$ ; <sup>c</sup> Valore massimo di modulo elastico (G') durante il periodo di coagulazione, fino a pH 4,9; <sup>d</sup> valore di pH estrapolato in corrispondenza del massimo valore di G' durante il periodo di coagulazione, fino a pH 4,9; <sup>e</sup> valore di pH estrapolato in corrispondenza del minimo valore di G' durante il periodo di coagulazione, fino a pH 4,9; <sup>f</sup> valore di pH estrapolato nel punto massimo del picco di  $\tan \delta$  durante la coagulazione.

Inoltre tale valore di pH corrispondeva al valore di pH del massimo in  $\tan \delta$  (**Figura 5.5 b**). A questo punto un secondo aumento nel valore di G' era notato per il campione controllo, ma non per i campioni esperimento, i quali raggiungevano il loro valore di pH finale al minimo in G' o al massimo in  $\tan \delta$ . E' tuttavia importante notare che, anche in 3X, una volta raggiunto il massimo in  $\tan \delta$ , si verificava una diminuzione di tale valore (dati ottenuti con corse più lunghe), indicando uno sviluppo simile, ma successivo della struttura. Inoltre, mentre 1X mostrava una fase di plateau prima di un rapido aumento fino al massimo in  $\tan \delta$ , 2X e 3X raggiungevano il massimo in maniera più graduale.



**Figura 5.5** – (a) Modulo elastico ( $G'$ ), e (b)  $\tan \delta$  in funzione del tempo per i campioni di latte non concentrato (\_\_\_), 2X (...) e 3X (---) durante la coagulazione. In (a), i valori di pH indicati si riferiscono al punto di coagulazione (rapido aumento del valore di  $G'$ ), e al massimo e minimo valore di  $G'$  durante la coagulazione mista. In (b) i valori di pH si riferiscono al punto massimo del picco di  $\tan \delta$  nel corso della coagulazione. I valori di pH sono la media di tre repliche. Le curve mostrano repliche rappresentative.

Per comprendere meglio i cambiamenti che avvengono durante la formazione della struttura conseguente all'acidificazione, il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  dalle micelle di caseina è stato quantificato in tutti i campioni nel corso dell'acidificazione stessa (**Figura 5.6**).

I valori di calcio totale e solubile e i rapporti tra calcio solubile (a pH 4,9 e dopo 2 giorni di conservazione della cagliata a 4°C) e calcio totale sono indicati in **Tabella 5.3**. I valori di calcio totale e solubile misurati nel latte scremato erano in accordo con i dati riportati in letteratura (Gaucheron, 2005). Il maggiore contenuto di calcio totale nei retentati di UF in confronto al latte scremato, è una conseguenza dell'associazione del calcio con le micelle di caseina (calcio colloidale). Invece, la quantità di calcio solubile nei retentati, prima dell'acidificazione, non differiva in maniera significativa nel latte scremato rispetto

**Tabella 5.3 – Valori di calcio totale e solubile per il latte scremato controllo e i retentati (2X, 3X)<sup>a</sup>**

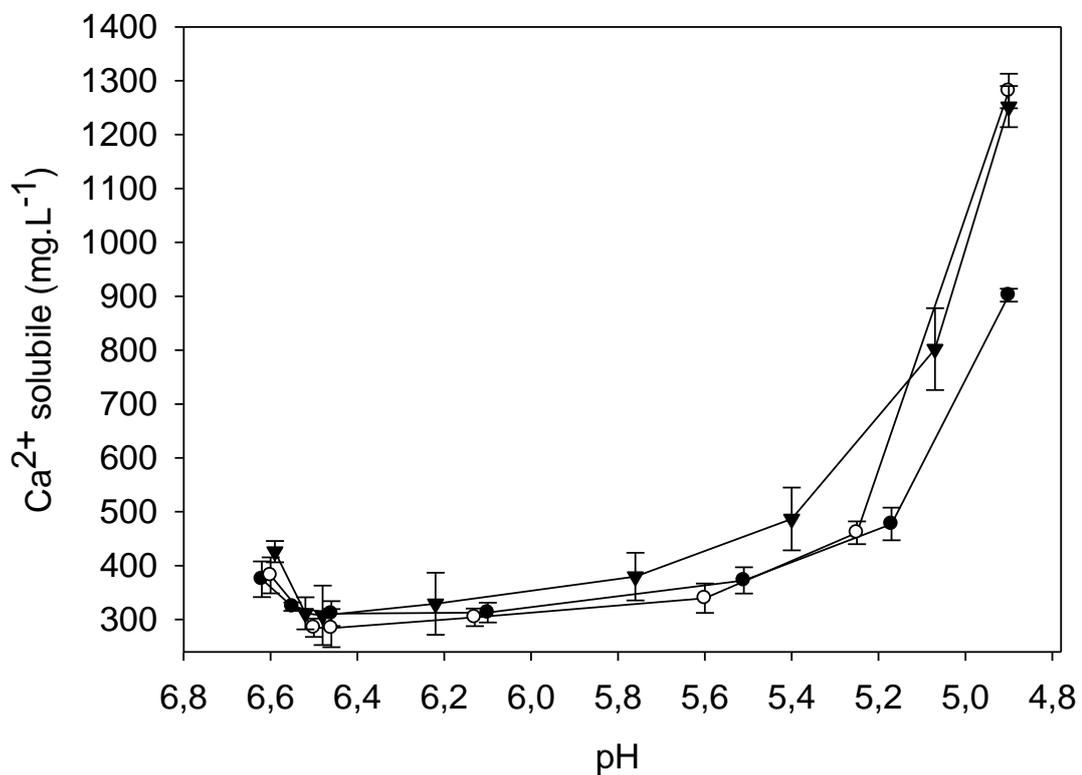
	Latte scremato	UF 2X	UF 3X
Calcio totale ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	1254 ± 19 <sup>a</sup>	2041 ± 36 <sup>b</sup>	2467 ± 104 <sup>c</sup>
Calcio solubile ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	375 ± 33 <sup>a</sup>	382 ± 33 <sup>a</sup>	426 ± 20 <sup>a</sup>
$\text{Ca}^{2+}$ sol 4,9 / $\text{Ca}^{2+}$ tot (%) <sup>b</sup>	72 ± 2 <sup>a</sup>	63 ± 2 <sup>b</sup>	51 ± 3 <sup>c</sup>
$\text{Ca}^{2+}$ sol 2 gg / $\text{Ca}^{2+}$ tot (%) <sup>c</sup>	89 ± 3 <sup>a</sup>	83 ± 4 <sup>a</sup>	86 ± 6 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> I valori riportati rappresentano la media e deviazione standard di tre repliche. I valori che, nella stessa riga, presentano in apice una lettera differente sono differenti in maniera significativa ( $p < 0,05$ ). <sup>b</sup> Rapporto tra calcio solubile misurato a pH 4,9 e calcio totale. <sup>c</sup> Rapporto tra calcio solubile misurato in campioni mantenuti a 4°C per 2 giorni (dopo che avevano raggiunto pH 4,9) e calcio totale. Il pH dei campioni era diverso dopo 2 giorni a 4°C: 4,6 per i gels da latte non concentrato, 4,7 per i gels 2X e 4,8 per i gels 3X.

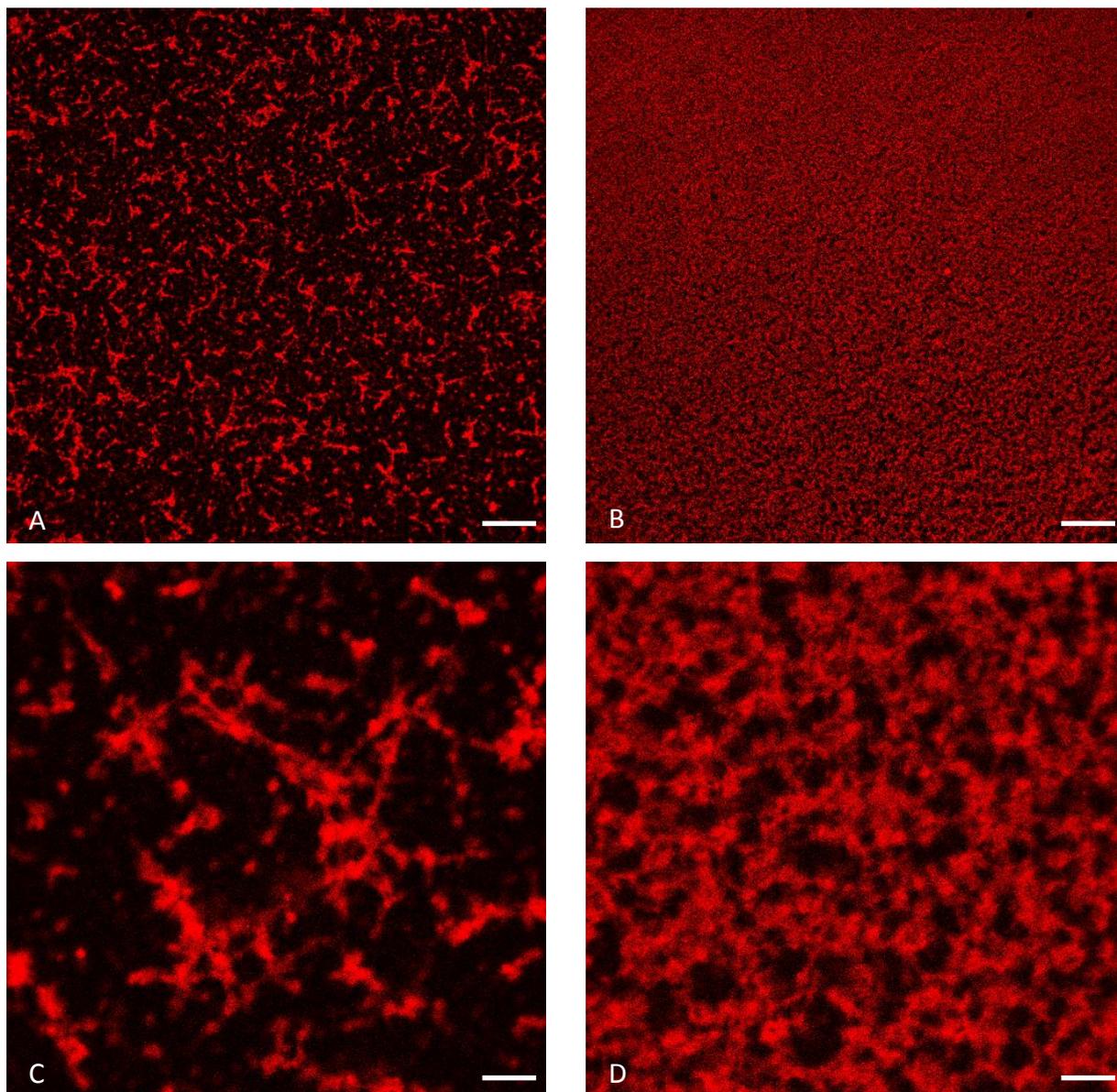
ai lattini concentrati, dato che i sali solubili diffondono liberamente attraverso la membrana di UF. Come è mostrato chiaramente in **Figura 5.6**, la concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  solubile diminuiva in maniera consistente da pH 6,6 a 6,5 in tutti i campioni. Tale riduzione era mediamente più rilevante all'aumentare del fattore di concentrazione del latte, e risultava pari a 60, 98, e 120  $\text{mg.L}^{-1}$  per 1X, 2X e 3X, rispettivamente. E'

importante sottolineare che la riduzione di pH da 6,6 a 6,5 avveniva in circa 2 h, e terminava in corrispondenza del punto di coagulazione (indotta dal caglio). E' pertanto probabile che il  $\text{Ca}^{2+}$  libero abbia contribuito all'aggregazione delle micelle di caseina dopo il rilascio di una quantità di CMP sufficiente perché la coagulazione avvenisse. Il contributo dei ponti di calcio nei gels presamici è stato abbondantemente discusso in letteratura (Crabbe, 2004).

I valori di  $\text{Ca}^{2+}$  solubile erano poi costanti fino ad un valore di pH di 5,5 circa, quando essi iniziavano lentamente ad aumentare come effetto della demineralizzazione delle micelle di caseina indotta dalla riduzione del pH. Infatti un rapido aumento dei valori di  $\text{Ca}^{2+}$  solubile poteva essere osservato nell'intervallo di pH compreso tra 5,5 e 4,9.



**Figura 5.6** – Contenuto di calcio in fase solubile in funzione del pH per i campioni di latte non concentrato (●), 2X (○) e 3X (▼) nel corso della coagulazione. Le barre di errore indicano la deviazione standard di 3 repliche.



**Figura 5.7** – Immagini ottenute tramite microscopia confocale per i gels (osservati a pH 4,9) da latte non concentrato (A, C) e 3X (B, D). A, B, scala: 25  $\mu\text{m}$ . C, D, scala: 5  $\mu\text{m}$ . Le proteine erano marcate con Rodamina B e appaiono in rosso nelle micrografie.

A pH 4,9 il rapporto calcio solubile / calcio totale (%) diminuiva linearmente ed in maniera statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), all'aumentare della concentrazione del latte come riportato in **Tabella 5.3**.

Queste differenze venivano annullate nel tempo, dal momento che il rapporto calcio solubile / calcio totale era simile dopo due giorni di conservazione dei campioni alla temperatura di 4°C, sebbene gli stessi avessero valori differenti di pH tra loro (4,60,

4,70, 4,80 per 1X, 2X e 3X rispettivamente), (**Tabella 5.3**). A questo punto circa l'83-89% del calcio era in fase solubile.

L'effetto della concentrazione del latte sulla microstruttura dei gels (osservata a pH 4,9) è mostrato in **Figura 5.7**.

I gels ottenuti da latte scremato non concentrato mostravano una struttura filamentosa, piuttosto caratteristica dei gels ottenuti tramite coagulazione mista (**Figura 5.7 a**), (Lucey et al., 2001). I gels ottenuti dal latte 3X (**Figura 5.7 b**) presentavano una struttura piuttosto compatta, con pori molto piccoli (in nero). La microstruttura dei coaguli ottenuti da retentati 2X (non mostrata) era simile a quella ottenuta dai retentati 3X. Le immagini a maggior ingrandimento (**Figura 5.7 c, d**) mostrano chiaramente che, mentre nel latte concentrato, la struttura proteica è molto compatta (**Figura 5.7 d**), quella dei gels da latte non concentrato (**Figura 5.7 c**) è più filamentosa. Micrografie molto simili sono state presentate da Lucey et al. (2001) per gels (a pH 4,8) ottenuti da latte scremato non trattato termicamente, e prodotti tramite piccole dosi di caglio e GDL. Le differenze tra gels da latte non concentrato e da retentato di UF erano dovute in parte alla minor concentrazione proteica nei gels controllo, dove le aree non costituite da proteina occupavano una frazione più ampia.

## 5.4 Discussione

### ***5.4.1 L'effetto dell'attività del caglio sugli stadi iniziali della fermentazione nei campioni di latte controllo e nel latte ultrafiltrato***

I risultati riportati nelle **Figure 5.3** e **5.4** dimostrano chiaramente che, sulla base della quantità di caglio e coltura starter aggiunti ai differenti tipi di latte in studio, la prima parte del processo di coagulazione mista può essere ascritta all'attività del caglio in presenza di una lieve acidificazione. Infatti tutti i campioni di latte presentavano un tempo di coagulazione di 109 minuti circa, ed un valore di pH di 6,50 circa. Lo stadio primario del processo di coagulazione presamica e la fase iniziale di aggregazione delle micelle di caseina non erano influenzate dalla concentrazione del latte.

L'andamento delle curve del raggio e di  $1/l^*$  è in accordo con studi precedenti riferiti alla coagulazione del latte scremato non trattato termicamente (Alexander & Dalgleish,

2004; Sandra et al., 2007), ed in particolare la riduzione del raggio negli stadi iniziali della reazione è coerente con la rimozione del CMP dalle micelle di caseina (stadio primario della coagulazione presamica), causato dalla proteolisi ad opera del caglio. Altri autori hanno riportato in precedenza che la forza stabilizzante del CMP è così grande che, a valori prossimi al pH naturale del latte, è necessario rimuovere una gran parte di esso (85-90%) per permettere l'aggregazione delle micelle caseiniche (Dalglish, 1979; Sandra et al., 2007). In questo studio noi abbiamo osservato che era necessario un rilascio di CMP dalle micelle pari a circa il 78-82% per tutti i campioni, affinché la coagulazione potesse essere osservata come dimostrato da un rapido incremento del raggio delle micelle di caseina (**Figura 5.4**). Il livello di proteolisi esercitato sulla  $\kappa$ -caseina affinché vi fosse un'aggregazione delle micelle risultava spostato verso percentuali più basse, probabilmente perché il pH nel punto di coagulazione era vicino a 6,5, e risulta pertanto più basso rispetto al pH naturale del latte (circa 6,7), (van Hooydonk, Boerritger, & Hagedoorn, 1986). Infatti la carica sulle micelle diviene minore quanto più basso è il valore di pH, e la capacità di stabilizzazione sterica esercitata dalla  $\kappa$ -caseina tende a ridursi con la diminuzione del pH (de Kruif, 1999).

In generale, la concentrazione del latte tramite UF dovrebbe condurre ad una riduzione delle cinetiche dello stadio primario della coagulazione presamica, sulla base della maggior quantità di micelle caseiniche nel latte concentrato rispetto a quello non concentrato (Dalglish, 1980). Perciò dovrebbe essere normale attendersi una quantità inferiore di CMP rilasciata nei campioni da latte ultrafiltrato rispetto a quelli da latte non concentrato, prima che le micelle caseiniche inizino ad aggregarsi tra loro. Karlsson et al. (2007), nel corso dei loro esperimenti sul latte concentrato tramite UF, hanno trovato una percentuale minore di CMP rilasciato dalle micelle nel retentato rispetto al latte non concentrato, in corrispondenza del punto di coagulazione. Comunque le condizioni applicate in questo lavoro erano molto differenti da quelle applicate nel presente studio, con particolare riferimento al maggior contenuto di caseina nel retentato ( $19,8 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), e anche al valore di pH scelto per la coagulazione nettamente più basso (5,80). Inoltre, nelle condizioni usate nel presente lavoro, non vi erano differenze tra i trattamenti fino al momento della coagulazione indotta dal caglio, come rilevato dalle misure relative al rilascio di CMP, a quelle di DWS o reologia.

Riguardo al tempo di coagulazione del latte concentrato tramite UF, sono stati riportati in letteratura dei risultati contraddittori (Karlsson et al., 2007; Sharma et al., 1993; Sharma, Mittal, & Hill, 1994; Waungana et al., 1998). Questi studi riportavano ritardi nei tempi di coagulazione, ma anche anticipi o gli stessi tempi di coagulazione confrontando il latte scremato non concentrato e i campioni di latte ultrafiltrato a diversi gradi di concentrazione. I nostri risultati sono in accordo con quelli riportati da Waungana et al. (1998), i quali hanno osservato che al valore di pH naturale del latte, la maggior concentrazione dello stesso non determina effetti sul tempo di coagulazione. Come regola generale, rispetto alle differenze trovate in letteratura sui tempi di coagulazione tra latte non concentrato e concentrato, è possibile dire che questo parametro risente delle condizioni sperimentali, metodologiche, e di processo applicate. E' inoltre di grande importanza il valore di pH al quale le misurazioni vengono effettuate, dal momento che la disponibilità di calcio ionico aumenta a livelli maggiori quando il latte è più acido. Ciò ha una grande influenza sulla riduzione delle repulsioni elettrostatiche nei concentrati da UF, e determina pertanto la riduzione delle velocità di aggregazione micellare.

#### ***5.4.2 Effetto dell'acidificazione sulla formazione del coagulo per il latte non concentrato e i retentati da UF***

I risultati mostrati in **Figura 5.5 (a, b)** indicano che le condizioni di coagulazione acido-presamica applicate in questo studio, possono essere ascritte alla situazione in cui un'ampia demineralizzazione della caseina del latte (solubilizzazione del calcio micellare) inizia successivamente alla formazione del gel, che inizialmente è formato principalmente grazie all'azione del caglio. Si verifica un disaccoppiamento nel corso del tempo tra gli effetti indotti dal caglio, e quelli dovuti all'acidificazione. Questo fenomeno è evidente in **Figura 5.5 (a)**, dove il modulo elastico presentava un ben distinto valore massimo (attribuito all'attività del caglio), seguito da un minimo dovuto alla progressiva demineralizzazione indotta dall'acidificazione per tutti i campioni. Inoltre il valore di  $\tan \delta$  presentava una riduzione fino al punto di coagulazione, ma poi andava incontro ad un massimo a valori di pH di 4,9-5,0 circa (**Figura 5.5 b**). Un comportamento reologico simile è stato osservato in passato nei gels da latte non concentrato ottenuti tramite ridotte quantità di caglio, e GDL (Lucey et al., 2000) o

batteri (Tranchant et al., 2001) addizionate al latte. Come è stato suggerito da questi autori, un tale comportamento reologico nel corso della coagulazione-acidificazione è tipico di un sistema in cui la coagulazione avviene a valori di pH elevati (lontani dal punto isoelettrico della caseina), ed è dovuto ad un fenomeno di rilassamento nei legami proteina-proteina. Ciò è causato da una perdita delle forze intermolecolari nel gel precedentemente formato, a causa della solubilizzazione del calcio-fosfato colloidale quando il pH scende a valori inferiori a 6,0 (Lucey et al., 2000). Così, il calcio assume un ruolo minore nei legami intermicellari, ed il gel diviene temporaneamente più viscoso e meno elastico. Come descritto in **Figura 5.5 (a)**, il valore di  $G'$  aumentava con velocità maggiore (e valori più alti), e allo stesso modo diminuiva più lentamente, all'aumentare della concentrazione del latte tramite UF, così come sottolineato dalle differenze significative mostrate in **Tabella 5.2**. I risultati ottenuti nel latte concentrato tramite UF, relativamente al rapido aumento del modulo elastico dopo il punto di coagulazione, sono in accordo con precedenti studi (Karlsson et al., 2007; Waungana et al., 1998). Infatti il modulo elastico dei gels dipende essenzialmente dalla concentrazione delle particelle coagulate, e dal numero e la forza dei ponti-legami tra loro. Essi sono maggiori nei gels presamici prodotti da latte concentrato tramite UF rispetto al latte non concentrato (Waungana, Singh, & Bennett, 1996). Infatti, come può essere notato in **Figura 5.6**, una maggior quantità di calcio solubile risultava ridotta per i gels da latte concentrato, negli stadi iniziali della coagulazione presamica. Tali differenze indicano che il calcio gioca un ruolo fondamentale nell'incrementare il numero dei ponti tra le micelle di caseina nei gels da latte concentrato tramite UF, e conseguentemente la forza di tali gels (Crabbe, 2004).

Per discutere la riduzione dei valori di  $G'$  tra il punto di massimo del picco e i valori di pH 4,9-5,0, ed anche l'aumento di  $\tan \delta$  fino al suo massimo (quasi corrispondente agli stessi valori di pH), diviene importante capire ciò che avviene relativamente al rilascio di calcio dalle micelle caseiniche nei campioni oggetto di studio (**Figura 5.6 e Tabella 5.3**). La riduzione nei valori di  $G'$  ed il corrispondente aumento in  $\tan \delta$ , durante la coagulazione acido-presamica, sono dovuti alla demineralizzazione delle micelle caseiniche, e questo fenomeno segna la transizione da un gel con prevalenti caratteristiche presamiche ad un gel prevalentemente acido (Tranchant et al., 2001). Le curve mostrate in **Figura 5.6** relative al rilascio del calcio solubile nei campioni sotto esame, presentavano alcune differenze rispetto ad alcuni lavori pubblicati in passato

(Laligant et al., 2003; Le Graët & Gaucheron, 1999; Ozer et al., 1998). Le differenze principali erano dovute al fatto che questi autori non avevano utilizzato il caglio nei loro esperimenti, e così non avevano notato alcuna riduzione dei valori di calcio solubile nei primi stadi dell'acidificazione, bensì, da subito, un graduale aumento del calcio libero. Inoltre è noto che le modalità (batteri o GDL), e le temperature di acidificazione hanno un grande impatto sulle cinetiche di rilascio del calcio dalle micelle di caseina quando il pH diminuisce (Laligant et al., 2003; Gaucheron, 2005). Comunque, in questi studi era possibile osservare un netto aumento nei valori di calcio solubile nell'intervallo di pH 5,5-5,0, così come evidenziato nel presente lavoro (**Figura 5.6**). Le Graët & Gaucheron (1999), nel loro studio relativo all'influenza della concentrazione di caseina sui valori di minerali solubili nel corso dell'acidificazione, avevano notato che il rapporto  $\text{Ca}^{2+}$  solubile /  $\text{Ca}^{2+}$  totale diminuiva linearmente con l'aumentare della concentrazione di caseina, e che i valori di pH necessari alla totale solubilizzazione si spostavano verso valori più bassi quando la concentrazione aumentava. Noi abbiamo osservato una tendenza simile considerando il rapporto  $\text{Ca}^{2+}$  solubile a pH 4,9 /  $\text{Ca}^{2+}$  totale (**Tabella 5.3**). E' probabile che la maggior concentrazione di caseina, nei campioni di latte ultrafiltrato, ostacoli la dissociazione dei sali colloidali. Lo ione calcio è implicato, nelle micelle di caseina, in due tipi di associazione: la prima è con il fosfato inorganico, e la seconda con il fosfato organico (residui di fosfoserina), che si trovano nella porzione più interna delle micelle (Gaucheron, 2005). Laligant et al. (2003) suggerivano che sotto pH 6,0 la dissociazione del calcio dai residui di fosfoserina avviene solamente se gli acidi citrico e fosforico e gli ioni  $\text{H}^+$  possono diffondere dentro le micelle. Se si considera l'ambiente differente creato nel sistema latte dal maggiore contenuto proteico, e la conseguente maggiore vicinanza tra le micelle, non è sorprendente che le cinetiche ed il comportamento del processo di diffusione del calcio possa risultare modificato. Le micrografie ottenute a pH 4,9 tramite il microscopio confocale (**Figura 5.7**) mostrano chiaramente che il processo di UF del latte produce un coagulo più compatto rispetto a quello ottenuto da latte non concentrato, e ciò sembra confermare quanto detto circa i ritardi nel rilascio del calcio nei gel da latte concentrato. Nel presente lavoro, le differenze nel rilascio di calcio tra latte non concentrato e latte UF erano cancellate quando i campioni erano mantenuti a 4°C per 2 giorni dopo che avevano raggiunto pH 4,9 (**Tabella 5.3**). Comunque, i campioni presentavano differenti valori di pH tra loro e questo sembrava confermare che il rilascio di calcio non era solo pH-dipendente, ma

anche tempo-dipendente, e i campioni di latte concentrato avevano bisogno di un tempo maggiore per liberare il calcio dalle micelle. E' dunque probabile che, le differenze nel rilascio di calcio osservate tra latte non concentrato e latte ultrafiltrato a pH 4,9, spieghino il differente sviluppo delle curve osservato per  $G'$  e  $\tan \delta$  (Figura 5.5 a, b), ed in particolare il fatto che il latte non concentrato raggiungeva il massimo in  $\tan \delta$  ad un valore di pH più alto rispetto a 2X e 3X (**Tabella 5.2**). Inoltre, a valori di pH più bassi di 5,0-4,9,  $\tan \delta$  diminuiva come conseguenza delle maggiori attrazioni proteina-proteina, dal momento che la carica netta diminuisce man mano che il valore di pH si avvicina al punto isoelettrico della caseina (pH 4,6), (Lucey & Singh, 2003).

## 5.5 Conclusioni

I risultati riportati in questo studio indicano che, nelle condizioni applicate, il processo di coagulazione mista acido-presamica può essere diviso in due fasi: una prima fase può essere attribuita alla coagulazione presamica in presenza di una lieve acidificazione, ed una seconda fase è invece dovuta al processo di acidificazione subito dal gel presamico. Nella prima fase non era possibile osservare differenze nel tempo di coagulazione e nel rilascio di CMP tra i campioni oggetto di studio. Successivamente, nel corso dell'acidificazione, tutti i campioni mostravano un valore massimo di modulo elastico seguito da una sua riduzione fino ad arrivare ad un valore minimo. Allo stesso modo il valore di  $\tan \delta$  aumentava fino ad un valore massimo. In generale, i campioni da latte concentrato raggiungevano (in termini di pH) il massimo in  $G'$  più rapidamente ed il minimo più lentamente in confronto ai campioni da latte non concentrato. In maniera simile, il valore massimo di  $\tan \delta$  veniva raggiunto più rapidamente nei campioni da latte non concentrato rispetto a quelli da latte ultrafiltrato.

I valori di calcio solubile suggerivano che le differenze relative al massimo in  $\tan \delta$  (o minimo in  $G'$ ) erano dovute ai differenti tassi di rilascio di calcio tra i campioni. I risultati presentati in questo studio permettono di comprendere in dettaglio i meccanismi che avvengono nel latte concentrato durante il processo di coagulazione mista, in cui il caglio gioca un ruolo importante. A tal proposito, potrebbe essere utile effettuare ulteriori studi utilizzando quantità di caglio ancora più ridotte, al fine di comprendere ciò

che accade nel latte ultrafiltrato in cui l'acidificazione assume una parte preponderante rispetto al caglio.

## 6. EFFETTI DELL'UTILIZZO DI INULINA COME FAT-REPLACER NELLA PRODUZIONE DI UN FORMAGGIO FRESCO OTTENUTO DA LATTE DI CAPRA CONCENTRATO TRAMITE ULTRAFILTRAZIONE

### 6.1 Introduzione

L'inulina è un polimero di riserva di origine vegetale che possiede importanti proprietà nutrizionali e tecnologiche. Viene considerata un ingrediente alimentare sicuro (Kaur & Gupta, 2002), e pertanto, può essere utilizzata nell'industria alimentare. Abbiamo già ampiamente descritto le proprietà di questa molecola (vedi sezione 4.3.2), tuttavia ora vedremo più nel dettaglio le sue proprietà tecnologiche con particolare attenzione alle sue applicazioni nel settore lattiero-caseario. Le proprietà tecnologiche dell'inulina sono strettamente dipendenti dal grado di polimerizzazione (DP) della sua catena molecolare (Moerman, Van Leeuwen, & Delcour, 2004). L'inulina a corta catena o l'oligofruttosio sono molto più solubili e dolci rispetto alle molecole a lunga catena, e presentano un profilo dolcificante simile a quello del saccarosio, ma un contenuto calorico inferiore (1-2 Kcal/g). Invece, le molecole a lunga catena (con DP superiore a 20) sono termicamente più stabili, meno solubili e più viscosi rispetto a quelle a corta catena. Inoltre presentano un'elevata capacità di legare l'acqua e, per tale caratteristica, di sostituire il grasso nei prodotti alimentari. Le proprietà dell'inulina (con elevato DP) come *fat-replacer* sono attribuite alla sua capacità di formare microcristalli che interagiscono tra loro formando piccoli aggregati che trattengono l'acqua, creando una struttura cremosa che fornisce una sensazione al palato simile a quella del grasso (Kip et al., 2006; Franck, 2002; kaur & Gupta, 2002). Sulla base della combinazione delle proprietà nutrizionali e tecnologiche, molti autori hanno studiato l'effetto dell'aggiunta di inulina sulle caratteristiche reologiche e sensoriali di alcuni prodotti caseari, come gelati (Schaller-Povolny & Smith, 1999; 2001), yogurt (Guggisberg et al., 2009; Pasephol et al., 2008; Kip et al., 2006; Dello Staffolo et al., 2004) e formaggi freschi (Cardarelli et al., 2008; Koca & Metin, 2004). Nella maggior parte di questi lavori l'obiettivo era valutare l'effetto dell'aggiunta di inulina ad alto DP come *fat-replacer* in prodotti a basso

contenuto di grasso. I prodotti caseari *low-fat* aiutano a ridurre l'*intake* calorico giornaliero e quindi a migliorare il bilancio energetico, tuttavia possono presentare una perdita di cremosità che in genere è associata ai prodotti aventi un maggior contenuto in grasso. Comunque, negli studi sopracitati viene riportato che l'inulina ha un effetto positivo sul miglioramento della struttura, del gusto e dei parametri sensoriali correlati alla cremosità dei prodotti. Pertanto, nell'ottica dello sviluppo di nuovi prodotti caseari freschi da latte di capra, caratterizzati da una valenza funzionale e da un ridotto contenuto di grasso, è interessante valutare l'aggiunta di inulina al latte caprino concentrato tramite ultrafiltrazione (UF). Utilizzando la tecnica di UF, è possibile ottenere latte scremato concentrato, che può essere utilizzato in combinazione con la crema di latte ed ingredienti funzionali quali i prebiotici, nella fabbricazione di formaggi freschi a composizione chimica predeterminata.

Pertanto, l'obiettivo di questo studio era quello di esaminare gli effetti dell'utilizzo di inulina come *fat-replacer*, su alcune proprietà reologiche, microstrutturali e sensoriali di formaggi caprini freschi ottenuti a partire da latte concentrato per UF.

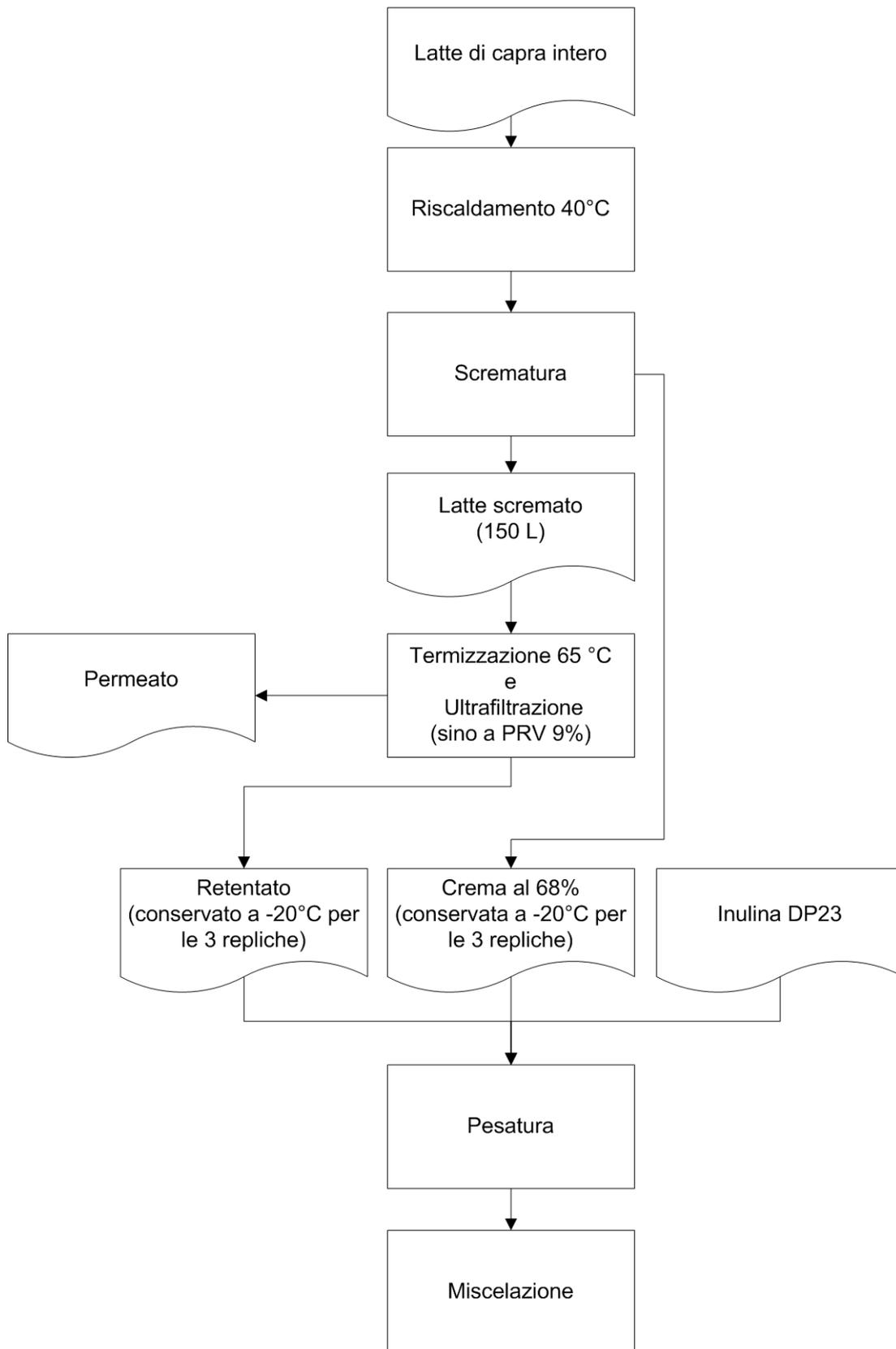
## 6.2 Materiali e Metodi

### 6.2.1 Livelli sperimentali

Sono state eseguite un totale di dodici microcaseificazioni (tre per ciascun livello sperimentale), utilizzando miscele (3 kg per livello) composte da retentato di UF di latte di capra magro, crema di latte di capra, e inulina DP $\geq$ 23 (Frutafit TEX, Sensus, The Netherlands), aventi il medesimo contenuto in proteina (8%) e le seguenti percentuali di grasso (Gr) e inulina (IN): **IN0 (controllo)**: 9% Gr, 0% IN; **IN2**: 7% Gr, 2% IN; **IN5**: 4% Gr, 5% IN; **IN7**: 2% Gr, 7% IN.

### 6.2.2 Preparazione delle componenti del latte

Il latte di capra intero veniva sottoposto ai trattamenti indicati nello schema di processo riportato in **Figura 6.1**.



**Figura 6.1** – Schema di preparazione delle componenti del latte

Inizialmente il latte veniva riscaldato a 40 °C e sottoposto a scrematura, mediante scrematrice centrifuga (Seital separatori, Italia) del tipo a “batch”, e con portata di 1500 L/h. La crema di latte veniva immediatamente congelata alla temperatura di -20°C fino al momento della preparazione delle miscele per ciascun livello sperimentale. Il latte magro (150 L), prima di essere sottoposto a concentrazione mediante UF, veniva trattato termicamente (65°C) al fine di abbattere la carica batterica.

Tutti i trattamenti termici di riscaldamento e raffreddamento avvenivano in modo discontinuo, in vasca di coagulazione a doppio fondo (Magnabosco, Italia).

L’ultrafiltrazione del latte veniva eseguita utilizzando un impianto pilota (Mete S.r.l., Membrane Technology, Varese, Italia), concepito per il funzionamento a “batch”, dotato di membrana (Celgard, USA) di natura polimerica (PES), con configurazione a spirale avvolta, con cut-off di 20 kD e superficie nominale di 5 m<sup>2</sup>. Una volta raggiunto il rapporto di concentrazione volumetrico (VCR) prestabilito, corrispondente ad un contenuto in proteina vera nel retentato pari a circa 9%, il retentato veniva scaricato dal serbatoio dell’impianto, ed immediatamente congelato a -20°C fino al momento della preparazione delle miscele per l’esecuzione delle 3 repliche per ciascun livello sperimentale.

### 6.2.3 Preparazione delle miscele

Le miscele contenenti l'8% di proteina e le percentuali di grasso ed inulina indicate precedentemente, erano preparate utilizzando precise quantità di retentato, crema, e, ad eccezione del livello IN0 (controllo), di inulina. I volumi di ciascun componente erano calcolati attraverso l'applicazione del sistema matematico a 4 equazioni, di seguito indicato:

$$\left\{ \begin{array}{l} d = ax + by + cz / V \\ d_1 = a_1x + b_1y + c_1z / V \\ d_2 = a_2x + b_2y + c_2z / V \\ x + y + z = V \end{array} \right.$$

$d$  = grasso nella miscela ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $d_1$  = proteina nella miscela ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $d_2$  = inulina nella miscela ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $a$  = grasso nella crema ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $a_1$  = proteina nella crema ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $a_2$  = inulina nella crema ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $b$  = grasso nel retentato ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $b_1$  = proteina nel retentato ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $b_2$  = inulina nel retentato ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $c$  = grasso nell'inulina ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $c_1$  = proteina nell'inulina ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $c_2$  = inulina nell'inulina ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $x$  = quantità crema (kg)  
 $y$  = quantità retentato (kg)  
 $z$  = quantità inulina (kg)  
 $V$  = quantità della miscela (kg)

### 6.2.4 Preparazione del formaggio

Il latte di ciascuna miscela veniva sottoposto ai trattamenti tecnologici indicati nello schema di processo riportato in **Figura 6.2**. Il latte veniva pastorizzato alla temperatura di  $74^\circ\text{C}$  e quindi omogeneizzato alla pressione di 200 bar, tramite omogeneizzatore discontinuo (mod. Z57L, Soavi & figli, Parma – Italia). Successivamente il latte veniva raffreddato alla temperatura di  $20^\circ\text{C}$ , e quindi inoculato con una coltura starter (0,05 g/L; CH-N19, CHR-Hansen, Hoersholm, Danimarca), costituita da batteri lattici mesofili aromatizzanti (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*), e addizionato con caglio liquido di vitello (0,02 mL/L; titolo 1:15.000, Caglificio Clerici, Cadorago, Como, Italia). La coagulazione e l'acidificazione avvenivano in contenitori di

vetro (400 mL) alla temperatura di 20°C nell'arco di 18 ore, e successivamente i formaggi venivano conservati alla temperatura di 4°C.



**Figura 6.2** – Schema di preparazione del formaggio

### **6.2.5 Determinazioni fisico-chimiche**

Il latte intero, il latte magro, ed il retentato venivano analizzati al fine di poter formulare correttamente le miscele. Su tali matrici venivano determinati i parametri riportati di seguito: pH (metodo potenziometrico, pHmetro 420 A Orion, Boston, USA); Sostanza secca (IDF, 1987); grasso (metodo Gerber); azoto totale (NT), (metodo Kjeldhal, IDF, 1993); azoto solubile (NS), e azoto non proteico (NNP), (Rowland, 1938). Sulla crema venivano effettuate le medesime determinazioni ad eccezione di quelle relative all'azoto. I dati relativi a queste componenti, avendo importanza unicamente per l'aspetto operativo di preparazione dei campioni, non sono stati esposti nel lavoro.

I formaggi erano analizzati alle 48 ore dalla produzione, ed in particolare venivano determinati i seguenti parametri: pH (metodo potenziometrico, pHmetro 420 A Orion, Boston, USA); sostanza secca (IDF, 1982); grasso (metodo Van Gulik); azoto totale (NT), azoto solubile a pH 4,6 (NS), e azoto non proteico (NNP), (Gripon, Desmazeaud, Le Bars, & Bergere, 1975).

### **6.2.6 Analisi colorimetriche**

I formaggi alle 48 h e dopo 20 gg dalla produzione venivano sottoposti (alla temperatura di 4°C), ad analisi colorimetrica di superficie, utilizzando un colorimetro portatile Minolta CR-400 (Minolta Co., Ltd., Japan). Il colore è descritto da tre valori, le coordinate di colore CIELAB: L, a, e b. La coordinata L (luminosità) dà una misura della maggiore o minore trasparenza del campione; la coordinata a dà una misura della maggiore o minore tendenza al rosso o al verde del colore; la coordinata b dà una misura della maggiore o minore tendenza al giallo o al blu del colore. Le misure erano standardizzate in riferimento alla piastra bianca di calibrazione. Venivano effettuate una media di 5 misurazioni per ognuna delle 3 repliche.

### **6.2.7 Test di penetrometria**

I formaggi alle 48 h e dopo 20 gg dalla produzione venivano sottoposti ai test di penetrometria. Prima dell'esecuzione di ciascun test i campioni venivano mantenuti alla temperatura di 15°C per 3 h. Il test era condotto in triplo direttamente sulla superficie libera dei formaggi conservati nei loro contenitori d'origine, utilizzando un reometro TA-XT2 (Stable Micro Systems, Surrey, UK). Le condizioni di esecuzione del test erano le seguenti: sonda in materiale plastico, con sezione piana e diametro di 20 mm; distanza di penetrazione/ritorno di 20 mm; velocità pre-test, velocità test e velocità post-test pari a 1 mm/s. La registrazione iniziava con la misura della forza che aumentava fino ad un valore massimo quando la sonda scendeva nel campione.

Dalla misure registrate nelle curve forza/spostamento, sono stati ricavati i seguenti parametri: forza massima (N), indice della durezza del prodotto; area positiva (N.mm), indice di consistenza del prodotto; forza massima negativa (N), indice di viscosità del prodotto; area negativa (N.mm), indice di adesività del prodotto.

### **6.2.8 Determinazione della microstruttura**

I formaggi alle 48 h dalla produzione erano esaminati da un punto di vista microstrutturale attraverso l'utilizzo della microscopia elettronica a scansione (SEM). A partire da ciascun formaggio venivano preparati alcuni campioni cilindrici (diametro ed altezza pari a circa 1,5 cm), i quali venivano immersi per 24 h, a temperatura ambiente, in glutaraldeide al 2,5% (Sigma-Aldrich) tamponata (tampone fosfato 0,1 M, pH 7,2), utilizzata come fissativo al fine di ottenere il *crosslink* delle proteine. A questo punto i campioni venivano sottoposti a 3 lavaggi successivi di 30 min. ciascuno in acqua distillata, criofratturati in azoto liquido al fine di visionare internamente la loro microstruttura, e disidratati mediante soluzioni a concentrazione crescente di acetone (25%, 50%, 75%, 100%; 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno). La disidratazione veniva completata con immersione dei campioni, per 2 ore, in 50% di esametildisilazano in acetone (entrambi Sigma-Aldrich) e successivamente in esametildisilazano puro.

Un microscopio elettronico a scansione (FEI QUANTA 200; FEI Company, Hillsboro, OR, USA) era utilizzato in low vacuum, a 20 kV, per vedere ciascun campione ad ingrandimenti da 800 x a 12000 x. Numerose immagini (1024x 1024 pixel) venivano salvate per ogni campione, e nel presente lavoro sono state presentate solo quelle più rappresentative.

### **6.2.9 Analisi sensoriale**

#### **6.2.9.1 Pairwise ranking test**

Il pairwise ranking test è un test sensoriale di confronto multiplo a coppie che consente di comparare numerosi campioni per un singolo attributo (Meilgaard, Civille, & Carr, 1999). Nel presente lavoro l'attributo in questione era la cremosità. Essa è la sensazione al palato associata solitamente al contenuto di grasso di un alimento. I campioni alle 48 h e dopo 20 gg dalla produzione venivano sottoposti alla temperatura di 6-8°C, ad un panel composto da 12 giudici selezionati, ai quali veniva chiesto di mettere in ordine d'intensità i formaggi per l'attributo "cremoso". Ad ogni giudice venivano presentati i campioni una coppia alla volta, in tutte le combinazioni possibili (6

coppie per i 4 campioni in esame), ed in ordine casuale. I risultati venivano elaborati attraverso il test statistico di Friedman (Meilgaard et al., 1999).

#### **6.2.9.2 Simple ranking test**

Il simple ranking test è un test sensoriale di ordinamento che consente di confrontare molti campioni per un singolo attributo (Meilgaard et al., 1999). A differenza del test di confronto multiplo a coppie, in questo caso i campioni vengono presentati ai giudici tutti assieme ed una sola volta. I giudici devono mettere in ordine su una scala da 1 a 4 i prodotti in base all'intensità dell'attributo prescelto. L'attributo in questione era il goaty (ovvero il tipico aroma ircino associato ai formaggi freschi caprini). I campioni dopo 10 gg dalla produzione venivano sottoposti, alla temperatura di 6-8°C, ad un panel composto da 20 giudici selezionati, ai quali veniva chiesto di mettere in ordine d'intensità i 4 campioni per l'attributo "goaty". I campioni erano presentati a ciascun soggetto in ordine casuale. I risultati venivano elaborati attraverso il test statistico di Friedman (Meilgaard et al., 1999).

#### **6.2.10 Analisi statistica**

Per gli esperimenti di penetrometria e colorimetria sono stati eseguiti l'analisi della varianza ed il test comparativo multiplo delle medie (Tukey) sulle misurazioni sperimentali, utilizzando la procedura General Linear Model del software statistico Minitab 12 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

## 6.3 Risultati e discussione

### 6.3.1 Composizione chimica dei formaggi

Il latte intero, il latte magro, la crema, ed il retentato venivano analizzati, come descritto nella relativa parte di materiali e metodi, al fine di costituire miscele con una composizione chimica prestabilita. La **Figura 6.3** e la **Tabella 6.1** mostrano, rispettivamente, le immagini fotografiche dei formaggi alle 48 h dalla produzione, e la composizione chimica degli stessi. La **Figura 6.3** permette di notare come i formaggi non apparissero, visivamente, differenti tra loro, e soprattutto come nessuno dei campioni presentasse sineresi nelle confezioni alle 48 h dalla produzione. Allo stesso modo, nemmeno i formaggi dopo 20 gg di conservazione a 4°C presentavano separazione di siero (immagini non mostrate).

**Tabella 6.1 – Composizione chimica dei formaggi alle 48 h dalla produzione (media  $\pm$  dev. stan.)**

	IN0*	IN2*	IN5*	IN7*
pH miscela	6,50 $\pm$ 0,01	6,55 $\pm$ 0,02	6,57 $\pm$ 0,03	6,58 $\pm$ 0,02
pH post-acidificazione	4,49 $\pm$ 0,01	4,51 $\pm$ 0,01	4,49 $\pm$ 0,01	4,50 $\pm$ 0,01
Solidi totali (g/100g)	21,51 $\pm$ 0,23	21,81 $\pm$ 0,08	21,73 $\pm$ 0,36	21,69 $\pm$ 0,12
Grasso (g/100g)	8,88 $\pm$ 0,10	6,99 $\pm$ 0,11	4,16 $\pm$ 0,05	2,13 $\pm$ 0,04
Grasso/ST** (g/100g)	41,31 $\pm$ 0,85	32,06 $\pm$ 0,46	19,22 $\pm$ 0,67	9,80 $\pm$ 0,21
Proteina totale*** (g/100g)	8,13 $\pm$ 0,15	8,09 $\pm$ 0,05	8,02 $\pm$ 0,10	8,03 $\pm$ 0,10
Sieroproteine (g/100g)	0,75 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,03
Inulina**** (g/100g)	0,00 $\pm$ -	2,00 $\pm$ -	5,00 $\pm$ -	7,00 $\pm$ -

\* IN0: 9% grasso, 0% inulina, (controllo); IN2: 7% grasso, 2% inulina; IN5: 4% grasso, 5% inulina; IN7: 2% grasso, 7% inulina. \*\* Rapporto grasso / solidi totali. \*\*\* Proteina totale: Azoto totale x 6,38. \*\*\*\* Quantità di inulina aggiunta alle miscele.

La composizione chimica dei formaggi (**Tabella 6.1**) dimostrava la validità del metodo di preparazione delle miscele utilizzato. Infatti, il contenuto in proteina totale di ogni formaggio era quello atteso (circa 8 g. 100g<sup>-1</sup>), così come il contenuto in solidi totali (da 21,51 a 21,81 g. 100g<sup>-1</sup>), e di sieroproteine (da 0,67 a 0,75 g. 100g<sup>-1</sup>) era piuttosto simile tra i prodotti. Pertanto, la sostanza secca dei campioni risultava costante, e il minor contenuto in grasso di IN2, IN5, e IN7 rispetto al prodotto *full-fat* (IN0), veniva compensato con un incremento del contenuto di inulina in questi campioni.

In questo modo era possibile ottenere dei formaggi via via più magri (come evidenziato anche dalla progressiva riduzione del rapporto grasso / solidi totali), dove il grasso veniva sostituito in rapporto di circa 1:1 dall'inulina, utilizzata come ingrediente funzionale.

Inoltre, come è possibile notare in **Tabella 6.1**, le miscele erano caratterizzate da valori di pH molto simili tra loro, e ciò era probabilmente dovuto al simile contenuto proteico che non determinava in esse differenze riguardo al potere tampone. Anche i formaggi delle 4 prove erano caratterizzati da valori di pH molto simili tra loro e non statisticamente differenti ( $p > 0,05$ ). Pertanto, l'inulina a lunga catena ( $DP \geq 23$ ) utilizzata in questo lavoro non sembrava essere fermentescibile per i batteri lattici utilizzati. La conferma deriva anche dal fatto che le curve di evoluzione del pH nel corso dell'intero processo di acidificazione (18 h) erano perfettamente sovrapponibili per i 4 livelli (curve non mostrate). Simili risultati sono stati ottenuti in lavori basati sull'incorporazione dell'inulina a lunga catena nello yogurt, dove l'inulina stessa non determinava cambiamenti nell'attività fermentativa dei batteri starter relativamente al valore di pH finale del prodotto (Guggisberg et al., 2009; Paseephol et al., 2008; Dello Staffolo et al., 2004).



**Figura 6.3** – Immagini fotografiche dei formaggi prodotti. IN0: 9% grasso, 0% inulina, (controllo); IN2: 7% grasso, 2% inulina; IN5: 4% grasso, 5% inulina; IN7: 2% grasso, 7% inulina.

### **6.3.2 Misure colorimetriche**

Il colore è un attributo di qualità piuttosto importante per prodotti come i formaggi freschi. Infatti, in base alla definizione stessa di questi prodotti, essi sono generalmente caratterizzati da un colore tendente al bianco del latte (Schulz-Collins & Senge, 2004). Un fattore che può influenzare il colore del prodotto è il colore degli ingredienti usati. L'inulina è commercializzata sotto forma di una polvere di colore bianco, e la sostituzione del grasso che normalmente presenta dei riflessi tendenti al giallognolo, potrebbe influenzare il colore del prodotto. Tuttavia, la **Tabella 6.2** indica come nessuna

differenza significativa ( $p>0,05$ ) venisse osservata nei valori di L, a, e b, tra i trattamenti per ciascun periodo di osservazione scelto, e sullo stesso campione nel corso della conservazione. Comunque i campioni con inulina erano caratterizzati da valori crescenti di L (luminosità), dovuti indubbiamente al colore bianco dell'inulina aggiunta in sostituzione al grasso. I valori di a erano negativi, indicando che essi erano nello spazio colorimetrico del verde, mentre i valori di b, essendo positivi si trovavano nello spazio colorimetrico del giallo. Pertanto, sebbene i campioni apparissero bianchi all'occhio umano, tuttavia lo strumento rivelava colori tendenti al giallo ed al verde.

**Tabella 6.2 – Analisi colorimetrica sui formaggi alle 48 h dalla produzione e dopo 20 gg di conservazione a 4°C (media  $\pm$  dev. stan.)**

	Campioni	L**	a**	b**
48 h	IN0*	94,07 $\pm$ 1,78	-2,28 $\pm$ 0,31	5,73 $\pm$ 0,02
	IN2*	94,94 $\pm$ 0,19	-2,20 $\pm$ 0,01	5,46 $\pm$ 0,57
	IN5*	94,84 $\pm$ 0,39	-2,43 $\pm$ 0,23	5,47 $\pm$ 0,13
	IN7*	95,09 $\pm$ 0,41	-2,28 $\pm$ 0,07	4,92 $\pm$ 0,58
20 gg	IN0*	93,82 $\pm$ 0,86	-2,41 $\pm$ 0,25	6,43 $\pm$ 0,57
	IN2*	95,08 $\pm$ 0,64	-2,21 $\pm$ 0,18	5,71 $\pm$ 0,37
	IN5*	95,96 $\pm$ 0,20	-2,10 $\pm$ 0,06	5,37 $\pm$ 0,20
	IN7*	95,08 $\pm$ 0,30	-2,06 $\pm$ 0,08	5,05 $\pm$ 0,13

\*IN0: 9% grasso, 0% inulina, (controllo); IN2: 7% grasso, 2% inulina; IN5: 4% grasso, 5% inulina; IN7: 2% grasso, 7% inulina.

\*\*L è la luminosità; a rappresenta la coordinata rosso/verde del colore; b rappresenta la coordinata giallo/blu del colore. I valori nella stessa colonna non sono statisticamente differenti ( $p>0,05$ ) tra i campioni per ciascun periodo di osservazione. Nessuna differenza significativa ( $p>0,05$ ) era inoltre osservata sullo stesso campione nel corso della conservazione.

Non sono stati trovati, in letteratura, dati riguardo l'effetto dell'inulina sulle proprietà colorimetriche dei formaggi freschi. Invece alcuni autori hanno riferito che l'inulina non modifica le proprietà colorimetriche dello yogurt. In particolare, in uno studio finalizzato a valutare l'effetto di diverse fibre (mela, grano, bambù, inulina) sulle proprietà

reologiche e sensoriali dello yogurt, Dello Staffolo et al. (2004) hanno riferito che solamente lo yogurt con fibre di mela mostrava differenze nel colore rispetto al controllo. Invece Aryana & McGrew (2007) hanno dimostrato che l'inulina (con catena di lunghezza variabile), non ha alcun effetto sull'aspetto e sui parametri di L, a, e b in yogurt prodotti con *Lactobacillus casei*.

### **6.3.3 Test di penetrometria**

La **Tabella 6.3** mostra i valori dei parametri reologici ottenuti attraverso i test di penetrometria. Il principale vantaggio di questo test è che non è richiesta alcuna preparazione del campione prima dell'esecuzione del test stesso, così vengono minimizzati i danni alla struttura del gel.

I parametri che possono essere ottenuti attraverso il test di penetrometria sono la forza massima (Fmax), che è la forza compressiva necessaria a penetrare 20 mm di formaggio (indica la durezza del prodotto); la forza massima negativa (Fmax negativa), che indica invece la viscosità del prodotto, e consiste nel valore massimo negativo misurato nel corso della risalita della sonda dai 20 mm di penetrazione verso la posizione iniziale. L'area positiva (indice di consistenza del prodotto) rappresenta invece il Lavoro, definito come l'area sotto la curva forza-spostamento nella parte positiva dell'asse y. L'area negativa (indice di adesività) è invece il Lavoro misurato sopra la curva forza-spostamento nella parte negativa dell'asse y. I parametri reologici in studio venivano influenzati dalla sostituzione grasso/inulina (**Tabella 6.3**).

In particolare, per tutti i parametri osservati, sia nei formaggi alle 48 h dalla produzione, che dopo 20 gg di conservazione a 4°C, è stata rilevata una riduzione lineare dei valori, in funzione del maggiore contenuto di inulina, con valori di IN0 superiori di 2- 2,5 volte circa rispetto a IN7. Come è possibile notare, per i valori relativi a tutti i parametri considerati, ad eccezione dell'area negativa nei formaggi dopo 20 gg di conservazione, IN5 e IN7 differivano in maniera statisticamente significativa rispetto al controllo, mentre IN2 non risultava significativamente ( $p>0,05$ ) differente da IN0. Nel caso dell'area negativa, nei formaggi conservati per 20 gg, la sola differenza significativa ( $p<0,01$ ) era tra IN7 e IN0.

**Tabella 6.3 – Parametri reologici ottenuti sui formaggi alle 48 h dalla produzione e dopo 20 gg di conservazione a 4°C (media ± dev. stan.)**

	Campioni	Fmax**	Area positiva**	Fmax negativa**	Area negativa**
48 h	IN0*	9,21 <sup>A</sup> ± 1,87	272,4 <sup>A</sup> ± 56,8	2,56 <sup>A</sup> ± 0,59	50,1 <sup>a,A</sup> ± 15,8
	IN2*	6,82 <sup>A,B</sup> ± 2,14	206,6 <sup>A,B</sup> ± 58,8	1,92 <sup>A,B</sup> ± 0,69	42,9 <sup>a,b</sup> ± 13,9
	IN5*	4,45 <sup>B,C</sup> ± 1,01	137,5 <sup>B,C</sup> ± 28,0	1,22 <sup>B,C</sup> ± 0,34	26,0 <sup>b,c</sup> ± 4,0
	IN7*	3,53 <sup>C</sup> ± 0,52	112,6 <sup>C</sup> ± 15,3	0,83 <sup>C</sup> ± 0,16	19,7 <sup>c,B</sup> ± 4,8
20 gg	IN0*	9,80 <sup>A</sup> ± 1,55	284,8 <sup>A</sup> ± 40,4	2,87 <sup>A</sup> ± 0,41	55,0 <sup>A</sup> ± 13,0
	IN2*	7,74 <sup>A,B</sup> ± 1,93	229,9 <sup>A,B</sup> ± 51,2	2,36 <sup>A,B</sup> ± 0,71	47,2 <sup>A,B</sup> ± 14,3
	IN5*	5,76 <sup>B,C</sup> ± 1,42	173,8 <sup>B,C</sup> ± 37,1	1,72 <sup>B,C</sup> ± 0,51	34,7 <sup>A,B</sup> ± 10,1
	IN7*	4,56 <sup>C</sup> ± 0,65	141,0 <sup>C</sup> ± 17,8	1,24 <sup>C</sup> ± 0,28	27,7 <sup>B</sup> ± 5,8

\*IN0: 9% grasso, 0% inulina, (controllo); IN2: 7% grasso, 2% inulina; IN5: 4% grasso, 5% inulina; IN7: 2% grasso, 7% inulina.

\*\*Fmax (Forza massima, N); Area positiva (N.mm); Fmax negativa (Forza massima negativa, N); Area negativa (N.mm).

I valori con una diversa lettera maiuscola (A, B, C) in apice, nella stessa colonna, differiscono statisticamente tra loro per  $p < 0,01$ , per ciascun periodo di osservazione. I valori con una diversa lettera minuscola (a, b, c) in apice, nella stessa colonna, differiscono statisticamente tra loro per  $p < 0,05$ , per ciascun periodo di osservazione. Nessuna differenza significativa ( $p > 0,05$ ) era osservata sullo stesso campione nel corso della conservazione.

IN2 differiva statisticamente da IN7 per tutti i parametri e per ogni periodo di osservazione considerato, ad eccezione dell'area negativa dopo 20 gg di conservazione dei prodotti. Al contrario, nessuna differenza significativa era osservata sullo stesso campione nel corso della conservazione, per tutti i parametri reologici osservati, anche se i valori tendevano ad aumentare nel tempo. Ciò poteva essere attribuito al fenomeno di rafforzamento della struttura dei gels, quando vengono conservati a basse temperature (Oliveira, Sodini, Remeuf, & Corrieu, 2001). In modo simile a quanto rilevato nelle nostre misure, Guggisberg et al. (2009) hanno osservato su campioni di yogurt (circa 14 % di solidi totali) standardizzati al 4% di proteina, e con differenti rapporti grasso/inulina, che la forza del gel era inferiore nei campioni con più inulina e meno grasso. I valori maggiori di forza, consistenza, adesività e viscosità rilevati nei prodotti con contenuto maggiore di grasso e minore di inulina sono da imputare alla

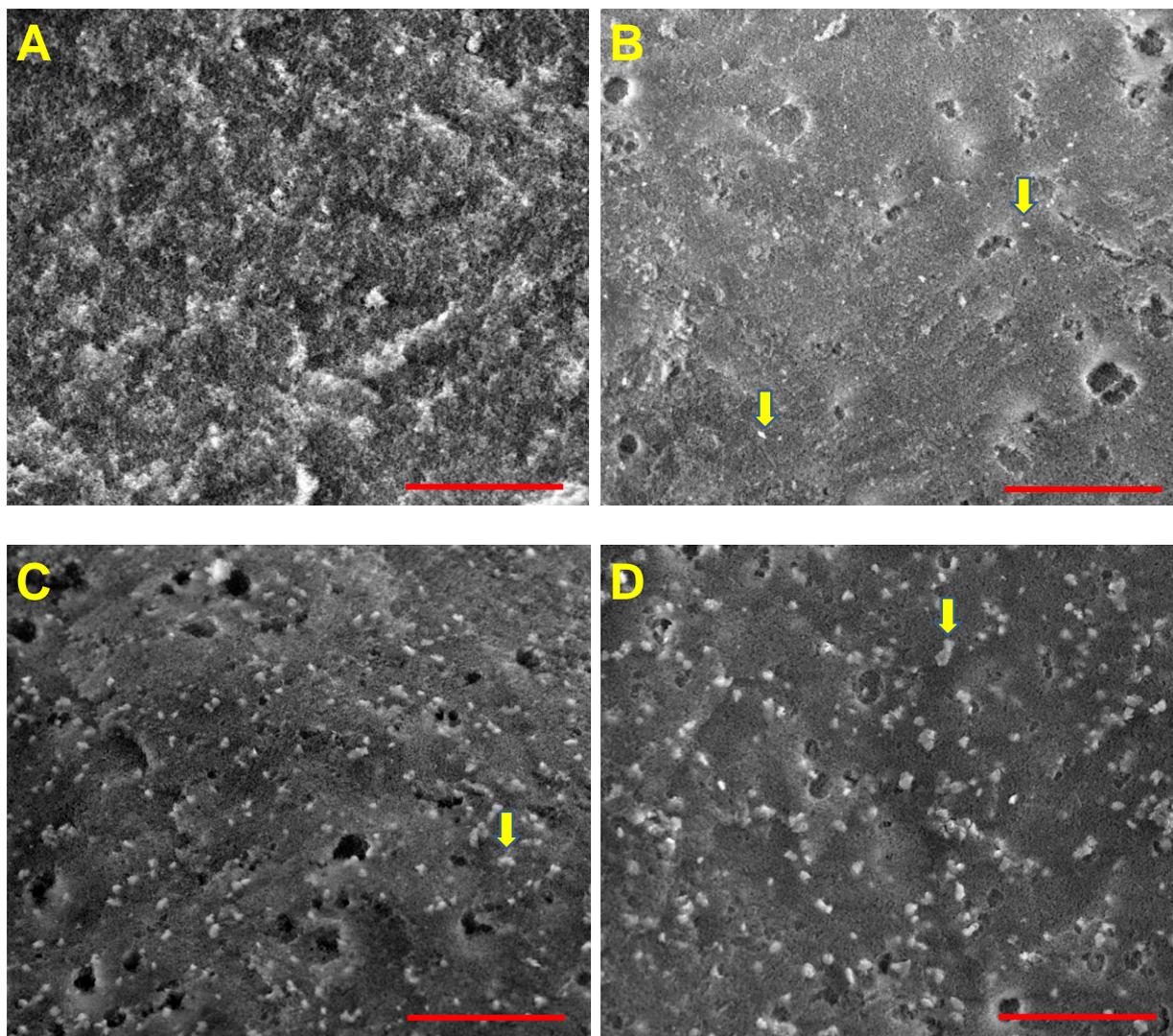
differente natura di queste sostanze, e ovviamente, anche alle modalità secondo cui esse partecipano alla formazione dei gels. Il grasso svolge una funzione piuttosto importante nello sviluppo della struttura dei formaggi, dal momento che fornisce un carattere omogeneo al prodotto, essendo distribuito in maniera uniforme all'interno della sua matrice caseinica (Mistry, 2001).

Quando l'inulina viene utilizzata come *fat-replacer*, essa si distribuisce nel prodotto in maniera differente rispetto al grasso. In particolare alcuni autori (Franck, 2002; Niness, 1999) riportano che l'inulina a lunga catena, non essendo perfettamente solubile nei prodotti, ha la capacità di formare microcristalli che interagiscono tra loro, e sono in grado di generare una struttura gradevolmente cremosa. Pertanto, è probabile che le differenti modalità di inglobamento di queste due componenti nella matrice caseinica del gel determini le differenze riscontrate nei parametri reologici misurati.

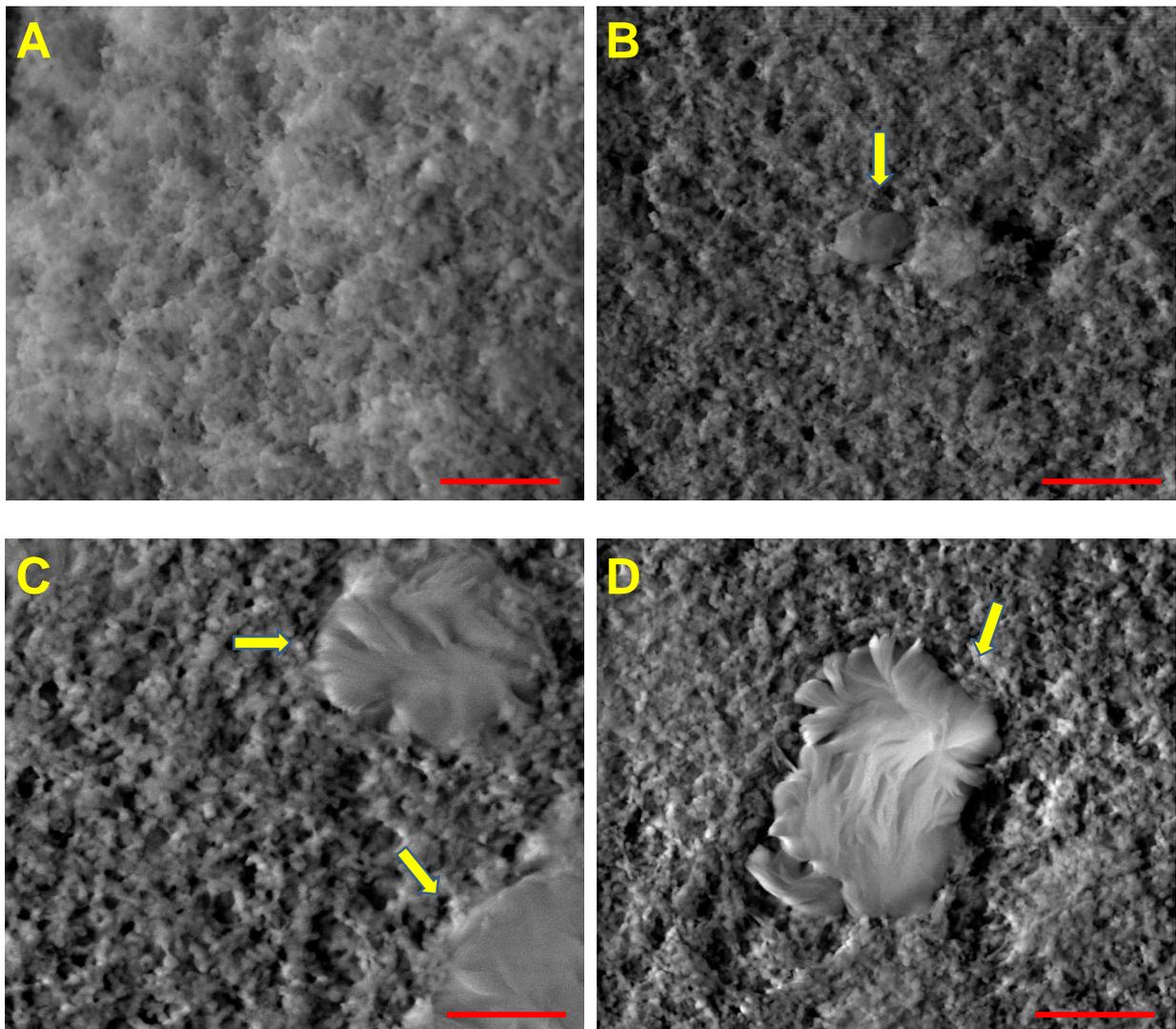
#### **6.3.4 Microstruttura**

Le **Figure 6.4** e **6.5** mostrano le micrografie (a diversi ingrandimenti) dei formaggi alle 48 h dalla produzione, ottenute tramite SEM. In generale la riduzione nel contenuto di grasso determina importanti differenze sulla microstruttura. Il formaggio controllo (IN0) (**Figura 6.4 A**), caratterizzato da una maggiore quantità di grasso, presenta una struttura maggiormente compatta, più omogenea e con una quasi totale assenza di pori rispetto agli altri livelli caratterizzati dalla crescente sostituzione di grasso con inulina. L'inulina tende a disporsi a macchie nel formaggio, e ad aggregarsi sotto forma di cristalli di dimensioni via via più grandi all'aumentare del suo contenuto nel prodotto, come risulta ben evidente dagli ingrandimenti a 800 x (frecce gialle in **Figura 6.4 B, C, D**). La **Figura 6.5** dà ancora maggiore evidenza rispetto a quanto detto sopra. In particolare il campione IN0 (**Figura 6.5 A**) presenta una rete proteica compatta, costituita di aggregati di micelle caseiniche di forma globulare fusi tra loro. La struttura si presenta poco porosa, ed i pori stessi sono di dimensioni molto piccole, probabilmente come conseguenza dell'inglobamento dei globuli di grasso all'interno della matrice proteica. I campioni IN2, IN5, e IN7 presentano una struttura meno compatta (**Figura 6.5 B, C, D**). Gli spazi vuoti sono in numero maggiore e più grandi rispetto a IN0, probabilmente a causa della minor presenza di grasso nei campioni.

L'inulina è invece presente sotto forma di cristalli, inglobati nella rete proteica, e di dimensioni maggiori nell'ordine  $IN7 > IN5 > IN2$ .



**Figura 6.4** – Immagini dei formaggi alle 48 h dalla produzione ottenute tramite SEM. Ingrandimenti 800 x, scala: 100  $\mu$ m. A, IN0: 9% grasso, 0% inulina, (controllo); B, IN2: 7% grasso, 2% inulina; C, IN5: 4% grasso, 5% inulina; D, IN7: 2% grasso, 7% inulina. Le frecce gialle indicano i cristalli di inulina.



**Figura 6.5** – Immagini dei formaggi alle 48 h dalla produzione ottenute tramite SEM. Ingrandimenti 12000 x, scala: 5  $\mu$ m. A, IN0: 9% grasso, 0% inulina, (controllo); B, IN2: 7% grasso, 2% inulina; C, IN5: 4% grasso, 5% inulina; D, IN7: 2% grasso, 7% inulina. Le frecce gialle indicano i cristalli di inulina.

E' possibile ipotizzare che i valori inferiori riscontrati nel test di penetrometria per i campioni con crescente contenuto di inulina, siano da attribuire alla struttura meno compatta in questi gel dovuta alla minor presenza di grasso, nonchè alla presenza dei cristalli di inulina in numero e dimensioni maggiori all'aumentare del contenuto di tale fibra nei formaggi.

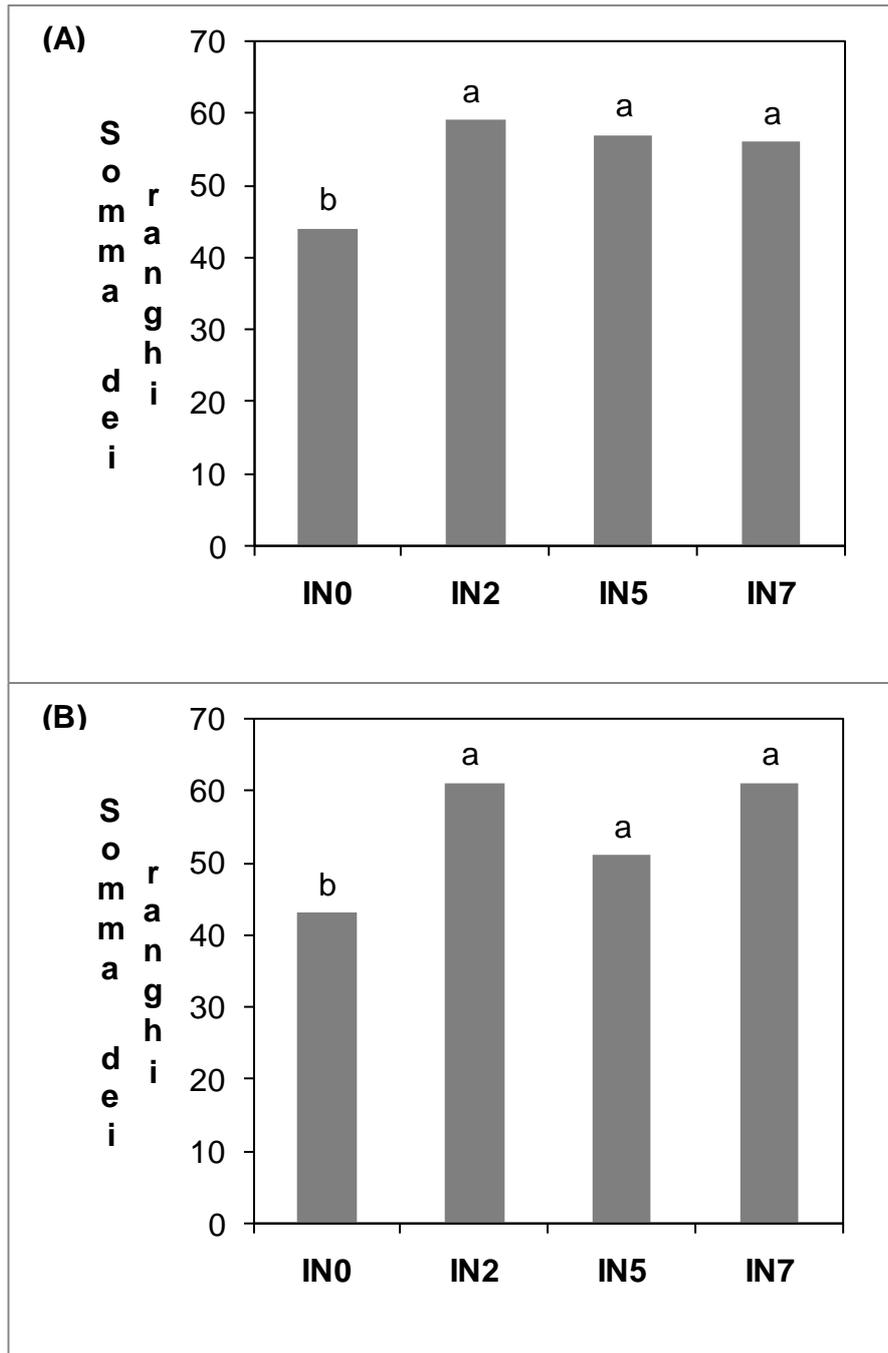
Franck (2002) e Niness (1999) hanno riferito che l'inulina è in grado di formare, in fase acquosa, un gel costituito da particelle cristalline inferiori al micron. Kip et al. (2006)

hanno ipotizzato che l'inulina potesse formare, nello yogurt, parte della rete strutturale proteica, aggregandosi agli aggregati proteici nel corso della fermentazione. Guggisberg et al. (2009) hanno evidenziato in micrografie ottenute tramite microscopia a scansione laser confocale, che l'inulina nello yogurt genera una struttura meno compatta e con pori di dimensioni maggiori, quando viene aggiunta in prodotti a basso contenuto di grasso o *full-fat*. Tuttavia in quest'ultimo lavoro non era stata verificata la disposizione dell'inulina nella rete proteica, in quanto l'inulina non poteva essere visualizzata con la tecnica ed il colorante utilizzati. Pertanto, nessuno dei lavori in nostro possesso era in grado di chiarire l'effettiva disposizione dell'inulina nei gel. In base alle micrografie ottenute nel presente lavoro, l'inulina non sembra partecipare attivamente alla formazione del gel proteico, ma piuttosto tende ad inglobarsi nella rete proteica sotto forma di cristalli che interrompono la continuità del gel caseinico.

### **6.3.5 Analisi sensoriale**

#### **6.3.5.1 Pairwise ranking test per l'attributo "cremoso"**

Il termine cremosità risulta essere piuttosto complesso da definire, dal momento che può vantare diverse definizioni ed essere utilizzato in diversi modi. Nel presente lavoro, abbiamo utilizzato la definizione di cremosità fornita da Kip et al. (2006), secondo cui essa è una combinazione di gusto e sensazioni strutturali legate alla quantità di grasso. La **Figura 6.6** mostra i risultati ottenuti mediante il pairwise ranking test per l'attributo "cremoso". Come è possibile notare tutti i campioni che contenevano inulina in sostituzione al grasso risultavano più cremosi ed in maniera statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) rispetto al controllo, mentre non differivano tra loro. Tali risultati erano ottenuti nei formaggi alle 48 h dalla produzione (**Figura 6.6 A**), e si confermavano nei formaggi conservati per 20 gg alla temperatura di 4°C (**Figura 6.6 B**). L'inulina è un *fat-replacer* piuttosto "attraente" per il settore alimentare dal momento che è in grado di migliorare la sensazione di cremosità percepita al palato di molti prodotti. I nostri risultati confermano che fin dai più bassi rapporti di sostituzione del grasso con inulina (IN2), la sensazione di cremosità percepita al palato risulta superiore rispetto al prodotto *full-fat*.



**Figura 6.6** – Somma dei ranghi per l'attributo “cremoso”, ottenuta tramite il pairwise ranking test, per i formaggi alle 48 h dalla produzione (A), e dopo 20 gg di conservazione a 4°C (B). IN0: 9% grasso, 0% inulina, (controllo); IN2: 7% grasso, 2% inulina; IN5: 4% grasso, 5% inulina; IN7: 2% grasso, 7% inulina. I valori con una diversa lettera minuscola (a, b) differiscono statisticamente tra loro per  $p < 0,05$ .

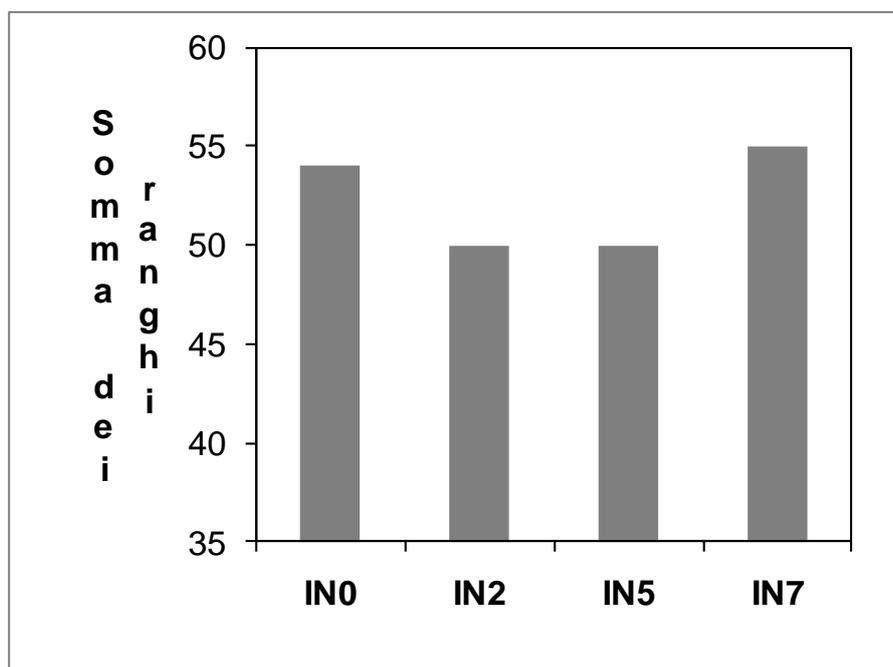
Inoltre, sembra evidente che l'attributo "cremoso" è correlato in maniera inversa rispetto ai parametri reologici rilevati strumentalmente. Probabilmente i cristalli di inulina, come già suggerito da Franck (2002) e Niness (1999), interagendo tra loro, sono in grado di generare una struttura particolarmente cremosa. Appare piuttosto complicato comparare i risultati ottenuti nel presente lavoro con quelli ottenuti da altri autori, in quanto il tipo di prodotto utilizzato risultava differente (nella maggior parte dei lavori il prodotto di riferimento è lo yogurt), e come conseguenza di ciò, le concentrazioni di inulina e grasso utilizzate erano anch'esse differenti. Guggisberg et al. (2009) riferiscono che l'aggiunta di inulina nello yogurt è in grado di influenzare la percezione di cremosità. Tale risultato era ottenuto con aggiunte di inulina del 2% e 4% in campioni contenenti una certa percentuale di grasso (1%, 2%, 3,5%). Al contrario nessun effetto era osservato nei campioni magri (0,1% di grasso). Infatti, uno yogurt con 4% di inulina e 0,1% di grasso possedeva una cremosità inferiore rispetto ad un prodotto *full-fat* controllo (3,5% di grasso). Altri autori suggeriscono che una quantità pari al 3% di inulina DP $\geq$ 23 è in grado di influenzare positivamente la sensazione di cremosità nello yogurt magro (Kip et al., 2006). Tuttavia in questo caso il campione controllo era costituito da yogurt magro (0,1% di grasso) senza aggiunta di inulina, e pertanto veniva valutata l'aggiunta di inulina al prodotto e non il suo comportamento come *fat-replacer*.

#### **6.3.5.2 Simple ranking test per l'attributo "goaty"**

Con il termine "goaty", utilizzato nel presente lavoro, si deve intendere il tipico aroma di ircino che è normalmente associato ai formaggi caprini freschi. In particolare secondo la definizione riportata da Ryffel, Piccinali, & Bütikofer (2008), è il tipico aroma associato ai caprini freschi della tradizione francese.

La **Figura 6.7** mostra chiaramente come i formaggi presentavano valori molto simili in termini di somma dei ranghi per l'attributo "goaty", e non risultavano statisticamente differenti tra loro ( $p > 0,05$ ). L'inulina a lunga catena utilizzata nel presente lavoro possiede un carattere neutro in termini di sapore, e quindi è plausibile che il suo utilizzo in sostituzione al grasso non influenzi l'aroma dei prodotti. Lo sviluppo dell'aroma ircino nel latte e nei formaggi caprini è invece dovuto alla presenza degli acidi grassi liberi, specialmente da C6:0 a C10:0 e più specificamente gli acidi grassi a catena ramificata

C9 e C10 come il 4-metil- e 4-etil-C8, che sono più abbondanti nel latte dei piccoli ruminanti rispetto al latte vaccino (Ha & Lindsay, 1993).



**Figura 6.7** – Somma dei ranghi per l’attributo “goaty”, ottenuta tramite il simple ranking test, per i formaggi dopo 10 gg di conservazione a 4°C. IN0: 9% grasso, 0% inulina, (controllo); IN2: 7% grasso, 2% inulina; IN5: 4% grasso, 5% inulina; IN7: 2% grasso, 7% inulina. I valori non differiscono statisticamente tra loro ( $p>0,05$ ).

Questi acidi grassi sono presenti nel latte e nei formaggi come conseguenza della lipolisi (l’idrolisi dei trigliceridi in acidi grassi liberi). Nel presente studio, la riduzione del contenuto di grasso e la sua sostituzione con inulina non ha determinato una minore percezione dell’aroma ircino nei formaggi. La causa di ciò era probabilmente da ricercare nel fatto che la frazione volatile degli acidi grassi liberi risultava sufficientemente abbondante in tutti i prodotti da non permettere al panel di discriminare tra i campioni per questo attributo.

## 6.4 Conclusioni

L'utilizzo di inulina come *fat-replacer* nel latte di capra è risultato particolarmente valido al fine di ottenere un formaggio fresco con caratteristiche potenzialmente funzionali (ricco in prebiotici e *low-fat*) tramite il processo tecnologico applicato. In particolare la fabbricazione di un formaggio prodotto direttamente nella sua confezione finale, e che non presenta sineresi nel corso della *shelf-life*, garantisce l'utilizzo ottimale dell'inulina. Infatti essa, essendo una fibra solubile, andrebbe in parte perduta con la frazione liquida nel corso dei processi di produzione tradizionali dei formaggi. Inoltre, le misure colorimetriche e la valutazione dell'aroma irino effettuate sui prodotti in studio non presentavano differenze, e tali aspetti uniti alla maggior cremosità riscontrata nei campioni con inulina potrebbero essere apprezzati dai consumatori. Dalle immagini ottenute al microscopio elettronico si può ragionevolmente concludere che la maggiore cremosità dei prodotti con inulina risulta correlata alla formazione di cristalli di questa sostanza, che aumentano di dimensione, interagendo tra loro, con l'incremento del contenuto di inulina nei formaggi.

## **7. PRODUZIONE DI RICOTTA OVINA A RIDOTTO CONTENUTO DI GRASSO A PARTIRE DA SIERO CONCENTRATO PER ULTRAFILTRAZIONE**

### **7.1 Introduzione**

La ricotta è probabilmente il più vecchio ed il più noto latticino ottenuto dal siero di latte (Pizzillo, Claps, Cifuni, Fedele, Rubino, 2005).

Come ampiamente descritto nel Capitolo 2, la ricotta, ed in maniera particolare quella ovina, è un prodotto caseario di origine italiana, ottenuto attraverso la denaturazione termica delle proteine del siero. La materia prima di produzione della ricotta è costituita principalmente dal siero di latte. Tuttavia spesso il siero viene addizionato di latte (dal 5 al 25%) e/o crema (Mucchetti et al., 2002). E' un latticino non sottoposto a processi di maturazione, caratterizzato da un elevato contenuto in acqua, con gusto delicatamente dolce, profumo di latte e crema, e con una struttura granulosa, ma non sabbiosa. La produzione di ricotta è stata considerata come una delle vie economicamente più convenienti per l'utilizzazione del siero, e la sua commercializzazione può essere considerata una fonte addizionale di reddito per le aziende casearie (Shukla & Kaur Brar, 1986).

Il processo tradizionale di trasformazione del siero in ricotta comporta rilevanti perdite di materia utile, in particolare di proteine ad alto valore biologico ed in misura inferiore di grasso, che si accumulano nel siero di fine lavorazione (la scotta). La tecnica di estrazione e la flocculazione incompleta delle sieroproteine, nelle condizioni di processo convenzionali, ne sono le principali cause.

Da studi precedenti si è visto che il recupero di materia utile, nella produzione della ricotta, aumenta sensibilmente in relazione al grado di concentrazione delle proteine nel siero (Balducci, 1974), questo per la capacità delle stesse di formare più facilmente aggregati a seguito delle trasformazioni indotte dal calore (Mangino, 1984). L'ultrafiltrazione (UF), di cui abbiamo abbondantemente discusso nei capitoli

precedenti, è un metodo estremamente valido al fine di ottenere la concentrazione e la standardizzazione della componente proteica del latte e del siero (Cheryan, 1998).

Lo scopo di questo lavoro è stato di verificare il comportamento del siero ovino concentrato per ultrafiltrazione, nelle condizioni di produzione tradizionali della ricotta, con particolare riguardo alla valutazione della composizione del prodotto e della sua resa di trasformazione.

## **7.2 Materiali e Metodi**

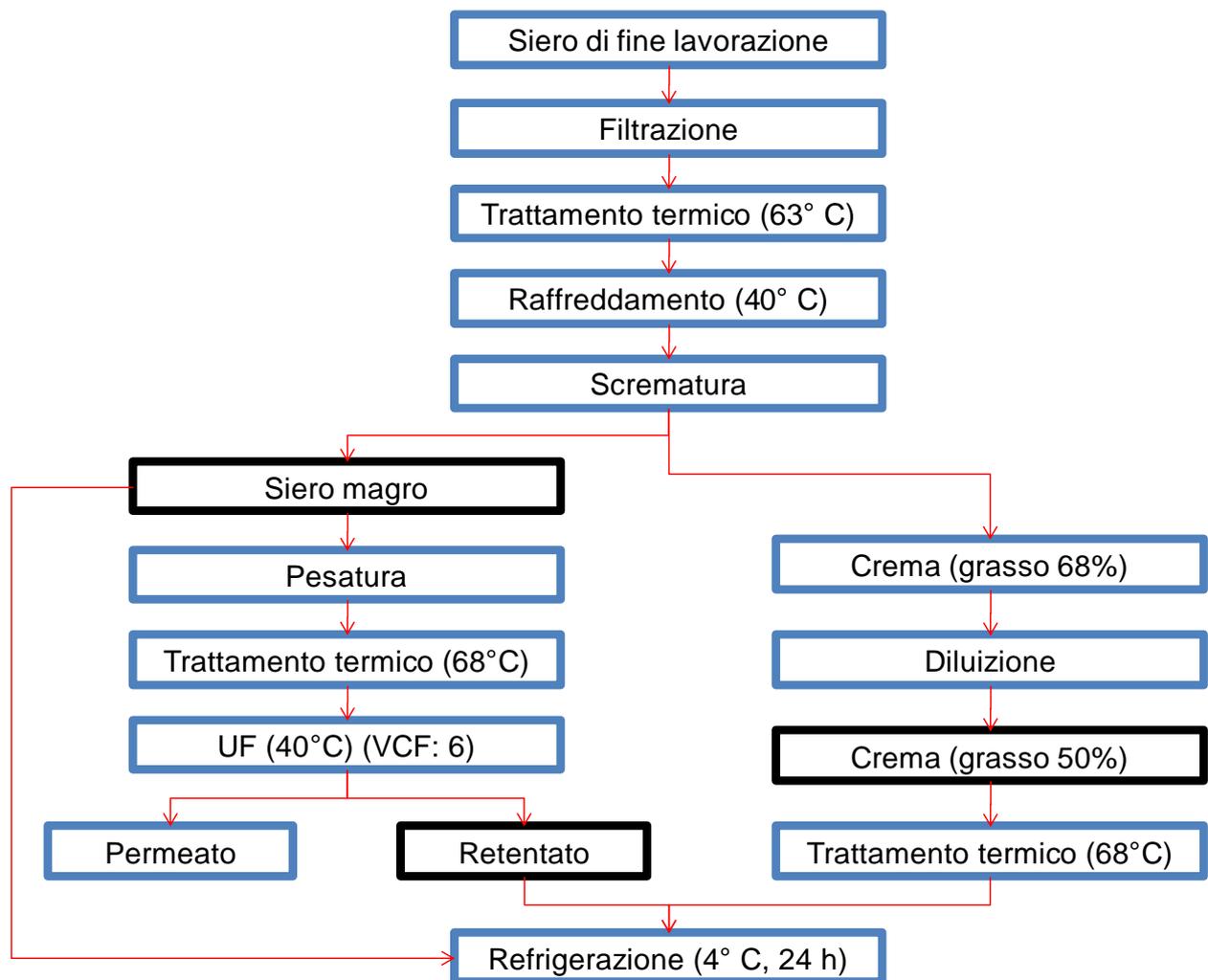
### ***7.2.1 Livelli sperimentali***

Sono state eseguite un totale di dodici trasformazioni di siero in ricotta (tre per ciascun livello sperimentale) secondo il processo di produzione convenzionale, utilizzando 4 miscele a composizione predeterminata (13 kg per livello) composte da siero ovino magro, siero ovino magro concentrato (retentato) e crema di siero ovino. Le miscele erano differenti per contenuto in grasso e proteine, ed avevano la seguente composizione: **MO1** (grasso 1,65%, proteine 1,5%); **MO2** (grasso 3.3%, proteine 3.0%); **MO3** (grasso 4.4%, proteine 4.0%); **MO4** (grasso 7.7%, proteine 7.0%). In questo modo il rapporto grasso/proteina veniva mantenuto costante (circa 1,1).

### ***7.2.2 Preparazione delle componenti delle miscele***

La **Figura 7.1** illustra il processo di preparazione delle componenti da utilizzare nella costituzione delle miscele. Il siero di fine lavorazione proveniente dalla trasformazione di 500 L di latte ovino intero, utilizzando la tecnologia del pecorino a pasta cruda, veniva filtrato, termizzato alla temperatura di 63°C, raffreddato a 40°C, e successivamente scremato mediante scrematrice centrifuga (Seital separatori, Italia) del tipo a “batch”, e con portata di 1500 L/h. La crema veniva titolata al 50% di grasso, termizzata (68°C), e immediatamente refrigerata e conservata a 4°C per 24 h. Allo stesso modo il siero magro veniva termizzato alla temperatura di 65°C, e una piccola aliquota era refrigerata e conservata (4°C) per 24 h. L'aliquota rimanente di siero magro, veniva sottoposta a

concentrazione tramite UF alla temperatura di 40°C. L'ultrafiltrazione del siero veniva eseguita utilizzando un impianto pilota (Mete S.r.l., Membrane Technology, Varese, Italia), concepito per il funzionamento a "batch", dotato di membrana (Celgard, USA) di natura polimerica (PES), con configurazione a spirale avvolta, con cut-off di 20 kD e superficie nominale di 5 m<sup>2</sup>. Una volta raggiunto il rapporto di concentrazione volumetrico (VCR) prestabilito (circa 6), il retentato veniva immediatamente raffreddato e conservato a 4°C. Tutti i trattamenti termici di riscaldamento e raffreddamento, descritti precedentemente, avvenivano in modo discontinuo in vasca di coagulazione a doppio fondo (Magnabosco, Italia).



**Figura 7.1** – Schema di preparazione delle componenti delle miscele.

### 7.2.3 Preparazione delle miscele

Le miscele contenenti le percentuali di grasso e proteina indicate precedentemente, erano preparate utilizzando precise quantità di retentato, crema, e siero magro. I volumi di ciascun componente erano calcolati attraverso l'applicazione del sistema matematico a 3 equazioni, di seguito indicato:

$$\begin{cases} d = ax + by + cz / V \\ d_1 = a_1x + b_1y + c_1z / V \\ x + y + z = V \end{cases}$$

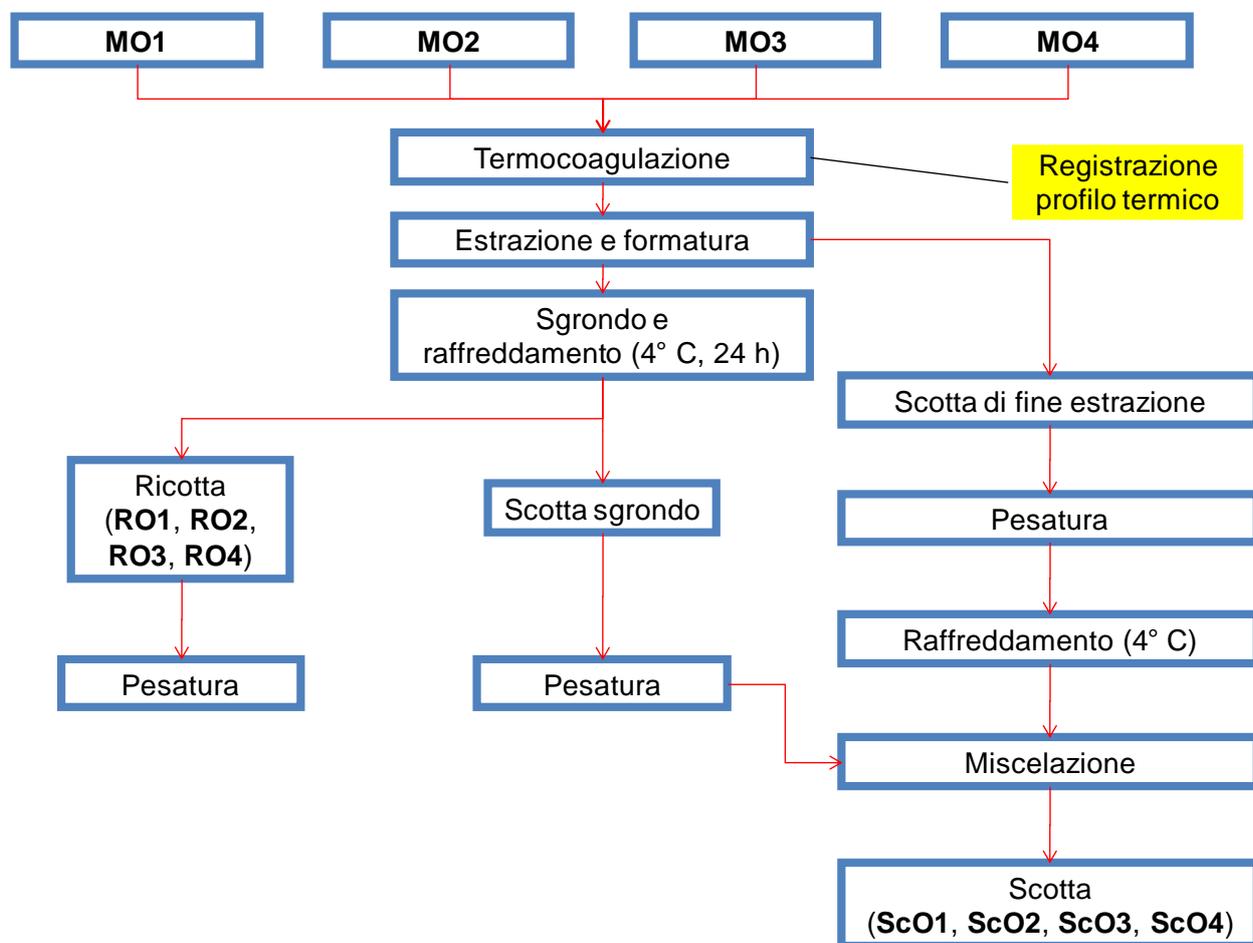
$d$  = grasso nella miscela ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $d_1$  = proteina nella miscela ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $a$  = grasso nella crema ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $a_1$  = proteina nella crema ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $b$  = grasso nel retentato ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $b_1$  = proteina nel retentato ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $c$  = grasso nel siero magro ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $c_1$  = proteina nel siero magro ( $\text{g.L}^{-1}$ )  
 $x$  = quantità crema (kg)  
 $y$  = quantità retentato (kg)  
 $z$  = quantità siero magro (kg)  
 $V$  = quantità della miscela (kg)

### 7.2.4 Produzione della ricotta

Ciascuna miscela veniva sottoposta al processo di termocoagulazione come illustrato in **Figura 7.2**. Le miscele venivano campionate in fase di riscaldamento alla temperatura di  $40^\circ\text{C}$ , ed immediatamente analizzate.

Il sistema di estrazione si basava sul riscaldamento indiretto del siero, mediante utilizzo di un bagnomaria termostato, la cui temperatura era mantenuta costante tra  $95^\circ$  e  $100^\circ\text{C}$ . La flocculazione della ricotta avveniva in lenta e costante agitazione. Il profilo termico del processo di termocoagulazione veniva monitorato in continuo, e registrato, mediante l'utilizzo di un Data Logger (Escort HT 21C16, Escort Data Logging System Ltd, Giorgio Bormac S.r.l, Carpi, MO, Italia), inserito all'interno della miscela all'inizio della fase di riscaldamento. Dall'elaborazione del profilo termico veniva estrapolata la temperatura alla quale avveniva l'affioramento. A seguito dell'affioramento, la ricotta veniva lasciata rassodare per 10', si procedeva quindi all'estrazione, ed al riempimento delle fische. La ricotta, a seguito di un periodo di sgrondo a temperatura ambiente, era trasferita in cella di raffreddamento, regolata a  $4^\circ\text{C}$ , per le 24 h successive. La scotta di

fine estrazione e la scotta sgrondo alle 24 h, venivano raccolte in appositi contenitori. Il giorno seguente, le ricotte derivate da ciascuna miscela venivano pesate e campionate (**RO1, RO2, RO3, RO4**). Allo stesso modo, le scotte (miscelate tra loro) erano pesate e campionate previo riscaldamento alla temperatura di 40°C, e immediatamente analizzate.



**Figura 7.2** – Schema di preparazione delle ricotte.

### **7.2.5 Analisi fisico-chimiche di macrocomposizione**

Il siero magro, il retentato, le miscele, e i campioni di scotta venivano analizzati per i parametri riportati di seguito: pH (metodo potenziometrico, pHmetro 420 A Orion, Boston, USA); Sostanza secca (IDF, 1987); grasso (metodo Gerber); azoto totale (NT),

(metodo Kjeldhal, IDF, 1993); azoto non proteico (NNP), (Rowland, 1938). Sulla crema, venivano effettuate le medesime determinazioni ad eccezione di quelle relative all'azoto. I risultati relativi al siero magro, retentato e crema, avendo importanza unicamente per l'aspetto operativo di preparazione dei campioni non sono stati esposti nel lavoro.

Le ricotte erano analizzate alle 24 h dalla produzione, ed in particolare venivano determinati i seguenti parametri: pH (metodo potenziometrico, pHmetro 420 A Orion, Boston, USA); Sostanza secca (IDF, 1982); grasso (estrazione Soxhlet); azoto totale (NT), e azoto non proteico (NNP), (Gripon, Desmazeaud, Le Bars, & Bergere, 1975).

### **7.2.6 Calcolo delle rese e dei recuperi materia**

Il calcolo delle rese è stato eseguito nel modo seguente:

$$\text{Resa} = \text{QR}/\text{QM} \times 100$$

$$\text{Resa corretta per l'umidità} = (\text{QR}/\text{QM} \times 100) \times (\text{UmR}/\text{UmC})$$

dove:

**QR**= Quantità ricotta (kg); **QM**= Quantità miscela (kg). La quantità di miscela presa in considerazione è riferita alla somma delle singole componenti utilizzate nella preparazione della miscela stessa. Il retentato veniva moltiplicato per il fattore volumetrico di concentrazione (VCR). In questo modo tutte le rese venivano riferite alla quantità di siero iniziale utilizzata; **UmR**= Umidità della ricotta determinata sperimentalmente ( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ); **UmC** = Umidità pari a  $70 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (valore medio di riferimento).

Il calcolo dei recuperi è stato eseguito nel modo seguente:

$$\text{Recupero materia (grasso, proteina o solidi totali)} = (\text{MR} \times \text{QR})/(\text{MM} \times \text{QM}) \times 100$$

**MR**= Materia nella ricotta ( $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ); **MM**= Materia nella miscela ( $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ); **QR**= Quantità ricotta (kg); **QM**= Quantità miscela (kg).

### **7.2.7 SDS-PAGE e quantificazione delle proteine**

I campioni, ottenuti come precedentemente descritto, erano analizzati tramite SDS-PAGE, al fine di verificarne i cambiamenti nel profilo proteico. L'elettroforesi monodimensionale era condotta su gel di poliacrilammide al 14% (da 7 cm) secondo la metodica descritta da Laemmli (1970). Venivano effettuate opportune diluizioni al fine di ottenere il medesimo carico proteico per ogni gruppo di campioni (miscele, scotte e ricotte). Le miscele e le scotte non venivano trattate in alcun modo prima dell'elettroforesi, mentre le ricotte venivano omogeneizzate e risospese in H<sub>2</sub>O Milli-Q, al fine di ottenere una concentrazione finale di campione pari a 10 mg/mL. Le proteine venivano colorate con Brilliant blue G 250 in base a quanto precedentemente descritto da Westermeier (2006), e le immagini venivano digitalizzate con un ImageScanner (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Successivamente, le immagini venivano analizzate e quantificate tramite il software QuantityOne (BioRad, Hercules, CA, USA), utilizzando i seguenti parametri per il rilevamento bande: *Sensitivity*, 10000; *Lane width*, 2400 mm; *Min. density*, 0,00%; *Noise filter*, 4,00; *Shoulder sens.*, 1,00; *Size scale*, 5.

### **7.2.8 Idrolisi in situ delle bande proteiche e identificazione tramite LC-MS/MS**

Dopo la quantificazione, le bande proteiche venivano identificate tramite spettrometria di massa. Dapprima esse subivano la digestione triptica in situ. Le bande venivano ritagliate dalle corsie corrispondenti a ciascun campione, decolorate tramite lavaggi ripetuti con 50 mM di NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8), e ACN. I campioni erano ridotti e carbamidometilati in 50 mM di tampone NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8), con 10 mM di DTT a 56°C, e poi con 55 mM di iodoacetamide a temperatura ambiente ed al buio. La digestione triptica era ottenuta alla temperatura di 37°C *overnight*, utilizzando 60-100 ng di tripsina per banda, in base all'intensità delle bande stesse. Successivamente, le bande venivano identificate tramite LC-MS/MS in base ai parametri descritti da Addis et al. (2009). Le analisi di LC-MS/MS erano ottenute tramite uno spettrometro di massa ibrido

Q-TOF, equipaggiato con una sorgente Z-spray, e accoppiato in linea con un sistema di cromatografia capillare CapLC (Waters, Manchester, UK). Dopo il caricamento, la miscela proteica (6  $\mu$ L) veniva concentrata e lavata a 20  $\mu$ L/min su una pre-colonna a fase inversa (Symmetry 300, C18, 5  $\mu$ m, NanoEase, Waters), utilizzando acido formico (0,2%) come eluente. Successivamente, i campioni venivano frazionati su una colonna capillare a fase inversa C18 (Symmetry, 75  $\mu$ m x 15 mm, Waters) ad un flow rate di 250 nL/min, utilizzando un gradiente lineare di eluente B (acido formico allo 0,2% in ACN al 95%) in A (acido formico allo 0,2% in ACN al 5%), dal 7 al 50% in 40 min. Veniva utilizzato Argon come gas di collisione. Il software ProteinLynx era utilizzato per analizzare gli spettri, e per generare una peak list, la quale veniva introdotta nel software MASCOT MS/MS (versione 2.2, Matrix Science, Boston, MA, USA) per l'identificazione proteica.

### **7.2.9 Analisi Statistica**

L'analisi della varianza ed il test comparativo multiplo delle medie (Tukey) sono stati eseguiti sulle misurazioni sperimentali, utilizzando la procedura General Linear Model del software statistico Minitab 12 (Minitab Inc., State College, PA, USA).

## **7.3 Risultati e discussione**

### **7.3.1 Composizione chimica delle miscele e delle ricotte**

La **Tabella 7.1** mostra la composizione chimica delle miscele di partenza. Come atteso, i valori di grasso, proteina, e conseguentemente solidi totali differivano tra i livelli, e tali differenze erano statisticamente significative ( $p < 0,05$ ). Per quanto riguarda il valore di pH, solamente MO4 differiva in maniera significativa rispetto agli altri livelli. Questo era dovuto alla maggiore quantità di proteine in MO4, che causava delle differenze riguardo al potere tampone. La maggiore capacità tampone dei retentati è stata discussa in maniera esaustiva da altri autori (Mistry & Kosikowski, 1985). Anche l'azoto non proteico (NNP) differiva in maniera significativa tra le 4 miscele. Esso viene concentrato

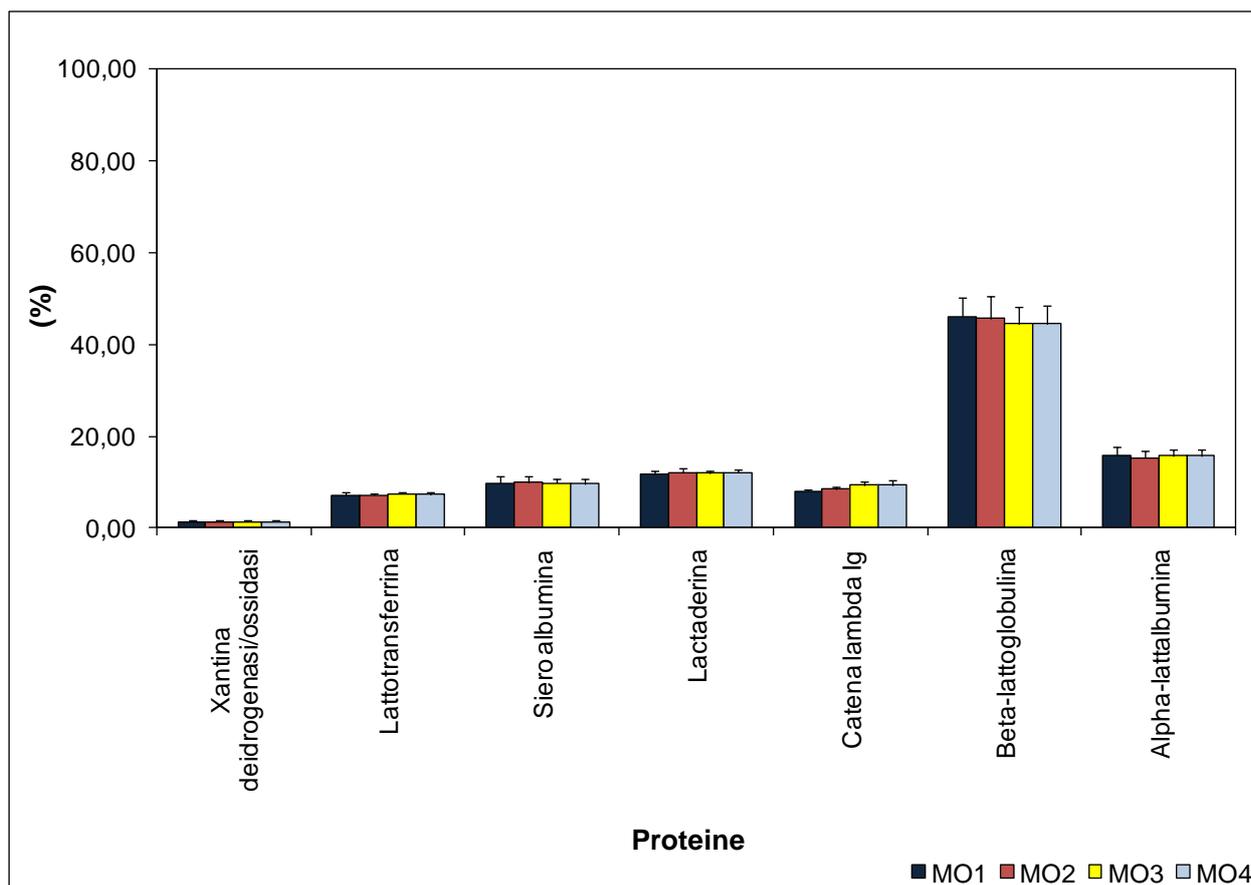
durante il processo di UF, e pertanto era più abbondante percentualmente nelle miscele in cui era necessario aggiungere una maggiore quantità di retentato (nell'ordine MO4>MO3>MO2>MO1). Per quanto riguarda il rapporto grasso/proteina, che era atteso pari a 1,1 per tutte le miscele, effettivamente non variava in maniera significativa tra i livelli, e presentava valori medi da 1,03 a 1,12.

**Tabella 7.1 – Composizione chimica delle miscele (media ± dev. stan.)**

	MO1	MO2	MO3	MO4
pH	6,48 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,53 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,53 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,35 ± 0,12 <sup>b</sup>
Solidi Totali ( g.100g <sup>-1</sup> )	8,76 ± 0,22 <sup>d</sup>	11,62 ± 0,31 <sup>c</sup>	13,70 ± 0,47 <sup>b</sup>	19,42 ± 0,45 <sup>a</sup>
Grasso ( g.100g <sup>-1</sup> )	1,61 ± 0,10 <sup>d</sup>	3,44 ± 0,06 <sup>c</sup>	4,50 ± 0,04 <sup>b</sup>	7,81 ± 0,27 <sup>a</sup>
Proteina ( g.100g <sup>-1</sup> ) <sup>(1)</sup>	1,56 ± 0,08 <sup>d</sup>	3,10 ± 0,27 <sup>c</sup>	4,16 ± 0,41 <sup>b</sup>	7,09 ± 0,48 <sup>a</sup>
Grasso/proteina	1,03 ± 0,06	1,12 ± 0,08	1,09 ± 0,12	1,11 ± 0,09
Grasso/solidi totali (%)	18,38 ± 1,16 <sup>d</sup>	29,63 ± 0,48 <sup>c</sup>	32,88 ± 1,37 <sup>b</sup>	40,25 ± 1,95 <sup>a</sup>
Proteina/solidi totali (%)	17,84 ± 1,13 <sup>d</sup>	26,64 ± 1,65 <sup>c</sup>	30,31 ± 2,04 <sup>b</sup>	36,47 ± 2,06 <sup>a</sup>
NNP (g.100g <sup>-1</sup> ) <sup>(2)</sup>	0,071 ± 0,006 <sup>d</sup>	0,104 ± 0,009 <sup>c</sup>	0,123 ± 0,010 <sup>b</sup>	0,164 ± 0,019 <sup>a</sup>

<sup>(1)</sup> Proteina: Azoto totale x 6,38; <sup>(2)</sup> NNP: azoto non proteico. I valori con una diversa lettera minuscola (a, b, c, d) in apice, nella stessa riga, differiscono statisticamente tra loro per p<0,05.

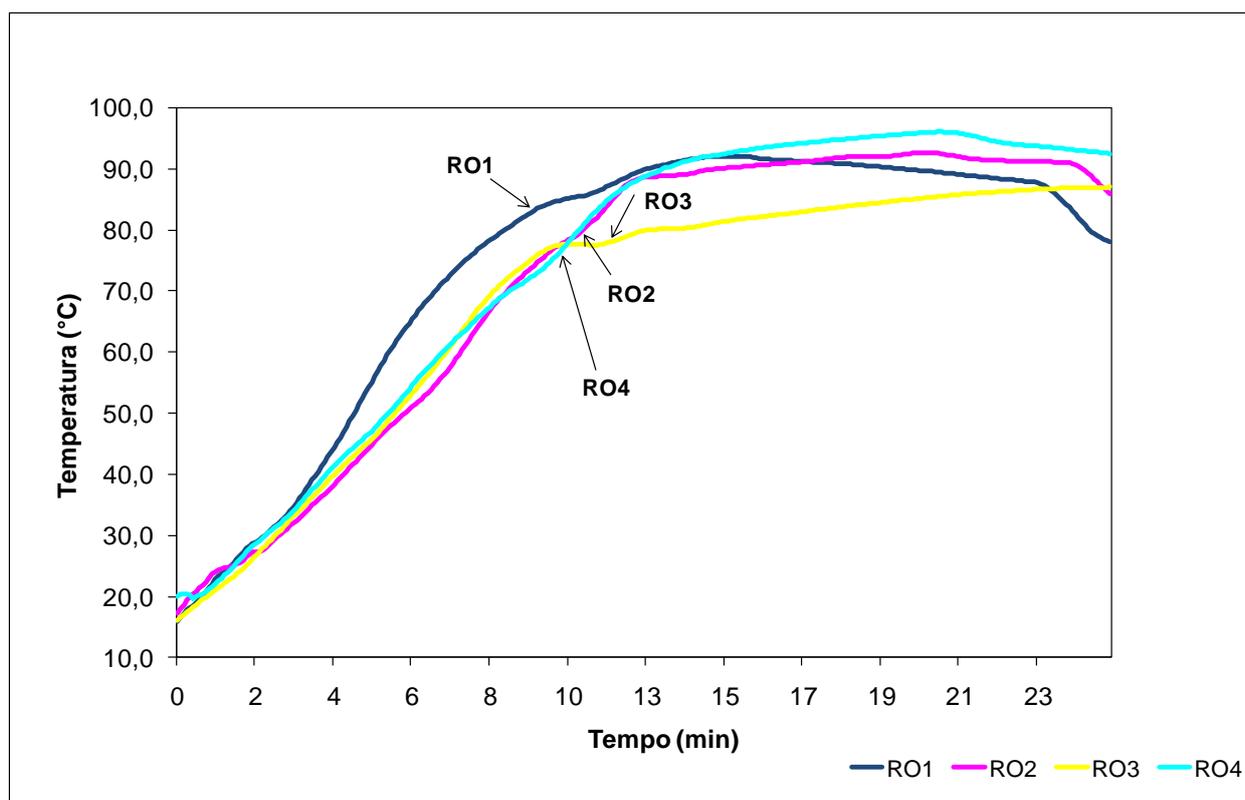
La **Figura 7.3** mostra la distribuzione quantitativa delle singole frazioni proteiche nelle miscele ottenute tramite QuantityOne (Bio-Rad). Le miscele erano caratterizzate dalla medesima distribuzione proteica (considerando che le analisi erano effettuate a parità di carico proteico). Infatti non veniva osservata alcuna differenza significativa (p>0,05) tra i livelli, nell'ambito di ogni singola frazione proteica. Ciò dimostra che il processo di produzione delle miscele, ed in particolare il passaggio del siero magro nell'impianto di UF, non determinavano differenze nella concentrazione delle singole proteine, ma tutte venivano concentrate allo stesso modo.



**Figura 7.3** – Distribuzione delle frazioni proteiche nelle miscele sulla base dell’analisi quantitativa effettuata tramite QuantityOne (Bio-Rad). Le barre d’errore indicano la deviazione standard di tre repliche.

Le due frazioni proteiche più abbondanti erano costituite dalla  $\beta$ -lattoglobulina ( $\beta$ -Lg; circa il 45%) e  $\alpha$ -lattalbumina ( $\alpha$ -La; circa il 16%). Poi venivano in ordine la lactaderina (circa il 12%), la sieralbumina (circa il 10%), la catena  $\lambda$  delle immunoglobuline (circa il 9%), la lattotransferrina (circa il 7%), ed infine la xantina deidrogenasi/ossidasi (1,5% circa). I risultati ottenuti per le percentuali di  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La, sieralbumina, immunoglobuline, e lattotransferrina sono perfettamente in linea con i dati riscontrati in letteratura per le frazioni sieroproteiche del latte vaccino (Fox, 2003), e con quanto riferito da altri autori per il latte ovino (Park, Juárez, Ramos, Haenlein, 2007). La lactaderina, e la xantina deidrogenasi/ossidasi sono due proteine della MFGM (membrana dei globuli di grasso del latte), (Cebo, Caillat, Bouvier, Martin, 2010). Nel presente lavoro, esse si trovano nella frazione serica, in quantità più o meno abbondante, probabilmente a causa del processo di scrematura subito dal siero, la cui azione meccanica esercitata sui globuli di grasso contribuisce ad incrementare il contenuto di queste proteine nel siero stesso.

In **Figura 7.4** sono rappresentati i profili termici ottenuti per le 4 miscele nel corso del processo di termocoagulazione. Inoltre vengono indicati i punti in corrispondenza dei quali si verificava l'affioramento (comparsa dei primi flocculi) delle ricotte. Dal punto di vista tecnologico le miscele erano trattate nelle medesime condizioni, come si può vedere dalle simili pendenze delle curve. Inoltre, la temperatura di affioramento delle 4 ricotte risultava compresa tra 76°C e 81°C in un intervallo di tempo compreso tra 9 e 11,5 minuti.



**Figura 7.4** – Profili termici ottenuti nel corso del processo di termocoagulazione. Le frecce indicano i punti, in corrispondenza dei quali, si verifica l'affioramento della ricotta per ciascun livello sperimentale. Le curve rappresentano una replica rappresentativa.

Dal punto di vista della composizione chimica, le ricotte sono risultate significativamente differenti per tutti i parametri analizzati ( $p < 0,05$ ), fatta eccezione per il pH (**Tabella 7.2**). In particolare, la ricotta RO4 risultava mediamente più umida  $72,9 \text{ (g. } 100\text{g}^{-1})$  rispetto a RO1 e RO2 ( $69,5 \text{ g. } 100\text{g}^{-1}$  e  $69,4 \text{ g. } 100\text{g}^{-1}$ , rispettivamente), mentre RO3 non differiva dalle altre ricotte per questo parametro.

Le percentuali di grasso e proteina nelle ricotte presentavano un andamento opposto tra i campioni. Infatti il valore di grasso tendeva a diminuire da RO1 a RO4, mentre la proteina tendeva ad aumentare. Nel caso del valore di proteina, RO1 differiva significativamente ( $p < 0,05$ ) dagli altri 3 livelli, mentre nel caso del grasso le differenze erano più graduali (**Tabella 7.2**), in base alla concentrazione di grasso e proteina della miscela di partenza. Probabilmente, la maggiore umidità rilevata in RO4 (soprattutto rispetto a RO1) era da attribuire alla maggiore capacità di ritenzione dell'acqua esercitata dalle sieroproteine denaturate, contenute in quantità superiore in questa ricotta.

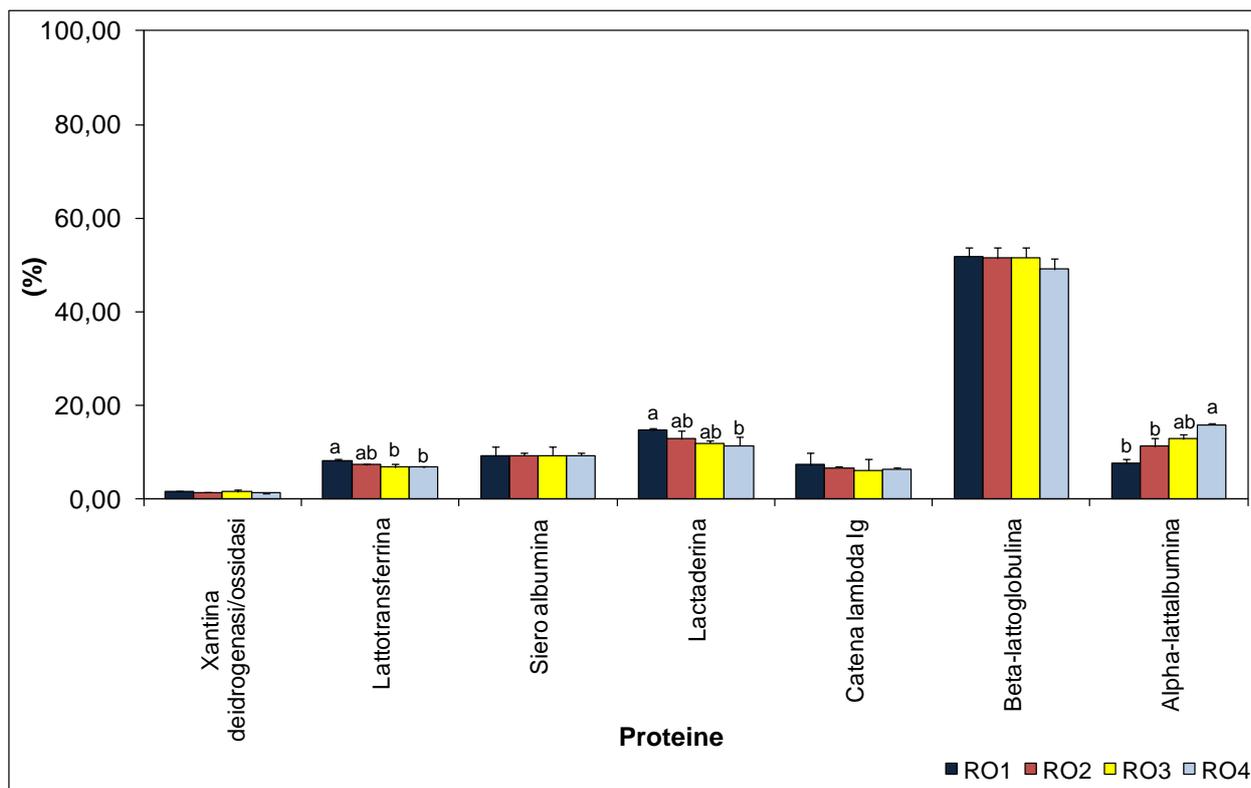
**Tabella 7.2 – Composizione chimica delle ricotte (media  $\pm$  dev. stan.)**

	RO1	RO2	RO3	RO4
pH	6,82 $\pm$ 0,24	6,79 $\pm$ 0,09	6,72 $\pm$ 0,15	6,66 $\pm$ 0,16
Umidità (g.100g <sup>-1</sup> )	69,52 $\pm$ 1,75 <sup>b</sup>	69,36 $\pm$ 2,28 <sup>b</sup>	70,34 $\pm$ 2,72 <sup>ab</sup>	72,88 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup>
Grasso (g .100g <sup>-1</sup> )	20,50 $\pm$ 2,19 <sup>a</sup>	17,34 $\pm$ 2,47 <sup>ab</sup>	15,72 $\pm$ 2,92 <sup>b</sup>	12,20 $\pm$ 1,60 <sup>c</sup>
Proteina (g.100g <sup>-1</sup> ) <sup>(1)</sup>	6,70 $\pm$ 0,85 <sup>b</sup>	9,61 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	10,12 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	10,18 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>
Grasso/proteina	3,12 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	1,80 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	1,56 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	1,20 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>
Grasso/solidi totali (%)	67,18 $\pm$ 5,03 <sup>a</sup>	56,42 $\pm$ 3,75 <sup>b</sup>	52,67 $\pm$ 5,03 <sup>b</sup>	44,84 $\pm$ 3,53 <sup>c</sup>
Proteina/solidi totali (%)	22,03 $\pm$ 2,74 <sup>c</sup>	31,46 $\pm$ 2,06 <sup>b</sup>	34,32 $\pm$ 3,58 <sup>ab</sup>	37,64 $\pm$ 2,29 <sup>a</sup>
NNP (g.100g <sup>-1</sup> ) <sup>(2)</sup>	0,060 $\pm$ 0,013 <sup>c</sup>	0,105 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup>	0,124 $\pm$ 0,018 <sup>b</sup>	0,191 $\pm$ 0,037 <sup>a</sup>

<sup>(1)</sup> Proteina: Azoto totale x 6,38; <sup>(2)</sup> NNP: azoto non proteico. I valori con una diversa lettera minuscola (a, b, c) in apice, nella stessa riga, differiscono statisticamente tra loro per  $p < 0,05$ .

I valori di NNP riflettevano sostanzialmente l'andamento riscontrato nelle miscele. Come conseguenza di questi risultati, e come può anche essere evidenziato dai rapporti grasso/proteina, grasso/solidi totali e proteina/solidi totali, all'aumentare del contenuto di grasso e proteine nelle miscele di partenza (pur mantenendo il medesimo rapporto tra queste componenti) si ottenevano ricotte via via più magre e proteiche. La **Figura 7.5** mostra la distribuzione percentuale delle differenti frazioni proteiche nelle ricotte oggetto di studio. Alcune proteine (xantina deidrogenasi/ossidasi, sieralbumina, catena  $\lambda$  delle immunoglobuline, e  $\beta$ -Lg) non mostravano un comportamento

significativamente differente ( $p > 0,05$ ) nella distribuzione percentuale tra i livelli. Al contrario la lattotransferrina e la lactaderina differivano significativamente ( $p < 0,05$ ) tra i livelli e presentavano una riduzione percentuale progressiva all'aumentare della concentrazione proteica delle miscele di partenza. Nel caso della lattotransferrina RO1 differiva significativamente da RO3 e RO4, mentre nel caso della lactaderina RO1 differiva in maniera significativa solamente da RO4. La  $\alpha$ -La era l'unica proteina che mostrava un *trend* inverso rispetto alle altre. Infatti all'aumentare della concentrazione proteica delle miscele di partenza, questa proteina era presente in percentuali superiori nelle ricotte, (RO4 differiva significativamente da RO1 e RO2). A tal proposito alcuni autori hanno riferito che la denaturazione dell'  $\alpha$ -La è notevolmente influenzata dall'aumento della concentrazione delle sieroproteine (Oldfield, Singh, & Taylor, 2005; Law & Leaver, 1997), ed in particolare della  $\beta$ -Lg. Lo stesso fenomeno era stato osservato da Calvo, Leaver, & Banks (1993), i quali utilizzando una miscela di  $\beta$ -Lg,  $\alpha$ -La e caseine, dimostravano che la perdita di  $\alpha$ -La nativa diveniva maggiore all'aumentare della concentrazione di  $\beta$ -Lg. La denaturazione e l'aggregazione dell'  $\alpha$ -La sono strettamente dipendenti dalla disponibilità di gruppi tiolo (Calvo et al., 1993). Sia la  $\beta$ -Lg che la sieralbumina hanno gruppi tiolo disponibili a prendere parte alle reazioni di interscambio tiolo-disolfuro, le quali portano alla formazione di legami disolfuro intermolecolari tra le sieroproteine. Oldfield et al. (2005) hanno invece indicato chiaramente che il tasso di denaturazione della  $\beta$ -Lg era interessato in maniera decisamente minore rispetto all'  $\alpha$ -La, in relazione all'aumentata concentrazione proteica nel siero. Secondo quanto suggerito da questi autori, dal momento che la  $\beta$ -Lg è in grado di interagire con altre sieroproteine, è possibile che tali interazioni (superiori nel siero concentrato), limitino le capacità di "unfolding" e denaturazione di questa proteina. Secondo quanto riportato da Singh & Havea (2003), la suscettibilità termica delle singole sieroproteine alla denaturazione diminuisce nel seguente ordine: immunoglobuline > sieralbumina/lattotransferrina >  $\beta$ -Lg >  $\alpha$ -La. E' nostra opinione che la medesima distribuzione percentuale di alcune proteine (xantina deidrogenasi/ossidasi, sieralbumina, catena  $\lambda$  delle immunoglobuline) o la loro riduzione (lattotransferrina, lactaderina) nelle ricotte in studio, siano dovute al fatto che queste frazioni proteiche, essendo maggiormente sensibili al trattamento termico, subiscano livelli di denaturazione ottimali, fin dai più bassi livelli di concentrazione proteica nelle miscele di partenza.



**Figura 7.5** – Distribuzione delle frazioni proteiche nelle ricotte sulla base dell’analisi quantitativa effettuata tramite QuantityOne (Bio-Rad). Le barre d’errore indicano la deviazione standard di tre repliche. I valori con una diversa lettera minuscola (a, b), nell’ambito di una determinata frazione proteica, differiscono statisticamente tra loro per  $p < 0,05$ .

### 7.3.2 Rese e recuperi materia

Le rese di produzione, calcolate sulla base della quantità di siero tal quale utilizzato, e i recuperi materia (nello specifico di grasso e proteina) delle ricotte sono risultati significativamente differenti ( $p < 0,05$ ), (**Tabella 7.3**). La resa e la resa corretta (ovvero riferita ad un valore di umidità del 70% per tutte le ricotte), aumentavano all’aumentare della concentrazione di grasso e proteina delle miscele di partenza (per le differenze significative vedere la **Tabella 7.3**). Mediamente l’incremento di resa della ricotta RO4 rispetto a RO1 era pari al 75%, (10,74 % contro 6,14%).

**Tabella 7.3 – Rese e recuperi materia (media  $\pm$  dev. stan.)**

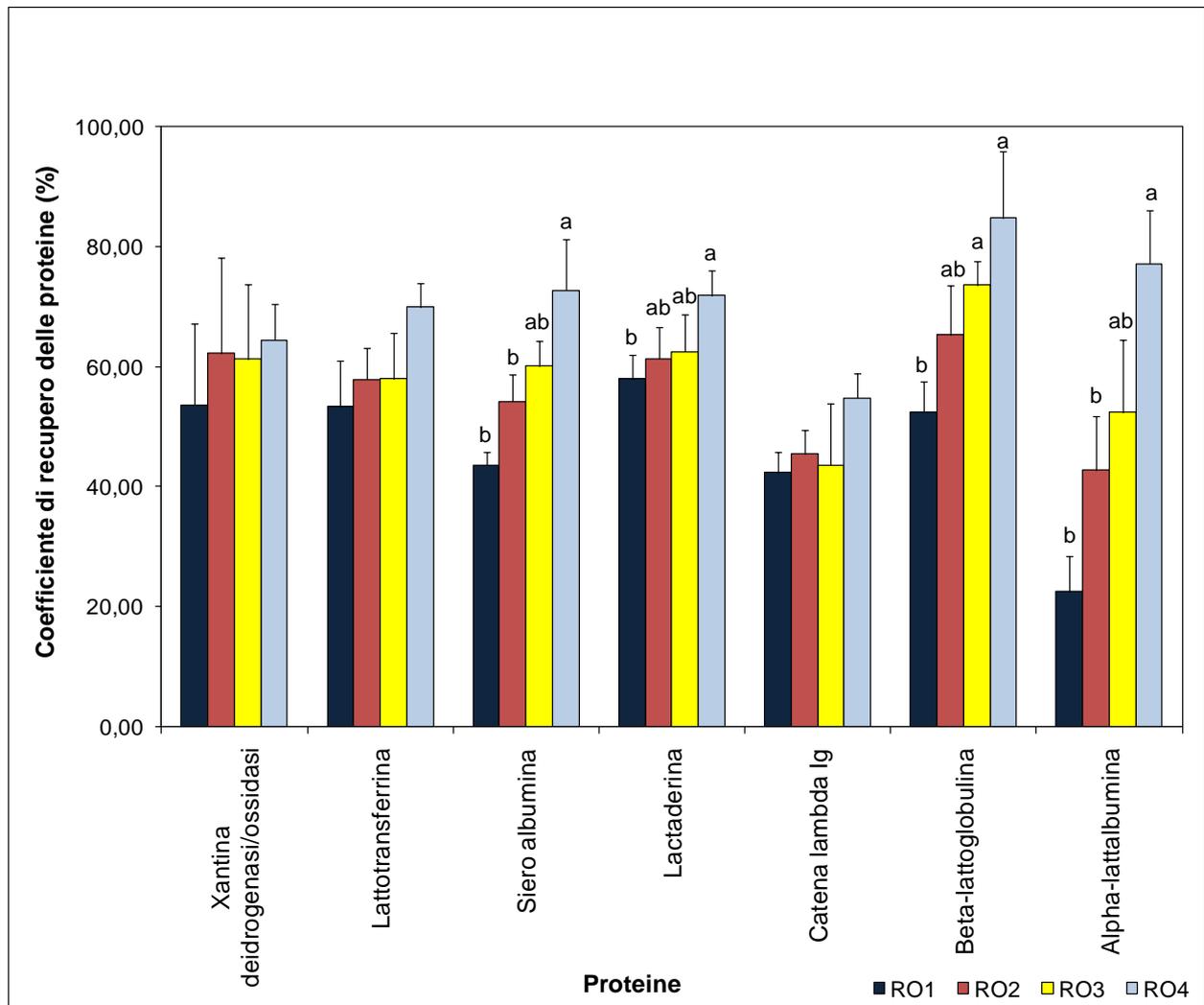
	RO1	RO2	RO3	RO4
Resa (kg.100kg <sup>-1</sup> ) <sup>(1)</sup>	6,14 $\pm$ 0,66 <sup>c</sup>	7,25 $\pm$ 0,71 <sup>bc</sup>	7,77 $\pm$ 0,99 <sup>b</sup>	10,74 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>
Resa corretta (kg.100kg <sup>-1</sup> ) <sup>(2)</sup>	6,23 $\pm$ 0,74 <sup>c</sup>	7,39 $\pm$ 0,66 <sup>bc</sup>	7,66 $\pm$ 1,02 <sup>b</sup>	9,66 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>
Recupero di grasso (%)	78,84 $\pm$ 9,65	78,38 $\pm$ 7,48	79,27 $\pm$ 12,11	85,20 $\pm$ 5,99
Recupero di proteina (%)	26,85 $\pm$ 5,64 <sup>c</sup>	48,55 $\pm$ 2,68 <sup>b</sup>	55,72 $\pm$ 4,67 <sup>b</sup>	81,50 $\pm$ 6,95 <sup>a</sup>

<sup>(1)</sup> Resa: quantità di ricotta (kg) ottenuta per 100 kg di siero di partenza; <sup>(2)</sup> Resa corretta: resa aggiustata al 70% di umidità. I valori con una diversa lettera minuscola (a, b, c) in apice, nella stessa riga, differiscono statisticamente tra loro per  $p < 0,05$ .

Considerando la resa corretta, l'incremento di resa scendeva mediamente al 55% (9,66% contro 6,23%). Ne consegue che circa il 20% della maggior resa era dovuto all'umidità e non al maggior recupero di materia.

I dati medi relativi ai recuperi, indicano che la proteina incide in misura nettamente maggiore rispetto al grasso nel determinare gli incrementi di resa. In particolare è notevole la differenza nel recupero di proteina tra RO4 e RO1 (81,5% contro 26,85%). Anche i livelli intermedi (RO3 e RO2) differivano significativamente ( $p < 0,05$ ) da RO1 e RO4. Al contrario, il recupero di grasso non differiva in maniera statisticamente significativa tra i livelli, risultando mediamente tra il 78% e l'85%. Pertanto, l'incremento di resa era sostanzialmente dovuto al maggior recupero di proteine. A tal proposito, la **Figura 7.6** mostra come tutte le frazioni proteiche siano interessate da un maggior recupero di proteina all'aumentare della concentrazione grasso/proteina nelle miscele di partenza. Si può notare come le frazioni proteiche più abbondanti (vedere **Figura 7.5**) siano, come atteso, quelle che più influiscono sui recuperi di ogni singola proteina. In particolare, in **Figura 7.6** spiccano gli elevati recuperi di  $\alpha$ -La, come conseguenza di quanto discusso precedentemente. Questi risultati confermano sostanzialmente quanto osservato precedentemente da Mangino (1984), ovvero che quando il contenuto di proteine nel siero è basso, insorgono maggiori difficoltà nella formazione del gel proteico, in quanto risulta più complicata l'interazione tra le molecole proteiche. Secondo Mangino (1984), ciò spiegava la minore capacità di affioramento della ricotta da siero vaccino (meno proteico) rispetto a quella da siero ovino. Con l'aumento della concentrazione proteica, la probabilità che si stabiliscano legami intermolecolari

aumenta, e di conseguenza la struttura del gel migliora progressivamente. Il gel risulta via via più compatto e le molecole proteiche che lo costituiscono trattengono maggiori quantitativi di acqua.



**Figura 7.6** – Coefficienti di recupero delle singole frazioni proteiche nella ricotta (g di proteina nella ricotta / g di proteina nella miscela). Le barre d'errore indicano la deviazione standard di tre repliche. I valori con una diversa lettera minuscola (a, b), nell'ambito di una determinata frazione proteica, differiscono statisticamente tra loro per  $p < 0,05$ .

## 7.4 Conclusioni

I risultati conseguiti nel presente lavoro confermano la validità del processo di concentrazione del siero, quale metodo per migliorare l'incremento della resa, e dei recuperi di materia utile nella ricotta.

In particolare, l'effetto della concentrazione delle proteine del siero tramite ultrafiltrazione determinava un maggiore recupero delle stesse nella ricotta. I risultati mostrano chiaramente che l' $\alpha$ -lattalbumina era la proteina che più di tutte risentiva in maniera positiva dell'effetto concentrazione, in quanto essa aumentava nelle ricotte all'aumentare della concentrazione proteica delle miscele di partenza.

Al contrario il recupero di grasso, che, peraltro, risulta già piuttosto performante nella produzione tradizionale di ricotta, non variava con la sua concentrazione nelle miscele. Come conseguenza dei differenti recuperi di grasso e proteina nelle ricotte oggetto di studio, era possibile ottenere prodotti caratterizzati da un'elevata resa, con un ridotto contenuto di grasso, ricchi in sieroproteine denaturate, e conseguentemente più umidi.

## CONCLUSIONI GENERALI

Al giorno d'oggi le raccomandazioni nutrizionali danno grande risalto al contributo fornito dal consumo di latticini ad una dieta sana ed equilibrata. Tuttavia spesso tali raccomandazioni spingono verso il consumo di prodotti magri o a ridotto contenuto di grasso. La principale ragione di tale messaggio rivolto al consumatore è la percentuale relativamente alta di acidi grassi saturi contenuta nel grasso del latte, ed il loro presunto impatto sul rischio di sviluppare malattie cardiovascolari. Tuttavia è ben noto che, in quanto componente naturale dei cibi, il grasso influenza in maniera specifica le proprietà reologiche, e le caratteristiche sensoriali dei prodotti quali la cremosità e l'aroma. Pertanto è piuttosto complicato riuscire ad imitare la qualità dei prodotti tradizionali quando si preparano delle formulazioni *low-fat*. Così, spesso si rende necessario utilizzare ingredienti in sostituzione del grasso per sopperire agli attributi di qualità persi quando il grasso è rimosso. Nell'ambito del crescente interesse verso lo studio e la formulazione di prodotti innovativi in ambito alimentare e lattiero-caseario in particolare, questa tesi ha permesso di mettere in luce l'importanza della tecnica di ultrafiltrazione applicata al latte e al siero di latte nello sviluppo di nuovi prodotti caseari freschi a ridotto contenuto di grasso e caratterizzati da potenziali effetti benefici per la salute. Nella prima parte sperimentale della tesi sono state mostrate le differenze nell'evoluzione della struttura dei gel ottenuti da latte magro e concentrato mediante coagulazione acido-presamica. Le differenze riscontrate nel comportamento reologico dei prodotti erano da imputare in modo chiaro al differente rilascio del calcio colloidale nel corso dell'acidificazione. Come evidenziato dai risultati ottenuti nella seconda parte sperimentale del presente lavoro, il latte concentrato, ricco in calcio e proteine, quali le caseine e le sieroproteine (proteine ad elevato valore biologico), può essere utilizzato in maniera ottimale miscelandolo con un ingrediente funzionale quale l'inulina (fibra dietetica a carattere prebiotico), utilizzata in sostituzione al grasso nella produzione di formaggi caprini freschi. Il prodotto studiato può inoltre costituire una valida matrice grasso-proteica nella quale incorporare altri ingredienti funzionali di natura solubile. Infatti, la coagulazione e successiva acidificazione del prodotto, che avvengono direttamente nella confezione finale senza alcuna separazione di siero, consentono un recupero pressoché totale di questi ingredienti a differenza di quanto potrebbe avvenire

nei prodotti tradizionali, dove la separazione di siero determinerebbe una loro perdita con un conseguente danno di natura economica. Nell'ultimo lavoro sperimentale di questa tesi è stato dimostrato che la concentrazione delle proteine del siero ottenuta tramite ultrafiltrazione determinava un maggiore recupero delle sieroproteine denaturate nella ricotta, e permetteva, come conseguenza, di ottenere prodotti più umidi e magri.

## BIBLIOGRAFIA

- Addeo, F., Coppola, S. (1983).** Aspetti tecnologici e microbiologici della trasformazione del latte di bufala in mozzarella e ricotta. *Latte*, 8, 706-723.
- Addis, M. F., Tanca, A., Pagnozzi, D., Crobu, S., Fanciulli, G., Cossu-Rocca, P., & Uzzau, S. (2009).** Generation of high-quality protein extracts from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Proteomics*, 9, 3815-3823.
- Alais, C. (2000).** *Scienza del latte*. Ed. Tecniche Nuove, Milano, Italia.
- Alexander, M., & Dalgleish, D. G. (2004).** Application of transmission diffusing wave spectroscopy to the study of gelation of milk by acidification and rennet. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 38, 83-90.
- Alexander, M., Rojas-Ochoa, L. F., Leser, M., & Schurtenberger, P. (2002).** Structure, dynamics, and optical properties of concentrated milk suspensions: an analogy to hard-sphere liquids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 253, 35–46.
- Annunziata, A., Vecchio, R. (2010).** Italian consumer attitudes toward products for well-being: the functional foods market. *International Food and Agribusiness Management Review*, 13 (2), 19-50.
- Aryana, K. J., & McGrew, P. (2007).** Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *LWT*, 40, 1808–1814.
- Balducci, A. (1974).** Concentrazione del siero di pecora per ultrafiltrazione ed utilizzazione dei concentrati per la produzione di ricotta. *Il Latte*, 1, 471-473.
- Beenakker, C. W. J., & Mazur, P. (1983).** Self-diffusion of spheres in a concentrated suspension. *Physica*, 120A, 388-410.
- Beenakker, C. W. J., & Mazur, P. (1984).** Diffusion of spheres in a concentrated suspension II. *Physica*, 126A, 349-370.
- Biliaderis, C. G., Khan, M. M., & Blank, G. (1992).** Rheological and sensory properties of yogurt from skim milk and ultrafiltered retentates. *International Dairy Journal*, 2, 311-323.
- Bottazzi, V. (1993).** *Microbiologia lattiero-casearia*. Edagricole, Bologna, Italia.

- Calvo, M. M., Leaver, J., & Banks, J. M. (1993).** Influence of other whey proteins on the heat-induced aggregation of  $\alpha$ -Lactalbumin. *International Dairy Journal*, 3, 719-727.
- Cardarelli, H. R., Buriti, F. C. A., Castro, I. A., Saad, S. M. I. (2008).** Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. *LWT – Food Science and Technology*, 41, 1037-1046.
- Carminati, D. (2001).** Una nuova tecnica a membrana per il quarg. *Latte*, 26 (10), 112-115.
- Castillo, M., Lucey, J. A., & Payne, F. A. (2006).** The effect of temperature and inoculum concentration on rheological and light scatter properties of milk coagulated by a combination of bacterial fermentation and chymosin. Cottage cheese-type gels. *International Dairy Journal*, 16, 131-146.
- Cebo, C., Caillat, H., Bouvier, F., Martin, P. (2010).** Major proteins of the goat milk fat globule membrane. *Journal of Dairy Science*, 93 (3), 868-876.
- Censis. (2007).** L'evoluzione delle abitudini alimentari degli italiani.
- Cheryan, M. (1998).** Ultrafiltration and microfiltration handbook. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster, Pennsylvania, USA.
- Corradini, C. (1995).** *Chimica e tecnologia del latte*. Ed. Tecniche Nuove, Milano, Italia.
- Crabbe, M. J. C. (2004).** Rennets: General and molecular aspects. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1: General aspects (3<sup>rd</sup> ed) (pp. 19-45). Elsevier Academic Press.
- Dalgleish, D. G. (1979).** Proteolysis and aggregation of casein micelles treated with immobilized or soluble chymosin. *Journal of Dairy Research*, 46, 653-661.
- Dalgleish, D. G. (1980).** Effect of milk concentration on the rennet coagulation time. *Journal of Dairy Research*, 47, 231-235.
- Dalgleish, D. G. (1998).** Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *Journal of Dairy Science*, 81, 3013-3018.
- Dalgleish, D. G., Senaratne, V., & Francois, S. (1997).** Interactions between alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in the early stages of heat denaturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3459-3464.

- Damodaran, S. (2008).** Aminoacids, peptides, and proteins. In: S. Damodaran, K. L. Parkin, & O. R. Fennema (Eds.), *Fennema's Food Chemistry* (4<sup>th</sup> ed) (pp. 217-329). CRC Press, Taylor & Francis Group, USA.
- de Kruif, C. G. (1997).** Skim milk acidification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 185, 19-25.
- de Kruif, C. G. (1999).** Casein micelles interactions. *International Dairy Journal*, 9, 183-188.
- de Kruif, C. G., & Holt, C. (2003).** Casein micelle structure, functions, and interactions. In: P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1: Proteins* (3<sup>rd</sup> ed, Part A) (pp. 233-276). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Dello Staffolo, M., Bertola, N., Martino, M., Bevilacqua, A. (2004).** Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. *International Dairy Journal*, 14, 263-268.
- Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Borneo, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B. (1999).** Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document., *British Journal of Nutrition*, 81 (1), S1-S27.
- Donato, L., Alexander, M., & Dalgleish, D. G. (2007).** Acid gelation in heated and unheated milks: Interactions between serum protein complexes and the surfaces of casein micelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4160-4168.
- Evers, J. M. (2004).** The milkfat globule membrane - compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *International Dairy Journal*, 14, 661-674.
- Euromonitor. (2004).** The world market for functional food and beverages, London, UK.
- FAO / WHO. CODEX STAN 283-1978** (formerly CODEX STAN A-6-1973. Adopted in 1973. Revision 1999, Amendments 2006, 2008). [www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net).
- Fox, P. F. (2003).** Milk proteins: general and historical aspects. In: P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1: Proteins* (3<sup>rd</sup> ed, Part A) (pp. 1-48). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2006).** Indigenous enzymes in milk: overview and historical aspects – part 1. *International Dairy Journal*, 16, 500-516.

- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (2004).** Cheese: an overview. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1: General aspects (3<sup>rd</sup> ed) (pp. 1-18). Elsevier Academic Press.
- Franck, A. (2002).** Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87 (2), S287-S291.
- Gaucheron, F. (2005).** The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45, 473-483.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.
- Gripon, J. C., Desmazeaud, M. J., Le Bars, D., & Bergere, J. L. (1975).** Etude du role des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. *Le Lait*, 55, 502-516.
- Guggisberg, D., Cuthbert-Steven, J., Piccinali, P., Bütikofer, U., Eberhard, P. (2009).** Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. *International Dairy Journal*, 19, 107–115.
- Guyomarc'h, F., Jemin, M., Le Tilly, V., Madec, M.-N., & Famelart, M.-H. (2009).** Role of the heat-induced whey protein/ $\kappa$ -casein complexes in the formation of acid milk gels: A kinetic study using rheology and confocal microscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5910-5917.
- Ha, J. K., Lindsay, R. C. (1993).** Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. *Journal of Dairy Science*, 76, 677-690.
- Henning, D. R., Baer, R. J., Hassan, N., & Dave, R. (2006).** Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads. *Journal of Dairy Science*, 89, 1179-1188.
- Hinrichs, J. (2001).** Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*, 11, 495-503.
- Hyslop, D. B. (2003).** Enzymatic coagulation of milk. In: P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1: Proteins (3<sup>rd</sup> ed, Part B) (pp. 839-878). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.

- Holt, C., & Sawyer, L. (1993).** Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of primary and secondary structures of the  $\alpha_{s1}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -caseins. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 89, 2683-2692.
- Holzapfel, W. H., & Schillinger, U. (2002).** Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, 109–116.
- Horne, D. S. (1999).** Formation and structure of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 9, 261-268.
- Horne, D. S., & Banks, J. M. (2004).** Rennet-induced coagulation of milk. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1: General aspects (3<sup>rd</sup> ed) (pp. 47-70). Elsevier Academic Press.
- Huppertz, T., & Kelly, A. L. (2006).** Physical chemistry of milk fat globules. In: P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 2: Lipids (3<sup>rd</sup> ed) (pp. 173-212). Springer Science + Business Media Inc., New York, USA.
- IDF. (1982).** Cheese and processed cheese. Determination of the total solid content (Reference Method). IDF Standard 4 A. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1987).** Milk, cream and evaporated milk total solids. IDF Standard 21 B. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- IDF. (1993).** Nitrogen content of milk and milk products. IDF Standard 20 B. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- ISMEA. (2007).** Gli acquisti alimentari in Italia: tendenze recenti e nuovi profili di consumo.
- Jenkins, D. J. A., Kendall, C. W. C., & Vuksan, V. (1999).** Inulin, oligofructose and intestinal function. *Journal of Nutrition*, 129, 1431S–1433S.
- Karlsson, A. O., Ipsen, R., & Ardö, Y. (2007).** Rheological properties and microstructure during rennet induced coagulation of UF concentrated skim milk. *International Dairy Journal*, 17, 674-682.
- Kaur, N., & Gupta, A. K. (2002).** Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Bioscience*, 27, 703–714.
- Keenan, T. W., & Mather, I. H. (2006).** Intracellular origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane. In: P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (Eds.),

Advanced Dairy Chemistry, Vol. 2: Lipids (3<sup>rd</sup> ed) (pp. 137-171). Springer Science + Business Media Inc., New York, USA.

- Kip, P., Meyer, D., Jellema, R. H. (2006).** Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal*, 16, 1098–1103.
- Koca, N., Metin, M. (2004).** Textural, melting and sensory properties of low-fat fresh kashar cheeses produced by using fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 365–373.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Laligant, A., Famelart, M.-H., Brulé, G., Piot, M., & Paquet, D. (2003).** Fermentation by lactic acid bacteria at two temperatures of pre-heated reconstituted milk. I - Behaviour of proteins and minerals. *Lait*, 83, 181-192.
- Law, A. J. R., & Leaver, J. (1997).** Effect of protein concentration on rates of thermal denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4255-4261.
- Le Graët, Y., & Gaucheron, F. (1999).** pH-induced solubilization of minerals from casein micelles: influence of casein concentration and ionic strength. *Journal of Dairy Research*, 66, 215-224.
- Li, J., & Dalgleish, D. G. (2006).** Controlled proteolysis and the properties of milk gels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4687-4695.
- López-Fandiño, R., Olano, A., San José, C., & Ramos, M. (1993).** Application of reversed-phase HPLC to the study of proteolysis in UHT milk. *Journal of Dairy Research*, 60, 111-116.
- Lucey, J. A. (2002).** ADSA Foundation Scholar Award. Formation and physical properties of milk protein gels. *Journal of Dairy Science*, 85, 281-294.
- Lucey, J. A., & Singh, H. (2003).** Acid coagulation of milk. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry, Proteins*, Vol. I (pp. 1001-1025). New York: Kluwer Academic.
- Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (1998).** A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono-delta-lactone. *Food Research International*, 31, 147-155.

- Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (2000).** Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono- $\delta$ -lactone. *Journal of Dairy Research*, 67, 415-427.
- Lucey, J. A., Tamehana, M., Singh, H., & Munro, P. A. (2001).** Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid. *International Dairy Journal*, 11, 559-565.
- Mangino, M. E. (1984).** Physicochemical aspects of whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, 67, 2711-2721.
- Maubois, J. L., & Mocquot, G. (1971).** Préparation de fromage à partir de "pré-fromage liquide" obtenu par ultrafiltration du lait. *Le Lait*, 508, 495-533.
- Maubois, J. L., & Mocquot, G. (1975).** Application of membrane ultrafiltration to preparation of various types of cheese. *Journal of Dairy Science*, 58 (7), 1001-1007.
- Maubois, J. L., Mocquot, G., Vassal, L. (1969).** French Pat. 2.052.121.
- Meilgaard, M. C., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1999).** Pairwise ranking test: Friedman analysis – comparing several samples in all possible pairs. "In: *Sensory evaluation Techniques*" (3<sup>rd</sup> ed.) (pp. 103-106). CRC Press, USA.
- Meilgaard, M. C., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1999).** Simple ranking test: Friedman analysis – randomized (complete) block design. "In: *Sensory evaluation Techniques*" (3<sup>rd</sup> ed.) (pp. 106-110). CRC Press, USA.
- Mistry, V. V. (2001).** Low-fat cheese technology. *International Dairy Journal*, 11, 413-422.
- Mistry, V. V., & Kosikowski, F. V. (1985).** Growth of lactic acid bacteria in highly concentrated ultrafiltered skim milk retentates. *Journal of Dairy Science*, 68, 2536-2543.
- Mistry, V. V., Maubois, J. L. (2004).** Application of membrane separation technology to cheese production. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1: General aspects (3<sup>rd</sup> ed) (pp. 261-285). Elsevier Academic Press.
- Moerman, F. T., Van Leeuwen, M. B., & Delcour, J. A. (2004).** "Enrichment of higher molecular weight fractions in inulin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3780-3783.

- Mucchetti, G., Carminati, D., Pirisi, A. (2002).** Ricotta fresca vaccina ed ovina: osservazioni sulle tecniche di produzione e sul prodotto. *Latte*, 27 (2), 154-166.
- Mucchetti, G., e Neviani, E. (2006).** *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza.* Ed. Tecniche Nuove, Milano, Italia.
- Mucchetti, G., Zardi, G., Orlandini, F., Gostoli, C. (2000).** The pre-concentration of milk by nanofiltration in the production of *quarg-type* fresh cheeses. *Le Lait*, 80, 43-50.
- Mulder, H., & Walstra, P. (1974).** *The milk fat globule: emulsions science as applied to milk products and comparable foods.* Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands.
- Nakazawa, Y., Furusawa, M., Hohno, H., Shida, T. (1991).** Proteolysis of *quarg* manufactured from milk concentrated by ultrafiltration. *Milchwissenschaft*, 46 (10), 640-643.
- Niness, K. R. (1999).** Inulin and oligofructose: what are they? *Journal of Nutrition*, 129, 1402S-1406S.
- Niva, M. (2007).** "All foods affect health": Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. *Appetite*, 48, 384-393.
- Oldfield, D. J., Singh, H., & Taylor, M. W. (2005).** Kinetics of heat-induced whey protein denaturation and aggregation in skim milks with adjusted whey protein concentration. *Journal of Dairy Research*, 72, 369-378.
- Oliveira, M. N., Sodini, I., Remeuf, F., & Corrieu, G. (2001).** Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 935-942.
- Ottosen, N. (1996).** The use of membranes for the production of fermented cheese. *Bulletin of the IDF*, 311, 18-20.
- Ozer, B. H., Robinson, R. K., Grandison, A. S., & Bell, A. E. (1998).** Gelation properties of milk concentrated by different techniques. *International Dairy Journal*, 8, 793-799.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G. F. W. (2007).** Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88-113.
- Paseephol, T., Small, D. M., & Sherkat, F. (2008).** Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. *Journal of Texture Studies*, 39, 617-634.

- Pizzillo, M., Claps, S., Cifuni, G. F., Fedele, V., Rubino, R. (2005).** Effect of goat breed on the sensory, chemical and nutritional characteristics of ricotta cheese. *Livestock Production Science*, 94, 33-40.
- Pouliot, Y. (2008).** Membrane processes in dairy technology - From a simple idea to worldwide panacea. *International Dairy Journal*, 18, 735-740.
- Rahimi-Yazdi, S., Ferrer, M. A., & Corredig, M. (2010).** Nonsuppressed ion chromatographic determination of total calcium in milk. *Journal of Dairy Science*, 93, 1788-1793.
- Relkin, P. (1996).** Thermal unfolding of beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 565-601.
- Roberfroid, M. B. (1999).** Caloric value of inulin and oligofructose. *Journal of Nutrition*, 129, 1436S-1437S.
- Rowland, S. J. (1938).** The determination of the nitrogen distribution in milk. *Journal of Dairy Research*, 9, 42-46.
- Ryffel, S., Piccinali, P., Bütikofer, U. (2008).** Sensory descriptive analysis and consumer acceptability of selected Swiss goat and sheep cheeses. *Small Ruminant Research*, 79, 80-86.
- Salvadori del Prato, O. (2001).** *Trattato di tecnologia casearia*, Ed. Calderini Edagricole, Bologna, Italia.
- Sandra, S., Alexander, M., & Dalgleish, D. G. (2007).** The rennet coagulation mechanism of skim milk as observed by transmission diffusing wave spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 308, 364-373.
- Saxelin, M., Korpela, R., & Mäyrä-Mäkinen, A. (2003).** Introduction: classifying functional dairy products. In T. Mattila-Sandholm, & M. Saarela (Eds.), *Functional dairy products* (pp. 1-16). Woodhead Publishing Limited, England.
- Schaller-Povolny, L. A., & Smith, D. E. (1999).** Sensory attributes and storage life of reduced fat ice cream as related to inulin content. *Journal of Food Science*, 64 (3), 555-559.
- Schaller-Povolny, L. A., & Smith, D. E. (2001).** Viscosity and freezing point of a reduced fat ice cream mix as related to inulin content. *Milchwissenschaft*, 56 (1), 25-29.

- Schkoda, P. (2003).** Membrane filtration - New applications in the manufacture of fermented dairy products. Fermented milk: Proceedings of the IDF seminar on aroma and texture of fermented milk held in Kolding, Denmark, June 2002, 184-194.
- Scholz-Ahrens, K. E., & Schrezenmeir, J. (2002).** Inulin, oligofructose and mineral metabolism — experimental data and mechanism. *British Journal of Nutrition*, 87 (2), S179-S186.
- Schulz-Collins, D., & Senge, B. (2004).** Acid and acid/rennet curd cheeses. Part A: quark, cream cheese and related varieties. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2: Major cheese groups (3<sup>rd</sup> ed) (pp. 300-328). Elsevier Academic Press.
- Sharma, S. K., Hill, A. R., & Mittal, G. S. (1993).** Effect of milk concentration, pH and temperature on aggregation kinetics and coagulation properties of ultrafiltered (UF) milk. *Food Research International*, 26, 81-87.
- Sharma, S. K., Mittal, G. S., & Hill, A. R. (1994).** Effect of milk concentration, pH and temperature on casein hydrolysis at aggregation, coagulation and curd cutting times of ultrafiltered milk. *Milchwissenschaft*, 49, 450-453.
- Shukla, F. C., & Kaur Brar, M. (1986).** Manufacture and signification of Ricotta cheese. *Indian Journal Dairy Science*, 39 (4), 343-348.
- Singh, H., & Havea, P. (2003).** Thermal denaturation, aggregation and gelation of whey proteins. In: P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1: Proteins (3<sup>rd</sup> ed, Part B) (pp. 1261-1287). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., Lugasi, A. (2008).** Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite*, 51, 456-467.
- Swaisgood, H. E. (2003).** Chemistry of the caseins. In: P. F. Fox, P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1: Proteins (3<sup>rd</sup> ed, Part A) (pp. 139-201). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Tranchant, C. C., Dalgleish, D. G., & Hill, A. R. (2001).** Different coagulation behaviour of bacteriologically acidified and renneted milk: the importance of fine-tuning acid production and rennet action. *International Dairy Journal*, 11, 483-494.

- Tratnik, L., Benkovic, G., Borovic, A., Subaric, D. (1996).** Production of fresh cheese enriched with ultrafiltered whey proteins. *Milchwissenschaft*, 51 (11), 624-627.
- Tuinier, R., & de Kruif, C. G. (2002).** Stability of casein micelles in milk. *Journal of Chemical Physics*, 117, 1290-1295.
- van Hooydonk, A. C. M., Boerrigter, I. J., & Hagedoorn, H. G. (1986).** pH-induced physico-chemical changes of casein micelles in milk and their effect on renneting. 2. Effect of pH on renneting of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40, 297–313.
- van Hooydonk, A. C. M., & Olieman, C. (1982).** A rapid and sensitive high-performance liquid chromatography method of following the action of chymosin in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 36, 153-158.
- van Loo, J., Coussement, P., De Leenheer, L., Hoebregs, H., Smits, G. (1995).** “On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet”. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 525-552.
- Waungana, A., Singh, H., & Bennett, R. J. (1996).** Influence of denaturation and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin on rennet coagulation properties of skim milk and ultrafiltered milk. *Food Research International*, 29, 715-721.
- Waungana, A., Singh, H., & Bennett, R. J. (1998).** Rennet coagulation properties of skim milk concentrated by ultrafiltration: effects of heat treatment and pH adjustment. *Food Research International*, 31, 645-651.
- Weitz, D. A., & Pine, D. J. (1993).** *Dynamic light scattering: the method and some applications*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Westermeier, R. (2006).** Sensitive, quantitative and fast modifications for Coomassie blue staining of polyacrilamide gels. *Proteomics*, 6, 63-64.