

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

Facoltà di Agraria

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari



**INDAGINE SULLA QUALITA' MICROBIOLOGICA  
DI TOME DI ORIGINE CAPRINA**

Relatore: Dott.ssa Laura FRANZETTI

Tesi di Laurea di:  
Alessio TAMBURELLO  
Matr. 678750

*Anno Accademico 2006 / 2007*

*Ai miei genitori*

# Indice

|                                                 |               |
|-------------------------------------------------|---------------|
| <b>1. Introduzione</b>                          | <b>1</b>      |
| 1.1 L'allevamento caprino                       | 1             |
| 1.1.1 Le razze                                  | 3             |
| 1.1.2 L'importanza in zone "minori"             | 4             |
| 1.2 Il latte di capra                           | 6             |
| 1.2.1 Principali costituenti                    | 8             |
| 1.2.2 Principali indici chimico-fisici          | 13            |
| 1.3 Attitudine alla caseificazione              | 15            |
| 1.3.1 Le tecnologie produttive del formaggio    | 16            |
| 1.3.2 Formaggi caprini a coagulazione lattica   | 17            |
| 1.3.3 Formaggi caprini a coagulazione presamica | 21            |
| 1.4 Aspetti microbiologici                      | 25            |
| 1.4.1 Le fermentazioni                          | 27            |
| 1.4.2 Normativa                                 | 28            |
| <br><b>2. Attività svolta</b>                   | <br><b>30</b> |
| 2.1 La Valsesia                                 | 31            |
| 2.2 Realtà studiate                             | 31            |
| <br><b>3. Materiali e metodi</b>                | <br><b>40</b> |
| 3.1 Analisi microbiologiche                     | 41            |
| 3.2 Isolamento dei ceppi                        | 45            |
| 3.2.1 Mantenimento dei ceppi                    | 46            |
| 3.3 Analisi genotipica degli Enterococchi       | 47            |
| 3.3.1 Estrazione del DNA                        | 47            |
| 3.3.2 Applicazione RAPD-PCR                     | 48            |
| 3.3.3 Applicazione ITS                          | 49            |
| 3.3.4 Elettroforesi dell'amplificato            | 49            |
| 3.3.5 Sequenziamento                            | 50            |

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. Risultati</b>                                      | <b>52</b> |
| 4.1 Risultati delle analisi microbiologiche              | 52        |
| 4.2 Risultati dell'analisi genotipica degli Enterococchi | 64        |
| <b>5. Conclusioni</b>                                    | <b>70</b> |
| <b>6. Bibliografia</b>                                   | <b>72</b> |
| <b>7. Riassunto</b>                                      | <b>73</b> |
| <b>8. Ringraziamenti</b>                                 | <b>75</b> |

# 1. Introduzione

## 1.1 L'allevamento caprino

La capra domestica, *capra hircus*, è un ruminante della famiglia dei Bovidae strettamente correlata alla pecora, allevato dall'uomo sin dai tempi del Neolitico per ricavarne più prodotti: latte, carne, pelle e lana. La maggior parte degli studiosi sono concordi nell'identificarla oggi come discendente della più grossa e selvatica *Capra aegagrus*, presente ancora in alcune zone montuose dell'Asia centrale.

La capra, a seconda della razza, presenta differenti e comuni caratteristiche morfologiche. Mediamente da adulta raggiunge un'altezza al garrese pari a circa 80 cm e arriva a pesare tra i 40 e 90 kg. Essa è caratterizzata da una testa a profilo rettilineo; occhi vivaci, grandi e iride di colore giallo; orecchie molto mobili di lunghezza variabile e corna (se presenti) a sezione triangolare, dritte o ritorte e rivolte all'indietro. Il mantello può presentarsi di diverso colore (bianco, nero, rossastro, ...), uniforme o pezzato.

Le capre sono animali tipicamente curiosi e molto intelligenti, poco esigenti dal punto di vista nutrizionale, dotati di un acuto udito, vista e olfatto ma soprattutto di un'agilità incredibile. In particolare quest'ultimo fattore ha favorito nel tempo la diffusione di questo animale: la capacità di arrampicarsi e brucare lungo zone impervie e marginali, inaccessibili ad altre bestie, ne ha sancito il successo e la possibilità di sfruttare territori rupestri altrimenti inutilizzati. Altra particolarità positiva della capra è il proprio rumine: esso si presenta più stretto e lungo rispetto ad altri ruminanti. Caratteristica che determina, soprattutto in casi in cui il foraggio è povero in proteine e ricco in fibra, una digestione più efficiente dovuta al maggior tempo di ritenzione dell'alimento e ad una maggior presenza di batteri cellulosolitici [1].

Nonostante ciò, l'andamento dell'allevamento caprino è stato segnato da fasi difficili ed alterne.

La capra al libero pascolo ama nutrirsi in particolare di germogli e gemme oltre che di giovani fusti. Questa attitudine ha dettato per alcuni periodi storici, in Italia soprattutto durante il Fascismo, una visione negativa dell'animale in quanto ritenuto dannoso per i boschi. L'imposizione di una tassa sull'allevamento caprino e l'esclusione dal pascolo di tutte le zone boschive decretò un enorme freno all'attività.

Successivamente, a partire dagli anni '70, l'allevamento della capra intraprese un lento percorso di riscoperta e valorizzazione. Determinante fu l'abrogazione delle leggi che ne limitavano il pascolo e una rivisitazione del suo rapporto con l'ambiente: la capra infatti oggi è considerata un'ottima risorsa per mantenere liberi e puliti dalla flora infestante sia i boschi che i pascoli e ridurre così, oltretutto, il rischio di incendi. Questa nuova mentalità fu promossa anche dall'azione politica della Comunità Europea atta a sostenere le attività in aree montane abbandonate e poco utilizzate, soprattutto in seguito all'esodo verso le città negli anni '60.

Per l'allevatore, in realtà, le opportunità interessanti sono ben altre: la possibilità di intraprendere un'attività imprenditoriale legata all'allevamento intensivo, considerando la relativa economicità della capre in quanto meno esigenti dal punto di vista nutrizionale rispetto ai bovini e, allo stesso tempo, la possibilità di evitare il regime imposto dalle quote latte. Non da meno, l'occasione di costruire attorno all'allevamento caprino una attività agrituristica, apprezzata negli ultimi decenni sia dal consumatore tradizionale che dal turista più attento.

In ogni caso, il comparto caprino italiano mostra non poche difficoltà.

Attualmente in Europa il maggior numero di capre si trova in Grecia, Spagna e Francia. In Italia esse sono diffuse principalmente nell'Italia meridionale, insulare e lungo l'arco alpino in numero pari a 977.984 capi [2]. La produzione di latte si attesta intorno alle 115.000 tonnellate/anno [2], destinato per il 75% alla caseificazione.

Tra il 1990 e il 2000 il numero di aziende che allevano capre è diminuito del 46.8% a fronte di un aumento del numero medio di capi allevati per azienda del 5.2% e pari a 19 animali [3].

Questi problemi sono dovuti in gran parte all'offerta polverizzata: piccoli e numerosi, gli allevatori sono vulnerabili ai trasformatori e risulta loro difficile rendere remunerosa l'attività.

Ma non solo. Un altro vincolo che limita la crescita sono le ridotte dimensioni degli allevamenti. Solo il 30% conta una superficie maggiore di 10 ettari e, ancor più grave, circa 6 mila aziende risultano prive di terreno proprio o con una superficie disponibile inferiore a 1 ettaro. Questo è dovuto ancora oggi, in particolare in alcune zone, alla diffusione del pascolo abusivo in aree pubbliche [3].

### **1.1.1 Le razze**

Le razze caprine presenti in Italia sono numerose e distribuite diversamente lungo la penisola. Di queste solo il 35% sono ufficialmente riconosciute e provviste di libro genealogico, distinguibili in razze gentili (cosmopolite) e rustiche (autoctone) [4].

Le prime, per loro attitudine produttiva ma anche grazie ad un modesto lavoro di selezione, si prestano meglio all'allevamento intensivo e ad essere utilizzate praticamente ovunque. Le seconde invece, per lo più diffuse nell'Italia meridionale e in alcune vallate del Nord, sono tipiche di un ambiente o area geografica particolare ove una razza gentile si adatterebbe con difficoltà.

La razza maggiormente presente sul nostro territorio, come riportato nella tabella 1.1, è la Sarda con 250.000 esemplari, seguono la Garganica con 50.000 capi e con 40.000 la Camosciata, la Saanen e la Maltese. Considerando un totale di circa 980.000 capi, possiamo affermare quindi che il mondo caprino italiano è costituito da numerose razze più o meno riconosciute e costituisce un'enorme risorsa genetica.

| <b>Razza</b> | <b>Numero capi</b> |
|--------------|--------------------|
| Camosciata   | 40.000             |
| Saanen       | 40.000             |
| Orobica      | 4.000              |
| Garganica    | 50.000             |
| Girgentana   | 1.000              |
| Jonica       | 18.000             |
| Maltese      | 40.000             |
| Sarda        | 250.000            |

*Tabella 1.1 – Consistenza principali razze caprine allevate in Italia sottoposte a controlli (Dati Assonapa, 2000) [4].*

Nel nord Italia si allevano in prevalenza razze importate dalla Svizzera quali Saanen e Camosciata delle Alpi, che sono le due su cui sono stati concentrati i maggiori sforzi di selezione e le più adatte all'allevamento intensivo, ma anche razze autoctone come la Bionda dell'Adamello in Val Camonica, Roccaverano in Piemonte e Orobica nelle Alpi Orobie e nelle limitrofe aree prealpine.

Nel mezzogiorno e nelle isole la Sarda predomina in Sardegna, mentre in Sicilia e nel restante meridione ogni provincia o area è caratterizzata da un tipico allevamento.

### **1.1.2 L'importanza in zone “minori”**

L'allevamento caprino è molto legato e vocato a quelle zone montuose e collinari svantaggiate, ove si ritiene prioritario la conservazione dell'ambiente e la contemporanea presenza dell'uomo. La capra, oltre a quanto già detto, si presta ad utilizzare le risorse foraggiere naturali meglio della vacca, la quale data l'elevata produttività richiede sempre più un largo uso di alimenti concentrati da acquistare presso aziende specializzate.

Spesso l'allevamento caprino è frutto di consolidate tradizioni casearie artigianali di elevata qualità e importante risorsa turistica per il territorio. Sono piccoli allevamenti dediti alla trasformazione del latte in formaggi tradizionali destinati alla vendita diretta al consumatore, tramite piccoli spacci o attività agrituristiche, altrimenti fornitori di piccoli negozi alimentari della zona.

Oggigiorno, sulle orme della vicina Francia ove l'allevamento caprino è una florida risorsa anche a livello industriale, l'opera di salvaguardia della biodiversità animale, della valorizzazione del territorio e dei prodotti tradizionali punta alla definizione di regolamenti che identifichino la tecnologia e l'area geografica di produzione; così da garantire la tipicità del prodotto, la qualità e promuoverne la conoscenza. A questo, sia a livello nazionale che europeo, si sta contribuendo anche con l'erogazione di finanziamenti e l'istituzione di comunità montane.

## 1.2 Il latte di capra

La lattazione caprina ha una durata variabile di circa 200 giorni, ma sia la quantità che la composizione presentano in base alla razza notevoli differenze. Le più produttive, la Saanen e la Camosciata, producono rispettivamente circa 519 e 462 kg/anno.

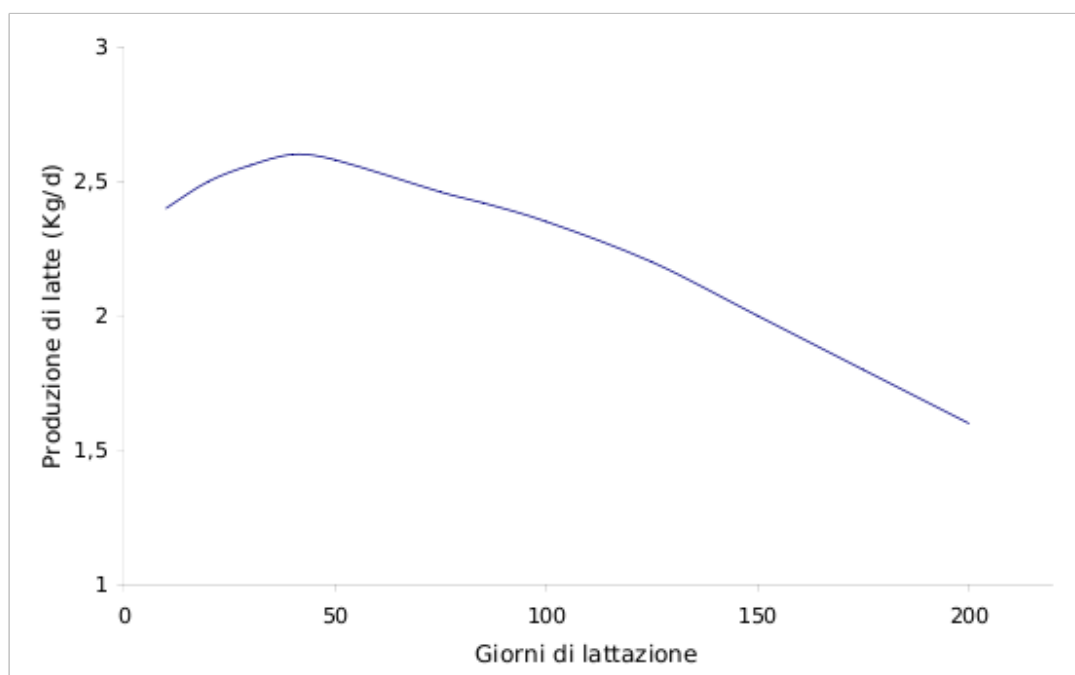
| <b>Razza</b> | <b>Latte kg/anno</b> | <b>Grasso %</b> | <b>Proteine %</b> |
|--------------|----------------------|-----------------|-------------------|
| Saanen       | 519                  | 3,06            | 2,91              |
| Camosciata   | 462                  | 3,22            | 2,97              |
| Girgentana   | 440                  | 3,78            | 4,36              |
| Jonica       | 333                  | 4,00            | 3,60              |
| Maltese      | 303                  | 4,10            | 4,30              |
| Orobica      | 288                  | 2,70            | 2,61              |
| Garganica    | 230                  | 4,30            | 3,80              |
| Sarda        | 196                  | 5,00            | 4,50              |

*Tabella 1.2 – Produzione media di latte delle principali razze caprine allevate in Italia (dati Assonapa, 2000)*

La composizione chimica del latte di capra, naturalmente, è molto variabile anche in relazione all'età dell'animale, allo stato di lattazione, al tipo di alimentazione ed alle condizioni ambientali e climatiche in cui vive.

Il latte nei primi 4-5 giorni, definito colostro, presenta un elevato contenuto proteico e lipidico che tende a diminuire ed assestarsi in 48 ore. Il lattosio, invece, detiene i valori minimi nelle ore prossime al parto e successivamente si registra un aumento graduale fino ai valori tipici del latte maturo. Questo primo latte è anche la prima fonte di anticorpi, in particolare immunoglobuline, destinate al capretto.

Successivamente, la quantità di latte prodotta è variabile e segue un andamento tipico, definito dalla curva di lattazione, caratterizzato da un picco di produzione e da una tendenza decrescente fino all'asciutta.



*Figura 1.1 – Curva di lattazione tipica*

La curva di lattazione è influenzata anche dall'ordine di parto, in quanto si hanno valori di produzione bassi per le primipare e crescenti fino alla quarta lattazione circa, ma anche dal tipo di parto: quello gemellare garantisce maggiori produzioni di un parto singolo.

La tabella 1.3 riporta la composizione indicativa media del latte di capra a confronto con il comune latte di vacca [5].

|                     | <b>Capra</b> | <b>Vacca</b> |
|---------------------|--------------|--------------|
| <b>Acqua g/L</b>    | 883,8        | 870,8        |
| <b>Lattosio g/L</b> | 42,9         | 48,0         |
| <b>Lipidi g/L</b>   | 35,3         | 40,6         |
| <b>Proteine g/L</b> | 31,0         | 33,6         |
| <b>Ceneri g/L</b>   | 7,0          | 7,0          |

*Tabella 1.3 – Composizione media del latte di capra e di vacca*

### 1.2.1 Principali costituenti

#### Glucidi

Oltre al lattosio, zucchero più importante e fonte energetica principale delle fermentazioni, si evidenzia la presenza di oligosaccaridi in quantità cinque volte superiore a quella del latte vaccino. Tali oligosaccaridi, sebbene presenti in tracce (mg/L), sembrano favorire lo sviluppo nell'uomo delle *Bifidobacterium spp.* che a livello intestinale esplicano azione protettiva [6].

Il latte di capra presenta un minor contenuto di lattosio rispetto a quello vaccino e inoltre l'N-acetilgalattosammina, presente nel latte bovino, è assente nel latte ovicaprino: tale differenza è stata proposta come strumento per individuare l'aggiunta di latte vaccino, fino ad una quantità pari al 5%, a quello di capra [5].

#### Proteine e altre sostanze azotate

Il latte di capra presenta una composizione proteica più simile al latte umano, definito “albuminoso”, che a quello di vacca detto “caseinoso”. Infatti, come è evidente nella tabella 1.4, il latte caprino è relativamente povero in caseine, sostanze maggiormente coinvolte nella formazione del coagulo, ma più ricco in sieroproteine.

|                           | <b>Capra</b> | <b>Vacca</b> |
|---------------------------|--------------|--------------|
| <b>Caseina</b>            | 65-68%       | 74-78%       |
| <b>Sieroproteine</b>      | 25%          | 17%          |
| <b>Azoto non proteico</b> | 7%           | 5%           |

*Tabella 1.4 – Frazioni azotate nel latte di capra e di vacca  
(% sul totale azotato)*

E' molto importante considerare anche le differenze strutturali. Le micelle di caseina del latte caprino hanno un diametro minore rispetto a quello di vacca: ciò rende il latte più digeribile dato che gli enzimi digestivi le idrolizzeranno più facilmente, ma influenzerà anche la formazione del coagulo che avverrà in minor tempo e sarà più soffice e friabile. La cagliata sarà meno consistente, impossibile da filare, difficile da spurgare e sottoporre a lunghe stagionature.

Osservando la frazione caseinica, è nota una elevata eterogeneità tra le varie razze, ma generalmente si ha un tasso di  $\kappa$  e  $\beta$  caseina maggiore e un più basso in caseina  $\alpha s1$  rispetto al vaccino.

|                      |                                 | <b>Valori medi</b>    |                       |
|----------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                      |                                 | <b>Latte di Capra</b> | <b>Latte di Vacca</b> |
| <b>Caseine (g/L)</b> |                                 | 26,8                  | 29,5                  |
|                      | <b>Ripartizione percentuale</b> |                       |                       |
|                      | $\alpha s1$ (%)                 | 23,1                  | 40,3                  |
|                      | $\alpha s2$ (%)                 | 18,4                  | 10,5                  |
|                      | $\beta$ (%)                     | 39,1                  | 33,2                  |
|                      | $\gamma$ (%)                    | -                     | 4,1                   |
|                      | $\kappa$ (%)                    | 17,4                  | 11,9                  |

*Tabella 1.5 – Caratteristiche frazione caseinica a confronto [5].*

Altro dato importante è il contenuto in azoto non proteico (NPN), come urea, amminoacidi liberi e ammoniacale, maggiore nel latte caprino di qualche punto percentuale e riportato in tabella 1.6.

|                  |                                 | <b>Valori medi</b>    |                       |
|------------------|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                  |                                 | <b>Latte di Capra</b> | <b>Latte di Vacca</b> |
| <b>NPN (g/L)</b> |                                 | 0,42                  | 0,28                  |
|                  | <b>Ripartizione percentuale</b> |                       |                       |
|                  | Urea (%)                        | 65,0                  | 29,6                  |
|                  | Acido urico (%)                 | 0,6                   | 8,1                   |
|                  | NH <sub>3</sub> (%)             | 0,8                   | 2,4                   |
|                  | Creatina – Creatinina (%)       | 3,5                   | 15,6                  |
|                  | Amminoacidi liberi (%)          | 17,0                  | 13,2                  |
|                  | Altro (%)                       | 13,8                  | 31,3                  |

*Tabella 1.6 – Caratteristiche frazione azotata non proteica [5].*

## **Lipidi**

Le differenze rispetto al latte vaccino sono evidenziabili sia sotto l'aspetto quantitativo che qualitativo. Il latte di capra presenta un maggior numero di acidi grassi a media e corta catena (C6-C10), come l'acido capronico, caprilico e caprinico, responsabili del tipico aroma dei prodotti.

I globuli di grasso del latte caprino sono più piccoli, hanno un diametro di soli 1-2 µm a differenza dei 3-4 µm del latte di vacca: questa particolarità, insieme all'assenza di agglutinine, determina una tendenza all'affioramento della crema praticamente nulla e allo stesso tempo, se sottoposto a coagulazione, la difficoltà da parte del reticolo caseinico nel trattenere il grasso, con conseguenti rese minori.

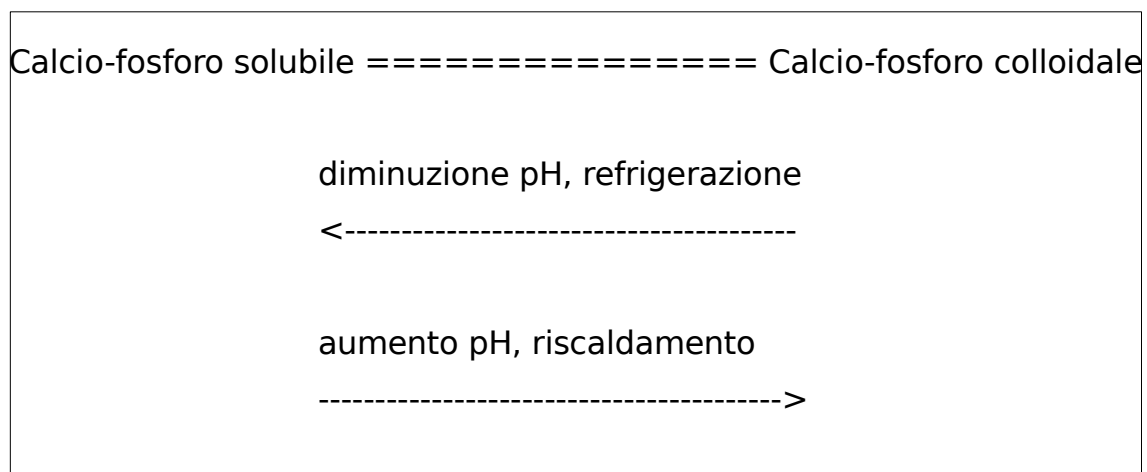
I globuli, oltre ad essere più piccoli e presentare perciò una maggiore superficie di esposizione, sono rivestiti da una sottile e fragile membrana lipoproteica. Queste caratteristiche li rendono più sensibili alla lipolisi: il latte sarà soggetto a rapido irrancimento ed i formaggi matureranno in tempi minori.

Inoltre, a differenza del latte vaccino, il grasso di capra è privo di caroteni e quindi il latte e i prodotti appaiono di colore più bianco [4].

### **Sali minerali**

Il latte di capra è contraddistinto da interessanti valori in sali minerali, in particolare presenta un buon contenuto in potassio e ferro.

Indispensabile osservare, soprattutto ai fini della caseificazione, il rapporto calcio-fosforo. Nel latte caprino il 45% del calcio è legato alla caseina (22% nel latte vaccino), mentre è più povero in sali di calcio solubili e più ricco in fosfati. L'equilibrio tra calcio e fosforo solubile e colloidale è influenzato dal pH e dalla temperatura. E' importante quindi valutare attentamente il trattamento termico, refrigerazione o riscaldamento, a cui sottoporre il latte e l'accidentale acidificazione: lo spostamento dell'equilibrio è in grado di mutare la carica della micella caseinica e determinare una minore o maggiore stabilità del coagulo[4].



*Figura 1.2 – Equilibrio calcio-fosforo in funzione del pH e della temperatura*

## Vitamine

Il latte caprino crudo contiene bassi valori di acido folico rispetto alle altre specie zootecniche. La vitamina A è contenuta come tale, a differenza del latte vaccino ove è presente anche come  $\beta$ -carotene, e si manifesta con un colore bianco intenso sia nel latte che nei prodotti.

| Vitamine ( $\mu\text{g/L}$ ) | Capra       | Vacca       |
|------------------------------|-------------|-------------|
| <b>Liposolubili</b>          |             |             |
| A                            | 622         | 270-468     |
| Carotene                     | Assente     | 140-220     |
| D                            | 0,6-1,1     | 0,20-1,25   |
| E                            | 300         | 410-1.000   |
| K                            |             | 0-330       |
| <b>Idrosolubili</b>          |             |             |
| C (mg/L)                     | 12,9-15     | 10-24       |
| B1                           | 400         | 300-550     |
| B2                           | 1.380-1.840 | 1.400-2.200 |
| B6                           | 70-600      | 220-700     |
| B12                          | 0,6         | 3-7,6       |
| Niacina                      | 1.870-2.770 | 700-1.100   |
| Acido pantotenico            | 3.100-3.440 | 2.800-4.200 |
| Acido folico                 | 2,4-10      | 2,8-68      |
| Biotina                      | 93          | 20-50       |

*Tabella 1.7 – Contenuto in vitamine ( $\mu\text{g/L}$ ) presenti nel latte caprino e vaccino [5]*

### **1.2.2 Principali indici chimico-fisici**

#### **Densità**

Il latte di capra presenta una densità media simile al latte vaccino e pari a 1,028-1,034 g/L, mentre si discosta dal latte di pecora, più denso, e caratterizzato da una densità pari a 1,034-1,040 g/L.

Un latte annacquato è evidenziabile da una diminuzione della densità, mentre al contrario la scrematura ne aumenta il valore. Come è logico pensare, se le operazioni di annacquamento e scrematura sono attuate contemporaneamente e attentamente, è possibile mantenere la densità del latte entro i valori normali.

#### **Indice crioscopico**

Il punto di congelamento (o punto crioscopico), altro indice molto importante utilizzato per rilevare eventuali irregolarità del latte, è compreso normalmente tra -0,520 e -0,540°C. L'innalzamento del punto crioscopico può nascondere una frode, come l'aggiunta di acqua, ma non solo. Anche un latte mastitico, che presenta valori ridotti di lattosio e citrati, determina un indice crioscopico più elevato e simile al latte annacquato. Così anche un latte acidificato, o a cui è stato aggiunto del sale, comportano una variazione del punto crioscopico.

#### **pH**

Nel latte caprino fresco l'equilibrio ionico fra i suoi elettroliti è vicino alla neutralità: il pH oscilla tra 6,5-6,7. Il latte è una soluzione tamponata, grazie in particolare ai gruppi ionici delle proteine, in grado di annullare piccole aggiunte di acidi o basi.

Il pH è misurato secondo una scala logaritmica e, quindi, è da considerare anormale un latte che presenti valori anche solo

leggermente divergenti dall'intervallo 6,5-6,7. Il latte di capre affette da mastite è caratterizzato da un minore contenuto in proteine e valori di pH pari a 6,9-7,0 mentre il pH del colostro risulta basso (6,5-6,4).

L'acidità, oltre al pH, è esprimibile anche come risultato di una titolazione con NaOH e misurata in gradi SH (Soxhlet-Henkel). Un latte fresco normale assume valori compresi tra 3,0 e 3,4°SH/50 [4].

### **1.3 Attitudine alla caseificazione**

Alla luce delle considerazioni fin qui esposte, il latte sottoposto a coagulazione si comporterà in maniera differente rispetto al latte vaccino. In particolare:

- il coagulo si forma più rapidamente e con dosi minori di caglio, ma è meno consistente e i tempi di spurgo e rassodamento sono superiori;
- la resa è inferiore rispetto al vaccino del 10-20% circa;
- il coagulo è delicato e non può essere sottoposto a trattamenti meccanici quali filatura ne tanto meno può sopportare elevate temperature.

Il latte di capra quindi non si presta a tutti i tipi di lavorazione. Esso è più adatto alla produzione di formaggi a coagulazione prevalentemente lattica, pasta fresca e breve o nulla stagionatura. Se sottoposto a coagulazione presamica, sono da escludere quelle produzioni che richiedono elevate temperature di cottura della cagliata, lavorazioni meccaniche intense in caldaia e lunghi tempi di stagionatura. A meno che non sia miscelato con del latte vaccino o di pecora, è sconsigliata la produzione di formaggi di grossa pezzatura, dato che la cagliata di pura capra si presenta poco tenace e fragile.

Nell'immaginario comune il latte di capra è stato quindi sempre associato alla produzione di caprini freschi, a coagulazione acida, che sono stati e forse ancor più oggi di gran successo in Francia, ma anche in Italia.

Ad essi è possibile affiancare la produzione, meno diffusa, di tome presamiche di piccole-medie dimensioni, pasta semidura e a breve stagionatura.

### **1.3.1 Le tecnologie produttive del formaggio**

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 in base alla 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. Dovendo riassumere, 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.

### 1.3.2 Formaggi 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.

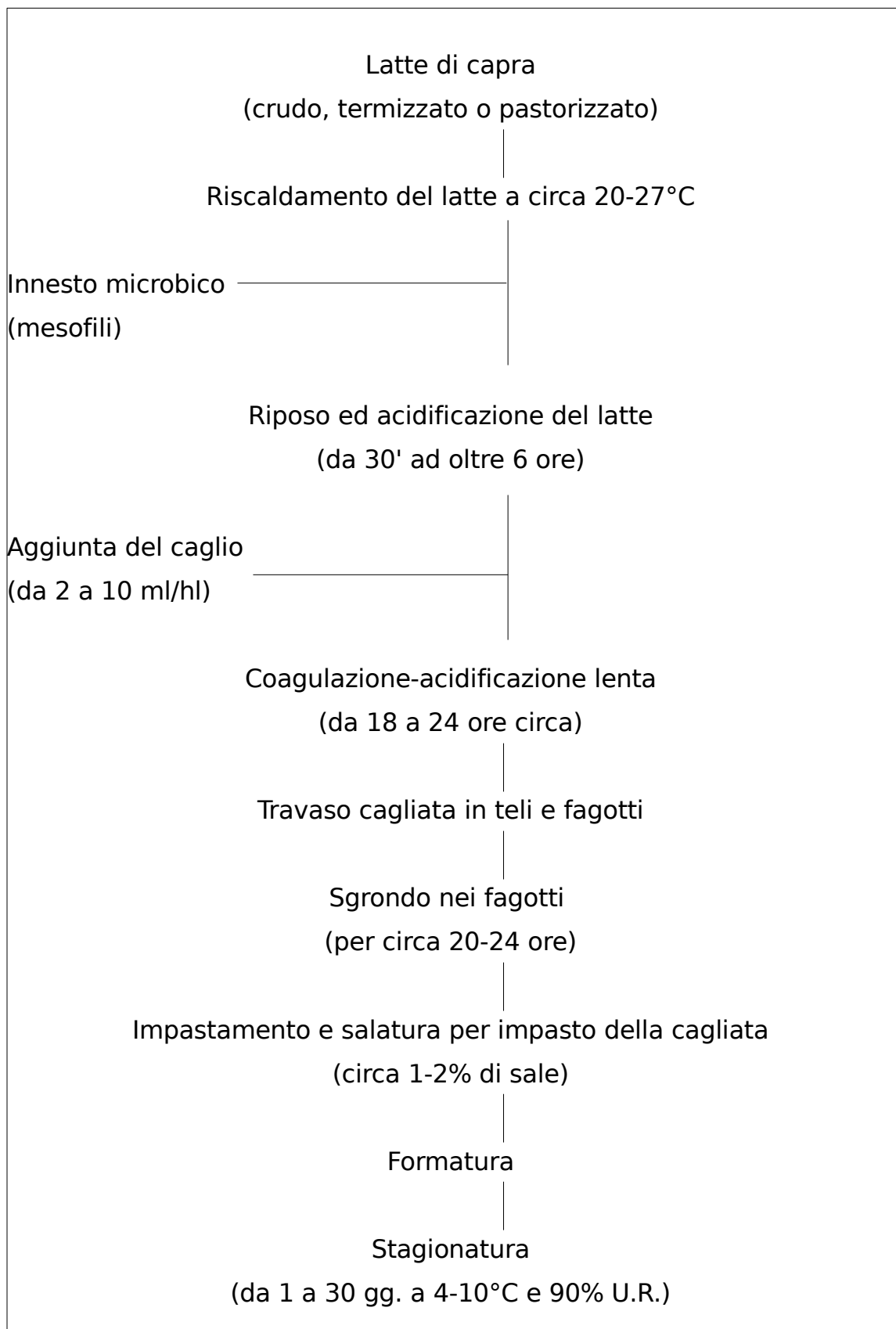
In qualche caso, meno frequentemente, i caprini freschi sono sottoposti ad una breve stagionatura di 20-30 giorni dopo essere stati insemenzati, per aspersione, con una soluzione salina contenente spore di muffe tipiche (*Penicillium*) in grado di formare un feltro superficiale colorato e caratterizzare sensorialmente il prodotto.

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

La tabella 1.8 riporta le percentuali dei principali costituenti, mentre la figura 1.3 evidenzia lo schema di produzione.

|          | Caprino fresco | Caprino fresco stagionato |
|----------|----------------|---------------------------|
| Acqua    | 51-65%         | 41-50%                    |
| Grasso   | 15-18%         | 19-28%                    |
| Proteine | 16-19%         | 22-25%                    |
| Ceneri   | 3-5%           | 5-7%                      |

*Tabella 1.8 – Composizione media del caprino fresco e il caprino fresco stagionato*



*Figura 1.3 – Schema generale della produzione del formaggio caprino lattico*

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 starters 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 popolato da microrganismi mesofili omo ed eterofermentanti quali *S. lactis*, *S. cremoris* e *S. diacetylactis*. L'acidificazione avviene lentamente, da 30' a 6 ore, 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 una coagulazione lenta che si protrae anche per 24 ore ad una temperatura pari a 22-25°C [4].

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, 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 per spolveramento delle 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 applica 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, su griglie metalliche e ben areati, a 10-14°C e con una umidità relativa superiore all'85% per un periodo compreso tra i 10-30 giorni.

### **1.3.3 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 1.9 ne riporta la composizione media.

|                 | <b>Caprino presamico stagionato</b> |
|-----------------|-------------------------------------|
| <b>Acqua</b>    | 35-45%                              |
| <b>Grasso</b>   | 24-32%                              |
| <b>Proteine</b> | 20-26%                              |
| <b>Ceneri</b>   | 3-4%                                |

Tabella 1.9 - *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.

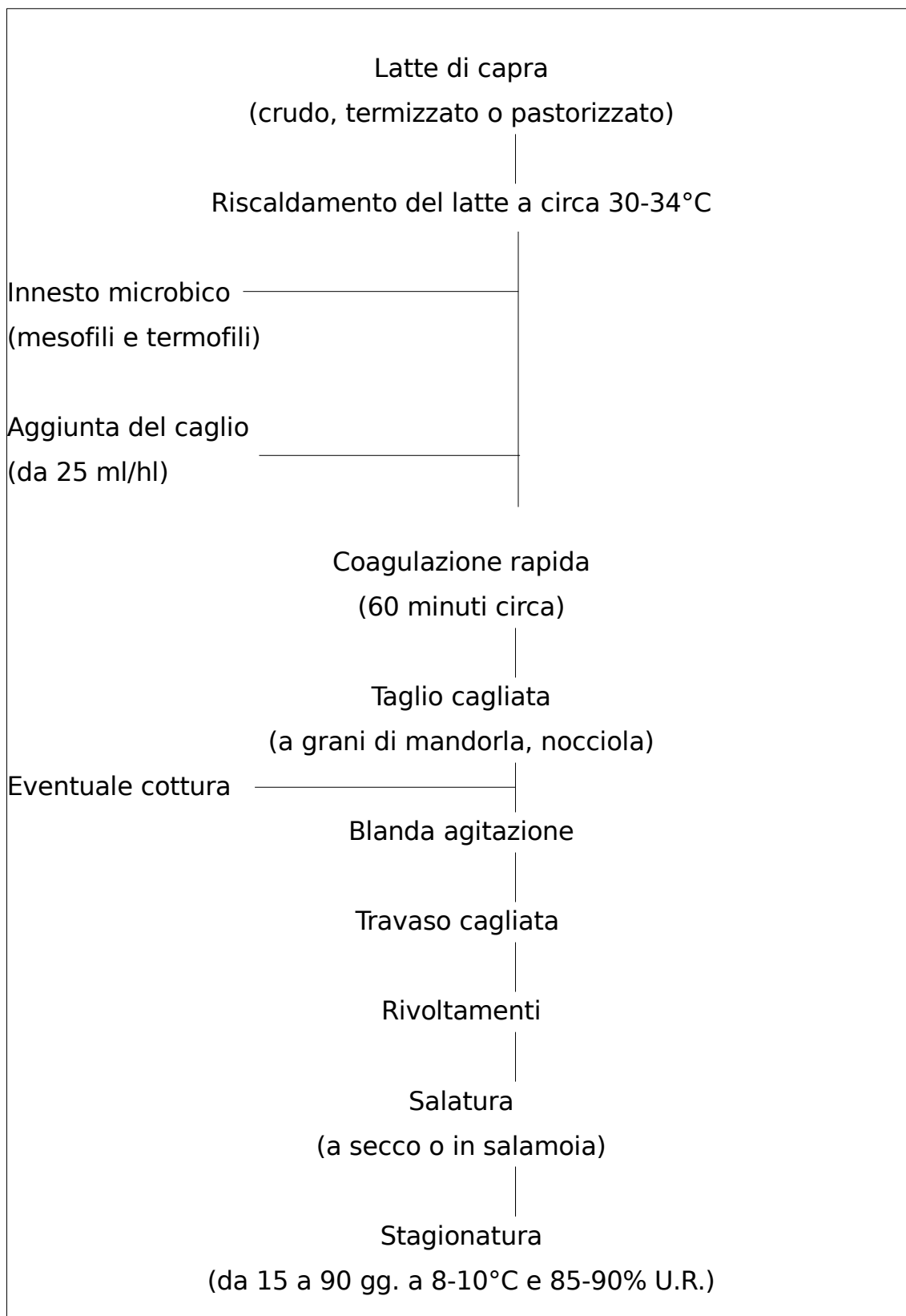
Le due tipologie presentano molte affinità produttive, rappresentate nella figura 1.4.

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 eterofermentanti (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 allocate, 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.



*Figura 1.4 – Schema generale della produzione del formaggio caprino presamico*

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, a differenza dei formaggi presamici a pasta cruda, si protrae anche fino a 4 mesi.

Alcuni esempi di questi formaggi sono lo Stael e il Caprino Pugliese.

## 1.4 Aspetti microbiologici

La qualità microbiologica del formaggio è fortemente influenzata dalle condizioni igieniche di lavorazione in ogni sua fase. Un buon latte destinato alla caseificazione deve presentare una bassa carica microbica, in particolare anticasearia, assenza di patogeni pericolosi per la salute e antibiotici che impedirebbero lo sviluppo dei batteri lattici. Il numero totale di microrganismi presenti nel latte, e in parte la loro natura, è determinato dalla dieta alimentare ma in particolare dall'igiene della mungitura, dalle condizioni di conservazione e trasformazione. Lo stato igienico-sanitario degli animali, degli ambienti di lavorazione, le superfici e gli strumenti utilizzati, deve garantire la minor presenza di microrganismi indesiderati, soprattutto patogeni. Ciò non è affatto semplice, in quanto il latte è un substrato ricco di nutrienti, con un pH vicino alla neutralità, quindi un ottimo terreno di crescita per molti microrganismi.

La microflora più comunemente presente nel latte è costituita prevalentemente da batteri lattici acidificanti (micrococchi in particolare), indice naturale dell'attitudine casearia della materia prima, e da piccole quantità di coliformi, clostridi, propionici, lieviti e muffe. La flora acidificante lattica si sviluppa meno rapidamente della flora contaminante (coliformi e psicrotrofi) e di conseguenza un latte con una elevata carica batterica sarà popolato da microrganismi inadatti alla caseificazione. Infatti i microrganismi psicrotrofi, tra i quali *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* e *Achromobacter*, a temperature pari a 6-8°C sono in grado di raddoppiare il loro numero in sole 4-8 ore [4]. Inoltre, l'eventuale trattamento termico di pastorizzazione avrà effetti limitati: distrugge i microrganismi ma non inattiva i loro enzimi, che esplicano azione proteolitica e lipolitica con conseguente formazione di un coagulo molle, difficile da spurgare, e un gusto rancido nei formaggi.

I principali gruppi microbici presenti nel latte sono:

- Carica Batterica Totale (CBT): tutti i microrganismi presenti nell'alimento; deve essere tanto più bassa quanto più il prodotto è fresco.
- Carica Batterica Psicrotrofa (CBP): microrganismi in grado di crescere a bassa temperatura: un latte refrigerato a lungo (>48 h) presenta in genere una CBP elevata. Il trattamento termico distrugge i microrganismi ma rimangono attivi i loro enzimi in grado di condizionare il prodotto finito.
- Batteri lattici: numerosi e utili ai fini della caseificazione. Possono essere acidificanti piuttosto che aromatizzanti e quindi responsabili del processo di maturazione del formaggio. La loro presenza numerosa contrasta lo sviluppo di microrganismi anticaseari sia per competizione sia per produzione di sostanze ad attività antimicrobica (batteriocine). Distinguibili principalmente in lattococchi e lattobacilli.
- Coliformi: gruppo di microrganismi ad habitat intestinale, produttori di gas e dotati di una buona capacità proteolitica, che nel formaggio possono dare sapori e odori sgradevoli e gonfiori precoci. Considerati indice dello stato igienico del prodotto, sono distrutti dalla termizzazione e dalla pastorizzazione.
- Escherichia coli: specie coliforme indicatore di contaminazione fecale; alcuni ceppi patogeni sono responsabili di forme diarroiche.
- Stafilococchi: in particolare lo *Staphylococcus aureus*, capace di rilasciare tossine termoresistenti che causano nell'uomo gastroenteriti. Esso è un normale saprofito della pelle e delle mucose dell'uomo e animali; rappresenta nel latte e prodotti derivati un altro indice di scarsa igiene. E' uno degli agenti eziologici della mastite nei ruminanti.
- Salmonella: patogeno con habitat intestinale, indice di poca igiene, è responsabile di una infezione alimentare che si manifesta con gastroenterite. Deve essere assente in 25g di prodotto.

- Listeria monocytogenes: microrganismo di origine ambientale, ubiquitario, molto psicrotrofo, patogeno per l'uomo e responsabile della Listeriosi. Per evitare la contaminazione bisogna prestare particolare attenzione all'acqua utilizzata, che deve essere potabile, ed alle condizioni della cella di stagionatura. Per legge deve essere assente in 25 g di prodotto.
- Lieviti e muffe: concorrono alla formazione dell'aroma del formaggio, ma possono dare sgradevoli conseguenze se presenti in forti quantità. Essi giungono nel prodotto generalmente dall'ambiente di lavorazione, in particolar modo dalla cella di stagionatura.

#### **1.4.1 Le fermentazioni**

Parte dei microrganismi sopra descritti sono caratterizzati da attività fermentativa a carico del lattosio molto importante e di interesse tecnologico ai fini della caseificazione.

- Fermentazione lattica: operata dai batteri lattici che spontaneamente acidificano il latte. Alla base dei processi di caseificazione, è assolutamente da evitare nel latte destinato al consumo diretto.
- Fermentazione alcolica: operata dalla flora contaminante, coliformi e lieviti in particolare, libera forte quantità di gas ed è spesso causa di gonfiori precoci nei formaggi. Questi microrganismi sono distrutti dai trattamenti termici.
- Fermentazione propionica: caratteristica dei microrganismi propionici, è ricercata nei formaggi come l'Emmenthal in cui determina la tipica occhiatura. Risulta dannosa se si sviluppa in altri formaggi a pasta dura. I batteri propionici sono resistenti ai trattamenti termici ma poco alotolleranti.

- Fermentazione butirrica: operata dai Clostridi butirrici, è causa del gonfiore tardivo nei formaggi e quindi molto grave in termini economici.

#### **1.4.2 Normativa**

In base al DPR n.54 del 14.01.1997 di Recepimento e Attuazione della Direttiva CEE 92/46 (pubblicato sul Supplemento della GU n.59 del 12.03.1997), il latte deve provenire da aziende registrate ed animali sani, controllati e dichiarati ufficialmente indenni da Brucellosi, non contenere residui chimici o farmacologici in misura superiore ai limiti stabiliti dalla direttiva CEE 2377/90 e presentare le seguenti caratteristiche microbiologiche:

- CBT a 30°C <  $1,5 \times 10^6$  ufc/ml per la produzione di formaggi da latte pastorizzato
- CBT a 30°C <  $5,0 \times 10^5$  ufc/ml per la produzione di formaggi da latte crudo

I valori sono calcolati sulla base di una media geometrica relativa ad un periodo di due mesi con almeno due prelievi al mese.

La legislazione attuale non prende in considerazione il numero di batteri coliformi, sebbene la loro presenza in numero elevato è considerata, come già accennato, indice di scarso igiene.

Oltretutto, nella versione originale europea della 92/46 sono prescritti per i latti bufalini e ovi-caprini destinati alla fabbricazione di prodotti da latte crudo gli stessi limiti per *Staphylococcus aureus* previsti per il latte vaccino, limiti che non sono stati recepiti in Italia dal DPR n.54/97.

Anche per quanto riguarda le cellule somatiche, non sono previste limitazioni sia a livello normativo europeo che nazionale perché, a differenza del latte bovino ove è chiaro sintomo di mastite, il latte di capra presenta una variabilità molto elevata dovuta a numerosi fattori.

Il Decreto Legislativo n.54, tra le varie disposizioni, fornisce anche indicazioni relative alle condizioni generali e i requisiti per il riconoscimento degli stabilimenti di trasformazione, tra cui l'adozione di un sistema di autocontrollo ispirato ai principi del metodo HACCP.

Il DPR 54/97 prevede comunque una serie di deroghe parziali riguardanti le piccole aziende di trasformazione di latte (<2.000.000 litri/anno e <500.000 litri/anno) che non devono adeguare né locali né impianti, e una deroga totale per le aziende che effettuano la vendita diretta dei prodotti lattiero-caseari presso propri locali. Queste deroghe sono ulteriormente ampliate dalla legge sulla produzione dei formaggi "tradizionali" (DL 173/98 e DM Sanità del 2.11.1999).

In ogni caso, i caseifici aziendali sono soggetti alle norme sulle licenze comunali e sull'igiene dei locali di fabbricazione (DM 327/80) e, quindi, vanno ideati, costruiti e condotti secondo la buona prassi igienico-sanitaria.

## 2. Attività svolta

La mia attività, svolta presso i laboratori del DiSTAM, sezione di Microbiologia Agraria, Alimentare ed Ecologica, ha riguardato l'analisi microbiologica di formaggio caprino provenienti da 3 piccoli caseifici della Valsesia, in Piemonte: uno di fondovalle e due di alpeggio. Il prodotto in questione è un formaggio a coagulazione prevalentemente presamica, pasta semicotta e media stagionatura ottenuto con del latte di capra crudo intero proveniente dalla mungitura serale e mattutina.

Le analisi, effettuate su prelievi sterili del prodotto lungo le successive fasi di lavorazione, hanno avuto come obiettivo la ricerca di determinati gruppi microbici: CBT, contaminanti, coliformi totali e fecali, batteri lattici totali (cocchi e bastoncini), Enterococchi, Micrococcaceae, lieviti e muffe.

Successivamente, ai fini della caratterizzazione, sono stati isolati da ogni singola produzione, a differenti fasi di lavorazione, batteri lattici, Micrococcaceae, lieviti e muffe per un totale di 1200 ceppi. Per ciascun isolato, dopo averne verificato la purezza e le caratteristiche morfologiche (microscopio ottico 480x), sono state avviate prove di classificazione mediante test di tipo molecolare.

Nel periodo limitato del tirocinio ho dedicato l'attenzione al genere *Enterococcus*. Da ciascun isolato, dopo aver estratto il DNA, è stato possibile riconoscere 34 gruppi mediante tecnica RAPD con primer universale e analisi della regione spaziatrice ITS.

Infine, un rappresentante per ogni gruppo è stato sottoposto a sequenziamento parziale della regione 16S rDNA.

## **2.1 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 km<sup>2</sup> 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, chiamata Val Grande, e numerose valli laterali minori. 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.

## **2.2 Realtà studiate**

I caseifici presi in esame sono tre. Uno di questi è situato a fondovalle, nel paese di Carcoforo (VC), mentre gli altri due sono alpeggi raggiungibili a piedi o con fuoristrada ubicati nei comuni di Campertogno e Scopello (VC), rispettivamente in località Cangelo e in località Alpe Mera. Nei tre caseifici sono allevate capre ibride e tutta la lavorazione del latte, mungitura compresa, è condotta manualmente e artigianalmente. Il latte refrigerato della sera e del mattino viene impiegato crudo.

## **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.

Ad esso si accede da un cortile di ghiaia, ove sostano i mezzi dei proprietari e dei clienti. Affacciato al cortile vi sono anche le due stalle di capre e vacche.

La lavorazione, che prosegue per non più di due ore, avviene al mattino o al pomeriggio ed è effettuata da un singolo operatore.

Il processo è riassunto nel diagramma di flusso della figura 2.1.

Il latte è trasportato dalla stalla al locale di produzione mediante secchi: versato nella caldaia di alluminio è riscaldato da un bruciatore a GPL.

Raggiunti i 33°C, viene aggiunto del caglio commerciale in pasta (1:10000) diluito in concentrazione pari a 20cc/100l. Per l'operazione è utilizzata una siringa di plastica, poi lavata e destinata ad ulteriore utilizzo.

Trascorsi 15-20 minuti in cui avviene la coagulazione, viene effettuato il primo taglio con coltello ed un secondo con le mani. Il siero viene asportato con delle bacinelle di plastica e destinato all'alimentazione degli animali.

Successivamente, la cagliata viene portata a 36-37°C aggiungendo dell'acqua a 50°C allo scopo di ottenere una blanda cottura. Il siero che si forma nuovamente viene eliminato.

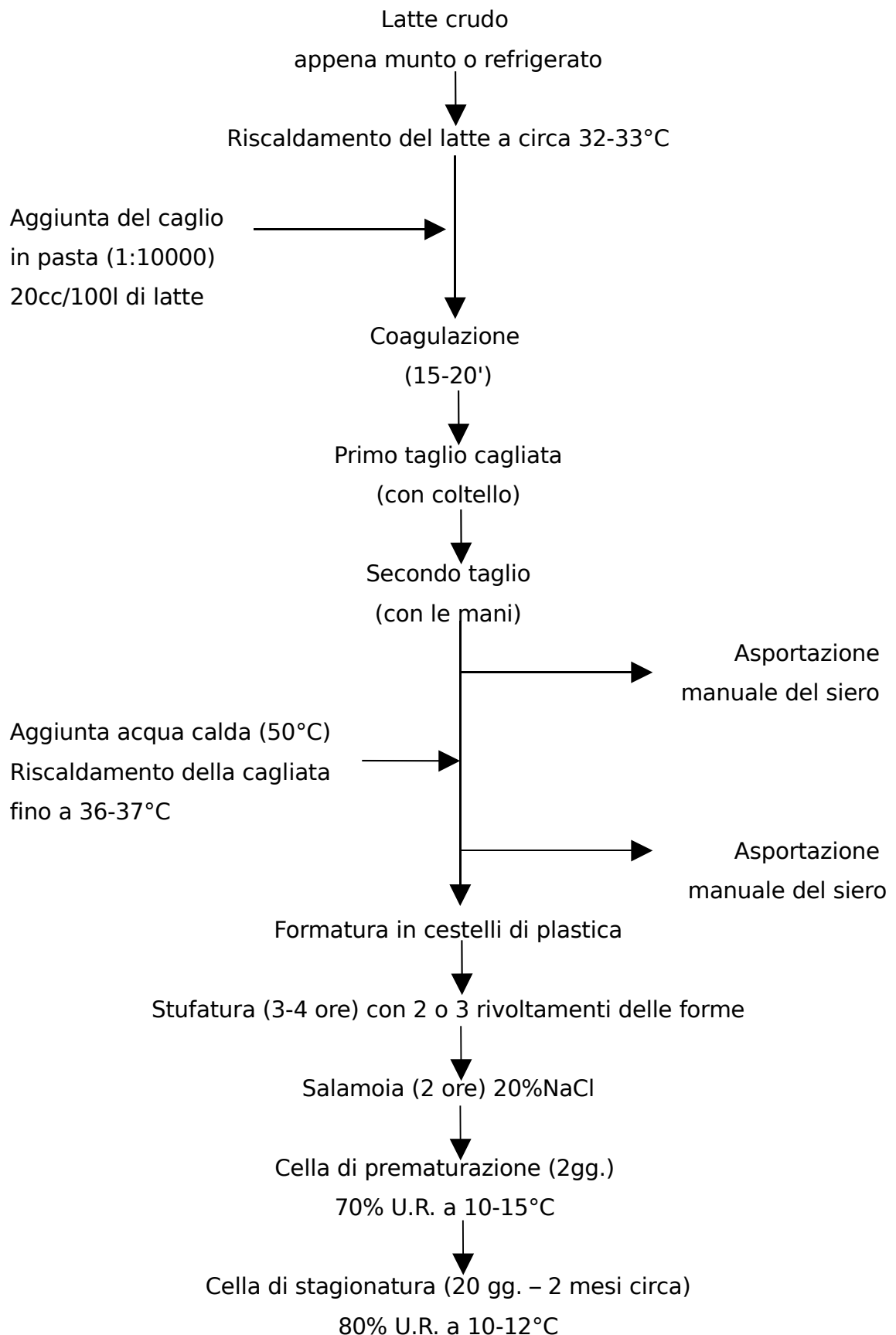
Quando i grani di caglio sono ben separati vengono trasferiti manualmente nei cestelli forati di plastica e l'addetto provvede con una leggera pressione a favorirne la formatura. I cestelli vengono così trasferiti su una griglia e con del vapore acqueo si effettua una stufatura di 3-4 ore con 2-3 rivoltamenti.

Terminata la stufatura le forme vengono immerse nella salamoia al 20%, rinnovata ogni 2 mesi, realizzata in una bacinella di plastica. Le forme sostano 2 ore.

Successivamente vengono trasferite nella cella di pre-maturazione (U.R.= 70% e T= 10-15°C) e riposte su assi di abete bianco ove permarranno per 2 giorni. In questa stessa cella sono presenti salami, formaggi di vario tipo e strisce adesive cattura insetti. Essa è utilizzata anche come ripostiglio.

Infine i formaggi vengono trasferiti nella cella di maturazione esterna al locale di produzione e caratterizzata da U.R. =80% e T=10-12°C.

La stagionatura ha durata variabile tra i 20 giorni e i 2 mesi.



*Figura 2.1 – Processo di produzione del caseificio di Carcoforo*

## **Cangelo**

Alpeggio raggiungibile solo a piedi, si trova a circa 1364 m s.l.m. e non è delimitato da mura perimetrali.

In questo piccolo caseificio si lavora latte vaccino e caprino. Tutta la lavorazione avviene in un unico locale le cui finestre sono protette da reti anti-insetto, le pareti ed il pavimento sono rivestiti completamente in PVC ad esclusione della zona caldaia rivestita in acciaio inox. Dal locale stesso si accede alla cella di stagionatura che presenta pareti intonacate bianche e assi di legno ove vengono poste le forme a maturare. I formaggi infine vengono venduti a rivenditori locali o impiegati in cucina nel ristorante di proprietà della famiglia.

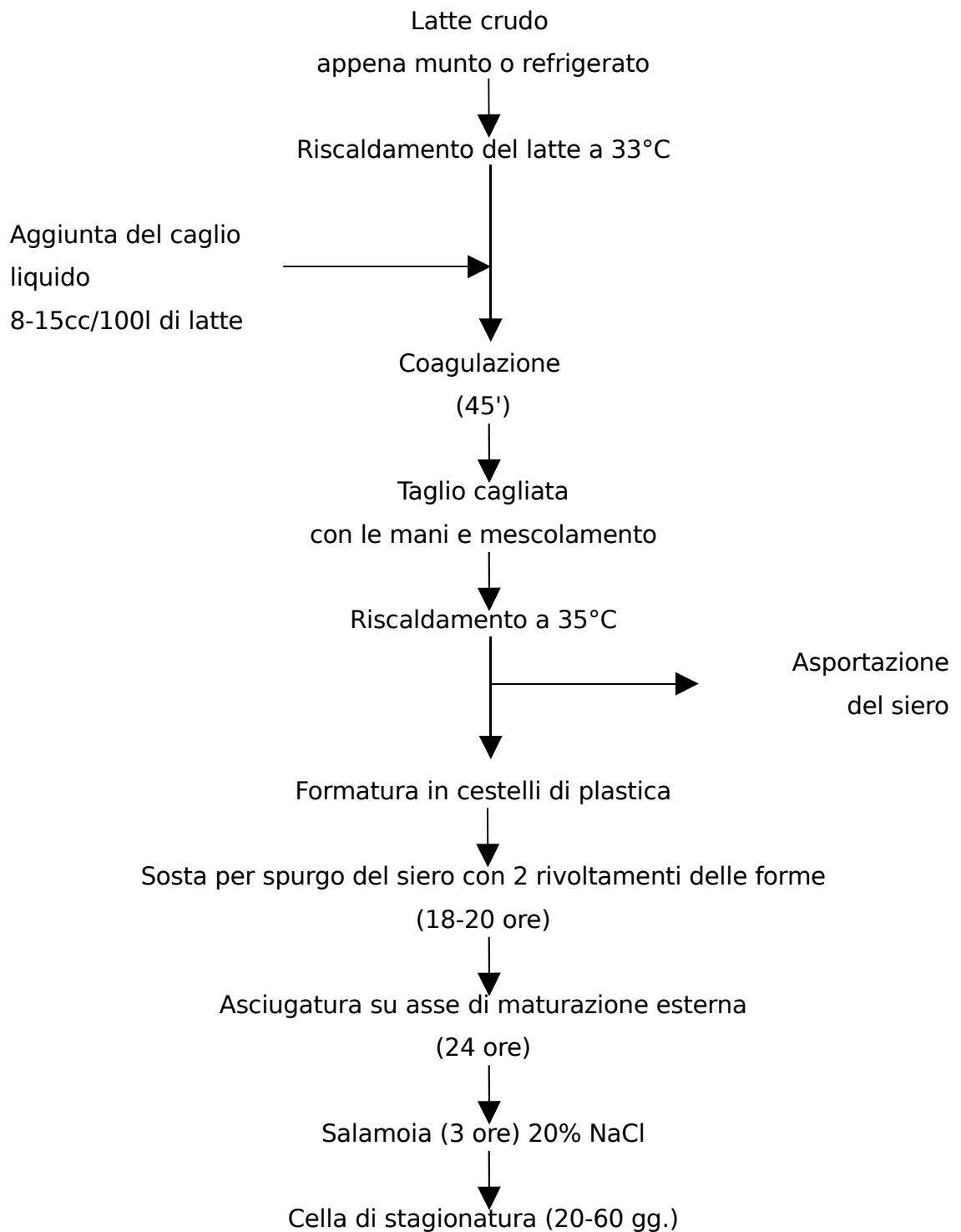
La produzione dei formaggi di capra generalmente viene effettuata prima di quella dei formaggi vaccini dallo stesso operatore come riportato in figura 2.2.

Il latte crudo impiegato proviene dalla mungitura della sera o del mattino e viene versato con dei secchi nella caldaia di rame. Il riscaldamento, mediante bombole a gas, porta il latte a 33°C e viene addizionato una quantità di caglio liquido pari a 15cc/100l di latte. Al termine della coagulazione, che dura circa 45-60 minuti, la cagliata viene tagliata con attrezzi appositi o con le mani. Segue un ulteriore riscaldamento a 35°C seguito dalla formatura: i cestelli in plastica vengono immersi direttamente nella caldaia e l'operatore con le mani agevola l'operazione.

I cestelli riempiti vengono posti a spurgare su un tavolo inclinato, coperti da un telo di carta a simulare una stufatura e vengono girate due volte. Il siero, raccolto in un secchio, viene impiegato per la produzione di ricotta e l'alimentazione dei maiali.

Il mattino successivo le forme vengono trasferite su assi di legno sul balcone esterno per subire così una prima asciugatura ed aumentare la consistenza. Dopo 24 ore di sosta le forme vengono immerse in salamoia realizzata in una bacinella per 3 ore.

Infine i formaggi sono posti in cella di stagionatura sulle assi di legno ove permarranno 20-60 giorni.



*Figura 2.2 – Processo di produzione del caseificio di Cingello*

### **Alpe Mera (località Preisà)**

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

Al pianoterra si trova la stalla, i locali di lavorazione, vendita e ristorazione mentre al I piano l'abitazione. Al piano inferiore la cantina, una toilette per i clienti del ristorante e una dispensa. Tutti i locali sono ben suddivisi tra loro da porte.

Nel caseificio è impiegato sia latte di capra che di vacca e tutte le fasi della lavorazione, anche in questo alpeggio, avvengono in unico locale al quale si accede dal porticato esterno. Le pareti del locale, come il pavimento, sono dotate di piastrelle di ceramica bianca fino ad un'altezza pari a 2 m. I serramenti sono tutti in legno, i vetri doppi e le finestre sono protette da reti anti-insetti.

La lavorazione artigianale viene effettuata da un singolo operatore secondo lo schema riportato in figura 2.3. In questo caseificio ogni giorno vengono lavorati circa 30-40 litri di latte di capra e vengono prodotti sia tomini presamici che freschi spalmabili; il siero viene impiegato per la produzione di ricotta e il residuo è destinato all'alimentazione del bestiame.

Il latte di capra, proveniente dalla mungitura manuale della sera o del mattino, viene trasportato dalla stalla in secchi e versato nella caldaia di rame tramite un colino allo scopo di effettuare una filtrazione. Il latte è riscaldato mediante bruciatore a gas fino ad una temperatura pari a 35°C : raggiunto tale valore viene aggiunto il caglio in polvere (1:100000) in quantità indicata dal produttore (1 misurino ogni 100/125/150 litri di latte).

La coagulazione varia da 30 minuti ad 1 ora in funzione della quantità di caglio aggiunta.

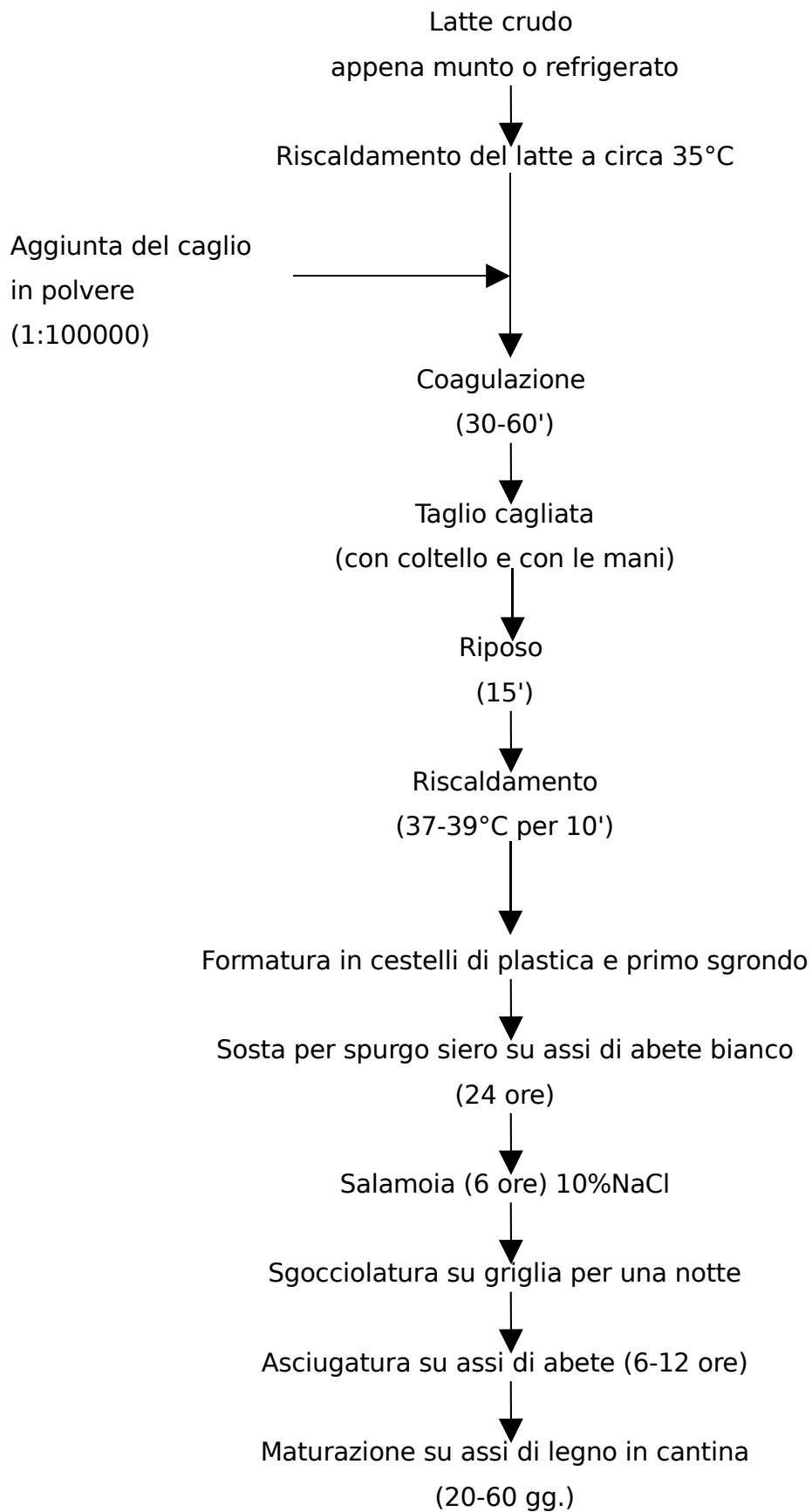
Successivamente la cagliata, rotta a mano o mediante coltello fino a dimensioni pari ad un chicco di mais, sosta per circa 15 minuti e viene poi riscaldata a 37-39°C per 10 minuti.

Depositati i fiocchi della cagliata sul fondo del paiolo, essi vengono estratti manualmente e posti all'interno dei cestelli in plastica.

Le forme vengono poi trasferite su un tavolo inox inclinato in modo da rendere più agevole lo spurgo e il drenaggio del siero raccolto in un secchio di acciaio posto sotto il tavolo. La formatura e lo spurgo sono anche facilitati da diversi rivoltamenti e pressioni esercitate dall'operatore. In seguito le forme vengono trasferite su assi di abete bianco nel locale stesso di produzione e lasciate riposare per 24 ore e compiere lo spurgo definitivo.

Trascorse le 24 ore le forme sono immerse in salamoia al 10% di NaCl ove sostano per 6 ore. La salamoia, realizzata in una bacinella, ospita anche prodotti ottenuti con latte vaccino.

Dopo la salamoia il formaggio è posto su delle griglie sopra la bacinella a sgocciolare per una notte. La mattina le forme sono trasferite su assi di abete bianco (poste sopra le precedenti) per 6-12 ore, ove asciugano, prima di essere portate sulle assi di legno in cantina per la stagionatura vera e propria che durerà 2 mesi circa.



*Figura 2.3 – Processo di produzione del caseificio di Alpe Mera.*

### 3. Materiali e metodi

Per valutare la composizione microbiologica dei campioni sono state realizzate delle conte in piastra con metodo colturale.

Per ciascun campione sono state eseguite le seguenti determinazioni:

- CBT
- Contaminanti
- Coliformi totali e fecali
- Batteri lattici totali
- Batteri lattici omofermentanti ed eterofermentanti
- Cocchi lattici
- Enterococchi
- Micrococcaceae
- *Staphylococcus aureus*
- Lieviti e muffe

I prelievi sono stati effettuati in condizioni di sterilità e la preparazione del campione all'analisi microbiologica è stata eseguita in accordo con la norma FIL IDF 122:2001 ISO 8261 [5].

Per ciascun campione pervenuto in laboratorio refrigerato sono stati prelevati e pesati sterilmente in un sacchetto sterile 10 grammi di prodotto, successivamente addizionati di diluente sterile citrato di sodio in ragione di 1:10 ed omogeneizzati in Stomacher 400 Circulator a 260 rpm per 2-3 minuti.

Per le diluizioni successive è stato utilizzato Ringer 1:4, ottenuto sciogliendo in 500ml di acqua distillata una compressa contenenti i seguenti sali: NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> e NaHCO<sub>3</sub>

Mediante tecnica delle diluizioni decimali sono stati quindi eseguiti i piastramenti negli idonei terreni colturali.

### 3.1 Analisi microbiologiche

#### Carica Batterica Totale (CBT)

Terreno di coltura impiegato: Agar Plate Count (APC) [7]

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Tryptone                    | 5,0 g   |
| Estratto di lievito         | 2,5 g   |
| Glucosio                    | 1,0 g   |
| Agar                        | 20,0 g  |
| H <sub>2</sub> O distillata | 1000 ml |
| pH                          | 7,0     |

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 [7]

|                     |         |
|---------------------|---------|
| 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) [7]

|                     |         |
|---------------------|---------|
| 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) [7]

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2,0 g  |
| Sodio acetato 3H <sub>2</sub> O | 5,0 g  |
| Citrato diammonico              | 2,0 g  |
| Soluzione A                     | 5 ml   |
| Agar                            | 18,0 g |
| Acqua distillata                | 1000ml |
| pH                              | 6,6    |

Soluzione A: MgSO<sub>4</sub> 11,5 g

MnSO<sub>4</sub>\*4H<sub>2</sub>O 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) medium [8]

|                                 |         |
|---------------------------------|---------|
| Fruttosio                       | 2,5 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 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  |
| H <sub>2</sub> O 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 [8].

### Cocchi Lattici

Terreno di coltura impiegato: M17 [7]

|                                           |         |
|-------------------------------------------|---------|
| Triptone                                  | 2,5 g   |
| Peptone                                   | 2,5 g   |
| Peptone di soia                           | 5,0 g   |
| Estratto di lievito                       | 2,5 g   |
| $\beta$ -glicerofosfato di Na             | 19,0 g  |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 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) [7]

|                     |         |
|---------------------|---------|
| 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)[7]

|                     |         |
|---------------------|---------|
| 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.

## **3.2 Isolamento dei ceppi**

Per ogni campione 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 inoculazione 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): [7]

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

Incubazione a 30°C per 24-48 ore.

Le colonie isolate da KEA sono state isolate in provette di BHI broth.

#### Brain Heart Infusion (BHI)

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Infuso di cervello di vitello | 200,0 g |
| 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     |

Preparato disciogliendo 37 g di polvere in 1000 ml di acqua distillata e sterilizzazione 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. Al fine di verificarne la purezza sono stati ripetutamente strisciati su piastre di MRS agar e reisolati.

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.

### **3.2.1 Mantenimento dei ceppi**

Tutti i batteri lattici isolati in MRS e M17 brodo sono stati congelati.

Da ogni isolamento è stato prelevato 1 ml di coltura, addizionato di 0,2 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.

### **3.3 Analisi genotipica degli Enterococchi**

Per poter identificare i ceppi isolati, dopo averne verificata la purezza al microscopio ottico (480X), sono state allestite prove molecolari.

#### **3.3.1 Estrazione del DNA**

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.

### 3.3.2 Applicazione 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 sugli Enterococchi è stato impiegato il primer M13: composto da poche basi e quindi caratterizzato da una bassa specificità [10]. Esso deriva dal fago M13 di *Escherichia coli* e presenta la seguente sequenza [9]:

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:

|                         | <b>Volume</b> |
|-------------------------|---------------|
| Acqua milli-Q           | 14,9 µl       |
| Buffer 10x              | 2,5 µl        |
| MgCl <sub>2</sub> 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          |
| <b>Volume totale</b>    | <b>25 µl</b>  |

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

- Denaturazione iniziale 94°C per 2 minuti
  - Denaturazione 94°C per 1 minuto
  - Annealing 43°C per 40 secondi
  - Estensione 72°C per 2 minuti
  - Estensione finale 72°C per 10 minuti
- 34 cicli

### 3.3.3 Applicazione ITS

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 di gruppi.

Per l'amplificazione è stata utilizzata la seguente soluzione:

|                         | <b>Volume</b> |
|-------------------------|---------------|
| Acqua milli-Q           | 18,2 µl       |
| Buffer 10x              | 2,5 µl        |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM | 1,0 µl        |
| DNTPs 10 mM             | 2,0 µl        |
| Primers ITS (f+r)       | 0,1 + 0,1 µl  |
| Taq polymerase 5 U/µl   | 0,10 µl       |
| DNA                     | 1 µl          |
| <b>Volume totale</b>    | <b>25 µl</b>  |

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

- Denaturazione iniziale 94°C per 2 minuti
  - Denaturazione 92°C per 1 minuto
  - Annealing 54°C per 1 minuto
  - Estensione 72°C per 1 minuto
  - Estensione finale 72°C per 7 minuti
- 34 cicli

### 3.3.4 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 250 ml di tampone TAE 1x (Tris base 40mM, acido acetico glaciale 20 mM, EDTA 1mM; pH 8) e si aggiunge bromuro d'etidio in quantità pari a 6 µl.

La concentrazione dell'agarosio nel caso di analisi RAPD-PCR è pari all'1,5% P/V, mentre per l'ITS 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 viene caricato anche 4 µl di marker, costituito da una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto: per la RAPD M13 il marker 1000bp, mentre per l'ITS il marker 100bp. 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. 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.

### 3.3.5 Sequenziamento

Un rappresentante per ciascun gruppo è stato sottoposto a sequenziamento della regione 16S rDNA.

Il DNA, dopo estrazione, è stato amplificato utilizzando una soluzione appositamente studiata così composta:

|                         | <b>Volume</b> |
|-------------------------|---------------|
| Acqua milli-Q           | 16,6 µl       |
| Buffer 10x              | 2,5 µl        |
| MgCl <sub>2</sub> 25 mM | 2,5 µl        |
| DNTPs 10 mM             | 2,0 µl        |
| Primers 16S (f+r)       | 0,1 +0,1 µl   |
| Taq polymerase 5 U/µl   | 0,2 µl        |
| DNA                     | 1 µl          |
| <b>Volume totale</b>    | <b>25 µl</b>  |

Il ciclo termico adottato è il seguente:

- Denaturazione iniziale 94°C per 2 minuti
  - Denaturazione 94°C per 45 secondi
  - Annealing 50°C per 45 secondi
  - Estensione 72°C per 1 minuto
- } 4 cicli
- Denaturazione 94°C per 45 secondi
  - Annealing 55°C per 35 secondi
  - Estensione 72°C per 1 minuto
- } 34 cicli
- Estensione finale 72°C per 7 minuti

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

La sequenza riscontrata per ogni ceppo di Enterococchi dell'analisi condotta è stata elaborata con CHROMAS 2.13 (Technelysium Pty Ltd. Australia): i risultati ottenuti sono stati elaborati con il programma BLAST e confrontati con le sequenze presenti nella banca dati on-line ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## 4. Risultati

### 4.1 Risultati delle analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state condotte su campioni prelevati sterilmente ad ogni fase della lavorazione, attraverso ripetuti sopralluoghi presso i singoli produttori. I risultati presentati sono quindi una media di almeno tre prelievi.

#### Carcoforo

I risultati delle analisi microbiologiche sono riportate in tabella 4.1 ed illustrati graficamente nelle figure 4.1 e 4.2.

| Prodotto              | CBT              | Lattici totali   | Cocchi Lattici   | Enterococchi     | Micrococcaceae       | Lieviti          |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|------------------|
| Latte crudo           | $2,5 \cdot 10^6$ | $6,0 \cdot 10^5$ | $6,0 \cdot 10^5$ | $3,2 \cdot 10^3$ | $3,6 \cdot 10^5$ (*) | $5,0 \cdot 10^2$ |
| Cagliata dopo rottura | $1,9 \cdot 10^8$ | $7,1 \cdot 10^6$ | $2,9 \cdot 10^7$ | $2,6 \cdot 10^5$ | $1,0 \cdot 10^5$     | $1,4 \cdot 10^7$ |
| Prima della stufatura | $2,2 \cdot 10^8$ | $1,5 \cdot 10^7$ | $3,7 \cdot 10^7$ | $1,3 \cdot 10^6$ | $1,0 \cdot 10^4$     | $1,3 \cdot 10^7$ |
| Dopo stufatura        | $9,6 \cdot 10^8$ | $4,6 \cdot 10^8$ | $1,1 \cdot 10^9$ | $4,8 \cdot 10^7$ | $3,0 \cdot 10^6$     | $1,4 \cdot 10^7$ |
| Prima della salamoia  | $1,8 \cdot 10^8$ | $3,1 \cdot 10^8$ | $3,0 \cdot 10^8$ | $1,5 \cdot 10^7$ | $8,1 \cdot 10^7$     | $1,6 \cdot 10^8$ |
| Dopo salamoia         | $6,0 \cdot 10^8$ | $4,0 \cdot 10^8$ | $8,2 \cdot 10^8$ | $3,5 \cdot 10^6$ | $8,0 \cdot 10^7$     | $2,3 \cdot 10^6$ |
| Fine stagionatura     | $1,1 \cdot 10^9$ | $2,4 \cdot 10^9$ | $2,7 \cdot 10^9$ | $5,7 \cdot 10^7$ | $1,3 \cdot 10^8$     | $3,0 \cdot 10^6$ |

(\*)Ricerca effettuata su Baird-Parker. Si tratta di *S. aureus* lecitinasi +.

Tabella 4.1 – Carcoforo: risultati delle conte (ufc/g)

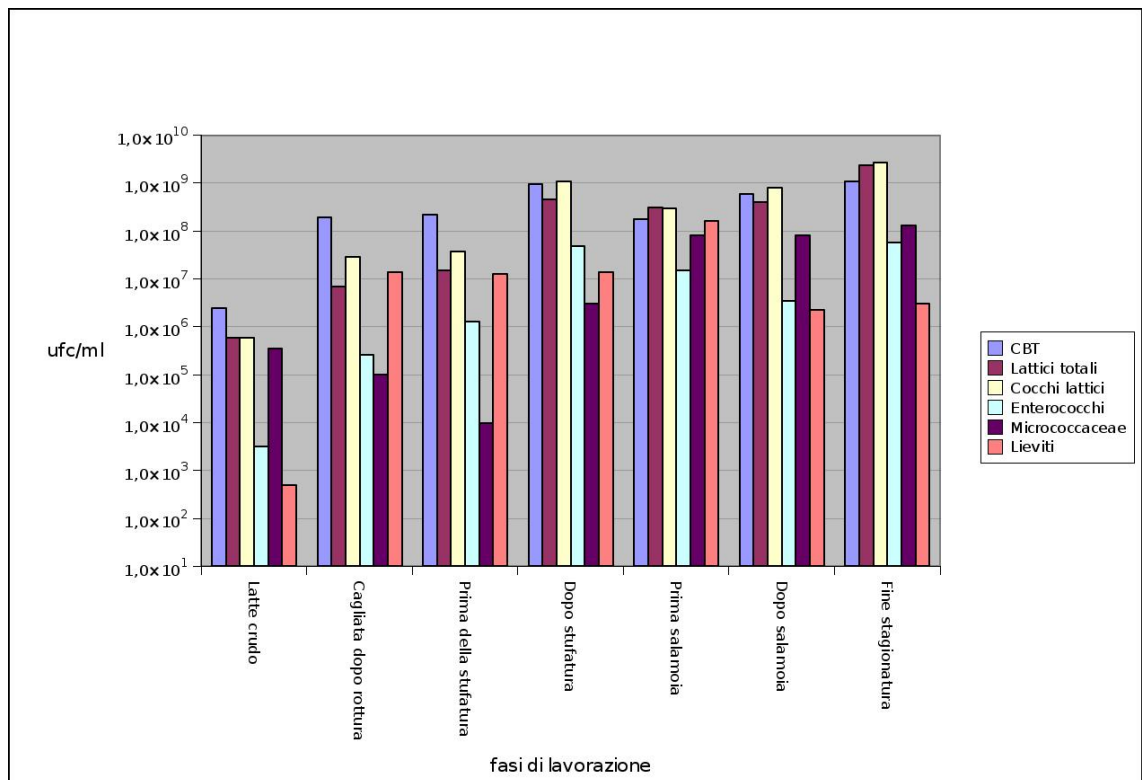


Figura 4.1 – Carcoforo: popolazione microbica ai successivi stadi di produzione

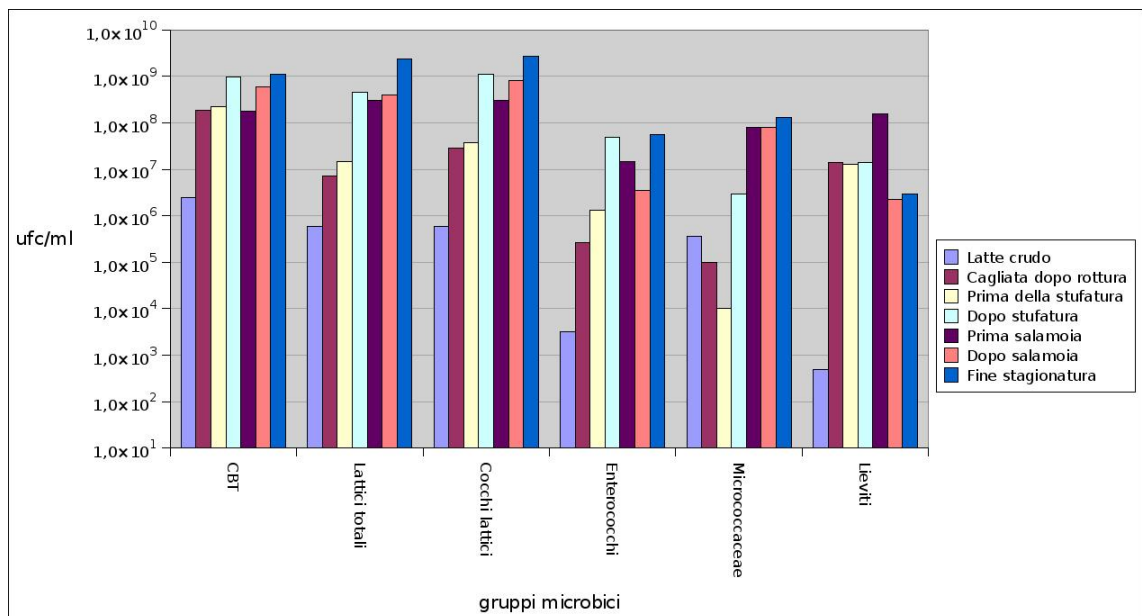


Figura 4.2 – Carcoforo: evoluzione dei vari gruppi microbici

Il latte di partenza è apparso di discreta qualità microbiologica tendendo conto che si tratta di latte proveniente da due mungiture (serale e mattutina) e che la conservazione refrigerata avviene, in questa particolare realtà, in un normale frigorifero domestico.

I coliformi totali sono presenti in numero contenuto (200 ufc/ml), mentre inferiore a 10 ufc/ml i coliformi fecali.

E' invece considerevole il contenuto di *Staphylococcus aureus*, ritrovato mediamente con valori dell'ordine di  $10^5$  ufc/ml.

La popolazione lattica, nonostante lievi oscillazioni, è apparsa costituita prevalentemente da forme a cocco, risultate poi omofermentanti (figura 4.3).

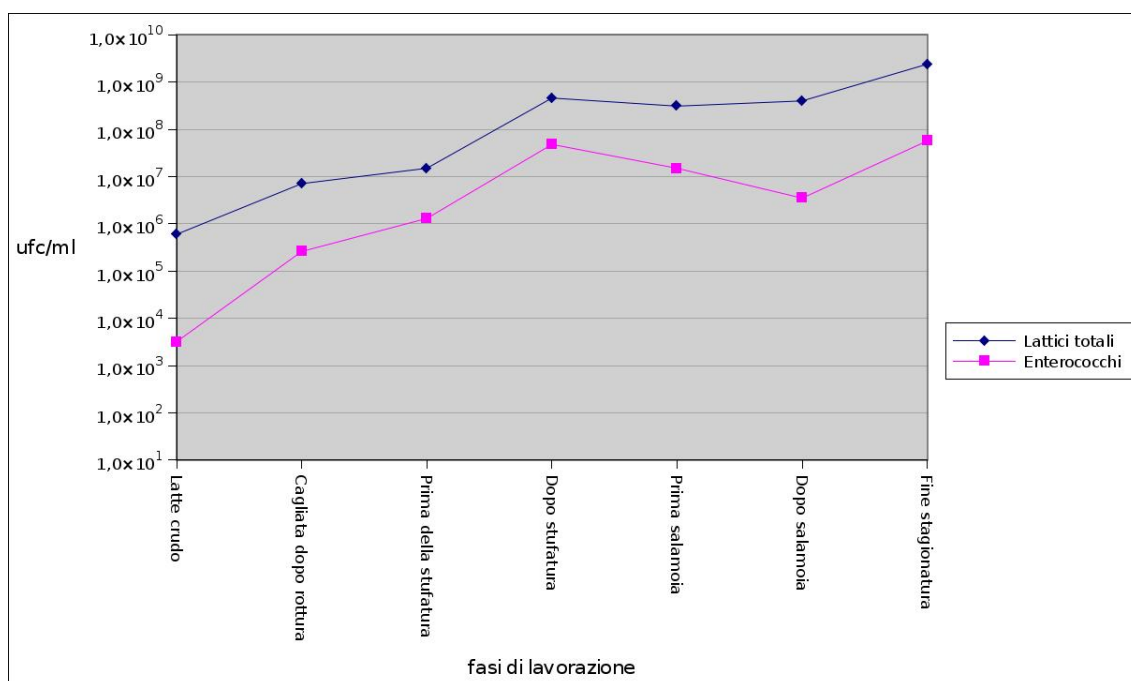


Figura 4.3 – Carcoforo: evoluzione lattici totali e Enterococchi

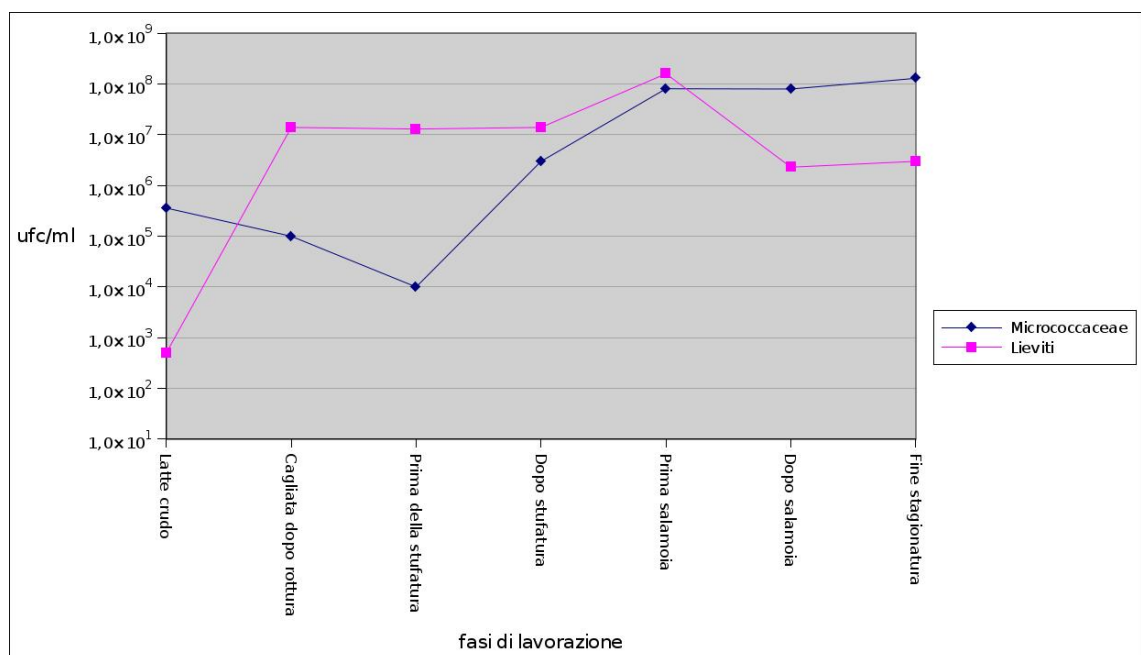
Tra questi gli Enterococchi sono i più rappresentati: il loro numero, di poco superiore a  $10^3$  ufc/ml nel latte, incrementa in modo continuo e regolare nelle successive fasi sino ad attestarsi intorno a  $10^7$  ufc/ml dalla stufatura sino a fine stagionatura.

Durante la lavorazione, è evidente un aumento generale della popolazione microbica.

Le Micrococcaceae mostrano un progressivo aumento durante la lavorazione sino a portarsi a valori prossimi le  $10^8$  ufc/g dopo la salatura.

Proprio questa fase determina una riduzione del contenuto di lieviti il cui numero era attestato su valori importanti fin dall'inizio della lavorazione.

Durante la stagionatura compaiono le muffe, provenienti dall'ambiente di lavorazione e presenti per lo più a livello della crosta.



*Figura 4.4 - Carcoforo: evoluzione lieviti e Micrococcaceae*

## Cangello

La situazione microbiologica del latte crudo e dei prodotti intermedi della realtà di Cangello è nel complesso simile a quella rilevata a Carcoforo.

Nonostante nel latte si registrino valori di carica batterica totale più elevati di un ordine ( $2 \cdot 10^7$  ufc/ml), la situazione igienica è apparsa nel complesso più confortante. Molto contenuto è il numero dei coliformi totali, sempre assenti i fecali; anche la presenza di *Staphylococcus aureus*, ritrovato con valori 100 volte inferiori rispetto a Carcoforo, è apparsa meno pesante.

La tabella 4.2 e le figure 4.5 e 4.6 riportano le componenti microbiche e il loro andamento.

| Prodotto                   | CBT              | Lattici totali    | Cocchi Lattici    | Enterococchi     | Micrococcaceae       | Lieviti          |
|----------------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------------|------------------|
| Latte crudo                | $2,0 \cdot 10^7$ | $6,0 \cdot 10^5$  | $5,0 \cdot 10^5$  | $8,0 \cdot 10^2$ | $1,1 \cdot 10^3$ (*) | $6,2 \cdot 10^3$ |
| Cagliata dopo rottura      | $2,5 \cdot 10^7$ | $1,6 \cdot 10^7$  | $1,7 \cdot 10^7$  | $3,0 \cdot 10^5$ | $1,0 \cdot 10^4$     | $1,0 \cdot 10^3$ |
| Prima della stufatura      | $4,3 \cdot 10^8$ | $4,2 \cdot 10^8$  | $4,2 \cdot 10^8$  | $1,7 \cdot 10^6$ | $4,4 \cdot 10^5$     | $5,0 \cdot 10^3$ |
| Dopo stufatura             | $6,7 \cdot 10^8$ | $4,3 \cdot 10^8$  | $5,3 \cdot 10^8$  | $1,5 \cdot 10^7$ | $2,2 \cdot 10^6$     | $7,0 \cdot 10^6$ |
| Dopo salamoia              | $1,2 \cdot 10^8$ | $1 \cdot 10^{10}$ | $1 \cdot 10^{10}$ | $4,0 \cdot 10^6$ | $6,0 \cdot 10^6$     | $1,0 \cdot 10^7$ |
| Formaggio 24 ore           | $2,4 \cdot 10^7$ | $9,4 \cdot 10^8$  | $1,0 \cdot 10^9$  | $4,4 \cdot 10^5$ | $1,0 \cdot 10^5$     | $2,0 \cdot 10^6$ |
| Formaggio 7 giorni         | $1,4 \cdot 10^6$ | $2,0 \cdot 10^9$  | $2,0 \cdot 10^9$  | $8,8 \cdot 10^7$ | $1,1 \cdot 10^5$     | $1,2 \cdot 10^7$ |
| Formaggio 1 mese           | $2,0 \cdot 10^7$ | $1,0 \cdot 10^8$  | $5,3 \cdot 10^7$  | $4,0 \cdot 10^6$ | $9,8 \cdot 10^5$     | $9,0 \cdot 10^4$ |
| Fine stagionatura (2 mesi) | $4,2 \cdot 10^8$ | $5,0 \cdot 10^9$  | $4,0 \cdot 10^9$  | $5,0 \cdot 10^6$ | $5,0 \cdot 10^5$     | $2,3 \cdot 10^8$ |

(\*) Ricerca effettuata su Baird-Parker. Si tratta di *S. aureus* lecitinasi +.

Tabella 4.2 – Cangello: risultati delle conte (ufc/g)

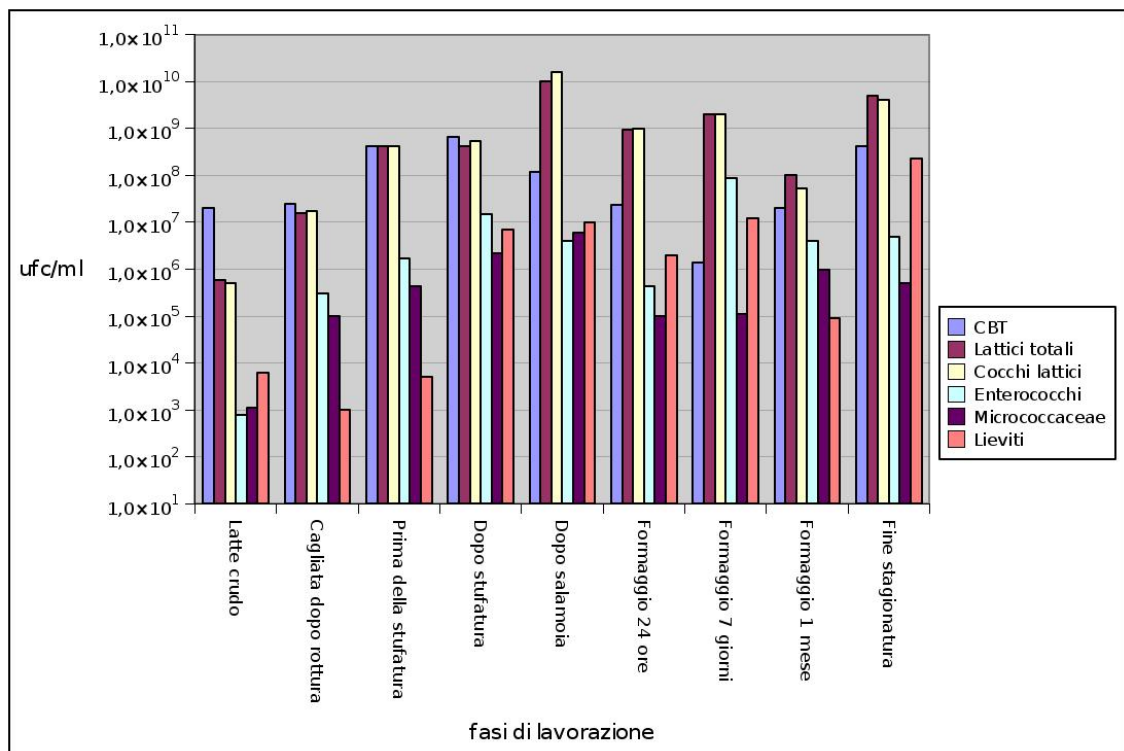


Figura 4.5 – Canello: popolazione microbica ai successivi stadi di produzione

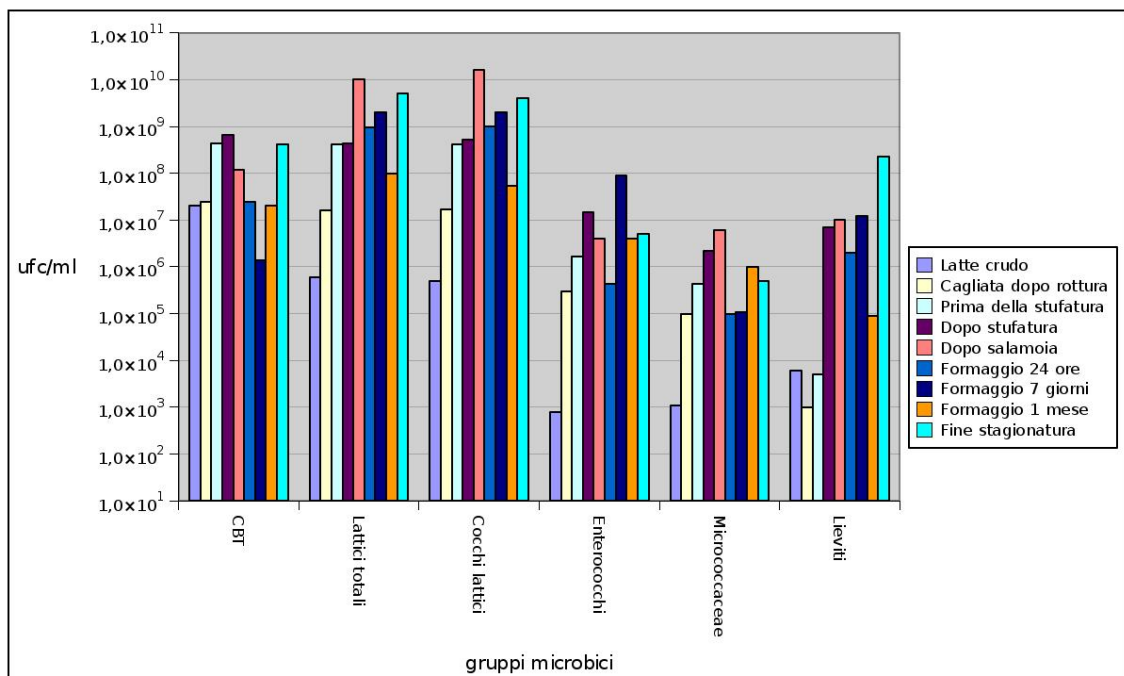


Figura 4.6 – Canello: evoluzione dei vari gruppi microbici

Anche in questo caso, la popolazione lattica è apparsa per lo più costituita da cocchi lattici che si confermano la componente maggioritaria.

Il loro numero aumenta sino alla fase della salamoia quando si registra un picco pari a  $1 \times 10^{10}$  ufc/g. Dopo di che subisce un lieve riduzione nelle prime 24 ore di stagionatura per poi stabilizzarsi intorno a valori di  $10^9$  fino a fine stagionatura.

Gli Enterococchi seguono, come per Carcoforo, un andamento molto simile ai cocchi lattici benchè il loro numero sia sempre di circa due ordini di grandezza inferiore (figura 4.7).

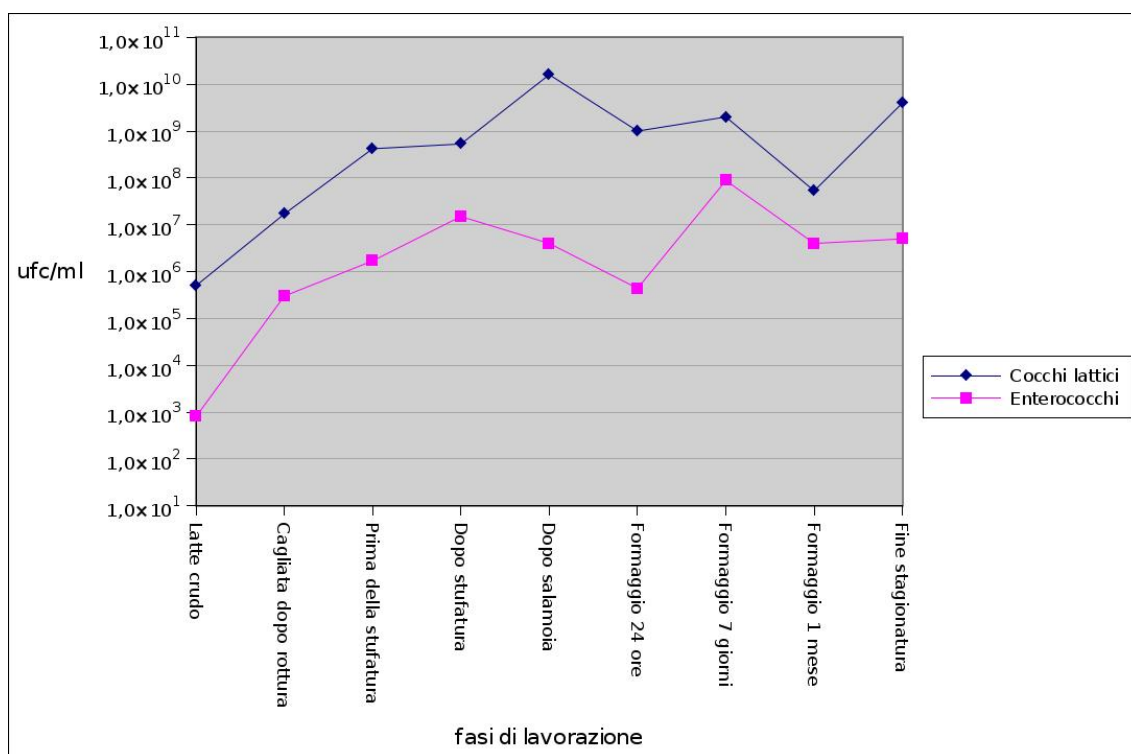


Figura 4.7 – Cangello: evoluzione lattici totali e Enterococchi

Interessante è osservare (figura 4.8) la costante modesta presenza di muffe lungo tutte le fasi produttive, formaggio stagionato compreso, ove invece i lieviti sono in gran numero.

Le Micrococcaceae, infine, si nota che aumentano di circa un ordine di grandezza nelle settimane finali della maturazione.

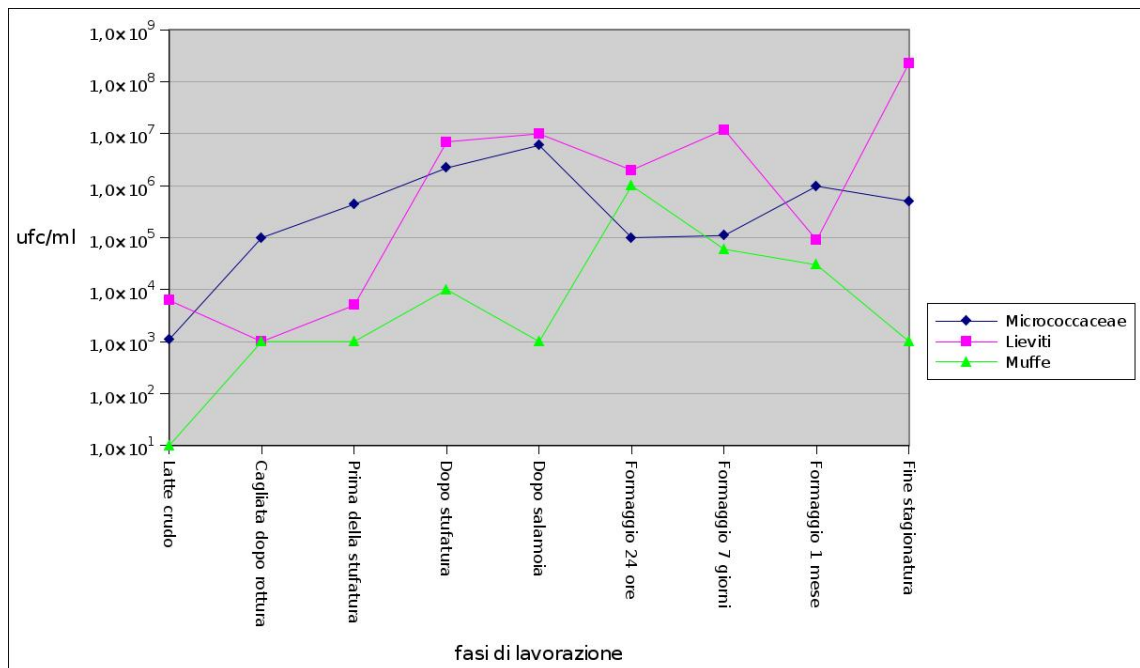


Figura 4.8 - Cangello: evoluzione lieviti, muffe e Micrococcaceae

### Alpe Mera (Località Preisà)

Alpe Mera è apparsa la realtà ove la produzione del formaggio è meno standardizzata. La durata di ciascuna fase, infatti, è lasciata molto all'esperienza dei singoli operatori. Per quest'ultimo alpeggio, come è possibile constatare nella tabella 4.3 e nelle figure 4.9 e 4.10, vale gran parte di quanto finora esposto per Carcoforo e Cangello.

Il latte ha una carica batterica totale pari a  $1,4 \times 10^6$  ufc/ml ed è stata rilevata la presenza di coliformi fecali, nell'ordine delle  $1,3 \times 10^3$  ufc/ml.

Anche la presenza di *Staphylococcus aureus*, rinvenuto in quantità pari a  $4,4 \times 10^4$  ufc/ml, non è trascurabile.

| <b>Prodotto</b>                   | <b>CBT</b>       | <b>Lattici totali</b> | <b>Cocchi Lattici</b> | <b>Enterococchi</b> | <b>Micrococcaceae</b> | <b>Lieviti</b>   |
|-----------------------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|------------------|
| <b>Latte crudo</b>                | $1,4 \cdot 10^6$ | $1,7 \cdot 10^5$      | $2,5 \cdot 10^6$      | $3,0 \cdot 10^2$    | $4,4 \cdot 10^4$ (*)  | $1,0 \cdot 10^2$ |
| <b>Cagliata dopo rottura</b>      | $1,1 \cdot 10^6$ | $9,0 \cdot 10^5$      | $5,5 \cdot 10^6$      | $1,0 \cdot 10^2$    | $1,6 \cdot 10^4$      | $4,1 \cdot 10^1$ |
| <b>Formatura</b>                  | $1,6 \cdot 10^7$ | $5,0 \cdot 10^5$      | $8,9 \cdot 10^6$      | $1,0 \cdot 10^2$    | $6,0 \cdot 10^4$      | $4,8 \cdot 10^3$ |
| <b>Formaggio 24 ore</b>           | $2,3 \cdot 10^7$ | $3,3 \cdot 10^8$      | $3,3 \cdot 10^9$      | $1,5 \cdot 10^5$    | $4,0 \cdot 10^5$      | $5,0 \cdot 10^6$ |
| <b>Formaggio 48 ore</b>           | $3,2 \cdot 10^7$ | $5,5 \cdot 10^9$      | $4,4 \cdot 10^9$      | $4,4 \cdot 10^7$    | $1,0 \cdot 10^7$      | $1,4 \cdot 10^5$ |
| <b>Formaggio 15 giorni</b>        | $4,3 \cdot 10^6$ | $4,2 \cdot 10^8$      | $6,0 \cdot 10^8$      | $3,0 \cdot 10^6$    | $5,4 \cdot 10^6$      | $1,0 \cdot 10^5$ |
| <b>Fine stagionatura (2 mesi)</b> | $1,5 \cdot 10^7$ | $1,8 \cdot 10^8$      | $8,3 \cdot 10^7$      | $2,6 \cdot 10^3$    | $3,1 \cdot 10^6$      | $2,7 \cdot 10^5$ |

(\*)Ricerca effettuata su Baird-Parker. Si tratta di *S. aureus lecitinasi* +.

Tabella 4.3 – Alpe Mera: risultati delle conte (ufc/g)

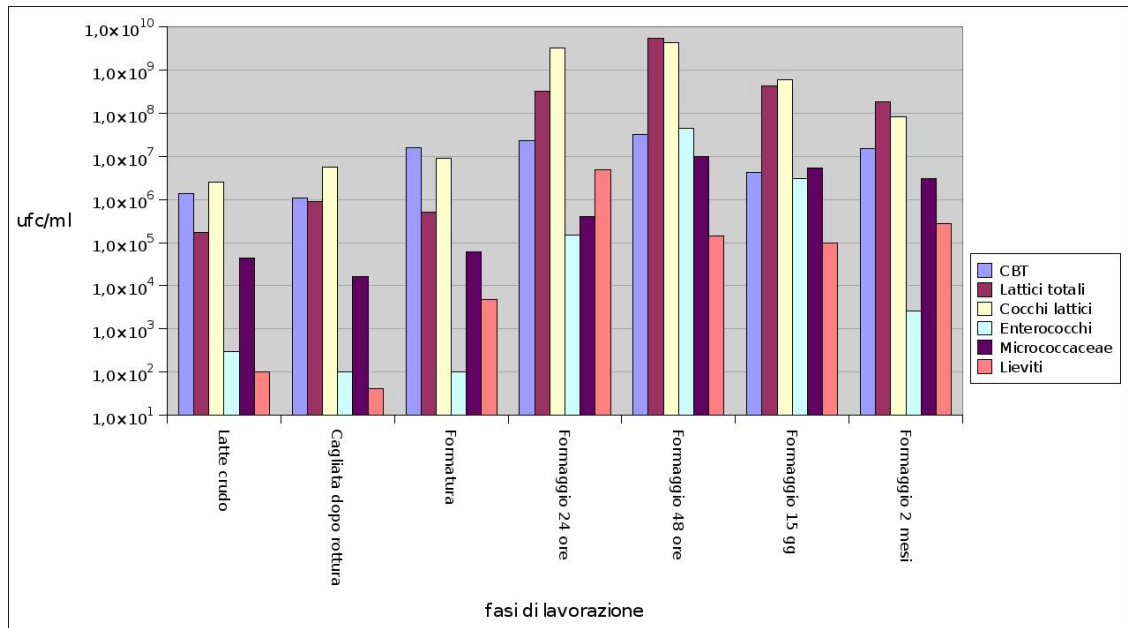


Figura 4.9 – Alpe Mera: popolazione microbica ai successivi stadi di produzione

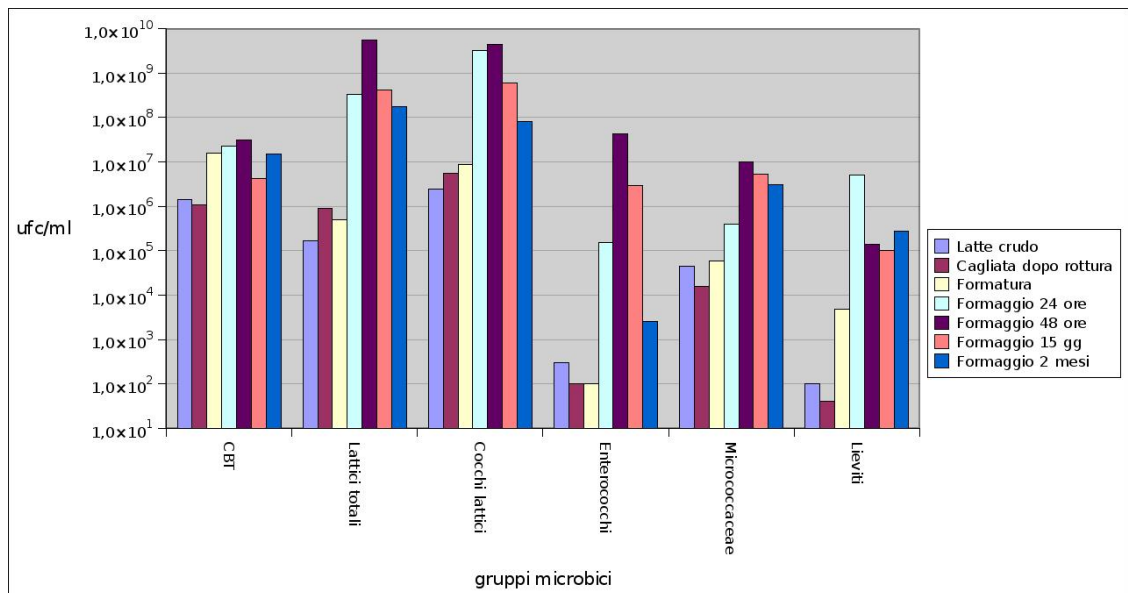
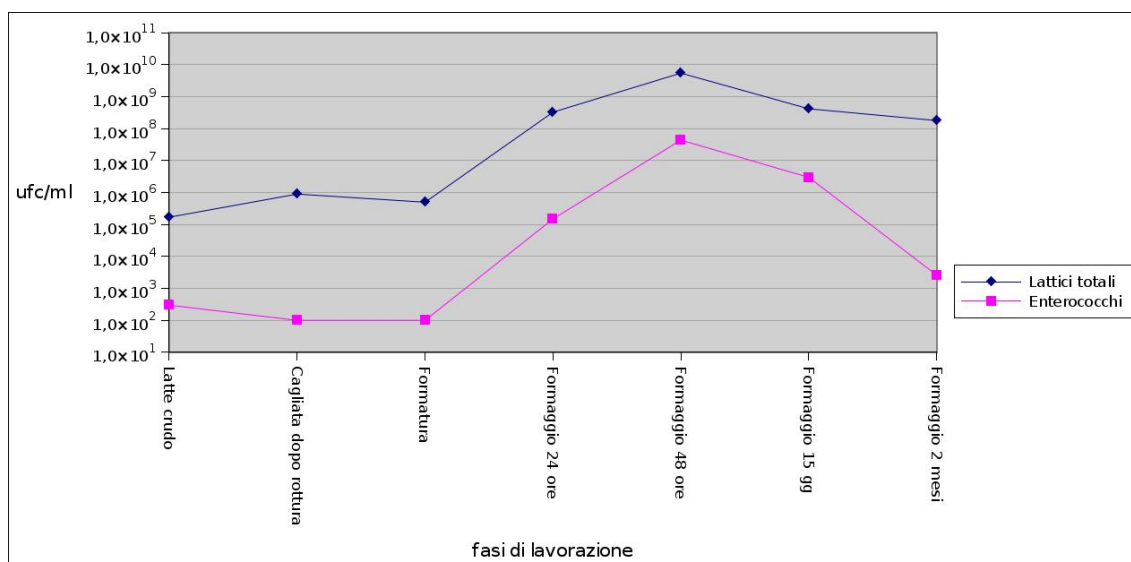


Figura 4.10 – Alpe Mera: evoluzione dei vari gruppi microbici

A differenza di quanto riscontrato nelle due precedenti realtà, è apparso più basso il contributo degli Enterococchi che si mantengono tali nelle prime fasi di produzione sino alla formatura, aumentano poi di ben tre ordini sino alle prime fasi della stagionatura per poi riportarsi ai valori iniziali ( $10^3$  U.F.C./g ) nel formaggio finito (figura 4.11).



*Figura 4.11 – Alpe Mera: evoluzione lattici totali e Enterococchi*

Importante appare anche la presenza dei lieviti (figura 4.12), il cui numero raggiunge il massimo all'inizio della stagionatura per poi ridursi rapidamente nelle successive 24 ore e assestarsi sino alla fine.

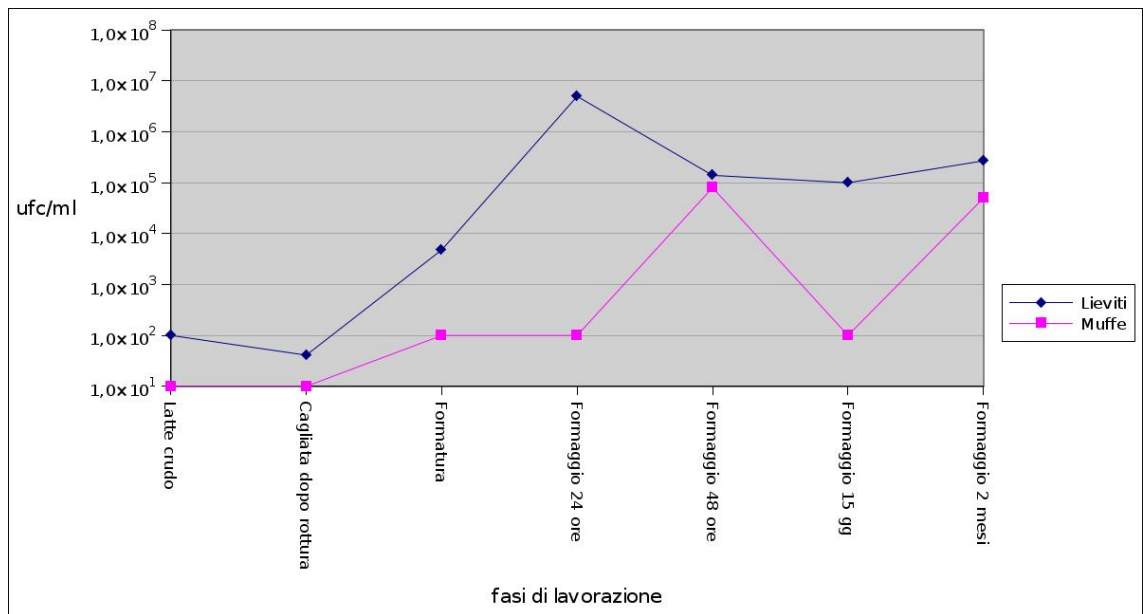
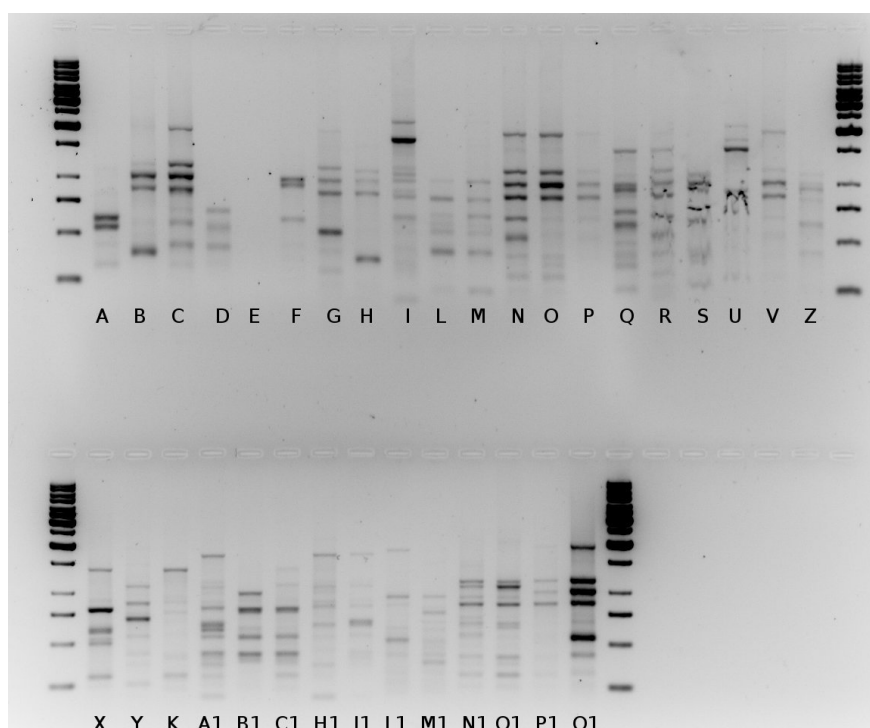


Figura 4.12 – Alpe Mera: evoluzione lieviti e muffe

## 4.2 Risultati dell'analisi genotipica degli Enterococchi

La classificazione degli Enterococchi per via molecolare è stata effettuata su ciascun isolato dopo averne accertato la purezza al microscopio.

L'applicazione della tecnica RAPD-PCR con primer universale M13 unita ad analisi della regione spaziatrice ITS con primers specifici ha reso possibile l'individuazione di 34 gruppi (Figura 4.13).



*Figura 4.13 – Profilo elettroforetico relativo all'amplificazione RAPD con primer M13 di un rappresentante per ciascun gruppo*

I 34 gruppi sono così composti:

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

Successivamente un rappresentante per gruppo è stato sottoposto a sequenziamento parziale della regione 16S rDNA ed è stata possibile così l'identificazione degli isolati.

La figura 4.14 riporta un esempio di sequenziamento di *Enterococcus faecalis* NRIC 0113.

```
>gi|157907334|dbj|AB362602.1| Enterococcus faecalis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:
NRIC 0113
Length=1555

Score = 1628 bits (821), Expect = 0.0
Identities = 821/821 (100%), Gaps = 0/821 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 51  TGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGA 110
      |||
Sbjct 93  TGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGA 152

Query 111 TAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTG 170
      |||
Sbjct 153 TAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTG 212

Query 171 AAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGG 230
      |||
Sbjct 213 AAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGG 272

Query 231 TAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG 290
      |||
Sbjct 273 TAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG 332

Query 291 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACG 350
      |||
Sbjct 333 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACG 392

Query 351 AAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTT 410
      |||
Sbjct 393 AAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTT 452

Query 411 GTTAGAGAAGAACAGGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAG 470
      |||
Sbjct 453 GTTAGAGAAGAACAGGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAG 512

Query 471 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT 530
      |||
Sbjct 513 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT 572

Query 531 TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTC 590
      |||
Sbjct 573 TTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTC 632

Query 591 AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC 650
      |||
Sbjct 633 AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCC 692

Query 651 ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCT 710
      |||
Sbjct 693 ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTCTCT 752

Query 711 GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGG 770
      |||
Sbjct 753 GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGG 812

Query 771 TAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGC 830
      |||
Sbjct 813 TAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGC 872

Query 831 AGCAAAACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCA 871
      |||
Sbjct 873 AGCAAAACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCA 913
```

Figura 4.14 – Risultato sequenziamento E. faecalis NRIC 0113

I risultati sono riportati nelle tabelle 4.4, 4.5 e 4.6.

| <b>Carcoforo</b>              |                                                    |                              |
|-------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------|
| <b>Provenienza</b>            | <b>Sigla</b>                                       | <b>Identificazione</b>       |
| Latte                         | LcrK1, LcrK5, LcrK4, Lcrk6, LcrK3, LcrK2           | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
| Cagliata                      | CaCRk1, Cacrk2, Cacrk3, Cacrk4, Cacrk5, Cacrk6     | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
| Prima della salamoia          | 605, 609, 606, 610                                 | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
|                               | 608                                                | <i>E. faecium</i> C228       |
| Dopo la salamoia              | 601, 602, 603                                      | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
| Formaggio a fine stagionatura | YP9, YC14, YC15, YP10, YC13, YP8, YP12, YC11, YP11 | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |

Tabella 4.4 – Carcoforo: risultati caratterizzazione genotipica degli Enterococchi

| <b>Cangello</b>                      |                   |                              |
|--------------------------------------|-------------------|------------------------------|
| <b>Provenienza</b>                   | <b>Sigla</b>      | <b>Identificazione</b>       |
| Latte                                | X514, X512, X513, | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
|                                      | X517              | <i>E. gilvus</i> 2366        |
|                                      | X516, X515        | <i>E. durans</i>             |
| Dopo stufatura                       | 140               | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
|                                      | 136,137,138       | <i>E. durans</i>             |
| Dopo la salamoia                     | 143               | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
|                                      | 142               | <i>E. durans</i>             |
| Formaggio 24 ore                     | X507              | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
| Formaggio 7 giorni                   | X518              | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
|                                      | X522              | <i>E. gilvus</i> 2366        |
|                                      | X519, X520        | <i>E. durans</i>             |
| Formaggio 30 giorni                  | X504, X506        | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
|                                      | X500              | <i>E. gilvus</i> 2366        |
|                                      | X501, X502, X505  | <i>E. durans</i>             |
| Formaggio fine stagionatura (2 mesi) | 125               | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113 |
|                                      | 123               | <i>E. durans</i>             |

Tabella 4.5 – Cangello: risultati analisi genotipica degli Enterococchi

| <b>Alpe Mera (Preisà)</b> |                                                                  |                                |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Provenienza</b>        | <b>Sigla</b>                                                     | <b>Identificazione</b>         |
| Cagliata dopo rottura     | Z40                                                              | <i>E. durans</i>               |
| Formaggio 24 ore          | Z28                                                              | <i>E. faecium</i> RJ16         |
|                           | Z31                                                              | <i>E. gilvus</i> 2366          |
|                           | Z30                                                              | <i>E. durans</i>               |
| Formaggio 48 ore          | Z9, Z70, Z73, Z69, Z6, Z10, Z3, Z13, Z8, Z12, Z72, Z65, Z11, Z86 | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113   |
|                           | Z14, Z15, Z1, Z2, Z5, Z7                                         | <i>E. faecalis</i> PFK3        |
|                           | Z77, Z76, Z74                                                    | <i>E. gilvus</i> 2366          |
|                           | Z68, Z64                                                         | <i>E. casseliflavus</i> F00186 |
| Formaggio 15 giorni       | Z79, Z80, Z85                                                    | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113   |
|                           | Z32, Z33, Z34, Z83, Z84                                          | <i>E. faecium</i> STP          |
| Formaggio 2 mesi          | Z52, Z17, Z53, Z58, Z16, Z56,                                    | <i>E. faecalis</i> NRIC 0113   |
|                           | Z55                                                              | <i>E. faecium</i> STP          |
|                           | Z20, Z21, Z54, Z59, Z22                                          | <i>E. gilvus</i> 2366          |
|                           | Z60, Z61, Z62, Z63, Z57                                          | <i>E. durans</i>               |

Tabella 4.6 – Alpe Mera: risultati caratterizzazione genotipica degli *Enterococchi*

I risultati del sequenziamento evidenziano tre situazioni differenti. Presso il caseificio di fondovalle, Carcoforo, sono stati identificati solo due ceppi di *Enterococchi*: *E. faecalis* NRIC 0113 e *E. faecium* C228. L' *E. faecalis* NRIC 0113 è stato ritrovato in tutte le fasi di produzione, mentre l' *E. faecium* C228 limitatamente allo stadio precedente alla salamoia.

La realtà di Cangelo ha rivelato una variabilità maggiore. Oltre al *E. faecalis* NRIC 0113, presente anche in questo caso lungo tutta la lavorazione, sono stati individuati l' *E. gilvus* 2366 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 7 ceppi ascrivibili a 5 diverse specie.

A differenza delle precedenti produzioni, l' *E. faecalis* NRIC 0113 non è presente in tutte le fasi lavorative e si notano invece ceppi non rinvenuti né a Cangelo né tanto meno a Carcoforo, come l' *E. faecium* RJ16, l' *E. faecalis* PFK3, l' *E. casseliflavus* F00186 e l' *E. faecium* STP.

## 5. Conclusioni

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 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 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 sono in modo molto contenuto.
- Significativo è invece il ritrovamento di *Staphylococcus aureus*, il cui numero non è da considerarsi trascurabile.
- La popolazione microbica è rappresentata principalmente da cocchi lattici omofermentanti che già nel latte di partenza rappresentano la componente maggioritaria.
- 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.
- Le muffe ritrovate provengono prevalentemente dalla crosta e sono associate alla differente ecologia dei locali di stagionatura.

Le prove di identificazione a livello di specie mediante tecniche molecolari, limitatamente agli Enterococchi, hanno permesso di delineare alcune differenze fra le tre produzioni:

- 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*.

## 6. Bibliografia

- [1] Succi G. 1999 *Zootecnia speciale*. pp.399-400, Città Studi Edizioni, Milano.
- [2] Dati FAO 2004 [www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp](http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp). (31/07/2008)
- [3] De Luca G. 2004 *L'allevamento della capra* Edagricole, Bologna.
- [4] Salvadori del Prato O. 2004 *Latte e formaggi caprini* Edagricole, Bologna.
- [5] Mucchetti G., Neviani E. 2006 *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia* Tecniche Nuove, Milano.
- [6] Corti M., Bruni G., Oldrati G. 1987 *La capra in provincia di Bergamo* Ed. Ferrari Clusone (BG).
- [7] Volonterio Galli A. 2005 *Microbiologia degli alimenti* Casa Editrice Ambrosiana, Milano.
- [8] McDonald L.C., McFeeters R.F., Daeschel M.A. and Fleming H.P 1987 *A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria* Appl. Environ. Microbiol. 53(6):1382-1384.
- [9] Hevy B. and Hall J. 1989 *Hypervariable DNA fingerprinting in Escherichia coli. Minisatellite probe from bacteriophage M13* J. Bacteriol., 171: 2528-2532.
- [10] Caffari E. *Genotipizzazione di batteri lattici isolati da impasti acidi: valutazione di due diverse tecnologie di produzione* Giornate del Dottorato in Scienze e Biotecnologie degli Alimenti Facoltà di Agraria, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, 29-30 Marzo 2007.

## 7. Riassunto

Il tirocinio, svolto presso il DiSTAM della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Milano, è stato focalizzato sull'analisi microbiologica di tome di capra dell'Alta Valsesia, in Piemonte. Il prodotto è un formaggio ottenuto con latte caprino crudo intero proveniente dalla mungitura serale e mattutina, a coagulazione prevalentemente presamica, pasta semicotta e a media stagionatura. Lo studio ha preso in esame tre differenti produzioni artigianali di piccole dimensioni, due di alpeggio e una di fondovalle, ognuna delle quali segue un proprio criterio produttivo.

Le analisi sono state effettuate su prelievi del prodotto lungo le successive fasi di lavorazione, a partire dal latte crudo fino al termine della stagionatura.

L'indagine ha avuto come obiettivo la ricerca di popolazioni microbiche, sia caratteristiche che contaminanti; in particolare sono stati ricercati i seguenti gruppi microbici: CBT, contaminanti, coliformi totali e fecali, batteri lattici totali (cocchi e bastoncini), Enterococchi, Micrococcaceae, lieviti e muffe.

I risultati delle conte non hanno rilevato sostanziali differenze fra le tre produzioni prese in considerazione. Esse sono accomunate da un buono stato igienico della materia prima, il latte crudo. Il formaggio è caratterizzato da un elevato numero di cocchi lattici omofermentanti e 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 organolettico il prodotto finito. Le muffe, infine, sono presenti prevalentemente a livello della crosta e provengono dall'ambiente di stagionatura.

Ai fini della caratterizzazione sono stati isolati da ogni singolo formaggio e a differenti fasi di lavorazione batteri lattici,

Micrococcaceae, lieviti e muffe per un totale di 1200 ceppi. Per ciascun isolato, dopo averne verificato la purezza e le caratteristiche morfologiche (microscopio ottico 480X) sono state avviate prove di classificazione mediante test di tipo molecolare. Nel limitato periodo del tirocinio ho potuto dedicare la mia attenzione alle forme microbiche ascrivibili al genere *Enterococcus*. Su ciascun isolato è stata effettuata l'estrazione del DNA e mediante tecnica RAPD con primer universale unita a successiva analisi della regione spaziatrice (ITS) è stato possibile riconoscere 34 gruppi. Un rappresentante per ciascun gruppo è stato infine sottoposto a sequenziamento parziale della regione 16S rDNA. La specie più frequentemente ritrovata è stata *Enterococcus faecalis*, in misura minore *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gilvus* ed *Enterococcus casseliflavus*.

## **8. Ringraziamenti**

Un ringraziamento particolare lo devo alla Dott.ssa Elena Colombo che mi ha costantemente seguito, supportato e sopportato.

Non da meno alla Dott.ssa Laura Franzetti che con infinita disponibilità mi ha permesso di svolgere serenamente e con interesse questa esperienza di tirocinio.

Grazie tante anche a Mauro Scarpellini, capace in ogni momento di farmi sorridere e donarmi brillanti consigli, ai miei compagni di laboratorio Alessandro, Luigi, Marco e Vania per la simpatia mai venuta meno e a tutti coloro che ho incrociato in questi mesi nei laboratori.

Un augurio, infine, ad Angelo che spero presto torni a correre lungo il corridoio.