

CARMELINDA BOTTIGLIERI, ANALTEA SCALONI, ELENA FEDELE,  
RAFFAELE ROMANO(\*\*), PAOLO BERGAMO, ALDO DI LUCCIA(\*)

## CARATTERIZZAZIONE DELLA FRAZIONE IDROSOLUBILE INFERIORE A 3.000 DALTON ISOLATA DA PROSCIUTTI CRUDI E COTTI DI CARNE SUINA

### INTRODUZIONE

Tra i prodotti tradizionali dell'area mediterranea si annoverano i prosciutti crudi, salumi non insaccati il cui processo tecnologico prevede esclusivamente addizione di sale e successiva stagionatura delle cosce di suino. Nelle masse muscolari e nel tessuto adiposo i lunghi tempi di maturazione (12-14 mesi) inducono una serie di attività sia proteolitiche, essenzialmente dovute agli enzimi citoplasmatici ( $\mu$ - e m-calpain, complesso proteolitico multicatalitico) e lisosomiali (catapsine), sia lipolitiche dovute ad enzimi endogeni muscolari [1, 2] ed, in misura minore, agli enzimi prodotti da microrganismi [3]. È stata osservata, infatti, un'intensa attività proteolitica [4], con conseguente riduzione delle catene polipeptidiche [5] e un incremento di peptidi a basso peso molecolare e di amminoacidi liberi [6]; si è, inoltre, riscontrato che alcuni amminoacidi e piccoli peptidi inferiore a 3.000 Da forniscono un importante contributo alla formazione del flavour [7]. Il prosciutto crudo, infatti, è molto apprezzato dal consumatore per le sue caratteristiche tessuometriche, sensoriali e nutrizionali, e oggi rappresenta un alimento al pronto consumo che in molti casi soddisfa le esigenze quotidiane della società moderna. Esso, inoltre, è adatto a tutte le età per la presenza di proteine ad alto valore biologico e per la facile digeribilità. Nel caso dei prosciutti cotti, invece, le cosce di suino sono preventivamente sottoposte a salagione mediante salamoia o iniezione diretta e cotte in forni ad acqua, a doccia o a vapore statico fino a raggiungere una temperatura di circa 70°C al cuore del prodotto. Dal momento che i prodotti cotti stanno sempre più conquistando importanti fette di mercato, la tecnologia di produzione è tuttora oggetto di numerose ricerche per migliorarne la qualità. In Italia, non esiste alcun parametro valido per legge in grado di definire i requisiti di qualità percepibili dal consumatore; la qualità giuridicamente tutelata fa riferimento solo alla sicurezza, alla salute ed alla corretta

---

Istituto di Ricerche sull'Adattamento dei Bovini e dei Bufali all'Ambiente del Mezzogiorno (IAB-BAM)-CNR - Via Argine 1085 - 80147 Napoli

(\*) Istituto di Scienza dell'Alimentazione (ISA)-CNR - Via Roma - 83100 Avellino

(\*\*) Dipartimento di Scienza degli Alimenti - Università degli Studi di Napoli Federico II - Via Università 100 - 80055 Portici - Na

informazione del consumatore. Per i prosciutti cotti le disposizioni di legge concernono gli additivi consentiti, in special modo i polifosfati, il cui limite massimo previsto non deve superare lo 0,25% [8]. Scopo di questo lavoro è la caratterizzazione della frazione idrosolubile a basso peso molecolare (<3.000 Da) dei prosciutti sia crudi che cotti, per osservare l'influenza che i processi tecnologici hanno su tale frazione e individuare parametri che possano essere adoperati come indicatori di qualità oggettivi e misurabili.

## MATERIALI E METODI

### Campioni

Si sono adoperati: 5 muscoli scheletrici di suino, 6 prosciutti cotti (3 con aggiunta di polifosfati e 3 senza polifosfati), 5 prosciutti crudi di Parma, 5 prosciutti crudi di S. Daniele, 5 prosciutti crudi Francesi (stagionatura 5-7 mesi).

### Estrazione della frazione idrosolubile

Sono stati omogeneizzati (omogeneizzatore PBI International) 50 g di prodotto per 5 min a 0°C in acqua distillata e l'omogenato è stato centrifugato a 5.000 rpm per 30 min a 0°C (centrifuga Minifuge RF Heraeus Sepatech), il surnatante recuperato è stato centrifugato a 13.000 rpm per 15 min a 0°C (Sorvall RMC 14) e filtrato con filtri 0,45 µm (Millipore). Dello stesso filtrato 400 µL sono stati concentrati in microconcentratori (Microcon 3; Amicon).

### Elettroforesi capillare

La frazione idrosolubile estratta dai prodotti in esame è stata analizzata mediante elettroforesi capillare (mod. P/ACE 2000, software GOLD, Beckman). In un capillare di silice fusa uncoated di 50 µm x 27 cm sono stati iniettati 50 nL di campione con alta pressione per 3 s. La separazione è stata condotta a 10 KV costante in tampone fosfato 80 mM pH 2,5, per 15 min a 25°C.

### Cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC)

I picchi osservati in elettroforesi capillare sono stati isolati e purificati mediante RP-HPLC utilizzando un sistema cromatografico Hewlett-Packard serie 1100 gestito dal software HP Chemstation. Alla colonna Jupiter C 18 (300 Å, 250x4,66 mm, 5 µ, Phenomenex, USA) è stato applicato un gradiente binario, con l'eluente A (acqua +0,1% TFA) e l'eluente B (acetonitrile +0,1% TFA), sviluppato ad un flusso di 1 mL/min a 40°C; in 0% di B per 10 min da 10 min a 35 min B passava dal 35 al 100%, per 2 min rimaneva al 100% per poi tornare allo 0% dopo 2 min. La rivelazione dei picchi è avvenuta a 214 nm e 218 nm mediante un rivelatore UV a serie di diodi. I picchi così rivelati sono stati raccolti singolarmente e identificati come amminoacidi OPA-FMOC derivati [9].

## RISULTATI E DISCUSSIONE

L'elettroforesi capillare in fase libera della frazione acquosa a cut off <3.000 Da mostra la presenza di sette picchi nella carne fresca e otto nei prosciutti. I picchi 2 e 3 sono i più intensi in tutti i campioni esaminati mentre il picco 5 è trascurabile nel ferogramma della carne fresca suina (fig. 1a). Le fig. 1b, 1c e 1d mostrano rispettivamente i ferogrammi di un prosciutto crudo estero (stagionatura 6 mesi) e dei prosciutti crudi S. Daniele e Parma; in questi ultimi due l'intensità dei picchi da 1 a 8 aumenta rispetto alla coscia, ad eccezione del picco 3 che diminuisce. Nel caso del prodotto meno stagionato la proporzione dei picchi da 1 a 7 è diversa da quella dei prodotti più stagionati; in particolare i picchi 6 e 7 hanno proporzioni simili. I ferogrammi del prosciutto cotto con polifosfati e senza polifosfati sono indicati, rispettivamente, nelle fig. 1e ed 1f; per entrambe i profili è possibile osservare in tutti i picchi da 1 a 8 una maggiore intensità rispetto al muscolo suino, ad eccezione del picco 3 che diminuisce. Il picco 8, inoltre, risulta essere più alto nel campione con polifosfati. Tutti i picchi osservati in elettroforesi capillare sono stati isolati e purificati mediante RP-HPLC ed identificati come OPA-FMOC derivati. In fig. 2 è mostrato il profilo cromatografico del prosciutto crudo S. Daniele. I primi tre picchi, eluiti insieme ed in proporzioni diverse, corrispondono ai picchi 1, 2 e 3 mostrati nei ferogrammi delle fig. 1b, 1c e 1d; la loro composizione è risultata essere una miscela costituita essenzialmente dagli amminoacidi proteici. I picchi da 5 a 7 sono stati identificati rispettivamente come Trp, Met, Phe e Tyr, mentre il picco 4 non ha mostrato natura amminoacidica. In tab. 1 sono riportati i risultati relativi alle aree percentuali dei picchi ottenuti dai ferogrammi della carne fresca e dei prosciutti. Il picco 3 varia dal 31% nella carne fresca al 25% circa nei prosciutti cotti e 16% nel

Tabella 1 - Percentuale delle aree dei picchi relativi ai ferogrammi della carne fresca e dei prosciutti stagionati.

Campioni	Picco 1	Picco 2	Picco 3	Trp	Met	Phe	Tyr	Picco 8
Muscolo suino	1,05±0,63	53,50±5,51	34,70±4,80	-	1,15±0,07	1,35±0,21	1,35±0,21	6,90±1,41
Pros. crudo estero	8,50±0,01	34,10±0,21	19,60±4,38	3,70±0,56	1,65±0,50	6,40±0,42	6,25±0,23	19,8±4,45
Pros. crudo Parma	8,35±1,62	22,70±1,41	9,65±2,19	10,2±0,77	3,20±0,01	17,7±1,27	14,40±2,68	13,7±0,49
Pros. crudo S. Daniele	8,40±0,28	21,10±0,98	9,20±0,21	9,01±0,56	3,15±0,07	18,8±0,91	12,25±0,63	17,1±0,28
Pros. cotto con polifosfati	7,30±1,70	36,70±3,53	22,6±0,07	3,70±0,56	1,75±0,63	5,60±0,21	6,50±0,56	15,9±1,06
Pros. cotto senza polifosfati	0,50±0,01	35,60±1,48	27,6±1,62	2,05±0,91	3,1±1,83	4,25±0,35	3,35±0,91	23,1±3,88

prosciutto estero mentre nel prosciutto S. Daniele e Parma rappresenta il 9,1 e l'11,2% rispettivamente. Per contro si osserva l'aumento dei picchi corrispondenti agli amminoacidi Trp, Met, Phe e Tyr dovuto, verosimilmente, alla presenza di peptidi nel picco 3. Tra gli amminoacidi identificati la Phe presenta un aumento maggiore, è possibile, quindi, considerare il rapporto tra il picco 3 e la Phe variabile in funzione della maturazione; questo consente di stabilire un indice sui tempi di stagionatura (tab. 2). Nel caso dei prosciutti cotti, naturalmente, ciò non è possibile per la differente tecnologia di produzione, ma si riscontra comunque una percentuale dei picchi relativi agli amminoacidi Trp, Met, Phe e Tyr simile ad un prosciutto con pochi mesi di stagionatura. Quanto osservato indica che tra la preparazione del prosciutto e la lavorazione industriale intercorre un lasso di tempo in cui gli enzimi endogeni calpaine e catepsine continuano la loro azione. Goll *et al.* [10, 11] riporta, infatti, che m- and  $\mu$ -calpaine sono gli enzimi principalmente implicati nelle numerose variazioni proteolitiche che avvengono all'inizio della maturazione della carne.

## CONCLUSIONI

L'elettroforesi capillare offre un metodo rapido ed accurato per valutare sia le differenze dei prodotti derivati dalla carne suina, sia la qualità dei prosciutti soprattutto per quanto riguarda i tempi di stagionatura. Naturalmente ulteriori studi sono in corso per verificare la validità dell'indice utilizzato nel determinare l'andamento della maturazione.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Taylor R.G., Geesink G.H., Thompson V.F., Koohmararie M., Goll D.E. "Is Z-Disk degradation responsible for postmortem tenderization?". *J. Anim. Sci.* 73:1351-1367 (1994).
- 2) Koohmararie M. "Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (Proteasome): purification, characterization, and comparison of its effects on myofibrils with  $\mu$ -calpains". *J. Anim. Sci.* 70:3697-3708 (1994).

Tabella 2 - Rapporto tra le aree percentuali del picco 3 e del picco della Phe come indice dei tempi di stagionatura.

Campioni	Aree percentuali del picco 3 (%)	Aree percentuali del picco Phe	Rapporto tra le aree percentuali del picco 3 e della Phe
Muscolo suino	34,7	1,35	25,8
Pros. crudo estero (stagionato 6 mesi)	19,6	6,4	3,0
Pros. crudo Parma (stagionato 12 mesi)	9,65	17,7	0,54
Pros. crudo S. Daniele (stagionato 14 mesi)	9,2	18,8	0,48

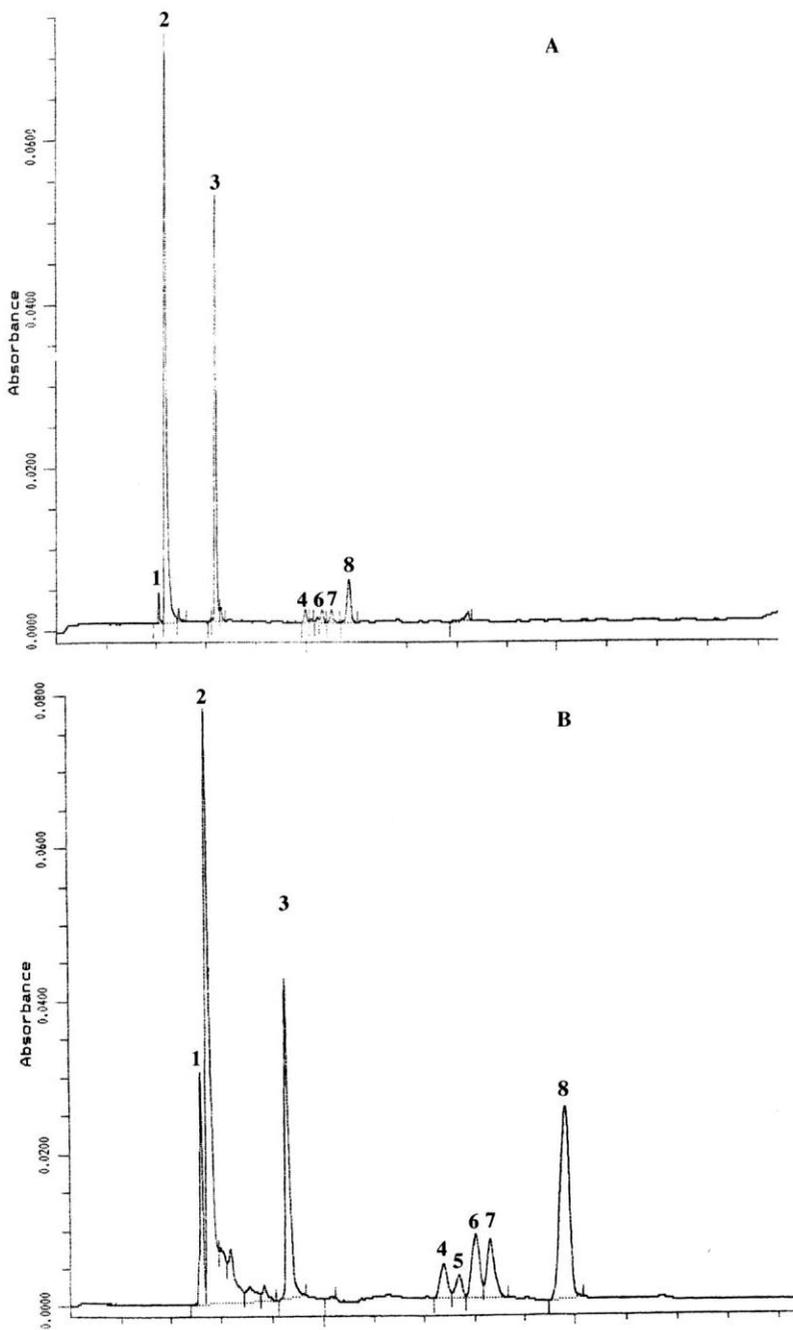
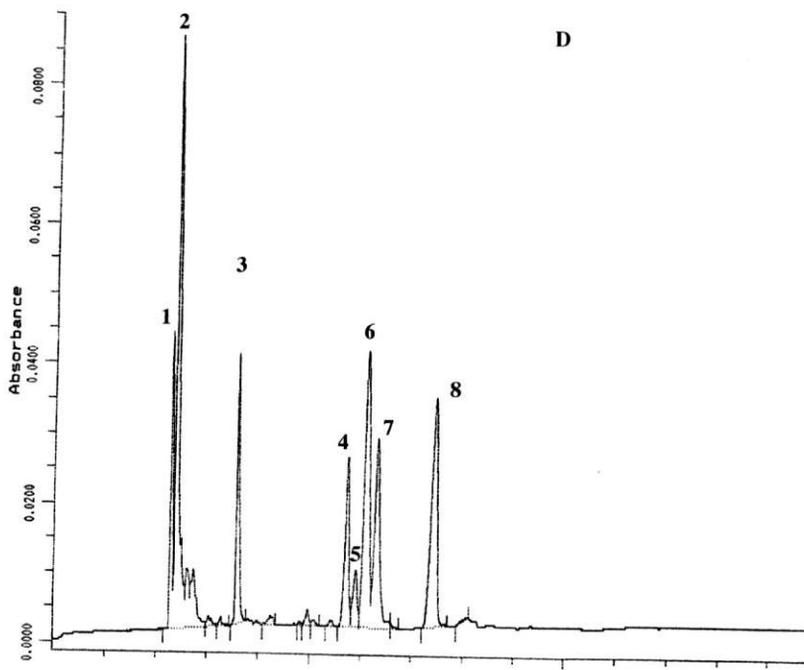
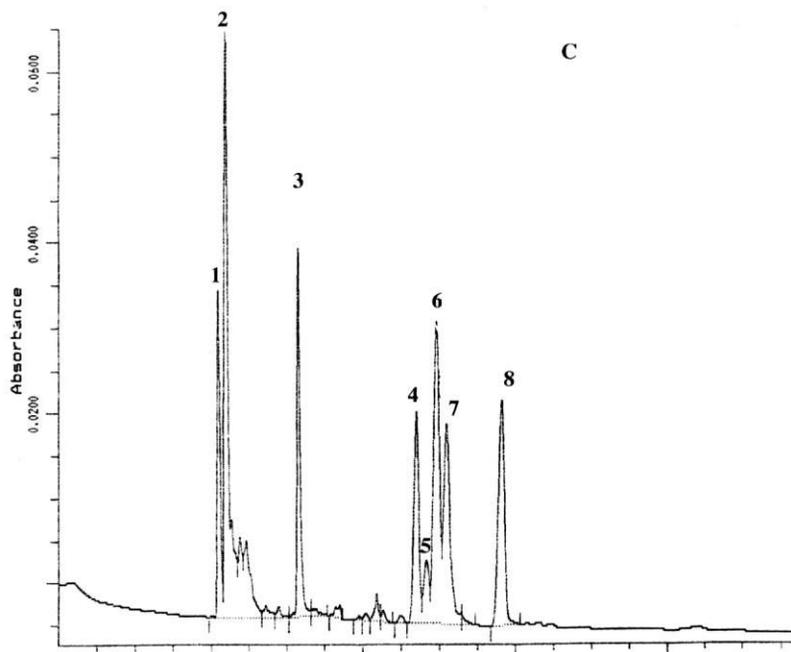
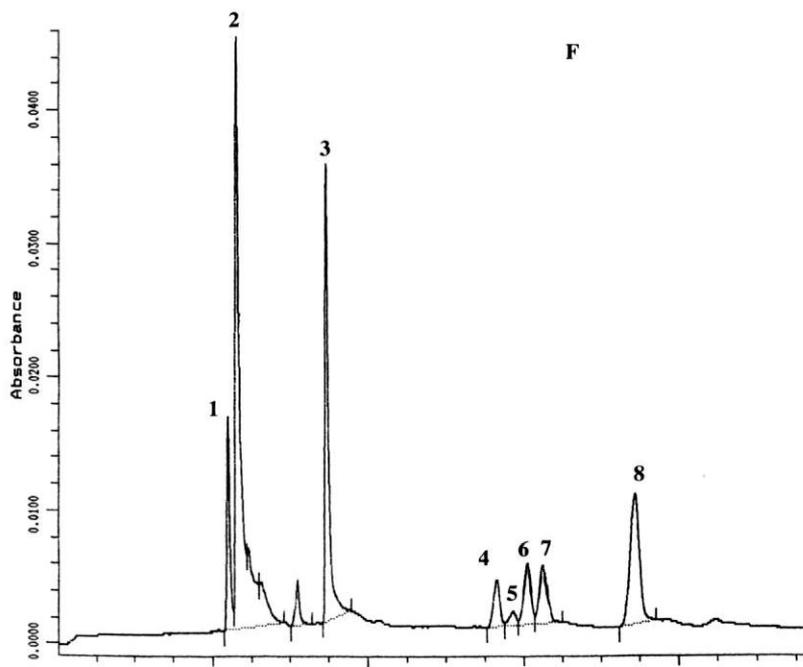
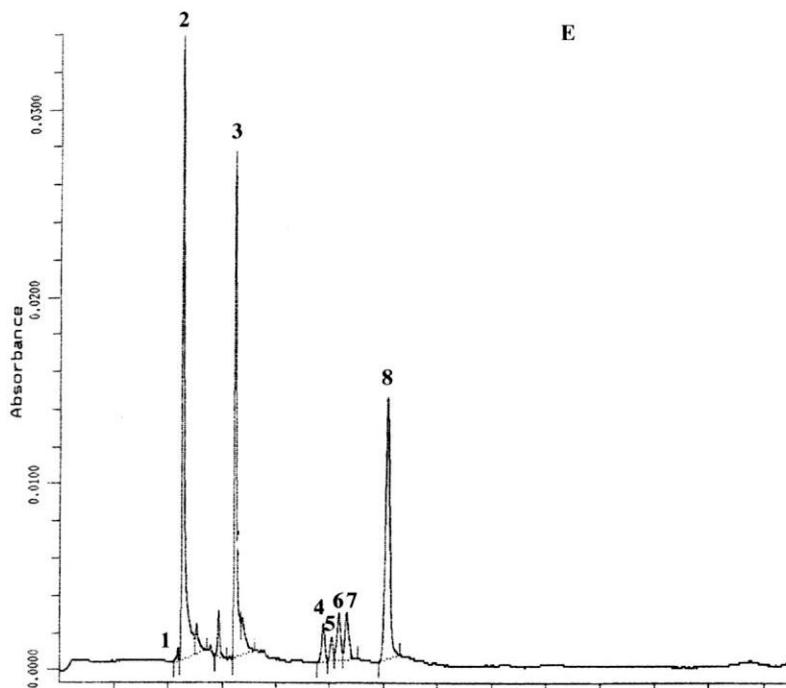


Fig. 1 - Elettroforesi capillare della frazione azotata idrosolubile: (a) carne suina (coscia); (b) prosciutto crudo estero; (c) prosciutto crudo S. Daniele; (d) prosciutto crudo Parma; (e) prosciutto cotto con polifosfati; (f) prosciutto cotto senza polifosfati. [1,2,e 3: miscela di aminoacidi e peptidi; 4: Trp; 5: Met; 6: Phe; 7: Tyr; 8: composto non identificato di natura non aminoacidica].





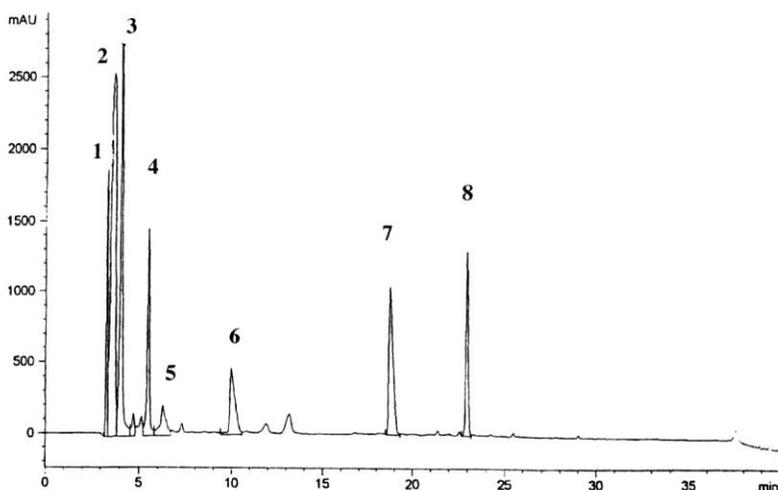


Fig. 2 - Identificazione dei picchi relativi al ferogramma del prosciutto crudo S. Daniele mediante cromatografia liquida ad alta prestazione a fase inversa (RP-HPLC). Picchi 1, 2 e 3 da HPLC, miscela di aminoacidi e peptidi; picco 4 di natura non aminoacidica, non identificato; picco 5, Met; picco 6, Tyr; picco 7, Phe; picco 8, Trp.

- 3) Verplaetse A, Demeyer D., Gerard S., Buys E. "Endogenous and bacterial proteolysis in dry sausage fermentation". Proceedings, 38th ICoMST, Clermont-Ferrand. 851-854, (1992).
- 4) Molina I., Toldrà F. "Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry-cured ham". J. Food Sci. 57:1308-1310 (1992).
- 5) Rodriguez-Nunez E., Aristoy M.C., Toldrà F. "Peptide generation in the processing of dry-cured ham". Food Chem. 53:187-190 (1995).
- 6) Aristoy M.C., Toldrà F. "Deproteinization techniques from HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham". J. Agric Food Chem. 39:1792-1795 (1991).
- 7) Cordoba J.J., Antequera T., Garcia C., Ventanas J., Lòpez-Bote C., Asensio M.A. "Evolution of free amino acids and amines during ripening cured ham". J. Agric Food Chem. 42:2296-2301, (1994).
- 8) Chizzolini R., Madarena G., Dazzi G. "Considerazioni sul significato del contenuto in acqua e proteine dei prosciutti cotti". Industrie Alimentari, p.533 luglio-agosto 1986.
- 9) Gratzfeld-Huesgen A. "Sensitive and reliable amino acid analysis in protein Hydrolysates using the HP 1100 Series HPLC". Technical note HP. Publication number 12-5966-3110E, Germany 01/1998.
- 10) Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G., Christiansen J.A. "Role of calpain system in muscle growth. Biochimie". (Paris) 74:225, (1992).
- 11) Goll D.E., Taylor R.G., Christiansen J.A., Thompson V.F. "Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality". Proc. 44<sup>th</sup> Annu. Recip. Meat Conf. 25-36. National live stock and meat board, Chicago, IL. (1992).

## RIASSUNTO

L'intensa attività proteolitica che si osserva nel corso della maturazione dei prosciutti produce aminoacidi e piccoli peptidi che influenzano particolarmente il gusto del prodotto finito. È stata studiata, mediante elettroforesi capillare e cromato-

grafia in fase inversa, la frazione idrosolubile inferiore a 3.000 Da della carne suina, di prosciutti crudi a diversa maturazione e di prosciutti cotti. I ferogrammi mostrano 8 picchi in tutti i campioni esaminati. Il terzo picco, in ordine di eluizione, diminuisce all'aumentare dei tempi di maturazione, indicando la presenza di peptidi a basso peso molecolare mentre aumentano quattro picchi identificati come Trp, Met, Phe e Tyr. Il rapporto tra il picco 3 e la Phe ha permesso di calcolare un indice in grado di stimare i tempi di maturazione. Nel caso dei prosciutti cotti si è, comunque, osservata una limitata attività proteolitica. I ferogrammi dei cotti con polifosfati presentano una più alta intensità del picco 8 rispetto ai cotti senza polifosfati, tale differenza è imputabile alla diversa porzione anatomica utilizzata per la lavorazione.

## SUMMARY

### CHARACTERIZATION OF WATER SOLUBLE FRACTION BELOW 3,000 Da OF DRY-CURED HAMS AND COOKED HAMS

*The proteolytic activity observed during dry-cured ham ripening yields amino acids and small peptides that affect taste of end product. The water soluble fraction < 3,000 Da of raw pork meat, dry-cured ham and cooked ham was investigated by capillary electrophoresis and reversed phase chromatography. The pherograms showed 8 peaks in all examined samples. The third peak, in order of elution, decreased while four peaks, identified as Trp, Met, Phe e Tyr, simultaneously increased, indicating the presence of small peptide in the third peak. The percentage area ratio of this latter peak and Phe allowed accounting an index of ripening time. In the case of cooked ham a limited proteolytic activity was observed. The pherograms of cooked hams, polyphosphate contained, showed higher intensity of peak 8 with respect to that of cooked ham without polyphosphate. This difference was accounted for anatomical region used in the manufacturing.*