

**RICONOSCIMENTO DELLE ALTERAZIONI MICROBICHE NEL
PROSCIUTTO DI PARMA MEDIANTE SPILLATURA E SISTEMA
OLFATTIVO ARTIFICIALE**

Laura Gabba, Enrico Dalcanale** e Stefania Sanfelici**

Consorzio del Prosciutto di Parma, Via Dell'Arpa, 8/B – 43100 Parma (Italia).

**Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università di Parma, V.le
delle Scienze, 17/A – 43100 Parma (Italia).

Riassunto

L'idoneità alla marchiatura del prosciutto di Parma DOP viene accertata con la pratica della spillatura, effettuata da operatori esperti, che acquisiscono professionalità con la pratica e in loro è riposta la decisione finale sulla qualità ed idoneità del prosciutto ad essere posto sul mercato. L'esame permette di rilevare i prosciutti non conformi sulla base dell'alterazione aromatica, indice dei difetti di natura microbiologica. In questa ricerca si è approntato un metodo d'analisi con sistema olfattivo artificiale (SOA) a sensori MOS, che associa il campionamento per spillatura con osso-sonda al calcolo di un modello di classificazione (DFA) dei difetti nel prosciutto crudo. Tre gruppi di prosciutti a diversa tipologia di difetto, rappresentativi dei difetti di maggior frequenza nella produzione, sono stati analizzati in presenza di aria cromatografia umida o secca, dando luogo a due sistemi analitici a diversa sensibilità nel caso dei campioni di prosciutto. Le classificazioni dei campioni hanno permesso di separare i gruppi a diversa difettatura a parità di posizione d'esame, e di identificare le zone interessate dal difetto all'interno della classe di difettatura. L'analisi strumentale ha confermato la descrizione dei difetti svolta con l'esame olfattivo di spillatura e indica che il SOA, corredato di un sistema di campionamento non invasivo e di un modello di classificazione appropriato, può risultare un valido strumento nell'identificazione dei difetti all'interno del controllo di qualità aziendale.

Key words: Parma ham, defects, "spillatura", electronic nose

INTRODUZIONE

Il Prosciutto di Parma DOP (Reg. CE n. 2081/92) è un prodotto tipico, la cui produzione è disciplinata per legge (1); la corrispondenza con gli standard qualitativi e la conseguente correttezza del processo produttivo sono garantite dagli organi preposti alla tutela e al controllo del prodotto, il Consorzio del Prosciutto di Parma (D.M. 03/07/1978 e succ.) e l'Istituto Parma Qualità (Reg. CE n. 2081/92). Quest'ultimo certifica la rispondenza del prosciutto ai requisiti di legge attraverso l'operazione di contrassegnatura o marchiatura (D.L. 253 15/02/93), cioè l'apposizione del marchio sulla cotenna delle cosce al termine della stagionatura.

Le alterazioni di natura microbiologica, in quanto compromettono la salubrità dei prosciutti stagionati, sono iscritte tra le cause invalidanti la marchiatura (Allegato B, Regolamento dei Principi di Marchiatura), e sono comunemente note agli operatori del settore come "difetti alterativi" o "cattivi odori". L'idoneità al marchio DOP è assegnata tramite esame ispettivo degli Ispettori Tecnici consortili e degli Incaricati IPQ e comprende la pratica della spillatura o puntatura (D.M. n. 253 del 15/02/93); l'esame permette di individuare i difetti che possono interessare diffusamente o localmente le diverse zone muscolari, tramite l'analisi degli odori anomali sviluppati in quei tessuti dai fenomeni putrefattivi. Un controllo interno di produzione, pertanto, viene eseguito ordinariamente nel corso della stagionatura, secondo disciplinare, a partire dal sesto mese di vita del prosciutto, corrispondente all'inizio della fase di maturazione nelle cantine di stagionatura.

L'operazione è svolta da sempre da esperti, mediante l'infissione di un ago-sonda nei prosciutti, cui segue un esame olfattivo dell'aroma rilasciato dal prosciutto alla sonda; tale sonda è per tradizione un osso di stinco di cavallo o di bovino, la fibula, reso sottile come un ago per forare le cosce senza danneggiarne la struttura muscolare. L'impiego dell'osso è ancora oggi ottimale per prelevare l'aroma perché è sufficientemente duro (costituenti minerali) e resistente (matrice proteica di collagene e polisaccaridi) (2) per sopportare le operazioni di inserimento ripetuto nei prosciutti stagionati, compatti e consistenti. E' particolarmente consono all'uso in quanto inerte e inodore (privo di midollo osseo) e ha una struttura di porosità adatta ad adsorbire e trattenere l'aroma senza interagire con esso e quindi senza modificarlo. L'aroma è poi rilasciato rapidamente, lasciando inalterato l'osso che può essere utilizzato in più punti e su più prosciutti senza richiedere operazioni di pulizia, e questo rende l'operazione di puntatura semplice, veloce (200 prosciutti in un'ora come stima media) ed economica.

Le posizioni classiche di foratura risiedono nelle zone tipiche di insorgenza dei difetti di natura microbica, che rappresentano le zone a maggior probabilità di sviluppo del difetto e quindi di controllo per la sua prevenzione. Si tratta dei dintorni dei tessuti ossei, dei grandi vasi sanguigni, che possono sottostare a dissanguamento non completo, e delle parti muscolari difficilmente raggiunte dal sale e dalla disidratazione, in cui si possono creare le condizioni idonee allo sviluppo elevato e non controllato di agenti microbici (3, 4, 5). I difetti principali, cui corrispondono le zone di puntatura, mostrate in Figura 1, sono descritti come (6):

- *difetto di gambo*, si genera in corrispondenza della tibia e dell'articolazione tibia-femore e da qui può diffondere all'intera coscia;
- *difetto di "vena"*, riguarda la zona muscolare adiacente alla vena femorale ed è rilevabile nella porzione antero-mediale del prosciutto (fiocco);
- *difetto di noce*, interessa la regione muscolare intorno alla testa del femore;
- *difetto di "anchetta" o di sott'osso*, si ha nei muscoli intorno al frammento residuo dell'ischio pubico o anchetta (osso del bacino) presente sulla superficie del prosciutto, e in minor misura intorno alla "corona", ed è abitualmente riferito come difetto di "acido fenico".

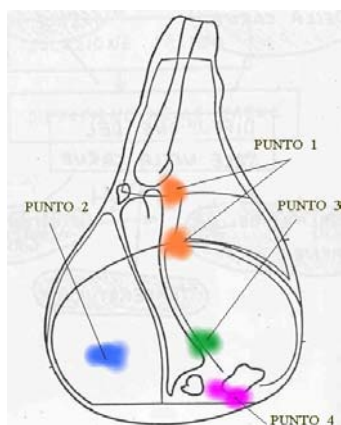


FIG. 1 - Punti di elezione per l'individuazione dei difetti microbici del prosciutto di Parma. PUNTO 1: posizione del gambo, in prossimità della tibia e dell'articolazione tibia-femore; PUNTO 2: posizione della vena laterale, nei muscoli che circondano il vaso sanguigno; PUNTO 3: posizione della noce, nelle vicinanze della testa del femore; PUNTO 4: posizione dell'anchetta, localizzata sotto il frammento dell'osso iliaco e nella porzione fra questo e la testa del femore.

L'odore dei prosciutti alterati da difetto di gambo è costituito in larga misura da composti solforati (idrogeno solforato, di-, tri-, tetra-metilsolfuro, tioesteri e mercaptani) cui si deve la percezione segnalata come "cattivo odore", generati dal metabolismo enzimatico batterico a partire dagli amminoacidi solforati (cisteina, cistina e metionina) e dal glutatione del prosciutto (3). Nei prosciutti alterati al termine del periodo del riposo sono stati isolati e identificati batteri della famiglia delle Enterobatteriacee (7, 8, 9) e

negli stessi prosciutti stagionati sono stati trovati alti valori di TBC (carica microbica totale), costituita soprattutto da Clostridi (3), entrambe specie dotate di attività desolforasi specifica, noti per la produzione di composti solforati maleodoranti.

Nei casi più gravi di alterazione, cioè di putrefazione vera e propria, che interessa tutta la coscia, prendono parte alla composizione dell'odore molteplici composti di derivazione enzimatica batterica dagli amminoacidi muscolari, tra cui le ammine biogene, sintetizzate da decarbossilasi batteriche specifiche (le famiglie batteriche coinvolte sono risultate in massima parte Clostridi proteolitici e peptolitici (3) che realizzano un fenomeno di frammentazione delle fibre muscolari, contribuendo alla produzione degli amminoacidi necessari alla sintesi delle ammine), i gruppi chimici dell'indolo e dello scatolo, generati dal triptofano, gli acidi grassi insaturi e saturi (deaminazione riduttiva), gli alfa-idrossiacidi (deaminazione idrolitica) e i chetoacidi (ossidazione deaminativa) (3).

Il difetto di vena si manifesta come un fenomeno putrefattivo all'esame olfattivo, ma si tratta di un'alterazione superficiale e localizzata ai dintorni del vaso sanguigno, la cui genesi microbiologica è incerta. Potendo escludere gli Enterobatteri, non identificati nella zona difettata, sono state considerate svariate specie batteriche alotolleranti isolate dai prosciutti italiani (*Carnobacterium*, *Corynebacterium* e *Vibrio* (5), e recentemente ceppi di un lattobacillo, *Marinilactibacillus psychrotolerans*, che cresce anche alle condizioni ambientali riscontrate nella vena (10)). L'ipotesi prevalente è che comunque l'insorgenza del difetto non sia attribuibile univocamente ad un ceppo batterico quanto piuttosto all'interazione tra più generi di batteri alotolleranti anaerobi obbligati e/o facoltativi che trovano condizioni comuni consone all'accrescimento (capacità di sviluppo a basse temperature, a pH elevato e ad elevate concentrazioni di sale) e che possono agire in sinergia nella formazione del difetto (11); analoga incertezza è registrata riguardo alla composizione in molecole volatili associata all'odore dei prosciutti difettati, per quanto l'analogia con l'odore alterato dei prosciutti con difetto di gambo induca a pensare che nei due casi la composizione sia simile.

Il difetto dell'acido fenico (odore di patata) è stato messo in relazione con maggior certezza alla classe chimica delle pirazine, tra cui le più frequenti sono risultate le alchilpirazine e in particolare la 2-metossi-3-isopropilpirazina, che dà percezione del difetto anche a concentrazioni molto basse (0.01 µg/Kg). Questi composti sono noti come i metaboliti di un batterio ritrovato sulla superficie dei prosciutti con difetto, sulla corona in prossimità della cotenna e nei dintorni dell'anchetta, e identificato come appartenente alla specie della *Pseudomonas cepacia* (12), che ha riprodotto "l'odore di

patata" in terreno colturale e su fette di prosciutto. L'ipotesi è ampiamente confermata dai dati di letteratura che indicano il composto come il componente principale dell'odore alterato in diversi prodotti (13, 14).

I fenomeni alterativi descritti indicano che la composizione dell'odore manifestato dal difetto può variare con l'entità della contaminazione, con le specie microbiche coinvolte e con il progredire dello stadio di sviluppo batterico; si tratta quindi di un odore complesso, la cui percezione non è rappresentata da poche specie chimiche individuabili e dosabili ai fini di una valutazione dell'entità del difetto, quanto piuttosto dall'insieme delle molecole liberate che interagiscono con le strutture recettoriali umane. La valutazione strumentale delle alterazioni di origine microbica richiede pertanto tecniche analitiche diverse da quelle classiche (cromatografia in fase liquida e gassosa, eventualmente accoppiata a rivelatore di massa) che permettono di conoscere la composizione degli odori ma non associano a questi un criterio di classificazione utile al sondaggio dell'alterazione (15).

Gli strumenti più interessanti in queste applicazioni sono risultati i sistemi olfattivi artificiali o nasi elettronici, costituiti da un pool di sensori chimici ed elettronici che genera un insieme di risposte quando interagisce con l'aroma, e da un idoneo sistema statistico per l'elaborazione delle risposte (16). Lo strumento lavora mimando in parte la fisiologia olfattiva umana, che si avvale di un circuito percezione-risposta instaurato tra i recettori nasali periferici (gli elementi sensibili) che costituiscono la base dell'olfatto umano e rispondono alla quasi totalità delle molecole volatili, trasmettendo un segnale elettrico al sistema nervoso centrale (il sistema di elaborazione dei dati) generato dall'interazione recettore-composti chimici. Analogamente a quanto accade nell'apprendimento umano, secondo cui il cervello acquisisce metodi di riconoscimento e accettabilità degli odori con l'esperienza, così il naso artificiale può costruire modelli di classificazione dei composti volatili sulla base delle differenze tra i segnali elettrici di risposta (17). E' invece diverso il sistema di rilevazione delle molecole volatili, basato su recettori molecolari nel caso dei mammiferi, e sulla variazione di resistività elettrica a seguito di reazioni di ossidazione nel caso dei sensori MOS. I sistemi statistici multivariati, che permettono di indagare le relazioni esistenti tra le variabili che descrivono un insieme di dati e che rappresentano i campioni in esame, quali sono quelli di classificazione, cluster e raggruppamento, elaborano mappe di distribuzione dei dati di immediata interpretazione, molto utili nei casi di segnalazione di campioni non conformi.

I SOA accoppiati a questa tipologia di sistemi di calcolo, sono stati impiegati con successo nel controllo microbiologico dei prodotti carni conseguente alla conservazione refrigerata (18, 19) e ai trattamenti

antibatterici (20); in particolare i sistemi olfattivi con sensori a ossidi di metalli semiconduttori (MOS) sono stati impiegati nel riconoscimento delle alterazioni batteriche nelle salsicce Francesi (21) e nei prosciutti Iberici (22). Altre applicazioni in campo alimentare che hanno raggiunto lo stadio applicativo industriale riguardano il controllo qualità degli imballi alimentari (23) e la determinazione della difettosità nell'olio extra vergine di oliva (24).

In questo lavoro si è studiato l'impiego di un SOA a sensori MOS per differenziare e riconoscere i prosciutti crudi idonei alla marchiatura da quelli difettati, e di affiancare l'esame manuale di puntatura con una analisi strumentale finalizzata alla valutazione affidabile, rapida e non distruttiva dei campioni. A questo scopo si è mantenuto il campionamento con l'osso sonda, impiegato nel controllo routinario in stabilimento, per effettuare l'analisi con lo stesso campione di aroma analizzato nella puntatura.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono state allestite due prove sperimentali (Prove 1 e 2), ciascuna con tre classi di prosciutti stagionati, N. 3 prosciutti per classe, a diversa difettatura, accertata da un puntatore professionista durante il routinario controllo di produzione. Sono stati scelti i prosciutti rappresentativi dei difetti di maggior incidenza produttiva, includendo in ogni gruppo un prosciutto idoneo alla marchiatura come controllo, e così suddivisi:

Prova 1) gruppo A, difetto di gambo diffuso; gruppo B, difetto d'anchetta; gruppo C, controllo.

Prova 2) gruppo A, difetto di gambo diffuso; gruppo B, difetto di vena laterale; gruppo C, controllo.

I campioni per l'analisi con SOA erano costituiti dall'aroma dei prosciutti, preparati mimando le operazioni di puntatura del controllo aziendale, in ordine casuale e puntando il singolo prosciutto in tutte le posizioni di difetto prima di puntare il successivo. Le posizioni d'esame sono state così identificate: posizione 1, gambo; posizione 2, vena laterale; posizione 3, intorno femorale; posizione 4, anchetta (Figura 1).

I prelievi delle sostanze aromatiche sono stati effettuati puntando l'ago-sonda nella posizione scelta per il tempo necessario all'adsorbimento delle molecole alla struttura porosa dell'osso, e inserendo poi la stessa punta nella fiala di misura, attraverso il setto di teflon della chiusura, per permettere alle sostanze adsorbite di liberarsi nello spazio di testa.

Sensore Olfattivo Artificiale (SOA) a sensori M.O.S

Le analisi sono state effettuate con un prototipo di SOA da banco (SOATEC, Parma, Italia) in cui gli elementi sensibili erano collocati all'interno di una camera di misura, attrezzata con 12 sensori MOS a strato sottile (Capteur, Gran Bretagna), e contenente i sensori di controllo del grado di umidità e della temperatura della camera (47°-50°C). Il sistema era dotato di autocampionatore con bagno termostato (a 25±1°C) per garantire condizioni omogenee di formazione dello spazio di testa dei campioni, e collegato alla camera di misura tramite un sistema di tubicini in PTFE per il trasporto della miscela volatile al modulo analizzatore. Il gas di trasporto era aria cromatografica, erogata da una bombola pressurizzata e collegata al campionatore, provvista di valvola di regolazione del flusso e di un sistema di umidificazione controllato (umidità assoluta dell'aria superiore a 12 g/m³). Il SOA era dotato di software per l'impostazione e il controllo dei parametri di misura e per l'acquisizione dei dati.

Il ciclo di misura è avvenuto in cinque passaggi, cui corrispondono i relativi tempi necessari per l'operazione (Tabella 1):

- formazione dello spazio di testa del campione a temperatura controllata (tempo di generazione dello spazio di testa) nella vial di misura, contenente il prelievo di aroma con osso-sonda;

- acquisizione della linea di base dei sensori (tempo di acquisizione della linea di base), che registra i valori di resistività dei sensori in assenza del campione (R_0);
- iniezione del campione allo stato gassoso (tempo di iniezione), che avviene in modo dinamico per trasporto dello spazio di testa con aria cromatografica;
- acquisizione del segnale (tempo di acquisizione), cioè la registrazione della variazione di resistività dei sensori (R_s) per interazione con le molecole del campione gassoso a intervalli di tempo stabiliti (scansione di acquisizione);
- attesa fra due misurazioni (tempo di attesa), per il passaggio di aria cromatografica nell'intero sistema al fine di riportare la resistività dei sensori ai valori di base.

Le prove sono state condotte in presenza di aria cromatografica secca o umida per valutare in quali condizioni si ha la maggiore efficacia separativa nel caso di campioni di carne; le condizioni sperimentali, ottimizzate per ciascuna prova separatamente, sono riportate in tabella 1. Nello studio di ottimizzazione si è valutata la variazione di risposta dei sensori al variare dei tempi di puntatura e di formazione dello spazio di testa, analizzando in triplicato gli stessi prosciutti difettati.

	Prova 1	Prova 2
Condizioni operative		
Tempo di puntatura	60 sec	15 sec
Gas di trasporto	aria cromatografica umida	aria cromatografica secca
Umidità assoluta	12 g/m ³	< 2 g/m ³
Flusso	300 ml/min	300 ml/min
Temperatura	25° ± 1°C	25° ± 1°C
Volume della vial di misura	25 ml	20 ml
Metodo di acquisizione		
Tempo di generazione dello spazio di testa	150 sec	60 sec
Tempo di acquisizione della linea di base	10 sec	10 sec
Tempo di iniezione	15 sec	15 sec
Tempo totale di acquisizione	150 sec	150 sec
Scansione di acquisizione	1 sec	1 sec
Tempo di attesa fra due campioni	320 sec	320 sec

Tab. 1 – Condizioni cromatografiche e metodi di acquisizione del sistema olfattivo artificiale.

Modello di classificazione (Pattern Recognition)

I segnali, ottenuti come funzioni continue del tempo, sono stati analizzati con il software in dotazione per costruire matrici di dati (banche dati) a diversi tempi di risposta (features) e individuare i migliori ai fini dell'efficacia separativa per classi di difettatura (elaborazioni non riportate). Le banche dati selezionate sono state elaborate con i moduli statistici Principal Component Analysis (PCA, dati non riportati) e Discriminant Analysis (DFA canonica) sviluppato per l'estrazione e la successiva classificazione di librerie di segnali.

Per ogni prova è stato necessario eseguire un numero di misure statisticamente valido per la costruzione di una matrice di dati adatta al calcolo della DFA, cioè una

matrice verticale in cui al numero dei dati elaborati o misure (m) corrisponda un numero di variabili (n) pari almeno ad un terzo dei dati ($m \times n \geq 3n \times n$) (25).

In queste prove sperimentali le variabili n sono costituite da:

- L, numero delle classi di appartenenza;
- K, numero dei sensori utilizzati;
- P, numero di "features" estratte per ogni segnale acquisito;

da cui il numero ottimale N di dati elaborabili si ha calcolando: $N \geq r \times L \times K \times P$, dove r è il rapporto tra il numero di misure e il numero di variabili, ottimale se $3 \leq r \leq 6$ (26, 27).

La robustezza, che indica l'affidabilità del modello di riconoscimento, è stata valutata applicando il test statistico "leave-one-out" cross-validation, che definisce la percentuale di corretto riconoscimento di tutti i campioni nelle relative classi di appartenenza. Il test consiste nel calcolo del modello di classificazione tramite DFA, escludendo un campione considerato come incognito, e verificando la correttezza dell'attribuzione del campione alla propria classe; il test è ripetuto fino a verifica di tutti i campioni (28).

Sono stati considerati affidabili i modelli di classificazione con percentuali di riconoscimento superiori all'80%.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Ottimizzazione delle condizioni sperimentali

I tracciati tipici di acquisizione dei sensori MOS nell'analisi dello spazio di testa di un campione di prosciutto sono mostrati in figura 2. La risposta del pool di sensori scelto in funzione del tempo, detta "impronta digitale" del campione, viene registrata come variazione di conducibilità elettrica del sistema, ed è espressa come rapporto percentuale $\Delta R/R_0$, dove R_0 è la resistenza all'inizio dell'acquisizione (valore di base), R_s è la resistenza istantanea assoluta durante l'acquisizione e ΔR è la resistenza istantanea differenziale del campione ($R_s - R_0$).

La risposta dei sensori MOS è una variazione della resistenza interna in seguito alla reazione con le molecole gassose dello spazio di testa del campione; si tratta sostanzialmente di un'ossidazione dei componenti volatili ad anidride carbonica e vapor acqueo per effetto dell'ossigeno adsorbito alla superficie dei sensori e interessa in toto i composti che costituiscono l'aroma (29). La curva registrata presenta una fase iniziale di rapida discesa del potenziale, cui partecipano le molecole più facilmente ossidabili; il minimo della funzione corrisponde alla massima variazione di resistività, che si realizza quando le molecole a medi valori di potenziale ossido-riduttivo vengono a costituire i componenti a maggior concentrazione nello spazio di testa; la fase successiva, detta fase di desorbimento, vede il graduale ritorno della resistività ai valori di base e dipende soprattutto dalla concentrazione delle molecole residue nello spazio di testa. L'impronta digitale quindi è caratteristica della coppia "campione volatile-pool di sensori" e dipende in larga parte dalla qualità e quantità dei componenti volatili, cioè, dal punto di vista sperimentale, dal tempo di formazione dello spazio di testa dei campioni e dal tempo di puntatura dei prosciutti.

Nella stessa Figura 2 sono riportati i tracciati relativi all'ottimizzazione sperimentale dell'analisi con aria umida (prova 1), registrati con tempo di puntatura di 60 sec, mentre il tempo di formazione dello spazio di testa è stato fatto variare a 90, a 150 e a 210 secondi. Dopo 90 sec le risposte dei sensori sono risultate significative solo per quelli più sensibili, a indicare che lo spazio di testa non si è arricchito di molecole in concentrazione sufficiente, mentre a 150 sec tutti i sensori danno segnali di buona intensità, descritti da cinetiche significativamente differenti da un sensore all'altro, con cui è possibile descrivere in modo diverso lo stesso spazio di testa e favorire la costruzione di un modello di classificazione idoneo all'analisi. Per tempi più lunghi, pari a 210 sec, le curve di risposta non sono significativamente diverse

dalla linea di base per tutti i sensori, indice di una perdita di componenti volatili prima dell'acquisizione.

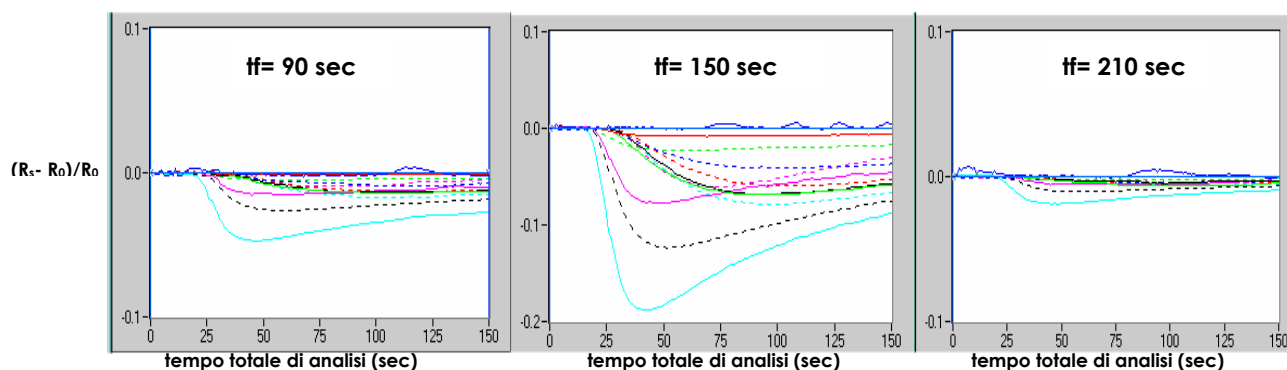


FIG. 2 – Risposte dei sensori allo spazio di testa generato dopo un tempo di 90, 150 e 210 secondi nell'analisi con aria umida.

I tracciati medi degli stessi campioni, registrati nelle stesse condizioni sperimentali (Tabella 1), con tempo di formazione dello spazio di testa a 150 sec., e utilizzando come gas di trasporto aria cromatografica umida o secca sono stati confrontati in figura 3. L'uso di aria secca porta all'aumento del massimo di intensità del segnale per tutti i sensori, cioè si ha maggiore sensibilità, e le cinetiche di ossidazione delle molecole volatili variano in risposta al diverso grado di umidità dello spazio di testa.

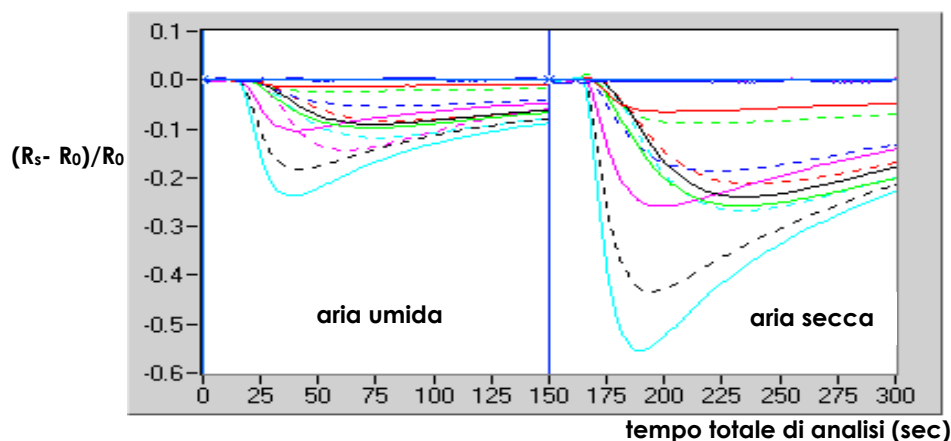


FIG. 3 – Impronte digitali di un campione di prosciutto nell'analisi con aria cromatografica umida e secca (condizioni sperimentali riportate in Tabella 1).

La risposta, infatti, varia in funzione della temperatura e dell'umidità dell'aria in cui si trovano i sensori (30); all'aumentare della temperatura, diminuisce la tensione di vapore dell'acqua contenuta nell'aria cromatografica di trasporto e quindi l'umidità relativa dell'aria a contatto con i sensori. La risposta R_s/R_0 , cioè in rapporto al valore di resistività in assenza di umidità, è funzione dell'umidità assoluta dell'aria (figura 4) e descritta da un'iperbole,

per cui utilizzando aria cromatografica secca (per valori di umidità assoluta tra 0 – 10 g/m³) si opera nella zona di dipendenza esponenziale. In queste condizioni, la sensibilità dei sensori è molto elevata, ma una piccola variazione di umidità provoca una forte variazione nella risposta; se, all'opposto, l'umidità assoluta dell'aria è maggiore di 15 g/m³, si raggiunge una zona di plateau in cui una variazione di umidità, anche elevata, provoca una corrispondente variazione di risposta trascurabile, cioè una minore sensibilità. In questo caso, se il campione contiene piccole quantità di acqua, quale è il caso del prosciutto crudo, l'aria umidificata, presente in largo eccesso, elimina le risposte dovute alla presenza di vapor d'acqua nello spazio di testa del campione, e nel caso di campioni a diversi gradi d'umidità, può renderne meno efficace la separazione.

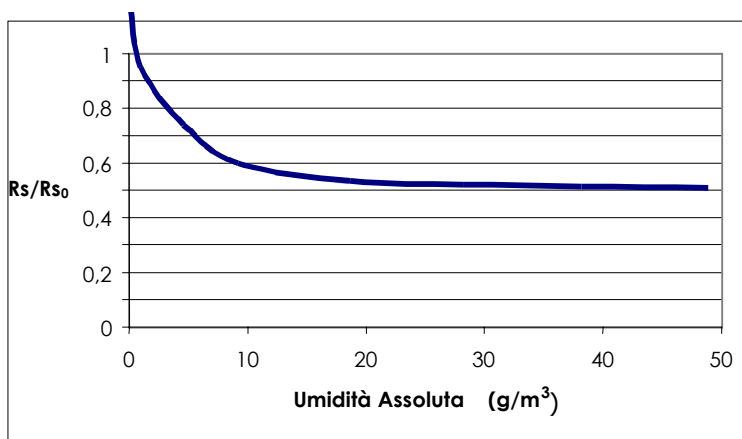


FIG. 4 - Risposta dei sensori in funzione dell'umidità assoluta* del gas di trasporto.

*Umidità assoluta: quantità di vapore acqueo contenuta in una unità di volume di atmosfera (g/m³).

Nelle due prove sperimentali svolte, con e senza aria umidificata, si hanno quindi due differenti composizioni dello spazio di testa dei campioni e in corrispondenza di queste, diverse sensibilità e cinetiche di risposta dei sensori; nella prova 2, con aria cromatografica secca, per la maggiore sensibilità accertata, abbiamo scelto di diminuire il tempo di puntatura a 15 secondi (prova sperimentale non descritta).

Prove sperimentali

I risultati dell'analisi di puntatura dei prosciutti nelle zone d'esame sono riportati in Tabella 2, espressi in termini di intensità dell'odore anomalo. All'esame olfattivo la classe A risulta compromessa in tutte le zone di puntatura, indice di un fenomeno esteso a tutte le zone muscolari e identificabile come gambo diffuso, mentre la classe B è caratterizzata

dall'alterazione principalmente a livello dell'anchetta (prova 1) e della vena (prova 2), e risultano difetti localizzati.

Prosciutto	Posizioni di puntatura											
	Gambo (1)			Vena (2)			Zona Femorale (3)			Anchetta (4)		
	Puntatore	Prova 1	Prova 2	Puntatore	Prova 1	Prova 2	Puntatore	Prova 1	Prova 2	Puntatore	Prova 1	Prova 2
A	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++++	+	+	+++
B	----	----	+	++	+	+++	+	+	----	+++	+++	----
C	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Tab. 2 – Analisi di puntatura dei prosciutti difettati umana e strumentale (prove 1 e 2).
 Classi di difettatura: nella prova 1 A) difetto di gambo; B) difetto d'anchetta; C) privo di difetti; nella prova 2 A) difetto di gambo; B) difetto di vena; C) privo di difetti.
 Il giudizio è espresso come intensità dell'odore anomalo secondo la legenda: molto intenso +++++, intenso +++, accentuato ++, poco pronunciato +, assente ----.

I dati strumentali, relativi a 180 misure, sono stati raccolti in 4 giornate di lavoro, estraendo da una a tre features per ogni curva, in modo da ottenere la massima informazione possibile. In particolare, il primo punto è stato scelto nella fase di ossidazione iniziale, subito dopo l'iniezione, in modo da differenziare i segnali dei singoli sensori in base alla loro sensibilità (20 secondi circa); il secondo in corrispondenza del massimo di risposta di tutti i sensori (50 secondi circa); il terzo alla fine del periodo di acquisizione in corrispondenza della fase di desorbimento (90 secondi circa).

Le DFA calcolate per le tre classi di difetto (Figura 5) hanno separato nettamente i prosciutti con difetto di gambo (A) da quelli conformi (C), mentre i gruppi con difetto di anchetta (B – prova 1) e di vena (B – prova 2) hanno una sovrapposizione più o meno estesa con gli altri gruppi.

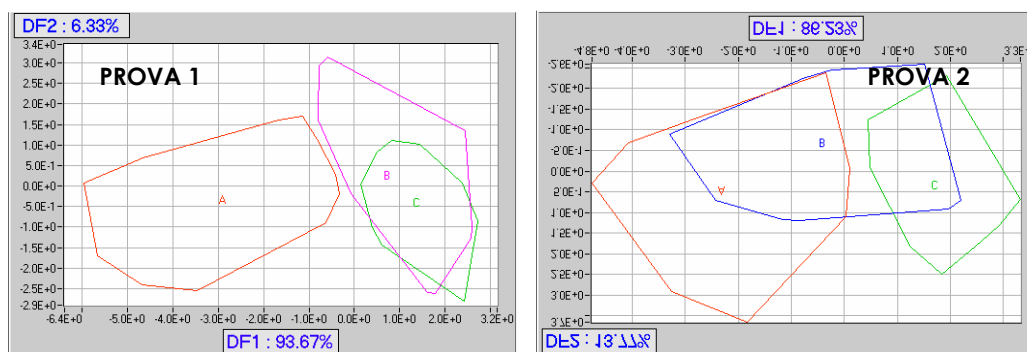


FIG. 5 - Discriminazione per tipo di difetto. DFA calcolata per 3 classi, sul totale delle misure effettuate (N. 180 prova 1 e N. 190 prova 2), con 11 sensori e 1 feature estratta.
 Classi della prova 1: -A, difetto di gambo; -B, difetto d'anchetta; -C, senza difetti.
 Classi della prova 2: -A, difetto di gambo; -B, difetto di vena; -C, senza difetti.

L'ipotesi è che la sovrapposizione sia da attribuire alla localizzazione del difetto, di tipo diffuso nel caso del gambo (A), e localizzato per i difetti di vena e anchetta (B). Il modello di classificazione rappresenta, sostanzialmente, una situazione media dell'aroma dei prosciutti, largamente dipendente dall'utilizzo, nella fase di elaborazione, delle misure effettuate in tutte le posizioni. Si è proceduto quindi alla creazione di librerie di dati divise per posizione di infissione, su cui costruire mappe di separazione dei difetti, e librerie divise per tipo di difetto con cui esaminare le diverse posizioni interessate.

Separazione per tipo di difetto. In tutte le posizioni di puntatura il gruppo di controllo è stato separato rispetto alla DF1 dal gruppo con difetto di gambo, mentre corrisponde del tutto o in massima parte al gruppo con difetto localizzato. Nella prova 1 il gruppo con difetto d'anchetta (B) che, come si è detto, ha una diversa genesi e composizione rispetto al difetto di gambo, viene posto dal modello in una posizione centrale sul piano delle due funzioni discriminanti (Figura 6), con parziale sovrapposizione al gruppo del gambo (A) nella sola posizione dell'anchetta (4).

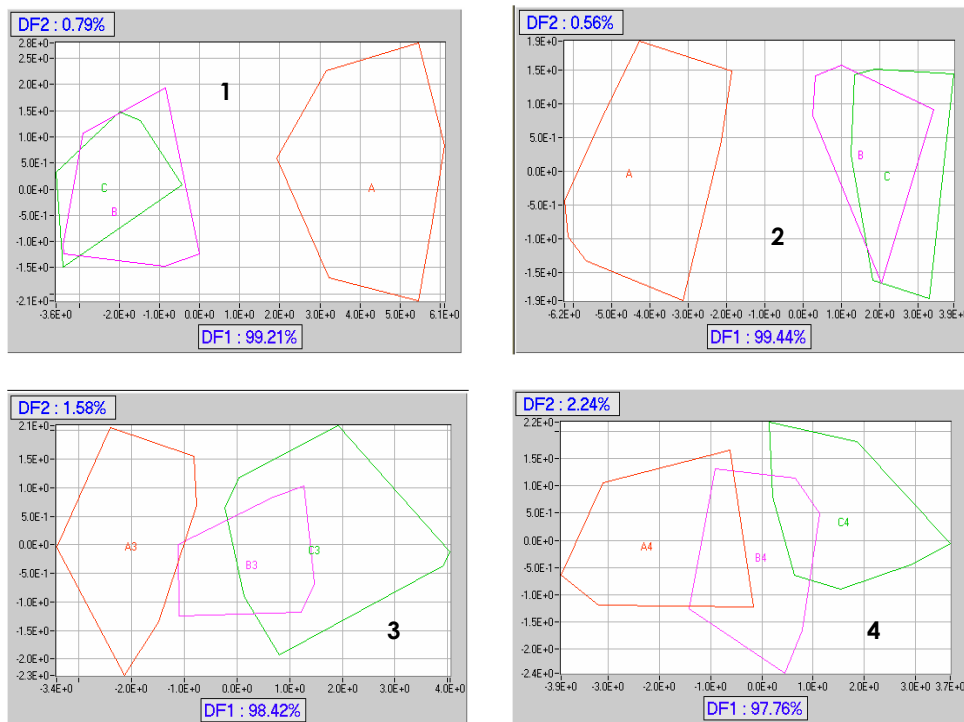


FIG. 6 – **Prova 1** - Discriminazione per tipo di difetto nella stessa posizione d'infissione.
 Gruppi: -A, difetto di gambo; -B, difetto d'anchetta; -C, controllo)
Posizione 1, gambo. DFA calcolata su 48 misure, 1 feature, 4 sensori, 3 classi.
Posizione 2, vena. DFA calcolata su 45 misure, 1 feature, 4 sensori, 3 classi.
Posizione 3, femore. DFA calcolata su 40 misure, 1 feature, 2 sensori, 3 classi.
Posizione 4, anchetta. DFA calcolata su 45 misure, 1 feature, 3 sensori, 3 classi.

Nella prova 2 il modello di raggruppamento è analogo nel mantenere separati i gruppi dei prosciutti conformi (A) da quelli con difetto di gambo diffuso (C) e nel sovrapporre parzialmente il gruppo con difetto di vena (B) con quello con difetto di gambo (A), per i quali le manifestazioni olfattive del difetto sono analoghe ma le ipotesi circa la causa microbiologica sono discordanti (Figura 7). E' interessante notare che in presenza di aria secca, che conferisce maggiore sensibilità ai sensori, nelle posizioni non interessate dal difetto, il gruppo con difetto localizzato non è assimilato al gruppo di controllo, come avviene nella prova 1 con aria umida, ma viene parzialmente distinto da questo lungo la DF1 e lungo la DF2.

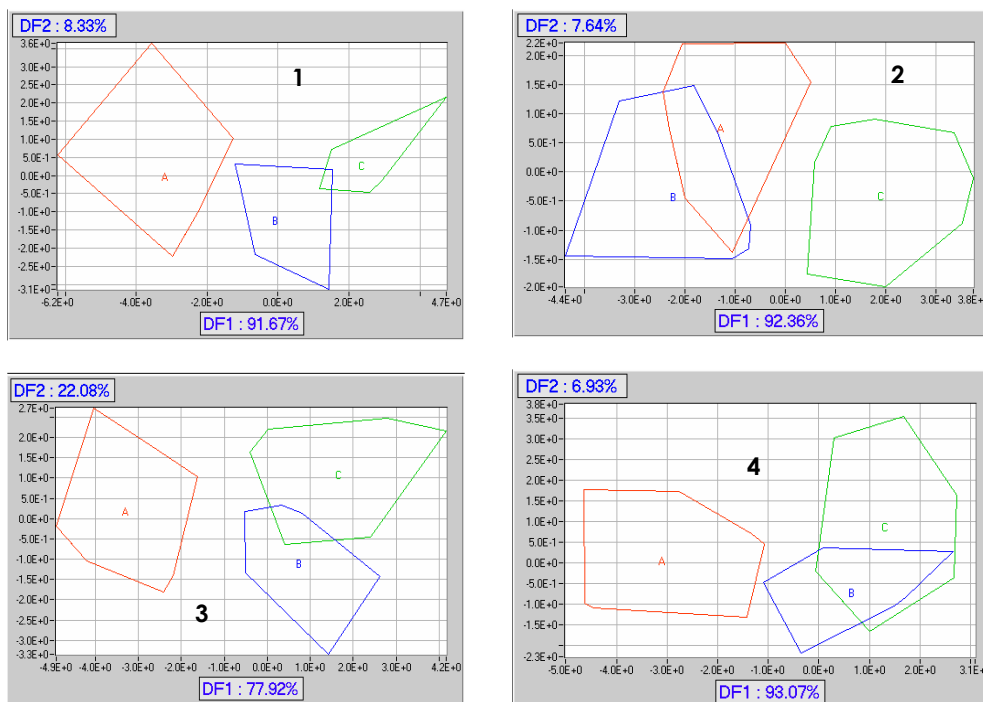


FIG. 7 – **Prova 2** - Discriminazione per tipo di difetto nella stessa posizione d'infissione.
 Gruppi: -A, difetto di gambo; -B, difetto di vena; -C, controllo.
Posizione 1, gamba, DFA calcolata su 45 misure, 1 feature, 4 sensori, 3 classi.
Posizione 2, vena, DFA calcolata su 45 misure, 1 feature, 4 sensori, 3 classi.
Posizione 3, femore, DFA calcolata su 50 misure, 1 feature, 2 sensori, 3 classi.
Posizione 4, anchetta, DFA calcolata su 45 misure, 1 feature, 3 sensori, 3 classi.

Separazione per posizione d'infissione. Le mappe di distribuzione risultanti dalle due prove sono mostrate nelle figure 8 e 9, rispettivamente per la prova 1 e la prova 2.

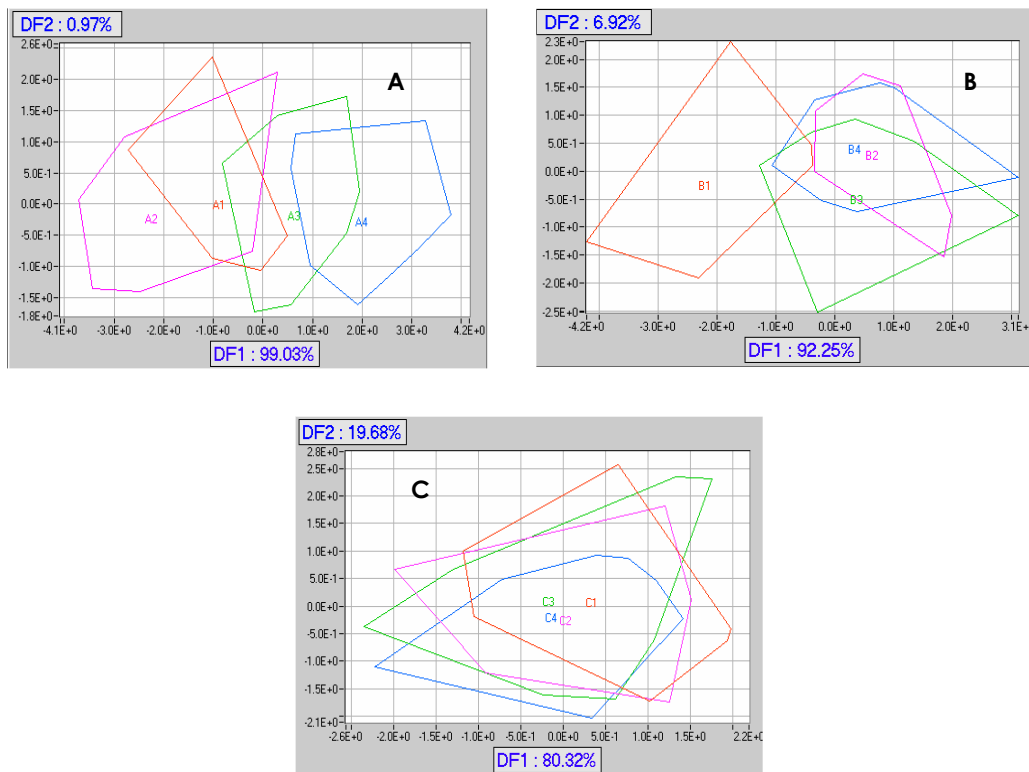


FIG. 8 – **Prova 1** - Discriminazione per posizione d'infissione all'interno del tipo di difetto.
 I 4 gruppi sono individuati dalle 4 posizioni di puntatura: -1: gambo; -2: vena; -3: zona femorale; -4: anchetta.
 Gruppi: -A, difetto di gambo (58 misure, 2 sensori, 1 feature); -B, difetto d'anchetta (65 misure, 5 sensori, 1 feature); C, controllo (55 misure, 2 sensori, 1 feature).

In entrambe le prove il gruppo di controllo (gruppo C) presenta aree quasi del tutto sovrapposte, in accordo con l'assenza del difetto in tutte le zone d'esame; analogo è il comportamento separativo all'interno del gruppo con difetto di gambo (gruppo A), in cui, a causa del difetto esteso, le posizioni risultano molto simili, ad eccezione della posizione dell'anchetta (4), che comunque, per la presenza del frammento dell'osso iliaco superficiale è una zona particolare della coscia. Nei casi di alterazione localizzata, il modello separativo risulta largamente dipendente dall'entità e dal tipo di difetto; nella prova 1, infatti, non si ha separazione dell'area corrispondente al difetto d'anchetta (B4), mentre nella prova 2 il gruppo con difetto di vena è ben separato. L'ipotesi sul limite dell'analisi fa capo alla necessità di dover garantire al sistema di elaborazione un elevato numero di misure in una porzione muscolare molto ristretta, e permette al sistema di calcolo DFA di isolare il difetto solo se vengono elaborate matrici di dati ottenute da sistemi di misura a elevata sensibilità.

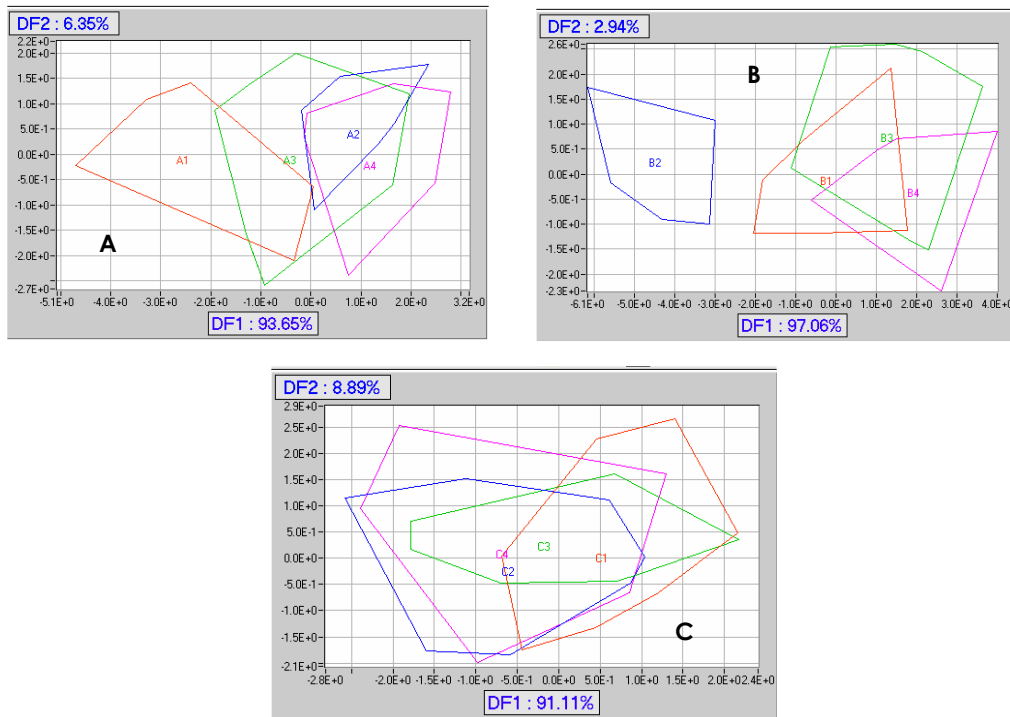


FIG. 9 - : **Prova 2** - Discriminazione per posizione d'infissione all'interno del tipo di difetto.
 14 gruppi sono individuati dalle 4 posizioni di puntatura: -1: gambo; -2: vena; -3: zona femorale; -4: anchetta.
 Gruppi: -A, difetto di gambo (60 misure, 2 sensori, 1 feature); -B, difetto di vena (68 misure, 2 sensori, 1 feature); C, controllo (65 misure, 2 sensori, 1 feature).

CONCLUSIONI

Le alterazioni microbiologiche (difetti) del prosciutto crudo, invalidanti l'apposizione del marchio DOP, possono essere esaminate con successo tramite analisi con sistema olfattivo artificiale a sensori MOS. Il sistema presenta molteplici punti di versatilità:

- 1- l'analisi può essere eseguita su campioni di aroma del prosciutto, prelevati con lo stesso ago-sonda impiegato nell'esame olfattivo ufficiale;
- 2- la sensibilità del modulo analitico può essere scelta in base alle finalità di discriminazione, variando le condizioni cromatografiche del gas di trasporto;
- 3- la capacità separativa del modulo statistico può essere affinata costruendo librerie di dati opportunamente selezionate per posizione di puntatura e per tipologia di difetto.

La sperimentazione, pur condotta su un ridotto numero di campioni, effettuando un campionamento manuale e legata a maggiori tempi di analisi rispetto alla puntatura, ha messo in luce che il sistema rappresenta un primo passo verso il controllo analitico strumentale del prodotto integro; l'analisi richiede la messa a punto di metodiche specifiche nelle diverse applicazioni e il supporto di un'analisi sensoriale di riferimento per l'attribuzione del giudizio qualitativo alle classi di separazione.

Parma, 30 marzo 2005

BIBLIOGRAFIA

- 1 – Consorzio del Prosciutto di Parma, *Manuale di corretta prassi igienica*, D.L.155/97 Ed.1, 1999.
- 2 – W. Bloom, D. W. Fawcett, *Trattato di Istologia*, Piccin, 1970
- 3 – C. Cantoni, C. Bersani, P. L. Roncaglia, *Ingegneria Alimentare*, 2, 40 (1994).
- 4 – G. M. Desenzani, P. Oddi, *Ingegneria Alimentare*, 6, 31 (1993).
- 5 – I. S. Barbuti, E. Rastelli, M. E. M. Emame, M. S. Grisenti, S. Quintavalla, G. Parolari, *Industria Conserve*, 78, 29 (2003).
- 6 – I. Ghinelli, *Le carni conservate – Vol. 2*, Piccin, 1972.
- 7 – M. Campanini, S. Barbuti, M. Ghisi, P. Baldini, *Industria Conserve*, 60, 300 (1985).
- 8 – F. Papa, *Industrie Alimentari*, 33, 636 (1994).
- 9 – M. E. Marín, M. C. De la Rosa, A. V. Carrascosa, I. Corneo, *Fleischwirtschaft*, 72, 1600 (1992).
- 10 – E. Rastelli, G. Giraffa, D. Carminati, G. Parolari, S. Barbuti, *Meat Science*, 2005, in corso di pubblicazione
- 11 – C. Pin, J. Baranyi, *International Journal of Food Microbiology*, 41, 59 (1998).
- 12 – D. Blanco, G. Barbieri, P. Mambriani, E. Spotti, S. Barbuti, *Industria Conserve*, 69, 230 (1994).
- 13 – R. G. Buttery, L. C. Ling, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 21, 745, (1973).
- 14 – C. Karahadian, D. B. Josephson, R. C. Lindsay, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 33, 339 (1985).
- 15 – C. Tullet, *Manufacture World Wide*, 1994.
- 16 – J. W. Gardner, P. N. Bartlett, *Sensors and Actuators B*, 18, 211, (1993).
- 17 – D. Hodgins, *Techniques for analyzing food aroma*, Marcel Dekker Inc., New York, 1997.
- 18 – Y. Blixt, E. Borch, *International Journal of Food Microbiology*, 46, 123, (1999).
- 19 – D. D. H. Boothe, J. W. Arnold, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 315, 2002.
- 20 – K. Y. Han, J. H. Kim, B. S. Noh, *Food Science and Biotechnology*, 10, 668, (2001).
- 21 – V. Rossi, C. Garcia, R. Talon, C. Denoyer, J. L. Berdagué, *Viandes et Produits Carnés*, 16, 21, (1995).
- 22 – a) V. Rossi, C. Garcia, R. Talon, C. Denoyer, J. L. Berdagué, *Sensors and Actuators B*, 37, 43, (1996). b) M. Garcia, M.C. Horrillo, J.P. Santos, M. Aleixandre, I. Sayago, M.J. Fernandez, L. Ares, J. Gutierrez, *Sensors and Actuators B*, 96, 621, (2003). c) L. Otero, M.C. Horrillo, M. Garcia, I. Sayago, M. Aleixandre, M.J. Fernandez, L. Ares, J. Gutierrez, *Meat Science*, 65, 1175, (2003)
- 23 – F. Camurati, G. Cristofanilli, M. Bonadonna, E. Colle, E. Dalcanale, *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 80, 65, (2003).
- 24 – C. Ricci, U. Bersellini, E. Dalcanale, *Italia Imballaggi*, 283, (2003).
- 25 – C. J. Hubertz, *Applied Discriminant Analysis*, J. Wiley & Sons, New York, 1994.
- 26 – J. F. Hair, Jr., R. E. Anderson, R. L. Tatham, W. C. Black, *Multivariate Data Analysis with Readings*, 4th Edition, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1995.
- 27 – K. L. Goodner, J. G. Dreher, R. L. Rouseff, *Sensors and Actuators B*, 80, 261, (2001).
- 28 – K. V. Mardia, J. T. Kent, J. N. Bibby, *Multivariate Analysis*, Academic Press, London, 1982.
- 29 – P. Mielle, *Trends in Food Science & Technology*, 7, 432, (1996).

30 – P. VanGeloven, M. Honore, J. Roggen, S. Leppavuori, T. Rantala, *Sensors and Actuators B*, 4, 185, (1991).