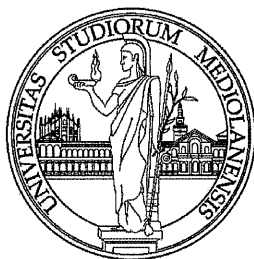


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Agraria

**Corso di Laurea Magistrale in Qualità e Sicurezza dell'Alimentazione
Umana**



**TIPIZZAZIONE MICROBIOLOGICA DI TOME CAPRINE
OTTENUTE DA LATTE CRUDO MEDIANTE LAVORAZIONI
ARTIGIANALI**

Relatore: Dott.ssa Laura FRANZETTI

Correlatore: Dott. Mauro SCARPELLINI

**Tesi di Laurea di:
Marco FRUSCA
Matr. n. 717314**

Anno Accademico 2007-2008

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 CENNI STORICI SULL'ALLEVAMENTO CAPRINO	1
1.2 L'ALLEVAMENTO CAPRINO: PROSPETTIVE E MERCATO	3
1.2.1 LA SITUAZIONE MONDIALE	3
1.2.2 LA SITUAZIONE EUROPEA	4
1.2.3 LA SITUAZIONE ITALIANA	5
1.3 LE AZIENDE AGRICOLE CAPRINE E IL SISTEMA DI ALLEVAMENTO	7
1.4 CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI DEL LATTE CAPRINO	9
1.5 FATTORI DI VARIAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DEL LATTE CAPRINO	15
1.6 QUALITA' DEL LATTE ED ATTITUDINE TECNOLOGICA	18
1.7 FORMAGGI CAPRINI	19
1.7.1 FORMAGGI CAPRINI A COAGULAZIONE LATTICA	20
1.7.2 FORMAGGI CAPRINI A COAGULAZIONE PRESAMICA	23
1.8 PROBLEMATICHE MICROBIOLOGICHE NELLA FILIERA DEL LATTE CAPRINO	26
1.8.1 I MICRORGANISMI PATOGENI E LA FILIERA DEL LATTE	26
1.8.2 LA LEGISLAZIONE ALIMENTARE DELL'UE ED IL CONTROLLO DEI PERICOLI MICROBIOLOGICI	30
1.8.3 MICRORGANISMI ALTERATIVI DEI FORMAGGI	40
1.8.4 MICRORGANISMI UTILI	40
1.9 LA MICROBIOLOGIA MOLECOLARE NEL CONTROLLO DELLA QUALITA' E SICUREZZA ALIMENTARE	41
2. SCOPO DELLA TESI	43
3. MATERIALI E METODI	44
3.1 LA VALSESIA	44

3.2 TIPOLOGIA DEI CASEIFICI: PROCESSO PRODUTTIVO E STRUTTURA DEL FBBRICATO	46
3.2.1 CARCOFORO	46
3.2.2 CANGELLO	53
3.2.3 ALPE MERA	59
3.3 CAMPIONI ALIMENTARI: ANALISI MICROBIOLOGICHE	65
3.4 ISOLAMENTO DEI CEPPI	71
3.5 CONSERVAZIONE ISOLATI	72
3.6 ANALISI GENOTIPICA PROCARIOTI	73
3.6.1 ESTRAZIONE DNA BATTERICO	73
3.6.2 AMPLIFICAZIONE RAPD-PCR	73
3.6.3 AMPLIFICAZIONE ITS-PCR	74
3.6.4 AMPLIFICAZIONE 16S rDNA	75
3.6.5 ELETTROFORESI DELL'AMPLIFICATO	75
3.6.6 SEQUENZIAMENTO ED ELABORAZIONE TRACCIATO	78
3.7 ANALISI FENOTIPICA DEI LIEVITI	78
3.7.1 CRESCITA SU PIASTRA DI YEAST MORFOLOGY AGAR	78
3.7.2 UTILIZZO FONTE DI AZOTO E FERMENTAZIONE ZUCCHERI	78
3.8 ANALISI GENOTIPICA DEI LIEVITI	80
3.8.1 ESTRAZIONE DNA EUCARIOTI	80
3.8.2 AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE "ITS rDNA" DEI LIEVITI	81
3.8.3 RESTRIZIONE DELL'AMPLIFICATO ITS	81
3.9 ANALISI AMBIENTALI	82
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	86
4.1 CARCOFORO	86
4.1.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE	86
4.1.2 CONDIZIONI AMBIENTALI	91
4.2 CANGELLO	92
4.2.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE	92

4.2.2 CONDIZIONI AMBIENTALI	98
4.3 ALPE MERA	99
4.3.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE	99
4.3.2 CONDIZIONI AMBIENTALI	105
4.4 CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE	107
4.4.1 ENTEROCOCCHI	109
4.4.2 BATTERI LATTICI	115
4.4.3 RIASSUNTO CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE	122
4.5 CLASSIFICAZIONE LIEVITI	126
5. CONCLUSIONE	130
BIBLIOGRAFIA	134
RIASSUNTO	138

1. INTRODUZIONE

1.1 CENNI STORICI SULL'ALLEVAMENTO CAPRINO

L'allevamento caprino ha origini antichissime. Numerosi reperti archeologici, molteplici riferimenti nella letteratura e nella mitologia greca, testimoniano che la capra è l'animale di più antica domesticazione. Le sue virtù sono state conosciute ed apprezzate da Assiri, Babilonesi, Fenici, Egizi fino agli Etruschi e ai Romani.

Nello stesso tempo però l'allevamento della capra in Italia ha sempre mostrato una forte discontinuità in termini numerici e di apprezzamento da parte di allevatori e consumatori.

In epoca romana la capra era tenuta in grande considerazione e i suoi prodotti (carne, latte e pelle) erano molto apprezzati, più che quelli vaccini e ovini. In questo periodo, l'attento sistema di allevamento di questa specie, porta a modificazioni nella morfologia della capra, che assume una taglia maggiore. D'altro canto però nel periodo romano si verifica uno spostamento dell'attenzione dalla capra alla pecora, per il ruolo assunto dalla lana nel sistema economico e produttivo. Con la caduta dell'Impero romano (476 d.C.), si assiste ad una forte diminuzione dell'allevamento caprino e le capre vengono in genere allevate in greggi di pecore. Con le invasioni barbariche questa situazione peggiora ulteriormente, a causa dell'insicurezza negli spostamenti che non consente di praticare la transumanza, il sistema di allevamento allora più diffuso.

Nel basso Medioevo (1000-1492 d.C.) e negli anni successivi, si assiste ad una messa a coltura delle campagne, con aumento dei seminativi, dei pascoli erbacei e delle bonifiche. In questo periodo, la produzione della lana riacquista la sua importanza e la transumanza viene regolamentata e tutelata, con aumento delle terre dedicate al pascolo, a scapito dell'agricoltura. La capra non viene più considerata di utilità sociale e si assiste ad una graduale riduzione dello spazio disponibile per il suo allevamento. Durante l'alto medioevo vennero rafforzati i divieti atti a limitare o proibire il pascolo delle capre su terreni destinati a semina dai grandi feudi.

Nei primi anni del XIX secolo è iniziata quella che viene poi definita "guerra alle capre" e che tornerà con vigore anche durante il ventennio fascista. L'inizio dell'ottocento vede forti cambiamenti a livello sociale ed economico, a vantaggio dello sviluppo della proprietà privata e della nascente industria. L'allevamento caprino subisce in questo periodo una forte contrazione numerica, per favorire l'allevamento più redditizio di bovini e ovini. La capra viene inoltre

ancora una volta accusata di rovinare siepi, campi, giardini e orti, di facilitare le frane, di distruggere i boschi e di trasmettere all'uomo malattie.

Dopo un periodo di espansione dell'allevamento caprino, la guerra alle capre torna durante il ventennio fascista, con l'emissione di due provvedimenti: il primo prevedeva l'esclusione del pascolo da tutte le aree boschive, anche di proprietà dell'allevatore (Regio Decreto Legislativo del 30/12/1923), il secondo introduceva la "tassa sulle capre" (Regio Decreto del 16/01/1927), una tassa onerosa per ogni capo posseduto, con l'effetto di falciare drasticamente il patrimonio caprino italiano.

Durante la guerra e nell'immediato dopoguerra, l'allevamento caprino vede una leggera ripresa, ma all'inizio degli anni '70 (boom economico ed esodo rurale) si ha un nuovo forte crollo di questo tipo di allevamento. Dalla seconda metà circa degli anni '70 si assiste ad una graduale e costante ripresa e aumento del numero di allevamenti e di capre allevate. Grazie alla riscoperta delle potenzialità di questo tipo di allevamento, che può essere condotto sia in modo estensivo in aree montane o caratterizzate da pascoli poveri sia in modo intensivo con razze altamente selezionate [1].

1.2 L'ALLEVAMENTO CAPRINO: PROSPETTIVE E MERCATO

1.2.1 LA SITUAZIONE MONDIALE

L'attuale consistenza del patrimonio caprino mondiale viene calcolata in oltre 738 milioni di capi. Rispetto a dieci anni fa, la quantità di bestiame caprino ha fatto registrare un incremento medio annuo approssimativamente uguale al 2,5%, che diventa di poco superiore al 3% se si riferisce al trentennio 1971/2001. Sotto questo profilo, la capra ha mostrato un comportamento nettamente differente dalle principali specie d'interesse zootecnico. Nel corso degli ultimi trent'anni nessun altro, tra i principali animali d'interesse zootecnico, ha, infatti, rilevato una crescita numerica altrettanto consistente: mentre i caprini sono quasi raddoppiati, i suini sono aumentati del 38%, i bovini solo del 18% e gli ovini sono addirittura diminuiti del 2% [3].

A questa imponente espansione non ha fatto tuttavia riscontro un riposizionamento geografico dell'allevamento. La caprinicoltura continua infatti ad essere praticata prevalentemente nei continenti asiatico ed africano e a risultare assai meno presente in quello europeo e americano.

Negli ultimi vent'anni a seguito dell'ormai inesorabile e drammatica distinzione tra paesi sviluppati e paesi in via di sviluppo (pvs) si può facilmente verificare come la zootecnia caprina rafforzi la sua presenza nel secondo tipo di paesi, tanto da potersi ragionevolmente affermare che essa continua a rimanere una prerogativa pressoché esclusiva del pvs. Inoltre la capra è una specie che si presta più di altre allo sfruttamento delle aree marginali, le quali sono, notoriamente e drammaticamente, assai più abbondanti nei paesi meno sviluppati che non in quelli economicamente più progrediti [3].

Le produzioni caprine utilizzate a fini alimentari sono la carne e il latte. Nel 2001 la produzione mondiale di carne ha quasi raggiunto i 3,8 milioni di tonnellate, mentre quella lattea ha superato i 12 milioni [3]. Rispetto a dieci anni prima l'offerta di carne risulta accresciuta del 38% e quella di latte del 24% [3].

La ripartizione geografica dell'allevamento sopra descritta si riflette evidentemente sulla distribuzione territoriale delle produzioni. Sia per la carne sia per il latte, infatti, i continenti asiatico e africano rappresentano le aree di maggiore concentrazione. Tuttavia è importante sottolineare come nel caso del latte caprino l'Europa occupi una posizione di relativa importanza, risultando in essa concentrato quasi un quinto della produzione mondiale.

Buona parte di tali produzioni sono prevalentemente destinate al consumo locale, in particolare, nel caso della carne il grado di apertura del settore, che è dato dal rapporto tra il totale degli

scambi (importazioni più esportazioni) e il totale della produzione mondiale, è stato nel 2000 pari a solo 1,3%. Nel caso del latte non si dispone di dati ufficiali, ma si ha ragione di ritenere che la consistenza del commercio internazionale sia egualmente bassa, anche a motivo dei maggiori problemi di trasporto e commercializzazione dovuti all'alta deperibilità di questo prodotto [2].

1.2.2 LA SITUAZIONE EUROPEA

In Europa l'allevamento caprino si presenta come una sorta di prerogativa pressoché esclusiva dell'area mediterranea: dei quasi 18 milioni di capi presenti nel vecchio continente al 2001, quasi 13 milioni (70% del totale) sono infatti allevati in nazioni europee che ricadono in quest'area. Nell'Unione Europea le nazioni con il maggior patrimonio caprino risultano essere la Grecia e la Spagna, in cui è complessivamente ubicato poco meno della metà del patrimonio continentale [3].

Sul piano delle produzioni, la leadership dell'UE è più marcata sul fronte della carne che non su quello del latte. In particolare, Grecia, Spagna e Portogallo evidenziano un maggior orientamento verso la caprinicoltura da carne piuttosto che verso quella da latte; il contrario avviene invece per Francia, Spagna, Grecia, Bulgaria e Italia.

In alcuni paesi europei la capra ha già da tempo imboccato la strada dell'imprenditorialità. Nel periodo 2000-2002, Francia, Grecia e Spagna vantano le maggiori produzioni, si collocano ai primi tre posti per produzione di latte caprino, la prima con 530.000 ton, la seconda e la terza a pari merito con 450.000 ton, [3] seguite da Bulgaria e Italia con circa 100.000 ton., [3] (Figura 1). Gli ultimi rilevamenti del 2003 [2] evidenziano che la produzione di latte caprino è aumentata in Italia ed in Francia, mentre ha registrato un netto calo in Portogallo e, in misura minore, in Spagna.

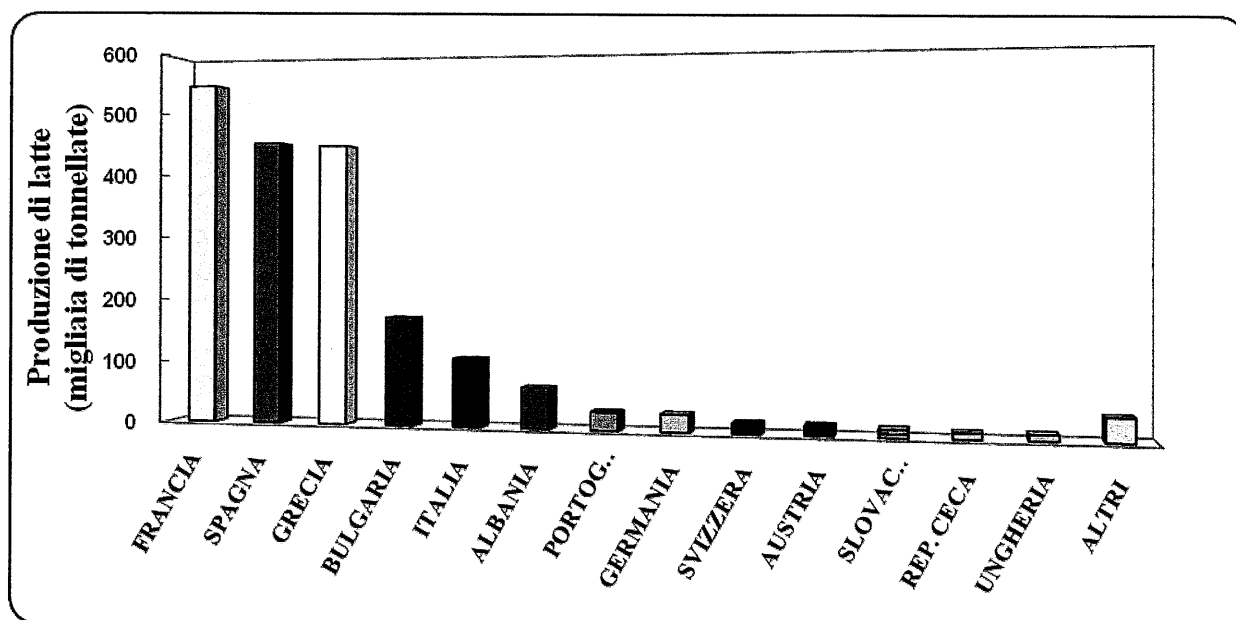


Figura 1: Produzione di latte caprino nei principali Paesi Europei (FAO, 2004)

Sebbene non riportata nelle precedenti considerazioni, merita di essere menzionata tra le principali aree di interesse caprino quella alpina, Svizzera e Austria soprattutto, dove, come noto, questo tipo di allevamento può contare su antichissime tradizioni.

Relativamente agli scambi, l'Europa partecipa piuttosto considerevolmente al, peraltro modesto commercio internazionale dei prodotti caprini: i paesi europei nel 2001 hanno coperto approssimativamente il 12% delle quasi 23 mila tonnellate di export mondiale di prodotti caprini [3].

1.2.3 LA SITUAZIONE ITALIANA

L'Italia, come si è appena osservato, rappresenta uno dei paesi europei dove la specie caprina è maggiormente rappresentata. Con oltre 1 milione e 300 mila capi, il nostro paese occupa infatti il terzo posto dopo Grecia e Spagna nella graduatoria delle nazioni UE in cui è praticato questo tipo di allevamento [3].

Da qualche anno la consistenza del bestiame caprino risulta relativamente stabile. Il dato sopra citato di 1,3 milioni di capi rappresenta il risultato massimo di un processo di espansione che ha raggiunto il suo picco nel corso degli anni ottanta.

In questo decennio, infatti, causa soprattutto le crisi attraversate del settore bovino e ovino, prevalentemente e rispettivamente riconducibili all'introduzione del regime delle quote e alle

difficoltà di collocamento dei formaggi ovini sui mercati internazionali, non pochi allevamenti hanno scelto di riconvertirsi alla capra.

Attualmente, tale spinta espansiva pare esaurita. Non è tuttavia da escludere una sua ripresa di vigore, soprattutto qualora persistessero i disagi prodotti nel comparto bovino a seguito delle vicende della BSE ed in quello ovino dalla verosimile riduzione delle esportazioni casearie come conseguenza del recente e forte apprezzamento dell'euro sul dollaro.

Tradizionalmente, l'allevamento caprino italiano è prevalentemente concentrato nel Mezzogiorno. Oltre l'80% dei capi è infatti allevato nei territori meridionali ed insulari della penisola, con Sardegna, Sicilia e Calabria che da sole ospitano il 58% di tutti i caprini nazionali [3]. Nel tempo, tuttavia, si nota un processo di riallocazione geografica dell'allevamento. Per quanto il predominio del meridione rimanga tutt'ora schiacciante, gli ultimi anni hanno portato il settentrione d'Italia a crescere più intensamente del sud, così che attualmente ben il 13% delle capre si trova allevato nel nord d'Italia, contro un appena 6% agli inizi degli anni settanta [3]. Tale fenomeno non può che essere valutato positivamente in relazione alle prospettive di sviluppo dell'intero comparto. Nel nord del Paese si ritrovano condizioni strutturali e infrastrutturali più idonee ad accrescere l'efficienza dei processi produttivi; un ambiente economico certamente più competitivo ma, allo stesso tempo, assai più stimolante; una tipologia di consumatore più ricco e complessivamente meglio disposto ad acquistare prodotti "particolari" quali indubbiamente sono quelli caprini.

Si è già detto che la zootecnia caprina italiana è prevalentemente orientata verso la produzione del latte e assai meno verso quella della carne. Nel 2006 gli allevamenti italiani hanno prodotto 170 mila quintali di latte, cui vanno aggiunti i 92 mila quintali destinati all'alimentazione dei capretti [3]. La Figura 2 riporta la produzione di latte caprino per singola regione italiana.

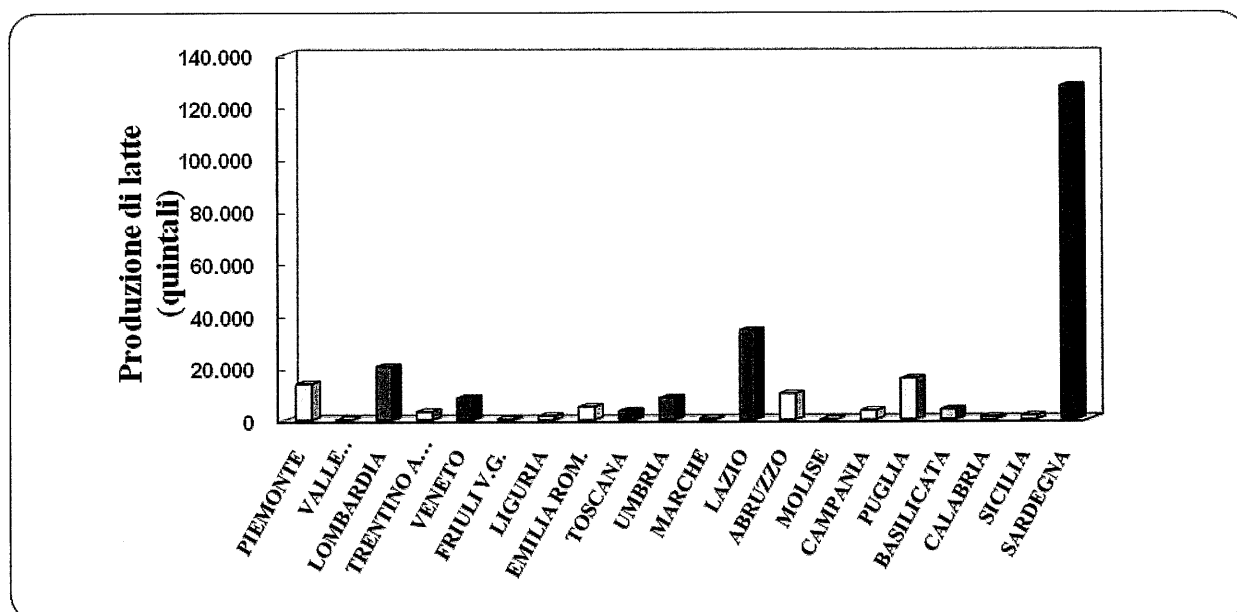


Figura 2: Produzione di latte per regione italiana (ISTAT, 2006)

Si può osservare dalla Figura 2 che il 62% della produzione nazionale di latte caprino è concentrata al sud, il 20% al centro e il 18% al nord d'Italia [3].

Relativamente ai rapporti con l'estero, si ha ragione di ritenere che questi siano assai blandi per quanto attiene il latte e, più in generale, le produzioni lattiero casearie. Si può infatti ipotizzare che l'intercambio di latte sia frenato dalla modestia dei volumi trattabili e dai noti problemi deperibilità, mentre quello dei latticini non assume particolare rilevanza dato il carattere prevalentemente locale che contraddistingue il consumo di questi prodotti in Italia.

1.3 LE AZIENDE AGRICOLE CAPRINE E IL SISTEMA D'ALLEVAMENTO

Secondo l'ultima rilevazione effettuata dall'ISTAT nel 2006 sulla "Struttura e produzione delle aziende agricole italiane", nell'allevamento caprino sarebbero coinvolte circa 60 mila imprese, cioè poco meno del 3% delle unità che compongono il tessuto produttivo dell'agricoltura italiana. Rispetto agli inizi degli anni '90 il numero di aziende con caprini risulta sensibilmente contratto (-35%), mentre quello dei capi allevati manifesta una sensibile crescita (+11%). La concomitanza di questi due eventi si riflette positivamente sull'ampiezza media degli allevamenti nazionali, che passa, da 14 a 23 capi per azienda [3].

Sebbene tale espansione sia da valutare in maniera positiva, costituendo il necessario presupposto alla creazione di unità più efficienti e competitive, non si può tuttavia non constatare, quanto irrisoria risulti essere la consistenza degli allevamenti caprini in Italia. Seppure medio, e in quanto tale celante al suo interno di singoli casi assai diversificati, il dato di cui sopra costituisce un'equivocabile indicazione delle difficoltà strutturali e quindi economiche del comparto caprino.

Come è facile comprendere una così vasta polverizzazione del comparto rende estremamente problematico garantire un impiego dei fattori produttivi che sia pienamente efficiente. Ciò si riflette sulla remunerazione dei fattori medesimi e, quindi, sull'economicità complessiva dell'allevamento. Inoltre va aggiunto che le ridotte dimensioni riducono fortemente la propensione delle imprese ad indurre innovazioni tecnologiche. Queste o sono eccessivamente costose, taluni macchinari o gli stessi animali geneticamente selezionati possono rientrare in questo novero, o sono particolarmente complesse per poter essere accessibili ad imprese troppo piccole.

Alla contenuta ampiezza numerica dei capi allevati corrisponde una dotazione terriera ugualmente limitata. Al 1999 risulta infatti che il 70% circa delle aziende che allevano caprini presenta una superficie agricola utilizzata (SAU) che non supera i 10 ettari [3].

Il quadro strutturale è ulteriormente aggravato dal fatto che nell'allevamento caprino, più che in quello di altre specie, permane tutt'ora assai consistente il ricorso all'uso di terre appartenenti ad istituzioni pubbliche. Sempre con riferimento al 1999, quasi il 9% delle aziende dedite alla zootecnia caprina risulta infatti privo di terreno agrario, contro un dato nazionale riferito alla totalità delle imprese praticanti l'allevamento animale calcolato nell'ordine del 3% circa. Il ricorso all'uso di terre pubbliche, pur consentendo l'esercizio dell'attività zootecnica in aree che non potrebbero essere altrimenti valorizzate ed ad imprese che diversamente non avrebbero motivo di esistere, rafforza l'immagine di una zootecnia caprina tuttora pensata come attività di sussistenza o, al più, complementare ad imprese più importanti. È infatti evidente come in tali condizioni si accentui il problema della precarietà della base terriera che rappresenta uno dei principali caratteri negativi dell'allevamento caprino. Precarietà della base terriera che a sua volta conduce a bassi investimenti fondiari e, quindi, ad altrettanto modesti livelli di produttività della terra.

Questo fenomeno appare particolarmente evidente nel mezzogiorno del Paese, mentre risulta meno accentuato al nord, dove invece prevale un tipo di allevamento più stanziale. Con

l'evidente esclusione del bestiame, il capitale di scorta appare generalmente scarso. In particolare, nel caso delle macchine e delle attrezzature o si ha che fare con imprese poco o niente provviste di un proprio parco mezzi, o si riscontrano casi in cui esso risulta sovradimensionato in alcune componenti, in particolar modo quelle rappresentate dalle macchine motrici, e carente in altre, quali macchine operatrici, mungitrici meccaniche, refrigeratori, ecc. Estremamente limitate si rilevano anche le risorse finanziarie destinate alla copertura delle anticipazioni di esercizio. Ne discende che le imprese caprine italiane risultano generalmente caratterizzate da un basso livello di capitalizzazione. Ciò costituisce un fatto grave di per se stesso, in quanto pregiudica l'efficienza dei processi produttivi e la possibilità, attraverso l'accantonamento dei profitti, di promuovere l'adozione di adeguate innovazioni tecnologiche. La scarsa dotazione di capitali propri, ed in modo particolare di capitali indifferenziati, induce inoltre un uso distorto della leva creditizia. Nelle suddette condizioni il ricorso al finanziamento esterno non viene utilizzato per sostenere un preciso progetto di sviluppo aziendale ma, all'opposto, è quasi integralmente assorbito dalle rilevanti esigenze di gestione.

1.4 CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI DEL LATTE CAPRINO

Il latte di capra si presenta di colore bianco-opaco in quanto in esso vi è assenza di carotenoidi e con sapore leggermente dolciastro [4-5].

La composizione media del latte caprino è mostrata nella Tabella 3 (Fonte INRAN). La sostanza secca nella quale sono rappresentati in ordine decrescente, zuccheri, grassi, proteine, ceneri e altri costituenti minori rappresenta il 10-13%.

ACQUA	86,3 g
PROTEINE	3,9 g
LIPIDI	4,8 g
CARBOIDRATI	4,7 g
ENERGIA	76 kcal 320 kJ
SODIO	40 mg

POTASSIO	180 mg
FERRO	0,1 mg
CALCIO	141 mg
FOSFORO	106 mg
TIAMINA	0,05 mg
NIACINA	0,30 mg
RIBOFLAVINA	0,11 mg
VIT. A ret. eq.	86 mcg
VIT. C	1 mg

Tabella 3: Composizione media del latte caprino per 100 g di prodotto (INRAN).

PROTEINE

Il latte di capra è una fonte importante di proteine di eccellente qualità, le quali contengono tutti gli amminoacidi essenziali in proporzione soddisfacente per un buon utilizzo da parte dell'organismo. Grazie ad un valore biologico molto elevato ed un buon coefficiente di utilizzazione digestiva, le proteine del latte di capra hanno un'ottima efficacia nutrizionale e possono soddisfare una buona parte della richiesta giornaliera in proteine di una persona adulta. Le sostanze proteiche del latte caprino si distinguono in coagulabili (70-80%) e non coagulabili (20-30%). Le proteine coagulabili sono costituite dalle caseine, mentre quelle non coagulabili lattealbumine, lattoglobuline, peptidi e azoto non proteico. Il contenuto delle singole frazioni è influenzato dall'alimentazione, dallo stadio di lattazione, da fattori ambientali e dalla razza. In particolare le proteine del latte caprino presentano una grande diversità individuale legata ad un polimorfismo genetico molto marcato nella caseina, che determina variazioni quali - quantitative notevoli [6]. Indagini elettroforetiche e cromatografiche, della componente proteica del latte di capra è stata individuata la presenza di frazioni diverse nelle caseine e nelle sieroproteine rispetto al latte vaccino. Quattro sono le frazioni caseiniche individuate nel latte caprino: $\alpha S1$, $\alpha S2$, β e K [7]. Di particolare interesse è il rapporto $\alpha S1/\alpha S2$ che è quasi sempre inferiore a 1; più elevato risulta essere il contenuto medio della caseina β e K sempre confrontate con le rispettive frazioni

presenti nel latte vaccino. Il basso contenuto di caseina $\alpha S1$, mentre da una parte consente di ottenere formaggi poco suscettibili di prendere sapore amaro, provoca dall'altra, effetti importanti sui processi di coagulazione [7]. La proporzione delle diverse frazioni caseiniche è all'origine di differenze osservate nel comportamento alla coagulazione di latti individuali. In realtà la caseina del latte di capra non si discosta dal modello strutturale delle micelle di caseina del latte vaccino ma, nonostante ciò, si rilevano comportamenti caseari nettamente differenti. Anche a parità di contenuti in caseina, i coaguli ottenuti dal latte di capra sono meno consistenti; il coagulo si forma più rapidamente, ma i tempi di rassodamento sono superiori. La causa può essere attribuita al fatto che la $\alpha S1$ rallenta la formazione del coagulo, sequestrando ioni di calcio e rendendolo, in tal modo, non disponibile per la formazione del precipitato di paracaseinato di calcio [8-9].

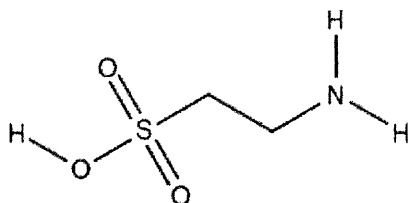
La debole consistenza della cagliata è la causa principale della minor versatilità casearia del latte di capra, delle maggiori difficoltà di trattamento meccanico e di perdita nella lavorazione.

TAURINA

La taurina (Figura 4a) è un prodotto di sintesi degli amminoacidi solforati cisteina e metionina presente nell'organismo animale. Il latte materno ne possiede un tenore alto, pari a 4,2 mg/100 ml. Il latte vaccino ne contiene soltanto 0,24 mg/100 ml. Come si osserva nella Figura 4b, il latte di capra ne contiene ancor più del latte materno, ovvero 4,5 mg/100g [9].

La taurina sembra svolgere una funzione importante quale fattore di crescita e sviluppo del cervello dei neonati, anche se in letteratura esistono controverse valutazioni rispetto a questa molecola, prodotta comunque naturalmente dall'organismo stesso.

Figura 4a: Formula di struttura della taurina.



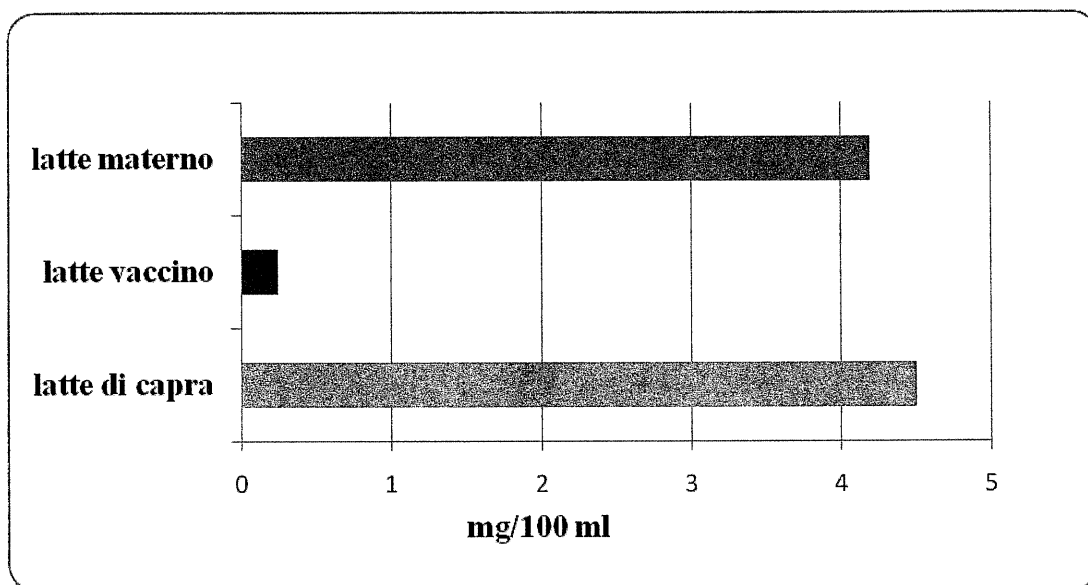


Figura 4b: Livelli di taurina (DFE, 2007).

GLUCIDI

Il componente più rappresentativo è il lattosio. Esso non viene assorbito tal quale dalla mucosa intestinale, ma è idrolizzato dalla lattasi intestinale che lo trasforma in glucosio e galattosio; il suo apporto in galattosio è importante per lo sviluppo del sistema nervoso centrale. Parte del lattosio viene fermentato dalla flora intestinale che lo trasforma in acidi grassi a corta catena, pronti per essere utilizzati come fonte energetica.

Il lattosio ai fini tecnologici della caseificazione non ha importanza in quanto finisce per la quasi totalità nel siero durante i processi di trasformazione [9].

LIPIDI

Il grasso del latte si presenta sottoforma di globuli. Nel latte di capra il diametro medio di questi è inferiore a quelli del latte vaccino e questo determina una maggiore digeribilità per la diminuzione del tempo di permanenza nell'apparato digerente [10].

I lipidi costituiscono la parte più variabile fra i costituenti del latte. La componente lipidica del latte di capra è costituita per il 98-99% da trigliceridi e per la restante parte da acidi grassi non

esterificati. Il diverso apporto dei vari acidi grassi può modificare le qualità tecnologiche e dietetiche del latte. Come mostrato in Figura 5 il latte caprino rispetto a quello vaccino, è caratterizzato da una elevata percentuale di acidi grassi a corta catena (20% vs 14%) e da una minore percentuale di acidi grassi saturi a catena lunga [11] (Figura 6).

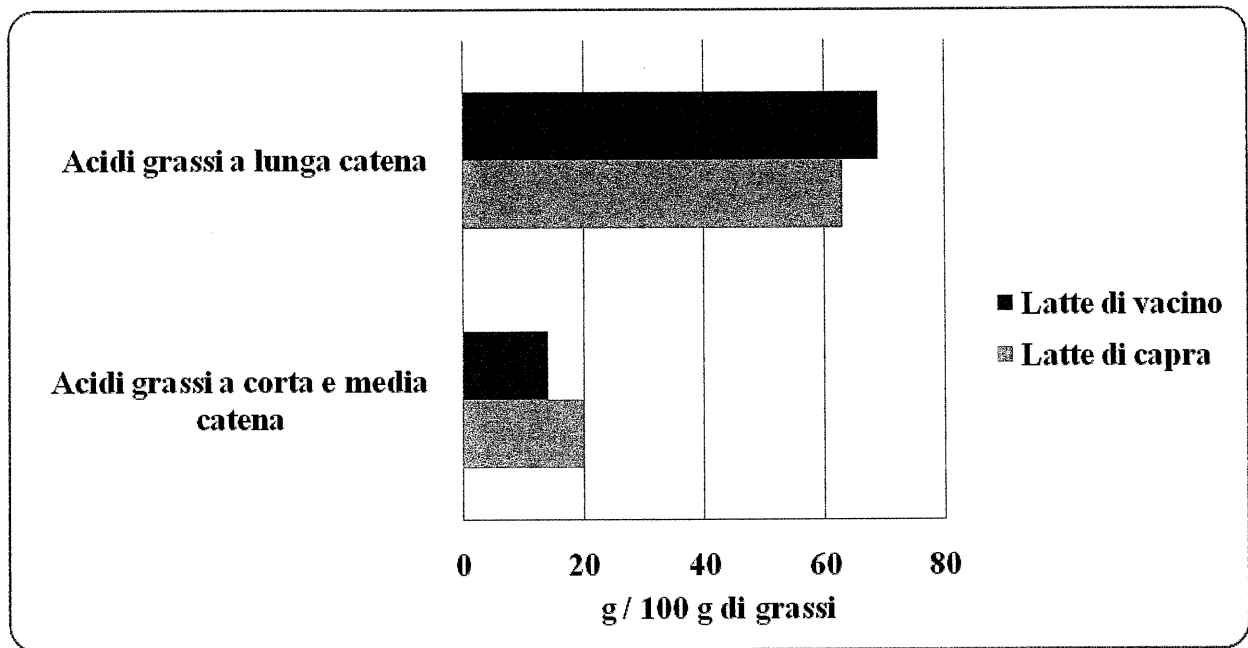


Figura 5: Confronto degli acidi grassi tra latte caprino e vaccino [11].

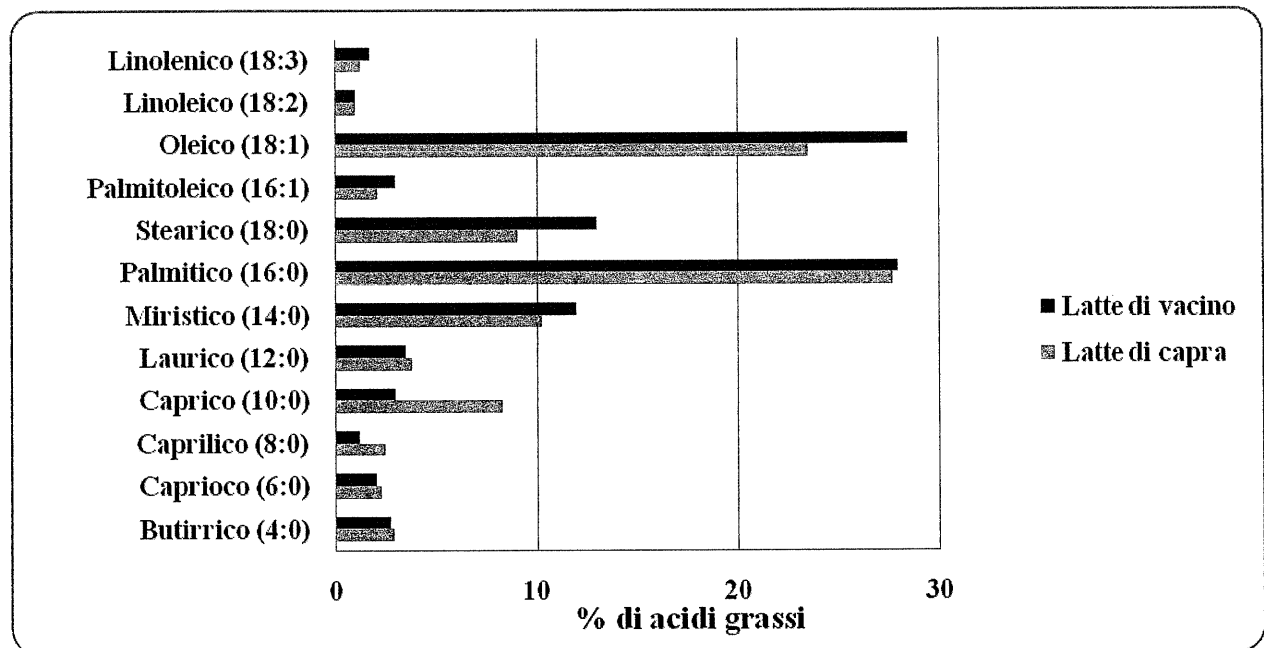


Figura 6: Composizione acidica del grasso del latte [11].

Tra gli acidi grassi, a C:18 (acido stearico) hanno origine dalla componente lipidica degli alimenti ingeriti e sono prelevati direttamente dalla ghiandola mammaria, dalle lipoproteine plasmatiche e dai trigliceridi [12-13].

Gli acidi grassi a C:8 e C:14 (acido caprico e acido miristico) hanno origine da glucidi derivati dalla cellulosa dei foraggi e sono sintetizzati dalla mammella a partire dall'acido acetico e dal β -idrossibutirrico, C:16 (acido palmitico) provenire da entrambi i sistemi [14].

Gli acidi grassi a media e corta catena hanno un maggior coefficiente di assorbimento intestinale di quelli a catena lunga e sono pertanto meglio digeribili. Arrivano direttamente al fegato attraverso la vena porta e non devono essere trasportati sotto forma di lipoproteine.

SALI MINERALI

Il contenuto in minerali del latte di capra è relativamente costante nel corso dell'intero periodo di lattazione. La composizione è simile a quella del latte vaccino per quanto riguarda il calcio e il fosforo, maggiori sono le quantità di cloro, magnesio e zinco, mentre minori risultano le quantità di cobalto e molibdeno. La Figura 7 mostra la percentuale di copertura della dose giornaliera raccomandata di minerali negli individui di età compresa tra i 25 e 50 anni fornita da una porzione di latte di capra (2dl) e di formaggio di capra a pasta semidura (50 g) [15].

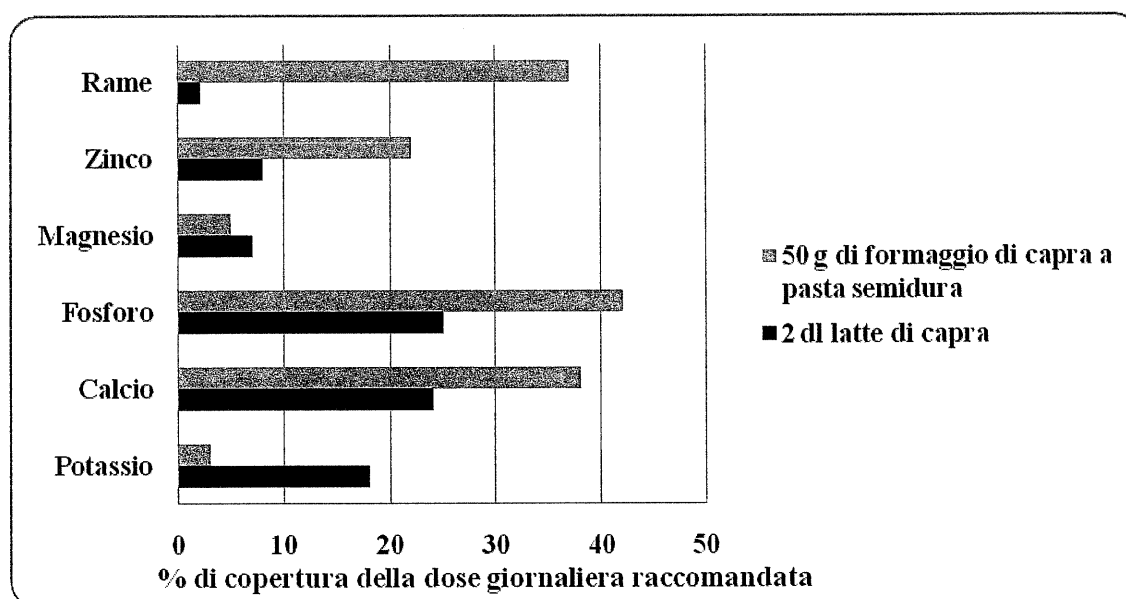


Figura 7: Percentuale di copertura della dose raccomandata di alcuni minerali (DFE, 2007)

Ad esempio, una porzione di formaggio di capra a pasta semidura copre più di un terzo del fabbisogno giornaliero di calcio e fosforo. L'elevato tenore di rame nel formaggio di capra è

dovuto all'impiego di caldaie di rame nel processo di caseificazione. Il formaggio di capra tradizionale ha spesso un tenore di rame più alto poiché la quantità di latte trasformato è inferiore a quella impiegata per la fabbricazione di formaggio a base di latte vaccino e quindi il passaggio di rame nel latte è più significativo (maggior superficie di rame per litro di latte) [16].

VITAMINE

I latte caprino è ricco di vitamina E, nicotinammide e vitamina B₁₂ mentre è povero in vitamina B₆, vitamina A e acido folico [16].

1.5 FATTORI DI VARIAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DEL LATTE CAPRINO

La produzione del latte nella capra è estremamente variabile sia quantitativamente che qualitativamente: prendendo in esame il primo aspetto si nota una grande distribuzione di valori, con oscillazioni che nella giornata vanno da 400 grammi a 5 chili di latte.

I fattori che determinano le variazioni quanti - qualitative della produzione lattea possono essere legati all'animale (fattori endogeni), oppure dovuti all'ambiente (fattori esogeni), ma possono allo stesso tempo, agire congiuntamente [4].

I fattori legati all'animale sono principalmente di natura genetica e possono essere riassunti in due gruppi: razza e individualità.

Per quanto riguarda i fattori che prescindono dall'animale, questi possono essere: zootecnici (ordine di lattazione, stadio di lattazione, stagione di inizio lattazione, modalità di mungitura, tipo e modalità di alimentazione e tecniche di allevamento) o mesologici (influenza del clima e del fotoperiodo, del suolo, dell'ambiente igienico – sanitario) [16].

Le Tabelle 8 e 9 riportano i risultati di uno studio a suffragio delle tesi sopra citate [4] che mette in risalto la variazione delle composizione di micronutrienti nel latte e formaggio di capra a seguito di differenti modalità di allevamento del bestiame: al pascolo ed in stalla entrambi da agricoltura biologica, confrontati con campioni simili per preparazione e/o stagionatura, ma di provenienza commerciale (Tabelle 8 e 9).

	LATTE		FORMAGGIO	
COMPONENTE	PASCOLO	STALLA	PASCOLO	STALLA
Zinco (mg/100g)	0.3±0.0	0.3±0.0	3.7±0.2	3.8±0.1
Selenio (µg/100g)	0.9±0.1 (a)	1.6±0.1 (a)	6.8±0.3 (e)	10.9±0.4 (e)
Retinolo (µg/100g)	69.6±16.2 (b)	55.7±6.1 (b)	326.7±41.7 (f)	256.7±27.2 (f)
Tocoferolo (µg/100g)	161.7±68.2(c)	72.6±9.2 (c)	842.0±36.5 (d)	646.8±72.7 (d)
Colesterolo (mg/100g)	13.3±2.1	12.5±1.1	84.5±4.9	96.7±6.1

Tabella 8: livelli di micronutrienti in latte e formaggio caprino. Differenze statisticamente significative tra lettere uguali, ANOVA $p < 0.05$

COPERTURE DEI FABBISOGNI (%)		ZINCO		SELENIO	VITAMINA A		VIT. E
PRODOTTO		UOMO	DONNA	ADULTO	UOMO	DONNA	ADULTO
<u>LATTE</u>	<i>PASCOLO</i>	8.1±0.9	11.6±1.2	4.1±0.7 a	25.4±6c	29.3±7 e	5±2.2 f
	<i>STALLA</i>	7.8±1.1	11.1±1.5	7.2±0.5 a	20.4±2c	23.8±2 e	2.3±0.3 f
	<i>COMMER.</i>	8	11	6	19	22	4
<u>FORMAGGIO</u>	<i>PASCOLO</i>	18.7±1	26.7±1.7	6.3±0.3 b	27±3.3d	31.3±3	5.3±0.2 g
	<i>STALLA</i>	18.3±1	26.9±0.9	9.9±0.4 b	21±2.0d	24.6±0.3	4.0±0.5 g
	<i>COMMER.</i>	8	11	5	23	27	4

Tabella 9: Copertura percentuale dei fabbisogni di zinco, selenio, vit. A ed E garantita da due porzioni giornaliere (250 g) di latte caprino e da una porzione (50 g) di formaggio caprino. I dati sono riportati come valore medio dall'analisi di 45 campioni di latte e 18 di formaggio ± deviazione standard. Il dato commerciale è il valore medio di tre determinazioni. Differenze statisticamente significative tra lettere uguali. ANOVA, $p < 0.05$.

Dalle tabelle, per esempio, si evince come siamo statisticamente differenti, in funzione della tecnica di allevamento, i livelli di selenio sia nel latte che nel formaggio.

1.6 QUALITA' DEL LATTE ED ATTITUDINE TECNOLOGICA

L'accertamento e la conoscenza della qualità del latte sono due momenti fondamentali e preliminari a qualsiasi altro trattamento del prodotto, in quanto permettono di esprimere una valutazione sul latte stesso e sulla sua attitudine alla trasformazione tecnologica: quest'ultima è tanto più importante se correlata alla destinazione principale del latte di capra che, in Italia come in altri Paesi, è la caseificazione [16-17].

Questo giudizio è d'altronde necessario come punto di partenza per interventi mirati ad un miglioramento delle caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche.

La valutazione qualitativa di un latte si ottiene dall'esame delle caratteristiche chimico-fisiche, della carica batterica e dal tracciato tromboelastografo: quest'ultimo consente di esaminare l'attitudine alla coagulazione e quindi la sua caseabilità, integrando le informazioni a riguardo con quelle chimiche. Le analisi microbiologiche comprendono in primo luogo la determinazione della Carica Batterica Totale e dei coliformi totali e dell'*E. coli*; questi due ultimi indici che forniscono informazione dell'accuratezza igienica delle operazioni, possono a valori troppo elevati pregiudicare la lavorazione casearia, aumentando il rischio di andare incontro a gonfiori, soprattutto precoci, e ostacolando il normale sviluppo della microflora casearia.

Altre analisi utili consistono nel rilevamento della presenza di microorganismi patogeni, quali ad esempio salmonelle e stafilococchi di origine pastifica (*S. aureus*) oppure *Brucella melitensis*, agente eziologico della brucellosi. Questa infezione nell'uomo deriva nella maggior parte dei casi proprio dal consumo di prodotti di origine caprina o ovina, quali il latte o derivati non trattati termicamente; nel formaggio questo batterio può resistere fino a 60 giorni, limite insufficiente in molti casi a garantire una "auto - sterilizzazione" entro il momento del consumo, dato che i formaggi di capra sono in gran parte freschi o a breve stagionatura.

È quindi importante cercare di contenere la contaminazione microbica mediante l'uso di precauzioni igieniche sia negli ambienti di allevamento, sia nel corso della mungitura, sia sul latte appena munto, che deve subire immediatamente una filtrazione per allontanare le particelle di sporcizia più grossolane, facendo subito seguire la refrigerazione per rallentare lo sviluppo microbico.

Un utile parametro per rilevare mastiti sub-cliniche è il numero di cellule somatiche contenute nel latte; cellule che in gran parte provengono dalla desquamazione degli alveoli della mammella

e in parte dai leucociti del sangue: questo valore è mediamente minore all'inizio della lattazione ($3\text{-}6\cdot 10^5$ cell/ml) e più elevato al termine ($6\text{-}8\cdot 10^5$ cell/ml), comunque superiore rispetto al latte bovino [17]. Per essere significativa la conta deve riferirsi ai latti individuali e non di massa, un innalzamento brusco e spesso collegato ad un aumento dei leucociti affluiti alla ghiandola mammaria come risposta da un attacco esterno è indice di una possibile infezione in atto.

Un esame chimico-fisico completo consente per prima cosa di esprimere un giudizio sul valore nutritivo del latte e dal punto di vista della caseificazione la determinazione di parametri più influenti come il tasso lipidico, le frazioni azotate e il contenuto di calcio e fosforo. Il grasso viene trattenuto in buona parte dalle maglie della caseina precipitata e, di conseguenza, ad un buon contenuto nel latte corrisponderà una buona presenza di grasso nel formaggio. È da tener presente oltre al valore nutritivo del grasso anche la sua influenza nella determinazione del profilo aromatico del prodotto finito [5]. È invece il tenore proteico ad influenzare maggiormente sulle rese delle trasformazioni casearie. Tra le proteine spicca il ruolo delle caseine e delle sieroproteine. Le prime utilizzate per la produzione del formaggio dopo caseificazione, le seconde utilizzate per la produzione di ricotta [4].

1.7 FORMAGGI CAPRINI

Il formaggio per la legislazione italiana (RDL n.2033 del 15.10.1925) è il prodotto che si ottiene dalla coagulazione acida e/o presamica del latte intero o parzialmente scremato o totalmente scremato o dalla crema, anche facendo uso di fermenti e sale da cucina, ove per latte senza specificarne la provenienza si intende quello vaccino.

In Italia, secondo dati Assolatte del 2002, la produzione totale di formaggi caprini si attesta sulle 6.500 tonnellate/anno. A questa rilevazione, naturalmente, sfugge la gran parte delle produzioni locali e artigianali, per cui si stima che complessivamente la produzione reale sfiori le 10-20.000 tonnellate/anno di formaggi di capra puro e le 3-5.000 tonnellate di formaggi caprini misti.

In realtà esistono in Italia, come altrove, molti tipi di formaggi distinti secondo numerosi criteri di classificazione. Principalmente si evidenzia la materia prima impiegata (latte di vacca, di pecora, di capra, di bufala o miscele), il contenuto in grasso (magro, leggero, semigrasso, grasso), la consistenza (molli, semiduri, duri), il tipo di coagulazione (lattica, presamica, mista), la temperatura di cottura della cagliata (a pasta cruda, semicotta, cotta) e durata della stagionatura (freschi, semistagionati, stagionati).

Il latte caprino sul territorio italiano è utilizzato per ottenere numerose specialità, ognuna con la sua storia e caratteristica di processo. Il latte di capra si presta sostanzialmente a due tecnologie produttive, distinguibili in “coagulazione lattica”, lenta, dovuta in prevalenza all'azione acidificante dei batteri lattici, e in “coagulazione presamica”, rapida, ove prevale l'azione degli enzimi coagulanti del caglio [16].

1.7.1 FORMGGI CAPRINI A COAGULAZIONE LATTICA

In questa categoria rientrano le più rinomate produzioni caprine: i caprini freschi. Spalmabili, cremosi, a pasta bianca e senza crosta, sono caratterizzati da un sapore dolce e leggermente acidulo, molto apprezzati oggi per il loro gusto delicato, saporito e per la freschezza in bocca.

Generalmente si presentano, sia a livello artigianale che industriale, con pezzatura compresa tra i 30 e 200g, spesso di forma cilindrica e destinati al consumo entro 1 settimana. In qualche caso, meno frequentemente, i caprini freschi sono sottoposti ad una breve stagionatura (20-30 giorni) dopo essere stati insemenzati, per aspersione, con una soluzione salina contenente spore di muffe tipiche (*Penicillium spp.*) in grado di formare un feltro superficiale colorato e caratterizzare sensorialmente il prodotto.

La resa di questi formaggi è buona (14-18% per i freschi e poco meno per quelli stagionati) grazie alla loro elevata umidità [4].

La tabella 10 riporta le percentuali dei principali costituenti, mentre la figura 11 evidenzia lo schema di produzione.

	Caprino fresco	Caprino breve stagionatura
Acqua	51-65%	41-50%
Grasso	15-18%	19-28%
Proteine	16-19%	22-25%
Ceneri	35%	57%

Tabella 10: Composizione media del caprino prodotto con coagulazione lattica

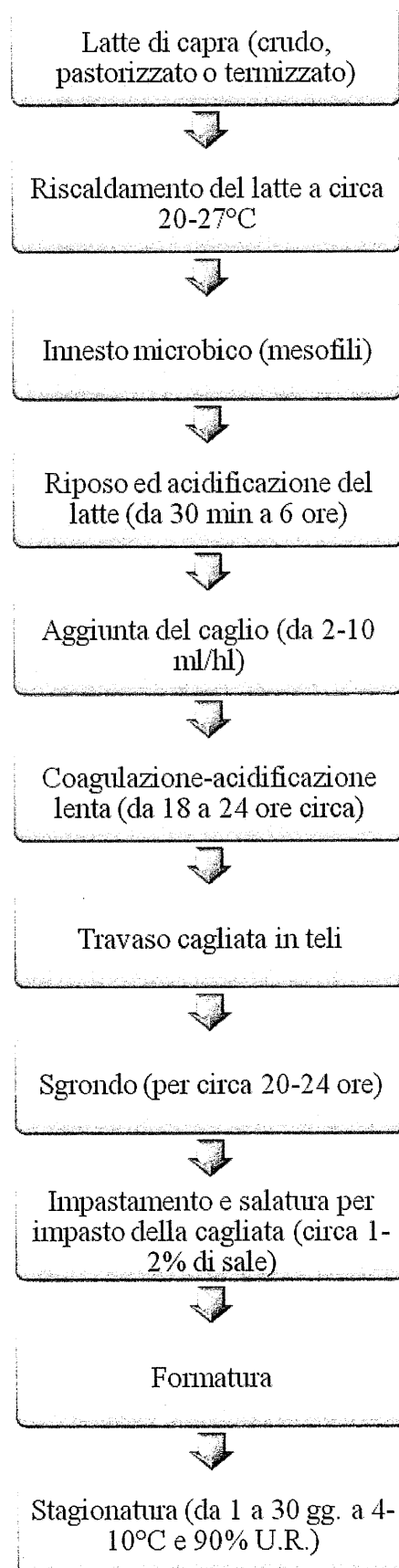


Tabella 11: Schema di produzione generale del formaggio caprino a coagulazione lattica

Il latte crudo può essere trattato o meno a diverse temperature a seconda della qualità microbiologica e la dimensione dell'ambito produttivo.

Mentre i formaggi artigianali, prodotti in aziende agricole di piccole dimensioni, affidavano e affidano tuttora l'acidificazione del latte alla fermentazione spontanea operata dalla popolazione microbica autoctona del latte crudo, nei moderni processi industriali ciò è ottenuto da latte trattato termicamente successivamente inoculato con colture specifiche di batteri lattici. Nel caso il latte presenti bassa carica microbica, si attuano trattamenti di termizzazione bassa a 62-65°C per pochi secondi, soprattutto per quelle cagliate destinate a spurgare negli stampi; mentre si preferisce ricorrere alla termizzazione alta (66-68°C per alcuni secondi) o pastorizzazione per i coaguli spurganti in tele. In alcuni casi, un'aliquota di latte è trattato ad una temperatura superiore agli 80°C così da recuperare per denaturazione le proteine solubili ed aumentare la resa complessiva.

L'operazione successiva è l'innesto microbico, attuato per iniziare l'acidificazione del latte. Esso può consistere in starter selezionati prodotti da industrie specializzate oppure sieroinnesto naturale ottenuto a partire dal siero spurgato nella lavorazione precedente. L'inoculo, solitamente corrispondente all'1-2% del volume totale, principalmente è rappresentato da cocchi lattici mesofili omofermentanti quali *L. lactis*, *L. cremoris* e *L. diacetylactis*. L'acidificazione richiede da 30' a 6 ore ed è seguita dall'aggiunta di caglio in piccole dosi, difficilmente oltre i 10ml/hl. Dopo un tempo di presa variabile tra i 10 e i 20 minuti, si ha la coagulazione lenta che si protrae anche per 24 ore ad una temperatura pari a 22-25°C [16].

Al termine della coagulazione il pH ottimale sarà vicino al punto isoelettrico della caseina (pH=4,6): questo valore di acidità determina il passaggio del calcio dallo stato colloidale alla forma solubile con conseguente demineralizzazione della caseina. Il coagulo che si forma è tipicamente friabile e in grado di trattenere poco siero. Valori di pH differenti possono compromettere la produzione: se superiori a 4,8 la pasta tende ad essere morbida ed appiccicosa, lo spurgo avviene male e il formaggio mal si conserverà. Se invece il pH è troppo basso (<4,3) il sapore diviene troppo acido ed il coagulo asciutto e fragile.

La fase successiva consiste nel delicato trasferimento della cagliata in un telo per lo spurgo o, nel caso delle produzioni artigianali, spesso già direttamente negli stampi. Durante lo spurgo, che lentamente avanza per 20-24 ore a temperatura ambiente, si eseguono tre o quattro rivoltamenti. Si prosegue con l'aggiunta del sale in ragione del 1-2%: nel caso sia già nello stampo la salatura avviene a secco sulle facce del formaggio, mentre se si trova nel fagotto la cagliata viene estratta,

impastata col sale rendendo il tutto più omogeneo possibile. Infine si procede alla formatura, di solito manuale, ed all'asciugatura finale. Lo scopo principale dell'asciugatura, realizzata su griglie o stuoie a 15°C per 1-4 giorni, è quello di diminuire l'umidità superficiale per favorire la crescita di microrganismi interessanti a scapito di muffe indesiderate. I caprini freschi sono così pronti per il consumo. Per mantenere più a lungo il prodotto è possibile aggiungere al momento della salatura del sorbato di potassio (1%) oppure recentemente si utilizza come soluzione il confezionamento in atmosfera controllata.

La produzione dei caprini freschi stagionati, invece, richiede qualche passaggio ulteriore. Come già accennato, i formaggi vengono insemenzati nella fase di salatura oppure spruzzati superficialmente con spore di *Penicillium* (ad esempio *P. camamberti* o *P. caseiculum*) per dare al prodotto finito una tipica crosta fiorita di colore bianco.

Esistono anche, soprattutto in Lombardia, alcune produzioni più complesse e articolate che presentano un gusto intenso, piccante e una crosta rosa-rossa, dovuta alla presenza in superficie di specie della famiglia delle Micrococcaceae e *Brevibacterium* spp. .

Per favorire la comparsa di muffe e la stagionatura i formaggi vengono posti in celle ben areate, su griglie metalliche, a 10-14°C e con una umidità relativa superiore all'85% per un periodo compreso tra i 10-30 giorni.

1.7.2 FORMAGGI CAPRINI A COAGULAZIONE PRESAMICA

Sono caprini ottenuti con coagulazione spiccatamente presamica, quindi con dosi superiori di caglio che, solo in Italia, presentano un numero grandissimo di varietà. Di solito si tratta di formaggelle di medio - piccole dimensioni, a forma cilindrica con facce piatte e scalzo più o meno bombato, difficilmente con un peso superiore al chilogrammo. Essi sono più asciutti dei caprini freschi, hanno un gusto maggiormente pronunciato e crosta evidente, soprattutto se stagionati a lungo. Le rese, come è facile immaginarsi, sono nettamente inferiori dei caprini freschi.

La Tabella 12 ne riporta la composizione centesimale.

	Caprino presamico stagionato
Acqua	35-45%
Grasso	24-32%

Proteine	20-26%
Ceneri	3-4%

Tabella 12: Composizione media del caprino presamico stagionato.

All'interno di questa categoria, possiamo distinguere due preparazioni: a pasta cruda e a pasta semicotta. Ogni produttore, soprattutto a livello artigianale, segue differenti criteri produttivi: in particolare non sempre viene effettuato un innesto microbico, ma si lascia che sia la flora autoctona del latte e la popolazione microbica presente nell'ambiente ad influenzare e caratterizzare il prodotto. Le due tipologie presentano molte affinità produttive, rappresentate nella figura 13.

Nel caso dei formaggi a pasta cruda il latte, crudo o trattato termicamente, viene portato a 30-32°C circa. In questo frangente, se il casaro lo ritiene opportuno, vengono aggiunti in ragione dell'1-2% i fermenti mesofili omo ed etero fermentanti (principalmente *L. lactis*, *L. cremoris* e *L. lactis subsp. diacetylactis*) eventualmente miscelati con termofili come *S. thermophilus*. In seguito ad inoculo, il latte viene lasciato maturare per circa mezz'ora sino ad acidità finale pari a circa 8-9°SH/100, quindi si procede all'aggiunta del caglio (1:10000), solitamente 25ml/100hl.

Il tempo di presa è circa 20' e dopo circa 45' si attua il primo taglio, si lascia riposare qualche minuto e si procede con il secondo taglio sino a dimensioni di una nocciola. Dopo una blanda agitazione della cagliata si lascia riposare per 5' circa.

Dalla cagliata viene poi estratto metà del siero e la restante miscela siero-cagliata è travasata negli stampi. A questo punto gli stampi sono sottoposti a stufatura a 22-24°C per circa 15-20 ore e rivoltati varie volte per facilitare lo spurgo. Al termine della stufatura, si estrae la cagliata dallo stampo e si procede alla salatura: a secco cospargendo il sale sulle facce e sullo scalzo fino a che il formaggio ha cessato lo spurgo, oppure per immersione in salamoia a 18°Bè, 12-15°C per circa 1-2 ore. Infine le forme vengono poste, tipicamente su assi di legno, in locali dedicati alla stagionatura che presentano una temperatura pari a 8-12°C e umidità relativa di circa 85%. I formaggi vi alloggiano per un periodo variabile tra i 15-45 giorni e sono spesso rivoltati e puliti.

Per quanto riguarda i caprini presamici a pasta semicotta la procedura è molto simile, salvo che la seconda rottura della cagliata è seguita dalla cottura a 42-45°C. In seguito alla stufatura il formaggio è raffreddato a 4°C per fargli acquistare consistenza e sottoposto a salatura, quasi sempre in salamoia. La stagionatura si protrae anche fino a 4 mesi. Alcuni esempi di questi formaggi sono lo Stael e il Caprino Pugliese.

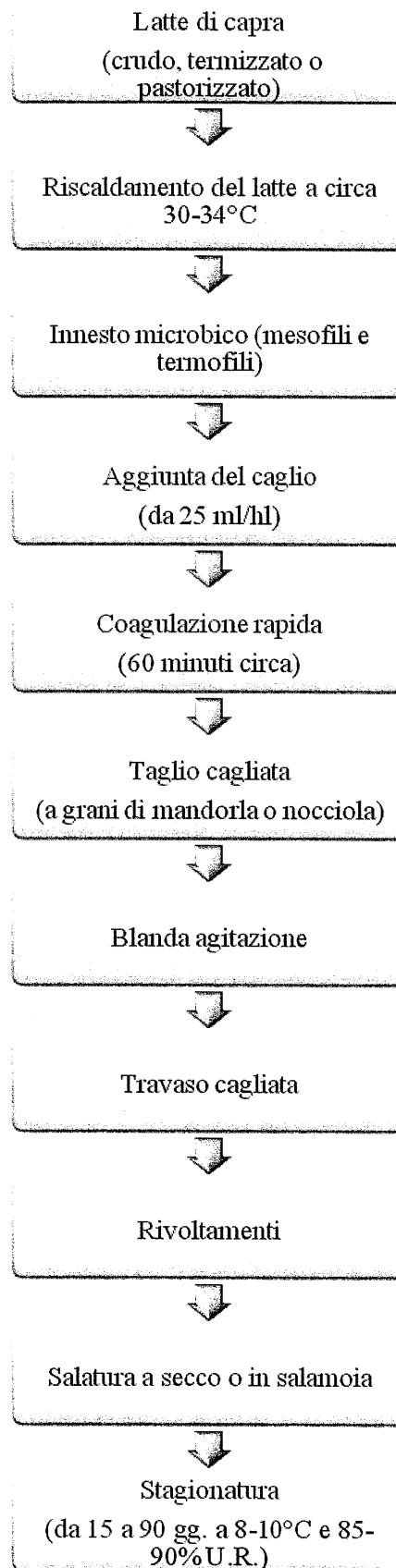


Figura 13: Processo di produzione del formaggio a coagulazione presamica.

1.8 PROBLEMATICHE MICROBIOLOGICHE NELLA FILIERA DEL LATTE CAPRINO

Le ripetute crisi nel settore della sicurezza alimentare hanno ridotto il livello di fiducia da parte del consumatore. L'opinione pubblica non dispone di una sufficiente conoscenza della produzione zootecnica e del settore agro-alimentare ed è spesso disorientata dall'informazione ricevuta tramite i mass-media, che non sempre forniscono gli elementi per comprendere l'estensione e la rilevanza dei problemi inerenti la sicurezza [16]. Il clima d'incertezza in diverse circostanze ha influenzato negativamente il mercato, con ripercussioni sui volumi di vendita e sui prezzi non sempre proporzionate al rischio e alla portata dei problemi.

Le difficoltà incontrate dalle Autorità governative nella gestione del rischio e delle emergenze alimentari nonché le carenze emerse nelle garanzie sull'igiene e sulla sicurezza nelle filiere di produzione, hanno reso necessaria la revisione della legislazione alimentare dell'Unione Europea. Attualmente la legislazione alimentare comunitaria con il recente "Pacchetto Igiene" definisce principi, obblighi e requisiti da rispettare per assicurare un elevato livello di protezione del consumatore e la catena alimentare è considerata come un unico processo, a partire dalla produzione primaria inclusa (Regolamento CE 178/2002).

L'assetto legislativo alimentare della UE, in considerazione della portata della revisione in atto, non ha assunto ancora carattere definitivo. A livello nazionale le innovazioni introdotte determinano un periodo transitorio in cui sarà necessario procedere alla revisione ed all'adeguamento dell'impianto legislativo. Il Ministero della Salute è chiamato nel mentre ad accelerare la definizione delle misure d'attuazione, per assicurare i necessari indirizzi agli operatori del settore nell'affrontare le maggiori responsabilità loro attribuite.

1.8.1 I MICRORGANISMI PATOGENI E LA FILIERA DEL LATTE

a) i dati della sorveglianza epidemiologica

Il comparto del latte e dei prodotti a base di latte, particolarmente attento alle tematiche della qualità e della gestione igienico-sanitaria, è stato investito in misura più contenuta dalle crisi inerenti la sicurezza alimentare. Le tecnologie e le misure adottate hanno progressivamente ridotto il rischio di contaminazione da parte dei microrganismi patogeni ed hanno consentito di

ottenere significativi successi nel ridurre l'incidenza dei casi di malattia associati al consumo di latte e prodotti derivati [16].

I microrganismi e le loro tossine ancora oggi hanno notevole incidenza quali agenti di malattie di origine alimentare. I risultati dei programmi di sorveglianza condotti nelle aree economicamente sviluppate evidenziano che il numero dei casi di tossinfezione è elevato [16] e notevolmente superiore risulta la frequenza dei casi stimati per anno [26].

Al consumo di latte e prodotti a base di latte è attribuito lo 0,5-5% dei casi di tossinfezione alimentare [27-28] mentre hanno maggiore importanza epidemiologica altri alimentari, quali le carni, le uova ed i prodotti di pasticceria (EFSA, 2005). Per le diverse specie dei microrganismi patogeni il livello di rischio risulta differente in relazione al prodotto considerato ed alle abitudini alimentari. Ad esempio al consumo di latte crudo è attribuito un elevato numero dei casi di tossinfezione da *Campylobacter*, *Salmonella* ed *E. coli* O157, in seguito alla contaminazione fecale nella fase della mungitura [27].

Al consumo di formaggi molli, in particolare a crosta lavata o erborinati, è associato un livello più elevato di rischio di Listeriosi [28].

I dati della sorveglianza epidemiologica sui casi di malattia di origine alimentare nell'uomo sono consistenti con i risultati dei piani di controllo e di sorveglianza sull'incidenza dei patogeni negli alimenti. Delle segnalazioni pervenute al sistema di allerta UE nel corso del 2004 (EC, 2005), comprensive dei rischi chimici, fisici e biologici, un terzo aveva per oggetto i prodotti di origine animale ed il 5,5% delle informazioni e notifiche riguardanti questa categoria riguardava i prodotti lattiero - caseari.

Nel corso degli ultimi due anni l'UE ha condotto un'estesa valutazione della sicurezza microbiologica dei formaggi (Raccomandazione CE 2004/24; Raccomandazione CE 2005/175). Sono state svolte indagini per la ricerca di *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* ed *E. coli* in formaggi ottenuti da latte pastorizzato e, insieme a *Campylobacter* termofilo, nei formaggi prodotti con latte crudo o termizzato. L'indagine è stata condotta in Italia (2004) su 1943 campioni appartenenti a differenti tipologie di formaggi al latte crudo e termizzato, prelevati alla produzione ed alla vendita. Tra i patogeni maggiori è stata rilevata la presenza di *Salmonella* in un campione (0,05%). Rispetto ai criteri microbiologici definiti, sono risultati non conformi per *S. aureus* ($m=10^3$ ufc/g, $M=10^4$ ufc/g) 39 campioni (2,0%) e per *E. coli* ($m=10^4$ ufc/g, $M=10^5$ ufc/g) 23 campioni (1,2%). In nessun campione è stata rilevata la presenza di *L. monocytogenes* e di *Campylobacter* [29]. I risultati ottenuti in altri paesi UE nell'ambito del

medesimo programma indicano una situazione abbastanza confrontabile per i patogeni maggiori [30]. In Francia la percentuale dei campioni non conformi è risultata invece elevata per Stafilococchi coagulasi positivi (11% nei formaggi freschi e 20% nei formaggi stagionati) ed *E. coli* (7% nei formaggi freschi e 3,5% nei formaggi stagionati).

b) i pericoli microbiologici e i prodotti lattiero-caseari

I batteri patogeni che possono determinare malattia alimentare in seguito al consumo di formaggi sono numerosi. I principali sono rappresentati da *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp (*S. enteritidis*, *S. dublin* e *S. typhimurium*) ed *E. coli* patogeno [30].

E' difficile definire in modo organico la reale incidenza delle tossinfezioni dovute ai formaggi di pecora e di capra, anche perché i risultati dei programmi di sorveglianza sono riportati in genere in forma aggregata. I dati disponibili (Tabella 14), che offrono indicazioni sulle specie patogene isolate con maggiore frequenza in episodi di tossinfezione, derivano prevalentemente da segnalazioni e rassegne bibliografiche [31-32].

I problemi di sicurezza dei prodotti ottenuti dal latte dei piccoli ruminanti mostrano alcune specificità legate alle condizioni sanitarie degli allevamenti, alle condizioni igieniche della raccolta, alla strutture o alle tecnologie utilizzate per la trasformazione.

Nella produzione primaria le tecnologie di allevamento e di alimentazione degli animali, il loro stato sanitario e le modalità di raccolta e di conservazione del latte influenzano in misura determinante le specie ed il livello di contaminazione microbica. Nelle fasi successive questi fattori condizionano l'efficacia degli ostacoli introdotti nel corso della trasformazione.

L'incidenza dei casi di Brucellosi umana è infatti maggiore nelle aree dove la patologia è endemica negli allevamenti [32]. Nelle aziende caprine che utilizzano gli insilati, il rischio dell'insorgenza di Listeriosi negli animali è elevato ed è più probabile la contaminazione del latte [33]. Le tecniche di mungitura, non sembrano avere incidenza sulla prevalenza delle mastiti [34], mentre esercitano una selezione delle specie microbiche agenti di mastite subclinica. Nel corso di indagini condotte tra alcune razze caprine [34], è stato osservato che negli allevamenti dove viene praticata la mungitura meccanica, rispetto a quelli in cui la mungitura è manuale, l'isolamento di *S. aureus* risulta più frequente (5,2% vs 2,1% dei patogeni isolati). La prevalenza degli Stafilococchi coagulasi negativi, i principali agenti di mastite subclinica nella capra da latte [35-36], al contrario diminuisce (71,6% vs 91,5%).

L'efficienza degli "ostacoli" in grado di controllare la contaminazione microbica del prodotto e le possibili *ricontaminazioni* nelle successive fasi del processo, dallo stoccaggio del latte in

azienda alla trasformazione e stagionatura dei formaggi, hanno importanza determinante per la sicurezza.

Nelle tecnologie casearie gli “ostacoli” sono diversamente applicati con risultati estremamente variabili sulle caratteristiche dell’ecologia microbica dei prodotti. Un ruolo fondamentale esercitano al riguardo i trattamenti con il calore, la rapidità ed il valore finale di acidificazione della cagliata, gli starter microbici, la cottura e la stufatura della cagliata, le modalità di salagione, il livello e la rapidità di riduzione dell’umidità nel formaggio, la competizione microbica e le modificazioni che i microrganismi inducono sulle caratteristiche del prodotto, la durata e la temperatura della maturazione e stagionatura [36]. Un’appropriata combinazione di ostacoli atti a controllare la microflora sembra poter garantire la sicurezza dei prodotti lattiero-caseari, rispetto al ricorso esclusivo ai trattamenti microbicidi, che hanno più volte dimostrato di non essere una garanzia assoluta per la prevenzione delle malattie alimentari [37].

Prodotto	Anno	Casi n.	Batterio	Nazione	Bibliografia
L. crudo capra	1985	2	<i>S. aureus</i>	Scozia	Sharp, 1989
F. molle capra	1988	1	<i>L. monoc.</i>	Inghilterra	Azadian, 1989
F. di capra	1990	277	<i>S. paratyphi B</i>	Francia	Grimont, 1991
F. di capra	1993	273	<i>S. paratyphi B</i>	Francia	Desenclos, 1996
L. crudo capra	1994	22	<i>E. coli O157</i>	Scozia	Ammon, 1997
F. di capra	2002	11	<i>Brucellosi</i>	Spagna	Méndez, 2003
L. crudo capra	2005	27	<i>Febbre Q</i>	Estonia	Kerbo, 2005

Tabella 14: Episodi di malattia di origine alimentare associati al consumo di latte (L.) e di formaggi (F.) di pecora.

La problematica della ricontaminazione è emersa a livello nazionale abbastanza recentemente, in seguito al ritiro dal mercato di formaggi erborinati o a crosta lavata da cui era stata isolata *L. monocytogenes* (*L.m.*). La contaminazione del prodotto avviene nelle fasi successive alla caseificazione, nel corso della stagionatura o di operazioni ad essa connesse.

Una esperienza sull’individuazione delle fonti di contaminazione nei caseifici caprini industriali è stata condotta in Sardegna [38]. In tali caseifici i formaggi prodotti sono prevalentemente a pasta dura o semidura (Pecorino Romano, Pecorino Sardo) e presentano caratteristiche di

ecologia microbica sfavorevoli per *L.m.*, come confermato anche mediante challenge test [37]. Altri prodotti come le ricotte, fresche o stagionate, costituiscono invece dei substrati estremamente favorevoli per lo sviluppo di questo patogeno.

L'indagine è stata condotta in 19 caseifici dove sono stati prelevati 408 campioni di: a) matrici alimentari: latte crudo, salamoia, formaggio molle, superficie dei formaggi duri, ricotta stagionata (superficie e pasta) e ricotta fresca; b) superfici a contatto con l'alimento: tavoli, utensili, scaffali, mani o guanti degli operatori; c) superfici non a contatto: pareti e pavimenti. I prelievi dalle superfici sono stati effettuati nei locali di caseificazione, lavorazione ricotta, salagione, maturazione e nelle celle refrigerate. *Listeria monocytogenes* è stata rilevata in 5 dei 19 stabilimenti e *Listeria spp* in 8. *Listeria monocytogenes* è stata isolata sporadicamente nel latte (1 campione), dalla superficie di formaggi duri (2), dalla superficie (2) e nella pasta (2) della ricotta stagionata. *Listeria spp* (*L. welshimeri*, *L. innocua* e *L. gray*) è stata isolata dalla salamoia (1), dalla superficie (2) e dalla pasta (1) della ricotta stagionata, dai tavoli (4), dai ripiani degli scaffali di maturazione (2), dalle pareti (2) e dai pavimenti (4).

1.8.2 LA LEGISLAZIONE ALIMENTARE DELL'UE ED IL CONTROLLO DEI PERICOLI MICROBIOLOGICI

I regolamenti del “pacchetto igiene” definiscono gli strumenti che gli operatori del settore alimentare devono utilizzare per assicurare un elevato livello di protezione per il consumatore. E' prevista l'applicazione di misure che possono assicurare il controllo dei pericoli microbiologici in tutte le fasi della filiera. La legislazione alimentare attribuisce, infatti, in modo più chiaro le responsabilità all'operatore del settore alimentare ed estende le misure di controllo alla produzione primaria. Definisce e ribadisce il sistema HACCP quale metodologia di riferimento per la gestione della sicurezza negli stabilimenti di trasformazione e ne prevede la sua applicazione secondo criteri di flessibilità e di proporzionalità del rischio. Infine riconsidera i criteri microbiologici da adottare.

a) le norme sull'igiene e la produzione primaria

Il legislatore introduce opportune differenziazioni negli obblighi previsti per gli operatori del settore alimentare, considerando le differenti condizioni in cui si svolgono le attività della produzione primaria rispetto a quelle della trasformazione. Le norme generali in materia d'igiene stabiliscono che nella produzione primaria (Regolamento CE 853/04, allegato I) devono essere adottate misure atte ad assicurare il controllo delle contaminazioni e dei rischi. Deve inoltre

conservare delle registrazioni, allo scopo di dare evidenza dell'avvenuta attuazione delle misure di controllo e di rendere disponibili le informazioni necessarie per la rintracciabilità e per supportare gli interventi di ritiro dei prodotti non conformi.

Mentre è unanime l'esigenza di assicurare un approccio strutturato dell'autocontrollo nella produzione primaria, le opinioni sulle metodologie da seguire per realizzarlo sembrano discordanti [36]. Il legislatore comunitario, così come la Commissione del Codex Alimentarius (2004), hanno considerato che l'applicazione integrale dell'HACCP nella produzione primaria comporta concrete difficoltà. La Commissione Europea si riserva infatti di valutare la fattibilità della sua estensione alla produzione primaria. Ritiene comunque opportuno che gli Stati membri incoraggino gli operatori della produzione primaria ad applicare tali principi, per quanto possibile.

Alcuni modelli si fondano esclusivamente sulle procedure di corretta prassi igienica, in altri casi oltre a queste è prevista l'applicazione di buone pratiche di allevamento e dell'HACCP, anche se con limitazioni o esclusioni (AAFC, 2003). L'applicazione dell'HACCP in azienda su base cogente piuttosto che nell'ambito di programmi volontari può rivelarsi talvolta controproducente o può incontrare forme di resistenza [34]. La resistenza è motivata dai costi della consulenza esterna, dalle difficoltà e dal tempo necessario per sviluppare le procedure documentate e svolgere le attività di monitoraggio, registrazione e verifica [35]. Nella filiera del latte alimentare bovino sono ormai diffuse le esperienze dove il management delle principali attività aziendali ha un approccio integrato e strutturato, spesso associato all'utilizzazione di risorse informatiche di rilevazione dei dati e per la gestione delle attività. Alcune aziende del settore primario hanno familiarità con l'assicurazione qualità ed hanno ottenuto la certificazione del sistema di gestione per la qualità o altre certificazioni in ambito volontario (certificazioni di prodotto, rintracciabilità di filiera o aziendale).

Nel settore dei piccoli ruminanti la graduale applicazione della legislazione può costituire uno stimolo positivo per una migliore gestione aziendale o per creare valore aggiunto per le produzioni ed in tale prospettiva si pone, infatti, la tracciabilità. Alcune misure di controllo fanno inoltre riferimento a procedure già previste da altre normative (ad es. le registrazioni inerenti il farmaco veterinario), inserite nell'autocontrollo (registrazione di determinazioni analitiche del latte) o supportate da programmi pubblici (piani di eradicazione). La gestione della sicurezza alimentare è così inserita in un contesto di buone pratiche di allevamento che, comprensive della sicurezza degli operatori, del benessere animale e della gestione ambientale, consentirebbero di delineare una prospettiva di management aziendale evoluto (Tabella 15). Sono state proposte e

definite linee guida per l'applicazione di buone pratiche igieniche per il settore ovino e caprino, ma le esperienze di una loro concreta attuazione sono limitate ad alcune realtà particolari, quali ad esempio le aziende dove viene praticato l'allevamento secondo il metodo biologico.

Buone pratiche di allevamento e Buone pratiche igieniche per la produzione primaria	
Identificazione degli animali	Gestione igienica della mungitura
Movimentazione degli animali	Stoccaggio, manipolazione e trasporto prodotti
Igiene degli animali	gestione del farmaco veterinario
Piano sanitario	Formazione del personale
Prevenzione delle zoonosi	Gestione dei rifiuti
Gestione degli alimenti zootecnici	Detergenti, disinfettanti e prodotti chimici
Gestione igienica dell'acqua	Registrazione delle analisi
Pulizia degli impianti	Gestione della documentazione
Pulizia e disinfezione ricoveri	Lotta agli insetti nocivi e altri infestanti

Tabella 15: Buone pratiche per la produzione primaria

b) le norme sull'igiene del latte alla produzione

Le norme di igiene specifiche del settore animale (Regolamento CE 853/2004) non apportano sostanziali innovazioni nella produzione primaria relativamente ai requisiti sanitari degli allevamenti, dei locali e attrezzature, mungitura, raccolta e trasporto. I criteri per il latte crudo alla produzione considerano esclusivamente parametri rilevanti per l'igiene e per la sanità della mammella, mentre i parametri di valutazione della qualità del latte saranno compresi in una normativa specifica. Per il latte di pecora e di capra il tenore in germi rappresenta l'unico criterio microbiologico di riferimento con valori di 1.500.000 ufc/ml per il latte destinato a prodotti a base di latte pastorizzato e 500.000 ufc/ml per il latte destinato alla produzione di formaggi al latte crudo e termizzato.

Gli Stati membri, con l'autorizzazione dell'Autorità competente, possono mantenere o stabilire misure nazionali per quanto riguarda il tenore di germi ed il contenuto in cellule somatiche per la fabbricazione di formaggi con periodo di maturazione di almeno 60 giorni e degli altri prodotti lattiero - caseari che, come la ricotta ed il burro derivano dal processo di fabbricazione di tali formaggi, purché ciò non pregiudichi il conseguimento degli obiettivi del regolamento. Anche la Commissione, assistita dal comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali può autorizzare per la fabbricazione di alcuni prodotti lattiero - caseari l'impiego di latte crudo non conforme ai requisiti previsti per il tenore di germi e di cellule somatiche. Gli Stati membri possono inoltre adottare specifiche disposizioni atte a vietare o limitare l'immissione sul mercato del latte o della crema crudi per il consumo umano diretto, cui è senz'altro associato un rischio microbiologico elevato.

c) i criteri di flessibilità e proporzionalità

I principi della flessibilità nell'applicazione delle misure di controllo igienico hanno notevole interesse per le produzioni tradizionali, frequenti nel settore dei piccoli ruminanti. Per i prodotti tradizionali (art.7 del Regolamento CE, 2074/2005) si intendono quelli storicamente riconosciuti o fabbricati secondo riferimenti tecnici codificati e metodi di produzione tradizionali, oppure protetti come prodotti alimentari tradizionali dalla legislazione comunitaria, nazionale, regionale o locale.

Deroghe nazionali individuali o generali, sono applicabili per: a) consentire l'utilizzazione ininterrotta di metodi tradizionali in una qualsiasi delle fasi della produzione, trasformazione o distribuzione degli alimenti; b) tenere conto delle esigenze delle imprese alimentari situate in regioni soggette a particolari vincoli geografici; c) in altri casi, limitatamente a requisiti strutturali, layout o attrezzature.

Le misure nazionali devono essere notificate entro dodici mesi dalla concessione alla Commissione e agli altri Stati Membri che possono proporre rilievi in merito. Le deroghe nazionali hanno per oggetto i requisiti dei locali di stagionatura (allegato II, capitolo II, del Regolamento CE n. 852/2004) ed è inoltre specificato come le operazioni di pulizia e disinfezione dei locali e la loro frequenza possano essere adattate per tener conto della specifica flora ambientale. E' possibile derogare ai requisiti previsti per gli strumenti e le attrezzature utilizzate (allegato II, capitolo II, punto 1, lettera f), e capitolo V, punto 1, del Regolamento CE n. 852/2004), che devono essere comunque mantenuti in condizioni igieniche soddisfacenti e regolarmente puliti e disinfettati. L'applicazione dei principi d'igiene e delle di misure di

controllo è comunque proporzionata al rischio e alle dimensioni delle produzioni. Nel caso di commercializzazione e vendita diretta dei formaggi al consumatore finale, in azienda o sul mercato locale, le Linee guida di attuazione dei Regolamenti (EC, 2005a,b) chiariscono che è sufficiente la registrazione dell'attività. Non è infatti necessario il riconoscimento che è invece previsto dal Regolamento CE 853/2004 per le attività di trasformazione. Per tali attività è previsto il rispetto delle norme generali d'igiene (Regolamento CE 852/2004) e dei criteri stabiliti per il latte crudo (Regolamento CE 853/2004).

d) la legislazione ed i criteri microbiologici

Le linee guida alla base della nuova legislazione comunitaria sono rappresentate da metodologie, condivise a livello internazionale, basate sui principi dell'analisi del rischio (IFT, 2004; Stringer, 2005). Le autorità governative sono chiamate a definire il livello di protezione appropriato (ALOP) per il consumatore e gli obiettivi di sicurezza alimentare (FSO), quali riferimenti rispettivamente per la collettività e per l'operatore del settore alimentare. L'obiettivo di sicurezza alimentare è rappresentato dalla massima prevalenza o dalla concentrazione del pericolo microbiologico nel prodotto al momento del consumo, compatibile con il livello di protezione previsto (CAC, 2005).

Un FSO può essere ad esempio la concentrazione di *L. monocytogenes* <100 ufc/g o la concentrazione di enterotossina stafilococcica <1 ng /100 g di formaggio nel momento in cui viene consumato (FIL-IDF, 2004). Per raggiungere tale scopo il prodotto all'uscita dello stabilimento o i prodotti intermedi in ciascuna delle fasi dovranno risultare conformi ad obiettivi di performance (PO) quali ad esempio l'assenza di *L. monocytogenes* in 25 ml di latte dopo la pastorizzazione o l'assenza di *L. monocytogenes* in 25 g di formaggio all'uscita dello stabilimento. In particolare nel definire l'OP all'uscita dallo stabilimento l'operatore del settore alimentare dovrà considerare l'eventuale incremento del numero dei microrganismi nelle condizioni di distribuzione e d'uso previsti. Per ciascuna fase dovranno essere definiti criteri di performance (PC) tali da raggiungere l'OP prefissato (ad es. una riduzione pari a 6 log ufc/g della concentrazione di *L. monocytogenes* nel latte in seguito alla pastorizzazione).

Il Regolamento CE n. 2073/2005 sui criteri microbiologici è stato sviluppato considerando tali metodologie (EC, 2005 d). Le misure di controllo adottate nelle diverse fasi della filiera sono integrate con ulteriori norme di attuazione e con verifiche basate sui criteri microbiologici.

L'operatore del settore alimentare ha la responsabilità di definire come realizzare la sicurezza del processo e utilizza le analisi microbiologiche allo scopo di trarre indicazioni sull'accettabilità di

un prodotto alimentare e dei relativi processi di lavorazione, manipolazione e distribuzione (EC, 2005d).

I criteri microbiologici costituiscono parte integrante delle procedure HACCP e delle altre misure di controllo dell'igiene e sono applicati per la loro validazione e verifica. E' nel contesto di tali procedure che l'operatore definisce il piano dei campionamenti definendone la frequenza – salvo dove diversamente specificato - adattandola alla natura e dimensioni dell'impresa, fatti salvi gli obiettivi inerenti la sicurezza dei prodotti (EC, 2005c).

Il Regolamento CE n. 2073/2005 apporta alcune innovazioni tra le quali l'estensione a tutti i settori alimentari dell'analisi del trend per i risultati dei controlli microbiologici, in precedenza applicata al settore della macellazione. E' previsto inoltre per gli stabilimenti dove vengono prodotti alimenti pronti al consumo capaci di supportare lo sviluppo di *L. monocytogenes* il prelievo e l'analisi di campioni dalle aree di lavorazione e dalle attrezzature. Gli alimenti che appartengono a questa categoria, che comprende anche alcuni prodotti caseari (ricotta fresca o stagionata, formaggi freschi, molli, etc.), prima dell'utilizzazione non sono sottoposti a cottura o altro trattamento in grado di eliminare o ridurre a un livello accettabile il numero dei microrganismi presenti. L'esigenza di effettuare la verifica delle contaminazioni ambientali da *L. monocytogenes* era già emersa a livello nazionale ed era stata emanata al riguardo una circolare relativa alle misure di controllo dei prodotti a base di latte (Ministero della Salute, 2005).

Una ulteriore innovazione riguarda la responsabilità e le modalità di determinazione della shelf-life dei prodotti. Nella definizione della data di scadenza o del termine minimo di conservazione si deve tenere conto del fatto che i criteri siano rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità, in particolare nel caso di alimenti pronti nei quali *Listeria monocytogenes* si può sviluppare. La determinazione della conservabilità, se necessario, deve essere supportata dallo studio delle caratteristiche microbiologiche del prodotto, basato sulla determinazione di parametri fisico-chimici (pH, Aw, etc.), delle concentrazioni dei conservanti, dell'influenza delle modalità di confezionamento. Altre risorse possono essere rappresentate dalla consultazione della letteratura scientifica disponibile e dei dati di ricerca sulle caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza dei microrganismi, dal ricorso a modelli matematici predittivi di sviluppo o di sopravvivenza, challenge e storage test. L'attenzione verso la determinazione della shelf-life è giustificata dal rischio di sviluppo dei patogeni psicotrofi (*L. monocytogenes*, *B. cereus*) in alimenti refrigerati di pronto consumo, ma tiene conto della prospettiva di definire in futuro dei criteri microbiologici applicabili al momento del consumo, riferiti cioè al FSO (EC, 2005 d) .

In generale, il criterio microbiologico definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o della quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita (Regolamento CE n. 2073/2005). I risultati delle analisi hanno l'obiettivo di dimostrare all'autorità competente che i prodotti possono risultare conformi ai criteri microbiologici di sicurezza per tutta la durata della vita commerciale prevista per il prodotto e nelle condizioni di conservazione "ragionevolmente attese".

Il "criterio di sicurezza alimentare", definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari ed è applicabile ai prodotti immessi sul mercato (Tabella 16).

Il "criterio di igiene del processo", definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione ed il valore indicativo di contaminazione al di sopra del quale è necessario adottare misure correttive. Per tale scopo non si applica ai prodotti immessi sul mercato (Tabella 17).

Il superamento dei limiti definiti per i criteri di sicurezza alimentare comporta l'adozione delle misure correttive definite nelle procedure HACCP, l'individuazione delle cause di non conformità e la revisione del piano di autocontrollo.

Nel caso di superamento di criteri di sicurezza gli alimenti devono essere ritirati o richiamati. Se i prodotti non conformi ai requisiti sono stati immessi sul mercato, secondo quanto previsto dal Regolamento 178/2002 (art. 19), l'operatore del settore alimentare deve informare l'autorità competente. Se immessi sul mercato, ma non già in vendita al dettaglio, tali prodotti possono essere sottoposti ad ulteriore trasformazione mediante un trattamento di risanamento da effettuarsi comunque non presso la rivendita al dettaglio. E' inoltre ammessa una diversa utilizzazione del prodotto rispetto allo scopo iniziale, da autorizzarsi da parte dell'Autorità competente.

Quando i risultati delle analisi relative ai criteri di igiene del processo sono insoddisfacenti le misure correttive che è possibile adottare vengono indicate nel Regolamento (CE n. 2073/2005, Allegato I, capitolo 2).

Al controllo ufficiale svolto dall'autorità e dalle istituzioni competenti è attribuito il compito di verificare la conformità alla normativa in materia di "prodotti alimentari, comprese le norme sulla salute degli animali e sul benessere degli animali" (Regolamento CE 854/2004, Regolamento CE n. 882/2004).

Microrganismo o tossine	Categoria	Piano di campionamento		Limiti	Metodo d'analisi di riferimento	Fase a cui si applica il criterio
<i>Listeria monocytogenes</i>	a) Alimenti pronti: per lattanti o per fini medici speciali	n=10	c=0	Non rilevabili in 25g	EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
	b) Alimenti pronti: che supportano ¹ la crescita, diversi da quelli indicati in a)	n=5	c=0	100 ufc/g ²	EN/ISO 11290-2	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		n=5	c=0	Non rilevabili in 25g ²	EN/ISO 11290-1	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
	c) Alimenti pronti: che non supportano la crescita, diversi da quelli indicati in a)	n=5	c=0	100 ufc/g ²	EN/ISO 11290-2	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
<i>Salmonella</i>	Formaggi, burro e panna da latte crudo o da latte sottoposto a trattamento termico < pastorizzazione	n=5	c=0	Non rilevabile in 25g	EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
	Latte in polvere e siero di latte in polvere	n=5	c=0	Non rilevabile in 25g	EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
Enterotossine stafilococciche	Formaggi, latte in polvere e siero di latte in polvere, come indicati nei criteri relativi agli stafilococchi coagulasi-positivi (vedi criteri di igiene)	n=5	c=0	Non rilevabili in 25g	Metodo europeo di screening	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

¹: non supportano la crescita di *L.monocytogenes* i prodotti con una delle seguenti caratteristiche: pH ≤ 4,4, aw ≤ 0,92, pH ≤ 5,0 e aw ≤ 0,94, conservabilità inferiore a 5 giorni. Anche altri tipi di prodotti possono appartenere a questa categoria, purché vi sia una giustificazione scientifica.

²: applicabile se il produttore è in grado di dimostrare che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità.

Tabella 16: Criteri di sicurezza alimentare applicabili ai prodotti a base di latte (Reg. CE 2073/2005).

Microorganismo	Categoria	Piano di campionamento/ limiti		Metodo d'analisi di riferimento	Fase a cui si applica il criterio	Azione/i in caso di risultati insoddisfacenti
<i>Enterobacteriaceae</i>	Latte pastorizzato e altri prodotti lattiero-caseari liquidi pastorizzati	n=5	c=2	ISO 21528-1	Fine del processo di lavorazione	Controllo efficacia trattamento termico, prevenzione della ricontaminazione, verifica qualità materie prime
		m=< 1 ufc/ml M= 5 ufc/ml				
<i>E. coli</i> ⁽¹⁾	Formaggi a base di latte o siero di latte sottoposto a trattamento termico	n=5	c=2	ISO 16649-1 o 2	Fase del processo di lavorazione in cui si prevede che il numero di <i>E. coli</i> sia il più alto ⁽²⁾	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e della scelta delle materie prime
		m=100 ufc/g M=1000 ufc/g				
<i>Stafilococchi coagulasi +</i>	Formaggi a base di latte crudo	n=5	c=2	EN/ISO 6888-2		
		m=10 ⁴ ufc/g M=10 ⁵ ufc/g			Fase del processo di lavorazione in cui si prevede che il numero degli stafilococchi sia il più alto	Miglioramento delle condizioni igieniche di produzione e della scelta materie prime. Per valori >10 ⁵ ufc/g, sulla partita di formaggio ricerca delle enterotossine stafilococciche
	Formaggi a base di latte sottoposto a trattamento a t.<pastorizzazione ⁽³⁾ Formaggi stagionati a base di latte o siero di latte sottoposto a pastorizzazione o a trattamento termico a t. superiore ⁽³⁾	n=5	c=2	EN/ISO 6888-1 o 6888-2		
		m=10 ² ufc/g M=10 ³ ufc/g				
	Formaggi a pasta molle freschi a base di latte o siero di latte sottoposto a pastorizzazione o a trattamento termico a t. superiore ⁽³⁾	n=5	c=2	EN/ISO 6579	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche di produzione. Per valori >10 ⁵ ufc/g, sulla partita di formaggio si ricercano le enterotossine stafilococciche
		m=10 ufc/g M=10 ² ufc/g				

⁽¹⁾ *E. coli* è qui utilizzato come indicatore del livello d'igiene.

⁽²⁾ Per i formaggi che non costituiscono substrato favorevole alla crescita il conteggio di *E. coli* è abitualmente massimo all'inizio del periodo di maturazione, mentre per i formaggi che costituiscono substrato favorevole alla crescita di *E. coli*, ciò si verifica abitualmente alla fine del periodo di maturazione.

⁽³⁾ Esclusi i formaggi per i quali il fabbricante può dimostrare, con soddisfazione delle autorità competenti, che il prodotto non presenta un rischio per quanto concerne l'enterotossina stafilococcica.

Tabella 17: Criteri di igiene del processo applicabili ad alcuni prodotti a base di latte (Reg. CE 2073/2005).

1.8.3 MICRORGANISMI ALTERATIVI DEI FORMAGGI

I microrganismi anticaseari o agenti di trasformazioni dannose non rispondenti alla tipicità del formaggio, si sviluppano solo in casi particolari e soprattutto in conseguenza di errate pratiche tecnologiche e possono essere causa di gravi difetti. Tra di essi possiamo considerare: i coliformi e i lieviti quando raggiungono rapidamente i valori superiori a 10^6 ufc/g(gonfiore precoce); i batteri propionici e clostridi butirrici che sviluppandosi in numero elevato ($<10^4$) in formaggi diversi dall'Emmenthal e similari possono essere una concausa di gonfiore tardivo, essi infatti utilizzano il lattosio presente trasformandolo rispettivamente in acido propionico e butirrico, anidride carbonica e idrogeno. Non è facile prevenire questo difetto: oltre ad una accurata selezione del latte di partenza, a una sua eventuale possibile pastorizzazione, all'uso di siero innesti naturali o fermenti selezionati buoni acidificanti, a un controllo accurato e costante della concentrazione delle salamoie e della temperatura delle celle di stagionatura, è possibile l'aggiunta di lisozima al latte in caldaia.

Per quanto riguarda i difetti di superficie o di crosta i più comuni sono: colorazioni anomale, dovute allo sviluppo non richiesto di batteri o muffe colorati; marciume, alterazione di tipo putrefattivo causato da sviluppo abnorme di microrganismi fortemente proteolitici e a elevata umidità dei locali di stagionatura.

1.8.4 MICRORGANISMI UTILI

Gli agenti di fermentazione utili o microrganismi caseari e rispondenti alla tipicità del formaggio sono presenti naturalmente nella materia prima o aggiunti durante il processo (starter). Sono rappresentati non solo da batteri lattici ma anche da altri gruppi microbici come gli enterococchi.

Esplicano tre tipi di azione: attività acidificante, avviene a carico del lattosio con produzione di acido lattico e in caso di fermentazione etero lattica anche di acido acetico e anidride carbonica; attività proteolitica, alla quale partecipano le eso ed endoproteasi di vari gruppi microbici (batteri lattici, Micrococcaceae...); attività lipolitica, consistente nella liberazione di acidi grassi e ascrivibile alle lipasi di lieviti, muffe e Micrococcaceae.

Nel complesso i microrganismi caseari aiutano il caglio nel complicato processo di maturazione che consiste nella trasformazione parziale della caseina da composto insolubile e insipido a solubile e sapido. Si svolge attraverso un complesso di reazioni biochimiche rappresentate, oltre che dalla fermentazione lattica, da altre fermentazioni collaterali (acido mista, 2,3 butilenglicolica, propionica, alcolica), da lipolisi che porta all'ottenimenti di acidi grassi liberi,

chetoacidi, e metil alchil chetoni; da proteasi da cui si originano peptoni, peptidi a lunghezza diversa e alla fine amminoacidi. La tecnologia di produzione, inoltre, è in grado di selezionare e delineare lo sviluppo microbico nel formaggio: per esempio l'eventuale cottura della cagliata e sua sosta sotto il siero è in grado di effettuare una selezione termica della microflora, determinare lo sviluppo della microflora dell'innesto e acidificazione ed avere l'inibizione parziale o totale delle attività enzimatiche secondarie associate al caglio.

1.9 LA MICROBIOLOGIA MOLECOLARE NEL CONTROLLO DELLA QUALITA' E SICUREZZA ALIMENTARE

Nel controllo della qualità e della sicurezza di un alimento la microbiologia riveste un ruolo sicuramente primario. Per questo motivo negli ultimi decenni si è affiancato alla microbiologia classica quella molecolare con particolare riferimento alla reazione a catena della polimerasi (PCR). Essa delineata nella sua forma nel 1971, diventa reale nel 1985 con la pubblicazione del primo esperimento di amplificazione del DNA. Da allora la PCR ha avuto un impatto via via crescente, inizialmente nell'ambito ristretto della biologia molecolare, approdando infine ad altre discipline scientifiche tra le quali la scienza alimentare. Questa tecnica era fino a qualche anno fa prerogativa dei laboratori di ricerca più avanzati, oggi invece si sta sempre di più affermando come tecnica di routine.

Una delle applicazioni più interessanti della PCR è la possibilità di ottenere dei “molecular fingerprinting”, una impronta digitale molecolare di un organismo, che permette di distinguerlo da “individui” strettamente correlati dal punto di vista genetico. Ecco quindi che anche la microbiologia ha fatto propria la tecnica del fingerprinting molecolare applicandola ai batteri. Questo può essere utile per differenti scopi:

- per identificare a livello di genere e specie e/o tipizzare un microrganismo ignoto;
- per evidenziare la presenza e l'eventuale quantità di un batterio in un determinato ambiente naturale (monitoraggio), dove “naturale” debba intendersi nella sua accezione più generale (ambienti acquatici, suolo, aria, alimenti, ecc.);
- per studiare una popolazione microbica naturale, allo scopo di verificarne il grado di polimorfismo genetico, oppure per isolare e/o identificare batteri con delle particolari capacità metaboliche, o ancora per verificare le eventuali fluttuazioni di struttura e composizione nel tempo di una matrice, in conseguenza delle variazioni delle condizioni

ambientali, in modo da poter correlare la maggior o minor quantità di uno o più microrganismi ad un determinato parametro ambientale.

L'importanza delle suddette problematiche è del tutto ovvia se si pensa al ruolo che i microrganismi svolgono in una miriade di processi naturali e/o biotecnologici ed al loro contributo nelle patologie umane, animali e vegetali e come gli alimenti siano spesso i protagonisti in entrambe le considerazioni [26].

2. SCOPO DELLA TESI

Tra le diverse produzioni alimentari “tradizionali”, un posto di rilievo hanno i prodotti caseari. Questi prodotti si caratterizzano solitamente per l’assenza di un processo standardizzato che non prevede l’impiego di fermenti lattici commerciali, gli “starter”, essendo la trasformazione e maturazione assicurate dalla popolazione lattica naturalmente presente nel latte. Se da un lato in questo modo vengono assicurati i caratteri sensoriali tipici di ciascun prodotto, l’assenza di standardizzazione nel processo produttivo e la peculiarità di ogni singola realtà, limita la possibilità di espansione e modernizzazione di un prodotto e di un processo considerati oggi di “nicchia”. Nelle produzioni casearie artigianali si necessita la selezione di ceppi che possiedano adeguate proprietà tecnologiche, mantenendo inalterate le caratteristiche sensoriali del prodotto finito e garantendo nel contempo la sicurezza igienico- sanitaria dei prodotti.

Quanto detto se è valido per i prodotti caseari di origine vaccina assume ancora maggiore importanza per quelli caprini. Si tratta di prodotti che dimenticati per lungo tempo proprio per le loro peculiari caratteristiche sensoriali, ma anche nutrizionali sono stati di recente rivalutati e stanno assumendo sempre maggiore importanza nella dieta.

Alla luce di queste valutazioni lo scopo del lavoro intrapreso è stato da un lato quello di valutare la qualità microbiologica di formaggi ottenuti da latte crudo caprino provenienti da tre differenti caseifici siti in Valsesia nella provincia di Vercelli e successivamente quello di caratterizzare, a livello di specie, la microflora lattica autoctona coinvolta nella maturazione, in particolare analizzando la diversità della comunità microbica e la dinamica di sviluppo durante il processo di trasformazione del latte in formaggio.

Accanto quindi a tecniche di indagine microbiologica tradizionale (conte in piastra, terreni selettivi e differenziali, visione al microscopio, ecc.) si è utilizzata la microbiologia molecolare (PCR, sequenziamento 16S rDNA, ecc.) al fine di ottenere una caratterizzazione univoca e poter approfondire, in un secondo momento, aspetti legati alla qualità sensoriale e tecnologica del formaggio caprino.

3. MATERIALI E METODI

Sono stati oggetto di studio le produzioni di latte caprino di tre realtà artigianali siti in Valsesia.

3.1 LA VALSESIA

La Valsesia è una valle alpina situata in Piemonte, nella parte settentrionale della provincia di Vercelli, percorsa dal fiume Sesia da cui prende il nome. Estesa per circa 760 km² dal Monte Rosa sino alle pianure vercellesi, presenta un'altitudine variabile tra i 250 e i 4554 m s.l.m. ed è composta da una valle principale, la Val Grande, e due valli minori Val Semenza e Val Piccola. I comuni maggiori sono Varallo e Borgosesia.

Le attività economiche più sviluppate, oltre al turismo sia invernale che estivo, sono rappresentate dall'industria metalmeccanica e dal tessile. Le caratteristiche geografiche del territorio e la presenza di numerose aree disponibili al pascolo ha da sempre reso l'allevamento una attività importante e significativa per il territorio: la produzione di formaggi ne è uno dei cardini. Molto nota è la Toma della Valsesia, prodotta con latte vaccino intero crudo; ma altrettanto interessanti sono le produzioni ottenute con latte di capra puro o in miscela con il vaccino.

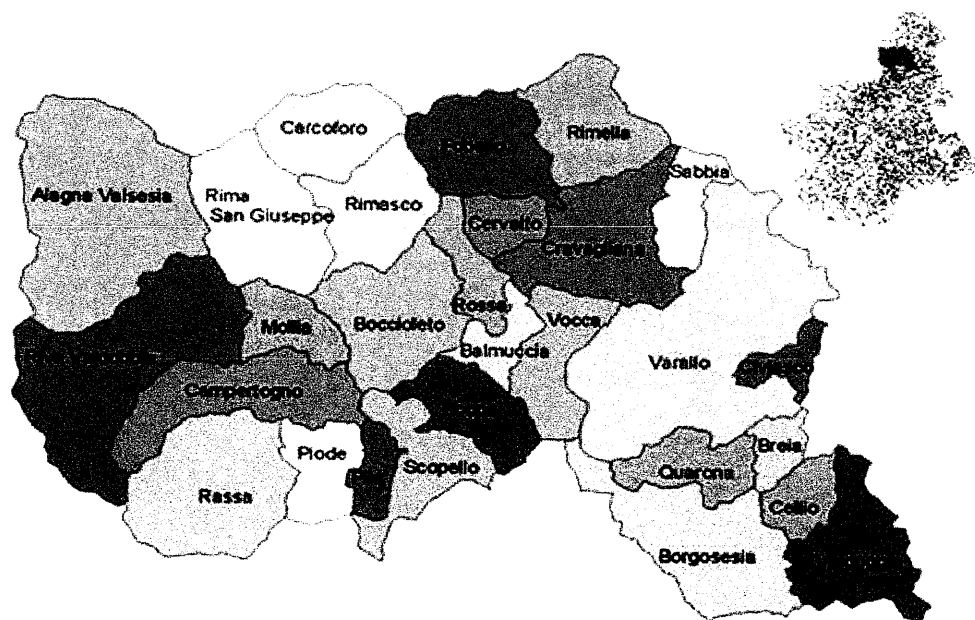


Figura 18: Posizione geografica della Valsesia.

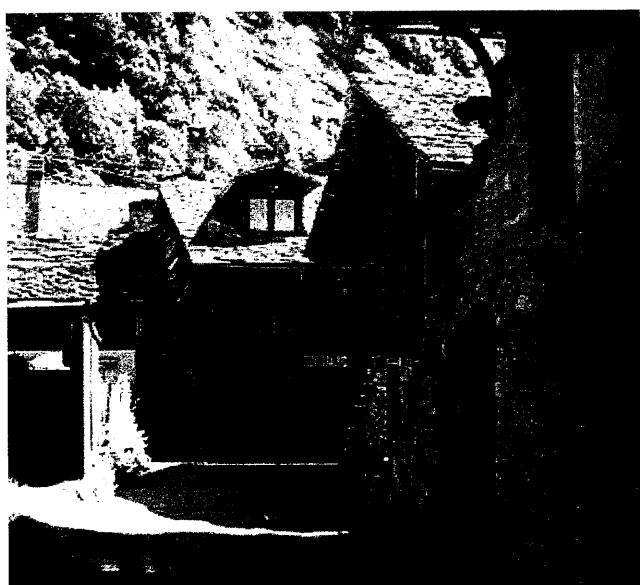
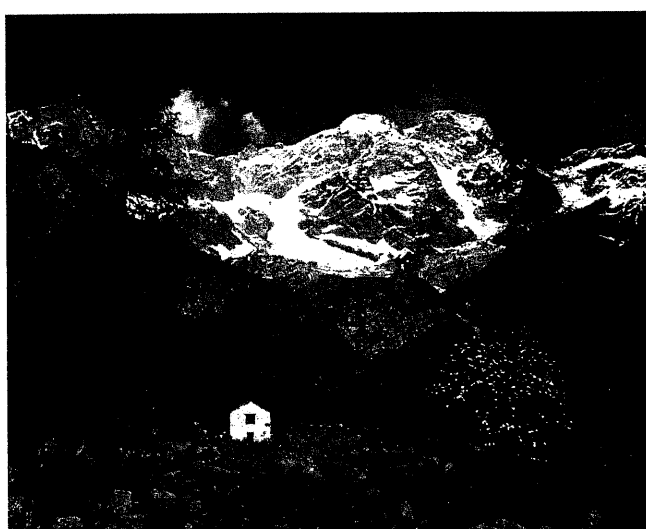
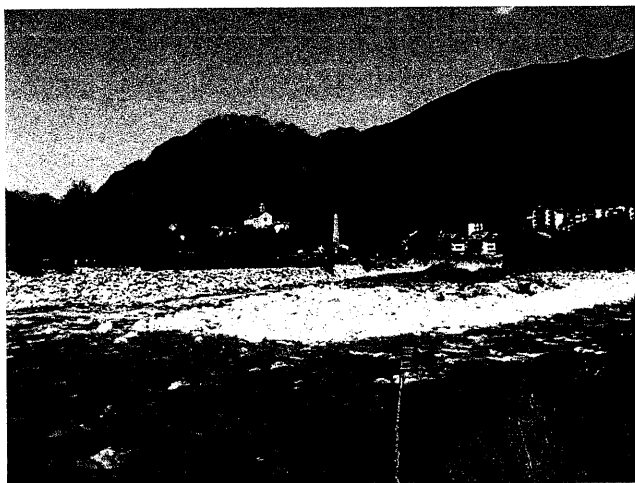


Figure 19: Immagini della Valsesia.

3.2 TIPOLOGIA DEI CASEIFICI: PROCESSO PRODUTTIVO E STRUTTURA DEL FABBRICATO

I caseifici presi in esame durante questo lavoro di tesi sono stati tre. Uno è sito a fondovalle, nel paese di Carcoforo (VC), mentre gli altri due sono alpeggi raggiungibili a piedi e con fuoristrada, rispettivamente in località Cangelo ed Alpe Mera. Nei tre caseifici sono allevate capre ibride e tutta la lavorazione del latte, mungitura compresa, è condotta manualmente e artigianalmente. Il latte lavorato è quello refrigerato proveniente dalla mungitura serale e mattutina ed è impiegato crudo.

3.2.1 CARCOFORO

Il caseificio è situato in paese, lungo la strada principale. L'edificio, di tre piani, ospita un unico locale di produzione al pianoterra ove avvengono tutte le fasi di produzione. Lo stesso locale è adibito anche alla stagionatura di salami e alla vendita dei prodotti.

Tutta la lavorazione avviene manualmente in modo artigiano ed è effettuata da un singolo operatore, questa si svolge secondo il diagramma di flusso riportato (Figura 31). Il latte refrigerato o no proveniente da una o due mungiture viene trasportato nel locale di produzione dalla stalla (ove avviene la mungitura, manuale) attraverso il cortile. Il latte viene versato dai secchi nella caldaia in alluminio in attesa di essere riscaldato mediante gas Gpl (Figure 20 e 21).

Figura 20. Caseificio di Carcoforo e bruciatore a GPL.

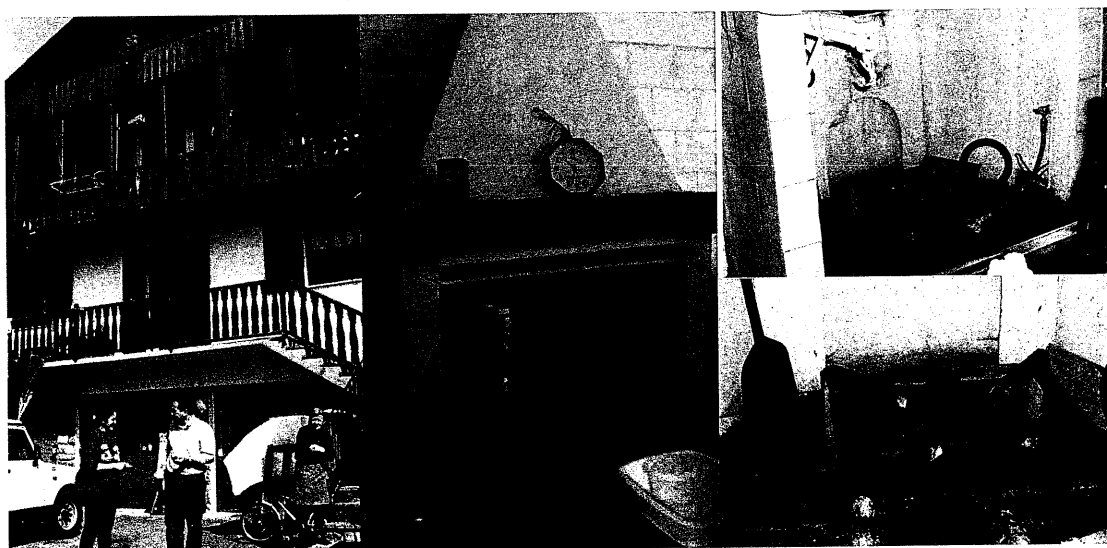
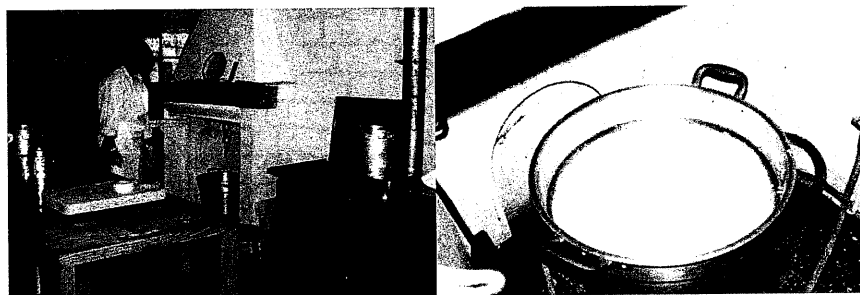


Figura 21. Caldaia di alluminio con latte.



Raggiunta la temperatura di 33°C viene aggiunto il caglio: è un caglio commerciale in pasta (Carappelli di forza 1:10.000) che viene diluito dall'operatore. La concentrazione di caglio aggiunta è 20cc ogni 100 litri di latte e viene dosato con una siringa di plastica che viene riutilizzata e lavata con sola acqua dopo ogni lavorazione (Figura 22). La coagulazione avviene in circa 15-20 minuti.

Figura 22. Siringa di plastica.



Trascorso questo tempo viene effettuato un primo taglio con coltello (Figura 23 e 24) ed un secondo con le mani (Figura 25).

Figura 23. Taglio con coltello.

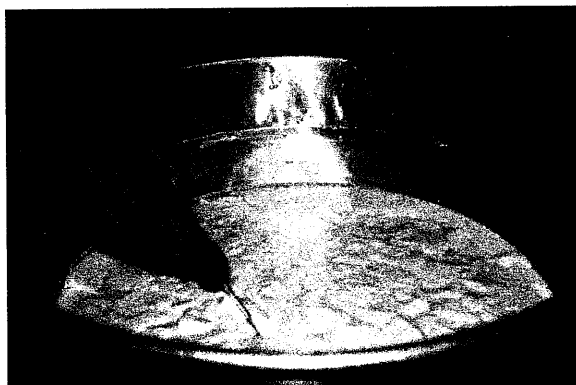


Figura 24. Cagliata rotta.

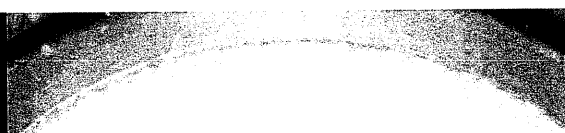
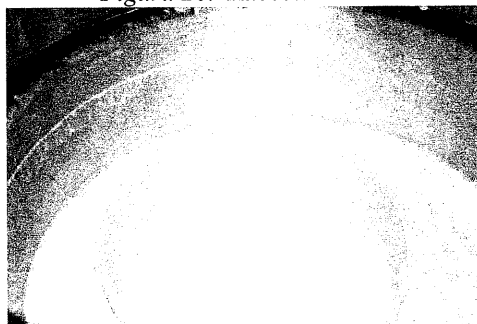


Figura 25. Taglio manuale.



Il siero che si raccoglie in superficie viene asportato manualmente con secchi di plastica e raccolto per l'alimentazione dei suini (Figura 26).

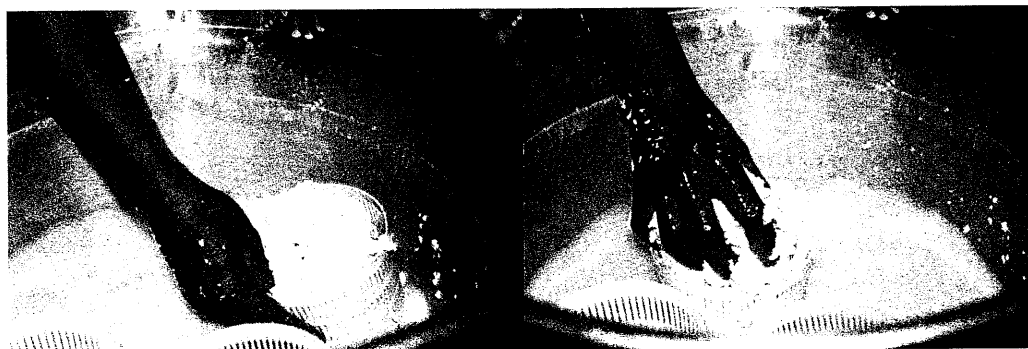
Figura 26. Raccolta siero.



Alla cagliata viene aggiunta acqua calda alla temperatura di circa 50°C allo scopo di effettuare una sorta di cottura della cagliata che raggiungerà la temperatura di circa 36-37 °C ed assumerà così un sapore più dolce. Il siero che si forma nuovamente viene ulteriormente asportato per evitare che riscaldandosi acidifichi troppo e porti all'ottenimento di una pasta troppo dura.

A questo punto i grani di caglio sono ben separati e verranno trasferiti con le mani dall'operatore all'interno dei cestelli in plastica (Figura 27). L'addetto effettua durante la formatura nel cestello una leggera pressione.

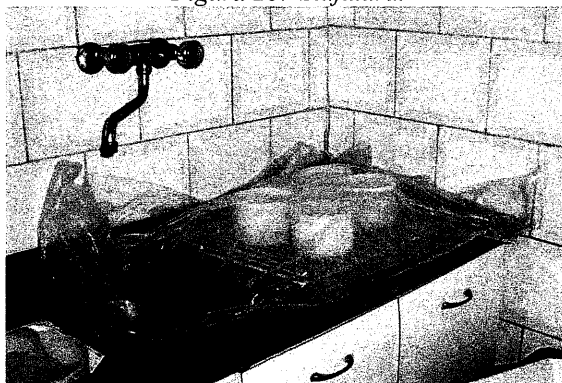
Figura 27. Fasi della formatura.





I cestelli riempiti vengono posti su di una griglia sotto la quale è posta dell'acqua calda e ricoperti con un telo di nylon. Quest'operazione ha l'effetto di una stufatura e durante il tempo di permanenza in tale fase (3-4 ore) le forme vengono rivoltate 2-3 volte (Figura 28).

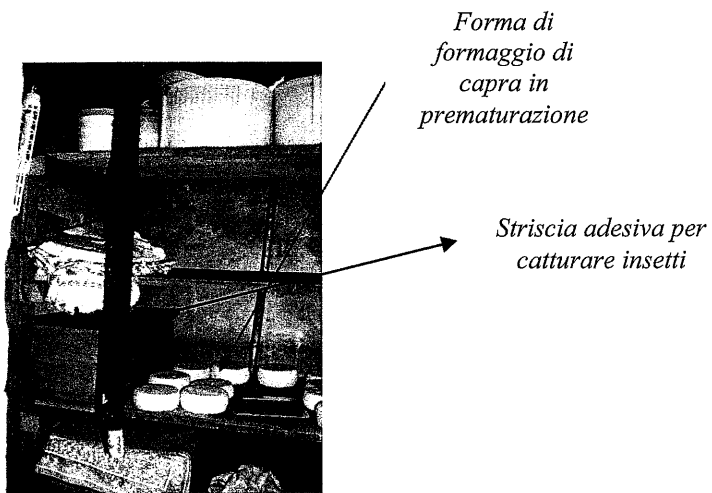
Figura 28. Stufatura.



Dopo stufatura le forme vengono trasferite in salamoia realizzata in una bacinella di plastica bianca collocata all'interno della cella di maturazione. La salamoia viene preparata con acqua di rete cui viene aggiunto sale grosso in ragione del 20% , la salamoia viene rinnovata ogni 2 mesi.

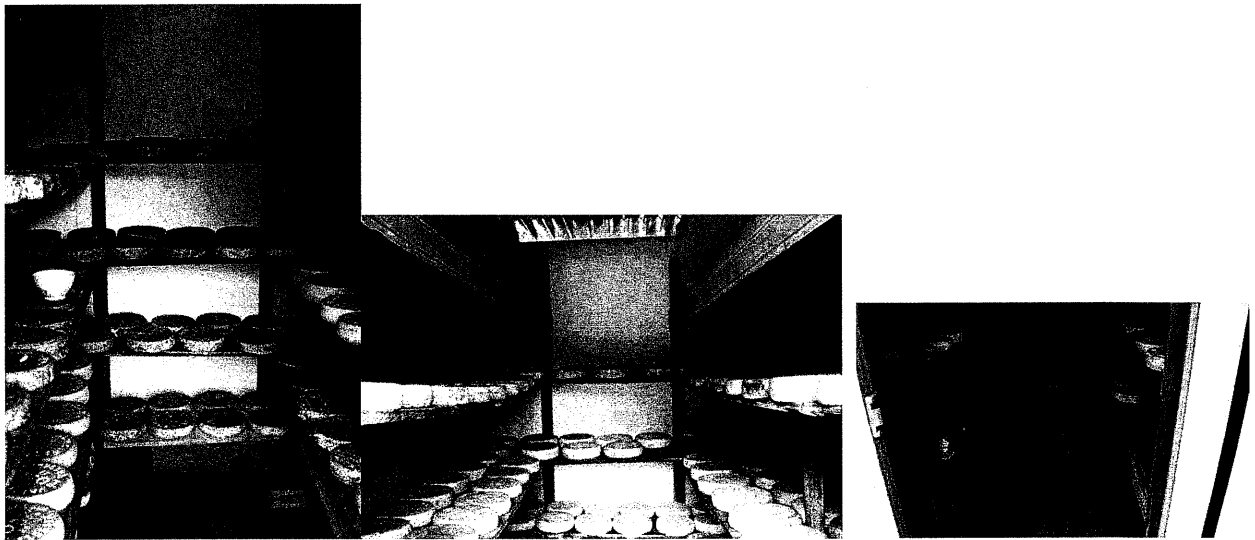
Le forme rimangono in salamoia per circa 2 ore e successivamente vengono trasferite nella cella di maturazione (U.R. 70% e $T=10-15^{\circ}\text{C}$) alla quale si accede dal locale di produzione. Il formaggio poggiato su assi di abete bianco rimane qui per circa 2 giorni. In questa cella di maturazione sono posti anche salami e formaggi di vario tipo, inoltre viene utilizzata come una sorta di magazzino per depositare bacinelle ed altro (Figura 29).

Figura 29. Particolare cella di prematurazione.



Infine le forme vengono trasferite nella cella di maturazione vera e propria (10-12°C e U.R.=80%) che si trova all'esterno del locale di produzione. La maturazione ha una durata minima di 20 giorni (Figura 30).

Figura 30. Cella di maturazione.



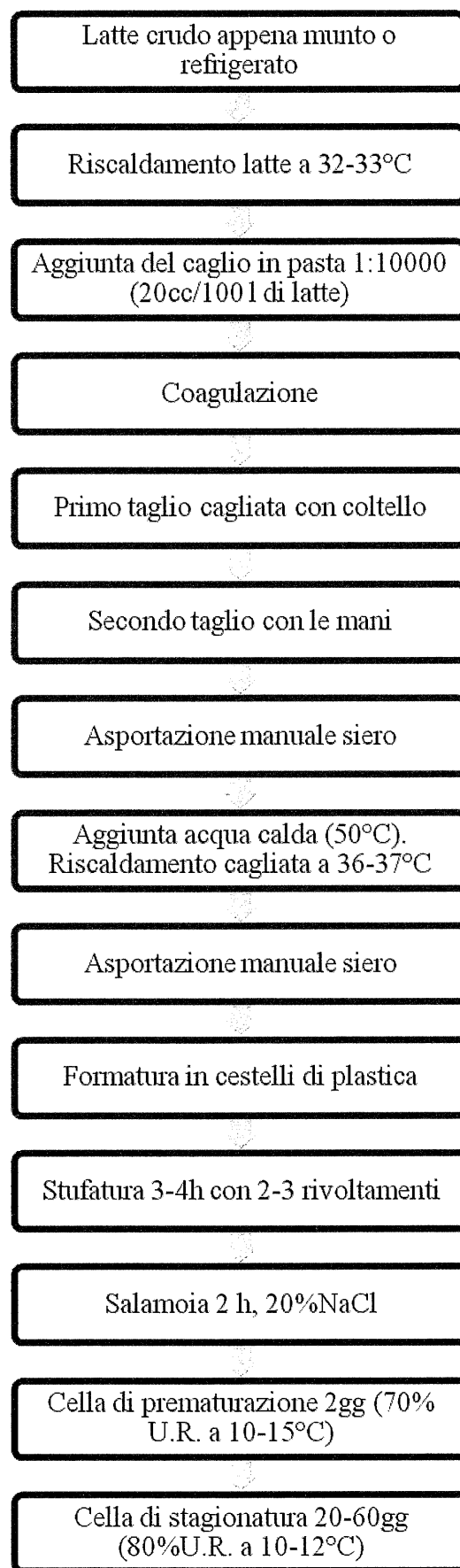


Tabella 31: Processo di produzione del caseificio di Carcoforo.

CARATTERISTICHE STRUTTURALI DEL FABBRICATO

Locale di lavorazione

Al locale di lavorazione si accede direttamente dall'esterno, attraverso una porta metallica con la parte superiore vetrata, per illuminare il locale con luce naturale (Figura 20). Il locale presenta pavimento e pareti (fino a circa 2,20 metri) piastrellate di colore chiaro. La restante parte di pareti e soffitto è in intonaco civile tinteggiato di bianco. Tutti i raccordi (pareti-pavimento e pareti-pareti) sono a spigolo vivo. Il locale è illuminato da una lampada al neon posta al centro del locale.

Nel locale ci sono due caldaie, una in rame e acciaio (per lavorare il latte di vacca) e l'altra in alluminio (per lavorare il latte di capra), un tavolo da lavoro in acciaio inox, una piccola zangola, un bancone in acciaio inox per la vendita dei prodotti e un lavabo in acciaio inox (ed altre attrezzature da cucina). Le caldaie sono posizionate in un camino e sono riscaldate a gas. Mediamente una bombola di gas da 20 kg dura 1,5 mesi (per la trasformazione casearia). Dal locale di lavorazione si accede all'abitazione sita al primo piano ed al locale di asciugatura (ventilazione forzata).

Locale di asciugatura

Il locale di asciugatura ha il pavimento piastrellato e le pareti e il soffitto in intonaco grezzo. Non ha finestre, l'unica porta di accesso è in metallo con la parte superiore vetrata per illuminare naturalmente il locale che funge anche da piccolo magazzino. Il locale è ventilato meccanicamente (ventilatore) per asciugare le forme disposte su scaffali in legno.

Cella di stagionatura

È una cella in PVC coibentato con pavimento piastrellato. Lungo il perimetro sono disposti gli scaffali di stagionatura con le assi in legno.

Le forme stagionano da 20 giorni a 2 mesi in condizioni microclimatiche variabili a seconda della stagione:

- estive: 11°C – 90-95%
- invernali: 13° – 90-95%

3.2.2 CANGELLO

Alpeggio raggiungibile solo a piedi, a circa 1364 m s.l.m. e non delimitato da mura perimetrali. In questo piccolo caseificio si lavora latte vaccino e caprino. I formaggi vengono venduti a rivenditori locali o impiegati in cucina nel ristorante di proprietà della famiglia. La produzione del tomini di capra generalmente viene effettuata prima di quella dei formaggi vaccini secondo lo schema riportato in Figura 40.

La mungitura viene effettuata mattina e sera all'aperto e solo in caso di pioggia in stalla. Per la produzione viene utilizzato il latte proveniente da due mungiture (sera-mattina) che, trasportato nel locale di produzione dall'esterno, viene versato dai secchi nella caldaia in rame in attesa di essere riscaldato mediante gas.

Raggiunta la temperatura di 33°C viene addizionato il caglio (caglio commerciale liquido Clerici), in ragione 8-15 cc ogni 100 litri dosato con un cucchiaino (un cucchiaino raso per 70/80L di latte). La coagulazione avviene in circa 45- 60 minuti. Al termine viene effettuata la rottura della cagliata mediante attrezzi appositi o alternativamente con le mani (Figura 32).



Figura 32: Rottura manuale della cagliata.

L'operatore immerge il braccio nel paiolo di rame e mescolando in continuazione rompe la cagliata. Segue un ulteriore riscaldamento così che la massa passa da una temperatura di 30 °C ad una di 35 °C circa.

A questo punto si ha la formatura: i cestelli in plastica vengono immersi direttamente all'interno del paiolo di rame per raccogliere i fiocchi della cagliata (Figure 33).

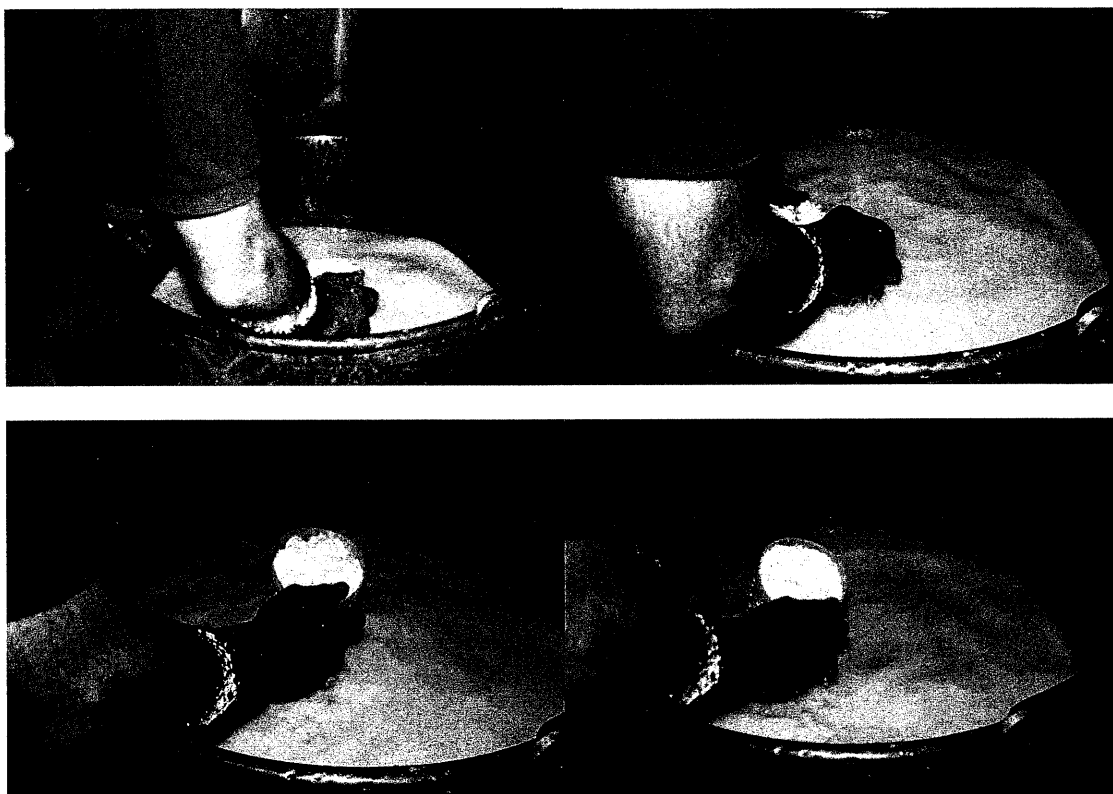


Figure 33: Fasi della formatura.

I cestelli riempiti senza esercitare pressione sul contenuto vengono posti a spurgare su di un tavolo in acciaio inox o su un piano di legno inclinato che consente il drenaggio e la raccolta del siero in un secchio; il siero servirà per la preparazione della ricotta e per l'alimentazione dei maiali (Figure 34 e 35).



Figura 34: Spurgo del siero su tavolo inox.

Piano per spurgo



Figura 35: Spurgo del siero su tavole in legno.

Le forme sono coperte con un telo di carta e vengono girate due volte (Figura 36).

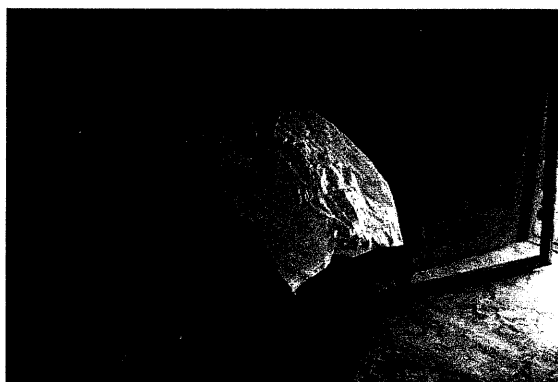


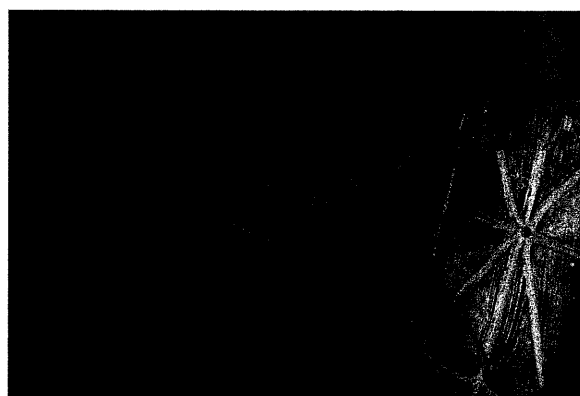
Figura 36: Forme coperte.

Il mattino successivo vengono trasferite su di un asse di maturazione che si trova sul balcone esterno in maniera tale da subire una prima “asciugatura” che favorisce una maggiore consistenza del prodotto finito. Qui le forme stazionano per circa 24 ore (Figura 37).



Figura 37: Maturazione su assi di legno.

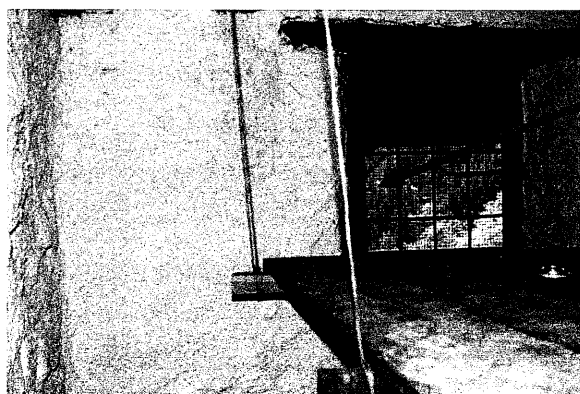
Trascorso questo tempo vengono immerse in salamoia (acqua e sale in una bacinella di plastica nel locale di stagionatura) dove rimangono per circa 3 ore (Figura 38).



Bacinella salamoia

Figura 38: Salamoia.

Infine il formaggio viene posto sulle assi della cella di maturazione dove rimane per circa una settimana/10 giorni (Figura 39).



Rete antinsetto

Figura 39: maturazione su assi di legno.

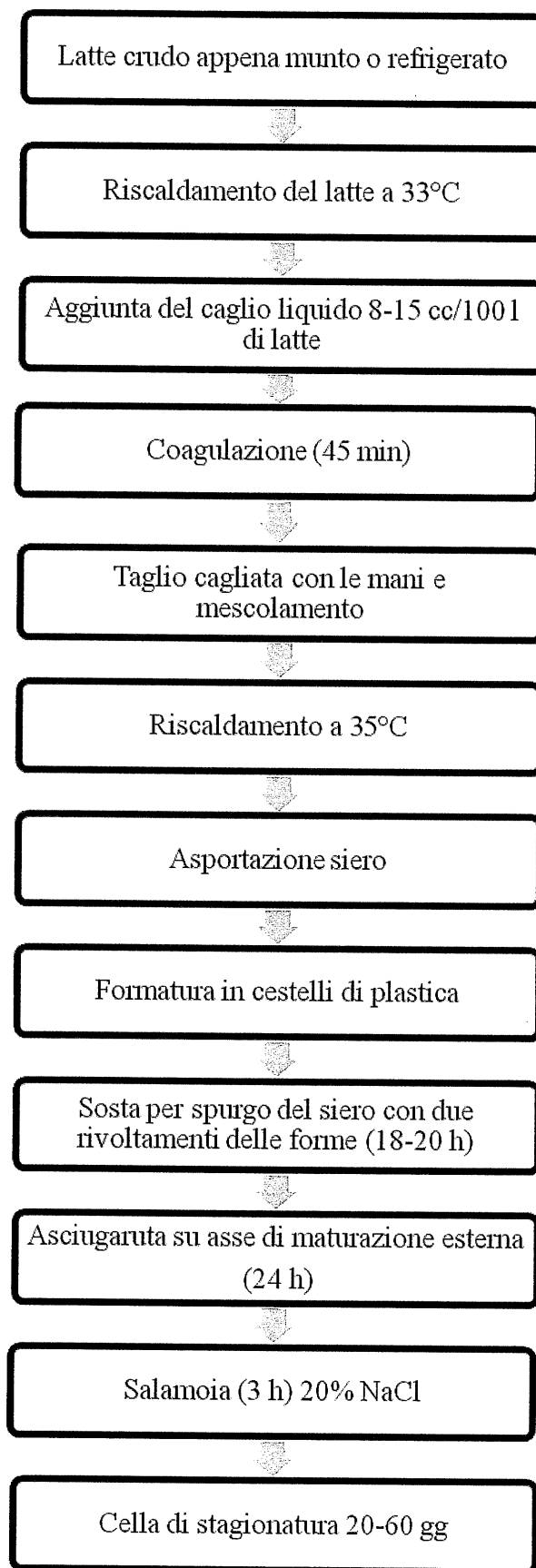


Tabella 40: Processo di produzione del caseificio di Cingello.

CARATTERISTICHE FABBRICATI (Figura 41)

Locale di lavorazione

La pavimentazione è in PVC ed è stata sovrapposta sulla pavimentazione pre-esistente. Le pareti sono realizzate in pannelli di PVC e sono raccordate tra loro, al pavimento e al soffitto con scossaline metalliche. Il soffitto è in legno. La zona retrostante la caldaia (camino) è rivestita da una lastra metallica. A lato della caldaia c'è l'unica finestra presente nel locale con telaio in legno e dotata di rete anti-insetti a maglia larga esternamente e a maglia fine internamente.

Al locale di lavorazione si accede da un primo locale utilizzato come deposito attrezzature. Il locale di lavorazione comunica con il locale di salatura e prima stagionatura e con il ballatoio esterno (lobbia) dove le forme vengono lasciate asciugare per 24 ore. Dal ballatoio esterno si accede ai servizi igienici. Le porte sono in legno. All'interno del locale vi è un lavabo in acciaio inox.

È presente nel locale una lampada al neon posta sulla parete vicino la porta d'ingresso.

Nel locale sono presenti due caldaie in rame e un tavolo in acciaio per lo spurgo delle forme e due in legno per lo spurgo e il riposo delle forme (coperte). Le attrezzature di caseificazione sono in acciaio e plastica per uso alimentare.

Locale di salatura e prima stagionatura

Dal locale di lavorazione si accede al locale di maturazione che presenta tre pareti intonacate e tinteggiate di bianco ed una in legno. Il pavimento e soffitto sono in legno. La finestra e la porta di accesso al locale presentano telaio in legno. La finestra è dotata di rete anti-insetto a maglia larga.

Nel locale sono presenti una vasca in plastica per la salatura delle forme e diverse assi di legno (sospese al centro del locale) su cui vengono poste a maturare le forme.



Figure 41: Cangelo. A: malga vista dall'esterno. B: locale lavorazione.

3.2.3 ALPE MERA

Alpeggio isolato di piccole dimensioni, a conduzione familiare, raggiungibile anche con mezzi fuoristrada e con attività di ristorazione.

La lavorazione artigianale viene effettuata da un singolo operatore secondo lo schema riportato in Figura 53.

Durante la lavorazione entrano ed escono dal locale i figli dei proprietari mentre l'eventuale vendita dei prodotti viene effettuata in un locale dedicato ben separato al quale si accede sempre dal porticato. Ogni giorno vengono lavorati circa 30/40 litri di latte caprino. Le tipologie di formaggio preparato sono due: caprino e toma di capra, mentre con il siero ottenuto durante la caseificazione viene prodotta quotidianamente ricotta di capra, il siero esausto è destinato all'alimentazione dei suini. Il latte proveniente da due mungiture (sera e mattina) viene trasportato nel locale di produzione dalla stalla dove avviene la mungitura manuale effettuata previa disinfezione delle mammelle. Il latte viene versato dai secchi nella caldaia in rame su cui è posto un colino tramite il quale viene effettuata una filtrazione. Segue un riscaldamento mediante gas che porta il latte ad una temperatura di circa 35°C (figure 42 e 43).

Raggiunta tale temperatura al latte viene aggiunto il caglio. Il caglio utilizzato è in polvere di tipo commerciale (Paride-Venturelli, forza 1:100.000): esso viene utilizzato seguendo le istruzioni del produttore (1 misurino ogni 100/125/150 litri di latte). Il tempo di coagulazione è variabile (30 minuti -1 ora) in funzione della quantità di caglio aggiunto.

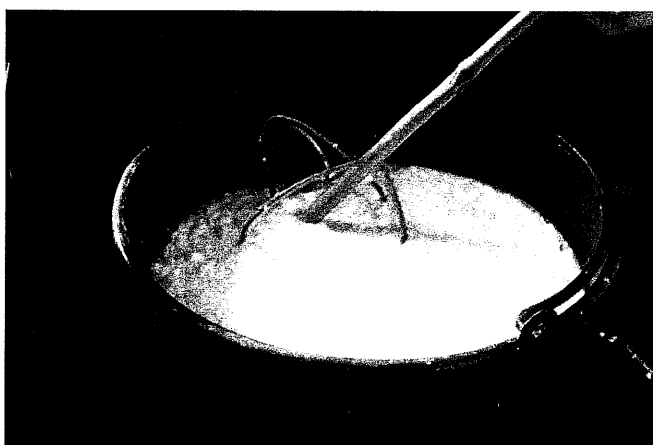


Figure 42 e 43: Prime fasi della lavorazione effettuate in caldaia di rame.

Trascorso questo tempo viene effettuata la rottura della cagliata a mano o mediante coltello; segue un tempo di sosta di circa 15 minuti e quindi un ulteriore riscaldamento a 37-39°C. La cagliata sosta a tale temperatura per un tempo di circa 10 minuti necessario per ottenere il deposito dei fiocchi sul fondo del paiolo. I fiocchi della cagliata vengono estratti manualmente dal fondo della caldaia e posti all'interno dei cestelli di plastica appoggiati su un tavolo in acciaio inox a piano inclinato per facilitare lo spurgo ed il drenaggio del siero dalle forme (Figure da 44 a 49) .



Figure da 44 a 49: Figure delle diverse fasi di lavorazione: dalla cagliata allo spurgo del siero.

Al termine della formatura le forme vengono trasferite su assi di abete bianco (poste all'interno del locale di produzione) a spurgare per circa 24 ore (Figura 50).

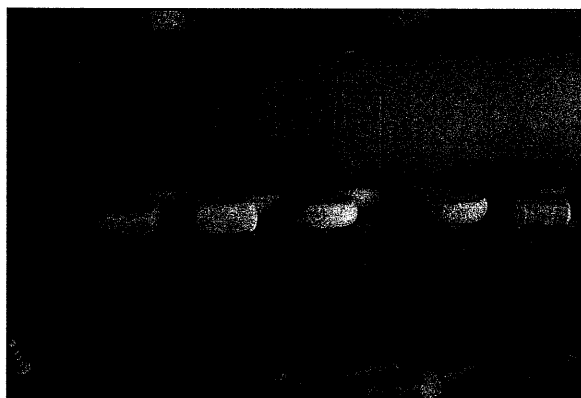
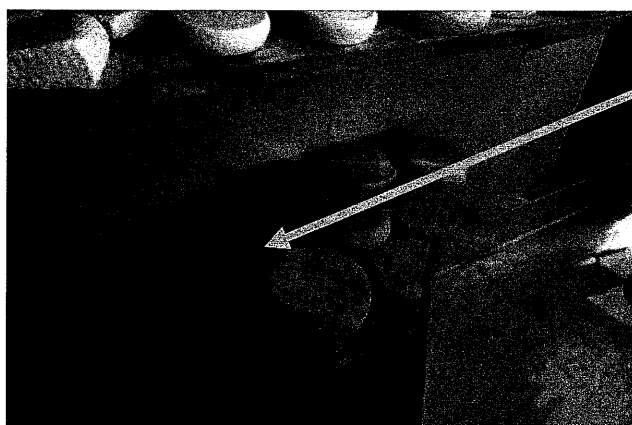


Figura 50: Spurgo delle forme su assi di abete.

Trascorso questo tempo le forme sono poste in salamoia (10% NaCl) dove sostano per circa 6 ore. La stessa salamoia ospita prodotti ottenuti sia con latte vaccino che caprino (Figura 51).



Bacinella salamoia

Figura 51: Salamoia.

Dopo la salamoia il formaggio viene spostato su griglie sospese al di sopra della vasca contenente la soluzione salina al fine di ottenere una sgocciolatura del liquido, qui viene lasciato per una notte. La mattina successiva le forme vengono trasferite su assi di abete bianco (poste al di sopra delle precedenti) dove sostano per circa 6-12 ore al fine di ottenere una prima asciugatura prima di essere portate in cantina dove viene realizzata la maturazione vera e propria (Figura 52). Questa operazione è importante per evitare ammuffimenti sugli assi di stagionatura della cantina.



Figura 52: Stagionatura delle forme.

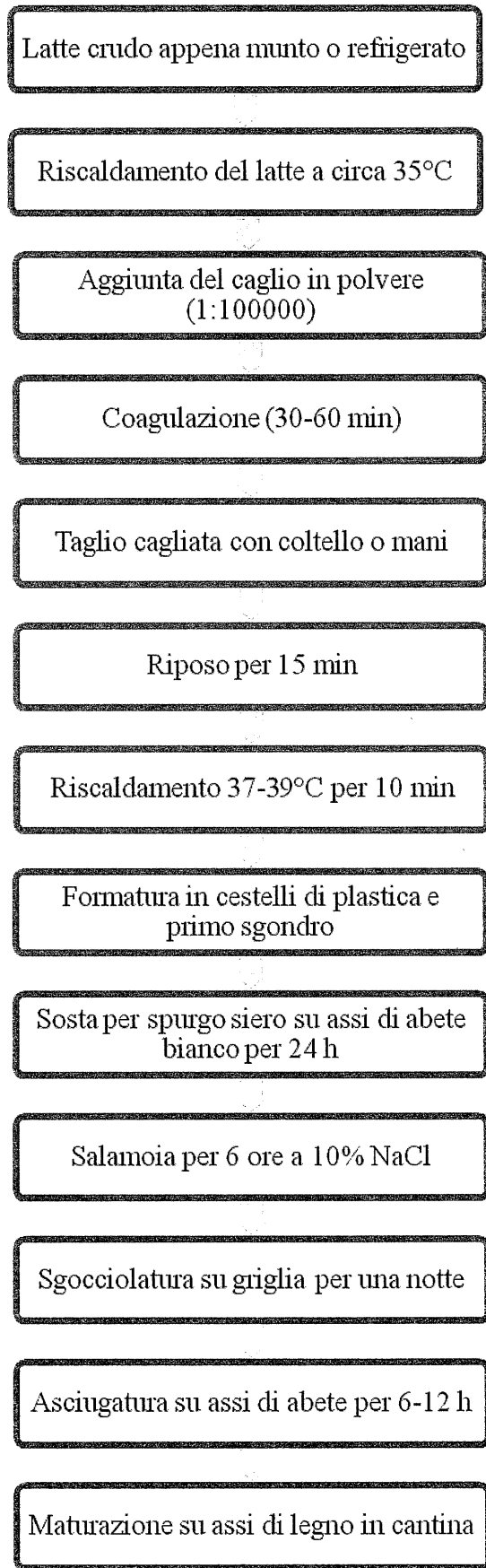


Tabella 53: Processo di produzione caseificio di Alpe Mera.

CARATTERISTICHE FABBRICATI

Il complesso produttivo in alpeggio risale al 1978, ma è stato ristrutturato nel 2006. La struttura isolata in mezzo ad un prato è priva di cintura perimetrale intorno al fabbricato. al pianoterra si trova la stalla, i locali di lavorazione, vendita e ristorazione, al primo piano l'abitazione ed al piano inferiore la cantina di stagionatura, una toilette per i clienti del ristorante e una dispensa. Tutti i locali sono ben suddivisi tra loro da porte metalliche, mantenute rigorosamente chiuse.

La struttura è collegata all'acquedotto comunale ed è allacciata alla rete elettrica.

Locale di lavorazione

Il locale di lavorazione presenta pareti piastrellate chiare sino all'altezza di 2 m, il resto delle pareti è in intonaco civile tinteggiato di bianco come il soffitto. La parete esterna è in legno e comprende un'ampia finestra protetta da rete anti-insetti. Le vetrocamere sono di sicurezza (contengono una rete metallica al loro interno) e contengono veneziane oscuranti. Il pavimento, di colore chiaro, è piastrellato in grès antiscivolo. I raccordi parete-parete e parete-pavimento sono a spigolo vivo. La porta di accesso al locale è in metallo con ampio riquadro in vetro ad altezza volto. L'illuminazione artificiale è data da una lampada al neon posta al centro del locale. Al centro del locale è presente un pozzetto per lo scarico delle acque di produzione con grigliato in plastica.

Il locale è dotato di due caldaie, una in rame per la lavorazione del latte di capra ed una in rame-acciaio inox per la lavorazione del latte vaccino, una cappa (non in funzione durante la lavorazione), un tavolo in acciaio inox per lo spurgo delle forme e un lavabo in acciaio a pedali con acqua calda/fredda. Lo spino è in acciaio, mentre i cestelli per la formatura sono in plastica alimentare. I riscaldamenti delle caldaie è a gas.

Locale di stagionatura

Il locale di stagionatura è stato ricavato nel sottosuolo. Il pavimento è in beole, le pareti e il soffitto sono intonacate. La porta è in metallo verniciato. La superficie del locale è di circa 4 m².

Nel locale sono presenti scaffalature in legno per la maturazione dei formaggi.

L'illuminazione è realizzata con una luce ad incandescenza posta al centro del locale (55 lux, senza luce 44 lux).

3.3 CAMPIONI ALIMENTARI: ANALISI MICROBIOLOGICHE

Presso ciascuna realtà produttiva sono stati effettuati prelievi in diversi momenti della produzione dalle materie prime (latte appena munto) al prodotto finito (formaggio pronto al consumo).

Su ciascun campione sono stati ricercati i seguenti indici microbiologici:

- Carica batterica totale,
- Contaminanti,
- Lattici totali,
- Cocchi lattici,
- Enterococchi,
- Coliformi totali e fecali,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (latte e prodotto finito),
- Spore di clostridi (latte),
- Lieviti e muffe.

PREPARAZIONE CAMPIONI

I campioni prelevati nelle diverse realtà produttive sono stati trasportati in giornata, con l'ausilio di borse termiche, in laboratorio per allestire le analisi microbiologiche in accordo con la norma FIL IDF 122:2001 ISO 8261.

Per ciascun campione alimentare pervenuto in laboratorio refrigerato sono stati prelevati e pesati sterilmente in un sacchetto sterile 10 grammi di prodotto, successivamente addizionati di diluente sterile sale triptone in ragione di 1:10 ed omogeneizzati in "Stomacher 400 Circulator" a 260 rpm per 2-3 minuti. Mediante tecnica delle diluizioni decimali sono stati quindi eseguiti i piastramenti negli idonei terreni colturali.

TERRENI

Carica Batterica Totale (CBT)

Terreno di coltura impiegato: Agar Plate Count (APC) [18]

Tryptone	5,0 g
Estratto di lievito	2,5 g
Glucosio	1,0 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 ml
pH	7

Sterilizzazione a 121°C per 15 minuti.

Semina per incorporamento e incubazione a 30°C per 48-72 ore.

Contaminanti

Terreno di coltura impiegato: Agar Gelisato

Peptone di gelatina	8,0 g
Agar	15,0 g
Acqua distillata	1000 ml

Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 30°C per 48 ore.

Coliformi Totali e Fecali

Terreno di coltura impiegato: Violet Red Bile Agar (VRB) [21]

Estratto di lievito	3,0 g
Peptone	7,0 g
Rosso neutro	0,03 g
NaCl	5,0 g
Lattosio	10,0 g
Sali di bile	1,5 g
Cristal violetto	0,002 g
Agar	15,0 g
pH	7,4

Semina in doppio strato e incubazione a 37°C e 44°C per 24 ore per la

ricerca rispettivamente dei coliformi totali e fecali.

Batteri lattici totali

Terreno di coltura impiegato: Man Rogosa Sharpe Agar (MRS) [20]

Peptone	10,0 g
Estratto di lievito	5,0 g
Estratto di carne	10,0 g
Tween 80	1,0 ml
Glucosio	20,0 g
K ₂ PO ₄	2,0 g
Sodio acetato 3H ₂ O	5,0 g
Citrato diammonico	2,0 g
Soluzione A	5,0 ml
Agar	18,0 g
Acqua distillata	1000ml
pH	6,6

Soluzione A: MgSO₄ 11,5 g

MnSO₄*4H₂O 2,4 g

Semina per incorporamento e incubazione in anaerobiosi (GAS PACK) a

30°C per 48 ore.

Batteri lattici omofermentanti ed eterofermentanti

Terreno di coltura impiegato: Homo-Heterofermentative differential (HHD) [25]

Fruttosio	2,5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
Tryptone	10,0 g
Phitone	1,5 g
Acido casamino	3,0 g
Estratto di lievito	1,0 g
Tween 80	1,0 ml
Verde bromocresolo	20,0 ml

Agar	20,0 g
Acqua distillata	1000ml
pH	7,0

Semina per spatolamento superficiale e incubazione in anaerobiosi(GAS PACK) a 30°C per 48 ore. Le colonie di ceppi omofermentanti cresceranno di colore blu-verde, mentre le colonie di quelli eterofermentanti si presenteranno bianche.

Cocchi Lattici

Terreno di coltura impiegato: M17

Tryptone	2,5 g
Peptone	2,5 g
Peptone di soia	5,0 g
Estratto di lievito	2,5 g
β -glicerofosfato di Na	19,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,25 g
Estratto di carne	5,0 g
Acido ascorbico	0,5 g
Agar	18,0 g
Acqua distillata	1000 ml
pH	7,0

Al momento dell'uso aggiungere sterilmente, per ogni 100 ml di terreno fuso e tenuto a 50°C, 5 ml di soluzione di lattosio al 10% in acqua (sterilizzata separatamente per filtrazione). Semina per incorporamento ed incubazione a 30°C per 48 ore

Enterococchi

Terreno di coltura impiegato: Kanamicina Esculina Azide Agar (KEA) [19]

Peptone di caseina	20,0 g
Estratto di carne	5,0 g
NaCl	5,0 g
Kanamicina solfato	0,02 g
Esculina	1000 ml
Citrato triammonico	0,5 g

Agar	15,0 g
pH	7,1

Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 37°C per 48 ore. Considerare solo le colonie nere con alone bruno-nero.

Micrococcaceae

Terreno di coltura impiegato: Mannitol Salt Agar (MSA)

Estratto di carne	1,0 g
Peptone	10,0 g
Mannitolo	10,0 g
NaCl	75,0 g
Rosso fenolo	0,025 g
Agar	15,0 g
Acqua distillata	1000 ml
pH	7,5

Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 37°C per 48 ore. Le colonie di Micrococcaceae cresceranno gialle con alone giallo.

Staphylococcus aureus

Terreno di coltura impiegato: Baird-Parker (BP)[24]

Tryptone	10,0 g
Estratto di carne	5,0 g
Piruvato di sodio	10,0 g
Estratto di lievito	1,0 g
Glicina	12,0 g
Cloruro di litio	5,0 g
Agar	20,0 g
Acqua distillata	1000 ml
pH	6,8

Al momento dell'uso aggiungere asetticamente un'emulsione di tuorlo d'uovo e tellurito di potassio in ragione di 5ml/100ml di terreno, miscelare delicatamente, evitando la formazione di schiuma, e versare in piastra. Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 37°C per 48 ore.

Lieviti e muffe

Terreno di coltura impiegato: Yeast Glucose Cloramfenicolo (YGC)

Estratto di lievito	5,0 g
Glucosio	10,0 g
Cloramfenicolo	0,1 g
Agar	18,0 g
Acqua distillata	1000 ml
pH	5,5

Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 30°C per 3-5 giorni.

Terreno selettivo per crescita muffe e lieviti: Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD)

Estratto di lievito	1%
Peptone	2%
Glucosio	2%
pH	5,5

Salmonella spp. [22]

La Ricerca delle Salmonelle negli alimenti non è mai una conta, ma una valutazione di presenza/assenza in una stabilita quantità di alimento (25 g o ml).

Il metodo classico (Gazzetta Ufficiale 346 del 13/12/1978) consta di quattro fasi:

1. Fase di prearricchimento: acqua peptonata tamponata a pH 7. Incubare a 37°C per 24h.
2. Fase di arricchimento selettivo Trasferimento di 1 o 0,1 ml di prearricchimento in brodo Rappaport-Vassidialis contenenti sostanze selettive che favoriscono la crescita di microrganismi di tipo intestinale. Incubare a 42°C per 24-48h
3. Fase di conferma su terreno selettivo e differenziale: striscio su terreno Salmonella Shigella Agar (SSA). Non si sterilizza. Salmonella cresce formando caratteristiche colonie piccole diafane (lattosio negative) talvolta con centro nero (produzione di H₂S).
4. Prove di conferma: API test 20E (Biomérieux).

***Listeria monocytogens* [23]**

Anche per *Listeria* si esegue una ricerca qualitativa in 25 g di prodotto. I passaggi sono:

1. Pre-arricchimento selettivo: 25 g di campione sono posti sterilmente in 225 ml di terreno di Fraser ½ concentrazione, incubazione a 30°C per 24 ore.
2. Arricchimento selettivo : trasferimento di 1 ml di prearricchimento in 10 ml di Fraser a concentrazione normale, incubazione a 37°C per 48 ore.
3. Prova di conferma in terreni differenziali e selettivi: In caso di annerimento della brodocoltura striscio su terreno selettivo differenziale ALOA (30°C per 48-72 ore).

3.4 ISOLAMENTO DEI CEPPI

Per ogni piastra è stato isolato il 20% delle colonie cresciute nelle piastre corrispondenti all'ultima diluizione. Le colonie isolate da APC, BP, VRB, MSA, sono state seminate in Tryptic Soy Broth (TSB) e, dopo incubazione a 30°C per 24-48 ore sono state strisciate, sul corrispondente terreno agarizzato (TSA) sterile, preparato in provette a "becco di clarino". Gli slant così ottenuti sono stati incubati a 30°C per 24-48 ore.

Tryptic Soy Broth (TSB):

Tryptone	17,0 g
Soitone	3,0 g
Destrosio	2,5 g
Cloruro di Sodio	5,0 g
Dipotassio fosfato	2,5 g
Acqua distillate	1000 ml
pH	7,3

Incubare a 30°C per 24-48 ore.

Le colonie isolate da KEA sono state isolate in provette di BHI broth avente la seguente composizione:

Brain Heart Infusion (BHI):

Infuso di cervello di vitello	200,0g
Infuso di cuore di manzo	250,0 g

Peptone	10,0 g
Destrosio	2,0 g
NaCl	5,0 g
Fosfato disodico	2,5 g
pH	7,4

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Semina e incubazione a 37°C per 24-48 ore.

Le colonie di eumiceti sono state isolate su slant a “becco di clarino” di YGC.

Gli isolati da MRS e da HHD sono stati seminati in provette di MRS broth ed incubate a 30°C per 24-48 ore.

Allo stesso modo le colonie isolate da M17 sono state seminate in provette di M17 broth, incubate a 30°C per 24-48 ore e strisciate sul corrispondente terreno agarizzato.

Al fine di verificarne la purezza tutti gli isolati sono stati ripetutamente strisciati sui corrispondenti terreni agarizzati e re-isolati. Tutti i ceppi isolati sono stati poi sottoposti ad osservazione al microscopio ottico 480x per verificare un eventuale contaminazione, mobilità e morfologia, informazioni utili per la classificazione.

3.5 CONSERVAZIONE ISOLATI

Tutti i batteri lattici isolati in MRS e M17 brodo sono stati congelati. Da ogni isolamento è stato prelevato 1,5 ml di coltura, addizionato di 0,3 ml di glicerolo, posto in provette monouso sterili di plastica e congelati a -25°C.

Gli isolati in TSA, YGC e BHI sono stati conservati a 4°C in cella frigo e trapiantati mensilmente.

3.6 ANALISI GENOTIPICA PROCARIOTI

I ceppi puri sono stati sottoposti ad analisi genotipica al fine di raggrupparli per specie ed effettuare successivamente il sequenziamento del gene 16S rDNA per la loro identificazione.

3.6.1 ESTRAZIONE DNA BATTERICO

Il protocollo usato è il seguente:

- Centrifugare a 5000 giri per 10 minuti 300 µl di brodocoltura fresca (overnight).
- Sospendere il precipitato in 400 µl di tampone di lisi TE 1X (Tris Hcl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM) e aggiungere 4 µl di lisozima (50 mg/ml). Incubare a bagnomaria a 37°C per 30 minuti.
- Aggiungere 10 µl di proteinasi K (20 mg/ml) e 12,5 µl di SDS (20% v/v) sciolto in acqua, porre ad incubare la miscela a bagnomaria a 37°C per 30 minuti.
- Procedere quindi all'aggiunta di 400µl di fenolo e successivamente centrifugare a 14000 giri per 15 minuti.
- Sottoporre il surnatante così ottenuto ad un eguale volume (400 µl) di cloroformio-alcool isoamilico (24:1) e centrifugare a 15000 giri per 10 minuti.
- A questo punto trasferire il surnatante e aggiungere 40µl di acetato di sodio (3M, pH 5,2) e 800µl di etanolo al 95% v/v freddo (-20°C) e centrifugare a 15000 giri per 30 minuti.
- Infine risospendere il precipitato contenente il DNA con 300 µl di etanolo al 70% v/v freddo (-20°C) e centrifugare nuovamente a 15000 giri per 10 minuti.
- Una volta rimosso delicatamente l'etanolo, farne evaporare le tracce rimanenti in thermomixer a 45°C, 400 rpm per 15-20 minuti.
- Aggiungere 50 µl di tampone TE1X e lasciar riposare una notte in frigo.

3.6.2 AMPLIFICAZIONE RAPD-PCR

La tecnica RAPD-PCR (Random Amplification Polymorphic DNA) è una amplificazione basata sulla reazione a catena della polimerasi che coinvolge tutto il cromosoma ed utilizza un primer aspecifico.

In questo studio è stato impiegato il primer M13: composto da poche basi e quindi caratterizzato da una bassa specificità. Esso deriva dal fago M13 di *Escherichia coli* e presenta la seguente sequenza: 5' GAG GGT GGC GGT TCT 3'.

Per ogni campione da sottoporre ad amplificazione, condotta nel Termociclatore Biometra T-Gradient, è stata allestita la seguente soluzione: Acqua milli-Q: 14,9 µl; Buffer 10x: 2,5 µl; MgCl₂ 25 mM: 4,0 µl; dNTPs 10 mM: 0,25 µl; DMSO 100%: 1,25 µl; Primer M13 100 µM: 1,0 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0,10 µl; DNA: 1 µl.

Il ciclo termico impiegato per la suddetta amplificazione è stato il seguente:

$$\frac{94^{\circ}\text{C}}{2'}; \left[\begin{array}{cc} \frac{94^{\circ}\text{C}}{1'} & \frac{72^{\circ}\text{C}}{2'} \\ & \frac{43^{\circ}\text{C}}{40''} \end{array} \right] \times 34; \frac{72^{\circ}\text{C}}{10'} \dots \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty}$$

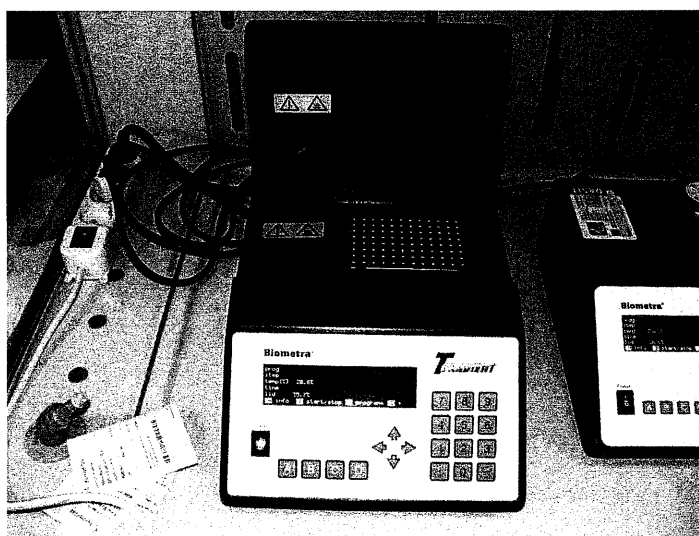


Figura 54: Termociclatore Biometra T-Gradient.

3.6.3 AMPLIFICAZIONE ITS-PCR

L'ITS è una tecnica molecolare di amplificazione selettiva di sequenze specifiche del DNA. Lo studio della regione ITS (Internal Transcribed Spacers), ossia la regione intergenica compresa tra il 16S rDNA ed il 23S rDNA, ha consentito di ridurre ancor più il numero dei gruppi.

Per l'amplificazione è stata utilizzata la seguente soluzione: Acqua milli-Q: 18,2 µl; Buffer 10x: 2,5 µl; MgCl₂ 25 mM: 1,0 µl; dNTPs 10 mM: 2,0 µl; DMSO 100%: 1,25 µl; Primer (f+r) 100 µM: 1,0+1,0 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0,10 µl; DNA: 1 µl.

Il ciclo termico impiegato per la suddetta amplificazione è stato il seguente:

$$\frac{94^{\circ}\text{C}}{2'}; \left[\begin{array}{cc} \frac{92^{\circ}\text{C}}{1'} & \frac{72^{\circ}\text{C}}{1'} \\ & \frac{54^{\circ}\text{C}}{1'} \end{array} \right] \times 34; \frac{72^{\circ}\text{C}}{7'} \dots \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty}$$

3.6.4 AMPLIFICAZIONE 16S rDNA

Per effettuare il sequenziamento dei ceppi è stata effettuata l'amplificazione della regione 16S rDNA.

Per l'amplificazione è stata utilizzata la seguente soluzione: Acqua milli-Q: 17,25 µl; Buffer 10x: 2,5 µl; MgCl₂ 25 mM: 2,5 µl; dNTPs 10 mM: 0,5 µl; Primer (f+r) 100 µM: 0,5+0,5 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0,25 µl; DNA: 1 µl.

Il ciclo termico impiegato per la suddetta amplificazione è stato il seguente:

$$\frac{94^{\circ}\text{C}}{2'}; \left[\begin{array}{c} \frac{94^{\circ}\text{C}}{45''} \cdots \frac{72^{\circ}\text{C}}{1'} \\ \frac{50^{\circ}\text{C}}{45''} \end{array} \right] \times 4; \left[\begin{array}{c} \frac{94^{\circ}\text{C}}{45''} \cdots \frac{72^{\circ}\text{C}}{1'} \\ \frac{55^{\circ}\text{C}}{35''} \end{array} \right] \times 34; \frac{72^{\circ}\text{C}}{7'} \cdots \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty}$$

3.6.5 ELETTROFORESI DELL'AMPLIFICATO

Gli amplificati ottenuti possono essere valutati e confrontati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Il gel si prepara sciogliendo una precisa quantità di agarosio in tampone TAE 1x (Tris base 40 mM, acido acetico glaciale 20 mM, EDTA 1mM; pH 8) e si aggiunge bromuro d'etidio in quantità pari a 5 µl/100 ml di TAE 1x. La concentrazione dell'agarosio nel caso di analisi RAPD-PCR è pari all'1,5% P/V, per l'ITS e il 16S è uguale al 2,5%. L'amplificato, prima di correre in cella elettroforetica GNA 200 (Pharmacia Biotech, Svezia), è addizionato di loading dye (blu di bromofenolo 0,025g, glicerolo 5 ml, acqua distillata 5 ml) in rapporto 9:1. Per ogni corsa vengono caricati anche 2 µl di marker, costituito da una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto: per la RAPD M13 e il 16S il marker 1kb (Fermentas), mentre per l'ITS il marker 100bp (Fermentas). Il primo, a differenza del 100bp, non ha il loading dye per cui va addizionato. Il gel è stato quindi fatto correre per un tempo di 1h e 30 minuti a 110V.

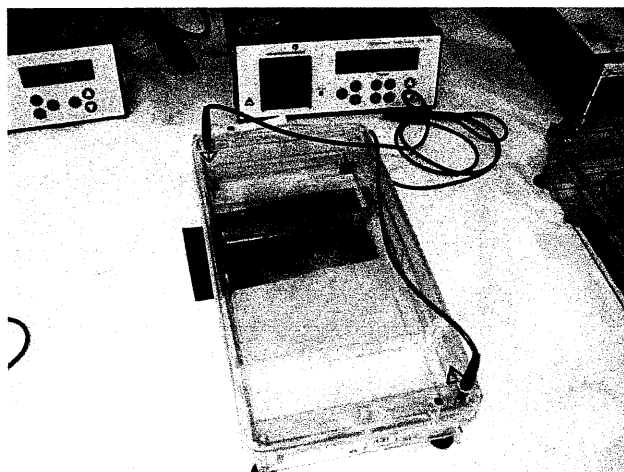


Figura 55: Box elettroforesi.

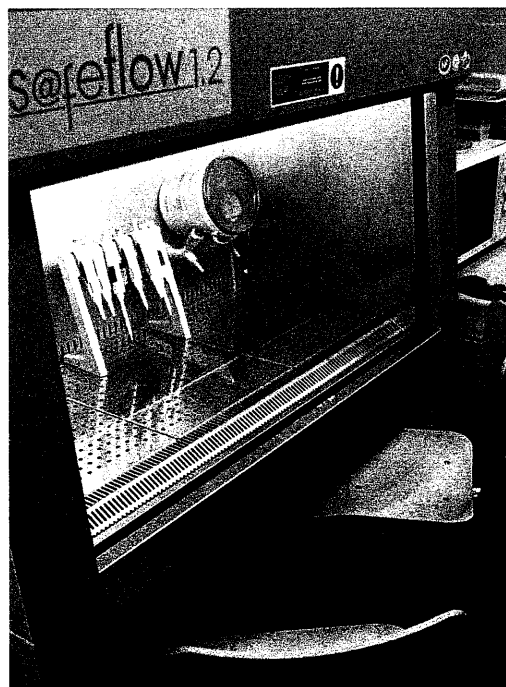


Figura 56: Cappa a flusso laminare.

Terminata la corsa è stato sottoposto a transilluminazione UV (GEL DOC XR System, Bio-Rad Laboratories, California) e l'immagine ottenuta è stata analizzata mediante software collegato Quantity One.

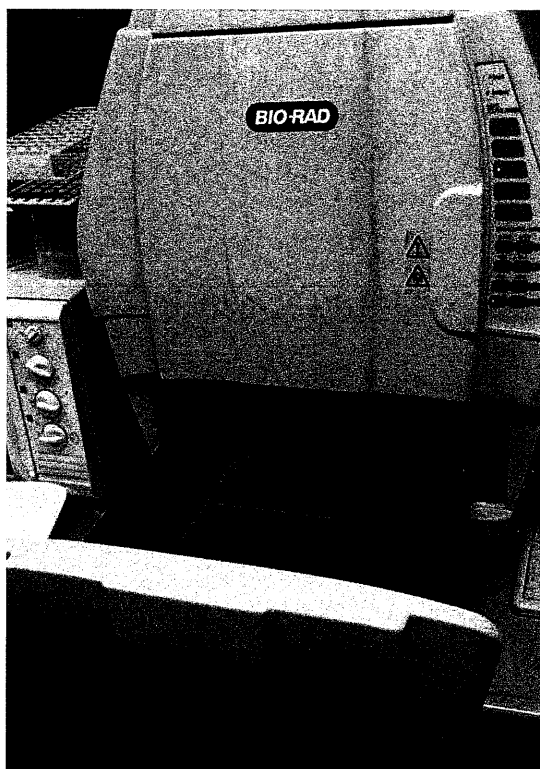
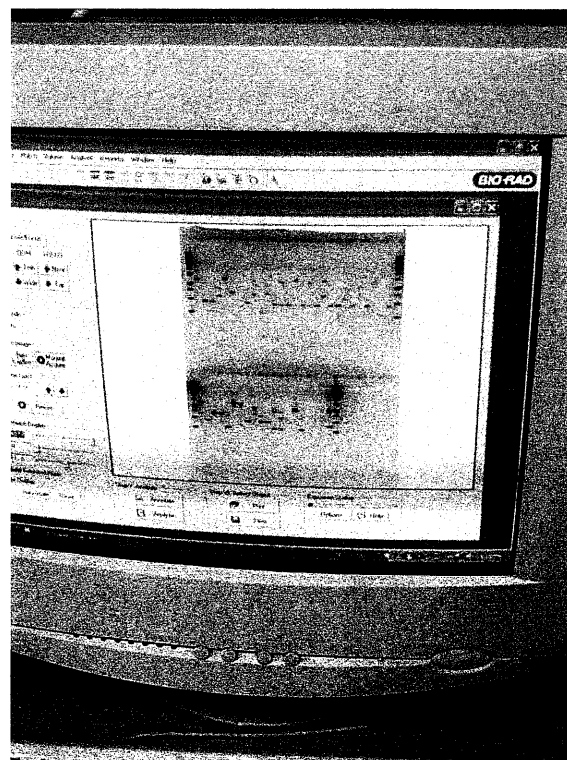


Figura 57: Tranilluminatore UV.

Figura 58: Software per visualizzare i gel elettroforetici.



3.6.6 SEQUENZIAMENTO ED ELABORAZIONE TRACCIATO

Il sequenziamento degli amplificati è stato realizzato presso i laboratori della ditta PRIMM di Milano.

La sequenza riscontrata per ogni ceppo è stata elaborata con CHROMAS 2.13 (Technelysium Pty Ltd. Australia): i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli presenti nella banca dati on-line (www.ncib.nlm.nih.gov).

3.7 ANALISI FENOTIPICA DEI LIEVITI

L'analisi fenotipica dei lieviti è stata effettuata al fine di effettuare un primo raggruppamento tra ceppi che presentavano una serie di prove morfologico - fermentative uguali.

3.7.1 CRESCITA SU PIASTRA DI YEAST MORFOLOGY AGAR (YMA)

I ceppi di lieviti cresciuti su YGC sono stati seminati in YMA e messi ad incubare a 30°C per 48 ore. La semina su YMA è stata effettuata per valutare alcuni parametri di crescita della colonia: colore e morfologia.

3.7.2 UTILIZZO FONTE DI AZOTO E FERMENTAZIONE ZUCCHERI

FASE PRELIMINARE

Prima di effettuare le prove di utilizzo dei nitrati e di fermentazione degli zuccheri è necessario ripulire le cellule di lievito cresciute su slant. Inizialmente con acqua distillata e dopo centrifugazione (3500 giri per 15 min) risospendere il fondello in 5 ml di sale triptone. Ricentrifugare e risospendere nuovamente il fondello in 5 ml di sale triptone. Questa sospensione di lieviti sarà quella utilizzata per le prove di utilizzo dei nitrati e fermentazione degli zuccheri.

UTILIZZO FONTE DI AZOTO

- sterilizzare due provette piccole per ogni ceppo di lievito, contenenti ognuna 4,5 ml di acqua distillata;
- preparare 100 ml di acqua distillata con 11,7 g di Yeast Carbon Base (YCB), sterilizzare per filtrazione;

- preparare 100 ml di acqua distillata con 11,7 g di YCB + 0,78 g di KNO_3 , sterilizzare per filtrazione;
- mettere in una serie di provette 0,5 ml di YCB e nell'altra serie 0,5 ml di YCB + KNO_3 ;
- inoculare 0,1 ml di ogni ceppo in due provette (una solo con YCB e l'altra con YCB+ KNO_3);
- incubare a 25°C per 3-4 giorni.

Il nitrato è la base azotata più discriminante. Si potrebbero comunque fare delle prove utilizzando NO_2 , cadaverina, glucosammina, ecc.

FERMENTAZIONE ZUCCHERI

E' stata testata la capacità fermentativa dei ceppi di lievito nei confronto del glucosio e del lattosio. La procedura è stata così eseguita:

- preparare due soluzioni zuccherine distinte al 20%: una con glucosio e l'altra con lattosio. Sterilizzazione per filtrazione amicrobica;
- preparare il terreno Yeast Nitrogen Base (YNB) sciogliendone 6,7 g in un litro di acqua distillata e distribuirne 9 ml in provette con campanella; sterilizzare in autoclave a $\frac{1}{2}$ atm per 30 min;
- aggiungere nella prima serie di provette 1 ml di soluzione di glucosio al 20% e nella seconda serie 1 ml di soluzione di lattosio sempre al 20% precedentemente sterilizzato;
- inoculare sterilmente una sospensione del lievito lavata con acqua distillata sterile per almeno due volte;
- incubare a 25-28°C per una settimana.

La lettura delle provette viene poi eseguita nel seguente modo: un ceppo è in grado di fermentare uno zucchero se la soluzione risulta torbida(crescita del lievito) e se la campanella contiene gas (avvenuta fermentazione dello zucchero).

3.8 ANALISI GENOTIPICA DEI LIEVITI

3.8.1 ESTRAZIONE DNA EUCARIOTI

L'estrazione del DNA da ceppi puri di lieviti è stata eseguita con la seguente procedura:

- Prelevare con l'ansa la patina di una muffa o di un lievito e risospenderla in 5 ml di terreno YEPD. Incubare una notte a 25°C.
- Prelevare 5 ml di brodo cultura e metterla in provette sterili adatte alla centrifugazione. Centrifugare per 15 min a 3500 rpm.
- Eliminare il surnatante. Risospendere il pellet in 500 microL di enzima litico Zymoliasi. Incubare a 30°C per 90 min.
- Centrifugare per 15 min a 3500 rpm. Eliminare il surnatante. Risospendere il pellet in 500 microL di soluzione "B".
- Aggiungere 50 microL di SDS 10% P/V. Blanda agitazione ed incubare a 65°C a bagnomaria per 30 min. Contemporaneamente mettere nel ghiaccio potassio acetato 3M per 30 min.
- Passati i 30 min aggiungere subito 200 microL potassio acetato freddo e lasciare le provette nel ghiaccio per 30 min. In questa fase è possibile fermarsi lasciando le provette in ghiaccio.
- Trasferire tutto ciò che si riesce in eppendorf da 2 ml. Centrifugare per 5 min a 14000rpm. Trasferire il surnatante in nuove eppendorf. Aggiungere 800 microL di isopropanolo. Lasciare a temperatura ambiente per 5 min rovesciando delicatamente le provette per alcune volte.
- Centrifugare per 10 min a 1400rpm. Eliminare il surnatante. Aggiungere al pellet di DNA 1 ml etanolo a 70%v/v agitare delicatamente.
- Centrifugare per 5 min a 14000rpm. Eliminare il surnatante e lasciare asciugare il pellet a 45°C per 15-30 min.
- Risospendere il pellet in 50-70 microL di acqua sterile mMQ.
- Lasciare a 4°C per una notte. Conservare in seguito il DNA a -20°C.

ZYMOLIASI:

- Soluzione “A”: 0.9 M di sorbitolo + 0.1 M di EDTA : pH 7.5
- 1 microL/ml di B-mercaptoetanolo 14mM(frigorifero)
- Filtrare con siringhe e filtro da 0.2 microm.
- Se avanza stoccare a -20°C,
- **SOLUZIONE DA UTILIZZARE: 10 ml di sol. A + 0.005 g di Zymoliasi + 10 microL di B-mercaptoetanolo.**

SOLUZIONE “B”:

- 0.05 M di TRIS HCl
- 0.02 M EDTA
- pH 7.4

3.8.2 AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE “ITS rDNA” DEI LIEVITI

Dopo l'estrazione del DNA dei lieviti si è proceduto all'amplificazione, tramite PCR, della regione spaziatrice compresa tra il 26S e il 18S rDNA (ITS).

Soluzione di amplificazione: Acqua milli-Q:38,1 µl; Buffer 10x: 5,0 µl; MgCl₂ 25 mM: 5,0 µl; dNTPs 10 mM: 1,0 µl; Primer (ITSL1+ITSL2) 100 µM: 0,5+0,5 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0,2 µl; DNA: 1 µl.

Ciclo di amplificazione:

$$\frac{92^{\circ}\text{C}}{2'}; \left[\begin{array}{c} \frac{95^{\circ}\text{C}}{1'} \\ \frac{50^{\circ}\text{C}}{1'} \end{array} \right] \times 34 \begin{array}{c} \frac{72^{\circ}\text{C}}{5'} \\ \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty} \end{array}$$

3.8.3 RESTRIZIONE DELL'AMPLIFICATO ITS

Dopo aver valutato l'avvenuta amplificazione della regione ITS attraverso un gel elettroforetico, l'amplificato è stato sottoposto a digestione attraverso l'ausilio di un enzima di restrizione Hin6I al fine di ottenere una più certa discriminazione a livello di ceppo dei lieviti isolati.

Soluzione di restrizione: Acqua milli-Q: 7,2 µl; Tango Buffer: 1,5 µl; Enzima Hin6I: 0,3 µl; Amplificato ITS: 6 µl.

La soluzione viene messa ad incubare per 2 ore a 37°C. Successivamente vengono osservati i frammenti di DNA attraverso una corsa elettroforetica con un gel di agarosio al 2,5%.

Ceppi che hanno mostrato un profilo ITS uguale e una restrizione differente sono da considerare diversi e quindi da sequenziare entrambi.

3.9 ANALISI AMBIENTALI

Sono stati eseguiti anche controlli a livello ambientale. Le analisi hanno riguardato la valutazione microbiologica dell'aria e delle superfici di lavoro.

CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELL'ARIA

La tecnica per effettuare il monitoraggio microbiologico ambientale prevede il campionamento delle cellule microbiche sospese nell'aria e la loro moltiplicazione su idonei terreni di coltura in modo tale da poter contare e, dopo isolamento, identificare i microrganismi presenti. I metodi che prevedono la conta batterica su terreno sono in grado di rilevare però solo la frazione microbica metabolicamente attiva ovvero quella capace di riprodursi e di formare colonie visibili. È importante ricordare, ai fini della valutazione del rischio biologico, che la dispersione dei microrganismi nell'aria e le tecniche di campionamento, possono indurre nei microrganismi condizioni di stress, riducendo così la loro vitalità e la capacità di riprodursi su un terreno di coltura e comportando, quindi, una possibile sottostima della contaminazione ambientale.

Il monitoraggio dei locali di lavorazione è stato effettuato con un sistema di campionamento attivo che prevede l'aspirazione di grandi volumi d'aria confinata per minimizzare così le differenze di distribuzione dei microrganismi dovute alle correnti, alla temperatura e alle dimensioni degli aggregati aerodispersi.

Per i rilievi è stato utilizzato il Microbial Air Monitoring System (Merck, mod. MAS-100 Eco®), un campionatore ad aspirazione monostadio ad impatto ortogonale, in grado di aspirare volumi prestabiliti di aria da un minimo di 10 litri ad un massimo di 500 litri.

All'interno della testa dell'aspiratore è alloggiata una piastra Petri del diametro di 90 mm contenente un terreno colturale specifico per il gruppo o microrganismo che si vuole ricercare su cui va ad impattare l'aria aspirata. Il terreno colturale viene scelto in funzione del gruppo

microbico da ricercare. Le piastre vengono messe ad incubare in termostato per tempi e temperature variabili a seconda del gruppo microbico ricercato.

I campioni d'aria sono stati prelevati nei reparti di lavorazione dove il prodotto è maggiormente esposto alla contaminazione ambientale.

All'interno di uno stesso locale sono stati campionati più punti, posizionando lo strumento a diverse altezze. I rilievi sono stati ripetuti più volte (almeno 3 volte) per ottenere dati significativi ai fini del controllo della contaminazione dell'aria.

I campionamenti sono stati effettuati in due diverse condizioni:

- senza lavorazione in corso e ad ambiente pulito e sanificato;
- con lavorazione in corso.

In tale modo è stato possibile quantificare l'apporto inquinante dovuto all'attività lavorativa e alle persone presenti.

Per valutare la qualità dell'aria il D.Lgs. 626/94, pur evidenziando la necessità di monitorare la presenza di potenziali specie patogene, non fornisce valori di carica batterica o micetica a cui rapportarsi. Occorre quindi fare riferimento ad alcuni parametri indicati in letteratura: ad esempio, la Commissione delle Comunità Europee (European Collaborative Action) propone per gli ambienti indoor fasce orientative di contaminazione dell'aria il cui superamento, però, non implica automaticamente l'instaurarsi di condizioni di pericolo o insalubrità (Tabella 58a e 58b).

<i>LIVELLI DI CONTAMINAZIONE DELL'ARIA</i>	
<i>Molto bassi</i>	$< 50 \text{ ufc/m}^3$
<i>Bassi</i>	$50 < \text{ufc/m}^3 < 100$
<i>Medi</i>	$100 < \text{ufc/m}^3 < 500$
<i>Alti</i>	$> 500 \text{ ufc/m}^3$

Tabella 58a: Livelli di contaminazione dell'aria.

<i>LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DELLE SUPERFICI</i>	
<i>Corretta sanificazione</i>	< 50 ufc/cm ² per CBT
	< 50 ufc/cm ² per coliformi
<i>Rischi per la sicurezza alimentare</i>	< 10 ⁴ ufc/cm ² per CBT

Tabella 58b: Livelli di contaminazione delle superfici.

CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELLE SUPERFICI

Per il controllo qualitativo della contaminazione delle superfici di lavoro sono state utilizzate due tecniche che prevedono lo sviluppo in piastra di microrganismi vitali: le spugnature e i tamponi. Il metodo delle spugnature prevede l'uso di spugne (4x8 cm) poste in sacchetti sterili richiudibili, contenenti 100 ml di diluente sterile (sale triptone). Al momento del campionamento, la spugna viene estratta con guanti sterili monouso, strizzata e sfregata da ambo i lati sulla superficie (solitamente 10x10 cm) da analizzare. Terminata tale operazione la spugna viene reintrodotta nel sacchetto che viene richiuso avendo cura di far uscire l'aria. Il campione tal quale viene conservato in condizioni refrigerate fino al momento dell'analisi da eseguire entro 24 ore dal prelievo. In laboratorio vengono allestite le diluizioni decimali seriali, utilizzando come diluente sempre sale triptone. Successivamente le diluizioni vengono seminate per diffusione in diversi terreni colturali e le piastre poste ad incubare per tempi e temperature variabili a seconda dell'indice microbiologico ricercato (vedi tabella 6).

La determinazione delle concentrazioni microbiche superficiali (UFC/cm²) viene effettuata, considerando ai fini del calcolo, la diluizione seminata e l'estensione della superficie campionata, secondo la seguente relazione:

$$SdUFCcmUFC \cdot 2/$$

dove:

UFC = numero di colonie cresciute su piastra;

d = diluizione seminata (10^{-x});

S = superficie campionata (cm²).

La tecnica dei tamponi viene utilizzata quando si vuole misurare il grado di contaminazione di superfici di difficile accesso con la tecnica precedente. Per questa metodica vengono utilizzati bastoncini sterili, dotati ad un'estremità di cotone idrofilo. Al momento del campionamento il

tampone, dopo essere stato inumidito con sale triptone, viene sfregato contro la superficie di cui si vuole conoscere il grado di contaminazione, quindi reinserito nella provetta di sale triptone e conservato in condizioni refrigerate fino al momento dell'analisi da eseguire entro 24 ore dal prelievo. In laboratorio si procede alla semina per striscio delle piastre Petri con il contenuto tale quale delle provette contenenti i tamponi. Le piastre seminate vengono incubate a tempi e temperature variabili a seconda del gruppo microbico ricercato. Il numero di colonie cresciute costituisce il valore UFC ricercato.

I controlli delle superfici sono stati effettuati su vasche di affioramento, caldaie e tavoli spersori prima e dopo le operazioni di pulizia, soprattutto per valutare l'efficacia delle operazioni di detergenza e sanificazione.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 CARCOFORO

4.1.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

I risultati delle analisi microbiologiche, effettuate presso la realtà di Carcoforo, sono riportate in Tabella 59 ed illustrati graficamente nelle Figure 60 e 61.

Fase di lavorazione	CBT	Lattici totali	Cocchi Lattici	Enterococchi	Micrococcaceae	Lieviti
Latte crudo	$2,5 \times 10^6$	$6,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$	$3,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^2$
Dopo rottura	$1,9 \times 10^8$	$7,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^7$	$2,6 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$
Prima stufatura	$2,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^7$
Dopo stufatura	$9,6 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$4,8 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$
Prima salamoia	$1,8 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$8,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$
Dopo salamoia	$6,0 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$	$8,2 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$	$8,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$
Fine stagionatura	$1,1 \times 10^9$	$2,4 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	$5,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^6$

Tabella 59: Carcoforo: risultati delle analisi microbiologiche. I risultati, espressi come ufc/g, sono la media di tre prelievi.

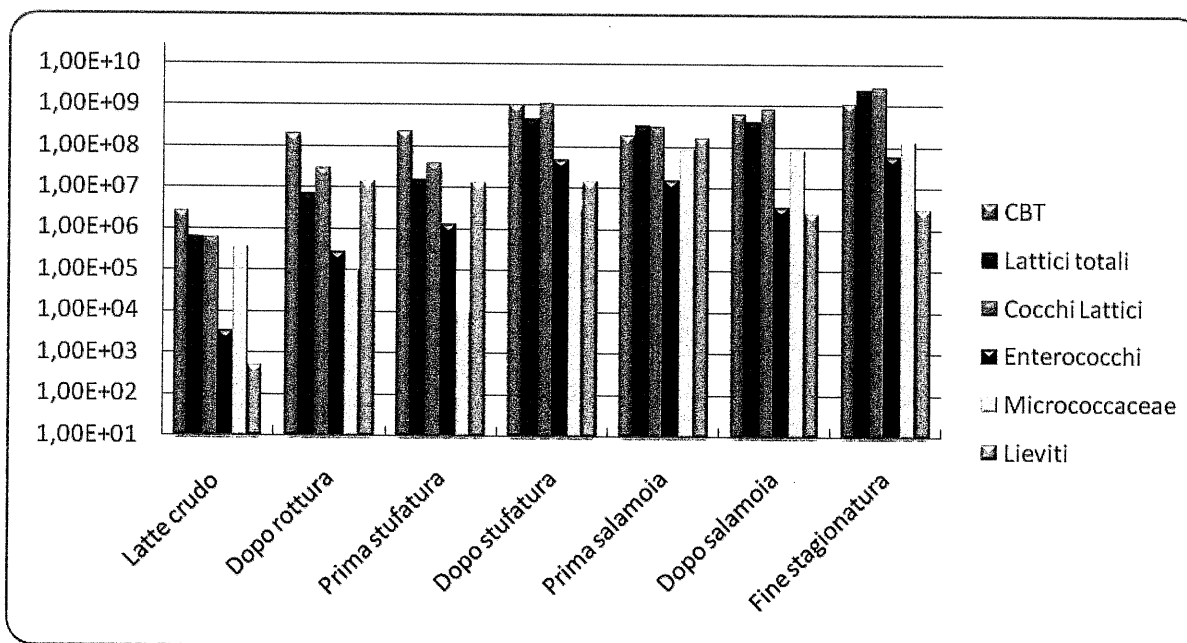


Figura 60: Carcoforo: popolazione microbica riscontrata durante la lavorazione.

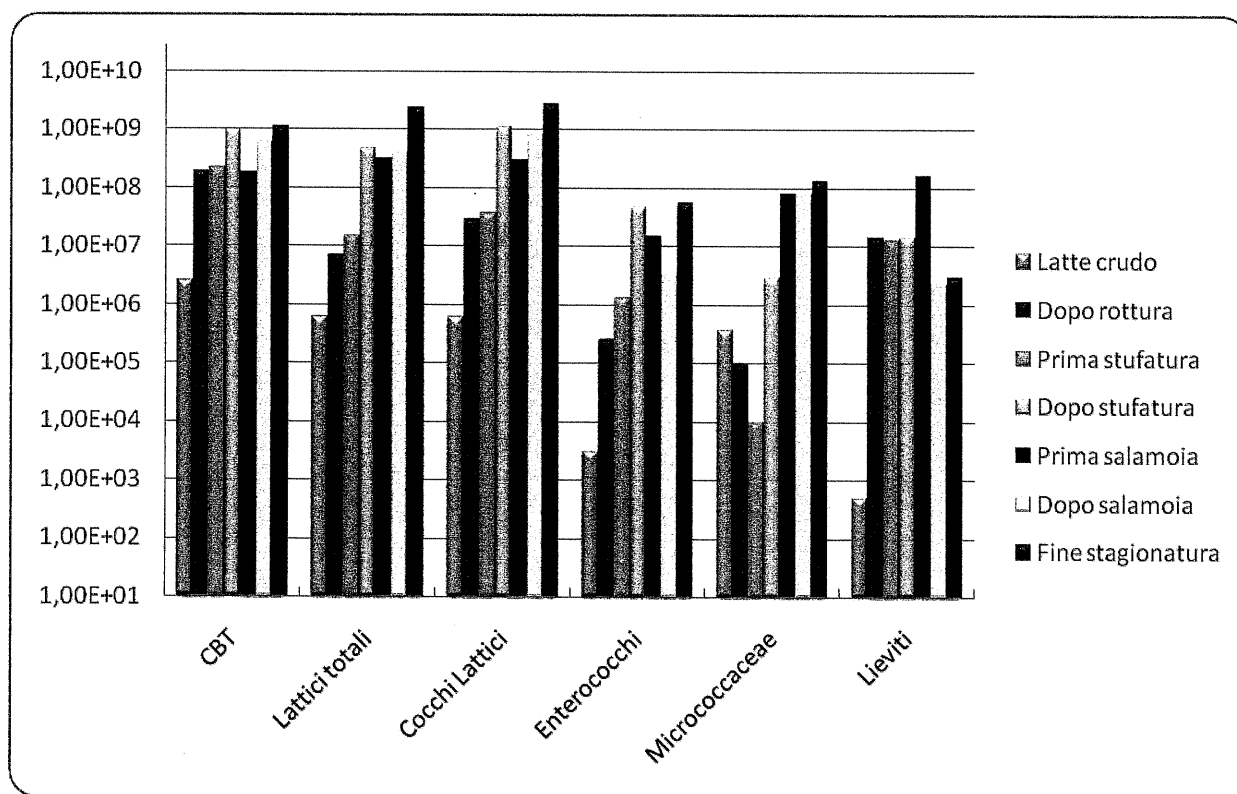


Figura 61: Carcoforo: distribuzione dei differenti gruppi microbici in funzione delle fasi di lavorazione.

Il latte di partenza è apparso di discreta qualità microbiologica. Esso infatti è il risultante di due mungiture, quella serale, conservata sino al suo impiego in frigorifero e quella mattutina impiegata nell'arco di poche ore. Pur mostrando una carica totale piuttosto alta (un ordine di grandezza superiore rispetto al riferimento di legge di 5×10^5 ufc/ml), risulta nei parametri un importante indicatore microbiologico della condizione igienica della mungitura e della caseificazione: i coliformi totali, infatti, sono stati ritrovati in numero contenuto (200 ufc/ml) e sempre inferiore a 10 ufc/ml i coliformi fecali.

Piuttosto elevato il numero delle Micrococcaceae (10^5 ufc/ml) di cui circa la metà sono risultati *Staphylococcus aureus* lecitinasi positivi, comunque non più ritrovato nelle successive fasi di lavorazione. *S. aureus* è un tipico indice microbiologico di contaminazione umana cioè avvenuta durante le fasi della caseificazione, ma più probabilmente visto che si ritrovano in elevate quantità nel latte crudo possono derivare dall'animale stesso magari affetto da un principio di mastite subclinica difficile da diagnosticare soprattutto se a soffrirne è un singolo animale.

Durante la lavorazione grazie alla fase di riscaldamento, sosta, spurgo e all'inevitabile e spesso preziosa contaminazione ambientale è evidente un aumento generale della popolazione microbica che andrà a selezionarsi durante le fasi di stufatura e maturazione del prodotto,

conferendo a quest'ultimo peculiari caratteristiche sensoriali (aroma, gusto, flavour, ecc.) e reologiche (consistenza, elasticità, ecc.).

Entrando nello specifico la popolazione lattica è stata riscontrata nel latte crudo in misura di 10^6 ufc/ml ed è costituita prevalentemente da forme a cocco omofermentanti che in alcuni momenti della produzione appaiono anche leggermente superiori ai lattici totali dovuto probabilmente alla crescita in piastra anche di forme cocciche non lattiche. La crescita dei batteri lattici è importante sino alla stufatura (da 10^6 a 10^9 ufc/ml), facilitata anche dall'abbondanza di substrato e dalla scarsa competizione di altre forme microbiche nonché dalle ideali condizioni di temperatura e umidità. Dalle conte effettuate i batteri lattici subiscono dopo la stufatura e quindi durante la salatura un arresto nella crescita a causa probabilmente dello stress dovuto alla concentrazione salina soprattutto per i batteri posti negli strati più esterni della toma caprina. Terminato infatti il periodo di salatura si osserva come durante la stagionatura la popolazione lattica ritorni a concentrazioni di oltre 10^9 ufc/ml, svolgendo importanti attività proteolitiche e lipolitiche sul prodotto grazie agli enzimi endogeni ed esogeni in possesso di questo gruppo di batteri (Figura 62).

Significativa è la presenza degli enterococchi: che seguono un andamento molto simile ai cocchi lattici, di poco superiori a 10^3 ufc/ml nel latte, incrementano in modo continuo e regolare durante le operazioni in caldaia, quindi dopo una riduzione, pari ad un ordine di grandezza in fase stufatura e salatura, riprendono la crescita durante la stagionatura per attestarsi intorno a 10^7 ufc/g nel prodotto finito (Figura 61).

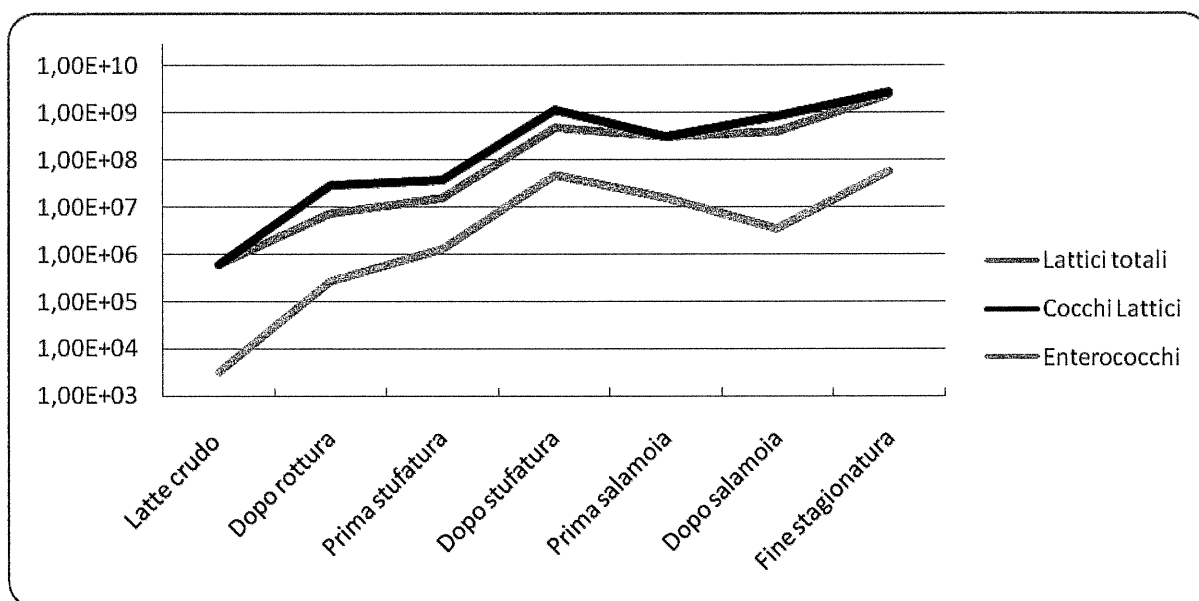


Figura 62: Carcoforo: evoluzione dei batteri lattici durante la lavorazione.

La Figura 63 riporta l'evoluzione di altri due indici microbici ricercati: Micrococcaceae e lieviti. Le Micrococcaceae, a fronte di una contrazione di 10^4 - 10^5 ufc/ml nelle primissime fasi, mostrano un progressivo aumento durante la lavorazione sino a portarsi con la salatura a valori prossimi le 10^8 ufc/g in quanto questo gruppo microbico risulta essere maggiormente capace di tollerare la concentrazione salina rispetto agli altri gruppi microbici e quindi è in grado di sfruttare al meglio la crescita esponenziale durante la stufatura che garantisce una temperatura di crescita ideale.

La fase di salatura al contrario determina una riduzione del contenuto di lieviti il cui numero era attestato su valori importanti fin dall'inizio della lavorazione. I lieviti molto probabilmente provengono da una contaminazione ambientale e potrebbero portare difetti al prodotto finito. Se mantenuti invece a questi livelli a fine maturazione (Figura 63), possono con la loro attività idrolitica conferire caratteristiche pregevoli al formaggio.

Durante la stagionatura compaiono le muffe, provenienti dall'ambiente di lavorazione e presenti per lo più a livello della crosta. Esse svolgono un'importante attività lipolitica che concorrerà a determinare durante la stagionatura del formaggio una differenziazione tra la pasta presente negli strati appena sottostanti la crosta e la pasta presente al centro della toma che risulterà più compatta.

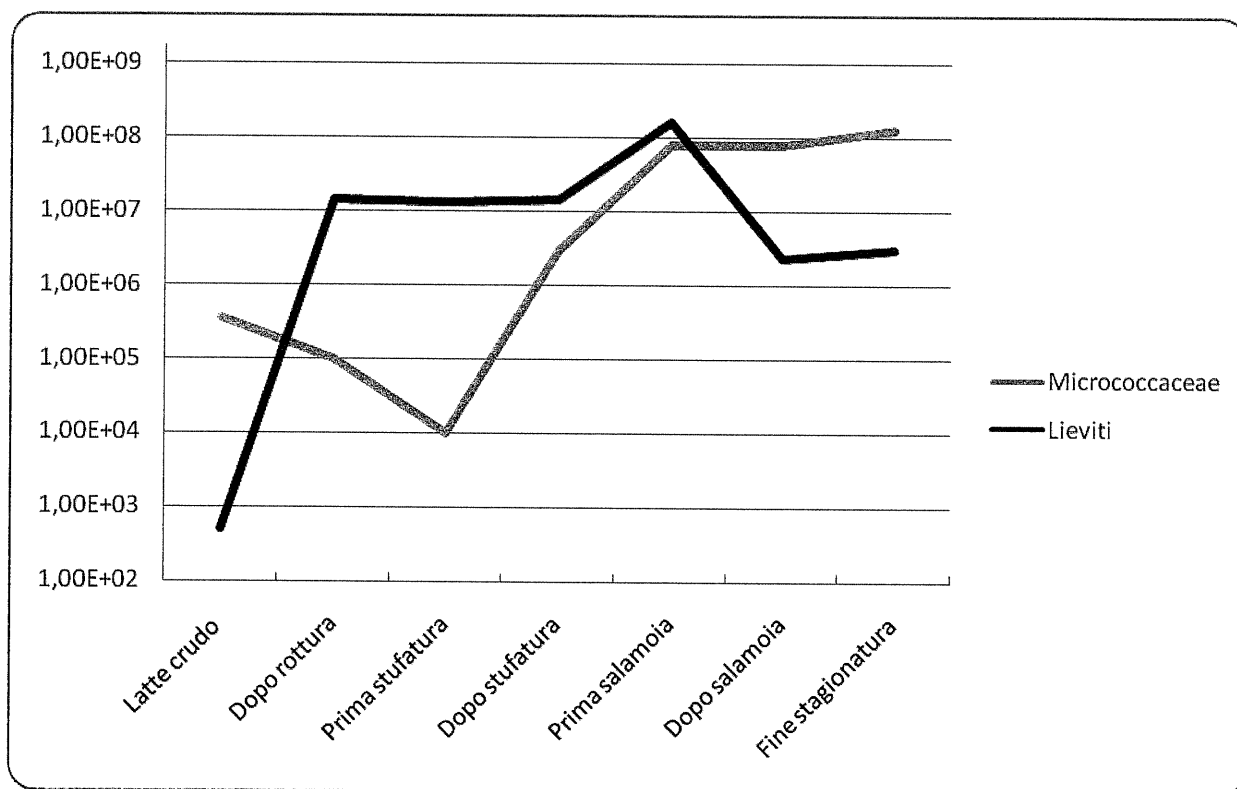


Figura 63: Carcoforo: evoluzione dei lieviti e delle Micrococcaceae.

La Figura 64 mette in evidenza la differenza di concentrazione microbica riscontrata nella pasta del formaggio e sulla crosta (inclusi i primissimi strati sottostanti). Come detto in precedenza risulta evidente e logica la maggior presenza di muffe, lieviti e contaminanti sulla crosta del formaggio rispetto che nella pasta dovuti ad una contaminazione dall'ambiente di maturazione attraverso l'aria, le assi di stagionatura, le mani dell'operatore, gli insetti, ecc.

Risultano invece non significative le differenze riscontrate tra Batteri lattici totali e nei cocchi lattici. Nella crosta risultano maggiormente presenti, rispetto alla pasta, batteri appartenenti alla famiglia delle Micrococcaceae e al genere *Enterococcus* derivanti anch'essi probabilmente da una maggior contaminazione ambientale rispetto alla pasta del formaggio.

Per quanto riguarda la ricerca dei patogeni come prescritto dal Reg. CE 2073/05 si è proceduto alla ricerca di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. La ricerca di questi due patogeni è stata effettuata sul latte crudo e sul formaggio a fine maturazione. In entrambi i casi le analisi hanno dato esito negativo e cioè assenza in 25 g di prodotto.

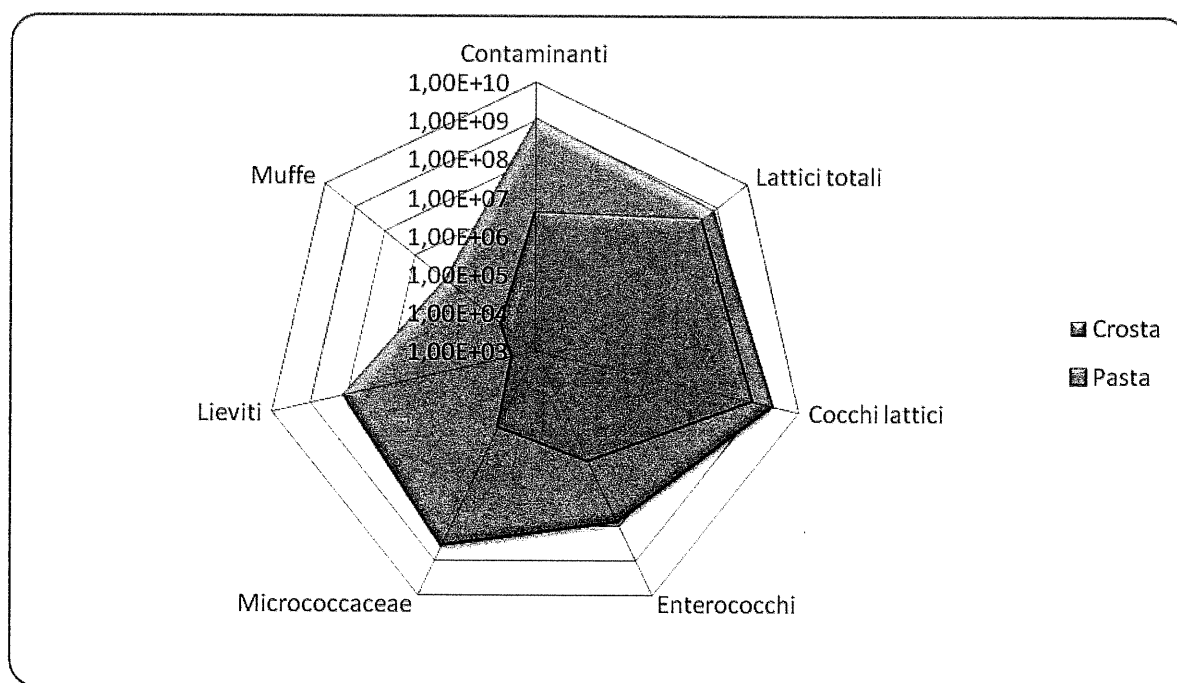


Figura 64: Distribuzione microbica tra crosta e pasta del formaggio a fine stagionatura.

4.1.2 CONDIZIONI AMBIENTALI

Condizioni igienico-sanitarie delle superfici di lavoro

Nel complesso la situazione ambientale è apparsa confortante. Tutte le superfici ed attrezzature (cestelli, caldaia, coltelli, contenitori vari, piani di lavoro) sono regolarmente lavate con detergente acido dopo ogni lavorazione.

Nel locale di trasformazione del latte in particolare viene effettuata una pulizia ambientale (piastrelle e pavimento) ogni 15 giorni con detergenti comuni. La carica batterica è costituita per lo più da forme lattiche derivate proprio dalla tipologia di prodotti trattati (Tabella 65)

	CBT (ufc/cm ²)	Coliformi totali (ufc/cm ²)	Coliformi fecali (ufc/cm ²)	Lieviti (ufc/cm ²)	Muffe (ufc/cm ²)
Tavolo di lavoro acciaio inox	2,1x10 ²	assenti	assenti	10	assenti
Piastrella parete	-	assenti	assenti	assenti	assenti
Cestello plastica formatura	-	assenti	assenti	assenti	assenti
Caldaia pulita	3	assenti	assenti	<1	<1

Tabella 65: Condizioni igienico sanitarie delle superfici di lavoro.

Qualità microbiologica dell'aria

Anche il controllo microbiologico dell'aria ha evidenziato una situazione confortante. Nel locale di lavorazione la carica batterica totale appare piuttosto bassa ed è comunque rappresentata da microrganismi ambientali non patogeni, mentre discreta è la presenza di lieviti che si riscontrano nella normale microflora del latte lavorato, soprattutto quello di origine caprina. Questa situazione è probabilmente da attribuire al ridotto numero di persone che operano nel locale ed all'attenzione prestata dall'addetta nel mantenere sempre la porta, che da sul cortile di accesso,

ben chiusa. Buona è anche la situazione del locale asciugatura, in cui i prodotti stazionano per un breve tempo prima dei essere trasferiti nella cella di stagionatura (Tabella 66).

Locale	Posizione	Aria (ufc/m ³)		
		CBT	Lieviti	Muffe
Lavorazione	Ingresso	0,25	2,1x10 ³	assenti
	Caldaia	2,0	1,6x10 ³	43
	Centro locale	3,7	0,04	0,1
Salatura/asciugatura	Centro locale	4,5	0.04	0,2

Tabella 66: Qualità microbiologica dell'aria.

4.2 CANGELLO

4.2.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

I risultati delle analisi microbiologiche effettuate sono riportati in Tabella 67 ed illustrati graficamente nelle figure 68 e 69.

Fase di lavorazione	CBT	Lattici totali	Cocchi Lattici	Enterococchi	Micrococcaceae	Lieviti
Latte crudo	2,0*10 ⁷	6,0*10 ⁵	5,0*10 ⁵	8,0*10 ²	1,1*10 ³	6,2*10 ³
Rottura cagliata	2,5*10 ⁷	1,6*10 ⁷	1,7*10 ⁷	3,0*10 ⁵	1,0*10 ⁴	1,0*10 ³
Prima stufatura	4,3*10 ⁸	4,2*10 ⁸	4,2*10 ⁸	1,7*10 ⁸	4,4*10 ⁵	5,0*10 ³
Dopo stufatura	6,7*10 ⁸	4,3*10 ⁸	5,3*10 ⁸	1,5*10 ⁷	2,2*10 ⁶	7,0*10 ⁶
Dopo salamoia	1,2*10 ⁸	1*10 ¹⁰	1*10 ¹⁰	4,0*10 ⁶	6,0*10 ⁶	1,0*10 ⁷
24 ore dopo salamoia	2,4*10 ⁷	9,4*10 ⁸	1,0*10 ⁹	4,4*10 ⁵	1,0*10 ⁵	2,0*10 ⁶
Dopo 7 giorni	1,4*10 ⁶	2,0*10 ⁹	2,0*10 ⁹	8,8*10 ⁷	1,1*10 ⁵	1,2*10 ⁷
Dopo 1 mese	2,0*10 ⁷	1,0*10 ⁸	5,3*10 ⁷	4,0*10 ⁶	9,8*10 ⁵	9,0*10 ⁴
Fine stagionatura (2 mesi)	4,2*10 ⁸	5,0*10 ⁹	4,0*10 ⁹	5,0*10 ⁶	5,0*10 ⁵	2,3*10 ⁸

Tabella 67 – Cangello: risultati delle analisi microbiologiche. Risultati, espressi come ufc/g, sono la media di tre prelievi.

E' possibile osservare che nel latte si registrano valori di carica batterica totale elevati, dell'ordine di 10⁷ ufc/ml, tuttavia la situazione igienica è apparsa confortante: infatti il numero

dei coliformi totali, è risultato contenuto e sempre assenti quelli fecali. Ridotta è apparsa anche la presenza *Staphylococcus aureus*, ritrovato nel latte con valori mai superiori alle 1000 ufc/ml.

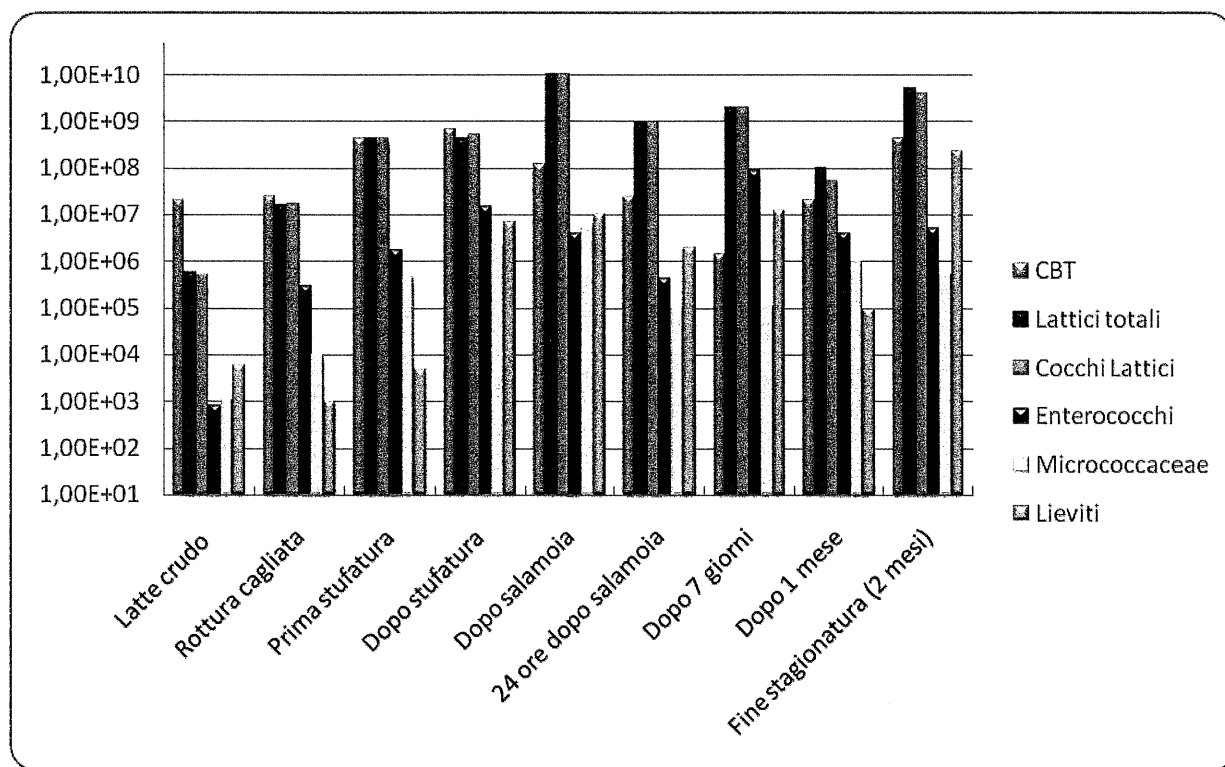


Figura 68 – Canello: popolazione microbica riscontrata durante la lavorazione.

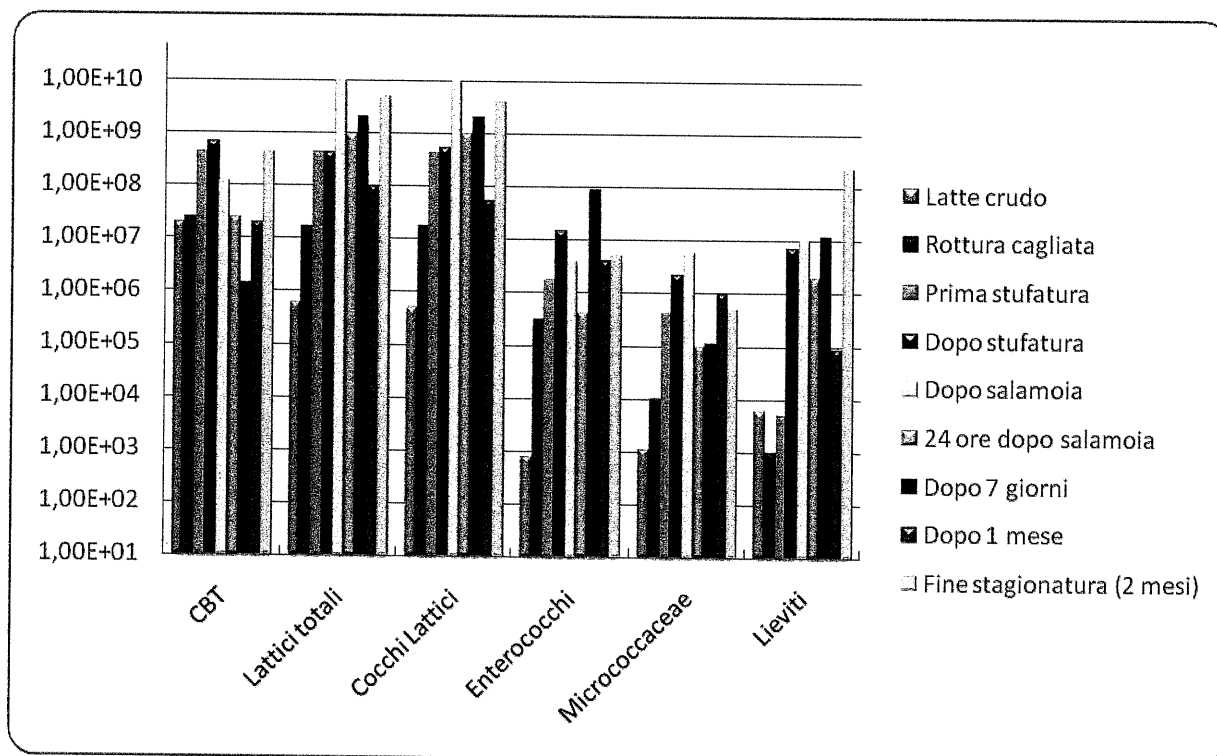


Figura 69 – Cannello: distribuzione dei differenti gruppi microbici in funzione delle fasi di lavorazione.

La Figura 70 riporta l'evoluzione nel tempo dei batteri lattici. Le forme a cocco omofermentanti rappresentano la componente lattica maggioritaria: il loro numero si sovrappone durante tutta la produzione a quello dei batteri lattici. La loro concentrazione aumenta in modo continuo dalla formazione della cagliata sino alla fase della salamoia, quando si registra un picco pari a $1 \cdot 10^{10}$ ufc/g grazie alla presenza di temperature ideali per la crescita durante la stufatura; successivamente dopo una lieve riduzione nelle prime 24 ore di stagionatura, dovuta probabilmente all'azione della salamoia stessa, si stabilizza intorno a valori di 10^9 ufc/g fino a fine stagionatura.

Gli enterococchi seguono, un andamento molto simile ai cocchi lattici benché il loro numero sia sempre di circa due ordini di grandezza inferiore (Figura 70). La loro presenza comunque contribuisce al conferimento delle caratteristiche sensoriali del prodotto finito svolgono importanti modificazioni biochimiche a carico della componente lipidica e proteica del formaggio contribuendo alla formazione di peptidi e acidi grassi a corta catena in grado di conferire gusto e aroma caratteristici.

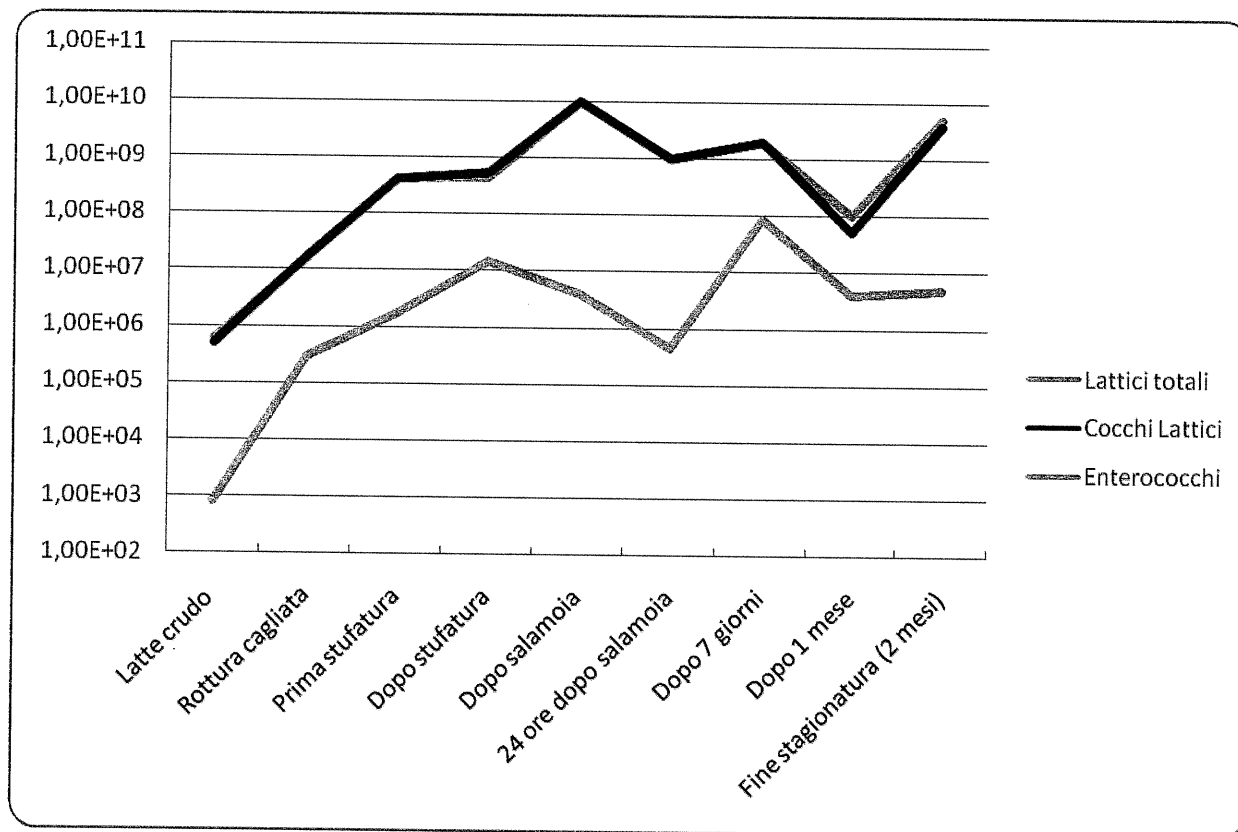


Figura 70 – Cannello: evoluzione dei batteri lattici.

Nella Figura 71 si può osservare come le Micrococcaceae, in numero contenuto nel latte, vadano incontro ad un progressivo aumento sino alla fase della salamoia in corrispondenza della quale si attestano su valori di 10^6 ufc/g con un incremento complessivo di 3 ordini di grandezza. Successivamente il loro numero subisce una lieve contrazione nelle prime 24 ore di stagionatura per poi assestarsi su valori dell'ordine di 10^5 ufc/g. Anche le Micrococcaceae svolgono importanti funzioni che si ripercuotono sulle caratteristiche qualitative del formaggio caprino, esse, infatti, prevengono l'irrancidimento dei grassi decomponendo l'acqua ossigenata prodotta da altri microrganismi e creano un ambiente riducente per riduzione dei nitrati; inoltre hanno una maggiore attività lipolitica e proteolitica rispetto ai fermenti lattici e sono in grado di metabolizzare aminoacidi e acidi grassi producendo composti importanti per il sapore e l'aroma del prodotto finito.

A fronte di una modesta presenza di muffe (Figura 72), anche a livello di crosta, si osserva una importante presenza di lieviti che presentano un andamento del tutto confrontabile a quello delle Micrococcaceae (Figura 71). La minor presenza di muffe può essere dovuta alla maggior attenzione all'igiene del locale di produzione alla minor numero di aperture verso l'ambiente esterno.

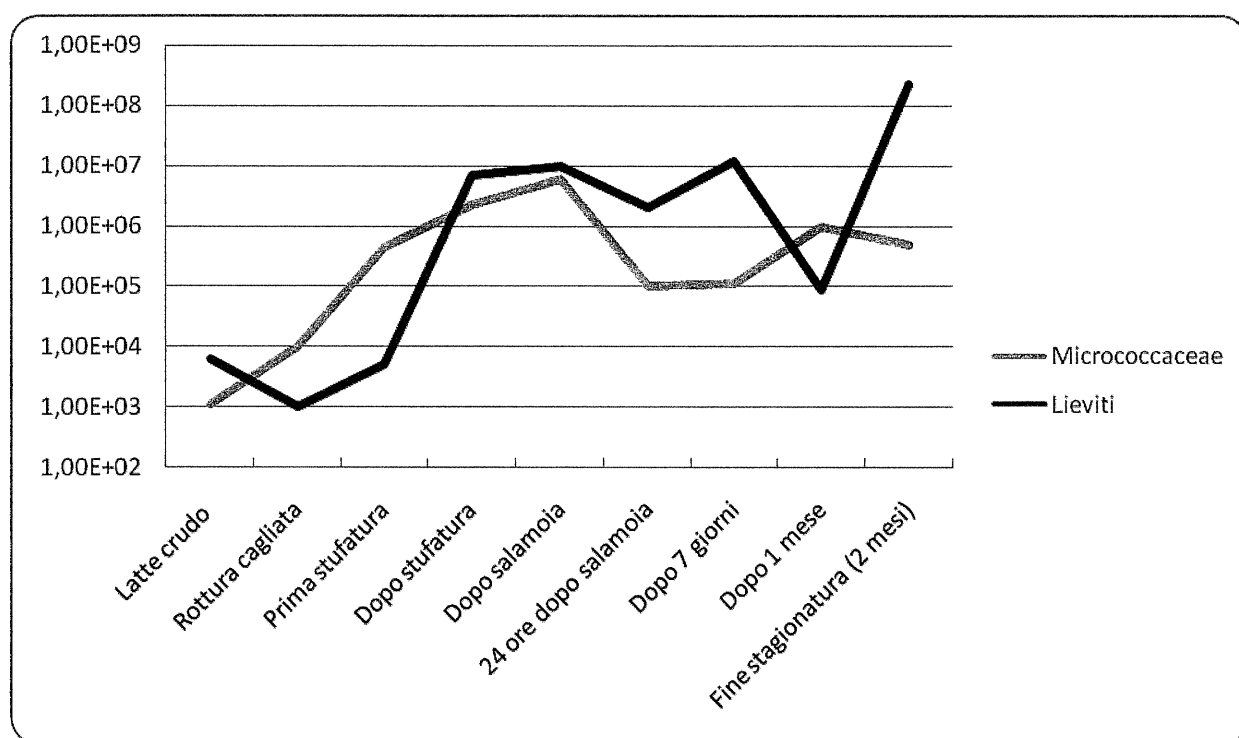


Figura 71 - Canello: evoluzione delle Micrococcaceae e dei lieviti.

La Figura 70 mostra la distribuzione microbica tra la pasta e la crosta del formaggio. Anche in questo caso risulta maggiormente contaminata la crosta sia per quanto riguardano le muffe, i lieviti, le Micrococcaceae e gli enterococchi. La pasta è invece maggiormente ricca di Batteri lattici tra cui i cocchi lattici rappresentano la maggior frazione.

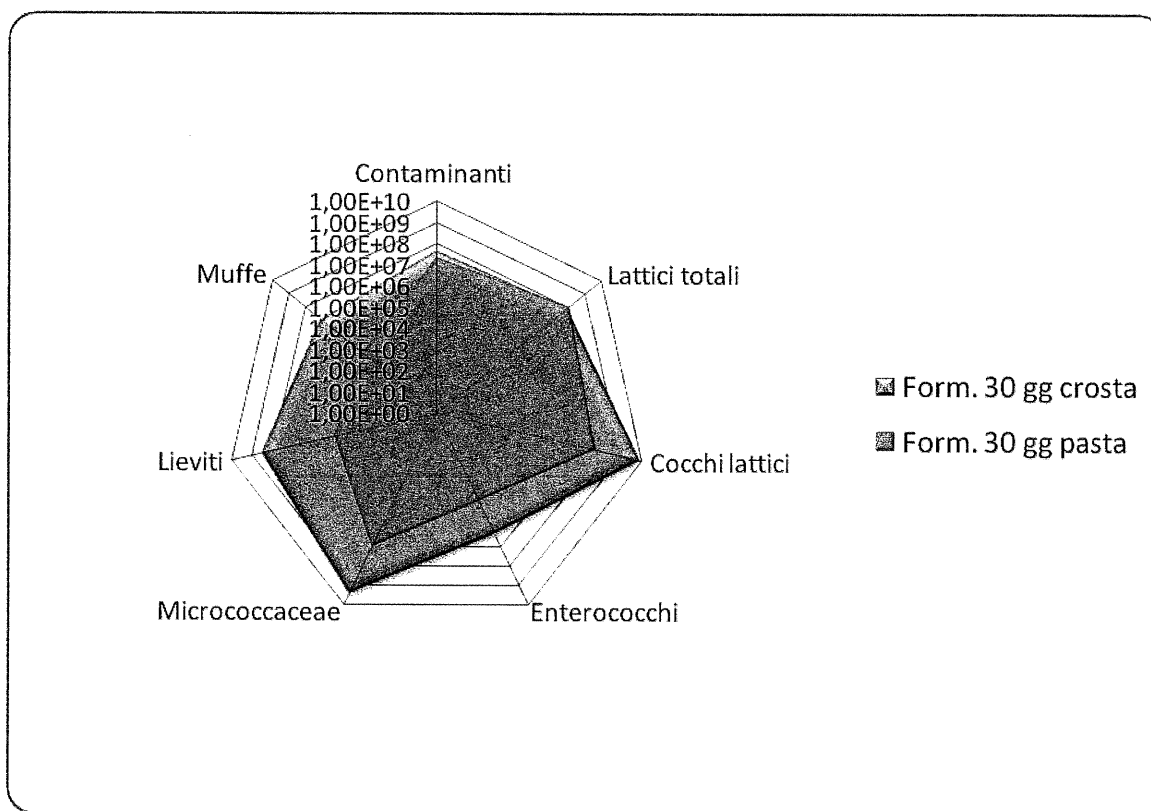


Figura 72: Distribuzione microbica tra crosta e pasta del formaggio stagionato 30 giorni.

Anche per il caseificio di Cangello è stata effettuata la ricerca di due patogeni tipici delle matrici alimentari: la *Listeria monocytogenes* e le *Salmonelle spp.* L'analisi è stata effettuata sul latte crudo, sull'acqua della salamoia e sul formaggio dopo una settimana dalla salatura riposto quindi nel locale di stagionatura. L'indagine della *L. monocytogenes* ha dato esito negativo in tutti i campioni, è quindi assente in 25g. La ricerca delle *Salmonelle spp.* è risultata negativa, assente in 25ml, sia nel latte crudo sia nel formaggio, ma è risultata presente nell'acqua della salamoia. La presenza della salmonella nell'acqua della salamoia è stato riscontrato in un unico prelievo e quindi potrebbe essere una contaminazione casuale. La nota positiva è che il patogeno non è stato rilevato nel formaggio ad inizio stagionatura e quindi la *Salmonella spp.* non è sopravvissuta alla fase di maturazione della toma a causa probabilmente della forte competizione da parte di altri batteri, lattici e non lattici, dalla possibile presenza di batteriocine inibitrici di batteri patogeni e dalle condizioni di crescita non ideali.

4.2.2 CONDIZIONI AMBIENTALI

Qualità microbiologica dell'aria e delle superfici

I risultati sono riportati nelle tabelle 73 e 74.

Locale	Posizione	Aria (ufc/m ³)		
		CBT	Lieviti	Muffe
lavorazione	Davanti caldaia	3,0	assenti	assenti
	Centro locale	4,0	assenti	assenti
	Media	3,5	assenti	assenti
salatura/asciugatura	Centro locale	5	assenti	assenti

Tabella 73: Qualità microbiologica dell'aria.

La qualità microbiologica dell'aria è risultata piuttosto buona. In particolare il numero dei microrganismi per m³ di aria è apparso molto contenuto, mai superiore alle 5 ufc/m³. Ottima la situazione per quanto riguarda gli eumiceti (lieviti e muffe) sempre assenti.

Per quanto riguarda le superfici i risultati sono riportati nella tabella sottostante.

	CBT (ufc/cm ²)	Muffe (ufc/cm ²)	Lieviti (ufc/cm ²)	RLU
Cestello plastica prima lavaggio	2,9x10 ²	2,4	5	3700
Cestello plastica dopo lavaggio	<10	<10	2,4	280
Parete PVC	<1	<1	<1	69
Parete dietro camino (lamina metallica)	<1	<1	<1	150
Asse per maturazione (esterno)	<1	10	<10	7400

Asse per maturazione (interno)	1400	10	70	84000
--------------------------------	------	----	----	-------

Tabella 74: Qualità microbiologica delle superfici di lavoro.

La situazione nonostante si tratti di un alpeggio è più che confortante, le migliorie strutturali apportate nel locale di lavorazione hanno, come si evince dai risultati riportati in tabella, dato i loro risultati. L'utilizzo di materiale liscio, privo di asperità, facilmente lavabile ed a cui il microrganismi aderiscono con difficoltà, come PVC e lamine in metallo ha semplificato al massimo le operazioni di pulizia, che peraltro viene svolta con particolare cura dei due addetti. A dimostrazione di ciò è la forte riduzione della CBT sui cestelli dopo il lavaggio.

4.3 ALPE MERA

4.3.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

Dalla tabella 75 e dalle figure 76 e 77 si evince la situazione microbiologica durante la lavorazione del formaggio caprino.

Fase lavorazione	CBT	Lattici totali	Cocchi Lattici	Enterococchi	Micrococcaceae	Lieviti
Latte crudo	$1,4 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^2$	$4,4 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^2$
Dopo rottura	$1,1 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^1$
Formatura	$1,6 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^5$	$8,9 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^2$	$6,0 \cdot 10^4$	$4,8 \cdot 10^3$
Dopo 24 ore	$2,3 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^6$
Dopo 48 ore	$3,2 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^9$	$4,4 \cdot 10^9$	$4,4 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^5$
Formaggio 15 giorni	$4,3 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^8$	$6,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^5$
Fine stagionatura (2 mesi)	$1,5 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^8$	$8,3 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^5$

Figura 75: Alpe Mera: risultati delle analisi microbiologiche. Risultati, espressi come ufc/g, sono la media di tre prelievi.

Il latte crudo ha una carica batterica totale pari a $1,4 \cdot 10^6$ ufc/ml ed è stata rilevata la presenza di coliformi fecali nell'ordine delle $1,3 \cdot 10^3$ ufc/ml. La presenza di coliformi fecali è da attribuire ad una possibile contaminazione durante la mungitura, avvenuta probabilmente in condizioni igieniche non perfettamente idonee. Nello stesso latte è stato inoltre riscontrato in quantità pari a $4,4 \cdot 10^4$ ufc/ml anche *Staphylococcus aureus* indice di una contaminazione umana del prodotto

oppure, come sottolineato per le altre realtà produttive esaminate, per problematiche derivanti dall'animale stesso. Tuttavia la presenza del patogeno, possibile produttore di enterotossine, non è stata confermata durante la lavorazione. Questo fatto avvalorava maggiormente l'ipotesi di una derivazione zoologica del batterio e non umana, che si sarebbe protratta e accentuata durante le fasi di caseificazione.

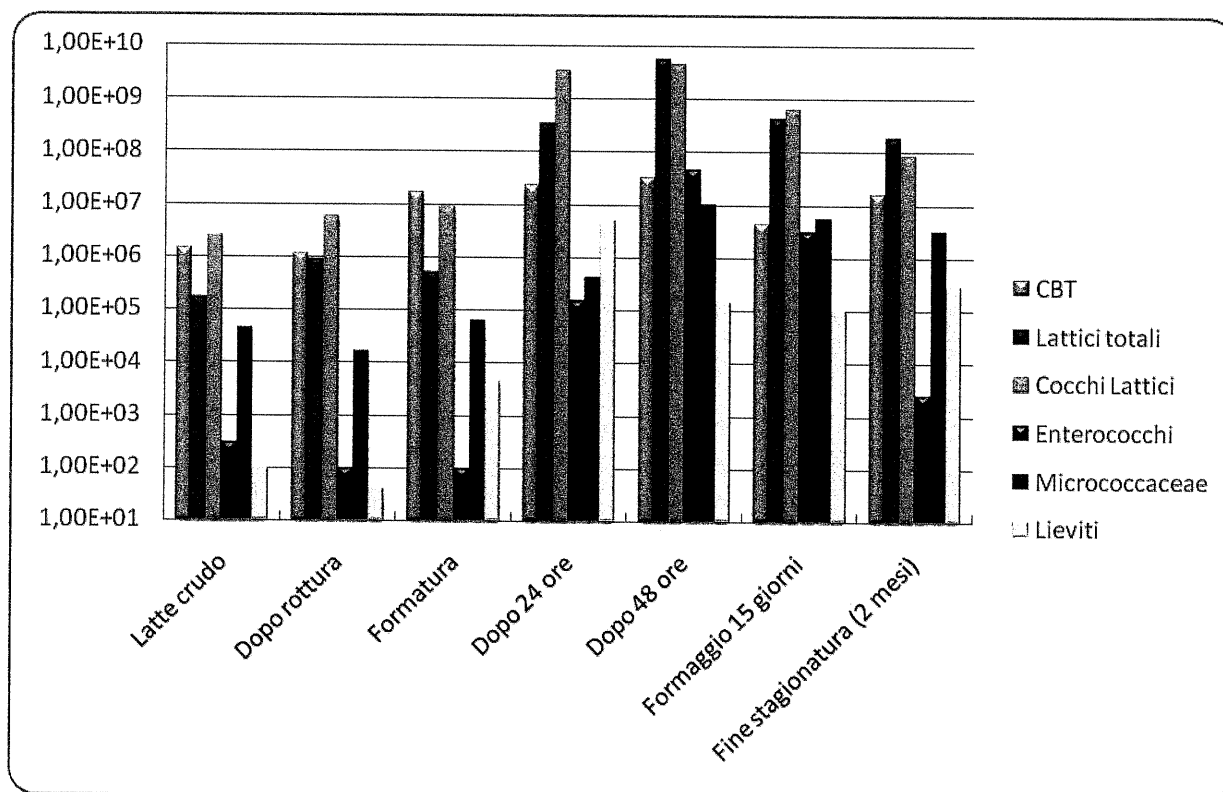


Figura 76: Alpe Mera: popolazione microbica riscontrata durante la lavorazione.

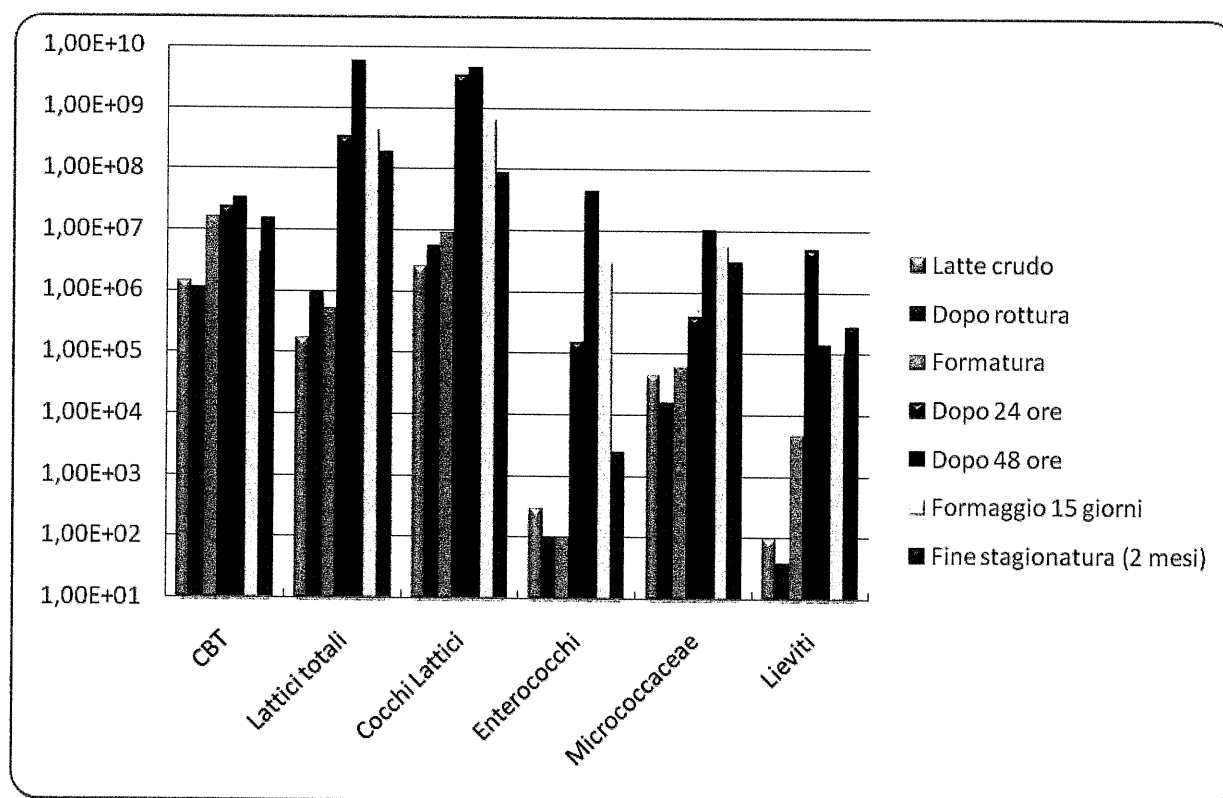


Figura 77: Alpe Mera: evoluzione dei vari gruppi microbici.

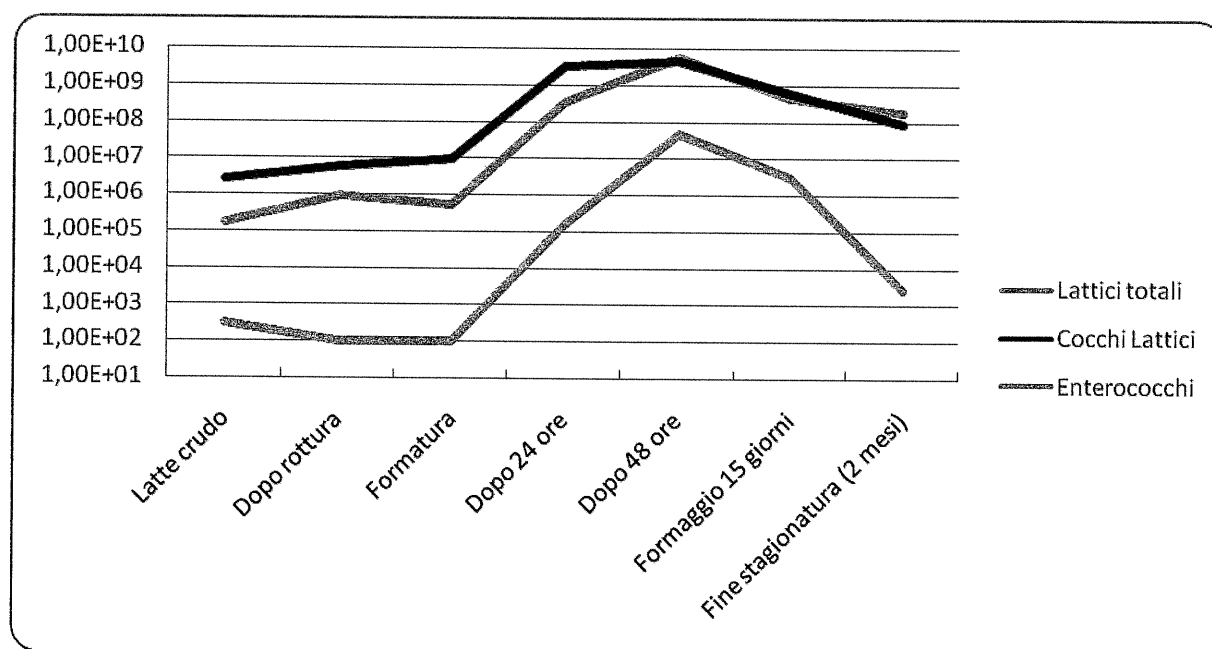


Figura 78: Alpe Mera: evoluzione dei batteri lattici e degli Enterococchi.

Come si osserva dalla Figura 78 la componente lattica è costituita anche in questo caso quasi esclusivamente da forme a cocco omofermentanti; già numericamente elevati nel latte si

mantengono su valori confrontabili nelle prime fasi della lavorazione per poi subire un forte incremento dalla formatura sino all'inizio della stagionatura durante la quale si assestano intorno a valori dell'ordine di 10^9 ufc/g per iniziare a decrescere durante la stagionatura che per questo tipo di toma caprina si protrae per oltre due mesi e causa un'inevitabile lisi di molti batteri lattici, che per continuare a moltiplicarsi, necessitano di condizioni ambientali e culturali molto più esigenti rispetto ad altre forme batteriche o fungine.

Gli Enterococchi decisamente poco rappresentati nel latte crudo e nelle primissime fasi di lavorazione, assumono importanza dalla fase di formatura in poi quando aumentano di ben quattro ordini di grandezza raggiungendo valori quasi confrontabili ai cocchi lattici. Questo delinea la loro quasi certa provenienza dall'ambiente esterno e non possono quindi essere considerati microflora tipica del latte caprino. La loro presenza in concentrazione di 10^7 ufc/ml riveste comunque un importante ruolo biochimico nel conferimento delle caratteristiche sensoriali del prodotto, in particolar modo su quelle olfattive ed aromatiche. La stagionatura successivamente ne provoca una significativa riduzione a valori di 10^3 ufc/ml. Il mantenimento a concentrazioni elevate degli Enterococchi sul formaggio a fine stagionatura avrebbe creato difetti qualitativi indesiderati sul prodotto, oltre che un rischio igienico che non sarebbe stato possibile trascurare.

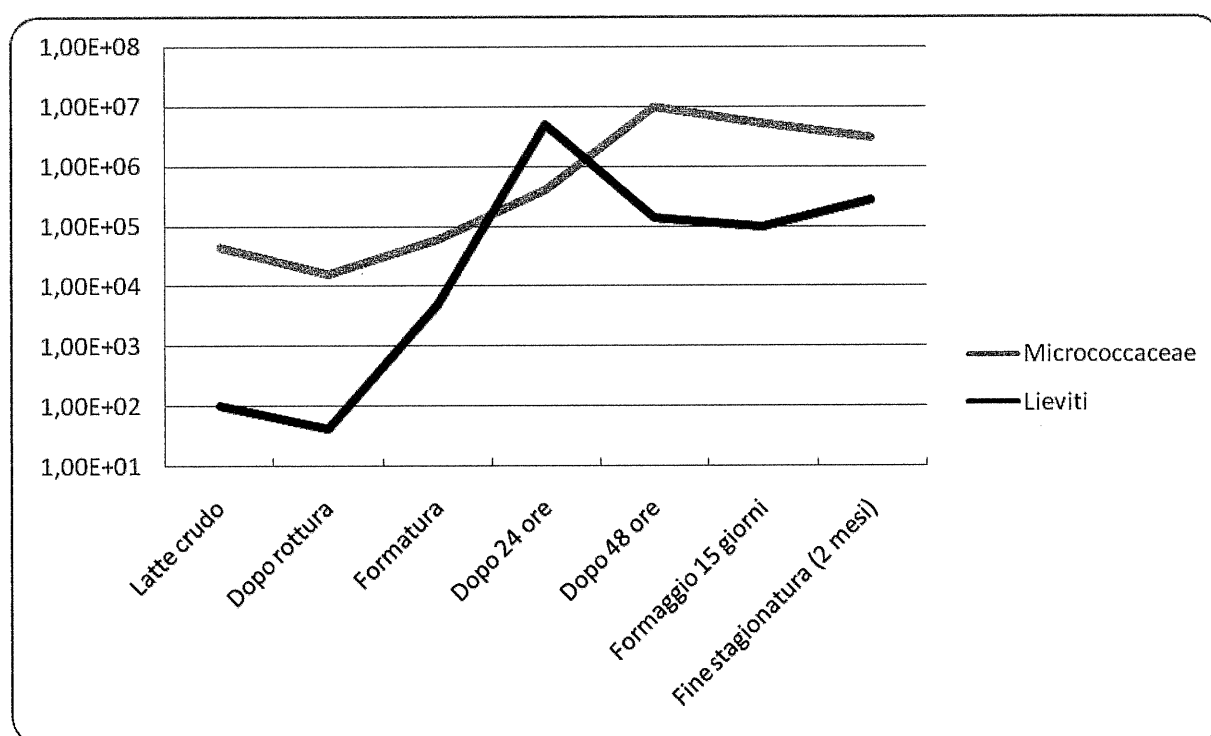


Figura 79: Alpe Mera: evoluzione dei lieviti e delle Micrococccaceae.

La Figura 79 evidenzia l'importanza dei lieviti, il cui numero subisce un continuo incremento sino dall'inizio della lavorazione per raggiungere il picco massimo (10^7 ufc/ml) con l'inizio della stagionatura durante la quale il loro numero sempre non trascurabile, si contrae ($5 \cdot 10^5$ ufc/ml). Anche in questo caso la scarsa presenza di lieviti nel latte crudo fa presupporre la loro presenza nel prodotto successivamente ad una contaminazione ambientale. Le favorevoli condizioni del substrato (presenza di lattosio, proteine e micronutrienti) ed ambientali (temperatura ed umidità) hanno permesso un rapido accrescere della concentrazione di lieviti che poi inevitabilmente con la restrizione dei presupposti sopra descritti si sono ridotti.

Si osserva inoltre una importante presenza di Micrococcaceae che, nonostante valori numerici iniziali elevati e quindi presenti fin dall'inizio nel latte crudo, incrementano ulteriormente durante tutta la lavorazione raggiungendo valori di 10^7 ufc/ml. Come accennato anche nelle relazioni dei caseifici precedenti le Micrococcaceae hanno una maggiore attività lipolitica e proteolitica rispetto ai fermenti lattici e sono in grado di metabolizzare aminoacidi e acidi grassi producendo composti importanti per il sapore e l'aroma oltre che conferire note cromatiche sulla crosta della toma caprina.

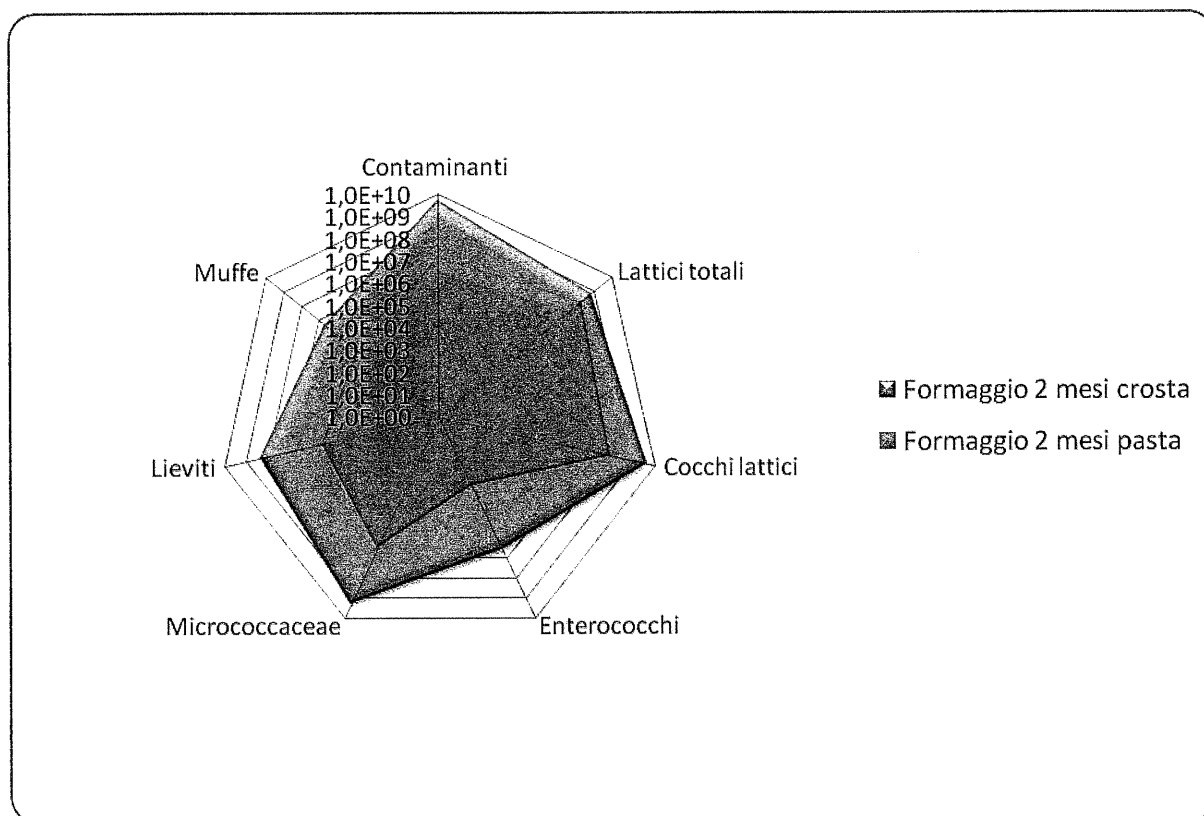


Figura 80: Distribuzione microbica tra crosta e pasta del formaggio a fine stagionatura.

Come si può osservare dal grafico in Figura 80 la crosta e gli strati appena sottostanti presentano un'elevata concentrazione e variabilità microbica, con significativa prevalenza di Micrococcaceae ed Enterococchi oltre che i classici lieviti e muffe di certa derivazione ambientale, ma che svolgono sulla crosta importanti attività enzimatiche che si ripercuotono in modo preponderante sulle caratteristiche qualitative del prodotto, in particolare nella maturazione degli strati sottostanti la crosta rispetto a quelli presenti al centro della toma caprina.

Anche per il caseificio posto in località Mera è stata effettuata la ricerca dei patogeni quali *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* I campionamenti effettuati sul latte crudo e sul formaggio a fine stagionatura hanno dato esito negativo che dal punto di vista della legislazione comunitaria corrisponde ad una assenza in 25 grammi di prodotto.

4.3.2 CONDIZIONI AMBIENTALI

Qualità microbiologica dell'ambiente di lavoro

L'aria presenta una buona qualità microbiologica (Tabella 81): il numero di microrganismi per m³ di aria evidenziato nell'unico locale di lavorazione appare infatti molto basso. L'unico valore che supera le 10 ufc è stato ritrovato nella cella di stagionatura e come prevedibile limitatamente alle muffe. L'attenzione prestata dagli addetti nella chiusura delle porte, finestre e nel limitare il più possibile spostamenti inutili da un locale all'altro dà buoni risultati.

Locale	Posizione	Aria (ufc/m ³)		
		CBT	Lieviti	Muffe
lavorazione	Centro locale	2,0	Assenti	0,5
	Finestra	2,7	0,15	0,5
	Media	2,4	0,08	0,5
stagionatura	Centro locale	2,2	0,9	14

Tabella 81: Qualità microbiologica dell'aria.

Confortante appare anche lo stato igienico delle superfici (Tabella 82). La discreta carica microbica riscontrata sui piani di legno dove vengono alloggiate le forme di formaggio trova giustificazione nel fatto che a seguito dello spazio ridotto le superfici testate sono sempre utilizzate. La carica microbica è per lo più costituita da lieviti che rappresentano almeno a livello di ambiente la componente microbica dominante. Si tratta degli stessi lieviti ritrovati poi nel prodotto e che a seguito della porosità del materiale sono allontanati con difficoltà, ma che contribuiscono a caratterizzare la qualità del formaggio durante la sua maturazione ed a conferirgli peculiari caratteristiche tipizzanti l'ambiente di lavorazione.

	CFU u/c/cm ²	Coliformi totali	Coliformi fecali	Lieviti	Muffe
Piastrella parete dietro caldaia	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti
Cappa aspirazione sopra caldaia	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti
Piano acciaio per sgocciolamento	1,1x10 ³	Assenti	Assenti	1,1x10 ³	Assenti
Griglia sgocciolamento	1,2x10 ³	Assenti	Assenti	1,2x10 ³	Assenti
Parete	2	Assenti	Assenti	Assenti	Assenti
Asse legno prima salamoia	3,0x10 ⁵	Assenti	Assenti	2,4x10 ³	3,6x10 ²
Asse legno dopo salamoia	1,3x10 ⁶	Assenti	Assenti	3,6x10 ⁴	2,0x10 ³
Asse legno cantina	1,0x10 ⁴	Assenti	Assenti	4,4x10 ²	5,2x10 ⁴

Tabella 82: Qualità microbiologica delle superfici di lavoro.

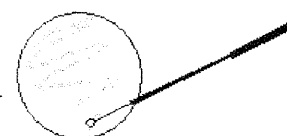
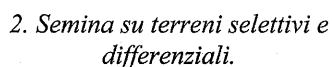
4.4 CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE

Ruolo di primaria importanza nella caratterizzazione microbiologica dei formaggi caprini dei caseifici sopra descritti è stata la microbiologia molecolare. Le colonie presenti nei differenti terreni colturali dopo la conta, sono state prelevate sterilmente, purificate mediante ripetuti strisci e passaggi in brodo culturale ed infine si è proceduto all'estrazione del DNA genomico attraverso procedura di "Mini Lisi".

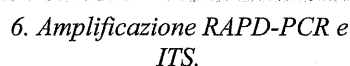
I differenti DNA estratti sono stati quindi sottoposti ad amplificazione RAPD-PCR al fine di raggrupparli in funzione del tracciato elettroforetico e per conferma anche ad amplificazione della regione spaziatrice ITS. Si è preso quindi un rappresentante per ogni gruppo formatosi e si è proceduto all'amplificazione della regione 16S rDNA e con l'appoggio di una ditta esterna è stato effettuato il suo parziale sequenziamento. Ottenuta la sequenza nucleotidica è stato possibile, con l'ausilio di banche dati specializzate, risalire al genere e alla specie di quei batteri che facevano parte di quel determinato gruppo.

In ultima analisi attraverso la codifica attribuita alle differenti colonie prelevate dalle piastre è stato possibile fare il percorso a ritroso del batterio, "rintracciando" il terreno culturale da dove è stato prelevato, il caseificio da cui proveniva, la fase di lavorazione dove è stato prelevata la matrice alimentare che lo conteneva e al periodo temporale di prelievo.

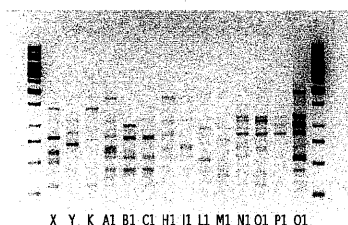
Di seguito viene proposta una schematizzazione della modalità operative seguite durante il lavoro di tesi, per passare successivamente all'analisi dettagliata di ognuno dei tre gruppi batterici di interesse caseario citati.



3. *Prelievo colonie e loro codifica.*



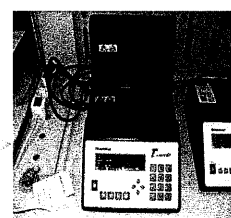
4. Purificazione colonie e visione al microscopio.



7. Corsa elettroforetica dell'amplificato.

	CODIFICA CEPP1		CODIFICA CEPP1		CODIFICA CEPP1
A	286, 243, 231, 242, 248, 145, 118, 116, 117, 119, 128, 133, 247, 245, 259, X509, 144, 122, 121, 141, X523, 131, 120, 124, 130, 132, 134, 138, 234, Z19, 241	P	UcR6, 665, YP10, LCR6, CaCR6, CaCR5, UCR6, 608, 609, 610, 602, YC13, YP8, 601, YP12, YC11, 603, 143	H1	X522, X500, Z31, Z12
B	Z52, 217, X514	U	CaCR7	I1	262, 300, Z57, 263
C	Z6, 270, Z73	Y	UCR4	L1	Z35
D	Z6, 270, Z73, Z58	X	X517, Z59	M1	Z7
E	Z6, 210, Z3, Z13, Z8, Z16, Z12, Z72, Z58, Z1, Z13	X		R	607
F	Z63, 284, Z33, Z13, Z12, Z32	Q	604	O	YP19, YC15, YC14, Z13
G	Z14, Z15	CA	Z54	N1	Z56
H	X504, X512, X518, X508, 125, X507, X513, 140, Z88	X	Z68, Z64	O1	Z85
I	X516, 136, X519, 123, 137, 131, X502, 136, 142, X501, X505, X520, Z61	K	Z67, Z78	P1	137
L	Z21, Z20, Z77	A1	Z40, Z60	Q1	Z1, Z5, Z2, Z7
M	Z76	B1	Z74	S	608
N	LCR1, LCR5, LCR6, CaCR2, CaCR3, CaCR4				

8. Raggruppamento.

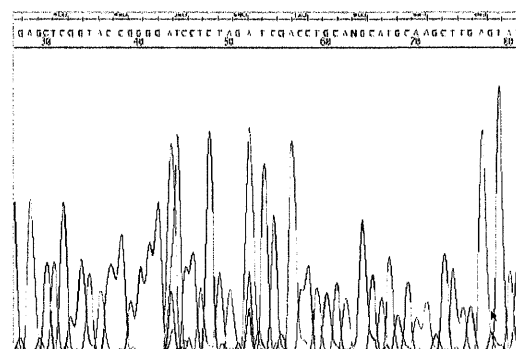


9. Amplificazione 16S rDNA.

12.
***Individuazione
genere e specie
del ceppo
batterico.***

[illegible]

11. Consultazione banca dati microbiologica.



10. Sequenziamento.

4.4.1 ENTEROCOCCHI

Dai campioni alimentari prelevati nei tre distinti caseifici della Valsesia dal terreno KEA, specifico per la ricerca degli enterococchi, sono state prelevate 160 colonie. Dopo essere state ristrisciate e osservate al microscopio per accertarne la purezza si è passati all'estrazione del DNA e alla successiva amplificazione RAPD-PCR con primer universale M13 (Figura 83) e ad analisi della regione spaziatrice ITS con primers specifici (Figura 84). Questo ha reso possibile il raggruppamento dei 160 isolati in 34 cluster riportati in tabella 85.

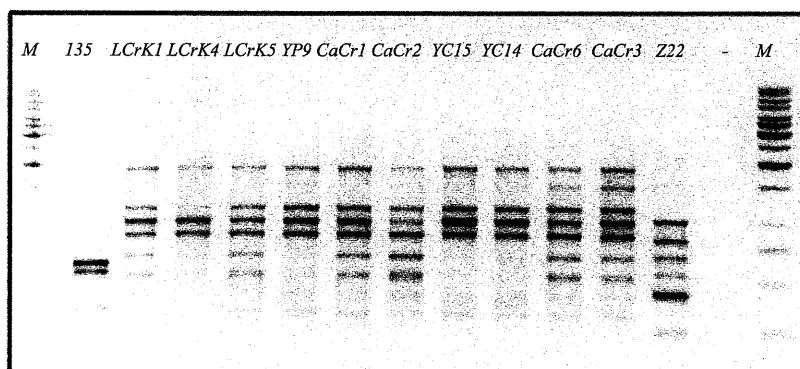


Figura 83: Esempio gel amplificazione RAPD-PCR con primer M13. Marker 100 bp.

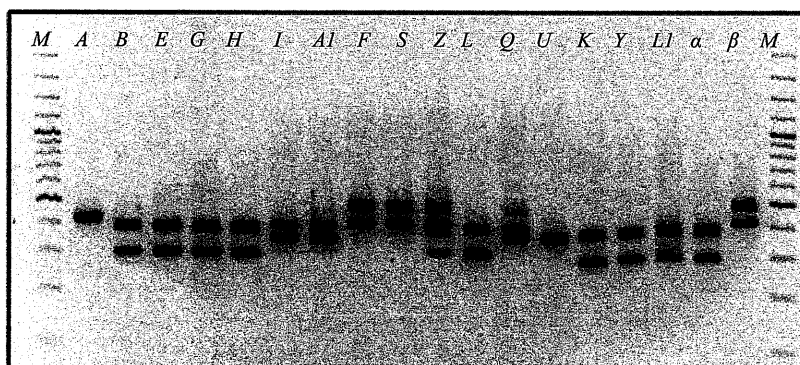


Figura 84: Gel amplificazione ITS di enterococchi. Marker 100 bp. α: *E. faecalis*. β: *E. faecium*.

GRUPPI	CODIFICA CEPPI		CODIFICA CEPPI		CODIFICA CEPPI
A	Z46, Z43, Z51, Z42, Z48, 145, 118, 116, 117, 119, 128, 133, Z47, Z45, 129, X509, 144, 122, 121, 141, X523, 131, 120, 124, X510, 132, 134, 135, Z24, Z19, Z41	T	600, X511	H1	X522, X500, Z31, Z22
B	Z52, Z17, X514	U	CaCrK7	I1	Z62, Z30, Z57, Z63
C	Z9, Z70, Z73	V	LCrK4	L1	Z35
D	Z80, Z69, Z53, Z58	Z	Z28	M1	Z37
E	Z6, Z10, Z3, Z13, Z8, Z16, Z12, Z72, Z65, Z11, Z79	X	X517, Z59		
F	Z83, Z84, Z33, Z34, Z55, Z32	W	Z36, X503		
G	Z14, Z15	J	X508	N1	Z56
H	X504, 127, X512, X518, X506, 125, X507, X513, 140, Z86	Y	Z68, Z64	O1	Z85
I	X516, 138, X519, 123, 137, X515, X502, 136, 142, X501, X505, X520, Z61	K	Z67, Z78	P1	YP11
L	Z21, Z20, Z77	A1	Z40, Z60	Q1	Z1, Z5, Z2, Z7
M	Z76	B1	Z74		
N	LCrK1, LCrK5, CaCrK1, CaCrK2, CaCrK6, CaCrK3	C1	Z54		
O	YP9, YC15, YC14, LCrK4	D1	Z18, Z25, Z29		
P	LCrK6, 605, YP10, LCrK2, CaCrK4, CaCrK5, LCrK3, 609, 606, 610, 602, YC13, YP8, 601, YP12, YC11, 603, 143	E1	Z75		
Q	604	F1	Z66, Z23		
R	607	G1	Z49		
S	608				

Figura 85: Ceppi presenti in ogni gruppo di enterococchi.

Successivamente si è proceduto all'amplificazione della regione ribosomale 16S rDNA e al suo successivo sequenziamento parziale. Dall'analisi delle sequenze in banca dati le specie ritrovate

sono state: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gilvus* ed *Enterococcus gallinarum*.

Per tre gruppi, I, A1 e II, il raffronto delle sequenze in banca dati ha dato la stessa percentuale di similarità tra due specie di enterococchi: *E. durans* ed *E. hirae*. A questo punto si è ricorsi alla restrizione del DNA mediante l'enzima *TaqI*. Come mostrato in Figura 86 tutti e tre i rappresentanti dei tre gruppi hanno dato tre bande di 100, 600 e 800 bp tipiche della specie *E. durans* (DSM2 20633^T).

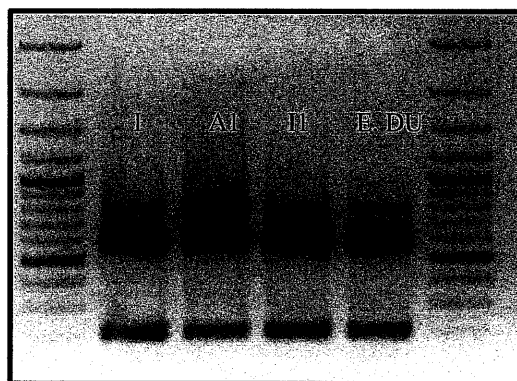


Figura 86: Corsa elettroforetica dopo restrizione del DNA genomica con enzima *TaqI*. Si osserva lo stesso tracciato del ceppo di *E. durans*.

Un'altra considerazione che è stato possibile effettuare sugli enterococchi ritrovati nei formaggi è che, come mostrato anche nella corsa elettroforetica nella Figura 83, alcuni rappresentanti dei gruppi nonostante mostrassero uno stesso profilo ITS e dal sequenziamento si constatava appartenessero alla stessa specie e ceppo, mostravano un profilo RAPD differente. Questo può essere spiegato dal fatto che potrebbe esistere una biodiversità a livello di genotipo in quanto la RAPD a differenza dell'ITS e del parziale sequenziamento del 16S amplifica su tutto il DNA genomico ed è quindi in grado di rilevare diversità in zone meno conservate del DNA. E' questo il caso, per esempio, dei gruppi "B e H" che hanno uno stesso profilo ITS, entrambi sono *E. faecalis*, ma mostrano un profilo RAPD differente (vedi Figure 83 e 84).

Le tabelle 85-87 riportano le specie ritrovate in funzione della fase di lavorazione per ciascun caseificio.

CARCOFORO		
Provenienza	Sigla	Identificazione
Latte	LCrK1, LCrK2, LCrK3, LCrK4, LCrK5, LCrK6.	<i>E. faecalis</i>
Cagliata	CaCrK1, CaCrK2, CaCrK3, CaCrK4, CaCrK5, CaCrK6.	<i>E. faecalis</i>
Prima della salamoia	605, 606, 609, 610.	<i>E. faecalis</i>
	608	<i>E. faecium</i>
Dopo la salamoia	601, 602, 603.	<i>E. faecalis</i>
Formaggio a fine stagionatura	YP8, YP9, YP10, YP11, YP12, YC11, YC13, YC14, YC15.	<i>E. faecalis</i>

Figura 85: Carcoforo: risultati della caratterizzazione genomica degli enterococchi.

CANGELLO		
Provenienza	Sigla	Identificazione
Latte	X512, X513, X514.	<i>E. faecalis</i>
	X517.	<i>E. gilvus</i>
	X515, X516.	<i>E. durans</i>
Dopo stufatura	140.	<i>E. faecalis</i>
	136, 137, 138.	<i>E. durans</i>
Dopo la salamoia	143.	<i>E. faecalis</i>

	142.	<i>E. durans</i>
Formaggio 24 ore	X507.	<i>E. faecalis</i>
Formaggio 7 giorni	X518.	<i>E. faecalis</i>
	X522.	<i>E. gilvus</i>
	X519, X520.	<i>E. durans</i>
Formaggio 30 giorni	X504, X506.	<i>E. faecalis</i>
	X500.	<i>E. gilvus</i>
	X501, X502, X505.	<i>E. durans</i>
Formaggio fine stagionatura (2 mesi)	125.	<i>E. faecalis</i>
	123.	<i>E. durans</i>

Figura 86: Canello: risultati della caratterizzazione genomica degli enterococchi.

ALPE MERA		
Provenienza	Sigla	Identificazione
Cagliata dopo rottura	Z40.	<i>E. durans</i>
Formaggio 24 ore	Z28.	<i>E. faecium RJ</i>
	Z31.	<i>E. gilvus</i>
	Z30.	<i>E. durans</i>
Formaggio 48 ore	Z3, Z6, Z8, Z9, Z10, Z11, Z12, Z13, Z65, Z69, Z70, Z72, Z73, Z86.	<i>E. faecalis</i>

	Z1, Z2, Z5, Z7, Z14, Z15.	<i>E. faecalis</i> PFK3
	Z74, Z76, Z77.	<i>E. gilvus</i>
	Z64, Z68.	<i>E. casseliflavus</i>
Formaggio 15 giorni	Z79, Z80, Z85.	<i>E. faecalis</i>
	Z32, Z33, Z34, Z83, Z84.	<i>E. faecium</i> STP
Formaggio 2 mesi	Z16, Z17, Z52, Z53, Z56, Z58.	<i>E. faecalis</i>
	Z55.	<i>E. faecium</i>
	Z20, Z21, Z22, Z54, Z59.	<i>E. gilvus</i>
	Z57, Z60, Z61, Z62, Z63.	<i>E. durans</i>

Figura 87: Alpe Mera: risultati della caratterizzazione genomica degli enterococchi.

Presso il caseificio di fondovalle, Carcoforo, sono stati identificati solo due specie di Enterococchi: *E. faecalis* e *E. faecium*. Ma mentre *E. faecalis* è stato ritrovato in tutte le fasi di produzione, mentre *E. faecium* limitatamente allo stadio precedente alla salamoia.

La realtà di Cangello ha rivelato una variabilità maggiore, oltre al *E. faecalis*, presente anche in questo caso lungo tutta la lavorazione, sono stati individuati l' *E. gilvus* e l' *E. durans*.

Infine, osservando i risultati inerenti l'alpeggio di Mera, si riscontra una variabilità ancor più pronunciata, in quanto sono stati identificati sette ceppi ascrivibili a cinque diverse specie. A differenza delle precedenti produzioni, *E. faecalis* non è presente in tutte le fasi lavorative e si notano invece ceppi non rinvenuti né a Cangello né a Carcoforo, come *E. faecium* RJ, *E. faecalis* PFK3, *E. casseliflavus* e *E. faecium* STP.

4.4.2 BATTERI LATTICI

Per la ricerca dei batteri lattici presenti nel latte crudo caprino, nella cagliata in lavorazione e nel formaggio caprino a fine maturazione si sono utilizzati due terreni culturali specifici: MRS (per la ricerca dei lattici totali) e M17 (per la ricerca dei cocchi lattici). Sono state prelevate 121 colonie dal terreno MRS e 97 colonie dal terreno M17. La procedura di classificazione è stata la medesima seguita per gli enterococchi: estrazione DNA, amplificazione RAPD-PCR, amplificazione ITS (Figura 88). Come mostrato nelle Tabelle 89 e 90 è stato possibile raggruppare gli isolati da MRS in 24 gruppi e 37 quelli da M17.

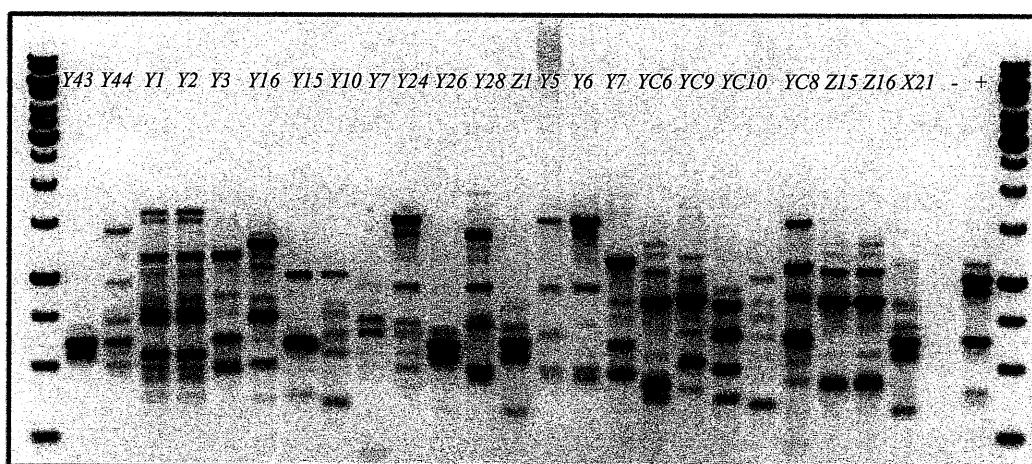


Figura 88: Esempio di amplificazione RAPD M13 di batteri lattici prelevati da M17. Marker 1Kb. Per esempio i ceppi Y1 e Y2 hanno lo stesso tracciato e verranno messi nello stesso cluster.

	CODIFICA CEPPI		CODIFICA CEPPI		CODIFICA CEPPI
R1	Z142, Z185	H2	X566	A3	YC9
S1	Z144, Z159, Z175	L2	X585	B3	YC10
T1	Z146, Z149, Z169, Z173	M2	X588	C3	Z140
U1	Z155, Z165, Z166, X596	N2	X594		
V1	Z162, Z177, Z179	O2	X593		
Z1	Z170, Z174, Z182, Z183	P2	X229		
X1	X562, X564, X572, X575, X578, X581, X582, X228, X206, Y24, YP5, YP6, YC7	R2	Z156		
Y1	X598, X223, X570, X220	S2	Y13		
K1	X226, X225, X219, X227, X216, X218, X214, X217	T2	Y31		
W1	X200, X207, X215, X210, X212, X201, X202, X204, X203, X209, X205, Y32, Y34, Y5, X211, Y43, Y26, Z143, X213, X568, X208	U2	Y44		
J1	X220, X222	V2	Y3		
A2	Y36, Y38, Y40	Z2	Y16		
B2	Y1, Y2	X2	Y15		
C2	Y10, YC8	Y2	Y7		
E2	Z153, Z157	K2	Y28		
F2	Z168	W2	YP7		
G2	X560	J2	YC6		

Figura 89: Gruppi batteri lattici isolati dal terreno M17. Il primo ceppo per ogni gruppo è stato utilizzato per il sequenziamento.

	CODIFICA CEPPI		CODIFICA CEPPI
D3	Z100, X178 , X198, X175	Q3	Y86 , YP50, YP56
E3	Z96 , Z91, Z92, Z134, Z133, Z132, Z89	R3	Z95 , YC50, X550, X549, X551, YP60
F3	Z126 , Z124, Z121, Y69	S3	X533 , X538, X174, X535, X556, X531, X536, X557, X172
G3	Z106 , Z103, Z102	T3	YC61
H3	Z90 , Z97	U3	X555
I3	Z105 , Y07	V3	X170
L3	Z114, Z112 , Z125, X193, X194, X180, X162, X179, X544, X160, X157, X182, X166, X186, X546, X168, X158, X156, X161, X164, X176, X232, X163, X188, X152, X150, X154, X184, X189, X151, X165, X153, X155, X159, Z109, X527	Z3	Z116
M3	Y93 , X540, Y89, Y90, Y63, Y56, Y80, Y88, Y51, Y59, X199, X181, X230, X231, X234, YC57, X187, X192, X185, X195, X196, X197, X233	X3	Y98
N3	X525 , Y74, Z119, Z117, Z107	W3	Z99
O3	Y61 , 607	J3	Y83
P3	X173 , X171, X235, X169	K3	Z127
		Y3	Y57
		A4	Z130

Figura 90: Gruppi batteri lattici isolati dal terreno MRS. In grassetto i ceppi utilizzati per il sequenziamento.

Successivamente preso il DNA di un ceppo rappresentante per ogni gruppo si è amplificato il 16S rDNA per il sequenziamento e la sua successiva identificazione.

Dalle codifiche è stato possibile risalire al caseificio e alla fase operativa dove è stato isolato il batterio, come mostrato nelle Figure 91, 92 e 93. E' importante osservare che come già si era

affermato nella sezione delle conte, nonostante i due differenti terreni la microflora dominante è rappresentata da forme a cocco omofermentanti obbligate.

CARCOFORO		
Provenienza	Sigla	Identificazione
Latte crudo	Y74.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	Y5.	<i>Lactococcus garviae</i>
	Y80.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Cagliata	Y93, Y88, Y90, Y89, Y24, CaCrK7.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	Y86.	<i>Lactococcus garviae</i>
	Y96.	<i>Leuconostoc lactis</i>
	Y10.	<i>Streptococcus parauberis</i>
Prima della stufatura	Y43, Y26, Y34.	<i>Lactococcus garviae</i>
	Y44, Y51, Y56, Y59, Y63.	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Fine stagionatura	YP50, YP56.	<i>Lactococcus garviae</i>
	YC57, YP7	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	YP5.	<i>Streptococcus termophilus</i>
	YC8.	<i>Streptococcus parauberis</i>

Figura 91: Risultati della caratterizzazione genomica dei batteri lattici.

Durante le fasi di lavorazione della toma caprina prodotta nel caseificio di Carcoforo sono state rilevate differenti specie di batteri lattici, appartenenti al genere *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. In particolare il *Lactococcus lactis subsp. cremoris* e il *Lactococcus garviae* sono stati riscontrati in tutte le fasi, dal latte crudo al formaggio a fine stagionatura. Inoltre si è osservata la presenza dello *Streptococcus thermophilus* e dello *Streptococcus parauberis*.

CANGELLO		
Provenienza	Sigla	Identificazione
Latte crudo	X152, X150, X154, X153, X156, X200, X201, X202, X203, X205, X182, X184.	<i>Lactococcus garviae</i>
	X562, X564, X181, X185.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
	X525.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Cagliata	X158, X156, X155, X207, X204, 133, 131, 132, 134, X193, X194.	<i>Lactococcus garviae</i>
	X206, X192, X195.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
Siero	X166, X164, X168, X163, X210, X208, X209, X211, X280, X179, X176.	<i>Lactococcus garviae</i>
	X175, X178.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
Cagliata prima della salamoia	X162, X160, X161, X159, X215, X212, X213, 118, 117, 119, 120, X509, X510.	<i>Lactococcus garviae</i>
	X198, X199, X196, X197, X533, X531, X572, X575, X219, X216, X217, X218.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>

	X170.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Cagliata dopo la salamoia	145, 144, 141.	<i>Lactococcus garviae</i>
	X172, X223, X220, X222, 143.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
Formaggio 7 giorni	X523, X544, X546, X568.	<i>Lactococcus garviae</i>
	X570, X538, X536, X540, X578, X581.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
Formaggio 1 mese (pasta e crosta)	X550, X549, X551.	<i>Lactococcus paraplantarum</i>
	X598, X556, X537, X582.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
	X555.	<i>Leuconostoc lactis</i>
	X585.	<i>Staphylococcus lentus</i>
	X588, X593, X596.	<i>Staphylococcus equorum</i>
Formaggio a fine stagionatura	X232, 122, 124.	<i>Lactococcus garviae</i>
	X174, X230, X231, X234, X233, X228, X226, X225, X227, X229.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>

Figura 92: Risultati della caratterizzazione genomica dei batteri lattici.

Occasionalmente sono state rinvenute forme etero fermentanti rappresentati comunque dalla sola specie *Leuconostoc mesenteroides*. Decisamente poco incisiva è il ritrovamento anomalo di bastoncini rinvenuti solo nella realtà Mera nel formaggio durante la lavorazione.

Anche nella lavorazione effettuata nel caseificio a Cangello le specie predominanti di batteri lattici sono *Lactococcus lactis subsp. cremoris* e *Lactococcus garviae*. Nel latte crudo e nella cagliata si riscontra anche la presenza di *Leuconostoc mesenteroides* e nella pasta del formaggio

Leuconostoc lactis. Inoltre è da sottolineare la presenza, soprattutto nel prodotto in maturazione e in prevalenza sulla crosta, di *Staphylococcus lentus* e *S. equorum*.

ALPE MERA		
Provenienza	Sigla	Identificazione
Latte	Z142.	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
	Z51, Z125, Z143.	<i>Lactococcus garviae</i>
	Z121, Z124, Z126.	<i>Leuconostoc lactis</i>
Cagliata	Z43, Z42, Z109, Z112, Z114, Z177, Z179.	<i>Lactococcus garviae</i>
Formatura	Z46, Z162.	<i>Lactococcus garviae</i>
Formaggio 24 ore	Z149.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
	Z24.	<i>Lactococcus garviae</i>
	Z130.	<i>Leuconostoc citreum</i>
	Z127.	<i>Staphylococcus saprophiticus</i>
Formaggio 48 ore	Z89, Z90.	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
	Z182, Z183, Z169.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
	Z107.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

	Z165, Z166.	<i>Staphylococcus equorum</i>
Formaggio 15 giorni	Z132, Z133, Z134.	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
	Z170, Z173, Z174.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
	Z35, Z37.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	Z119, Z117.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Formaggio 2 mesi	Z91, Z92, Z95, Z96, Z97.	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
	Z100, Z146.	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
	Z155, Z156.	<i>Staphylococcus equorum</i>
	Z19.	<i>Lactococcus garviae</i>
	Z153, Z157.	<i>Serratia sp.</i>

Figura 93: Risultati della caratterizzazione genomica dei batteri lattici.

Anche nella toma caprina prodotta presso Alpe Mera i Batteri lattici riscontrati nel latte crudo e durante la caseificazione sono ascrivibili al genere *Lactococcus*, *Staphylococcus* e *Leuconostoc*. Risulta però maggiormente varia la microflora, a differenza dei due caseifici analizzati in precedenza, in quanto si rileva la presenza di *Lactobacillus paraplantarum* e *Pediococcus pentosaceus*.

4.4.3 RIASSUNTO CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

La classificazione molecolare è avvenuta mediante l'impiego di tecniche finalizzate allo studio genetico, in particolare si è ricorsi alla sequenziamento parziale di una specifica regione dell'operone ribosomale, 16S rDNA che rappresenta la componente più significativa ai fini della collocazione tassonomica dei vari microrganismi in quanto risulta la regione più conservata a livello genetico.

CARCOFORO

Nel latte crudo la microflora lattica è risultata poco varia. Le forme a cocco omofermentanti sono come la maggioranza e sono rappresentate per lo più da lattococchi, seguiti da enterococchi. Nello specifico tra i lattococchi le specie dominanti sono *Lactococcus lactis* e *Lactococcus garvieae*, mentre tra gli enterococchi ritroviamo *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus faecalis*.

Nel latte crudo sono state ritrovate anche numerose Micrococcaceae classificate poi come *Rothia* spp. e *Staphylococcus* spp. Si tratta di microrganismi tipici della cute la cui provenienza è da attribuire alla mungitura manuale o direttamente all'animale. Le Micrococcaceae, ritrovate anche nel prodotto a fine stagionatura svolgono un ruolo sensoriale non indifferente, infatti, alcune specie sono pigmentate e contribuiscono alla determinazione dell'aspetto della superficie ed inoltre hanno una maggiore attività lipolitica e proteolitica rispetto ai fermenti lattici e sono in grado di metabolizzare aminoacidi e acidi grassi producendo composti importanti per il sapore e l'aroma della toma.

Con l'inizio della trasformazione, prendono il sopravvento i lattococchi tra i quali la specie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* risulta dominante. Alcuni ceppi di *Lc. lactis* subsp. *lactis* sono in grado di fermentare il citrato, presente nel latte, con produzione di anidride carbonica e sostanze aromatiche, come il diacetile, che dà il tipico aroma di burro. Altri sono inoltre in grado di produrre sostanze inibitorie di natura proteica (batteriocine) attive contro patogeni ed agenti di deterioramento. Sempre nel latte e nella cagliata è stata rilevata la presenza, in quantità minoritaria, di *Leuconostoc lactis* e *Leuconostoc mesenteroides*; essa è una specie batterica etero fermentante mesofila o psicrofila usata nei prodotti lattiero caseari spesso in associazione con il *Lc. lactis* per la loro capacità di fermentare il citrato con produzione di sostanze aromatiche. Dal momento che producono anidride carbonica (un gas) per fermentazione degli zuccheri e del citrato, possono determinare una lieve occhiatura nei formaggi.

L'allontanamento del siero e la posa in stufatura e successiva salatura realizzano condizioni più favorevoli ad altre forme a cocco costituite per lo più da Enterococchi che con la specie *faecalis* diventano il gruppo microbico dominante. Questi sono frequentemente presenti nella microflora di prodotti artigianali dove potenzialmente svolgono un ruolo importante, nella determinazione delle proprietà sensoriali contribuendo a lipolisi e proteolisi dei substrati organici e per la sicurezza igienica, producendo sostanze inibitorie verso microrganismi patogeni. Tuttavia la presenza in queste specie di ceppi patogeni (responsabili di infezioni nosocomiali, gastroenteriti, endocarditi), talvolta resistenti ad antibiotici, la capacità di produrre amine biogene per

decarbossilazione di aminoacidi, rendono questo gruppo in un certo qual modo sospetto almeno dal punto di vista prettamente medico.

A conferma comunque dell'importanza degli enterococchi nella caratterizzazione aromatica del prodotto, la specie *E. faecalis* si ritrova nella pasta del prodotto finito, accanto a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e a *Streptococcus thermophilus* selezionatosi probabilmente con la stufatura.

CANGELLO

Il latte utilizzato è apparso particolarmente ricco di cocchi lattici rappresentati per lo più da *Lactococcus garviae* seguito da *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Entrambi sono importanti microrganismi coinvolti nella coagulazione e successiva maturazione di prodotti caseari ottenuti da latte crudo. Non trascurabile, benché numericamente inferiori, è la presenza di *Enterococcus faecalis*. Successivamente alla coagulazione si osserva una inversione tra i due lattococchi, che comunque si confermano la componente maggioritaria, ed aumenta la presenza e la biodiversità degli Enterococchi: si riscontrano infatti *Enterococcus faecalis*, *E. durans* ed *E. gilvus*. Quest'ultimo viene maggiormente riscontrato nella crosta del formaggio e potrebbe derivare da una contaminazione ambientale o direttamente da una contaminazione umana. Il serbatoio di incubazione degli Enterococchi è infatti l'intestino umano o animale facendo di questi possibili veicoli di contaminazione.

Interessante è la presenza di una'ampia varietà batterica osservata durante la stagionatura. Compagno alcune forme a bastoncino etero fermentanti facoltative come il *Lactobacillus paraplantarum* caratterizzato da una buona attività acidificante e dalla possibilità per alcuni ceppi di essere produttori di batteriocine ed essere utilizzati per il controllo biologico di patogeni; oltre a forme a cocco appartenenti alla famiglia delle Micrococcaceae. In particolare sono state ritrovate *Staphylococcus equorum* (crosta e pasta), già utilizzato come starter per alcune produzioni casearie e *Kocuria* spp. entrambi caratterizzati da buona attività lipolitica, carattere che influisce positivamente sull'aroma del prodotto finito.

ALPE MERA

Dalla classificazione si evince come nel latte crudo la specie più rappresentata sia il *Lactococcus garviae* seguita dal *Leuconostoc lactis* e dal *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Il *Lactococcus*

garviae si conferma la principale specie microbica presente sino a dopo la salamoia quando la popolazione batterica inizia ad essere più varia: viene infatti riscontrata la presenza di *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, accanto a specie diverse di Enterococchi: *Enterococcus faecalis*, seguito da *Enterococcus gilvus*, *E. durans*, *E. casseliflavus* ed *E. faecium*. Durante la stagionatura compaiono anche alcune forme lattiche a bastoncino rappresentate da *Lactobacillus paraplantarum*, che alla fine insieme ad *Enterococcus faecalis* sono state le sole specie ritrovate sul prodotto finito. Entrambe queste due ultime specie batteriche svolgono un'importante attività peptidasica con formazione di composti aromatici importanti per la definizione della qualità sensoriale del formaggio caprino.

Un'analisi più approfondita può inoltre mettere in evidenza le differenti specie microbiche lattiche riscontrate nella pasta e sulla crosta del prodotto durante la maturazione. Dopo 48 ore dalla formatura la pasta del formaggio è costituita principalmente dalle seguenti forme batteriche coltivabili in piastra: *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactococcus lactis* e *Staphylococcus equorum*. Sulla crosta le forme microbiche lattiche riscontrate sono state: *Enterococcus faecalis*, *E. gilvus*, *E. casseliflavus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Staphylococcus equorum*.

Nel formaggio caprino dopo 15 giorni di stagionatura si riscontra la presenza nella pasta di *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* e *Pediococcus pentosaceus*. Sulla crosta invece si è ritrovato: *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* ed *E. gallinarum*.

Nella toma caprina a fine stagionatura (due mesi) le forme batteriche lattiche ritrovate nella pasta sono state le seguenti: *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* ed *E. gilvus*; nella crosta invece è stata appurata la presenza di: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garviae*, *Enterococcus faecalis*, *E. gilvus*, *E. faecium*, *Staphylococcus equorum* ed *Serratia proteamaculans*.

4.5 CLASSIFICAZIONE LIEVITI

Dalle piastre di YGC e YM sono state prelevate 65 colonie di lieviti e si è proceduto alla classificazione dopo loro purificazione.

Sulla base delle prove morfologiche (visione al microscopio, morfologia e colorazione su terreno YMA) e culturali (utilizzo fonti di azoto, capacità fermentativa) descritte nella sezione Materiali e Metodi è stato possibile riunire i lieviti in 22 gruppi come mostrato nella tabella 94.

	Colore colonia su YMA	Utilizzo nitrati	Fermentazione glucosio	Fermentazione lattoso	Codifica ceppo
Tondi	Rosa lucido	-	+	+	Z314, 81, 84
Clavati	Lucida bianca	-	+	-	Z331
Tondi molto piccoli	Lucida bianca	-	+	+	Z316
Piccoli allungati	Lucida marroncina	-	+	+	Z333, Z332
	Gialla rugosa	+	-	-	Z346
	Marrone liscia	-	+	-	854
	Gialla rugosa	-	-	-	855
Tondi	Bianca lucida	-	+	-	83, Z315, Z345
	Bianca	-	+	+	113, 820, 90, 101,

	lucida				Z317, Z310, X726
	Bianca	+	+	+	103, 110, 111, 109
	lucida				
	Rugosa	-	+	-	819
	bianca				
	Lucida	-	-	-	Z326
	bianca				
	Rugosa	-	+	-	X712
	bianca				
	Lucida	-	+	-	X710
	bianca piatta				
	Rugosa	-	+	+	X721, X722
	gialla				
Tondi piccoli	Bianca	-	+	+	833, Z321, Z322,
	lucida				Z347, X702, X709,
					X700, X708, X709,
					87, 106, 107, Z706,
					X707, 104
	Bianca	+	+	+	811
	lucida				
	Bianca	+	+	-	856, 105
	lucida				
	Bianca	-	+	-	850, 852, Z323,
	lucida				Z312, Z313, Z311,
					114, 115
	Bianca	+	-	+	X701

lucida				
Bianca	-	-	-	X728
lucida piatta				
Bianca	+	-	-	108
lucida				

Tabella 94: Classificazione dei lieviti in base alle prove fisiologiche.

Un isolato per gruppo e per caseificio di provenienza è stato sottoposto all'estrazione del DNA, alla successiva amplificazione della regione ITS (Figura 95) ed alla restrizione dell'amplificato con l'enzima *Hin*6I (Figura 96) ed infine al sequenziamento.

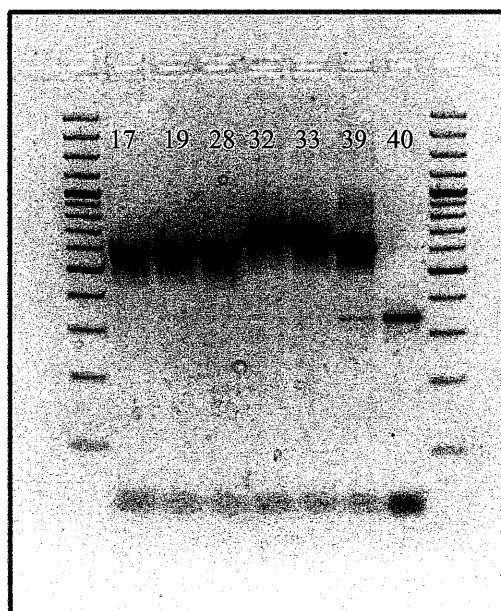


Figura 95 : Esempio di amplificazione ITS. Marker 100 bp.

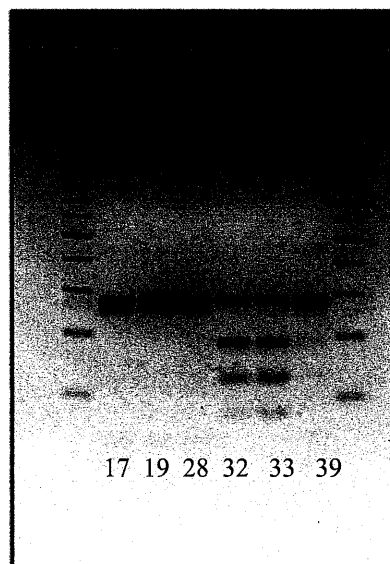


Figura 96 : Esempio di restrizione con enzima *Hin6I*. Marker 100 bp.

La specie più frequentemente riscontrata è *Debaryomyces hansenii* seguito dal *Kluyveromyces lactis* e dal *Clavispora lusitaniae*.

In particolare *Debaryomyces hansenii* è comune a tutte tre i caseifici e in quasi tutte le fasi di lavorazione, dal latte crudo sino al formaggio finito. *Kluyveromyces lactis* è stato ritrovato solo nelle realtà di Mera e Cangelo in maggior concentrazione nel latte e nelle prime fasi di lavorazione. *Clavispora lusitaniae* è invece stata rinvenuta a Cangelo e Carcoforo sia nel latte crudo che durante la lavorazione e fino nel formaggio caprino a fine lavorazione.

5. CONCLUSIONI

L'insieme dei risultati ottenuti e discussi propone un quadro esaustivo delle qualità microbiologiche possedute dal formaggio prodotto da latte crudo caprino.

Prima di addentrarci nell'esaminare le vere e proprie conclusioni di questo lavoro di ricerca, è necessario richiamare alcune premesse inerenti il piano sperimentale adottato.

In questo lavoro di tesi, dove lo scopo era la valutazione della qualità microbiologica del formaggio caprino e la caratterizzazione molecolare della popolazione batterica lattica, si è deciso di analizzare le tome provenienti da tre differenti realtà produttive. Le realtà prese in esame sono piccole produzioni artigianali, a conduzione familiare, frutto dell'esperienza acquisita col tempo dai produttori e spesso tramandata loro dai padri. Le tecniche produttive adottate sono poco o per niente standardizzate anche a causa delle limitanti condizioni ambientali (ubicazione struttura, agibilità locali) in cui operano. Gli operatori, da parte loro, hanno dimostrato grande interesse e disponibilità alla collaborazione al fine di migliorare il processo produttivo e rendere le proprie produzioni di livello superiore.

Le analisi condotte hanno portato alle seguenti conclusioni:

- i risultati delle conte microbiche non hanno evidenziato, per lo meno a livello qualitativo, differenze sostanziali tra le produzioni;
- la situazione igienica del latte è apparsa soddisfacente: benché la carica batterica totale superi i valori contemplati dall'attuale normativa, i coliformi fecali (quando presenti) lo erano in modo molto contenuto. Essi infatti sono un tipico indice microbiologico di contaminazione fecale e di stato igienico dei locali di mungitura e lavorazione del prodotto. La loro eventuale presenza a valori elevati nel formaggio finito potrebbe indurre ad alterazioni indesiderate la toma caprina;
- significativo è invece il ritrovamento di *Staphylococcus aureus*, il cui numero non è da considerarsi trascurabile. Esso è un indice microbiologico di contaminazione umana, ma più probabilmente visto che è stato ritrovato limitatamente e solo nel latte crudo, la sua presenza può essere attribuita all'animale stesso magari affetto da una mastite subclinica difficile da diagnosticare se a soffrirne è un singolo capo. Questo indice è comunque sicuramente da monitorare in quanto potrebbe essere legato alla produzione di tossine da parte del batterio nel prodotto;

- la popolazione microbica è rappresentata principalmente da cocchi lattici omofermentanti che già nel latte di partenza rappresentano la componente maggioritaria. I batteri lattici svolgono un ruolo importante e prioritario nel conferimento delle caratteristiche qualitative (aroma, gusto, consistenza, colore, ecc.) del prodotto oltre che essere indispensabili per una buona caseificazione del latte in formaggio. Essi contribuiscono anche alla sicurezza igienica dell'alimento grazie all'inevitabile abbassamento del pH dovuto alla fermentazione degli zuccheri con produzione di acido lattico e alla capacità di alcune specie (*Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum*) di produrre batteriocine contro la *Listeria* spp. e i *Clostridium* spp.;
- elevata è stata anche la quantità di enterococchi riscontrati soprattutto nelle fasi centrali della caseificazione. Gli enterococchi (*Enterococcus faecium*, *E. faecalis* e *E. durans* sono le specie più frequentemente isolate) sono dei microrganismi omofermentanti di forma coccica che hanno un ruolo controverso. Essi sono da un lato frequentemente presenti nella popolazione batterica di prodotti artigianali dove potenzialmente svolgono un ruolo importante nella determinazione delle proprietà sensoriali, contribuendo a lipolisi e proteolisi; e per la sicurezza igienica, producendo sostanze inibitorie (batteriocine) verso microrganismi patogeni (*Listeria* sp. e *Clostridium* sp.). Dall'altro lato la presenza in queste specie, di ceppi responsabili di infezioni nosocomiali, gastroenteriti, endocarditi, talvolta resistenti ad antibiotici e con la capacità di produrre ammine biogene per decarbossilazione di aminoacidi, rendono questo gruppo in un certo qual modo sospetto. Gli enterococchi, come confermato anche nella nostra indagine molecolare, sono spesso presenti nelle colture per la produzione di formaggi artigianali, ma non vengono commercializzati, come colture starter selezionate;
- abbondante è il ritrovamento di lieviti e delle Micrococcaceae. La loro presenza non è da ritenersi negativa in quanto caratterizzati da spiccata attività proteolitica e soprattutto lipolitica. Intervengono positivamente sulle caratteristiche sensoriali del prodotto finito. Alcune specie di Micrococcaceae sono pigmentate e contribuiscono alla determinazione dell'aspetto della superficie del formaggio a fine stagionatura.
- le muffe ritrovate provengono prevalentemente dalla crosta e sono associate alla differente ecologia dei locali di stagionatura. Esse saranno oggetto di uno studio successivo finalizzato a valutarne le specie presenti e l'influenza che esse hanno sulle caratteristiche qualitative del prodotto;

- il controllo microbiologico dell'ambiente ha dato risultati confortanti.

Le prove di identificazione molecolare, a livello di specie, ottenute attraverso il sequenziamento parziale della regione dell'operone ribosomale 16S rDNA, effettuate limitatamente agli Enterococchi ed ai Batteri lattici, hanno permesso di delineare alcune differenze fra le tre produzioni:

- fra gli enterococchi la specie più frequentemente ritrovata, in tutti e tre i caseifici, è stata *Enterococcus faecalis*. Presso l'alpeggio di Mera, in particolare, è stata riscontrata una maggiore variabilità, in quanto sono stati trovati anche *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gilvus* ed *Enterococcus casseliflavus*, quest'ultimo riscontrato solo in questo caseificio;
- le forme lattiche a cocco le specie maggiormente riscontrate in tutti e tre i caseifici e in quasi tutte le fasi della lavorazione sono *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus garviae*. Nel latte crudo inoltre si riscontra la presenza di *Leuconostoc mesenteroides*. Nella realtà di Carcoforo nel formaggio a fine maturazione si è osservata la presenza dello *Streptococcus thermophilus* e di *Streptococcus parauberis*. Nel caseificio di Cangello è da sottolineare, soprattutto nel prodotto in stagionatura e in prevalenza sulla crosta, la presenza di *Staphylococcus lentus* e *S. equorum*. Lungo la lavorazione della toma caprina prodotta presso Alpe Mera la popolazione microbica appare decisamente più varia rispetto agli altri due caseifici accanto ai batteri lattici ascrivibili ai generi *Lactococcus* e *Leuconostoc* si rileva infatti la presenza di *Lactobacillus paraplantarum* e *Pediococcus pentosaceus*. Questi ultimi per la loro elevata attività peptidasica e per la capacità di metabolizzare aminoacidi, con produzione di composti aromatici vengono, in prodotti non artigianali, utilizzati come colture aggiuntive per l'accelerazione della maturazione dei formaggi;
- per quanto riguarda i lieviti dal sequenziamento si osserva che la specie maggiormente riscontrata nelle tre diverse realtà produttive è *Debaryomyces hansenii* seguito da *Kluyveromyces lactis* e da *Clavispora lusitaniae*.

Prospettive future e possibili evoluzioni di questo lavoro sono ascrivibili alla ricerca di starter selezionati che possano iniziare un approccio di standardizzazione del processo produttivo e favorire l'espansione del mercato del formaggio caprino, espressione di un territorio.

L'attività effettuata in questo lavoro di tesi è stata oltremodo istruttiva, consentendo fra l'altro, un approccio metodologico innovativo nel merito degli studi, quali quelli della caratterizzazione molecolare microbica, attuati nell'ottica della qualificazione di prodotti tradizionali (i formaggi caprini) meritevoli di ulteriore promozione nelle nostre abitudini alimentari.

BIBLIOGRAFIA

1. Matassino D., Rubino R. 1996. I sistemi produttivi zootecnici nelle aree interne meridionali. La questione agraria. 16: 121-140.
2. Faresi R., Greppi G. 2003. Prospettive dell'allevamento caprino. XV° Congresso Nazionale. SIPAOC. pp. 6-8.
3. Dati FAO 2004 www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp.
4. Benvenuti N. La produzione del latte di capra: aspetti quali - quantitativi. 2000. L'allevatore di ovini e caprini. 2:10-14.
5. Rubino R., Emaldi C., Muscillo F. 1995. La scoperta del latte di capra. Il Vergaro. 3: 23-28.
6. Noè L., Feligni M. 1999. Il latte di capra, un alimento antico. Informatore Zootecnico. 9: 64-66.
7. Cecchi F. 2003. I principali fattori che incidono sui parametri di coagulazione nel latte dei piccoli ruminanti. L'allevatore di ovini e caprini. 2: 6-10.
8. Cattaneo T., Giangiacomo R. 2001. Aspetti rilevanti nella trasformazione casearia del latte di capra e nel recupero del siero. Scienza e Tecnica Lattiero – Casearia. 52(6): 401-406.
9. Marconi S., Manzi P., Santaroni G., Pizzoferrato L. 2002. Dall'allevamento animale all'alimentazione umana: alcuni aspetti della qualità nutrizionale di latte e formaggio caprino. La Rivista di Scienza dell'Alimentazione. 31(2): 157-163.
10. Wehrmuller K., Stephan R. 2007. Prodotti a base di latte di capra e alimentazione. ALP. 28: 1-4.
11. Franzetti L., Pompei M., Scarpellini M., Galli A. 2004. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. of different origins. Current Microbiol. 49: 255-260.
12. Lazzi C., Rossetti L., Zago M., Neviani E., Giraffa G. 2003. Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. J. Appl. Microbiol. 96: 481-490.

13. Brusetti L., Borin S., Mora D., Rizza A., Raddadi N., Sorlini C., Daffonchio D. 2006. Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56: 154-164.
14. Ubertalle A. 2006. Caratteristiche annonarie del latte di capra e variazioni determinate dai fattori zootecnici. *Rivista della Società Italiana di Scienze dell'Alimentazione*. 9(1): 21-26.
15. Ubertalle A. 1996. Latte di capra: dietetica e alimentazione umana. *Il Latte*. 11: 56-62.
16. Ubertalle A., Bianchi M. 2000. L'allevamento delle capre per la produzione del latte. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*. 38(1): 33-45.
17. Jenness R. 1980. Composition and characteristics of goat milk. *J. Dairy Sci.* 63: 1605-1630.
18. ISO-International Organization for Standardization. 2003. ISO 4833. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms Colony-Count Technique at 30°C.
19. 2007. Kanamicyn Esculine Azide Agar. For the Isolation Differentiation and Enumeration of Enterococci in Foodstuffs, Water and Other Materials. In *Merck Microbiology Manual*, 12th edition; Merck: Darmstadt, Germany. 306.
20. De Man, J. C.; Rogosa, M.; Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-136.
21. Hitchins, A. D.; Hartman, P. A.; Tood, E. C. D. 1992. Coliforms: *Escherichia coli* and its Toxins. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*; Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F., Eds.; American Public Health Association (APHA): Washington, DC. 325-369.
22. ISO-International Organization for Standardization. 2007. EN/ISO 6579 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp.
23. ISO-International Organization for Standardization. 2004. ISO 11290-1 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Detection of *Listeria monocytogenes*.

24. ISO-International Organization for Standardization. 2004. UNI/EN/ISO 6888 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la conta di stafilococchi coagulasi-positivi (*Staphylococcus aureus* e altre specie).
25. McDonald L.C., McFeeters R.F., Daeschel M.A., Fleming H.P. 1987. A differential medium for the enumeration of Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 53(6): 1382-1384.
26. Maccabiani G., Pavoni E. 2004. Setting-up of a PCR based method for species identification in milk products [Polymerase Chain Reaction]. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie (Italy). 58: 407-408.
27. Sellami N. S., Badis A., Guetarni D. 2007. Characterisation phenotypic of lactic bacteria isolated from believed milk of goat of two caprine populations local Arabia and Kabyle. Journal of Animal and Veterinary Advances. 6(12): 1474-1481.
28. Zhang WenYi, Yun YueYing, Sun TianSong. 2008. Isolation and identification of dominant microorganisms involved in naturally fermented goat milk in Haixi region of Qinghai, China. Annals of Microbiol. 58(2): 213-217.
29. Bonetta S., Bonetta S., Carraro E. 2008. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. Food Microbiology. 25(6): 786-792.
30. Atasoy A. F. 2008. Evaluation of pH change kinetics during different stages of Kashar cheese production from bovine, ovine and caprine milk. J. Food Process. and Pres. 32(3): 416-428.
31. Al-Zahrani S. H., Al-Zahrani F. S. 2006. Production of bacteriocin(s) by four lactic acid bacteria isolated from raw milk on organic waste. World Applied Sciences Journal. 1(2): 135-143.
32. Lima S., Santos M. G. O., Carvalho M. 2006. Microbiological characters in raw and pasteurised goat milk from small dairies in Paraíba. Higiene Alimentar. 20(142): 79-84.
33. Katili L. M., Bonassi I. A., Roca R. de O. 2006. Chemicophysical and microbiological aspects of cheese made of a mixed coagulation, ripened by mould using slow or fast frozen goat's milk and slow or fast frozen curd. Ciencia e
34. Tecnologia de Alimentos. 26(4): 740-743.

35. Scintu M. F., Piredda G. 2007. Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Ruminant Research*. 6(1): 221-231.
36. Caridi A., Micari P., Foti F., Ramondino D. 2003. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese *Caprino d'Aspromonte* produced from raw or thermized goat's milk. *Food Microbiol.* 20: 201-209.
37. Florez A. B., Lopez-Diaz T. M., Alvarez-Martin P. 2006. Microbial characterisation of the traditional Spanish blue-veined *Cabrales* cheese: identification of dominant lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*. 223 (4): 503-508.
38. Psoni L., Kotzamanidis C., Yiangou M. 2007. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from *Batzos*, a Greek PDO raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 114 (2): 211-220.
39. Ogier J. C., Lafarge V., Girard V. 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. and Environ. Microbiol.* 70 (9): 5628-5643.

RIASSUNTO

Tra le diverse produzioni alimentari “tradizionali”, un posto di rilievo hanno i prodotti caseari. Questi prodotti si caratterizzano solitamente per l’assenza nel ciclo produttivo di fermenti lattici commerciali, gli “starter”, essendo la trasformazione e maturazione del prodotto assicurate dalla popolazione lattica naturalmente presente nel latte. Se da un lato in questo modo vengono assicurati i caratteri sensoriali tipici del prodotto, l’assenza di standardizzazione nel processo produttivo e la peculiarità di ogni singola realtà non garantiscono la possibilità di espansione e modernizzazione di un prodotto e di un processo considerati oggi di “nicchia”. Nelle produzioni casearie artigianali si considera pertanto, con sempre maggiore importanza, la necessità di selezionare ceppi che assicurino le necessarie proprietà tecnologiche, mantenendo inalterate quelle sensoriali garantendo la sicurezza igienico- sanitaria dei prodotti.

Oggetto di questo lavoro è stata la valutazione della qualità microbiologica di formaggi ottenuti da latte crudo caprino provenienti da tre differenti caseifici siti in Valsesia nella provincia di Vercelli e successiva caratterizzazione, a livello di specie, della microflora lattica autoctona coinvolta nella maturazione.

Le analisi sono state effettuate su prelievi del prodotto lungo le fasi di lavorazione, a partire dal latte crudo fino al termine della stagionatura; in particolare sono stati ricercati: carica batterica totale, contaminanti, coliformi totali e fecali, batteri lattici totali (cocchi e bastoncini), Enterococchi, Micrococcaceae, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, lieviti e muffe. Successivamente, dopo isolamento, e purificazione, mediante l’impiego di tecniche finalizzate allo studio genetico, per i batteri lattici e lieviti si è proceduto al loro raggruppamento sulla base del profilo RAPD-PCR. In seguito su un rappresentante per gruppo, è stato effettuato il sequenziamento parziale della regione 16S rDNA, la componente più significativa ai fini della collocazione tassonomica dei vari microrganismi.

I risultati delle conte microbiche non hanno evidenziato, per lo meno a livello qualitativo, differenze sostanziali tra le produzioni. La situazione igienica del latte è apparsa soddisfacente: benché la carica batterica totale superi i valori contemplati dall’attuale normativa, i coliformi fecali (quando presenti) lo erano in modo molto contenuto. Nel formaggio la popolazione microbica è rappresentata principalmente da cocchi lattici omofermentanti che già nel latte di partenza rappresentano la componente maggioritaria. I batteri lattici svolgono un ruolo importante e prioritario nel conferimento delle caratteristiche qualitative (aroma, gusto, consistenza, colore, ecc.) del prodotto oltre che essere indispensabili per una buona

caseificazione del latte in formaggio. Elevata anche la quantità di enterococchi rinvenuti soprattutto nelle fasi centrali della caseificazione del latte; dopo la salatura è evidenziabile un importante aumento dei lieviti e delle Micrococcaceae che, con la loro attività lipolitica e proteolitica, caratterizzano dal punto di vista sensoriale il prodotto finito. Le muffe, infine, sono presenti prevalentemente a livello della crosta e provengono dall'ambiente di stagionatura.

L'analisi molecolare, eseguita su 281 ceppi, rivela una discreta variabilità nella comunità batterica. Fra gli enterococchi la specie più frequentemente ritrovata, in tutti e tre i caseifici, è stata *Enterococcus faecalis*. Presso l'alpeggio di Mera, in particolare, sono stati riscontrati anche *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gilvus* ed *Enterococcus casseliflavus*, quest'ultimo ritrovato solo in questa realtà. Fra le forme lattiche a cocco le specie maggiormente rilevate in tutti e tre i caseifici e in quasi tutte le fasi della lavorazione sono *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus garviae*. Nel latte crudo inoltre si riscontra la presenza di *Leuconostoc mesenteroides*. Nella realtà di Carcoforo nel formaggio a fine maturazione si è osservata la presenza dello *Streptococcus thermophilus* e dello *Streptococcus parauberis*. Nel caseificio di Cangello è da sottolineare, soprattutto nel prodotto in stagionatura e in prevalenza sulla crosta, la presenza di *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus equorum*. Più varia la microflora lattica nella toma caprina prodotta presso Alpe Mera dove accanto a *Lactococcus* e *Leuconostoc* è stata rilevata la presenza di *Lactobacillus paraplantarum* e *Pediococcus pentosaceus*.

Prospettive future e possibili evoluzioni di questo lavoro sono la messa a punto di starter selezionati che possano favorire una "standardizzazione" del processo produttivo oltre che creare una valida e solida struttura produttiva che permetta di espandere il mercato del formaggio caprino.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno aiutato durante questo lavoro di tesi. In particolare la dott.ssa Laura Franzetti e il dott. Mauro Scarpellini per la loro pazienza, disponibilità e fiducia che hanno riposto in me. Sono quindi molto felice di collaborare con loro per un altro anno attraverso una borsa di studio.

Grazie inoltre ad altri tre colleghi: Elena, Luigi e Vania del “mitico laboratorio” di microbiologia alimentare con cui ho condiviso giornate divertenti di lavoro e studio e con i quali le stesse passavano veramente in fretta e dove non ci si annoiava mai.

Un sincero grazie ma soprattutto un grande “in bocca al lupo” a tutti i miei compagni di corso di laurea con cui ho condiviso due anni veramente fantastici: alternando studio, gioie, rammarichi ma soprattutto costruendo con loro una vera amicizia. Grazie quindi ad Elisa D, Claudia, Samuele, Elisa B, Stefano, Mary, Gianfranco, Massimo, Valeria e Maria Paola.

Un ringraziamento anche alle varie realtà produttive casearie della Valsesia che dimostrando sempre una forte disponibilità ci hanno fornito la materia prima per svolgere questo lavoro di tesi.

Ma soprattutto grazie ai miei genitori per avermi dato la possibilità di studiare e raggiungere questo traguardo. Grazie alla mia nonna, a mia sorella Valeria, a tutti i miei parenti e cugini, ai colleghi di lavoro del ristorante “Forchettone” e agli amici, sempre così attenti ai miei risultati universitari.