



www.regione.lombardia.it

BITTO E VALTELLINA CASERA DOP: TIPICITÀ E INNOVAZIONE

Quaderni della ricerca
N. 132 - Giugno 2011



Regione Lombardia
Agricoltura

Sperimentazione condotta nell'ambito del progetto di ricerca
"I formaggi DOP valtellinesi: miglioramenti tecnologici nel rispetto della tipicità"
(Programma regionale di ricerca in campo agricolo 2007 - 2009).

Capofila del progetto

Consorzio per la tutela dei formaggi Valtellina Casera e Bitto

Responsabile scientifico

Milena Brasca

Partner

CNR-ISPA Sezione di Milano
CRA-FLC Settore lattiero-caseario di Lodi
Fondazione Fojanini di Studi Superiori di Sondrio

Testi a cura di

Selene Erini
Consorzio per la tutela dei formaggi Valtellina Casera e Bitto
Via Bormio, 26 - 23100 Sondrio
Tel. 0342 210247 - selene.erini@ctcb.it

Milena Brasca - Stefano Morandi
CNR-ISPA Sezione di Milano
Via Celoria, 2 - 20133 Milano
Tel. 02 50316685 - milena.brasca@ispa.cnr.it - stefano.morandi@ispa.cnr.it

Milena Povolo - Lucia Monti
CRA-FLC
Via A. Lombardo, 11 - 26900 Lodi
tel. 0371 45011 - fax 0371 35579 - milena.povolo@dentecra.it

Fausto Gusmeroli - Giampaolo Della Marianna
Fondazione Fojanini di Studi Superiori, Sondrio
Via Valeriana, 32 - 23100 Sondrio;
Tel. 0342 512954 - fausto.gusmeroli@provincia.so.it

Foto a cura di

Livio Piatta (prima di copertina)
Fondazione Fojanini di Studi Superiori
Consorzio Tutela Valtellina Casera e Bitto

Per Informazioni

Regione Lombardia - Direzione Generale Agricoltura
U.O. Innovazione, cooperazione e valorizzazione delle produzioni
Struttura Ricerca, innovazione tecnologica e servizi alle imprese
Piazza Città di Lombardia n.1 - 20124 Milano
Tel: +39 02 6765.3790 - fax +39 02 6765.8056
e-mail: agri_ricerca@regione.lombardia.it
Referente: Gianpaolo Bertoncini e Giovanna Praderio
e-mail: gianpaolo_bertoncini@regione.lombardia.it

© Copyright Regione Lombardia

Grafica e stampa

Tipografia Bettini - Via Spagna, 3 - 23100 Sondrio



BITTO E VALTELLINA CASERA DOP: TIPICITÀ E INNOVAZIONE

INDICE

Presentazione	5
Introduzione	7
FORMAGGIO BITTO DOP	8
Valutazione del panel sensoriale	10
Caratterizzazione del formaggio Bitto	14
Studio della biodiversità della microflora lattica nel formaggio Bitto	22
Caseificazioni sperimentali con le miscele di fermenti autoctoni	32
Pascolo e qualità del formaggio	41
FORMAGGIO VALTELLINA CASERA DOP	51
Studio della biodiversità della microflora lattica nel formaggio Valtellina Casera e formulazione delle miscele starter	53
Caratterizzazione chimica dei formaggi ottenuti dalle caseificazioni sperimentali con le miscele di fermenti autoctoni	63
Conclusioni	72
Bibliografia	75
Diffusione dei risultati	78
Metodi	79

PRESENTAZIONE



I formaggi DOP Bitto e Valtellina Casera rappresentano le eccellenze della produzione casearia valtellinese.

Il loro valore non è solo economico, ma anche culturale, ambientale e turistico. Infatti, con gli altri prodotti tipici della provincia, contribuiscono alla migliore promozione del territorio e consentono di mantenere viva un'attività agricola e artigianale che affonda le proprie radici nella storia locale. La loro tutela è pertanto fondamentale e passa anche attraverso attività di ricerca mirate all'ottenimento di informazioni e tecnologie migliorative del processo produttivo.

I prodotti DOP sono strettamente legati alle tradizioni di un territorio, a un preciso contesto ambientale e a un modello produttivo che, col passare del tempo, può subire cambiamenti. Per questo motivo si rendono a volte necessari adeguamenti del processo tecnologico, pur sempre rispettoso della tradizione e della tipicità. Lo stesso Regolamento (CE) 510/2006 relativo a DOP e IGP prevede la possibilità di *"chiedere l'approvazione di una modifica di un disciplinare, in particolare per tener conto dell'evoluzione delle conoscenze scientifiche e tecniche..."*

Il progetto di ricerca "I formaggi DOP valtellinesi: miglioramenti tecnologici nel rispetto della tipicità - VALTEC" si sviluppa a supporto di alcune modifiche proposte per

i disciplinari di produzione del Bitto e del Valtellina Casera, tra cui l'impiego per la caseificazione di fermenti autoctoni, isolati e selezionati dalla microflora caratteristica di questi formaggi.

È noto che, tra i vari fattori che intervengono nel processo di caseificazione, quelli di ordine microbiologico svolgono un ruolo essenziale nella produzione e maturazione dei formaggi. Essi sono però anche i più difficili da governare - soprattutto nel caso di produzioni artigianali e in condizioni produttive difficili come quelle dell'alpeggio - e possono portare all'insorgenza di difetti e conseguenti scarti che incidono fortemente sulla qualità dei prodotti, pregiudicandone la commercializzazione.

Il progetto ha portato da un lato ad una migliore definizione delle caratteristiche peculiari e tipiche di questi prodotti, da preservare nel tempo, dall'altro all'individuazione di starter selezionati autoctoni il cui uso consente la riduzione dell'incidenza dei difetti, una migliore sanità del prodotto e, allo stesso tempo, il mantenimento delle caratteristiche che sono espressione del legame con il territorio.

In particolare, i risultati della sperimentazione, raccolti in questo Quaderno della Ricerca, forniscono utili informazioni ai produttori e ai tecnici che operano nella filiera del Bitto e del Valtellina Casera e possono essere un modello di approccio metodologico per la produzione di starter autoctoni per altri formaggi DOP.

GIULIO DE CAPITANI

Assessore all'Agricoltura
della Regione Lombardia

RINGRAZIAMENTI

Un particolare ringraziamento e ricordo vanno a Roberta Lodi che ha fortemente voluto questo studio sui formaggi Bitto e Valtellina Casera, prodotti tipici della Valtellina, terra a cui era profondamente legata.

Ringraziamo anche le aziende che hanno partecipato al progetto per la loro disponibilità e generosa collaborazione.



INTRODUZIONE

L'allevamento di bestiame e la conseguente produzione di formaggi hanno da sempre rappresentato uno dei pilastri dell'economia agricola valtellinese. Più del 70% del latte prodotto in provincia di Sondrio viene caseificato: ciò è indicativo di come la trasformazione casearia, in particolare in prodotti tipici, consente di valorizzare al meglio la produzione lattiera locale. Bitto e Valtellina Casera sono gli esponenti di spicco del comparto e grazie al loro forte legame col territorio hanno conseguito nel 1996 la denominazione di origine protetta (DOP), con la definizione dei rispettivi disciplinari di produzione. Negli anni, l'evoluzione delle conoscenze tecnico-scientifiche e le mutate condizioni produttive e ambientali hanno portato a richiedere delle modifiche ai disciplinari, alcune delle quali relative ad aspetti tecnologici, in particolare alla possibilità di impiegare fermenti lattici autoctoni nel processo di caseificazione.

È noto che nel processo di caseificazione intervengono fattori di ordine microbiologico, biochimico, fisico, fisico-chimico, chimico e meccanico. Ogni tipo di formaggio scaturisce da una determinata combinazione di questi fattori. I fattori di ordine microbiologico, che sono peraltro i più difficili da governare, svolgono un ruolo essenziale nella produzione e nella maturazione dei formaggi.

L'utilizzo di latte crudo per la caseificazione è un punto di forza per i formaggi tipici Bitto e Valtellina Casera, ma, contemporaneamente, può diventare il punto di mag-

gior debolezza se la qualità microbiologica del latte è scadente, vuoi per la povertà di batteri lattici, vuoi per la presenza di microrganismi anticaseari. L'impiego dell'innesco nella produzione di formaggi a latte crudo contribuisce a "guidare" i processi fermentativi, riducendo l'insorgenza di difetti nel prodotto. Esso assicura corrette condizioni di acidificazione e spurgo della cagliata, consentendo, allo stesso tempo, lo sviluppo equilibrato delle diverse specie microbiche filocasearie presenti nella materia prima che intervengono nel processo di maturazione, garanzia di tipicità del formaggio.

Nel Valtellina Casera, in caso di pastorizzazione della materia prima, l'innesco interviene in modo determinante anche nel processo di maturazione e, quindi, nello sviluppo di aromi e odori e nella consistenza della pasta.

Nel caso dei formaggi tipici, è di notevole interesse l'uso di starter specifici isolati e selezionati dalla microflora caratteristica. Per la loro messa a punto occorre conoscere i vari microrganismi che intervengono nel processo di caseificazione, identificandoli, valutandone le numerose attività enzimatiche, e studiare quindi la formulazione, per ogni tipo di lavorazione, di innessi selezionati, in modo da rispettare o esaltare i tratti peculiari di ogni prodotto. In questo modo è possibile valorizzare al meglio le prerogative qualitative di queste produzioni, evitando di appiattirne il gusto e l'identità e mantenendole ben distinte dalle produzioni industriali standardizzate.

FORMAGGIO BITTO DOP

Con regolamento (CE) n. 1263/96 il Bitto, prestigioso formaggio d'alpeggio valtellinese, ottiene il riconoscimento della Denominazione di Origine Protetta (DOP), con l'approvazione del relativo Disciplinare di Produzione che ne definisce tecnologia e caratteristiche.

Il Bitto è un formaggio grasso, a pasta cotta e semidura. Si produce negli alpeggi della provincia di Sondrio e di alcuni comuni limitrofi delle province di Bergamo e Lecco. Il periodo di produzione è naturalmente quello della monticazione degli alpeggi, dal 1 giugno al 30 settembre.

Il latte vaccino intero di una mungitura, con l'eventuale aggiunta di latte caprino in misura non superiore al 10%, viene coagu-

lato immediatamente in loco con l'uso di caglio di vitello. A coagulazione avvenuta, la cagliata viene tagliata fino ad ottenere dei grumi della dimensione di chicchi di riso. Segue la cottura ad una temperatura compresa tra i 48 e i 52°C. Dopo l'agitazione fuori fuoco e la sosta sotto siero, la pasta viene estratta e posta in fascere che conferiscono al formaggio il caratteristico scalzo concavo. Seguono la salatura, a secco o in salamoia, e la maturazione, che inizia nelle casere d'alpe e si completa nel fondovalle. La stagionatura ha una durata minima di 70 giorni, ma può essere protratta per diversi anni senza compromettere le caratteristiche organolettiche e strutturali.



Figura I

Processo di produzione, conservazione e marchiatura del formaggio Bitto

Uno schema sintetico delle fasi di lavorazione e controlli per l'apposizione del marchio è riportato in figura I.

Il Bitto ha forma cilindrica regolare, con superfici piane di diametro tra i 30 e i 50 cm e scalzo concavo, a spigoli vivi, alto 8-12 cm. Il peso varia da 8 a 25 kg. La crosta è compatta, di colore giallo paglierino, più intenso con la stagionatura. La pasta ha struttura compatta, con occhiatura rada ad occhio di pernice e colore variabile dal bianco al giallo paglierino in funzione della stagionatura. Il sapore è dolce e delicato, con aroma più intenso al procedere della maturazione e in presenza di latte caprino.

OBIETTIVI E PIANO SPERIMENTALE

Il progetto di ricerca ha affrontato innanzitutto il problema legato alla definizione delle caratteristiche tipiche del formaggio Bitto (caratteristiche sensoriali, chimiche e microbiologiche) e delle loro relazioni con i fattori ambientali ed antropici. L'introduzione di una pratica tecnologicamente innovativa, quale l'impiego di starter autoctoni, deve infatti mantenere inalterate le caratteristiche originarie di questo formaggio. Quindi, gli starter prodotti nel corso della sperimentazione hanno mirato semplicemente a ridurre l'incidenza dei difetti e garantire i requisiti di sicurezza del formaggio senza alterarne quelle prerogative tipiche che sono espressione del legame con il territorio.

Il progetto si è sviluppato su due anni, secondo il seguente piano operativo:

Anno I

Il complesso delle informazioni di produzione e dei dati analitici (chimici e sensoriali) relativi ai formaggi che hanno partecipato alla Mostra del Bitto del 2007 è stato utilizzato per classificare il prodotto in quattro gruppi tipologici, dai quali sono state estratte altrettante aziende-campione in cui effettuare la sperimentazione.

Nel 2008, in ciascuna azienda campione,

sono state eseguite in due periodi diversi della stagione produttiva le rilevazioni sulla vegetazione pascoliva e sono state monitorate e campionate due caseificazioni effettuate senza alcun innesto, per un totale di otto lavorazioni. I campioni di latte in caldaia e di cagliata sono stati inviati ai laboratori di riferimento per le successive analisi microbiologiche e chimiche. Dai campioni di cagliata sono stati isolati, identificati e caratterizzati 97 ceppi di batteri lattici, tra i quali sono stati selezionati tre ceppi utilizzati per la formulazione di due diverse miscele starter, preliminarmente testate in laboratorio. I formaggi ottenuti dalle otto lavorazioni sono stati sottoposti a valutazione sensoriale nel corso della Mostra del Bitto del 2008 e a successive analisi microbiologiche e chimiche.

Anno II

In tre delle malghe campione selezionate per le indagini precedenti sono state eseguite due caseificazioni sperimentali per ciascuna miscela starter, per valutare sia le lavorazioni del mattino sia della sera, oltre a una caseificazione di controllo, per un totale di 12 caseificazioni sperimentali con l'uso di starter e tre caseificazioni controllo. Gli starter sono stati aggiunti al latte crudo in caldaia. Le lavorazioni sono state monitorate registrando i principali dati tecnologici e sottoponendo i campioni di latte e cagliata ad analisi microbiologiche, al fine di valutare l'attività dei fermenti innestati.

I formaggi così ottenuti sono stati sottoposti all'analisi sensoriale durante la Mostra del Bitto del 2009 e a successive analisi microbiologiche e chimiche per valutarne la qualità e l'eventuale presenza di difetti ed alterazioni nelle caratteristiche organolettiche e chimiche riconducibili all'uso degli starter. I formaggi sperimentali sono stati confrontati con quelli partecipanti alla Mostra per verificarne la corrispondenza delle caratteristiche di tipicità.

VALUTAZIONE DEL PANEL SENSORIALE

INTRODUZIONE

La qualità di una valutazione sensoriale dipende dalla preparazione e abilità dei giudici e dalle condizioni nelle quali si trovano ad operare (Meilgaard *et al.*, 1999). Prima di utilizzare i dati sensoriali, soprattutto nell'ambito di studi e lavori sperimentali, è quindi consigliabile verificare la bontà dell'operato del panel.

Ciò si fa analizzando il grado di accordo dei giudici nei confronti del posizionamento lungo le scale di misura e dell'apprezzamento dei descrittori per mezzo dell'analisi delle componenti principali (o altro ordinamento), applicata, rispettivamente, alla matrice dei punteggi Giudici x Descrittori e alle matrici Forme x Giudici, osservando in questo caso, in particolare, la quota di varianza spiegata (VAF: *Variance Accounted For*) da ogni prima componente (Peron, 2000).

Come noto, infatti, le componenti sono variabili artificiali che, diversamente dalle originarie, sono incorrelate e non equamente informative (Dagnelie, 1986). Se le correlazioni tra le variabili originarie sono molto strette, ossia se, nel caso in esame, vi è un buon accordo tra i giudici, la prima componente riassume una parte importante della variabilità; se invece le variabili originarie sono poco correlate tra loro, ossia non vi è un buon accordo tra i giudici, la quota rendicontata è modesta.

In questo lavoro si è analizzato il comportamento del panel sensoriale che opera da anni nell'ambito della tradizionale mostra-concorso del formaggio Bitto di Morbegno e che ha valutato anche le forme sperimentali. Si tratta di un panel composto da otto membri addestrati. L'indagine è sta-

ta effettuata in occasione della mostra di Morbegno dell'anno 2008.

MATERIALI E METODI

Le forme di Bitto analizzate furono 56, di età approssimativa di tre mesi e appartenenti a differenti produttori. La valutazione riguardò le caratteristiche estetiche delle forme, le caratteristiche della pasta (colore, occhiatura e consistenza al tatto) e del gusto (odore, sapore/aroma e struttura). I caratteri estetici furono apprezzati in modo collegiale dalla commissione, gli altri individualmente da ogni giudice. I punteggi furono attribuiti secondo le seguenti scale di merito:

1. Caratteristiche estetiche:	
Aspetto della forma	4-10
2. Caratteristiche della pasta:	
Colore:	4-10
Occhiatura:	da 4-10
Consistenza al tatto:	4-10
3. Caratteristiche gustative:	
Odore:	8-20
Sapore/Aroma:	8-20
Struttura:	8-20

Alle tre qualità che compongono le caratteristiche del gusto fu dunque attribuito peso doppio. Le medie dei punteggi complessivi espressi dai giudici determinarono la classifica di merito. In aggiunta fu fatta una valutazione del sapore, secondo gli attributi del dolce, del salato, dell'acido e dell'amaro, adottando una scala 1-10.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella matrice di tabella 1 sono riportati i punteggi medi assegnati dagli otto giudici

Tabella 1 - Punteggi medi attribuiti dai giudici ai descrittori e coefficienti di variazione

Giudici	Caratteristiche della pasta			Caratteristiche gustative			Categorie dell'aroma			
	Colore	Occhiat.	Consist.	Odore	Sap./Ar.	Strutt.	Dolce	Salato	Acido	Amaro
BG	798	673	746	1355	1232	1338	634	346	359	338
BR	796	613	712	1291	1202	1309	623	584	593	246
IM	754	612	668	1157	1063	1232	563	339	521	150
LL	804	654	661	1214	1150	1139	552	489	654	209
LR	829	605	660	1293	1084	1202	382	427	445	378
SG	692	602	641	1264	1082	1096	389	405	454	271
MA	645	521	571	1139	921	996	491	607	741	702
SL	800	661	713	1361	1218	1296	521	729	741	663
Media	765	618	671	1259	1119	1201	520	491	563	370
CV (%)	839	773	796	661	926	980	1833	2818	2527	5566

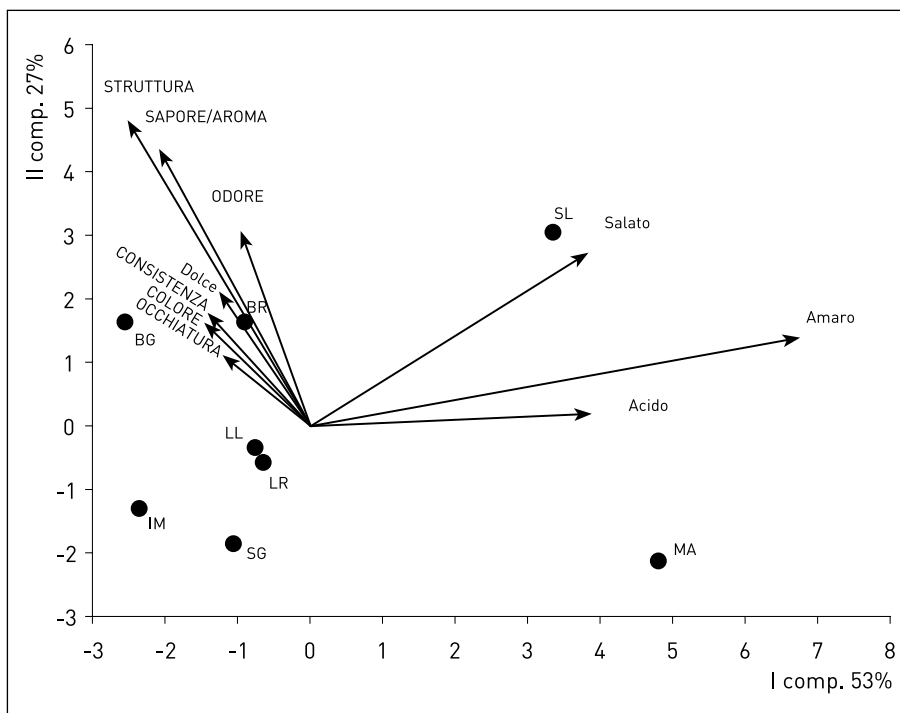


Figura 1 - Biplot di ordinamento ottenuto all'analisi delle componenti principali sulla matrice Giudici x Descrittori

alle forme e in figura 1 è mostrato il diagramma di ordinamento ottenuto all'analisi delle componenti principali della matrice. Come si vede, emergono notevoli differenze di posizionamento tra i giudici nelle

categorie del sapore, massimamente per l'amaro (56% di coefficiente di variazione), in misura minima per il dolce (18% di CV). Gli altri caratteri sono valutati in maniera molto simile (CV inferiori al 10%). Responsabili della variabilità sono principalmente

Tabella 2 - Varianza spiegata (VAF) dalla prima componente principale estratta dalle matrici Forme x Giudici per i descrittori

Descrittore	VAF (%)
Colore	63
Occhiatura	78
Consistenza al tatto	55
Odore	64
Sapore / Aroma	65
Struttura	52
Dolce	44
Salato	54
Acido	47
Amaro	49

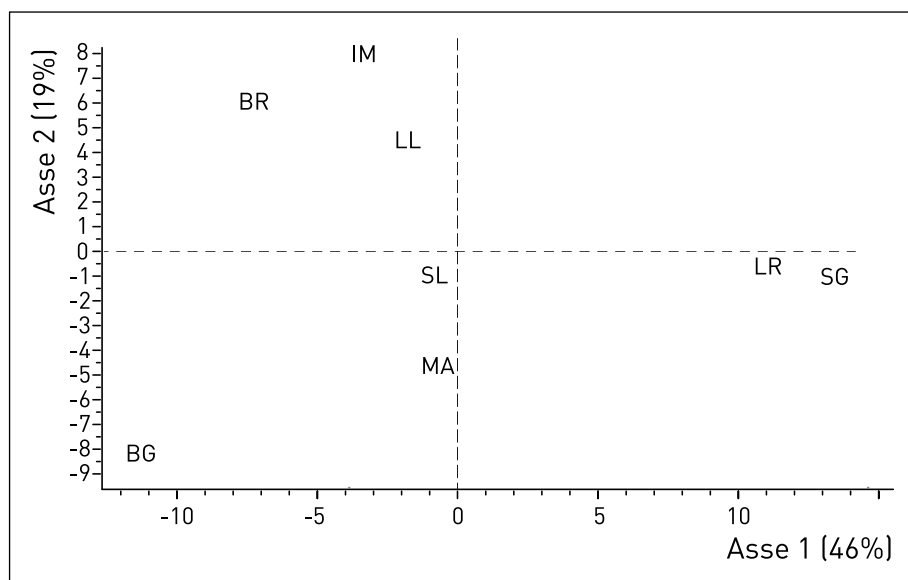


Figura 2 - Ordinamento dei Giudici nello spazio delle prime due componenti principali estratte dalla matrice Giudici x Forme per il carattere Dolce

due soggetti, SL e MA, i quali ostentano un livello di percezione decisamente superiore negli attributi salato, amaro e acido. Essi si distinguono invece tra loro per gli altri descrittori, con MA posizionato su livelli inferiori, i più bassi in assoluto se si eccettua la categoria del dolce. Gli altri giudici rivelano un comportamento più uniforme, con BG e BR contraddistinti da punteggi tendenzialmente più generosi, specialmente nei caratteri sapore/aroma, struttura e dolce.

Riguardo all'apprezzamento dei descrittori, si rileva una buona concordanza generale, come indicato in tabella 2 dai valori di VAF sempre superiori al 45%. L'occhiatura è il carattere più in sintonia (78% di VAF), mentre i più controversi risultano ancora le categorie del sapore, il dolce innanzitutto (44% di VAF), poi l'acido e l'amaro (47% e 49% nell'ordine).

Il comportamento dei singoli giudici è osservabile nei diagrammi di ordinamento ricavati a partire dalle matrici trasposte.



Limitando l'attenzione al carattere più controverso (Fig. 2), si evince come il giudice BG sia quello che tende a distinguersi maggiormente, contrapponendosi soprattutto a LR e SG, molto simili tra loro, e secondariamente a IM, LL e BR, anch'essi abbastanza omogenei. AM e SL hanno un atteggiamento sostanzialmente intermedio.

In definitiva l'analisi ha evidenziato un certa eterogeneità all'interno del panel nel

posizionamento lungo le scale di merito dei descrittori e, per contro, un elevato grado di accordo nel loro apprezzamento relativo. Dal momento che il posizionamento non influisce sul parere complessivo del panel e può, oltretutto, essere emendato a posteriori con un semplice rescaling dei dati, ne discende una valutazione largamente positiva dell'operato del gruppo e quindi una buona affidabilità dei dati da esso forniti.

CARATTERIZZAZIONE DEL FORMAGGIO BITTO

Per avere una conoscenza il più possibile completa della composizione chimica del Bitto sono stati analizzati 45 formaggi che avevano partecipato nel 2007 all'annuale Mostra di Morbegno (SO) nel mese di Ottobre. I formaggi sono stati caratterizzati per ciò che riguarda la composizione centesimale, la frazione volatile, le frazioni proteiche e gli acidi organici.

COMPOSIZIONE CENTESIMALE

In tabella 3 sono riportati i dati relativi alla composizione di base della campionatura dei 45 Bitto in concorso. Si può notare una discreta variabilità, soprattutto per ciò che riguarda le percentuali delle frazioni dell'azoto non caseinico e non proteico. Inoltre, si può notare come siano stati ritrovati in alcuni campioni valori di umidità

che superano il 38% indicato dal disciplinare come valore massimo.

Occorre, tuttavia, sottolineare che per nessun formaggio il contenuto di sostanza grassa espresso sul secco è risultato inferiore al 45%, come richiesto dal disciplinare. Dalle valutazioni della giuria di assaggiatori è emerso che, di questi 45 formaggi, 31 avevano ottenuto la sufficienza (considerando come limite inferiore il punteggio 58,5/100). Osservando i valori di composizione centesimale solo dei formaggi giudicati positivamente si possono formulare interessanti considerazioni (Tabella 4). Mentre non si osservano differenze per ciò che riguarda il range di variazione del contenuto in umidità e della composizione in grasso, proteine totali e ceneri, si nota, invece, come le percentuali delle frazioni

Tabella 3 - Composizione chimica percentuale dei 45 Bitto in concorso alla Mostra di Morbegno (SO)

	Umidità (g/100 g)	Grasso (g/100 g)	Grasso (% sul secco)	Proteine tot. (g/100 g)	Ceneri (g/100 g)	NCN (%)	NPN (%)
Media	36,01	34,8	54,3	24,72	3,77	0,77	0,44
DS*	1,69	2,51	3,06	1,21	0,36	0,16	0,13
CV %*	4,7	7,2	5,63	4,9	9,5	20,4	28,9
minimo	33,40	26,9	45,2	21,85	2,37	0,47	0,25
massimo	40,46	38,3	59,6	27,97	4,54	1,44	0,99

* DS: Deviazione Standard; CV%: Coefficiente di variazione

Tabella 4 - Composizione chimica percentuale dei 31 Bitto in concorso alla Mostra di Morbegno (SO) giudicati con punteggio sufficiente dal panel di assaggiatori

	Umidità (g/100 g)	Grasso (g/100 g)	Proteine tot. (g/100 g)	Ceneri (g/100 g)	NCN (%)	NPN (%)
Media	35,95	34,8	24,69	3,74	0,73	0,40
DS*	1,64	2,41	1,08	0,33	0,10	0,08
CV %*	4,6	6,9	4,4	8,9	14,0	19,2
minimo	33,47	26,9	22,99	2,37	0,47	0,25
massimo	40,45	38,3	26,73	4,13	0,88	0,64

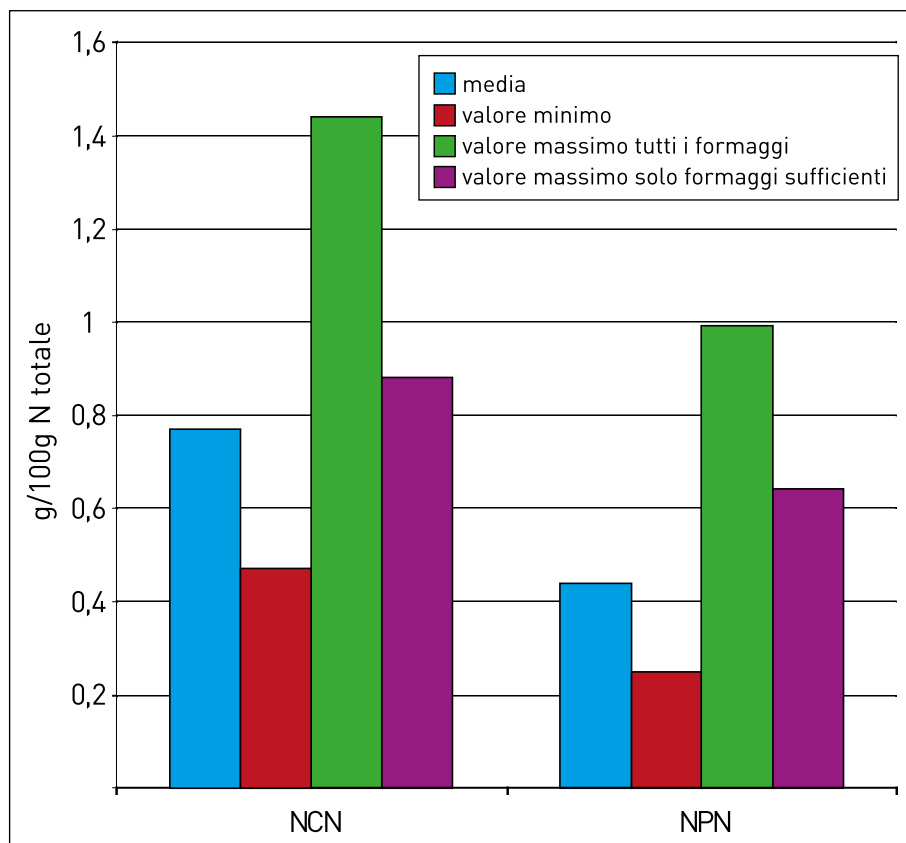


Figura 3 - Variazione dei valori delle percentuali delle frazioni azotate nei campioni della Mostra

dell'azoto non caseinico (NCN) e non proteico (NPN) mostrino valori massimi inferiori, rispetto a quelli ritrovati per l'intero set dei 45 formaggi (Figura 3).

Nel formaggio queste due frazioni sono costituite dai frammenti delle proteine (peptidi) formati nel corso della maturazione per azione degli enzimi proteolitici. Questi possono essere costitutivi del latte, derivare dal caglio oppure venire rilasciati dai microrganismi. I peptidi di maggiori dimensioni vengono separati nella frazione dell'azoto non caseinico, mentre quelli più piccoli, insieme ad amminoacidi e ammoniaca, vengono separati nell'azoto non proteico e rappresentano lo stadio finale del processo di proteolisi. Pertanto, in generale, più un formaggio è maturo più elevata sarà la percentuale di azoto non proteico, anche se è bene ricordare che in particolari tipologie di formaggi, quali quelli erborinati o a crosta fiorita, la presenza delle muffe

determina un andamento completamente differente del fenomeno. La proteolisi è uno dei processi più complessi e importanti della maturazione di un formaggio ed è il principale responsabile dei cambiamenti strutturali nella pasta del formaggio. Piccoli peptidi e amminoacidi contribuiscono direttamente al flavour del formaggio e gli amminoacidi sono a loro volta il substrato per numerose reazioni che portano alla formazione di altre molecole responsabili dell'aroma. Al tempo stesso, però, una quantità eccessiva di alcuni peptidi idrofobici può essere la causa della comparsa di sapore amaro e quindi in alcuni casi di difetti (Fox e McSweeney, 1998). Alla luce di queste considerazioni, poiché tra i 45 formaggi Bitto giudicati insufficienti ve ne erano alcuni che presentavano una elevata percentuale di NCN e NPN, si può ipotizzare che per questi prodotti all'origine dei difetti riscontrati dal panel di assaggiatori vi

fosse un anomalo andamento proprio dei fenomeni proteolitici. In particolare tali difetti si ritiene possano essersi manifestati, per due formaggi, come nota di amaro e per altri come problemi strutturali. A questo proposito, infatti, dal calcolo dei coefficienti di correlazione effettuato sul set di dati relativi alla composizione centesimale e ai giudizi degli assaggiatori, è emerso come il punteggio relativo alla consistenza sia inversamente correlato, con significatività elevata ($P=0,001$), con i valori di NCN%: in altre parole a valori più elevati di percentuale della frazione dell'azoto non caseinico sono associati punteggi inferiori per ciò che riguarda la consistenza del formaggio. Fenomeni proteolitici della pasta che hanno portato a valori più elevati delle frazioni azotate potrebbero quindi essere all'origine di caratteristiche strutturali del formaggio ritenute non accettabili dal panel di assaggiatori. Inoltre, il punteggio relativo all'amaro è risultato correlato, con buona significatività ($P=0,05$), con i valori di NPN%, ovvero più alti punteggi assegnati al gusto amaro sono associati a valori più elevati di NPN%.

COMPOSIZIONE DELLA FRAZIONE VOLATILE

E' stata adottata la tecnica di estrazione SPME (Microestrazione in fase solida), basata sul principio dello spazio di testa statico, seguita dall'analisi gascromatografica con rivelatore spettrometro di massa (Povolo *et al.*, 2007). Con questa tecnica vengono estratte le molecole più volatili che si pongono in equilibrio tra la matrice del campione e lo spazio vuoto che rimane sopra il formaggio nel recipiente per l'analisi. Nei 45 campioni di formaggio analizzati sono state riconosciute circa 40 molecole appartenenti alle classi chimiche di chetoni, alcoli, esteri, acidi, aldeidi e terpeni. Da una valutazione complessiva del set di dati emerge, anche per ciò che riguarda la frazione volatile, una discreta variabilità, spiegabile con l'elevata artigianalità della lavorazione e i numerosi fattori in gioco nell'intero processo produttivo. Le classi di composti più abbondanti sono risultate quelle di chetoni, alcoli, esteri e acidi volatili.

Ad eccezione dei terpeni, derivanti direttamente dall'erba fresca del pascolo (Bosset

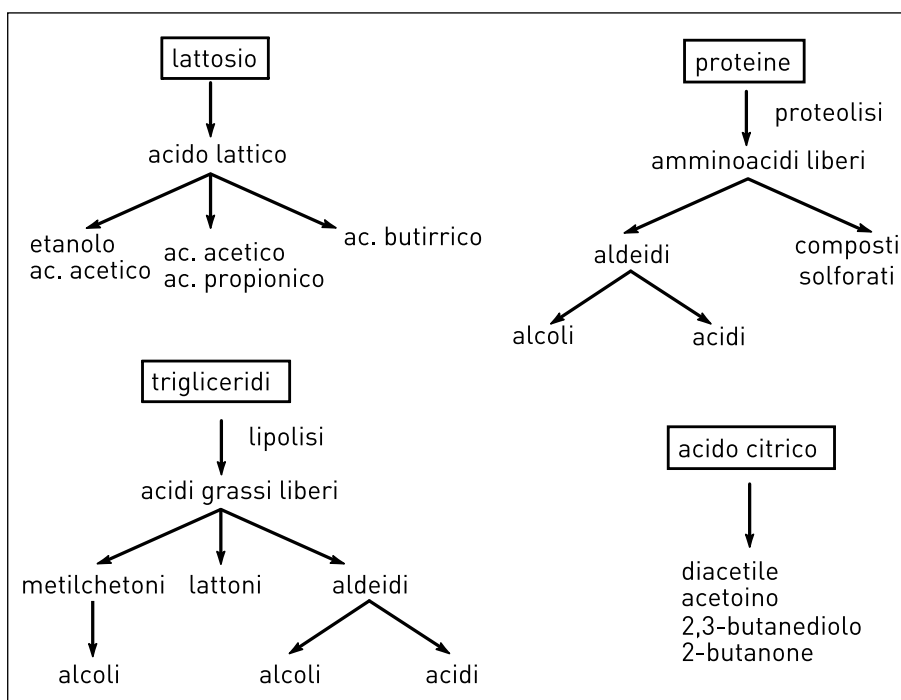


Figura 4 - Principali vie di sintesi delle sostanze volatili nel formaggio

et al., 1994; Viallon *et al.*, 2000; De Noni e Battelli, 2008), e dell'acetone, che potrebbe derivare dall'alimentazione dell'animale poiché ritrovato anche in latte appena munto, la presenza delle molecole rilevate è legata alle complesse reazioni biochimiche che hanno luogo nel formaggio durante la sua maturazione. In Figura 4 vengono riportate in modo sintetico alcune vie di formazione di molecole volatili nel formaggio (McSweeney e Sousa, 2000). Diacetile, acetoino e 2-butanone sono prodotti della via metabolica del citrato. I metilchetoni 2-pentanone, 2-eptanone e 2-nonanone derivano dalla β -ossidazione e decarbossilazione degli acidi grassi liberi. Per quanto riguarda gli alcoli, in generale gli alcoli primari possono derivare dalla riduzione delle corrispondenti aldeidi e gli alcoli secondari dalla riduzione dei corrispondenti chetoni. L'etanolo è il prodotto di una delle possibili fermentazioni microbiche del lattosio, mentre il 3-metil-1-butanolo deriva dal metabolismo dell'amminoacido leucina. Gli acidi grassi volatili a catena lineare si formano sia per lipolisi del grasso, che da metabolismo microbico, mentre quelli a catena ramificata, isobutirrico ed isopentanoico, originano dal catabolismo microbico degli amminoacidi valina e leucina, rispettivamente. Gli etilesteri, responsabili nell'aroma delle note di fruttato, si formano dall'azione di enzimi esterasi di origine microbica.

In Tabella 5 vengono riportate, per alcune delle molecole ritrovate nella frazione volatile del Bitto, le note aromatiche associate. L'aroma desiderabile di un prodotto origina dal delicato equilibrio tra le diverse molecole, molte delle quali presenti al di sotto della concentrazione soglia di percezione.

Sul set di dati ottenuto dall'analisi della frazione volatile dei 45 formaggi Bitto della Mostra 2007 è stata applicata la tecnica statistica multivariata dell'Analisi delle Componenti Principali (PCA), in modo da

poter osservare se vi fossero particolari raggruppamenti di campioni. Dato l'elevato numero di variabili (composti volatili estratti) si è ritenuto opportuno, in questa fase del lavoro, raggrupparle nelle classi chimiche di appartenenza prima di effettuare l'analisi statistica. Sono state tenute in considerazione le classi di chetoni, alcoli, esteri ed acidi. In Figura 5 è riportato il biplot della prima e seconda componente dei 45 formaggi e delle 4 classi di sostanze. Si può osservare come non si evidenzino particolari raggruppamenti di campioni, ma tutto il set di dati sia disperso in un'unica nuvola di punti. Ciò conferma quanto già osservato relativamente all'estrema variabilità compositiva di questi formaggi. Tuttavia se ai numeri dei campioni si sostituisce il punteggio ottenuto dalla giuria di assaggio si può constatare un andamento: i formaggi che avevano ricevuto il giudizio più elevato (superiore a 70/100, simbolo colore verde), pur non essendo separati dal resto dei campioni, si trovano tutti nella zona sinistra del grafico, mentre la maggior parte di quelli che avevano ricevuto i punteggi insufficienti si trova nella zona destra (simbolo colore rosso). La posizione dei campioni è determinata dalla loro composizione in sostanze volatili, soprattutto quelle appartenenti alle classi di acidi ed alcoli, ed in particolare dalla loro quantità: i formaggi con i punteggi più elevati avevano complessivamente una quantità di molecole nello spazio di testa inferiore rispetto a quelli giudicati negativamente. Ciò porta ad ipotizzare che al giudizio molto positivo possa anche aver contribuito una composizione in sostanze volatili globalmente meno abbondante e per questo, probabilmente, più equilibrata. Nei formaggi giudicati negativamente, se sicuramente la causa del punteggio basso non è ascrivibile ad un'unica ragione, si può ritenere che problemi nella produzione e maturazione, che hanno dato origine ad un prodotto con presenza di difetto, si

Tabella 5 - Sensazioni odorose associate ad alcune molecole volatili rilevate nel formaggio Bitto (Curioni e Bosset, 2002)

Sensazione odorosa	Composti volatili
Fruttato	etil acetato, etil butirrato, etil esanoato, 2-pentanone
Burro	diacetile, acetoino
Formaggio erborinato	2-eptanone, 2-nonanone
Erbaceo	2-pentanololo, 2-eptanololo
Acido, acre	acidi acetico, butirrico, esanoico
Di formaggio	ac. butirrico

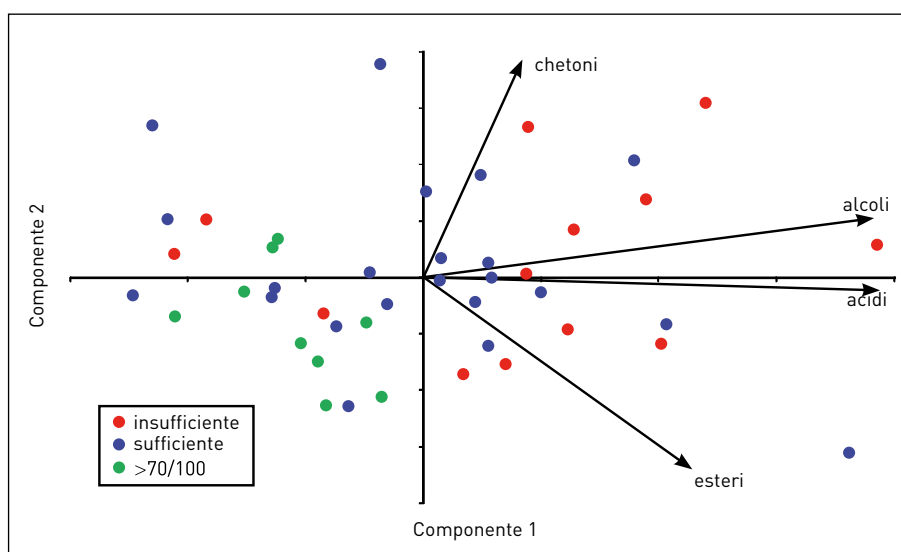


Figura 5 - Biplot dei 45 formaggi della mostra e delle 4 classi di sostanze volatili (varianza totale spiegata 71,5%)

manifestino anche in uno sviluppo eccessivo di molecole volatili, la presenza delle quali può aver determinato, a sua volta, nel formaggio note aromatiche non apprezzate. I risultati dei singoli composti volatili sono stati correlati con i giudizi sensoriali: solo per alcune molecole si è osservata una correlazione statisticamente significativa, sia positivamente che negativamente. Prendendo in considerazione solo i giudizi relativi alle caratteristiche gustative, è risultata una correlazione positiva tra acetone e "odore" e tra 2-pentanone e "odore", "sapore-aroma" e "struttura". Per molte altre molecole, è emersa una correlazio-

ne negativa, ciò a conferma del fatto che quantità più elevate di queste molecole sono associate a giudizi più negativi del prodotto.

PROFILO PROTEICO

La maturazione del formaggio è il risultato di complessi fenomeni chimici e biochimici che contribuiscono a far assumere al prodotto l'aspetto, la consistenza e l'aroma caratteristici di ciascuna varietà. I cambiamenti biochimici possono essere raggruppati in tre categorie (McSweeney, 2004): la lipolisi, ossia l'idrolisi dei trigliceridi con liberazione di acidi grassi ad opera

delle lipasi; la proteolisi, che riguarda la demolizione della caseina con formazione di peptoni ad elevato peso molecolare che vengono successivamente degradati a peptidi di dimensioni intermedie fino alla liberazione di singoli aminoacidi; e la glicolisi, che riguarda principalmente il metabolismo del lattosio. In seguito a questi eventi primari, si susseguono una serie di eventi secondari che coinvolgono il metabolismo degli aminoacidi, degli acidi grassi liberi, del lattato e del citrato con formazione di composti aromatici, che incidono notevolmente sulle caratteristiche organolettiche del prodotto.

La maggior parte di queste reazioni sono opera dell'attività di diversi enzimi.

Nel formaggio, una delle principali fonti di enzimi è il caglio, contenente per circa il 95% chimosina, responsabile della coagulazione presamica del latte. La chimosina è inattivata dal calore (~55°C), quindi nei formaggi a pasta cotta quali il Bitto non

contribuisce al manifestarsi dei fenomeni proteolitici nel corso della maturazione.

Il latte stesso è una fonte di proteinasi, tra le quali la principale è la plasmina, che al contrario della chimosina è particolarmente rilevante nella maturazione dei formaggi a pasta cotta in quanto è attivata dal calore (Bastian e Brown, 1996): temperature elevate favoriscono la conversione da plasminogeno (precursore inattivo) a plasmina, poiché determinano l'inattivazione degli inibitori della plasmina e l'incremento di attività degli attivatori del plasminogeno. Substrato preferenziale della plasmina sono le β -caseine. Un'altra classe di proteinasi endogene del latte, normalmente associate alle cellule somatiche, è costituita dalle catepsine, tra cui la catepsina D presenta gli stessi siti di attacco della chimosina (Hurley *et al.*, 2000; McSweeney e Fox, 1995). Anche i batteri lattici dello starter, la cui funzione principale è quella di produrre acido lattico per abbassare il

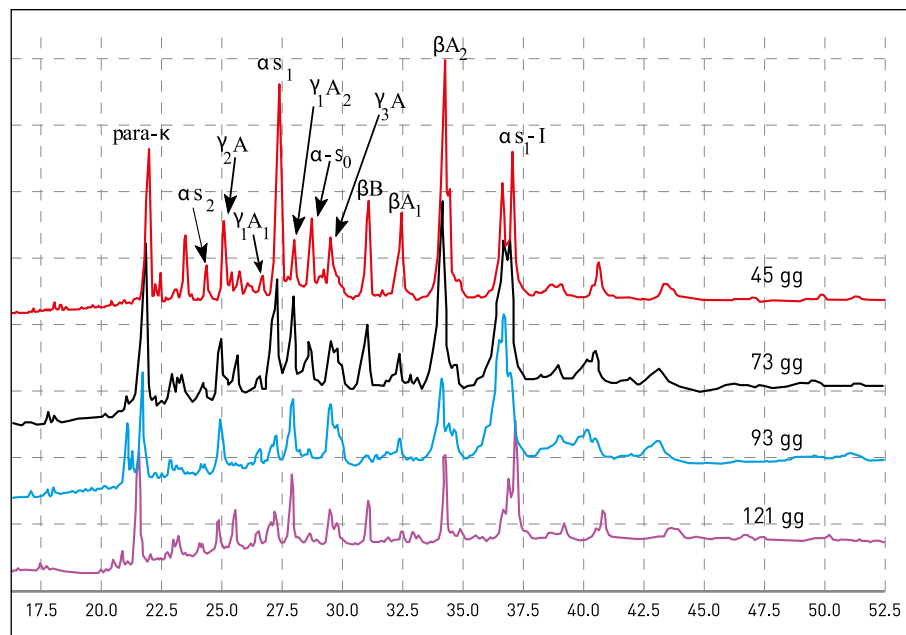


Figura 6 - Elettroferogrammi di formaggio Bitto a diversi periodi di maturazione. Sono indicate le frazioni caseiniche integre ed i principali prodotti di degradazione. Para-k: para-k caseina; α_{s2} : α_{s2} -caseina; γ_2A : γ_2A -caseina; γ_1A_1 : γ_1A_1 -caseina; α_{s1} : α_{s1} -caseina; γ_1A_2 : γ_1A_2 -caseina; α_{s0} : α_{s0} -caseina; γ_3 : γ_3 -caseina; βB : βB -caseina; βA_1 : βA_1 -caseina; βA_2 : βA_2 -caseina; α_{s1-I} : α_{s1-I} -caseina

Tabella 6 - Composizione negli acidi organici (g/100g) presenti in quantità minore dei 45 formaggi della Mostra di Morbegno

Acidi	Media	Ds	Cv%	Minimo	Massimo
Citrico	0,06	0,06	97,8	0,00	0,23
Piruvico	0,01	0,02	117,2	0,00	0,08
Succinico	0,04	0,03	72,6	0,00	0,12
Formico	0,01	0,02	133,6	0,00	0,11
Acetico	0,11	0,03	29,9	0,03	0,22
Piroglutammico	0,01	0,01	206,8	0,00	0,08
Butirrico	0,04	0,06	142,2	0,00	0,31
Propionico	0,03	0,02	57,8	0,00	0,05
Lattico	1,30	0,22	16,7	0,74	1,86

DS: deviazione standard; CV%: coefficiente di variazione

pH del prodotto nelle fasi immediatamente successive alla caseificazione, possiedono un corredo enzimatico in grado di attaccare i peptidi più grossi per formare peptidi di dimensioni inferiori, fino alla liberazione di singoli amminoacidi. Infine, la microflora endogena del latte, caratteristica soprattutto dei formaggi a latte crudo quali il Bitto, ha una spiccata attività proteolitica, in grado di produrre peptidi con dimensioni intermedie ed amminoacidi liberi, nonché una gran varietà di composti, alcuni particolarmente importanti per la composizione aromatica del prodotto, sia attraverso il metabolismo degli zuccheri (metabolismo omo- o etero-fermentante) che di altri substrati (ad esempio acidi organici e amminoacidi) [Beuvier e Buchin, 2004].

L'analisi mediante Elettroforesi Capillare Zonale (CZE) della componente proteica, applicata nel progetto per lo studio dell'andamento della proteolisi, ha consentito di separare le diverse frazioni caseiniche integre ed i prodotti di degradazione a peso molecolare più elevato e di valutare i possibili meccanismi enzimatici alla base della maturazione del prodotto.

L'elettroforesi sfrutta il principio per cui una molecola carica (quale può essere una proteina ad un determinato pH assimilabile ad un elettrolita di seconda specie) sotto

l'influenza di un campo elettrico, si muove verso il polo di segno opposto.

La metodica adottata (Recio e Olieman, 1996; Recio *et al.*, 1997) prevede che il formaggio venga solubilizzato in Urea 6M in presenza di un agente riducente (DTT), per dissociare le micelle caseiniche e rompere i ponti disolfuro presenti negli aggregati proteici. La separazione elettroforetica avviene in un capillare di silice fusa e le specie separate vengono rivelate mediante un detector UV.

I tracciati elettroforetici (elettroferogrammi) relativi alla componente proteica dei campioni allo studio (Figura 6) hanno evidenziato un'estensiva degradazione delle β -caseine ad opera della plasmina con formazione di γ -caseine.

Con il procedere della maturazione anche l' α s1-caseina viene progressivamente degradata e si ha la comparsa di un picco allo stesso tempo di migrazione dell' α s1-caseina: questa specifica azione idrolitica di solito avviene ad opera della chimosina, che dovrebbe, però, essere inattivata alle temperature adottate per la cottura della cagliata del Bitto. Si può quindi ipotizzare o una inattivazione incompleta della chimosina nella fase di cottura e quindi una sua attività residua, o l'azione di un'altra proteinasi acida, quale potrebbe essere la

catepsina D, che è stata indicata come la responsabile della proteolisi in alcuni formaggi di tipo svizzero (Hayes *et al.*, 2001). Infine, la liberazione di questo peptide potrebbe essere il risultato dell'attività proteolitica di enzimi microbici, soprattutto quelli della microflora non-starter caratteristica dei formaggi prodotti da latte crudo, che hanno una intensa attività proteolitica. La composizione della frazione proteica dei formaggi analizzati è risultata caratterizzata da una importante variabilità, a conferma della complessità dei fattori coinvolti nel processo proteolitico.

COMPOSIZIONE IN ACIDI ORGANICI

Anche l'analisi degli acidi organici nei formaggi può fornire informazioni interessanti riguardo la qualità del prodotto e l'andamento della maturazione. Gli acidi organici presenti nei formaggi possono derivare dal normale metabolismo dell'animale ed essere quindi già presenti nel latte al momento della trasformazione (acido citrico), oppure identificati come prodotti del metabolismo microbico (acido lattico, succinico, formico, piruvico, acetico) o ancora derivanti dall'idrolisi della frazione grassa (acido butirrico). In alcuni casi possono essere aggiunti nel corso della trasformazione quali agenti acidulanti (acido citrico e lattico) (Fox *et al.*, 2000).

Il ruolo degli acidi organici nei prodotti lattiero-caseari riguarda soprattutto la riduzione del pH, attraverso la produzione di acido lattico che avviene nelle prime fasi della caseificazione, al fine di inibire la crescita di microrganismi patogeni e alterativi e favorire lo spurgo della cagliata (Janhøj e Qvist, 2010). Inoltre, taluni composti contribuiscono alla formazione dell'aroma del prodotto (McSweeney e Sousa, 2000) mentre altri sono un indice della qualità microbiologica (Beresford e Williams, 2004).

L'analisi HPLC, effettuata sui campioni allo

studio secondo la metodica di Bouzas *et al.* (1991), basata su di un principio combinato di cromatografia di esclusione e di separazione in fase inversa, ha permesso la valutazione di eventuali zuccheri residui (lattosio, glucosio e galattosio) e la presenza di acidi organici (citrico, piruvico, succinico, formico, acetico, piroglutamico, butirrico e propionico). Come atteso, poiché lo studio ha interessato campionature di formaggi stagionati, non è stata riscontrata la presenza di zuccheri residui: infatti il lattosio viene metabolizzato rapidamente nelle prime fasi della maturazione così da evitare lo sviluppo di una microflora secondaria indesiderata. Il prodotto principale della fermentazione risulta quindi l'acido lattico, che rappresenta circa l'80% degli acidi prodotti.

Più interessanti risultano gli acidi presenti in quantità minore, che derivano dal catabolismo dell'acido lattico da parte della microflora non-starter e che contribuiscono maggiormente alla caratterizzazione del prodotto. I dati ottenuti dai 45 formaggi della Mostra mostrano una discreta variabilità quali-quantitativa nella composizione in acidi organici (Tabella 6).

Ai fini di una caratterizzazione del prodotto è possibile identificare alcuni acidi come particolarmente interessanti.

L'acido acetico, ad esempio, è considerato un elemento importante per il flavour del prodotto: può derivare dal metabolismo del lattosio, del citrato e degli amminoacidi da parte della microflora starter oppure dall'ossidazione del lattato da parte della microflora non-starter, con la contemporanea produzione di acido formico.

L'acido butirrico ha principalmente un'origine enzimatica, ascrivibile all'azione di lipasi endogene, derivanti dall'uso di latte crudo, oppure alla debole attività lipolitica dei batteri lattici e della microflora non-starter (Beuvier e Buchin, 2004).

STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ DELLA MICROFLORA LATTICA NEL FORMAGGIO BITTO

Lo studio della biodiversità microbica presente in un formaggio a latte crudo rappresenta il primo e fondamentale passo per realizzare una caratterizzazione puntuale del prodotto e per l'individuazione di specifici biotipi potenzialmente utilizzabili come starter (quindi con la funzione di guidare le prime fasi della fermentazione) oppure come microrganismi secondari che esplicano la loro funzionalità nel proseguo del processo produttivo ossia durante la stagionatura del formaggio. Con questa finalità, presso quattro malghe (CC, PM, AL e VA), si sono condotte 8 caseificazioni senza il ricorso a fermenti selezionati (CCc, PMc, ALc, VAc). Di ciascuna malga sono stati analizzati campioni di latte, cagliata e i rispettivi formaggi a 70 giorni di stagionatura. Per quanto riguarda il latte, le analisi sono state eseguite con la finalità di verificare la qualità igienico-sanitaria della materia prima; si sono pertanto determinate la carica batterica, i coliformi e gli stafilococchi coagulasi positivi. I restanti campioni sono stati esaminati e descritti dal punto di vista microbiologico in termini di popolazioni presenti: utilizzando opportuni terreni colturali si è proceduto a valutare la microflora lattica nelle sue diverse componenti differenziando batteri lattici mesofili e termofili, cocchi e bastoncini, enterococchi ed eterofermentanti obbligati. Dai diversi terreni colturali si sono complessivamente isolati 225 ceppi batterici dei quali 190 sono risultati appartenere al gruppo dei batteri lattici in base alla colorazione di Gram e alla prova della catalasi. I ceppi batterici, una volta purificati, sono stati conservati a -20 °C con idonei crioprotettivi.

L'identificazione dei ceppi è stata condotta preliminarmente mediante la tecnica Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR (RADP-PCR) che consente di ottenere informazioni riguardo la collocazione tassonomica e di valutare la diversità all'interno delle specie.

La reazione di RAPD-PCR è stata allestita con tre diversi primer (tabella 7) e le condizioni di amplificazione applicate sono quelle riportate da Andrighetto *et al.* (2002) e Morandi *et al.* (2006). I tre profili di amplificazione ottenuti sono stati elaborati mediante clustering UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) utilizzando il software BioNumerics 5.1 (Applied Maths). L'identificazione così ottenuta è stata successivamente confermata mediante PCR specie-specifica utilizzando le coppie di primer riportate in tabella 7 e le reazioni di PCR sono state eseguite come precedentemente riportato da Morandi *et al.* (2011).

Gli isolati per i quali non è stato possibile confermare l'identificazione mediante PCR specie specifica sono stati sottoposti al sequenziamento di una porzione di circa 800 bp, del gene 16S rRNA, impiegando i primer universali P8FPL e P806R secondo la procedura riportata da Hosseini *et al.* (2009). I prodotti di PCR sono quindi stati sequenziati da Primm s.r.l. e le sequenze ottenute confrontate con quelle disponibili nella Gene Bank del National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Di tutti i 190 ceppi isolati sono state valutate la produzione di CO₂, e la crescita a 10 e 45 °C ed in presenza di concentrazioni crescenti di NaCl (2%, 4% e 6,5%).

Tabella 7 - Primer utilizzati per l'identificazione e la tipizzazione dei batteri lattici

Target	Primer	Sequenza (5' to 3')	Bibliografia
<i>Enterococcus faecalis</i>	FAE-fw	CGCTAGGCTCCATTGATAGC	Morandi <i>et al.</i> 2010
	FAE-rev	CGGTTGGGTCTTGATCACTT	
<i>E. faecium</i>	FUM-fw	CGGAGACTACACAATTTGTTTTT	Morandi <i>et al.</i> 2010
	FUM-rev	CGGTTGGGTTTTGATCCTT	
<i>E. durans</i>	DUR-fw	ATTTAGATCGGGGCCTTAGC	Morandi <i>et al.</i> 2010
	DUR-rev	GCGGTGTTCTCGGTTTGTAT	
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	LAC-fw	TCTTGATTGTGGGGCCTTAG	Morandi <i>et al.</i> 2010
	LAC-rev	TCACAGTTTTTGGTTTATTTATCG	
<i>Lc. garvieae</i>	LGA-fw	CCTTAGCTCAGCTGGGAGAG	Morandi <i>et al.</i> 2010
	LGA-rev	TTCGCAGCTTTACAGAAATGTT	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST-fw	CACTATGCTCAGAATACA	Lick <i>et al.</i> 1996
	ST-rev	CGAACAGCATTGATGTTA	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Dell	ACGGATGGATGGAGAGCAGGCAG	Van Hoorde <i>et al.</i> 2008
	DeIII	GCAAGTTTGTCTTTTCGAACTCAACTC	
<i>Lb. casei</i>	Prl	CAGACTGAAAGTCTGACGG	Walter <i>et al.</i> 2000
	CasII	GCGATGCGAATTTCTTTTTTC	
<i>Lb. fermentum</i>	Lfpr	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	Walter <i>et al.</i> 2000
	FermlI	CTGATCGTAGATCAGTCAAG	
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>	PrII	CAGACTGAAAGTCTGACGGACGG	Van Hoorde <i>et al.</i> 2008
	Pcas II	GCGATGCGAATTTCTTTTTCTTTC	
RAPD-PCR	M13	GAGGGTGGCGGTCT	Andrighetto <i>et al.</i> 2002
	D11344	AGTGAATTCGCGGTCAGATGCCA	Andrighetto <i>et al.</i> 2002
	D8635	GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC	Morandi <i>et al.</i> 2006
Sequencing	p8FPL	AGTTTGATCCTGGCTCAG	Hosseini <i>et al.</i> 2009
	p806R	GGACTACCAGGTATCTAAT	

La caratterizzazione tecnologica dei ceppi in esame è stata condotta valutando l'attività acidificante, riducente e proteolitica secondo quanto riportato da Morandi *et al.* (2011) e Brasca *et al.* (2007). Il potere acidificante dei singoli ceppi è stato espresso in relazione a tre diverse classi individuate in base alla variazione di pH in latte a seguito di inoculo all'1% e incubazione a 37°C per 24h: classe I, isolati con scarso potere acidificante (ΔpH nell'arco di tempo di 6 e 24 ore $< 1,5$); classe II, ceppi con medio potere acidificante ($1,5 < \Delta\text{pH} < 2,0$) e classe III, isolati con alto potere acidificante ($\Delta\text{pH} > 2,0$). Anche per quanto riguarda il potere riducente misurato nell'arco delle 24 ore, i batteri lattici sono stati suddivisi in tre classi: classe I, isolati con scarso potere riducente ($E_h > -2$ mV); classe II, ceppi

con medio potere riducente (-2 mV $< E_h < -102$ mV), e classe III, isolati con alto potere riducente ($E_h < -102$ mV).

L'attività proteolitica stata determinata mediante un metodo colorimetrico come riportato precedentemente da Hull (1947). Inoltre, su tutti gli isolati è stata valutata l'attività antimicrobica contro *Listeria monocytogenes* ATCC 9525 e *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 mediante il metodo standardizzato della diffusione in agar, come riportato da Campos *et al.* (2006), in BHI agar (Scharlau Microbiology).

I ceppi batterici selezionati per la composizione delle miscele starter sono stati ulteriormente studiati per quanto riguarda l'antibiotico resistenza e l'attività inibente nei confronti di microrganismi target. La suscettibilità a 14 antibiotici diversi (ci-

profloxacina 5 µg/disk, eritromicina 15 µg/disk, levofloxacina 5 µg/disk, oxacillina 1 µg/disk, penicillina G 10 µg/disk, streptomina 10 µg/disk, tetraciclina 30 µg/disk, vancomicina 30 µg/disk, ampicillina 10 µg/disk, cloramfenicolo 30 µg/disk, mupirocina 200 µg/disk, nitrofurantoina 300 µg/disk, quinupristina/dalfopristina 15 µg/disk e rinfamicina 30 µg/disk, (Oxoid) è stata valutata mediante test di diffusione in agar secondo quanto indicato dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). L'attività antimicrobica contro *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterococcus faecalis* SV6 (collezione CNR-ISP), *Clostridium sporogenes* ATCC 3584 e *Cl. tyrobutyricum* DSMZ 2637 è stata determinata mediante il metodo standardizzato della diffusione in agar, come riportato da Campos *et al.* (2006) in BHI agar.

CONTE BATTERICHE

Il latte destinato alla produzione di Bitto ha evidenziato una qualità microbiologica pie-

namente soddisfacente. La carica batterica è risultata molto variabile nelle diverse realtà analizzate presentando un valore minimo di 3,95 ed uno massimo di 6,00 log₁₀ UFC/mL, mentre la presenza di coliformi è invece risultata sempre contenuta (valore medio 2,93 ± 0.41 log₁₀ UFC/mL). Gli stafilococchi coagulasi positivi sono stati rilevati in tre degli otto campioni di latte con un valore massimo pari a 3,65 log₁₀ UFC/mL. I batteri lattici sono presenti con numeri importanti in tutte le forme analizzate sia nella cagliata che nel formaggio a 70 giorni di maturazione (tabelle 8 e 9). Nella cagliata i cocchi mesofili rappresentano il gruppo più numeroso con valori compresi tra 4,30 e 6,83 log₁₀ UFC/g, ma cospicuo risulta essere anche il contributo dei cocchi termofili che presentano un valore medio pari a 6,11 log₁₀ UFC/g. Diversamente distribuita risulta la componente bastoncellare dove le forme termofile prevalgono su quelle mesofile con valore medio di 5,98 vs 5,40 log₁₀ UFC/g. L'analisi microbiologica

Batteri lattici	Media	DS
Cocchi mesofili (M17 30 °C)	6,37	0,85
Cocchi termofili (M17 45 °C)	6,11	0,77
Lattobacilli mesofili (MRS 30 °C)	5,40	0,62
Lattobacilli termofili (MRS 45 °C)	5,98	1,00
Enterococchi (KAA)	4,21	0,67
Eterofermentanti obbligati	3,47	91

Tabella 8 - Contenuto di batteri lattici nelle cagliate di Bitto DOP (Valori espressi come Log₁₀ UFC/g)

Batteri lattici	Media	DS
Cocchi mesofili (M17 30 °C)	7,79	0,19
Cocchi termofili (M17 45 °C)	7,66	0,33
Lattobacilli mesofili (MRS 30 °C)	8,02	0,13
Lattobacilli termofili (MRS 45 °C)	7,46	0,38
Enterococchi (KAA)	7,14	0,26

Tabella 9 - Contenuto di batteri lattici nel formaggio Bitto DOP a 70 giorni di stagionatura (Valori espressi come Log₁₀ UFC/g)

delle cagliate evidenzia anche un elevato tenore di enterococchi e di eterofermentanti obbligati, anche se inferiore rispetto a quello di cocchi e bastoncini lattici.

I batteri lattici raggiungono il massimo sviluppo nel formaggio durante la maturazione con una netta prevalenza in questa fase delle forme mesofile; nel formaggio a 70 giorni di stagionatura i batteri lattici sono risultati compresi tra 7,00 log₁₀ UFC/g determinato in M17 agar a 45 °C (cocchi termofili) e 8,21 log₁₀ UFC/g in MRS agar a 30 °C (bastoncini mesofili). Gli enterococchi, nel passaggio da cagliata a formaggio, aumentano di circa tre cicli logaritmici, in accordo con quanto riportato in letteratura in relazione ad altri formaggi a latte cru-

do (Morandi *et al.* 2005). L'incremento del contenuto di enterococchi nel corso della maturazione del Bitto conferma che questo gruppo di batteri esplica un ruolo chiave nella definizione delle caratteristiche di questo formaggio.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI BATTERI LATTICI

Le specie batteriche rilevate nella cagliata e nel formaggio (tabella 10) consentono di fare ulteriori considerazioni.

Dei 225 isolati, 190 ceppi (97 da cagliata e 93 da formaggio) sono ascrivibili al gruppo dei batteri lattici. Questi ceppi sono risultati appartenere a 23 specie diverse di-

Specie	Cagliata	Formaggio	Totale
<i>Enterococcus durans</i>		1	1
<i>E. faecalis</i>	3	3	6
<i>E. faecium</i>	33	39	72
<i>E. lactis</i>		10	10
<i>Lactococcus garvieae</i>	2		2
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	1		1
<i>Leuconostoc lactis</i>	3		3
<i>Ln. mesenteroides</i>	2		2
<i>Pediococcus acidilactici</i>	2	6	8
<i>Pd. pentosaceus</i>	2	10	12
<i>Streptococcus bovis</i>	1		1
<i>S. macedonicus</i>	1		1
<i>S. salivarius</i>	1		1
<i>S. thermophilus</i>	29	4	33
<i>Streptococcus spp.</i>	2		2
<i>Lactobacillus brevis</i>		2	2
<i>Lb. casei</i>		2	2
<i>Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	3	2	5
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	1		1
<i>Lb. fermentum</i>	10	5	15
<i>Lb. parabuchneri</i>	1		1
<i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i>		7	7
<i>Lb. plantarum</i>		1	1
<i>Lb. reuteri</i>		1	1
totale	97	93	190

Tabella 10 - Batteri lattici isolati dai campioni di cagliata e formaggio Bitto

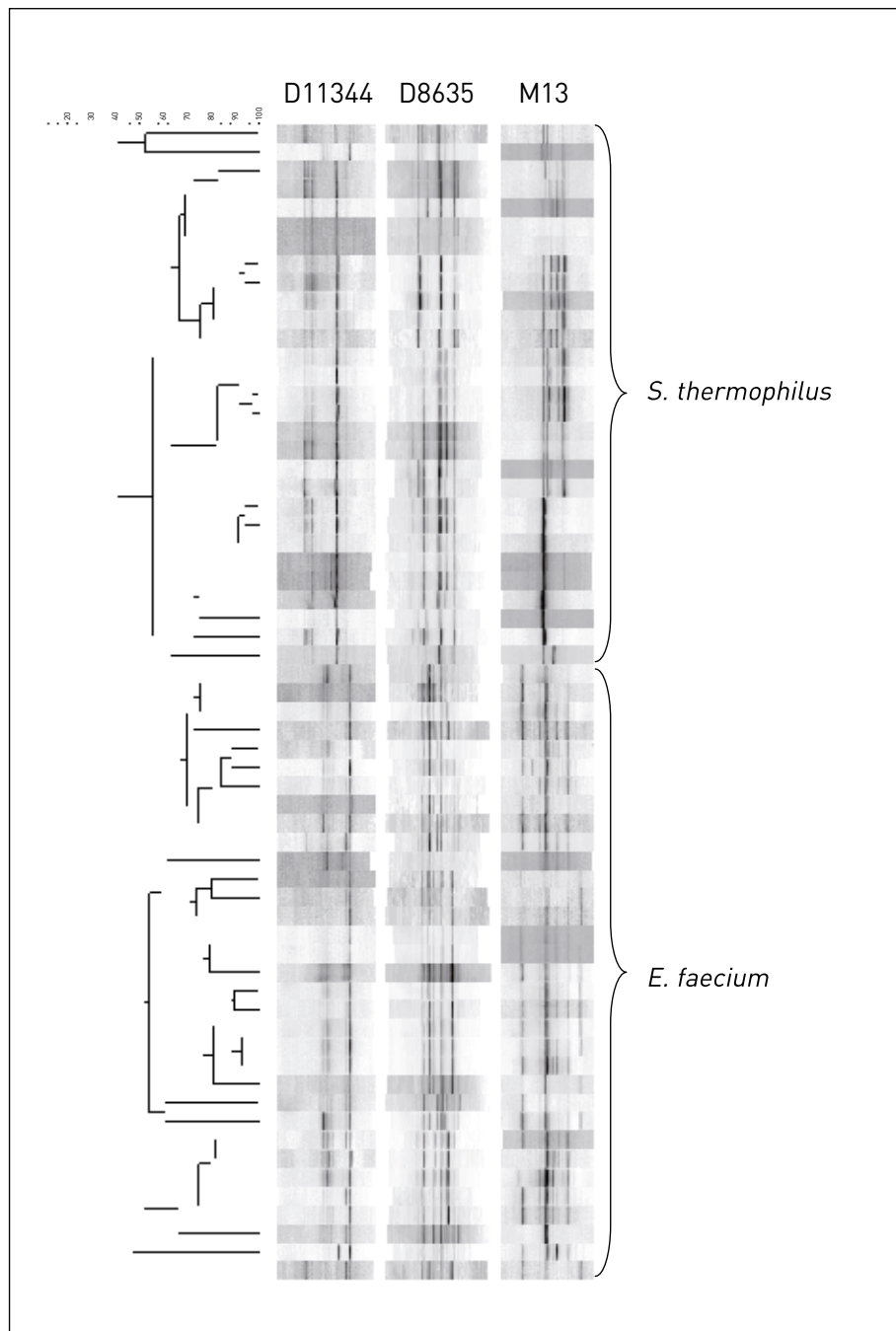


Figura 7 - Diversità genotipica dei ceppi di *E. faecium* e *S. thermophilus*, isolati dai campioni di cagliata, valutata con Cluster analysis dei profili RAPD-PCR

mostrando la presenza di una complessa biodiversità confermata anche dai profili RAPD-PCR. In particolare, i 155 ceppi di forma coccica sono stati attribuiti a 14 diverse specie, mentre i 35 batteri lattici di forma bastoncellare sono risultati appartenere a 9 specie (tabella 10). Due ceppi, appartenenti al genere *Streptococcus*, no-

nostante sia stato eseguito il sequenziamento parziale del gene 16S rRNA, sono stati identificati solo a livello di genere. Le specie più rappresentate sono risultate *Enterococcus faecium* (72/190) e *Streptococcus thermophilus* (33/190). La predominanza del genere *Enterococcus*, presente in quattro diverse specie (*E. durans*,

E. faecalis, *E. faecium* ed *E. lactis*), è stata riportata anche in precedenti lavori riguardanti formaggi a latte crudo (Giraffa 2003; Brasca *et al.* 2006; Morandi *et al.* 2010; Morandi *et al.* 2011).

Analizzando i dati relativi alle temperature di crescita, è interessante notare come quasi la totalità dei ceppi è in grado di crescere a 45 °C, ad eccezione di alcuni isolati appartenenti alle specie *Leuconostoc lactis*, *Ln. mesenteroides*, *Lactobacillus parabuchneri* e *Lb. paracasei ssp. paracasei*. Per quanto concerne invece la crescita in presenza di NaCl, 135, ceppi, comprendenti gli enterococchi, i pediococchi, *Lactobacillus casei*, *Lb. paracasei ssp. paracasei*, *Lb. fermentum* e *Lb. parabuchneri* sono risultati in grado di moltiplicarsi anche alla più elevata concentrazione di sale testata (6,5%).

Confrontando la microflora delle diverse tipologie di campioni si può notare come *Lc. garvieae*, *Lc. lactis ssp. lactis*, *Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides*, *S. bovis*, *S. macedonicus*, *S. salivarius* e *Lb. parabuchneri* siano presenti solo nelle cagliate, mentre *E. durans*, *E. lactis*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*,

Lb. paracasei ssp. paracasei, *Lb. plantarum* e *Lb. reuteri* sono stati isolati solo nel formaggio.

Interessante notare, come nei campioni di formaggio sia stata riscontrata una nuova specie batterica denominata *Enterococcus lactis* (Morandi *et al.* 2011).

La specie predominante è risultata essere *E. faecium* per la quale la percentuale di isolamento è risultata elevata sia nella cagliata che nel formaggio (34% e 42% rispettivamente). Questi dati concordano pienamente con quanto già evidenziato in numerosi formaggi tradizionali europei in cui gli enterococchi naturalmente presenti rappresentano una parte importante della popolazione batterica della cagliata e, in alcuni casi, costituiscono il genere prevalente nel prodotto a fine stagionatura (Giraffa *et al.* 2003, Jokovic *et al.* 2008). La presenza consistente degli enterococchi si spiega con la loro adattabilità a condizioni ambientali che sono avverse ad altri gruppi batterici. Gli enterococchi sono infatti in grado di crescere in presenza di elevate concentrazioni di sale, in condizioni di elevata acidità e sono caratterizzati da una

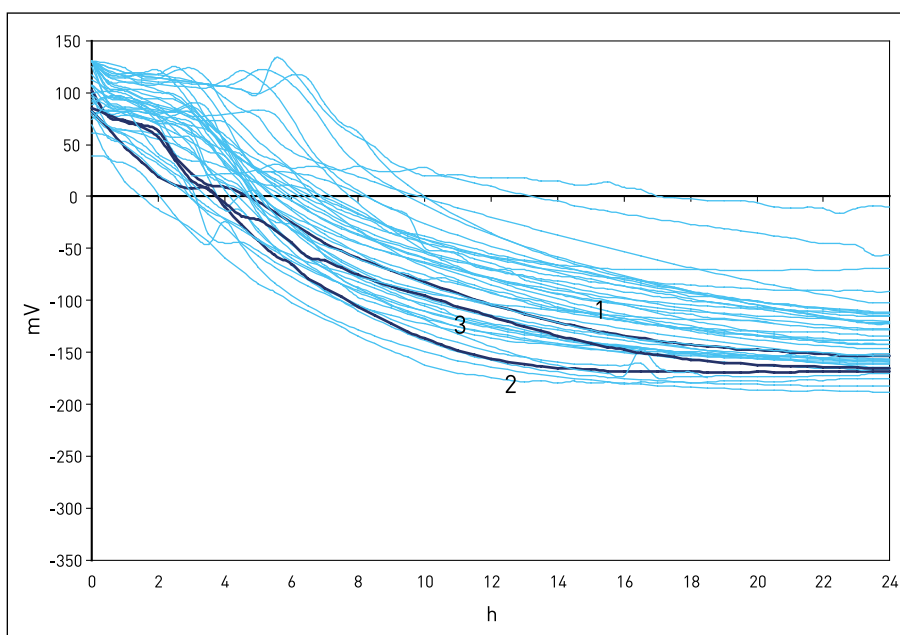


Figura 8 - Curve di riduzione dei 44 ceppi di *S. thermophilus* in latte

sufficiente termoresistenza che consente loro di sopravvivere alle temperature di cottura della cagliata applicata nella tecnologia del formaggio Bitto (48 - 52 °C) (Morandi *et al.* 2005). Seppure la presenza di questi batteri è spesso associata ad una contaminazione di origine fecale, occorre sottolineare che essi rappresentano anche parte della popolazione microbica delle superfici fogliari di molte essenze vegetali, e si ritrovano comunemente nell'ambiente. Non di meno va considerato che hanno

un ruolo di fondamentale importanza nella conduzione delle fermentazioni e nella definizione delle caratteristiche sensoriali dei formaggi a latte crudo (Cogan *et al.* 1997). La presenza di *S. thermophilus*, invece, risulta consistente nelle prime fasi della lavorazione (29/97 ceppi isolati da cagliata) ma si riduce notevolmente nel formaggio a 70 giorni di stagionatura (4/93). Questo andamento corrisponde a quanto atteso e già riportato per altri prodotti tradizionali con tecnologia simile, dove *S.*

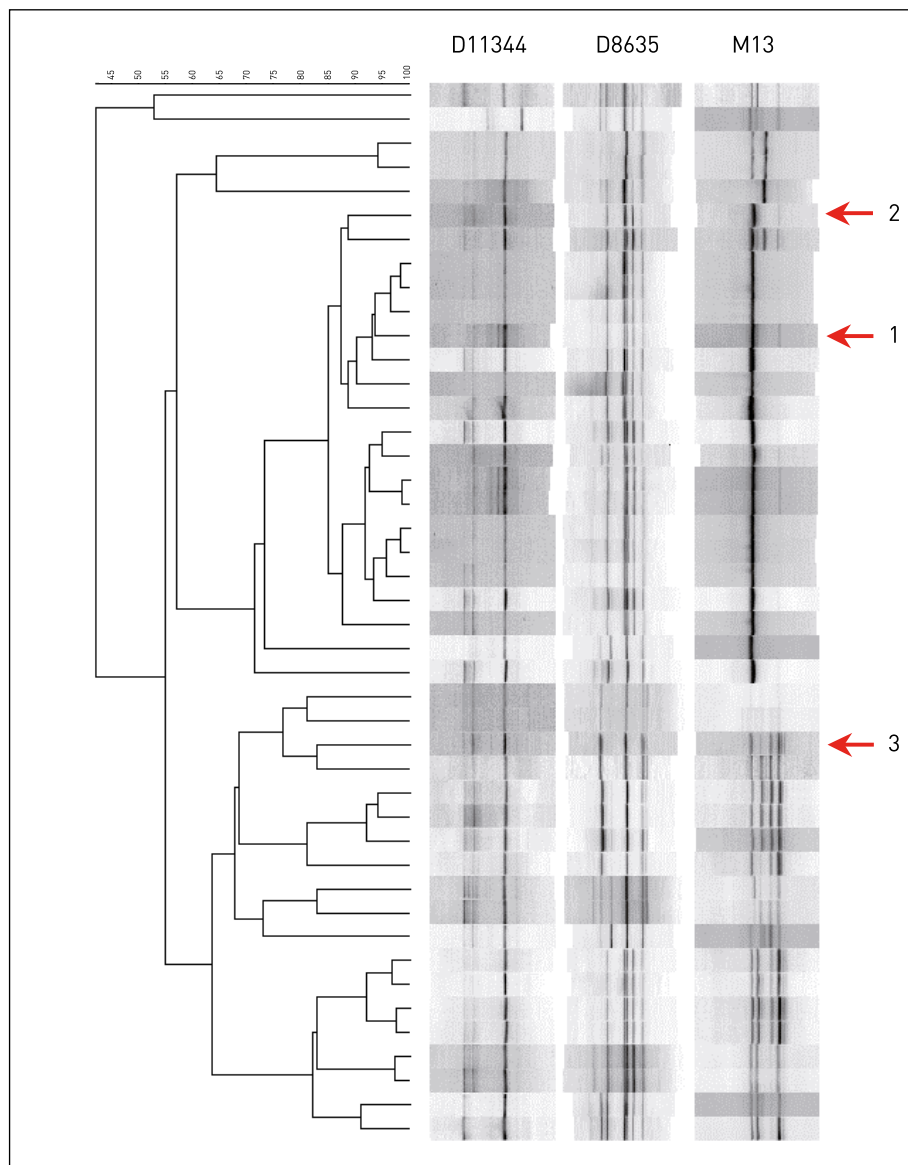


Figura 9 - Diversità genotipica valutata mediante Cluster Analysis dei profili RAPD-PCR dei ceppi di *S. thermophilus* isolati. In evidenza i tre ceppi utilizzati per la composizione delle due miscele di starter

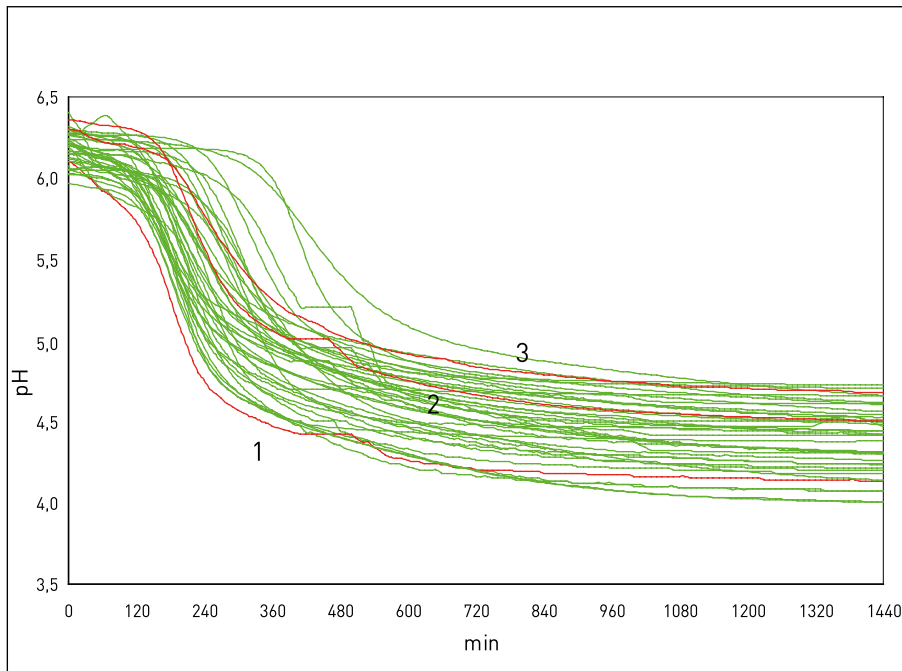


Figura 10 - Curve di acidificazione dei 44 ceppi di *S. thermophilus* in latte

thermophilus prevale nella cagliata dove svolge il compito di assicurare una corretta fermentazione convertendo il lattosio in acido lattico e decresce con il prolungarsi della stagionatura a favore di batteri lattici non starter che rappresentano invece la microflora determinante per l'esplicarsi dei complessi biochimismi che sottendono la maturazione.

Col prolungarsi della stagionatura si osserva inoltre un aumento dei pediococchi anch'essi primari attori della maturazione dei formaggi a lunga stagionatura. Tra le forme bastoncellari, nella cagliata è risultato prevalere *Lactobacillus fermentum* il cui contenuto decresce nel formaggio dove la specie maggiormente presente è *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* anch'essa caratteristica di questa tipologia di produzioni. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, è l'unico tra i bastoncini ad essere presente con numeri importanti nella cagliata e a permanere con contenuto rilevante durante la stagionatura.

L'analisi genetica eseguita mediante RAPD-PCR ha permesso di valutare varia-

bilità genetica fra le diverse specie ritrovate e la diversità all'interno della stessa specie (figura 7). L'analisi eseguita sui 190 isolati ha evidenziato un'ampia variabilità inter- e intra-specifica in cui i biotipi appartenenti alla stessa specie sono raggruppati nel medesimo cluster. Nelle specie quantitativamente più presenti nella cagliata, *E. faecium* e *S. thermophilus*, si è evidenziata un'ampia eterogeneità intra-specifica, con una similarità rispettivamente pari a 42,7% e 41% (figura 7). All'interno di questi gruppi sono evidenziabili diversi sub-clusters, non sempre correlabili con l'alpeggio corrispondente dal cui prodotto sono stati isolati, né con le caratteristiche fenotipiche e tecnologiche indagate in questo lavoro. Sei ceppi, tutti isolati da cagliata, hanno evidenziato di possedere attività inibente nei confronti dei microrganismi target ed in particolare un *E. faecium* inibisce lo sviluppo di *Listeria monocytogenes* mentre tre *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, un *Lb. fermentum* e uno *Streptococcus* spp. possiedono attività anti-*Staphylococcus aureus*.

Tabella 11 - Attività inibente dei tre ceppi di *S. thermophilus* impiegati per la formulazione delle miscele nei confronti di microrganismi patogeni e/o indesiderati

	<i>S. thermophilus</i>		
	1	2	3
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> DSM 2637T	+	+	-
<i>Cl. sporogenes</i> ATCC 3584T	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> SV6 (CNR-ISPA)	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 9525	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19095	-	-	-

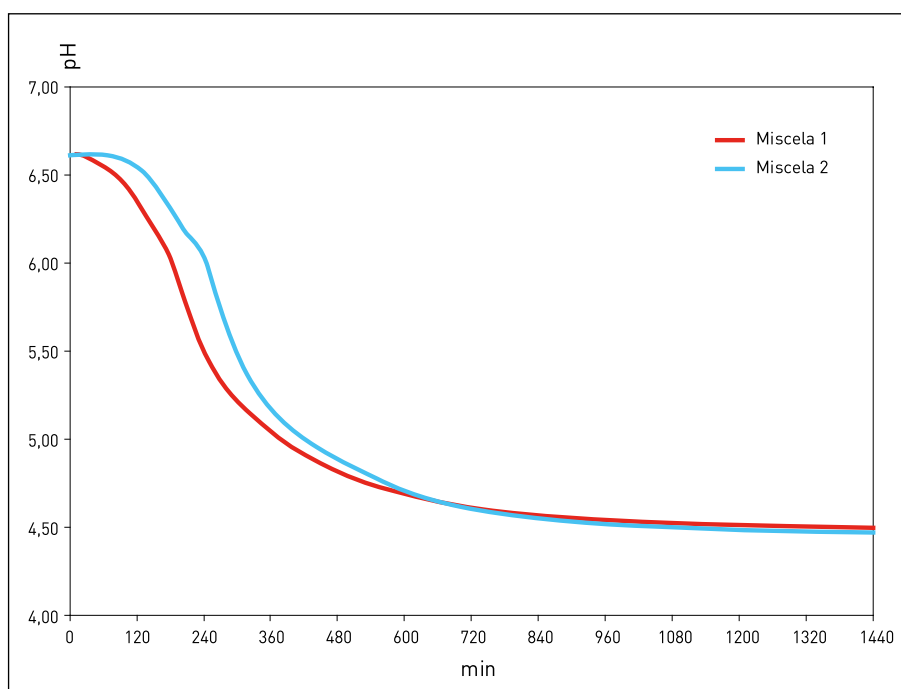


Figura 11 - Curve di acidificazione delle 2 miscele starter impiegate nelle caseificazioni sperimentali

FORMULAZIONE DELLE MISCELE STARTER

Come evidenziato dalle specie maggiormente ritrovate nella cagliata, la tecnologia di produzione del Bitto, con la cottura condotta tra i 48 e 52 °C, favorisce nella cagliata lo sviluppo di batteri lattici termofili (tabella 10) e in particolare *S. thermophilus* ed *E. faecium*. A partire dalla considerazione che *E. faecium* viene impiegato quale starter secondario e non costituisce quindi una specie d'elezione per il corretto

avvio della fermentazione si è focalizzata l'attenzione sui ceppi di *S. thermophilus* una delle specie maggiormente impiegate come starter in questa tipologia di prodotti. Tutti i 33 ceppi isolati appartenenti alla specie *S. thermophilus* sono in grado di svilupparsi a 45 °C, di moltiplicarsi anche in presenza del 2% di sale e, come atteso, non producono anidride carbonica a partire da glucosio.

Come già confermato in altri lavori (Morandi *et al.* 2010), i ceppi di *S. thermophi-*

lus non hanno dimostrato di avere una rilevabile attività proteolitica, carattere ricercato per innesti impiegati nella produzione di formaggi a pasta molle. La scelta dei biotipi per la formulazione delle due miscele da testare nelle successive prove sperimentali in alpeggio è stata quindi condotta considerando le attività di interesse tecnologico, prima tra tutte la capacità di ossidoriduzione che costituisce una caratteristica tecnologica importante, in quanto ceppi caratterizzati da una buona capacità riducente sono in grado di creare un sistema di anaerobiosi che ostacola crescita di microrganismi alterativi quali come *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp.. Tra gli 11 ceppi più riducenti, appartenenti alla classe II ($-2 \text{ mV} < E_h < -102 \text{ mV}$) si sono individuati tre *S. thermophilus* (figura 8) caratterizzati da un diverso profilo genetico (figura 9) e a diversa attività acidificante valutata nelle prime 6 ore di incuba-

zione: il ceppo 1 a 6 ore dall'inoculo risulta avere un elevato potere acidificante (classe III; $\Delta\text{pH} > 2,0$), il ceppo 2 mostra di avere un medio potere acidificante (classe II; $1,5 < \Delta\text{pH} < 2,0$) ed il ceppo 3 risulta essere invece più lento nel ridurre il pH (classe I; $\Delta\text{pH} < 1,5$) (figura 10).

I tre *S. thermophilus* selezionati sono risultati suscettibili a tutti i 14 antibiotici testati ed i ceppi 1 e 2 hanno mostrato attività inibente nei confronti di *Cl. tyrobutyricum* specie responsabile dei fenomeni di gonfiore tardivo (tabella 11). Ciascuna delle due miscele, la cui curva di acidificazione è riportata in figura 11, è stata quindi formulata affinché contenesse due ceppi con diversa capacità acidificante, un discreto potenziale di ossidoriduzione e almeno uno dei due avente attività anti-*Cl. tyrobutyricum*. In particolare la miscela M1 conteneva *S. thermophilus* 1 e 2 mentre la miscela M2 è composta dai ceppi 2 e 3.



CASEIFICAZIONI SPERIMENTALI CON LE MISCELE DI FERMENTI AUTOCTONI

Le due miscele sono quindi state impiegate in caseificazioni sperimentali presso tre alpeggi (CC, PM e AL) e con ciascuna sono state eseguite due lavorazioni in giorni diversi. Su tutte le forme sperimentali sono state condotte analisi microbiologiche e chimiche al fine di effettuare un confronto tra i prodotti ottenuti senza l'impiego di innesto e quelli ottenuti utilizzando i due innesti di microrganismi autoctoni.

ANALISI MICROBIOLOGICHE

Su tutti i campioni di cagliata e di formaggio a 70 giorni di stagionatura, si è pertanto determinato il contenuto di batteri lattici differenziando cocchi e bastoncini mesofili e termofili.

Dall'analisi delle cagliate emerge una significativa differenza fra le caseificazioni sperimentali e quelle di controllo; in particolare il contenuto medio di batteri lattici,

è superiore di circa un logaritmo nei campioni ottenuti con le miscele 1 e 2 rispetto al controllo (figura 12). Il contenuto di cocchi termofili, valutato in M17 a 45°C, risulta predominante in tutte le cagliate sperimentali a dimostrazione del buon sviluppo dei microrganismi apportati con l'innesto. L'analisi RAPD-PCR eseguita sui ceppi isolati dalle cagliate relative alle miscele 1 e 2 ha consentito di evidenziare la presenza dei biotipi inoculati quali prevalenti (figura 13).

Dai risultati delle analisi microbiologiche relative ai formaggi si evidenzia come gli starter agiscano prevalentemente durante le prime fasi della lavorazione, i cocchi termofili che prevalevano nella cagliata, lasciano il posto nel formaggio ai bastoncini mesofili, microflora tipica dei prodotti a latte crudo. L'importante differenza tra le forme sperimentali e quelle di controllo

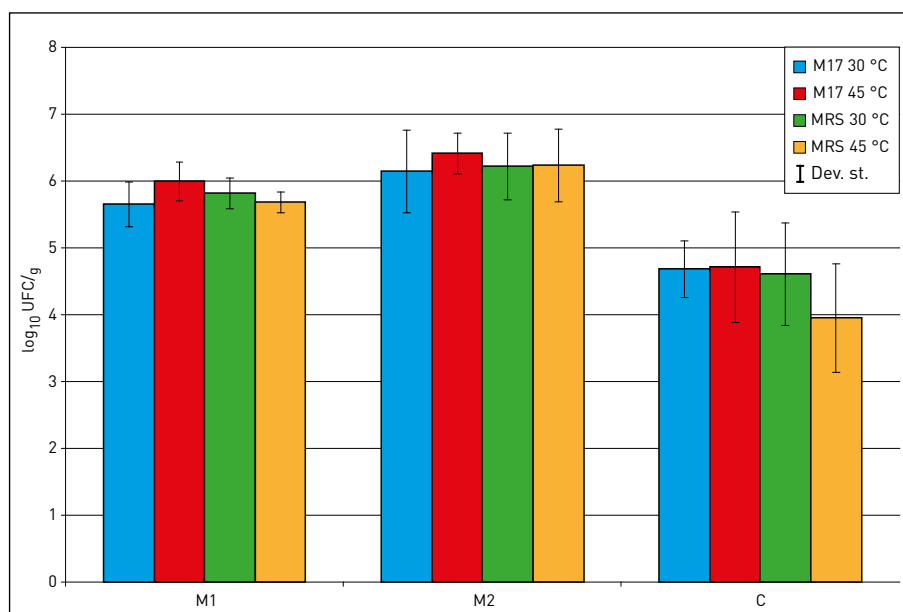


Figura 12 - Contenuto di batteri lattici nelle cagliate delle caseificazioni sperimentali M1 e M2 = formaggi da caseificazioni con starter; C = formaggi da caseificazioni controllo.

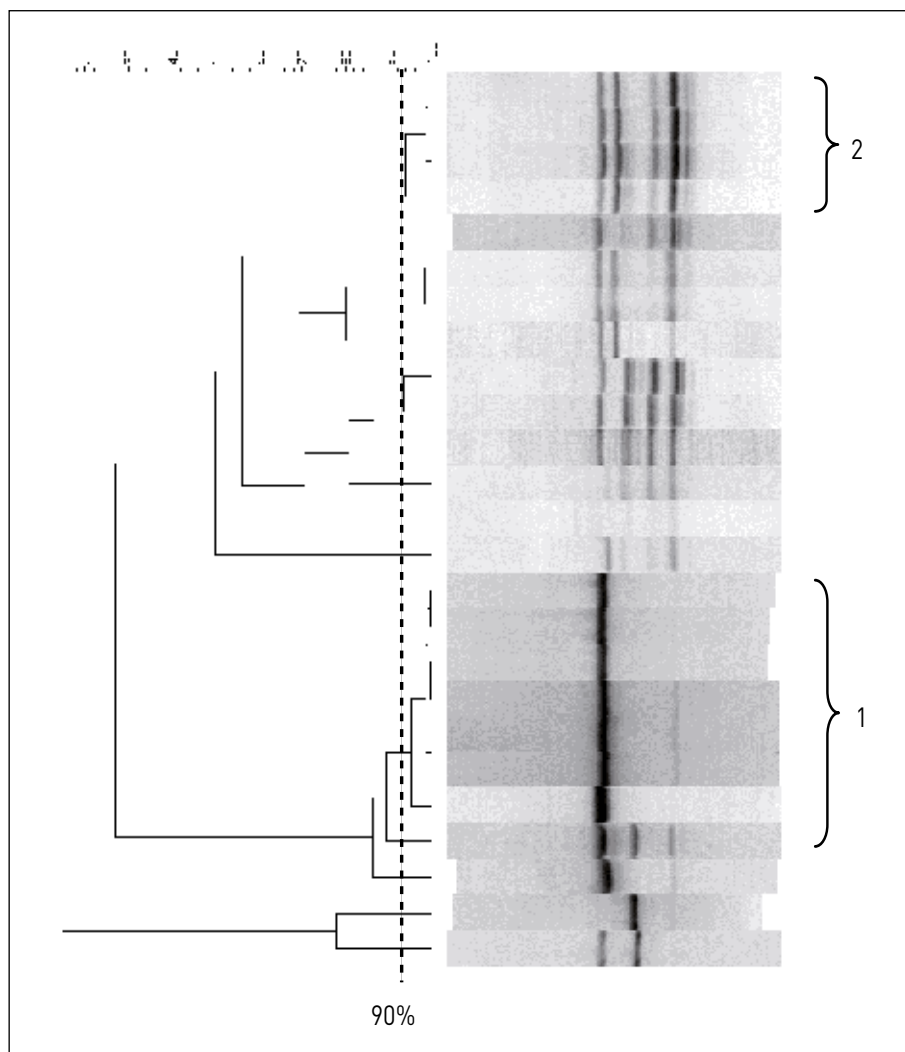


Figura 13 - Cluster analysis dei profili RAPD-PCR di *S. thermophilus* isolati dalle cagliate ottenute con la Miscela 1 costituita dai ceppi 1 e 2

lo evidenziata nella cagliata, non è più riscontrabile nel formaggio. Le forme relative alla miscela 1 sono caratterizzate da un contenuto di tutte le forme di batteri lattici lievemente inferiore a quello rilevato con la miscela 2 e nelle forme controllo (figura 14).

COMPOSIZIONE CENTESIMALE

I formaggi Bitto della sperimentazione sono stati prodotti presso tre alpeggi (CC, PM e AL) senza impiego di innesto (indicati solo con la sigla dell'alpeggio) e con impiego di due miscele di microrganismi

autoctoni (M1 e M2). Tutte le lavorazioni sono state condotte in doppio. In tabella 12 è riportata la composizione chimica centesimale di tutti i formaggi prodotti.

Complessivamente la composizione centesimale dei formaggi rientrava per ciascun parametro nella variabilità riscontrata per il formaggio Bitto. Tuttavia si possono fare alcune considerazioni relativamente ai risultati ottenuti, anche in relazione ai punteggi assegnati dalla giuria.

I formaggi prodotti senza impiego di starter in tutte e tre le aziende avevano un contenuto tendenzialmente elevato in umidità

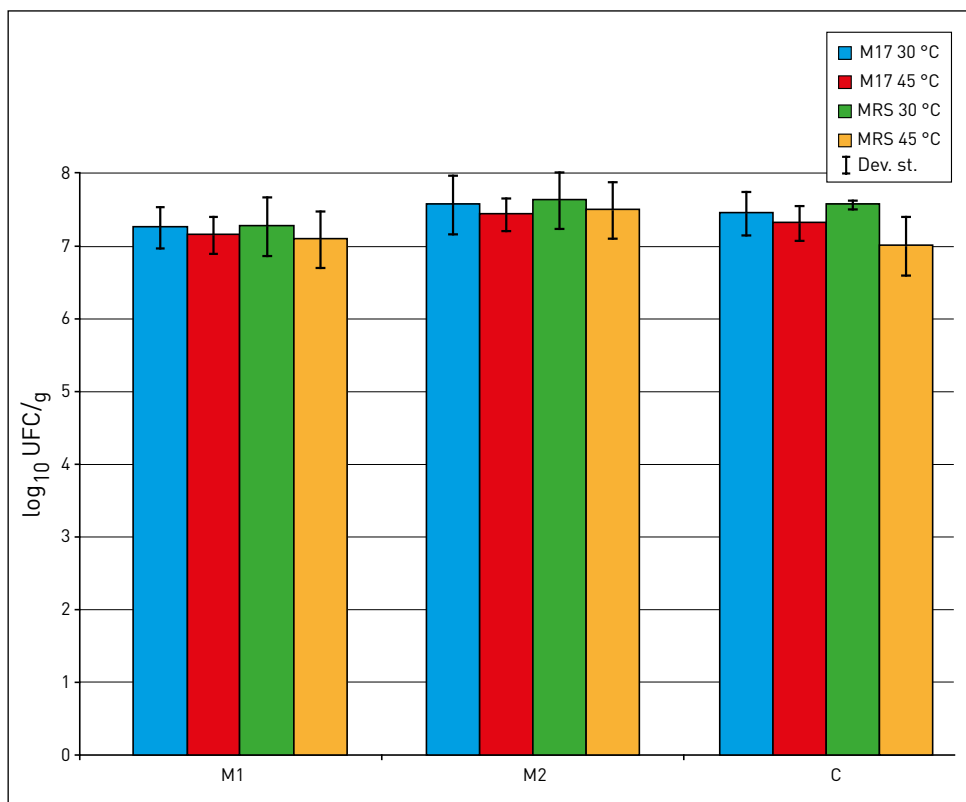


Figura 14 - Contenuto di batteri lattici nei formaggi delle caseificazioni sperimentali

Tabella 12 - Composizione chimica percentuale dei formaggi della sperimentazione

	Umidità (g/100 g)	Grasso (g/100 g)	Proteine tot. (g/100 g)	Ceneri (g/100 g)	NCN (%)	NPN (%)
CC	38,99	32,5	24,62	3,67	0,82	0,41
CC	38,85	32,0	25,08	3,49	0,53	0,20
PM	37,26	33,8	24,36	3,70	0,87	0,36
PM	38,14	34,3	23,51	3,93	0,86	0,44
AL	37,14	34,3	24,01	3,68	0,75	0,35
AL	37,49	35,6	22,77	3,50	0,78	0,41
CC-M1	34,92	36,1	24,91	3,51	0,64	0,36
CC-M1	33,65	36,9	25,46	3,40	0,67	0,38
CC-M2	34,28	35,9	25,96	3,52	0,62	0,33
CC-M2	35,55	34,8	25,50	3,30	0,67	0,37
PM-M1	33,17	35,0	26,76	3,94	0,94	0,49
PM-M1	32,61	36,5	27,04	3,68	0,96	0,51
PM-M2	33,06	36,6	25,98	3,53	0,94	0,55
PM-M2	34,77	34,4	26,49	3,96	0,91	0,42
AL-M1	34,86	35,2	24,27	5,39	0,71	0,33
AL-M1	33,85	36,9	24,65	3,58	0,76	0,38
AL-M2	34,45	36,2	24,83	3,73	0,66	0,38
AL-M2	35,42	36,0	23,19	3,82	0,76	0,38

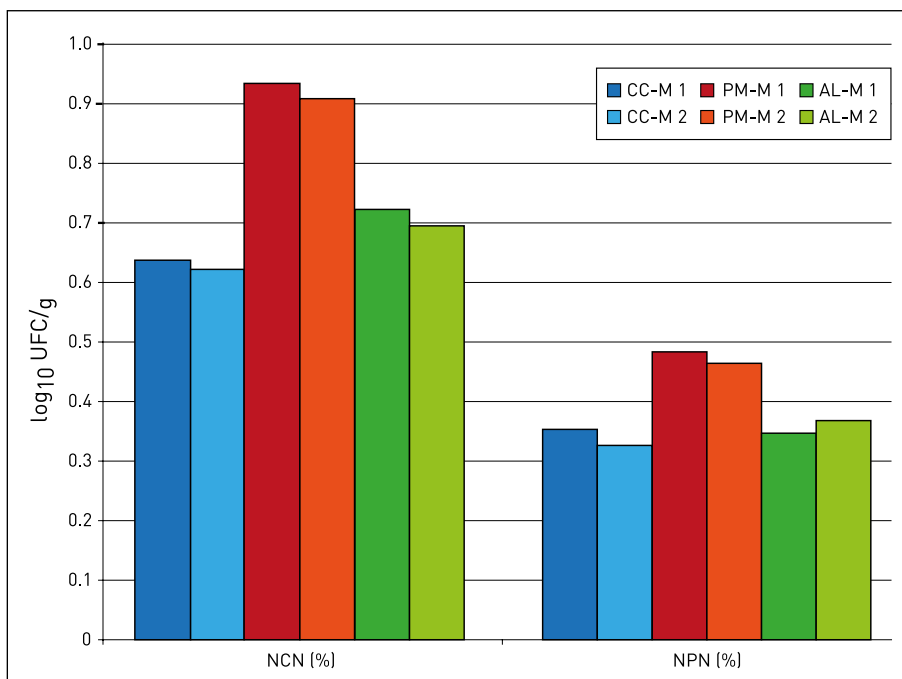


Figura 15 - Media dei valori delle % di NCN e NPN dei formaggi prodotti con le miscele starter

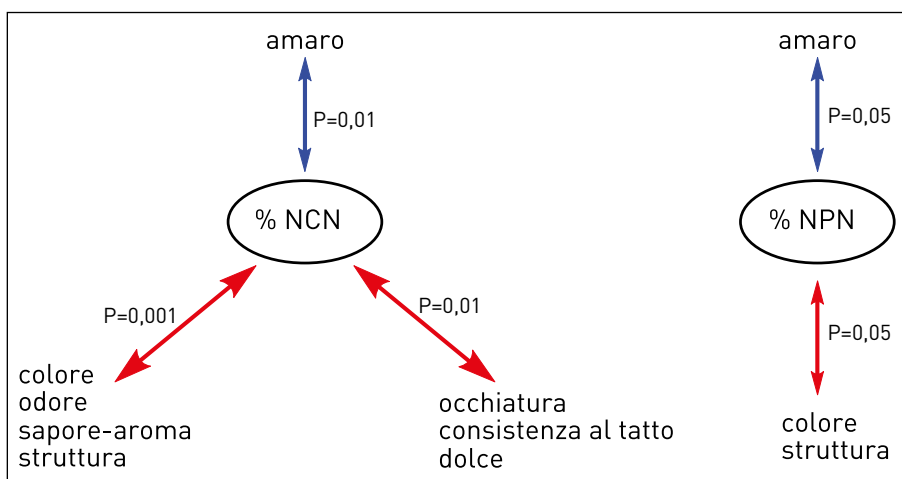


Figura 16 - Parametri del giudizio sensoriale correlati alle frazioni %NCN e %NPN. Linea blu = correlazione positiva, linea rossa = correlazione negativa

e ciò è conseguenza dei problemi di spurgo del siero evidenziatisi nel corso della caseificazione. Il giudizio sensoriale formulato dal panel di assaggiatori ha messo in evidenza la presenza di difetti e solo metà dei formaggi ottenuti senza innesto sono stati ritenuti sufficienti. Inoltre, il parametro gustativo “amaro” è risultato, per questi campioni, significativamente correlato con i valori percentuali delle frazioni NCN

ed NPN. Per ciò che riguarda i formaggi ottenuti con l’impiego delle due miscele di microrganismi autoctoni, mentre non si sono evidenziate differenze compositive ascrivibili all’impiego di una o dell’altra miscela starter, si sono osservate composizioni diverse, soprattutto relativamente alle frazioni azotate, a seconda dell’azienda produttrice. In particolare, dei prodotti dell’azienda PM, tre su quattro hanno ri-

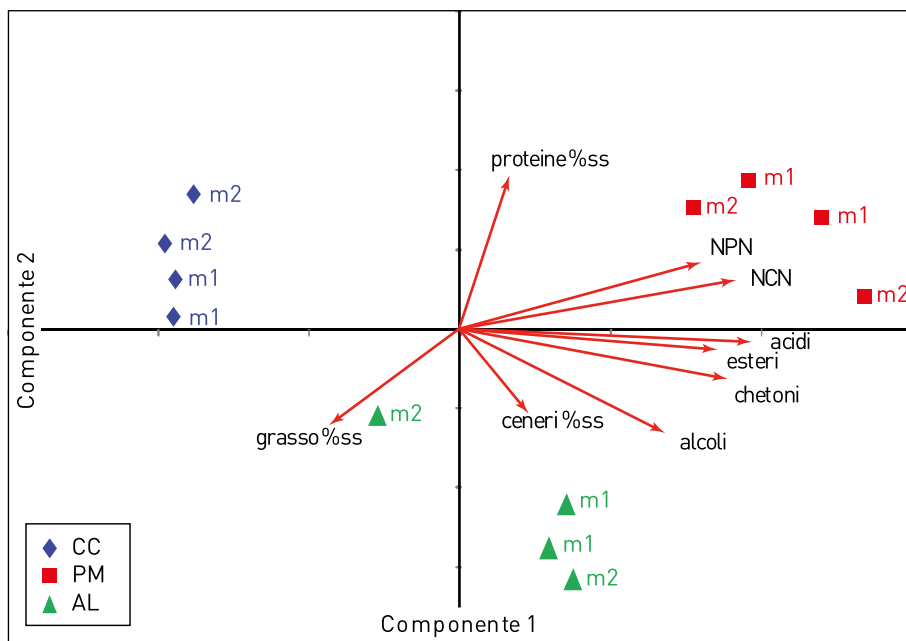


Figura 17 - Biplot dei 12 formaggi prodotti con le miscele starter e delle 9 variabili (varianza totale spiegata 79,2%); m1=miscela starter 1; m2=miscela starter 2

cevuto giudizi insufficienti e tutti avevano mostrato valori elevati di % NCN, tutti superiori a 0.88%, che era risultato il valore massimo ritrovato nei Bitto in concorso aventi punteggio sufficiente (Figura 15).

Molto probabilmente anche in questi formaggi si sono sviluppati processi proteolitici che hanno determinato la formazione di peptidi responsabili della comparsa di difetti, che si sono manifestati come problemi di struttura e presenza dei sapori acido e amaro più marcati.

I dati di composizione centesimale, ed in particolare le frazioni dell'azoto non caseinico e proteico, hanno mostrato interessanti correlazioni con i giudizi sensoriali (Figura 16).

In particolare è stata individuata una correlazione inversa con il punteggio assegnato alla struttura e sapore-aroma, e diretta con il punteggio dell'amaro. In altre parole, alti valori di %NCN sono associati a bassi punteggi delle caratteristiche della struttura e del sapore-aroma, e ad elevato punteggio della nota di amaro. Anche la frazione dell'azoto non proteico (%NPN) ha

mostrato, sebbene con significatività inferiore, correlazione inversa con la struttura e diretta con l'amaro.

Queste osservazioni confermano come, anche per questi campioni, alcuni difetti possano essere ricondotti a anomali fenomeni proteolitici, come già ipotizzato dalla valutazione dei dati ottenuti dai 45 formaggi della mostra.

COMPOSIZIONE DELLA FRAZIONE VOLATILE

La composizione della frazione volatile dei formaggi prodotti con le miscele rientra nel range di variabilità della composizione osservato con la campionatura dei Bitto della mostra.

Anche per questi campioni sembra esserci una correlazione tra l'abbondanza della frazione volatile e il punteggio totale della giuria. I formaggi dell'azienda CC, che avevano ottenuto i punteggi più elevati (pari o superiori a 70/100), sono caratterizzati da un profilo volatile più equilibrato e meno abbondante. Situazione opposta per i campioni dell'azienda PM, che sono risultati

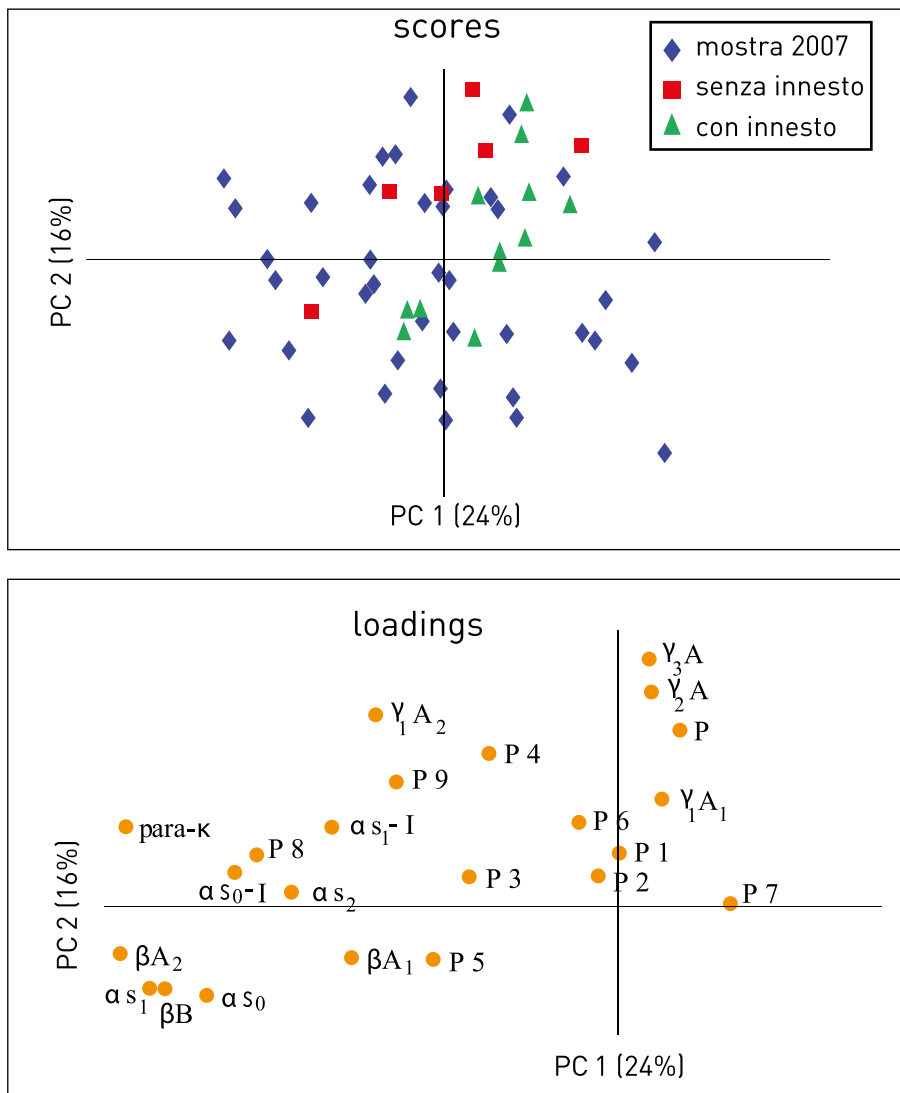


Figura 18 - Score e loading plot ottenuti dall'elaborazione dei valori di aree normalizzate dei picchi dei tracciati elettroforetici di tutti i campioni analizzati. α_{s_2} , α_{s_1} , α_{s_0} , β_B , β_{A_1} , β_{A_2} : frazioni caseiniche integre; para-k, γ_2A , γ_1A_1 , γ_1A_2 , γ_3A , α_{s_1-I} : principali degradazioni proteiche; variabili indicate con P: peptidi la cui origine non è stato possibile identificare con precisione.

essere molto ricchi in molecole volatili, soprattutto della classe di acidi, esteri e chetoni, ma che all'assaggio della giuria avevano ricevuto giudizi negativi. I prodotti dell'azienda AL, che aveva ottenuto punteggi sufficienti, intermedi tra gli altri due produttori, si posizionano anche per il quantitativo di molecole volatili in posizione intermedia.

Valutando l'effetto della composizione chimica di base e della frazione volatile mediante analisi statistica multivariata si può osservare come i Bitto ottenuti nell'am-

bito della sperimentazione si distinguono in base al produttore, mentre non si evidenziano raggruppamenti in base alla miscela di microrganismi usata come starter (Figura 17). Dalle considerazioni effettuate sulla base della composizione centesimale e della frazione volatile si può concludere come l'impiego delle miscele non abbia portato a modificare la composizione del formaggio, mentre rimanga importante l'effetto dell'insieme articolato e complesso di fattori che caratterizza ciascuna realtà produttiva.

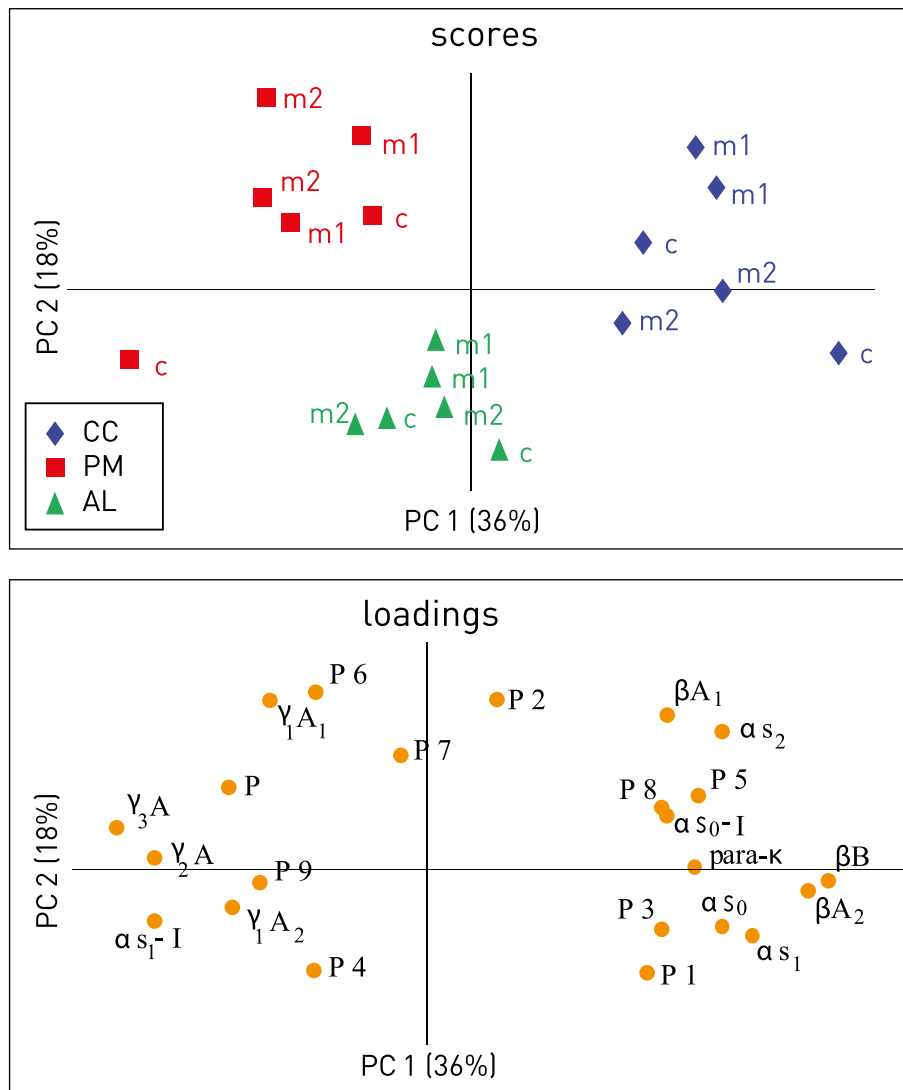


Figura 19 - Scores e loading plot ottenuti dall'elaborazione dei valori di aree normalizzate dei picchi dei tracciati elettroforetici dei campioni relativi alla sperimentazione; c: campioni controllo; m1, m2: campioni prodotti con le due miscele starter. αs_2 , αs_1 , αs_0 , βB , βA_1 , βA_2 : frazioni caseiniche integre; para-k, γ_2A , γ_1A_1 , γ_1A_2 , γ_3A , αs_1-I : principali degradazioni proteiche; variabili indicate con P: peptidi la cui origine non è stato possibile identificare con precisione.

PROFILO PROTEICO

E' stata valutata la presenza di differenze significative tra i profili proteici dei formaggi della sperimentazione rispetto alla campionatura di riferimento (45 Bitto della Mostra). I dati ottenuti dai profili elettroforetici (i valori delle aree normalizzate, espressi come rapporto tra l'area del picco ed il relativo tempo di migrazione) sono stati sottoposti ad Analisi delle Componenti Principali (Figura 18).

Ai fini della elaborazione statistica, ciascun elettroferogramma rappresenta un campione, mentre ciascun picco del tracciato è una variabile: sono stati considerati i picchi relativi alle frazioni caseiniche integre, quelli relativi alle degradazioni principali e alcuni picchi, identificati con la lettera P seguita da un numero progressivo, che non è stato possibile identificare con precisione ma che sono risultati interessanti nella caratterizzazione dei diversi campioni per

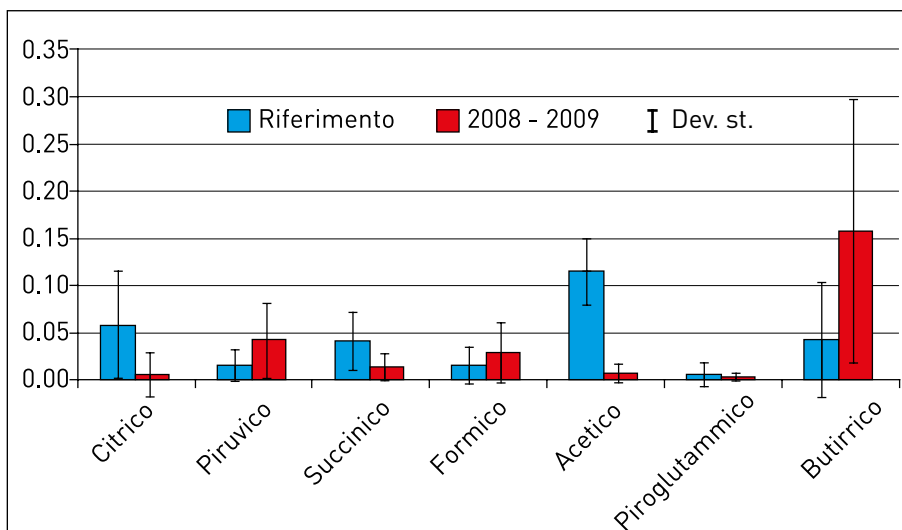


Figura 20

Acidi organici presenti in quantità minore: confronto tra il contenuto in campioni Bitto di riferimento e nei formaggi della sperimentazione (2008-2009)

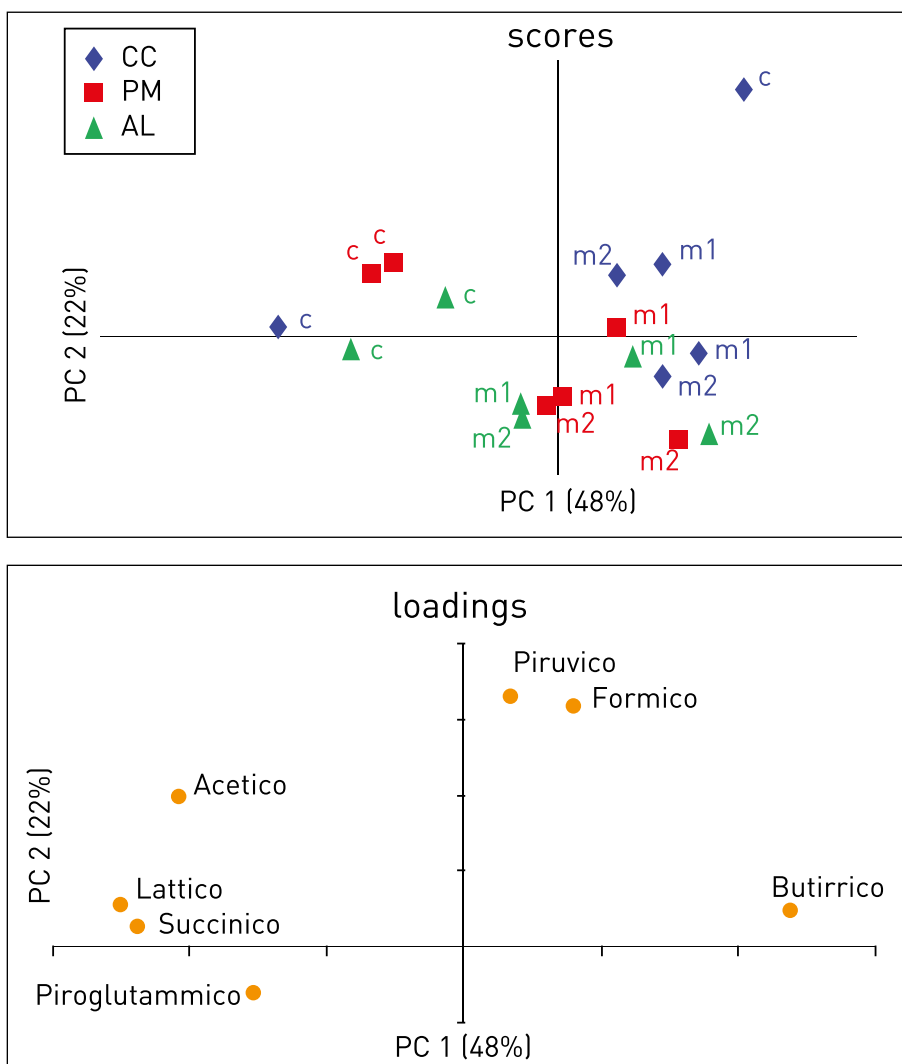


Figura 21 - Scores e loading plot dei formaggi della sperimentazione e degli acidi organici; c: formaggi ottenuti senza innesto; m1, m2: formaggi prodotti con le due miscele starter

la loro variabilità sia in termini di presenza/assenza, sia in termini di variazione di concentrazione.

I campioni della sperimentazione, sia per il 2008 che per il 2009, non si differenziano, per composizione delle frazioni proteiche, dai Bitto analizzati precedentemente, rientrando nella variabilità della produzione di tale formaggio. Osservando, invece, nello specifico i campioni che hanno partecipato alla sperimentazione, la PCA su campioni controllo (C) e quelli prodotti con le miscele starter (m1 e m2) ha evidenziato un raggruppamento dei campioni in base al produttore: sulla separazione hanno influito alcuni peptidi che derivano probabilmente dalla microflora non starter che si è naturalmente selezionata in ciascun ambito produttivo.

E' possibile osservare come la specificità di ciascun produttore sia mantenuta anche in seguito all'utilizzo di miscele di starter (Figura 19).

COMPOSIZIONE IN ACIDI ORGANICI

La composizione in acidi organici dei formaggi della sperimentazione, caratterizzata da una importante variabilità, rientra nel range osservato nei Bitto della Mostra (Figura 20). Dall'analisi delle componenti principali dei dati degli acidi organici dei campioni della sperimentazione si osserva una separazione dei formaggi ottenuti senza innesto rispetto a quelli prodotti con le due miscele starter (Figura 21): una delle variabili maggiormente responsabili di questa classificazione sembra essere il contenuto in acido lattico. E' da sottolineare che i campioni prodotti senza innesto hanno presentato problemi di spurgo durante la caseificazione: avendo trattenuto, quindi, una maggiore quantità di siero era presente anche una più elevata quantità di lattosio, successivamente metabolizzato ad acido lattico. Ciò spiega i valori più elevati di questo composto nei formaggi prodotti senza starter selezionato.



PASCOLO E QUALITÀ DEL FORMAGGIO

INTRODUZIONE

La qualità del formaggio dipende dalla combinazioni di moltissimi fattori distribuiti lungo tutta la filiera di produzione, dall'allevamento del bestiame fino alla stagionatura. Nei prodotti di malga, come il Bitto, ottenuti a partire da latte crudo, le possibilità che il casaro ha di controllare e standardizzare i vari passaggi del processo produttivo sono limitate, ma ciò, se da un lato rende più incerti i risultati, dall'altro concorre ad innalzare la tipicità del formaggio, arricchendola anche di quella variabilità che i consumatori non massificati e più consapevoli apprezzano e desiderano. La tipicità è espressa massimamente quando la trasformazione avviene in loco secondo consuetudini tradizionali e il latte deriva da animali di razze autoctone alimentati con foraggi locali. Il contesto malghivo soddisfa idealmente tutte queste condizioni: le pratiche casearie hanno storie millenarie, vi sono razze animali selezionate in ambienti alpini e la base alimentare è rappresentata dai pascoli.

Nel presente lavoro si è inteso indagare la relazione tra il pascolo e la qualità chimica e sensoriale del Bitto. Il legame pascolo-formaggio è molto complesso, date le numerosissime variabili coinvolte e la difficoltà a separarne gli effetti.

Si tratta per altro di un argomento che negli ultimi decenni ha ricevuto non poche attenzioni da parte degli studiosi, sia nel tentativo di caratterizzare i prodotti di malga così da poterli distinguere e tutelare sul mercato, sia per fare luce attorno al problema, molto dibattuto, dell'uso di alimenti concentrati ad integrazione del pascolo. Sono state effettivamente rilevate

differenze nei profili chimici tra i formaggi di malga e di fondovalle (Dumont e Adda, 1978; Bosset *et al.*, 1994; Mariaca *et al.*, 1997), riconducibili principalmente al trasferimento diretto o mediato dall'attività digestiva e metabolica di svariati composti contenuti nell'erba, come sono state dimostrate, sempre a livello chimico, interferenze dell'integrazione alimentare (Bovolenta *et al.*, 2002).

Anche a livello sensoriale si sono evidenziate differenze tra malga e fondovalle (Bosset *et al.*, 1999; Bugaud *et al.*, 2002), mentre l'uso dei concentrati ha dato esiti meno univoci (Framondino *et al.*, 2005; Lodi *et al.*, 2005; Haldemann, 2010).

L'indagine effettuata rientrava nel tema della caratterizzazione del prodotto e mirava, in particolare, a verificare quanto la composizione floristica del pascolo potesse riflettersi sui profili chimici e la qualità percepita del Bitto, ciò nella prospettiva di comprendere meglio il ruolo del pascolo nella valorizzazione del *terroir*, ossia di quell'identità di luogo fondamentale per la tutela e la remuneratività del prodotto (Piano, 2010). Connessioni di questo tipo erano già state dimostrate in altri contesti e prodotti di malga (Martin e Coulon, 1995; Buchin *et al.*, 1999, Martin *et al.*, 2001; Bugaud *et al.*, 2002; Verdier-Metz *et al.*, 2002).

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato realizzato nella stagione 2008 in quattro malghe del territorio della provincia di Sondrio (Figura 22 e Tabella 13), selezionate in funzione della qualità sensoriale osservata alla mostra di Morbegno dell'anno 2007 (vedi lavoro valutazione panel).

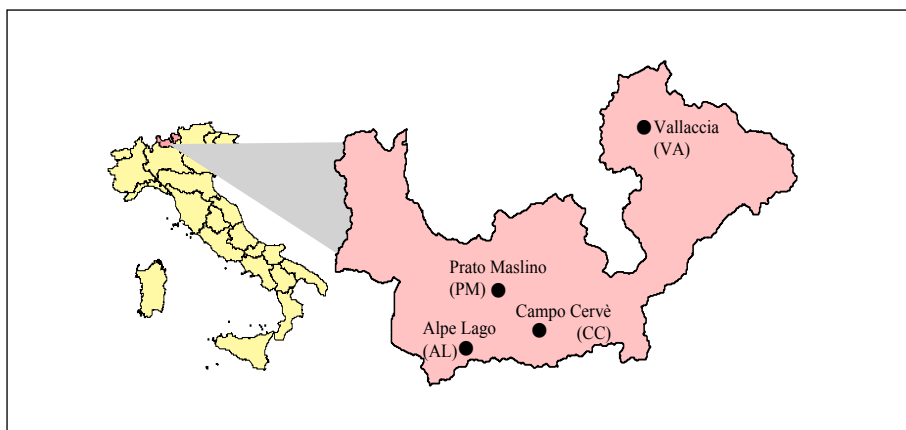


Figura 22 - Ubicazione delle malghe oggetto dello studio

Tabella 13 - Principali indicatori gestionali delle malghe

	Campo Cervè	Prato Maslino	Alpe Lago	Vallaccia
Razza bovina principale	Bruna/P.rossa	Frisona	Bruna/Gr. alpina	Bruna
Presenza bestiame caprino	no	no	si	no
Integrazione concentrati	si	si	no	si
Mungitura meccanica	si	si	no	si

Tabella 14 - Dati stagionali delle otto aree pascolive

	Campo Cervè		Prato Maslino		Alpe Lago		Vallaccia	
	CC1	CC2	PM1	PM2	AL1	AL2	VA1	VA2
Sigla area	CC1	CC2	PM1	PM2	AL1	AL2	VA1	VA2
Altitudine [m s.l.m.]	1807	2076	1582	1583	1848	1496	2133	2146
Inclinazione (%)	33	17	14	16	52	46	27	24
Esposizione prevalente	300	330	50	240	230	240	90/270	270

Le 52 forme in concorso vennero classificate individuando quattro aggruppamenti, entro i quali furono appunto estratte le quattro malghe campione, una per ogni aggruppamento, in modo da avere una buona rappresentazione della variabilità del prodotto.

In ogni malga vennero individuate due aree pascolive relativamente omogenee, utilizzate dal bestiame in diverse epoche della stagione alpestre (Tabella 14).

La dimensione delle aree era tale da permettere una permanenza delle mandrie di tre giorni, un tempo ritenuto sufficiente

per eliminare gli effetti sul latte delle assunzioni alimentari dei giorni precedenti. Appena prima dell'ingresso degli animali furono eseguite le rilevazioni sulla vegetazione, mentre quelle sul latte, sulle lavorazioni e sui formaggi al termine dei tre giorni di pascolamento.

Le indagini vegetazionali consistarono in rilievi fitosociologici con il metodo sigmatista della Scuola di Zurigo-Montpellier (Braun-Blanquet, 1928). Vennero inventariate le specie cormofite, stimandone il ricoprimento con percentuali a vista in aree di saggio di 10 m² e identificandole

secondo la nomenclatura della Flora d'Italia (Pignatti, 1982). In ogni area di pascolo furono eseguiti mediamente sei rilievi, referenziati per mezzo di altitudine, inclinazione ed esposizione e distribuiti con il criterio del campionamento stratificato, con gli strati a rappresentare zone floristicamente ed ecologicamente omogenee ad un'esplorazione visiva dell'area.

Dai rilievi si ricavarono, attraverso il procedimento delle medie ponderate sulle percentuali di ricoprimento delle specie, il valore foraggero secondo Klapp-Stählin (Werner e Paulissen, 1987) e gli indici ecologici di Landolt (1977), oltre a tre indici di biodiversità specifica (ricchezza floristica, indice di Shannon e indice di Equiripartizione).

Per ogni area di pascolo vennero poi calcolate le medie delle composizioni floristiche e dei vari indici, ponderando sulle superfici degli strati dei rilievi.

Le composizioni floristiche furono sottoposte a cluster analysis gerarchica agglomerativa, con il coefficiente di correlazione come misura di somiglianza e il legame medio di gruppo come algoritmo di fusione. La struttura di aggregazione fu utilizzata per verificare i gradienti floristici estratti per mezzo dell'analisi delle componenti principali, gradienti che sono serviti per lo studio del determinismo eco-

logico delle cenosi attraverso la procedura indiretta di Whittaker (1967) e per la ricerca dei legami tra il pascolo e la qualità del latte e del formaggio. Quest'ultima fu apprezzata a circa 75 giorni di maturazione, relativamente alla composizione di base (umidità, grasso, proteine totali, azoto non caseinico e non proteico), alle frazioni volatili e a quelle proteiche, secondo le procedure già descritte nel lavoro precedente. La valutazione sensoriale fu effettuata dal panel addestrato, secondo i criteri già ricordati.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il pascolo

Le proprietà ecologiche e pabulari delle aree pascolive sono illustrate nella tabella 15. I lineamenti floristici sono riassunti nello spazio di ordinamento definito dalle prime due componenti principali (Figura 23). I due assi rendicontano rispettivamente il 31% e il 28% della variabilità e, come si evince nel diagramma di detrito dallo scarto che le separa dalle successive componenti (Figura 24) e soprattutto dal confronto con il dendrogramma ottenuto alla cluster analysis (Fig. 25), sono in grado di rappresentare con fedeltà le relazioni di somiglianza/dissomiglianza tra le aree.

Tabella 15 - Indici ecologici di Landolt e indice foraggero

Sigla area	Campo Cervè		Prato Maslino		Alpe Lago		Vallaccia	
	CC1	CC2	PM1	PM2	AL1	AL2	VA1	VA2
Umidità	3,0	3,1	3,1	3,0	2,9	2,9	2,9	2,7
Luce	3,5	3,6	3,6	3,7	3,8	3,6	4,0	3,8
Temp.	2,0	2,1	2,2	2,1	1,9	2,3	1,7	1,8
Cont.	2,9	2,9	3,1	3,1	3,1	3,1	3,0	3,1
pH	2,7	2,0	2,8	2,8	2,5	2,6	2,5	2,5
Nutrienti	3,0	2,4	3,3	2,9	2,6	2,8	2,5	2,5
Humus	3,4	3,7	3,3	3,1	3,3	3,2	3,4	3,3
Granulometria	4,0	4,1	4,1	4,0	3,9	4,0	4,1	3,9
Indice foraggero	3,6	3,4	4,4	3,9	2,7	3,9	3,6	3,2

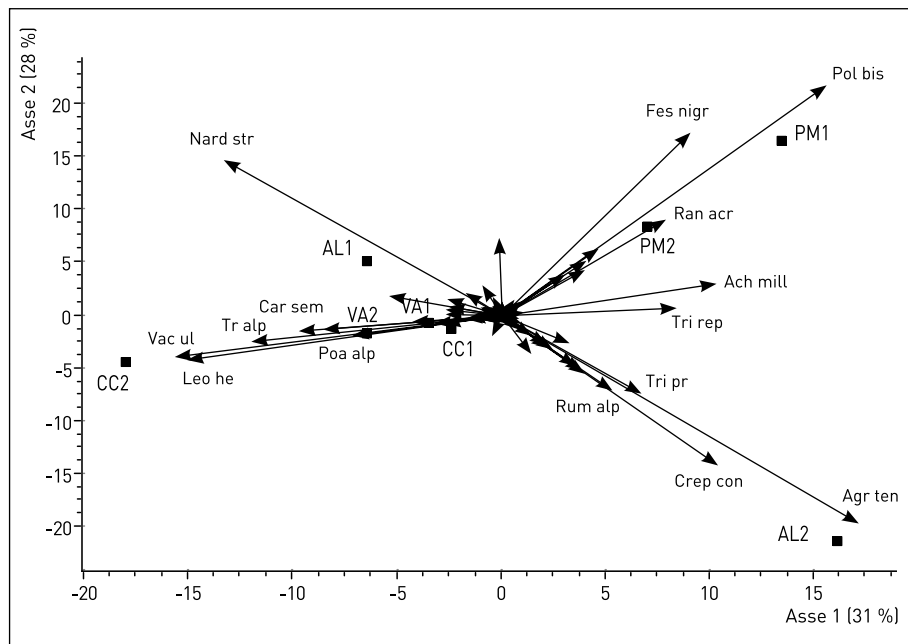


Figura 23 - Biplot di ordinamento delle aree lungo le prime due Componenti principali

AL2 è il distretto che maggiormente si discosta. Dislocato a quota relativamente bassa e su un pendio piuttosto pronunciato, ha come specie distintive soprattutto *Crepis conyzifolia*, *Agrostis tenuis*, *Trifolium pratense* ssp. nivale e *Rumex alpestris*. Anche CC2 è piuttosto singolare, per l'elevata copertura di *Vaccinium uliginosum* e secondariamente di *Leontodon helveticus*, *Nardus stricta* e *Trifolium alpinum*. Si tratta di un comprensorio posto attorno ai 2000 m di quota e di pendenza relativamente lieve.

Le altre aree si assomigliano di più e tendono a formare un raggruppamento abbastanza omogeneo. Molto simili sono, in particolare, PM1 e PM2, avendo come elementi dominanti soprattutto *Festuca nigrescens*, *Polygonum bistorta* e *Ranunculus acris*.

Entrambe hanno altimetria attorno ai 1600 m e pendenza non accentuata. Gli altri siti tendono ad avere lineamenti meno caratterizzati. Gli elementi di spicco sono essenzialmente *Luzula sylvatica*, *Poa alpina* e *Ranunculus montanus* in CC1, *Nardus*

stricta e *Potentilla erecta* in AL1, mentre in VA1 e VA2, i distretti più elevati, vi sono diverse specie distintive, ma con percentuali di ricoprimento sempre modeste.

L'analisi di gradiente indiretta (Tabella 16) individua tre indici ecologici correlati significativamente al primo asse, nessuno al secondo. Al primo asse si correla anche l'indice foraggero, mentre nessun legame sussiste con i tre indici di biodiversità. Le specie che nel diagramma di ordinamento ricadono nella parte di destra sembrano dunque associarsi a condizioni di maggiore fertilità chimica e minore acidità del suolo, favorendo la qualità del pascolo. Le specie di sinistra, viceversa, sembrano prediligere matrici ad accumulo organico e ridotta attività biochimica, penalizzando la pabularità dei cotici.

Gradienti floristici e caratteristiche chimiche del latte e del formaggio

Tra i due gradienti floristici e i composti chimici del latte e del formaggio emergono diversi legami significativi, specialmente per il secondo gradiente (Tabella 17).

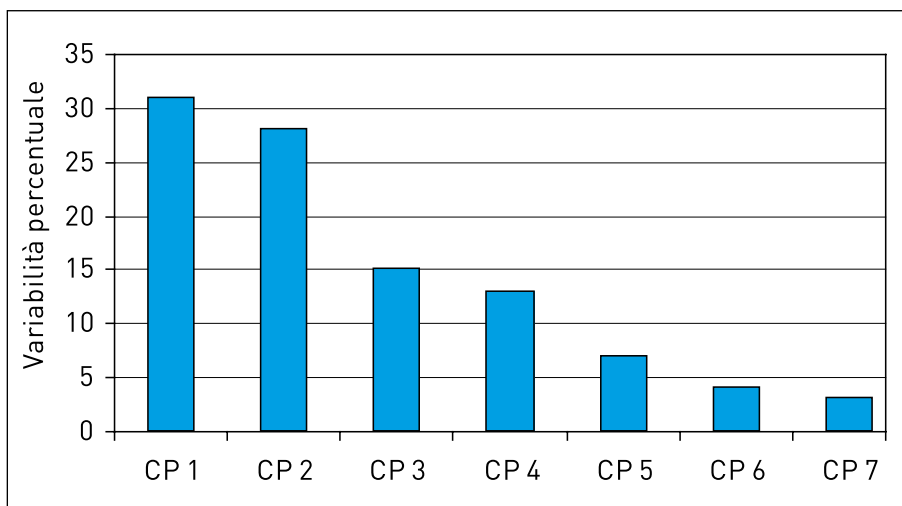


Figura 24

Diagramma di detrito delle Componenti principali

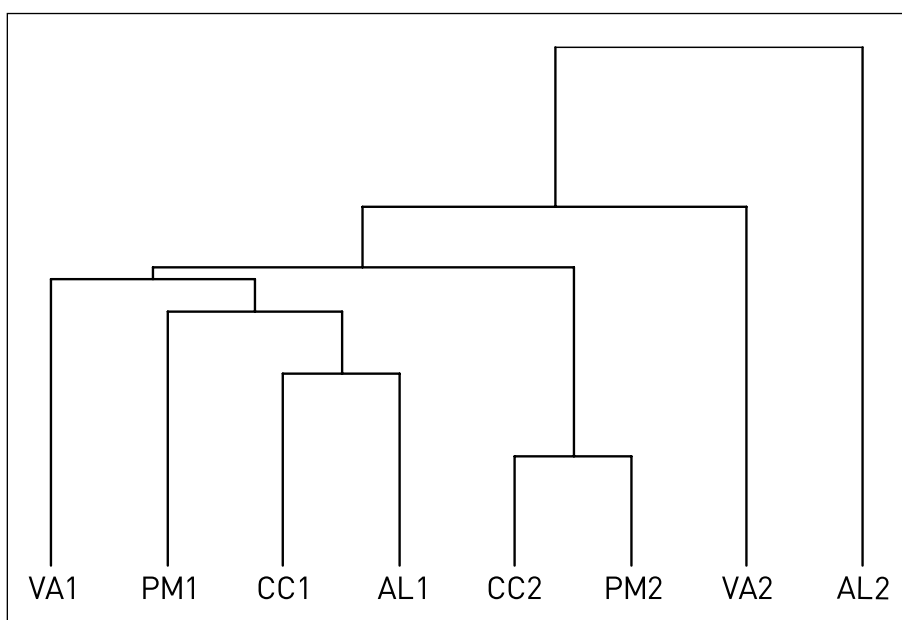


Figura 25 - Dendrogramma ottenuto alla cluster analysis sui dati floristici

Al primo si correla solo il tenore proteico del latte. Come il valore foraggero, esso tende ad incrementare con le specie situate a destra nello spazio di ordinamento e a diminuire con le specie posizionate a sinistra. Non pochi composti del formaggio esibiscono tuttavia valori del coefficiente molto vicini alla soglia critica ($|r|=0,71$ per $P=0,05$), come 1-butanolo tra le sostanze volatili ($r=0,68$ e $0,66$) e para-K caseina e αS_0 tra le frazioni proteiche ($r=-0,70$ e $-0,65$). Il secondo gradiente si pone

in relazione con i contenuti in ceneri, azoto non proteico, azoto non caseinico, acido propionico e due peptidi non identificati (P4 e P9).

Queste variabili sembrano accompagnarsi fondamentalmente ad una maggiore presenza di *Nardus stricta*, *Festuca nigrescens* e *Polygonum bistorta*, a scapito soprattutto di *Crepis conyzifolia*, *Agrostis tenuis*, *Trifolium pratense ssp. nivale* e *Rumex alpestris*. Altri composti sfiorano la significatività, in particolare 3-metil-1-

butanolo ($r=0,66$), 1-pentanol ($r=-0,65$), acido isovalerico ($r=0,68$) e β -pinene ($r=-0,65$) per la componente volatile, α 1 ($r=-0,67$), β B ($r=-0,69$) α 1-I ($r=-0,67$) per la componente proteica.

I composti del latte possono senz'altro essere influenzati dall'alimentazione, anche se molti altri fattori possono entrare in gioco. Tra le molecole volatili del formaggio, il terpene β -pinene deriva direttamente dall'erba verde (Viallon *et al.*, 2000), mentre le altre sono il frutto delle complesse reazioni biochimiche, molte delle quali di origine microbica, che hanno luogo nel formaggio durante la maturazione. In generale i formaggi prodotti nell'area AL hanno mostrato un contenuto più elevato

in terpeni (α -pinene, β -pinene, canfene, Δ 3-carene); in quest'area, però, le specie dicotiledoni, notoriamente ricche in terpeni (Scehovich, 1988 e 1991; Mariaca *et al.*, 1997; Cornu *et al.*, 2001), risultano meno abbondanti (copertura del 46,1% contro un minimo di 50,1% e un massimo di 61,4% negli altri siti).

L'apparente anomalia potrebbe trovare spiegazione in un maggior consumo di dicotiledoni da parte del bestiame causa l'abbondanza di *Nardus stricta* e altre graminoidi cattive foraggiere, scarsamente appetite o del tutto rifiutate (l'indice foraggero risulta in effetti qui il più basso in assoluto). Si potrebbe altresì pensare ad una fase fenologica delle specie al momento

Tabella 16 - Coefficienti di correlazione tra le prime due Componenti principali e gli indici ecologici di Landolt

	CP 1	CP 2
Umidità	-0,07	0,40
Luce	-0,23	0,17
Temperatura	0,59	-0,16
Continentalità	0,68	0,12
pH	0,81*	0,35
Nutrienti	0,74*	0,45
Humus	-0,73*	-0,13
Granulometria	-0,19	0,18

* Significativo per $P=0,05$

Tabella 17 - Coefficienti di correlazione significativi tra i gradienti floristici e i composti chimici del latte e del formaggio

	CP 1	CP 2
Proteine latte	0,81*	0,03
Ceneri	0,02	0,94***
NCN	0,31	0,76*
NPN	0,11	0,74*
Acido propionico	0,11	0,75*
Peptide P4	-0,13	0,89**
Peptide P9	0,26	0,76*

* Significativo per $P=0,05$

** Significativo per $P=0,01$

*** Significativo per $P=0,001$

del prelievo più propizia alla concentrazione in terpeni, come pure alla significativa presenza di taluni elementi, quali *Hypericum maculatum*, *Potentilla erecta* e *Thymus serpyllum* (coperture rispettivamente del 6,2%, 4,9% e 3,6%), del tutto assenti o molto scarse negli altri popolamenti, i quali potrebbero avere una dotazione terpenica particolarmente elevata (nessuna informazioni in merito è per altro disponibile).

Per quanto riguarda le frazioni proteiche di degradazione, esse, derivano dai processi di proteolisi a carico delle caseine che, in un formaggio a pasta cotta come il Bitto, avvengono essenzialmente ad opera della plasmina e delle proteasi microbiche, essendo gli enzimi del caglio in gran parte denaturati durante la caseificazione (Upadhyay *et al.*, 2004).

La proteolisi è funzione anzitutto del tempo di maturazione, come traspare dalle correlazioni tra l'età del formaggio e le frazioni dell'azoto non caseinico (NCN) e non proteico (NPN) (Tabella 18), ma anche l'alimentazione può condizionarla modificando sia il contenuto di plasmina, sia le attività dei microrganismi, queste ultime attraverso vari composti, in particolare i terpeni (Buchin *et al.*, 1999; Bugaud *et al.*, 2002). Al contrario è stata osservata una correlazione inversa con alcune frazioni caseiniche integre, quali α s1, β B, β A1

e β A2: al procedere della maturazione il contenuto di queste frazioni diminuisce, poiché vanno incontro a degradazione.

Dal momento che i gradienti floristici si correlano a numerosi composti e che questi possono interagire tra loro, diviene interessante il confronto con il quadro chimico complessivo ricavato all'analisi delle componenti principali.

L'ordinamento della matrice dei dati analitici (Figura 26) mostra assonanze e discordanze con quello floristico, attestando un indubbio effetto del pascolo, entro però un sistema di covariazione in cui altri fattori sembrano divenire dominanti, mascherando o relegando in subordine la componente pascoliva.

Gradienti floristici e caratteristiche sensoriali del formaggio

Diversamente dai composti chimici, i descrittori sensoriali del formaggio non sembrano riflettere per nulla la variabilità dei cotici. I coefficienti di correlazione con i due gradienti non raggiungono mai soglie di significato statistico, né per i punteggi di merito, né per le categorie del gusto. Essi rimangono tutti largamente al di sotto del valore critico.

Alle analisi sensoriali, invece, sono percepiti scarti significativi tra le forme, tanto nei punteggi di merito, quanto negli attributi gustativi (Tabella 19). Sussistono

Tabella 18 - Coefficienti di correlazione tra l'età del formaggio e le frazioni proteiche

Frazioni proteiche	r
NCN	0,90 **
NPN	0,91 *
NPN/NT	0,88 **
α s1	-0,86 **
β B	-0,72 *
β A1	-0,80 *
β A2	-0,77 *

* Significativo per P=0,05

** Significativo per P=0,01

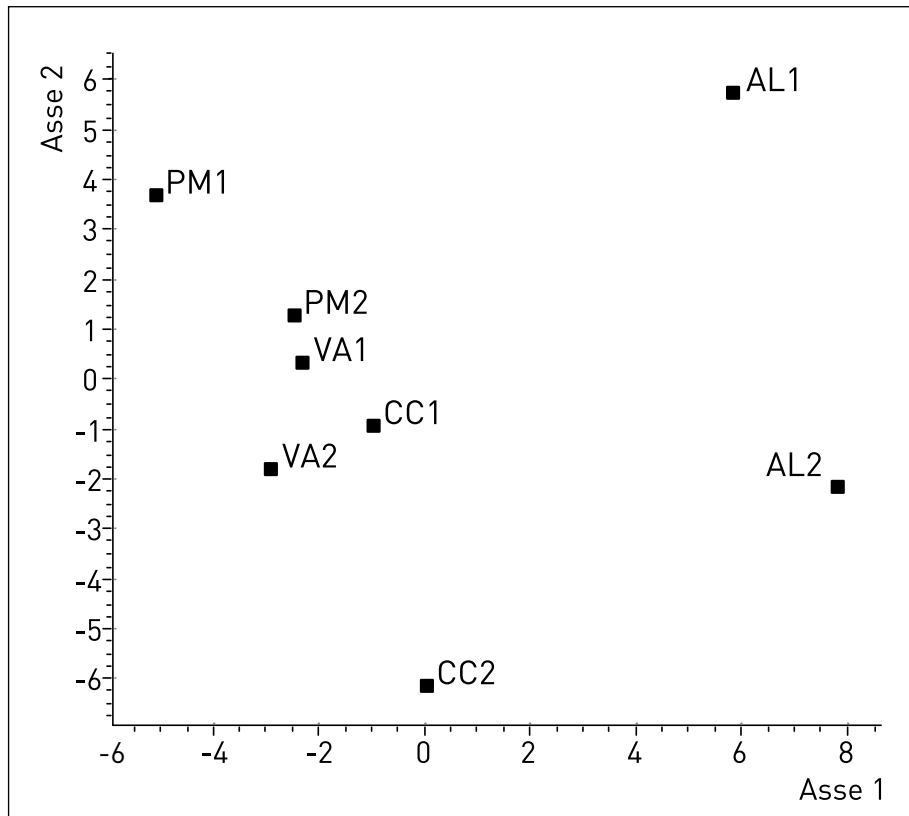


Figura 26 - Ordinamento delle aree in base ai dati chimici lungo le prime due Componenti principali

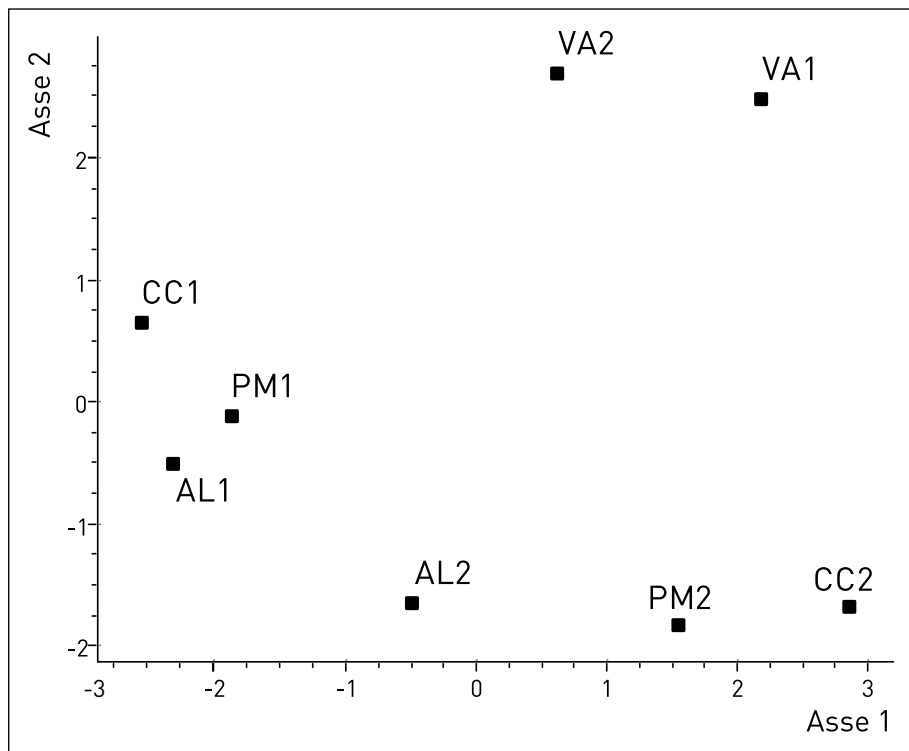


Figura 27 - Ordinamento delle aree in base ai dati sensoriali lungo le prime due Componenti principali

Tabella 19 - Punteggi medi dei descrittori sensoriali e significatività all'analisi della varianza*

	Colore	Occhiat.	Tatto	Odore	Sap./Ar.	Struttura	Dolce	Salato	Acido	Amaro
CC1	6,44c	5,44b	6,50ac	11,63b	9,13c	9,63d	4,25b	4,75ab	6,50a	6,38a
CC2	7,81ab	5,44b	6,50ac	11,38b	10,75ab	11,13ac	6,13a	3,13c	3,88b	2,00d
PM1	7,69ab	5,25b	6,63ab	9,75c	9,13c	10,38cd	4,75ab	5,25a	6,50a	4,88b
PM2	7,38b	4,31c	5,44d	11,50b	10,63ac	11,38ac	6,00a	3,00c	3,88b	4,50b
AL1	6,00c	4,81bc	6,19bc	10,25bc	9,50bc	10,63bd	3,38b	5,13a	6,13a	4,63b
AL2	6,38c	4,94b	5,81cd	10,25bc	9,88ac	10,75bd	4,25b	3,50bc	6,13a	2,81cd
VA1	8,38a	6,25a	7,06a	13,25a	11,38a	12,25a	6,00a	5,25a	6,13a	3,88bc
VA2	7,50b	6,13a	6,88ab	13,38a	10,38ac	11,88ab	4,63ab	5,75a	6,75a	3,75bc
Signif.	0,001	0,001	0,001	0,001	0,05	0,001	0,01	0,001	0,001	0,001

* Medie contraddistinte da lettere uguali non sono tra loro differenti al test di Duncan per $P=0,05$

inoltre numerose correlazioni significative tra i descrittori e i composti chimici, sia volatili che della frazione proteica: due per l'odore, il sapore/aroma e gli attributi acido e dolce; tre per il tatto, la struttura e l'attributo salato; quattro per l'occhiatura e l'attributo amaro; otto per il colo-

re. La struttura delle relazioni esplicitata dall'ordinamento dei dati sensoriali (Fig. 27) risulta pertanto poco sovrapponibile a quella floristica. Essa appare anche poco concorde con quella chimica, in ragione evidentemente della presenza di una concomitanza di interazioni molto intricata.





FORMAGGIO VALTELLINA CASERA DOP

Con regolamento (CE) n. 1263/96 il Valtellina Casera, formaggio di latteria la cui storia è strettamente legata alla diffusione delle latterie sociali e turnarie in provincia di Sondrio, ottiene il riconoscimento della Denominazione di Origine Protetta (DOP), con l'approvazione del relativo Disciplinare di Produzione che ne definisce tecnologia e caratteristiche.

Il Valtellina Casera è un formaggio semigrasso, a pasta semicotta e semidura.

Si produce con latte vaccino proveniente da allevamenti della provincia di Sondrio che viene lavorato nei caseifici dislocati sul territorio.

Il latte di due o più mungiture viene parzialmente scremato (per affioramento o

centrifuga) prima di essere sottoposto a coagulazione, ottenuta con l'uso di caglio di vitello. La rottura del coagulo avviene fino a quando i grumi hanno la grandezza di chicchi di mais e la successiva cottura ad una temperatura compresa tra i 40 e i 45°C. Una volta estratta, la pasta viene posta nelle apposite fascere marchianti che riportano, ripetuta più volte, la scritta Valtellina Casera preceduta da una forma di formaggio stilizzata. Seguono la salatura (a secco o in salamoia) e la stagionatura che avviene nelle tradizionali "casere" o in adeguate strutture (ad una temperatura di 6-13°C e umidità relativa non inferiore all'80%) e che si protrae per almeno 70 giorni.



Figura II

Processo di produzione, conservazione e marchiatura del formaggio Valtellina Casera

Il Valtellina Casera ha forma cilindrica regolare, con superfici piane di diametro tra i 30 e i 45 cm e scalzo diritto alto 8-10 cm. Il peso varia da 7 a 12 kg. La crosta è sottile ma consistente. La pasta, di colore dal bianco al giallo paglierino a seconda del periodo di produzione e della stagionatura, è compatta e elastica con occhiatura sparsa e tendenzialmente fine; con la stagionatura diviene leggermente più friabile e solubile. Il Valtellina Casera giovane ha sapore dolce con sentore di latte; ha gusto molto delicato e facile, di grande equilibrio. Con il prolungarsi della stagionatura, il sapore si fa più ricco con note di frutta secca e profumi di foraggi affienati.

OBIETTIVI E PIANO SPERIMENTALE

Il progetto di ricerca ha voluto innanzitutto definire le caratteristiche tipiche del formaggio Valtellina Casera - caratteristiche sensoriali, chimiche e microbiologiche - al fine di introdurre nella tecnologia produttiva l'impiego di starter autoctoni che devono mantenere inalterate le caratteristiche distintive di questo formaggio. Quindi, gli starter prodotti nel corso della sperimentazione hanno mirato semplicemente a ridurre l'incidenza dei difetti e garantire i requisiti di sicurezza del formaggio senza alterarne quelle prerogative tipiche che sono espressione del legame con il territorio. Il progetto si è sviluppato su due anni, secondo il seguente piano operativo:

Anno I

Il complesso delle informazioni relative alla valutazione sensoriale e alle analisi chimiche effettuate sui formaggi Valtellina Casera che hanno partecipato alla Mostra del Bitto del 2007, ha permesso di individuare i parametri caratterizzanti il prodotto. Nel 2009, in ciascuna delle tre aziende campione individuate, sono state monito-

rate e campionate due caseificazioni effettuate senza alcun innesto, per un totale di sei lavorazioni. I campioni di latte in caldaia e di cagliata sono stati inviati ai laboratori di riferimento per le successive analisi microbiologiche e chimiche. Dai campioni di cagliata sono stati isolati, identificati e caratterizzati 96 ceppi di batteri lattici, tra i quali sono stati selezionati 5 ceppi utilizzati per la formulazione di tre diverse miscele starter, preliminarmente testate in laboratorio.

I formaggi ottenuti dalle sei lavorazioni sono stati sottoposti a valutazione sensoriale nel corso della Mostra del Bitto del 2009 e a successive analisi microbiologiche e chimiche.

Anno II

In ciascuna delle tre aziende campione sono state eseguite due caseificazioni con la miscela starter 1, una caseificazione con la miscela starter 2 e una caseificazione con la miscela starter 3, oltre a una caseificazione di controllo, per un totale di dodici caseificazioni sperimentali con l'uso di starter e tre caseificazioni controllo. Gli starter sono stati aggiunti al latte crudo in caldaia.

Le lavorazioni sono state monitorate registrando i principali dati tecnologici e sottoponendo i campioni di latte e cagliata ad analisi microbiologiche, al fine di valutare l'attività dei fermenti innestati.

I formaggi così ottenuti sono stati sottoposti all'analisi sensoriale durante la Mostra del Bitto del 2010 e a successive analisi microbiologiche e chimiche per valutarne la qualità e l'eventuale presenza di difetti ed alterazioni nelle caratteristiche organolettiche e chimiche riconducibili all'uso degli starter. I formaggi sperimentali sono stati inoltre confrontati con quelli partecipanti alla Mostra.

STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ DELLA MICROFLORA LATTICA NEL FORMAGGIO VALTELLINA CASERA E FORMULAZIONE DELLE MISCELE STARTER

Lo studio che ha coinvolto il Valtellina Casera si è avvalso dello stesso schema sperimentale utilizzato per il Bitto. Innanzitutto si è valutata l'incidenza dei principali gruppi microbici che contribuiscono a definire le caratteristiche dei formaggi a latte crudo quindi si è isolato un significativo numero di batteri lattici con la finalità individuare specifici biotipi potenzialmente utilizzabili come starter. Nel primo anno di sperimentazione, presso tre caseifici si sono monitorate complessivamente sei caseificazioni eseguite senza impiego di starter, si sono verificati i parametri tecnologici e si sono analizzati campioni di latte, le rispettive cagliate e i formaggi a 70 giorni di stagionatura.

Per quanto riguarda il latte, le analisi sono state eseguite con la finalità di verificare la qualità igienico-sanitaria della materia prima (carica batterica, coliformi e stafilococchi coagulasi positivi). Cagliate e formaggi sono stati esaminati e descritti

dal punto di vista microbiologico in termini batteri lattici nelle diverse componenti differenziando mesofili e termofili, cocchi e bastoncini, enterococchi ed eterofermentanti obbligati. Dai diversi campioni di cagliata si è proceduto quindi ad isolare un numero significativo di batteri lattici che sono stati valutati in relazione al loro potenziale utilizzo come innesti in base alla caratteristiche tecnologiche (attività acidificante, riducente e proteolitica), ma anche l'inibizione di microrganismi patogeni quali *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

CONTE BATTERICHE

La qualità microbiologica del latte destinato alla produzione di Valtellina Casera è risultata nel complesso soddisfacente, nonostante alcuni campioni abbiamo presentato valori di carica batterica superiore al milione di UFC/mL. I batteri lattici sono presenti con numeri importanti in tutte le

Tabella 20 - Contenuto di batteri lattici nelle cagliate e nel formaggio di Valtellina Casera DOP (Valori espressi come log₁₀ UFC/g).

Batteri Lattici	Cagliata		Formaggio	
	Media	DS	Media	DS
Cocchi mesofili (M17 30 °C)	562	63	751	93
Cocchi termofili (M17 45 °C)	555	71	741	117
Lattobacilli mesofili (MRS 30 °C)	5,44	44	768	54
Lattobacilli termofili (MRS 45 °C)	5,13	56	698	65
Enterococchi (KAA)	4,31	70	670	88
Eterofermentanti obbligati	3,03	88	nd	nd

forme analizzate sia nella cagliata che nel formaggio a 70 giorni di maturazione (Tabella 20). Per quanto riguarda i campioni di cagliata le analisi hanno evidenziato che i cocchi mesofili rappresentano il gruppo più numeroso con valori compresi tra 5,00 e 6,83 log₁₀ UFC/g; importante risulta anche il contributo dei cocchi termofili che presentano un valore medio pari a 5,55 ± 0,71 log₁₀ UFC/g. Analoghe considerazioni si possono fare per quanto riguarda la componente bastoncellare dove le forme mesofile prevalgono su quelle termofile con valore medio di 5,44 ± 0,44 vs 5,13 ± 0,56 log₁₀ UFC/g. L'analisi microbiologica delle cagliate evidenzia anche un elevato tenore di enterococchi (4,31 ± 0,70 log₁₀ UFC/g) e di eterofermentanti obbligati (3,03 ± 0,88 log₁₀ UFC/g).

Come riportato in studi riguardanti formaggi a latte crudo i batteri lattici raggiungono il massimo sviluppo durante la maturazione del formaggio con una netta prevalenza in questa fase delle forme mesofile; nel formaggio a 70 giorni di stagionatura, infatti, i bastoncini termofili, che rappresentano il gruppo meno consistente, sono presenti con un valore medio pari a 6,98 log₁₀ UFC/g mentre i cocchi mesofili che sono il gruppo più numeroso presentano un valore medio di 7,51 log₁₀ UFC/g. Gli enterococchi, nel passaggio da cagliata a formaggio aumentano di circa tre cicli logaritmici, in accordo con quanto riportato in letteratura in relazione ad altri formaggi a latte crudo (Morandi *et al.* 2005). L'incremento del contenuto di enterococchi nel corso della maturazione del Valtellina Casera conferma che questo gruppo di batteri esplica un ruolo chiave nella definizione delle caratteristiche di questo formaggio.

IDENTIFICAZIONE DEI BATTERI LATTICI

Dalle 6 cagliate corrispondenti alle caseificazioni monitorate sono stati complessivamente isolati 112 ceppi batterici dei quali 96 risultati appartenere al gruppo dei bat-

teri lattici. Tali ceppi, una volta purificati, sono stati conservati a -20 °C con idonei crioprotettivi. L'identificazione dei ceppi è stata condotta secondo quanto precedentemente descritto per il Bitto.

Le specie batteriche rilevate nella cagliata e nel formaggio (Tabella 21) consentono di fare interessanti considerazioni.

I 96 batteri lattici sono risultati appartenere a 19 specie diverse dimostrando la presenza di una complessa biodiversità, anche all'interno della specie, confermata anche dai profili RAPD-PCR. I 90 ceppi di forma coccica sono stati attribuiti a 14 diverse specie, mentre i 6 batteri lattici di forma bastoncellare sono risultati appartenere a 4 specie. Un ceppo, appartenente al genere *Streptococcus*, è stato identificato solo a livello di genere nonostante sia stato eseguito il sequenziamento parziale del gene 16S rRNA. Le specie più rappresentate sono risultate *Enterococcus faecium* (20/96), *E. faecalis* (20/96), *Streptococcus thermophilus* (19/96) e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (10/96). In piena concordanza con quanto già evidenziato in precedenza per quanto riguarda il Bitto, gli enterococchi naturalmente presenti rappresentano una parte importante della popolazione batterica della cagliata, ne sono infatti state ritrovate 4 diverse specie: *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium* ed *E. hirae*. Un'importante presenza di batteri del genere *Enterococcus*, è stata riportata anche in precedenti lavori riguardanti formaggi a latte crudo.

La presenza consistente degli enterococchi si spiega con la loro adattabilità a condizioni ambientali che sono avverse ad altri gruppi batterici. Gli enterococchi sono infatti in grado di crescere in presenza di elevate concentrazioni di sale, in condizioni di elevata acidità e sono caratterizzati da una sufficiente termoresistenza che consente loro di sopravvivere alle temperature di cottura della cagliata (Giraffa, 2003;

Tabella 21 - Batteri lattici isolati dai campioni di cagliata di Valtellina Casera e loro caratteristiche colturali.

Specie	Numero ceppi	Idrolisi Esculina	Sviluppo				
			10 °C	45 °C	2% NaCl	4% NaCl	6.5% NaCl
<i>Enterococcus durans</i>	4	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	20	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i>	20	13+ (7±)	18+ (2±)	+	+	+	+
<i>E. hirae</i>	2	+	+	+	+	+	+
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	-	+	-	+	+	+
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	10	17- (3±)	+	15+ (5 -)	+	-	-
<i>Leuconostoc lactis</i>	2	-	+	-	+	+	+
<i>Ln. mesenteroides</i>	3	-	+	-	+	+	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	-	+	-	+	+	+
<i>Streptococcus equinus</i>	2	-	-	+	+	+	-
<i>S. thermophilus</i>	19	-	-	+	+	-	-
<i>S. uberis</i>	4	-	-	+	+	+	-
<i>Streptococcus spp.</i>	1	-	-	+	+	-	-
<i>Weissella confusa</i>	1	-	-	+	+	+	+
<i>Lactobacillus casei</i>	1	-	+	+	+	+	+
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	2	-	-	+	+	-	-
<i>Lb. fermentum</i>	2	-	1+ (1-)	+	+	+	+
<i>Lb. plantarum</i>	1	-	+	+	+	+	+
totale	96						

Brasca *et al.*, 2006; Morandi *et al.*, 2005; Morandi *et al.*, 2010; Morandi *et al.* 2011). Seppure la presenza di questi batteri è spesso associata ad una contaminazione di origine fecale, occorre sottolineare che essi rappresentano anche parte della popolazione microbica delle superfici fogliari di molte essenze vegetali, e si ritrovano comunemente nell'ambiente. Non di meno va considerato che hanno un ruolo di fondamentale importanza nella conduzione delle fermentazioni e nella definizione delle caratteristiche sensoriali dei formaggi a latte crudo (Cogan *et al.*, 1997).

La presenza di *S. thermophilus*, risulta, come atteso e come rilevato nelle cagliate del Bitto, consistente nelle prime fasi della lavorazione (19/96 ceppi isolati da cagliata). Questo andamento corrisponde a quanto atteso e già riportato per altri prodotti tradizionali con tecnologia simile, dove *S. thermophilus* prevale nella cagliata dove svolge il compito di assicurare

una corretta fermentazione convertendo il lattosio in acido lattico e decresce con il prolungarsi della stagionatura a favore di batteri lattici non starter. Accanto alle specie maggioritarie si sono ritrovati batteri dei generi *Leuconostoc* e *Weissella* che se presenti in numero sufficiente conferiscono al prodotto una piccola occhiatura e *Pediococcus*, la cui presenza è importante per la definizione delle caratteristiche sensoriali del prodotto durante la stagionatura.

Tra le forme bastoncellari, nella cagliata sono risultati prevalere *Lb. fermentum*, appartenente al gruppo degli eterofermentanti e *Lb. delbrueckii ssp. lactis*, ma si sono rilevati anche *Lb. plantarum* e *Lb. casei* specie comunemente riscontrate in formaggi a latte crudo con caratteristiche simili al Valtellina Casera. La presenza di specie batteriche quali *Lc. garvieae*, *S. equinus* e *S. uberis*, che non rientrano nelle specie batteriche di interesse caseario,

evidenzia un impoverimento in batteri lattici della materia prima latte a favore dei batteri di origine animale.

RAPD-PCR FINGERPRINTING

L'analisi genetica eseguita mediante RAPD-PCR ha permesso di valutare sia la variabilità fra le specie ritrovate sia la diversità all'interno della stessa specie.

Analogamente a quanto osservato in questo lavoro per il Bitto, nella produzione del Valtellina Casera è presente una significativa biodiversità. La cluster analysis eseguita sui profili di amplificazione ottenuti mediante RAPD-PCR con l'impiego di tre diversi primer ha evidenziato che i biotipi appartenenti alla stessa specie, sono raggruppati nel medesimo cluster. Nelle specie quantitativamente più presenti, *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. thermophilus* e *Lc. lactis ssp. lactis*, si è evidenziata un'ampia eterogeneità intra-specifica valutabile dal valore di similarità del cluster che è risultato rispettivamente pari a 46,2%, 52,6%, 45,1%, e 28,1% (Figura 28). All'interno di questi gruppi sono inoltre evidenziabili diversi sub-clusters, non sempre correlabili con il produttore dal cui formaggio sono stati isolati i ceppi batterici, né con le caratteristiche fenotipiche e tecnologiche.

CARATTERISTICHE CULTURALI

I 96 batteri lattici sono quindi stati caratterizzati in relazione alla produzione di CO₂ e la capacità di crescita a 10 e 45 °C ed in presenza di concentrazioni crescenti di NaCl (2%, 4% e 6,5%).

Analizzando i dati relativi alle temperature di crescita (tabella 21), è interessante notare come la maggior parte dei ceppi (87,5%) è in grado di crescere a 45 °C; fanno eccezione 5 dei 10 isolati appartenenti alle specie *Lactococcus lactis ssp. lactis*, tutti i ceppi appartenenti al genere *Leuconostoc* e i singoli *Lc. garvieae* e *Pediococcus pentosaceus*. A 10 °C invece non sono in grado di moltiplicarsi uno dei due ceppi

di *Lb. fermentum*, tutti i ceppi del genere *Streptococcus* e *Weissella*, e della specie *Lb. delbrueckii ssp. lactis*.

Per quanto concerne invece la crescita in presenza di NaCl, si osserva un comportamento diverso tra le varie specie, ma assolutamente omogeneo all'interno di esse: gli enterococchi, come da letteratura, si sviluppano velocemente anche in presenza del 6,5% di NaCl, mentre *S. thermophilus*, *Lc. lactis ssp. lactis*, *Leuconostoc* e *Pediococcus pentosaceus* non sono in grado di moltiplicarsi con concentrazioni di sale superiori al 2,0%.

CARATTERIZZAZIONE TECNOLOGICA

La caratterizzazione dell'attitudine tecnologica dei ceppi in esame è stata condotta utilizzando gli stessi criteri precedentemente esposti per il formaggio Bitto.

Come ben si evince dalla tabella 22, i ceppi studiati mostrano generalmente una debole attività acidificante nell'arco delle prime 6 ore di incubazione. Come atteso, *S. thermophilus*, specie comunemente impiegata come starter nelle produzioni in cui è richiesto un forte abbassamento di pH in caldaia, è la specie più acidificante nell'arco delle prime 6 ore di incubazione; è importante rilevare che ben 17 dei 19 ceppi di *S. thermophilus* producono solo una media acidificazione dopo 24 ore, il che significa che producono un'elevata quantità di acido lattico nelle prime ore per poi stabilizzarsi.

All'interno di questa specie troviamo le maggiori differenze tra biotipi per quanto riguarda l'attività acidificante dopo 24 ore. *Lb. delbrueckii ssp. lactis* si conferma essere una specie con forte attività acidificante abbinata al prolungarsi dell'incubazione mentre i batteri del genere *Leuconostoc*, risultano caratterizzati da una debole capacità. L'attività riducente è apparsa strettamente legata alla specie di appartenenza, seppure si sono rilevate differenze intraspecifiche. *E. faecalis*, *Lc.*

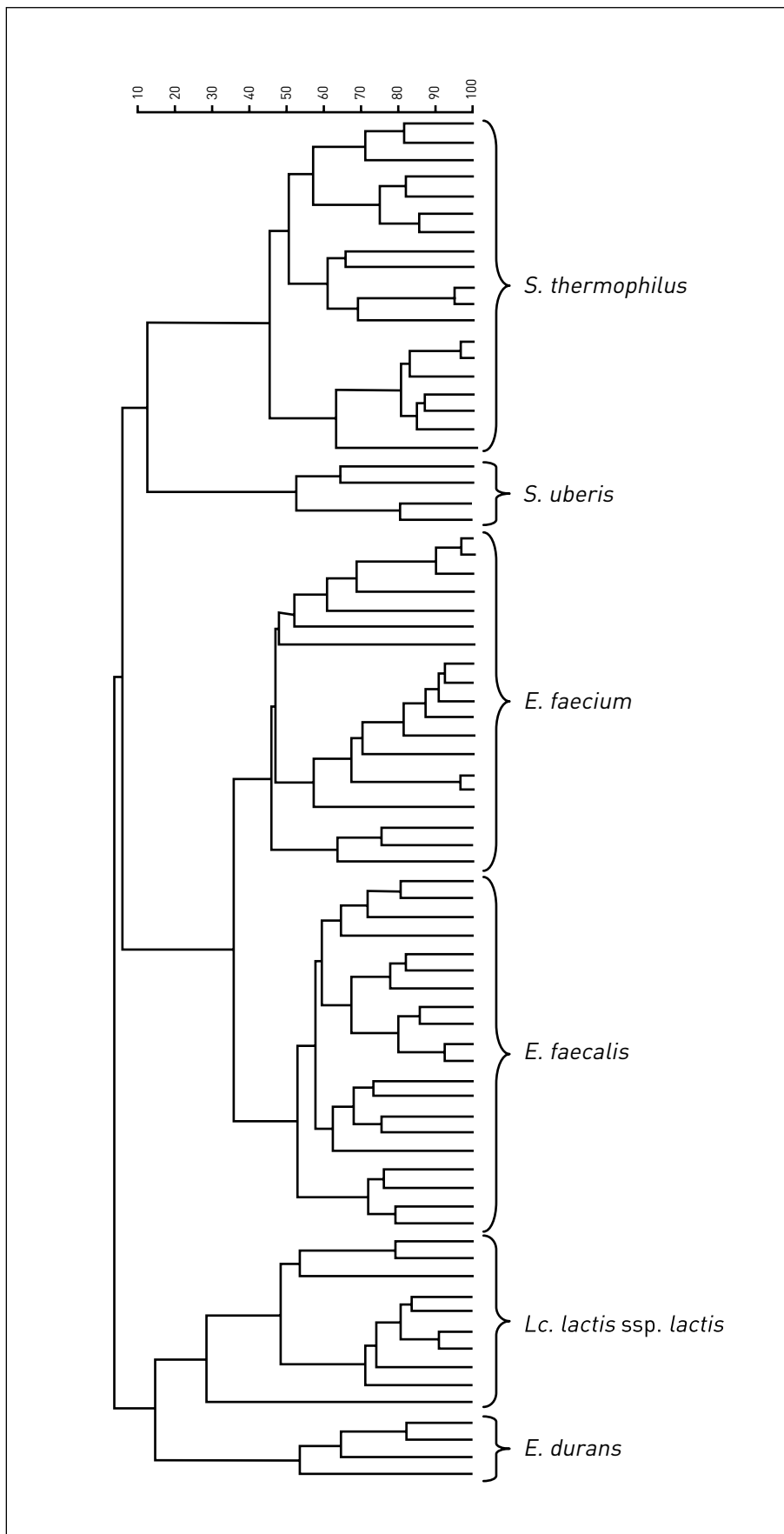


Figura 28 - Diversità genotipica dei ceppi di *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. thermophilus* e *Lc. lactis ssp. lactis*, isolati dalle cagliate di Valtellina Casera, valutata mediante Cluster analysis dei profili RAPD-PCR.

Tabella 22 - Attività acidificante e riducente dei batteri lattici isolati dalle cagliate di Valtellina Casera valutate nell'arco di 24 ore incubazione in latte a 37 °C

Sigla	Specie	ΔpH 6h	ΔpH 24h	Redox (mV)	Sigla	Specie	ΔpH 6h	ΔpH 24h	Redox (mV)
VC3	<i>E. durans</i>	1,24	1,72	-275,0	VC113	<i>Lb. casei</i>	0,19	1,00	-133,7
VC7	<i>E. durans</i>	0,99	1,71	-230,3	VC107	<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	1,16	2,20	-181,3
VC78	<i>E. durans</i>	1,20	1,72	-321,6	VC108	<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	0,93	1,95	-213,3
VC81	<i>E. durans</i>	1,21	1,69	-164,6	VC38	<i>Lb. fermentum</i>	0,74	1,04	-256,9
VC1	<i>E. faecalis</i>	1,00	1,54	-396,5	VC30	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	1,02	1,99	-356,9
VC2	<i>E. faecalis</i>	0,92	1,47	-340,9	VC52	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	1,43	1,75	-375,6
VC4	<i>E. faecalis</i>	1,04	1,55	-395,3	VC63	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	1,23	1,97	-338,2
VC5	<i>E. faecalis</i>	0,95	1,53	-405,0	VC64	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	1,45	1,85	-369,1
VC12	<i>E. faecalis</i>	1,14	1,86	-390,0	VC66	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	1,15	1,88	-358,8
VC14	<i>E. faecalis</i>	1,06	1,82	-399,0	VC77	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	0,84	1,60	-371,7
VC15	<i>E. faecalis</i>	1,11	1,84	-394,1	VC91	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	1,08	1,87	-350,0
VC17	<i>E. faecalis</i>	0,69	1,40	-394,1	VC105	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	0,09	1,77	-391,2
VC23	<i>E. faecalis</i>	0,56	1,28	-396,4	VC106	<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	0,92	1,65	-392,0
VC28	<i>E. faecalis</i>	0,94	1,59	-394,1	VC103	<i>Ln. lactis</i>	0,34	1,29	-134,0
VC29	<i>E. faecalis</i>	1,14	1,88	-404,0	VC104	<i>Ln. lactis</i>	0,17	1,34	-172,0
VC33	<i>E. faecalis</i>	1,18	1,85	-400,0	VC99	<i>Ln. mesenteroides</i>	0,06	1,46	-211,8
VC34	<i>E. faecalis</i>	1,10	1,70	-395,1	VC111	<i>Ln. mesenteroides</i>	0,08	1,30	-215,1
VC42	<i>E. faecalis</i>	0,66	1,29	-402,0	VC112	<i>Ln. mesenteroides</i>	0,09	1,22	-182,0
VC49	<i>E. faecalis</i>	0,93	1,71	-345,3	VC54	<i>Pd. pentosaceus</i>	0,20	1,62	-252,1
VC79	<i>E. faecalis</i>	0,97	1,56	-400,1	VC101	<i>S. equinus</i>	1,27	1,84	-212,9
VC85	<i>E. faecalis</i>	0,86	1,37	-408,0	VC110	<i>S. equinus</i>	1,28	1,86	-216,3
VC86	<i>E. faecalis</i>	0,89	1,50	-407,0	VC20	<i>S. thermophilus</i>	1,21	1,67	-191,0
VC88	<i>E. faecalis</i>	0,86	1,48	-405,0	VC24	<i>S. thermophilus</i>	1,25	1,89	-218,8
VC89	<i>E. faecalis</i>	0,83	1,53	-390,6	VC25	<i>S. thermophilus</i>	1,17	1,79	-197,2
VC6	<i>E. faecium</i>	0,84	1,42	-214,7	VC44	<i>S. thermophilus</i>	1,22	1,78	-240,4
VC8	<i>E. faecium</i>	0,89	1,47	-218,4	VC48	<i>S. thermophilus</i>	1,53	1,94	-231,2
VC9	<i>E. faecium</i>	0,85	1,59	-203,3	VC50	<i>S. thermophilus</i>	1,41	1,82	-215,1
VC10	<i>E. faecium</i>	0,78	1,52	-206,3	VC56	<i>S. thermophilus</i>	1,32	1,87	-203,3
VC26	<i>E. faecium</i>	1,20	1,91	-199,0	VC57	<i>S. thermophilus</i>	1,26	1,78	-194,8
VC36	<i>E. faecium</i>	1,12	1,73	-283,4	VC58	<i>S. thermophilus</i>	1,25	1,76	-216,2
VC37	<i>E. faecium</i>	1,13	1,74	-291,4	VC59	<i>S. thermophilus</i>	1,23	1,71	-224,7
VC45	<i>E. faecium</i>	1,37	1,85	-227,2	VC60	<i>S. thermophilus</i>	1,59	1,90	-218,5
VC67	<i>E. faecium</i>	1,26	1,72	-241,1	VC62	<i>S. thermophilus</i>	1,48	1,95	-187,1
VC80	<i>E. faecium</i>	1,10	1,66	-151,2	VC68	<i>S. thermophilus</i>	1,50	1,87	-201,9
VC82	<i>E. faecium</i>	1,05	1,63	-235,6	VC69	<i>S. thermophilus</i>	1,75	2,23	-219,7
VC83	<i>E. faecium</i>	1,03	1,60	-211,9	VC70	<i>S. thermophilus</i>	1,54	1,95	-207,6
VC84	<i>E. faecium</i>	0,98	1,52	-272,3	VC71	<i>S. thermophilus</i>	1,57	2,00	-223,3
VC87	<i>E. faecium</i>	1,15	1,56	-183,6	VC73	<i>S. thermophilus</i>	1,54	1,88	-200,3
VC92	<i>E. faecium</i>	0,96	1,63	-282,0	VC74	<i>S. thermophilus</i>	1,22	1,76	-198,9
VC93	<i>E. faecium</i>	0,86	1,43	-188,6	VC102	<i>S. thermophilus</i>	1,40	1,96	-210,4
VC96	<i>E. faecium</i>	0,67	1,49	-219,6	VC11	<i>S. uberis</i>	0,88	1,60	-188,6
VC97	<i>E. faecium</i>	1,13	1,68	-313,1	VC46	<i>S. uberis</i>	0,82	1,70	-194,8
VC98	<i>E. faecium</i>	1,13	1,76	-178,1	VC47	<i>S. uberis</i>	0,83	1,67	-238,5
VC100	<i>E. faecium</i>	1,07	1,66	-239,6	VC53	<i>S. uberis</i>	0,84	1,66	-201,30
VC75	<i>E. hirae</i>	1,07	1,64	-241,2	VC31	<i>Streptococcus spp.</i>	0,83	1,81	-185,90
VC76	<i>E. hirae</i>	1,00	1,60	-288,5	VC90	<i>Weissella confusa</i>	0,77	1,13	-196,0

	pH	redox		pH	redox		pH	redox
Debole	< 1,50	> 200	Media	1,50-2,00	200-300	Alta	> 2,00	< 300

lactis ssp. *lactis* sono risultate le specie maggiormente riducenti, accanto a singoli ceppi di *E. faecium*. *Lc. garvieae* e *Lb. plantarum*. Solo 4 ceppi di *E. faecalis* sono risultati in grado di idrolizzare la caseina. Per quanto riguarda la capacità di inibire la crescita di *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, che costituiscono un potenziale fattore di rischio nelle produzioni casearie al latte crudo, 12 ceppi hanno evidenziato di possedere attività inibente nei confronti dei microrganismi target ed in particolare 4 *E. faecalis* e 1 *Lc. garvieae* inibiscono lo sviluppo di *Listeria monocytogenes*; 1 *E. faecalis*, 1 *E. faecium*, 1 *Lc. lactis* ssp. *lactis*, 1 *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* e 1 *W. confusa* possiedono attività anti-*Staphylococcus aureus* mentre 1 *Lc. lactis* ssp. *lactis* e 1 *Streptococcus* spp. hanno mostrato attività antimicrobica nei confronti di entrambi i patogeni testati (Tabella 23).

FORMULAZIONE DELLE MISCELE STARTER

Come evidenziato dalle specie maggiormente ritrovate nella cagliata, la tecnologia di produzione di Valtellina Casera, con la cottura condotta tra i 40 e 45 °C, favorisce nella cagliata lo sviluppo di forme cocciche termofile (*S. thermophilus*, *E. faecium* e *E. faecalis*) e mesofile (*Lc. lactis* ssp. *lactis*) (Tabella 23).

A partire dalla considerazione che gli enterococchi vengono impiegati quali starter secondari e non costituiscono quindi una specie d'elezione per il corretto avvio della fermentazione, si è focalizzata l'attenzione sui ceppi di *S. thermophilus* e di *Lc. lactis* ssp. *lactis* due delle specie maggiormente impiegate come starter in questa tipologia di prodotti. La scelta dei biotipi per la formulazione delle 3 miscele da testare nelle successive prove sperimentali presso i 3

Tabella 23 - Attività inibente dei batteri lattici isolati dai campioni di cagliata di Valtellina Casera nei confronti di *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*

Specie	Numero ceppi	Attività inibente	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Enterococcus durans</i>	4	-	-
<i>E. faecalis</i>	20	4+	1+
<i>E. faecium</i>	20	-	1+
<i>E. hirae</i>	2	-	-
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	1+	-
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	10	1+	2+
<i>Leuconostoc lactis</i>	2	-	-
<i>Ln. mesenteroides</i>	3	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	-	-
<i>Streptococcus equinus</i>	2	-	-
<i>S. thermophilus</i>	19	-	-
<i>S. uberis</i>	4	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	1	1+	1+
<i>Weissella confusa</i>	1	-	1+
<i>Lactobacillus casei</i>	1	-	-
<i>Lb. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	2	-	+
<i>Lb. fermentum</i>	2	-	-
<i>Lb. plantarum</i>	1	-	-
totale	96		

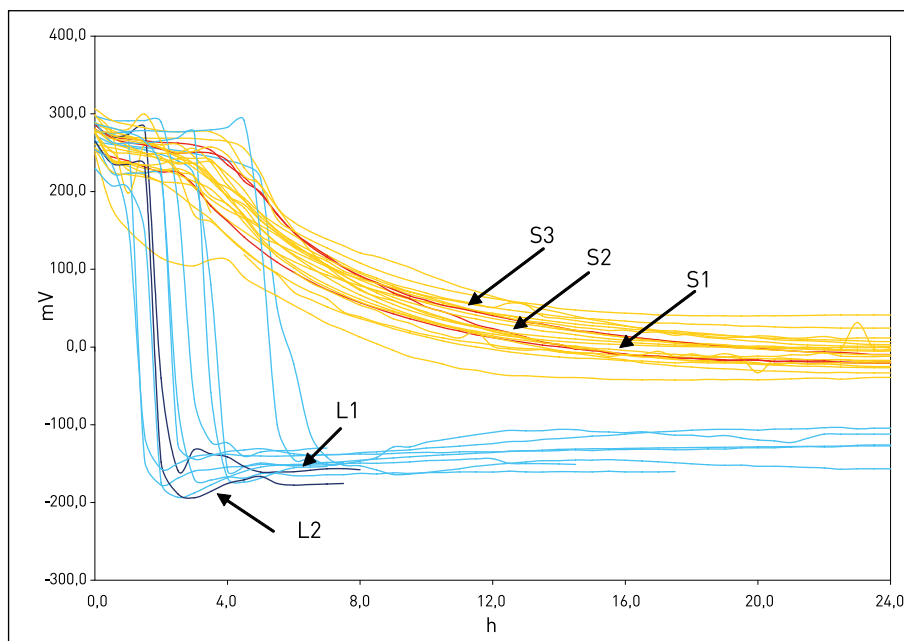


Figura 29 - Curve di riduzione dei ceppi di *S. thermophilus* (in arancio) e *Lc. lactis ssp. lactis* (in azzurro) nelle 24 h.

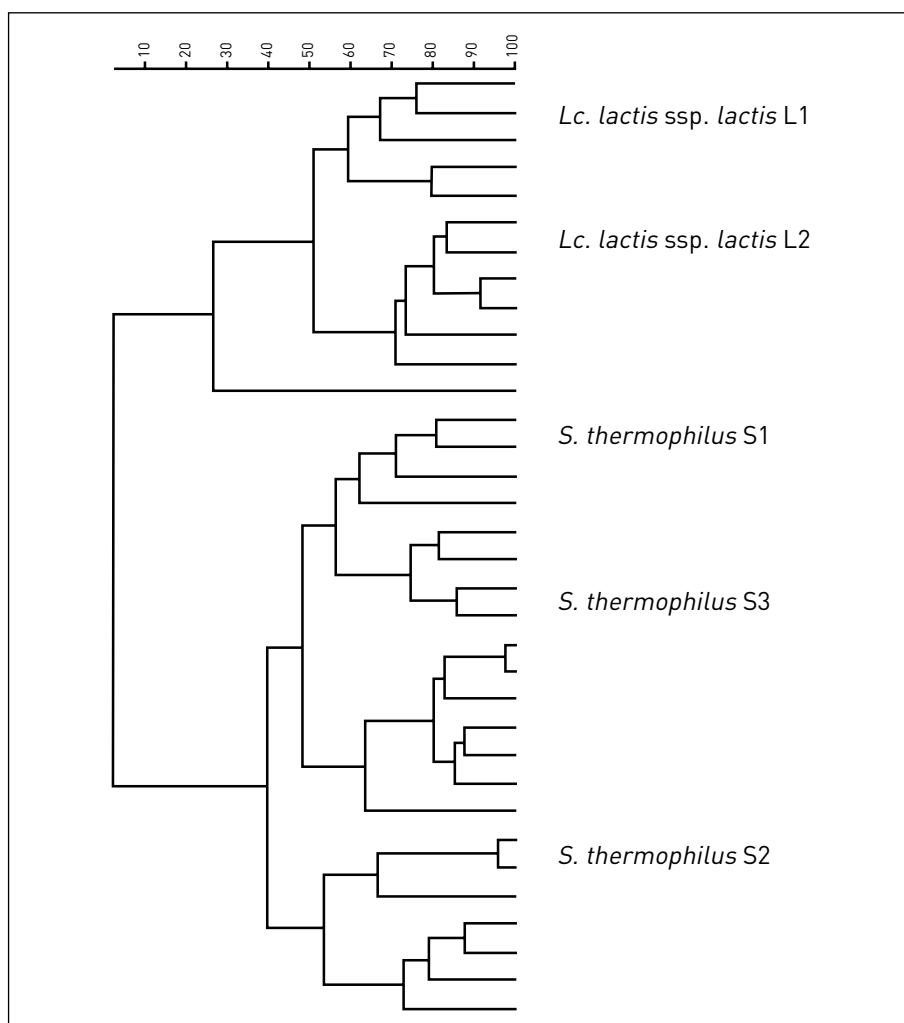


Figura 30 - Diversità genotipica valutata mediante Cluster Analysis dei profili RAPD-PCR dei ceppi di *S. thermophilus* e *Lc. lactis ssp. lactis* isolati. In evidenza i cinque utilizzati per la composizione delle tre miscele di starter.

produttori è stata condotta considerando le attività di interesse tecnologico prima tra tutte la capacità di ossidoriduzione che costituisce una caratteristica tecnologica importante, in quanto ceppi caratterizzati da una buona capacità riducente sono in grado di creare un sistema di anaerobiosi che ostacola crescita di microrganismi alterativi quali come *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. Considerando la specie *S. thermophilus*, tra i 14 ceppi più riducenti, appartenenti alla classe II ($-2 \text{ mV} < Eh < -102 \text{ mV}$) (Figura 29) si sono individuati tre isolati caratterizzati da un diverso profilo

genetico (Figura 30), a diversa attività acidificante valutata nelle prime 6 ore di incubazione: il ceppo S1 a 6 ore dall'inoculo risulta avere un basso potere acidificante (classe I; $\Delta\text{pH} < 1,5$), mentre i ceppi S2 e S3 mostrano di avere un medio potere acidificante (classe II; $1,5 < \Delta\text{pH} < 2,0$) (Figura 31).

Per quanto riguarda la specie *Lc. lactis* ssp. *lactis*, si sono individuati due isolati caratterizzati da un diverso profilo genetico (Figura 28), da un alto potere riducente (Classe III, $Eh < -102 \text{ mV}$) (Figura 29) e da un basso potere acidificante (classe I; ΔpH

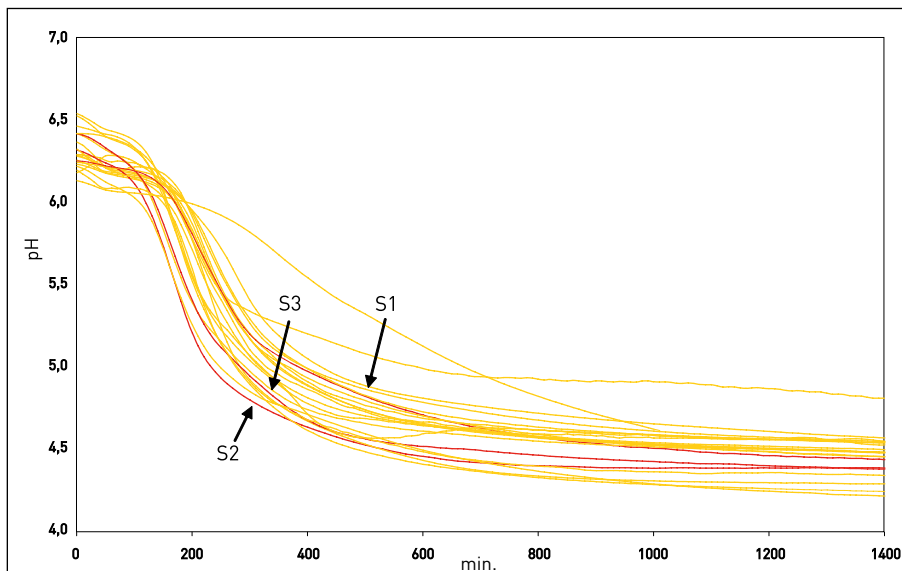


Figura 31 - Curve di acidificazione dei 19 ceppi di *S. thermophilus* in latte

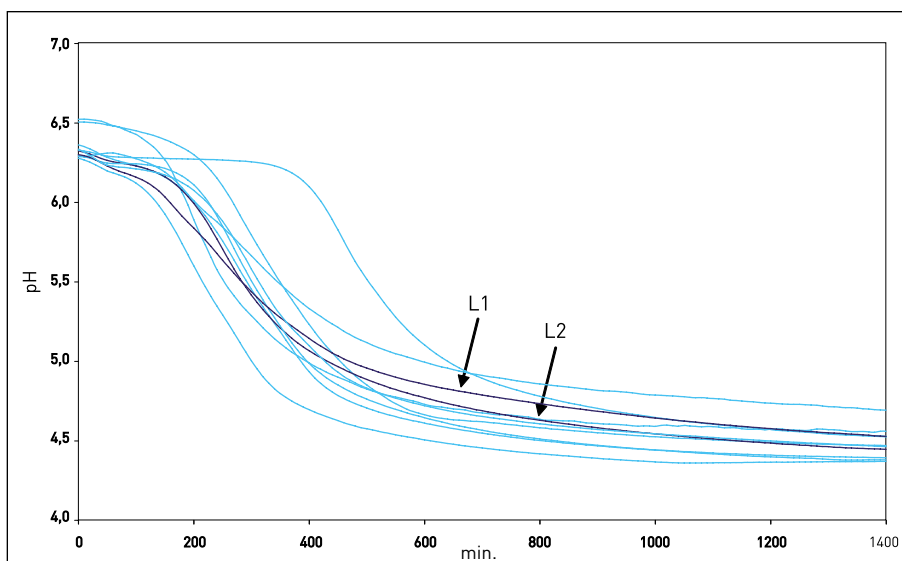


Figura 32 - Curve di acidificazione dei 10 ceppi di *Lc. lactis* ssp. *lactis* in latte

< 1,5) (Figura 32). I ceppi batterici appartenenti alle specie *St. thermophilus* e *Lc. lactis ssp. lactis* così individuati per la formulazione delle miscele starter sono stati ulteriormente caratterizzati per quanto riguarda l'antibiotico resistenza e l'attività inibente nei confronti di microrganismi target. I 3 *S. thermophilus* ed i 2 *Lc. lactis ssp. lactis* selezionati sono risultati suscettibili ai 14 antibiotici testati ed il ceppo L1, è stato scelto anche in quanto è grado di inibire lo sviluppo di *L. monocytogenes* e *S. aureus* specie responsabili di infezioni ed intossicazioni alimentari (Tabella 24). Si sono quindi formulate 3 miscele ciascuna delle quali contenente due ceppi (1 *S. thermophilus* e 1 *Lc. lactis ssp. lactis*) con diversa capacità acidificante, un buon potenziale di ossidoriduzione ed, in due mi-

scele, il ceppo di *Lc. lactis ssp. lactis* avente attività anti-*L. monocytogenes* e anti-*S. aureus*. In particolare la miscela M1 conteneva *S. thermophilus* S1 ed *Lc. lactis ssp. lactis* L1, la miscela M2 era formata dai ceppi S2 e L1 mentre la miscela M3 conteneva gli isolati S3 e L2.

Di tali miscele è stata verificata la curva di acidificazione a seguito di un inoculo in latte all'1% e incubazione a 37 °C per 24 ore (Figura 33).

Le tre miscele sono quindi state impiegate in caseificazioni sperimentali presso gli stessi 3 caseifici oggetto di sperimentazione l'anno precedente e presso ciascuno sono state eseguite due lavorazioni con ogni miscela starter in giorni diversi, messe a confronto con la normale produzione dell'azienda.

Tabella 24 - Attività inibente di *S. thermophilus* e *Lc. lactis ssp. lactis* nei confronti di microrganismi patogeni e/o indesiderati

Microrganismi target	<i>S. thermophilus</i>			<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	
	S1	S2	S3	L1	L2
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> DSM 2637T	-	-	-	-	-
<i>Cl. sporogenes</i> ATCC 3584T	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> SV6 (CNR-ISPA)	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 9525	-	-	-	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19095	-	-	-	+	-

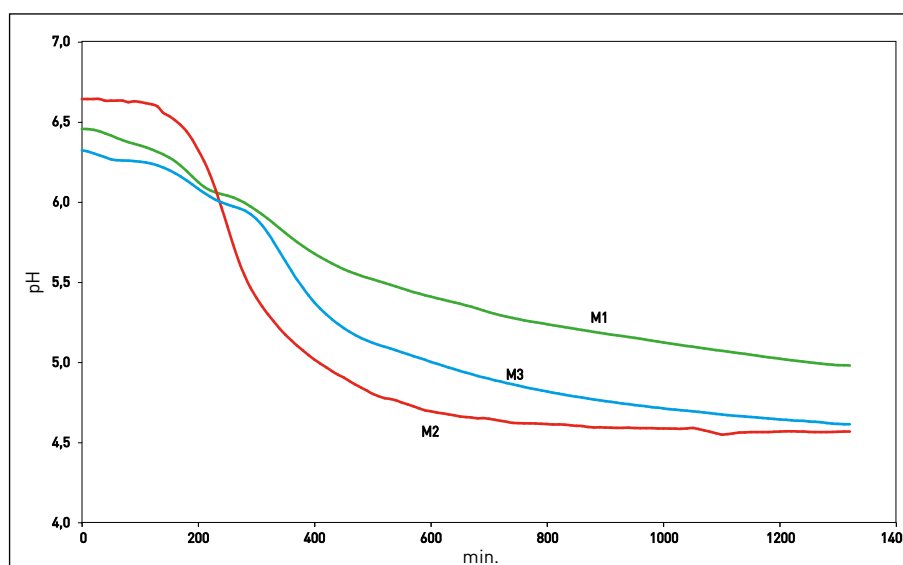


Figura 33 - Curve di acidificazione in latte delle 3 miscele starter impiegate nelle caseificazioni sperimentali.

CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEI FORMAGGI OTTENUTI DALLE CASEIFICAZIONI SPERIMENTALI CON LE MISCELE DI FERMENTI AUTOCTONI

COMPOSIZIONE CENTESIMALE

Con lo scopo di caratterizzare il formaggio Valtellina Casera, nell'ambito della Mostra di Morbegno (SO) sono stati prelevati 15 campioni, la composizione centesimale dei quali è riportata in Tabella 25.

I formaggi aventi tempo di maturazione inferiore, come era lecito aspettarsi, hanno mediamente un maggior contenuto in umidità e più basse percentuali delle frazioni dell'azoto non caseinico (NCN) e non proteico (NPN). Tali frazioni, infatti, si formano nel corso della maturazione per azione degli enzimi proteolitici. Per ciò che riguarda il contenuto in grasso, la variabilità riscontrata può essere ricondotta alla diversa entità della scrematura del latte applicata da ciascun produttore. Per ciò che riguarda il giudizio della giuria di assaggiatori, tutti i formaggi prelevati avevano ottenuto un punteggio al di sopra della sufficienza. Nell'ambito della sperimentazione sono stati prodotti Valtellina Casera senza impiego di innesto e con miscele di microrganismi autoctoni. Tutti i campioni sono stati valutati dalla giuria di assaggiatori durante l'annuale Mostra del Bitto di

Morbegno. La composizione dei 6 formaggi ottenuti senza innesto (3 con tempo di maturazione tra 70-179 gg. e 3 con tempo di maturazione tra 180-299 gg.) è riportata in Tabella 26, insieme al punteggio assegnato dalla giuria di assaggiatori. Anche per questi formaggi si può notare una discreta variabilità nella composizione e come solo due prodotti, appartenenti alla categoria 70-179 gg. di maturazione, abbiano ottenuto un punteggio sufficiente da parte della giuria. In particolare, sembra di poter individuare nella elevata percentuale della frazione di azoto non caseinico (NCN) la possibile causa di difetto. Di tutti i formaggi, il n° 78 ha mostrato una composizione di base anomala: oltre ad un contenuto in umidità elevata, è risultato avere un basso contenuto di grasso e alta percentuale di proteine. Inoltre, sia la percentuale di NCN che quella di NPN, rispettivamente 2,00% e 1,25%, sono risultate molto alte, al di sopra dei valori massimi riscontrati nei formaggi di riferimento del gruppo avente lo stesso periodo di maturazione (1,24% e 0,84% rispettivamente). La giuria di assaggiatori aveva inoltre rilevato in questo for-

Tabella 25 - Composizione dei 15 formaggi prelevati nell'ambito della Mostra

Maturazione giorni		Umidità (g/100g)	Grasso (g/100g)	Proteine tot. (g/100g)	Ceneri (g/100g)	NCN (%)	NPN (%)
70-179	media	33,24	32,4	28,90	4,60	0,98	0,63
	min	29,88	28,6	26,26	3,98	0,70	0,49
	max	39,88	35,4	30,89	5,05	1,24	0,84
180-299	media	29,29	33,8	30,75	5,06	1,22	0,92
	min	28,61	32,6	29,43	4,57	1,06	0,83
	max	30,51	35,0	31,81	5,83	1,47	1,12

Tabella 26 - Composizione di base del formaggio ottenuto senza innesto e punteggio totale assegnato dalla giuria di assaggiatori

Azienda	N°	Maturazione giorni	Umidità g/100 g	Grasso g/100 g	Proteine g/100 g	Ceneri g/100 g	NCN (%)	NPN (%)	Punteggio giuria
A	117	155	35,93	28,7	27,96	5,67	0,93	0,62	613
B	76	154	35,88	31,7	26,48	4,78	0,96	0,57	676
C	78	142	39,75	19,2	33,77	5,23	2,00	1,25	515
A	83	226	34,86	29,9	29,66	5,18	1,36	0,97	476
B	80	224	33,01	32,1	30,12	4,46	1,36	1,10	554
C	85	218	35,68	28,9	29,42	5,51	1,32	0,94	547

Tabella 27 - Composizione centesimale dei Valtellina Casera sperimentali

Azienda	N°	Maturazione giorni	Miscela starter	Umidità g/100g	Grasso g/100g	Proteine g/100	Ceneri g/100	NCN %	NCN %	Punteggio giuria
B	64	148	M1	31,34	34,8	28,71	3,97	0,68	0,55	73
B	66	148	M3	31,68	33,9	30,15	4,30	0,79	0,46	76
C	69	120	M1	34,10	27,4	32,52	6,03	1,02	0,66	71
C	68	120	M3	31,78	28,3	34,49	5,44	1,19	0,79	60
A	75	211	M1	30,46	34,3	30,01	5,02	1,08	0,78	79
A	73	211	M2	32,23	32,6	30,39	4,71	1,15	0,68	66
B	72	205	M2	31,39	33,7	30,51	3,97	1,20	0,83	63
C	78	198	M1	29,82	22,6	39,39	6,65	1,26	0,83	69
C	77	198	M2	30,46	27,2	35,5	6,78	1,12	0,66	72

maggio una significativa nota di "amaro". Pertanto, come già osservato per il Bitto, si può ipotizzare che la causa del giudizio negativo sia da ritrovare in prodotti di fenomeni proteolitici anomali. Relativamente ai formaggi aventi maturazione 180-299 gg., i tre campioni prodotti senza innesto sono risultati caratterizzati da una % NCN tendenzialmente elevata, anche se non superiore al valore massimo riscontrato nei Valtellina Casera di riferimento.

Successivamente nelle stesse tre aziende sono state condotte le prove di produzione di formaggio Valtellina Casera con impiego di 3 miscele di microrganismi autoctoni (M1, M2 e M3). La Tabella 27 riporta la composizione centesimale dei formaggi ottenuti. L'impiego delle miscele non ha influenzato le caratteristiche di composizione chimica dei formaggi. I parametri delle frazioni azotate % NCN e % NPN sono risultati in media con i valori riscon-

trati nei formaggi prelevati nell'ambito della Mostra (Tabella 25), a dimostrazione di un normale andamento dei processi di proteolisi.

COMPOSIZIONE DELLA FRAZIONE VOLATILE

Su tutti i campioni di Valtellina Casera, sia delle Mostre che della sperimentazione, è stato condotto lo studio della frazione volatile mediante SPME/GC/MS. In Figura 34 è riportato un esempio di tracciato di profilo aromatico di Valtellina Casera con indicate le principali molecole estratte. Ad eccezione dell'acetone, che potrebbe derivare dall'alimentazione dell'animale poiché ritrovato anche in latte appena munto, la presenza delle molecole rilevate è legata alle complesse reazioni biochimiche che hanno luogo nel formaggio durante la sua maturazione (McSweeney e Sousa, 2000), come riportato precedentemente nella de-

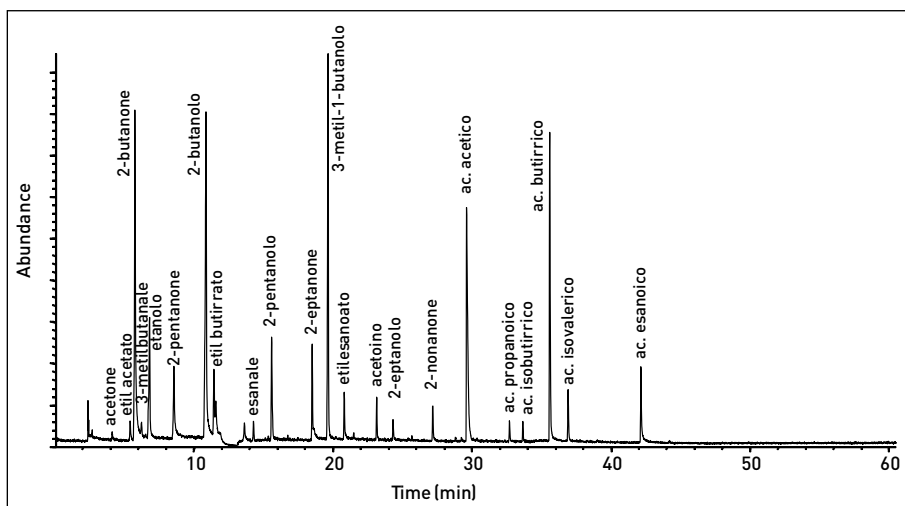


Figura 34 - Esempio di profilo SPME/GC/MS di formaggio Valtellina Casera

scrizione del formaggio Bitto. Anche per quanto riguarda la composizione della frazione volatile si è registrata una discreta variabilità. Le principali classi di molecole rilevate sono quelle di acidi, chetoni e alcoli. In nessun formaggio è stata riscontrata la presenza di terpeni, rilevati invece in qualche formaggio Bitto, ciò a conferma del fatto che tali molecole sono legate all'alimentazione al pascolo dell'animale. Relativamente alle caratteristiche della frazione volatile dei formaggi Valtellina Casera ottenuti senza impiego dell'innesto e con le tre miscele di fermenti autoctoni si possono fare alcune considerazioni. Tra i campioni prodotti senza innesto si distingue in particolare il n°78 la cui frazione volatile è risultata caratterizzata da elevate quantità di chetoni e alcoli. Inoltre, nella classe degli acidi è stato riscontrato un valore particolarmente elevato di acido propionico, indice molto probabilmente dello sviluppo più intenso dei microrganismi responsabili della sua formazione. I formaggi n°80 e 85 hanno mostrato un valore globale molto elevato di alcoli e, nel caso del n°85, anche di acidi. In generale, poi, i formaggi prodotti senza impiego dell'innesto si sono caratterizzati per una differente composizione della frazione volatile, soprattutto per ciò che riguarda la classe degli esteri, con l'eccezione del n°83, risultato privo

di queste molecole. Nei formaggi ottenuti senza starter, infatti, sono state rilevate molecole quali etil propionato, metilpropil estere dell'acido acetico e dell'ac. propanoico, assenti sia nei formaggi prelevati alla Mostra che nei Valtellina Casera prodotti successivamente nelle stesse aziende con l'impiego delle miscele. Ciò può essere spiegato con lo sviluppo di fermentazioni particolari che hanno determinato uno sbilanciamento dei normali equilibri e condizioni favorevoli per un'attività più intensa degli enzimi esterasi, responsabili della sintesi di questi composti. Inoltre, ciò può in parte spiegare anche i giudizi non positivi dati dalla giuria su questi formaggi: gli esteri sono molecole caratterizzate da note aromatiche di fruttato, ma ciò può non essere sempre accettato o, come tutte le sostanze volatili, se l'equilibrio viene alterato, la sensazione odorosa può diventare sgradevole e originare un difetto.

I formaggi ottenuti senza innesto sono stati valutati insieme a quelli prelevati nell'ambito della Mostra dello stesso anno (2009): il data set sul quale è stata condotta l'Analisi delle Componenti Principali (Figura 35) è risultato costituito, quindi, da 9 variabili (% sostanza secca, % grasso sul secco, % proteine sul secco, % ceneri sul secco, % NCN, % NPN, alcoli, chetoni, esteri e acidi) e 16 oggetti (6 formaggi

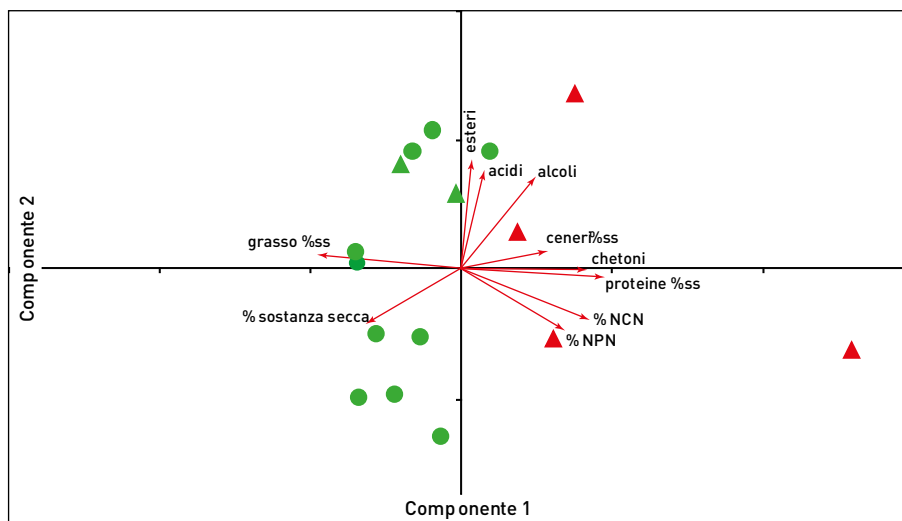


Figura 35 - Biplot dei 16 i campioni (10 formaggi della Mostra, cerchio, e 6 formaggi della sperimentazione ottenuti senza innesto, triangolo) e delle 10 variabili (analisi di base e classi di sostanze volatili). Giudizio della giuria - in verde = punteggio sufficiente; in rosso = punteggio insufficiente. Varianza totale spiegata 67,1%.

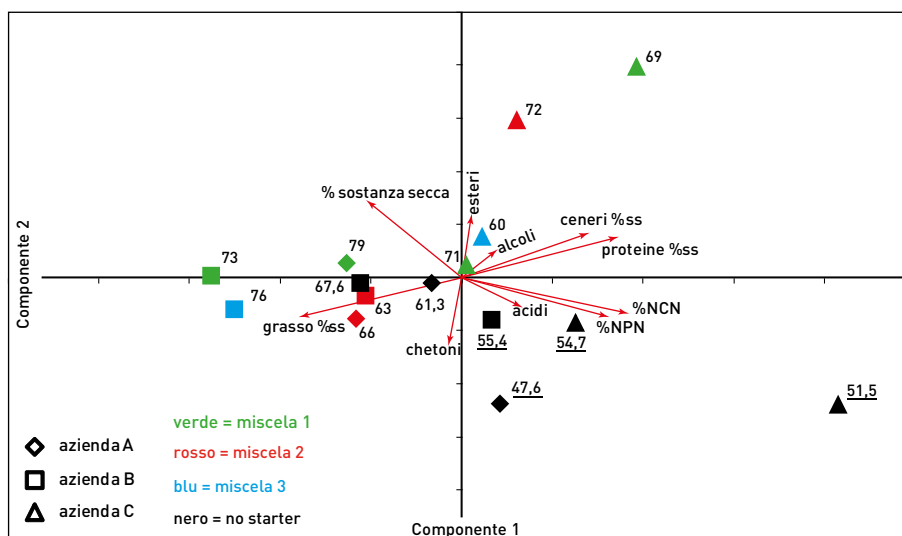


Figura 36 - Biplot dei 15 i campioni (6 formaggi ottenuti senza innesto e 9 formaggi ottenuti con le tre miscele starter) e delle 10 variabili (analisi di base e classi di sostanze volatili). m1, m2, m3 = miscele starter provate; campioni con solo simbolo = formaggi ottenuti senza innesto. In carattere corsivo = punteggi della giuria. Varianza totale spiegata 56,2%.

ottenuti senza innesto e 10 formaggi della Mostra). Si può notare una tendenza alla separazione tra i formaggi in accordo con il punteggio assegnato dalla giuria di assaggiatori: i Valtellina Casera che avevano ottenuto i punteggi insufficienti si collocano nella zona destra del grafico, dove pesano soprattutto le variabili % NCN, % NPN, % proteine, chetoni, alcoli. Ciò significa che molto probabilmente l'elevata quantità di

molecole volatili delle classi di chetoni e alcoli, così come un andamento non corretto della proteolisi ha comportato l'insorgenza di difetti che hanno determinato per questi campioni un giudizio negativo. Al contrario, invece, i formaggi che avevano ottenuto un punteggio sufficiente si trovano nella zona opposta del grafico: ciò potrebbe significare che sono caratterizzati da una composizione in sostanze

volatili e da una proteolisi meno intensa e quindi più equilibrate. I formaggi ottenuti con l'impiego delle miscele starter sono risultati caratterizzati da una composizione della frazione volatile in accordo con

quella dei Valtellina Casera della Mostra e tutti hanno ottenuto un punteggio positivo. Dalla valutazione statistica dei dati di composizione centesimale e della frazione volatile dei formaggi della sperimentazione

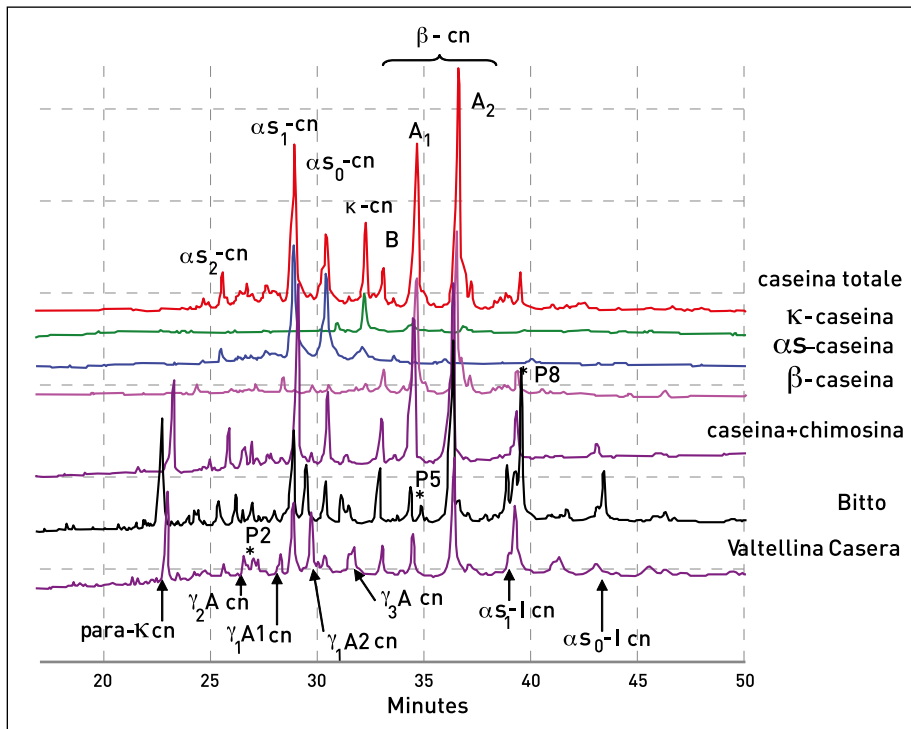


Figura 37 - Elettroferogramma di un campione di formaggio Valtellina Casera confrontato con un campione di Bitto e standard commerciali delle principali frazioni caseiniche. Sono indicate le frazioni caseiniche integre ed i principali prodotti di degradazione. Para-k - Para-k caseina; α₂ - α₂-caseina; γ₂A - γ₂A-caseina; γ₁A₁ - γ₁A₁-caseina; α₁ - α₁-caseina; γ₁A₂ - γ₁A₂-caseina; α₀ - α₀-caseina; γ₃ - γ₃-caseina; βB - βB-caseina; βA₁ - βA₁-caseina; βA₂ - βA₂-caseina; α₁-I - α₁-I-caseina. P=peptidi incogniti derivanti dalla degradazione proteica.

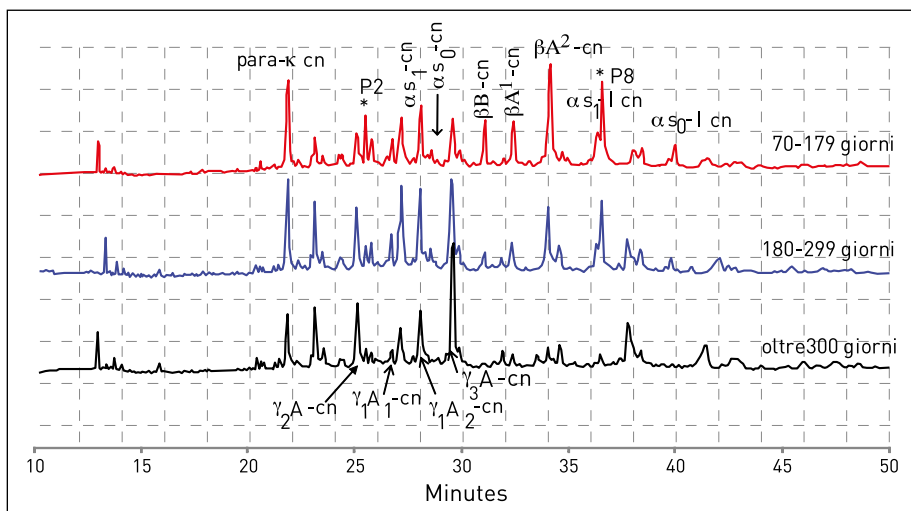


Figura 38 - Elettroferogrammi di formaggio Valtellina Casera a diversi periodi di stagionatura ottenuti mediante CZE-UREA. Sono indicate le frazioni caseiniche integre ed i principali prodotti di degradazione. Per la legenda vedi Figura 37.

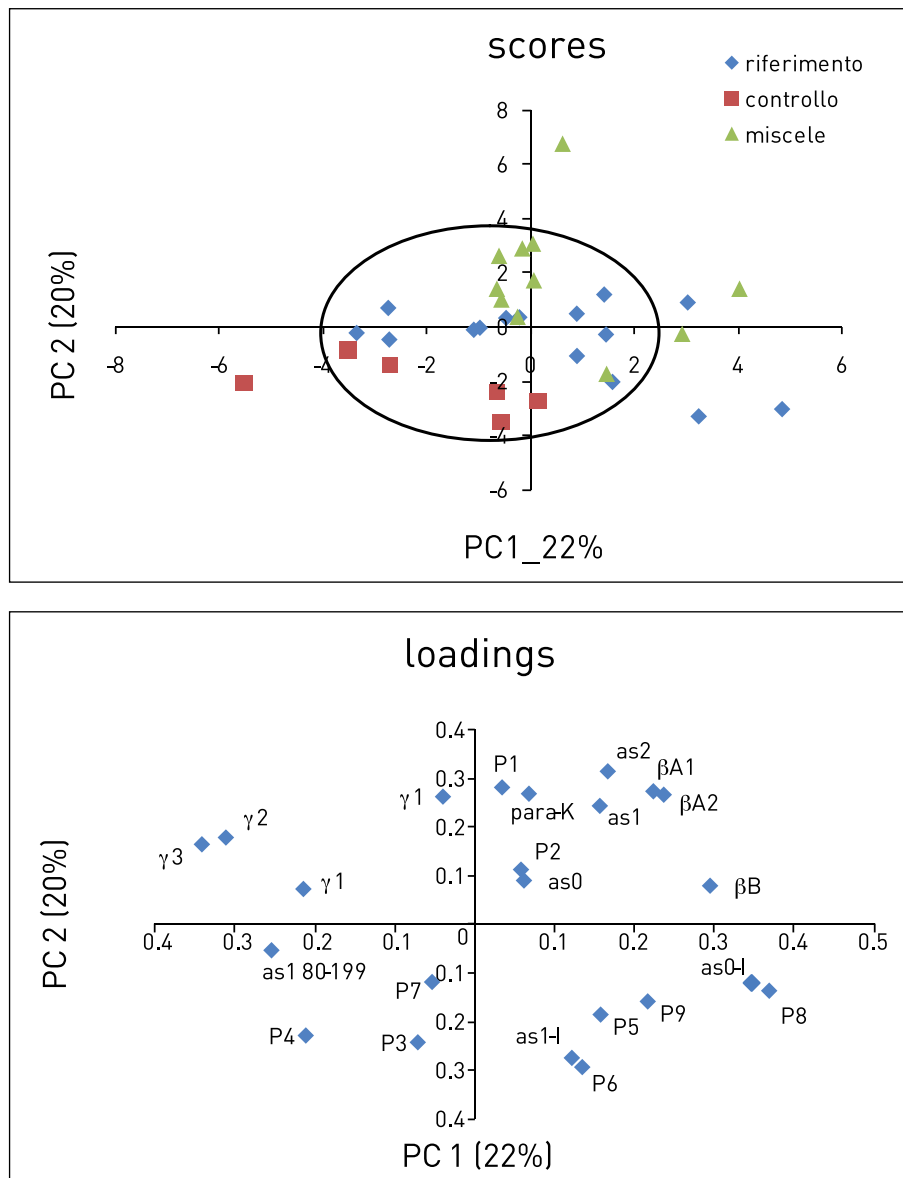


Figura 39 - Analisi PCA applicata alle aree normalizzate degli elettroferogrammi dei campioni di formaggio riferimento, controllo (prodotti senza fermenti aggiunti) e prodotti con le miscele starter. Sono indicate le frazioni caseiniche integre ed i principali prodotti di degradazione. Per la legenda vedi Figura 37.

(sia ottenuti senza innesto, che con le miscele starter) si evidenzia una separazione in base al punteggio della giuria. I formaggi prodotti senza starter e giudicati insufficienti si posizionano in una diversa zona del grafico rispetto a quelli che avevano ricevuto un giudizio positivo, sia ottenuti senza innesto che con le miscele (Figura 39), che invece si collocano insieme ai Valtellina Casera prodotti con le miscele, che avevano ottenuto tutti un punteggio posi-

tivo. Anche in questo confronto le variabili che pesano maggiormente nella separazione sono le due frazioni azotate % NCN e % NPN. Per ciò che riguarda le tre miscele di fermenti impiegate, non si sono evidenziate differenze tra i formaggi in relazione all'utilizzo di una miscela di fermenti autoctoni piuttosto di un'altra, mentre si osserva una leggera separazione dei Valtellina Casera dell'azienda C rispetto a quelli delle aziende A e B.

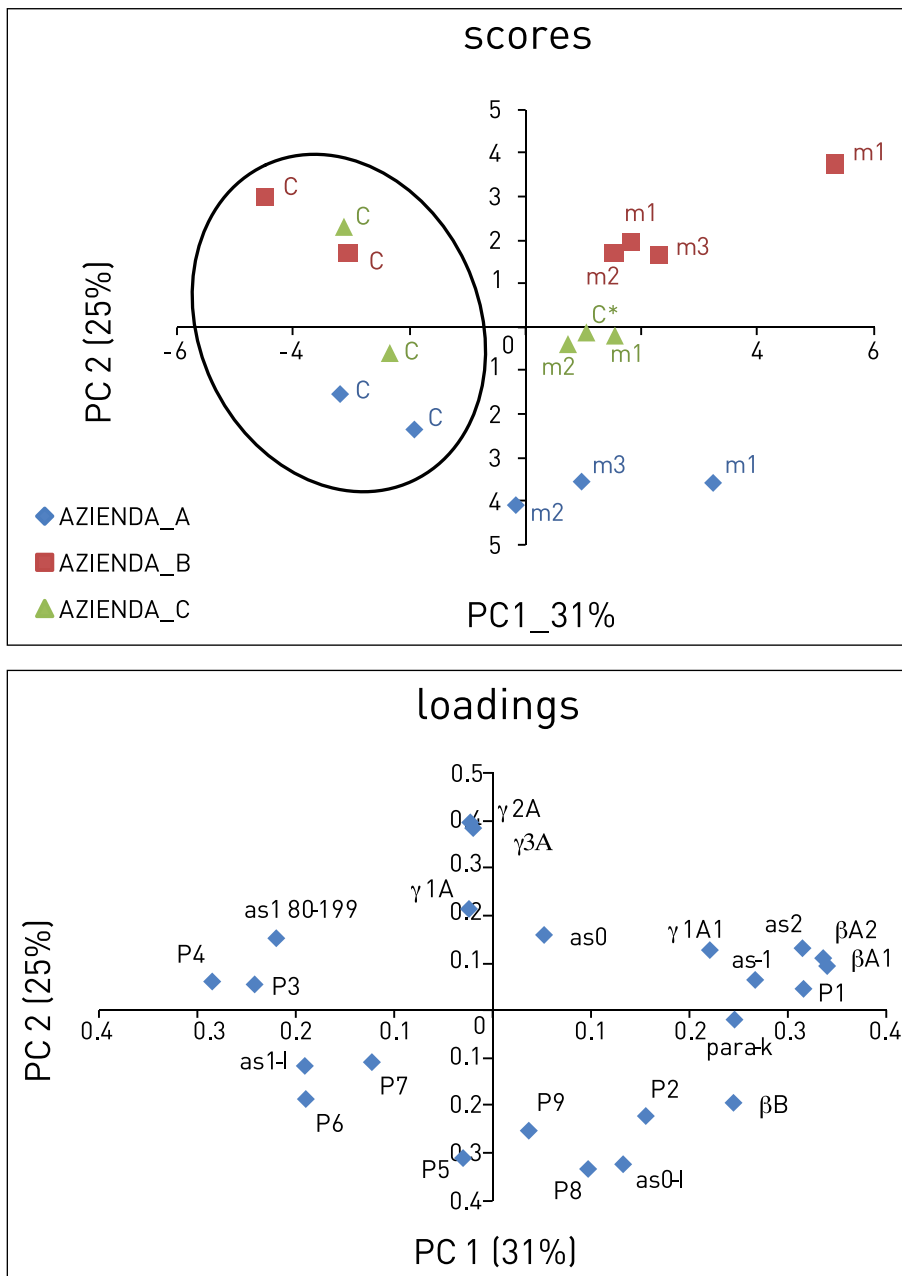


Figura 40 - Analisi PCA applicata alle aree normalizzate degli elettroferogrammi dei campioni di formaggio prodotti dalle tre aziende partecipanti alla sperimentazione - C = campioni controllo prodotti senza starter; m1, m2 e m3 = campioni prodotti con le tre miscele starter; per la legenda vedi Figura 37.

PROFILO PROTEICO

Tutti i formaggi sono stati sottoposti allo studio della frazione proteica mediante elettroforesi capillare zonale in presenza di urea (CZE-UREA); in Figura 37 è riportato un esempio di tracciato relativo al Valtellina Casera e agli standard commerciali impiegati per il riconoscimento delle principali frazioni caseiniche. Essendo il Val-

tellina Casera un formaggio a pasta semicotta, l'azione idrolitica principale nel corso della stagionatura è svolta dalla plasmina, che degrada soprattutto le β -caseine, con formazione di γ -caseine. In Figura 38 vengono riportati esempi di elettroferogrammi relativi a formaggio Valtellina Casera a diversi periodi di stagionatura. E' possibile osservare una degradazione

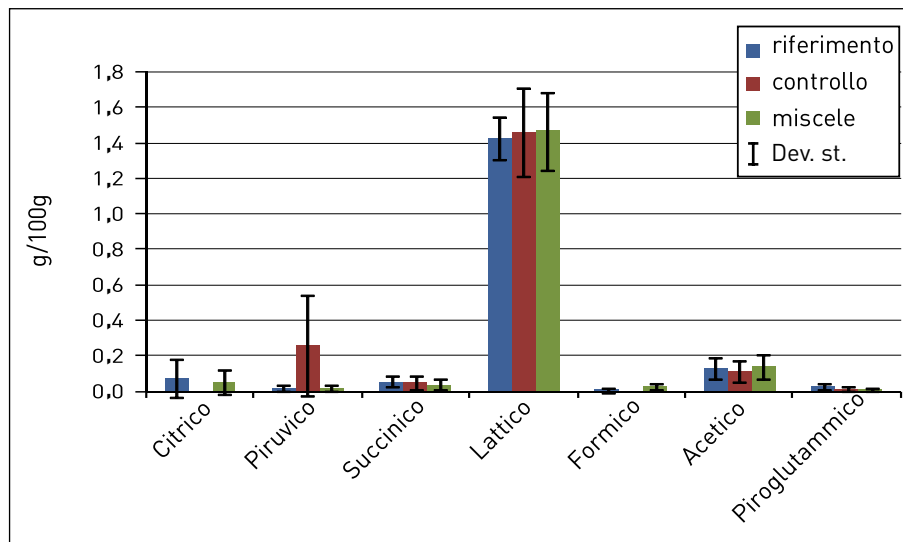


Figura 41 - Contenuto in acidi organici nei campioni di Valtellina Casera allo studio - riferimento = data set prelevato alla fiera del Bitto per valutare la variabilità del prodotto; controllo = formaggi prodotti senza innesto; miscele = formaggi prodotti usando le due miscele sperimentali.

anche dell' α s1-caseina, che potrebbe essere imputabile, come per il Bitto, ad una incompleta denaturazione della chimosina, oppure all'attività di un'altra proteinasi, quale ad esempio la catepsina D, oppure al corredo enzimatico della microflora presente. L'analisi PCA applicata alle aree normalizzate degli elettroferogrammi dei campioni di formaggio ha evidenziato una disposizione dei campioni in base al grado di proteolisi, che aumenta dal quadrante a destra in alto a quello in basso a sinistra (Figura 39). I valori riscontrati mediante analisi CZE ben si accordano con i dati relativi alla composizione di base dei campioni, in particolare i valori di azoto non caseinico (% NCN) e non proteico (% NPN) espressi sulla sostanza secca. I campioni prodotti senza innesto (controllo) risultano avere un grado di proteolisi più elevato rispetto agli altri, probabilmente in conseguenza del fatto che presentavano un contenuto maggiore di umidità, che può aver favorito i fenomeni proteolitici. È possibile comunque evidenziare un raggruppamento della maggior parte dei campioni in un nucleo centrale, mentre alcuni formaggi, che avevano valori della composizione di

base "anomali", se ne discostano decisamente. Questa minore variabilità dei campioni di Valtellina Casera può derivare dalle condizioni di produzione di questo formaggio, più standardizzate rispetto alle condizioni di produzione del Bitto. Effettuando una valutazione statistica dei campioni della sperimentazione (Figura 40) si è evidenziata una disposizione dei campioni prodotti dalle tre aziende su piani paralleli, in funzione dei peptidi che erano già stati individuati nei Bitto e che derivano probabilmente dalla microflora non starter, selezionatasi naturalmente in ciascun ambito produttivo. Contemporaneamente, è possibile evidenziare, come già notato in precedenza, un raggruppamento dei campioni controllo nel lato sinistro del piano, dovuto un maggiore grado di proteolisi.

COMPOSIZIONE IN ACIDI ORGANICI

I campioni di Valtellina Casera allo studio, suddivisi nei tre gruppi (data set prelevato alla fiera del Bitto per valutare le caratteristiche del prodotto, formaggi prodotti senza innesto e formaggi prodotti usando le due miscele starter sperimentali) sono stati sottoposti ad analisi HPLC degli zuccheri resi-

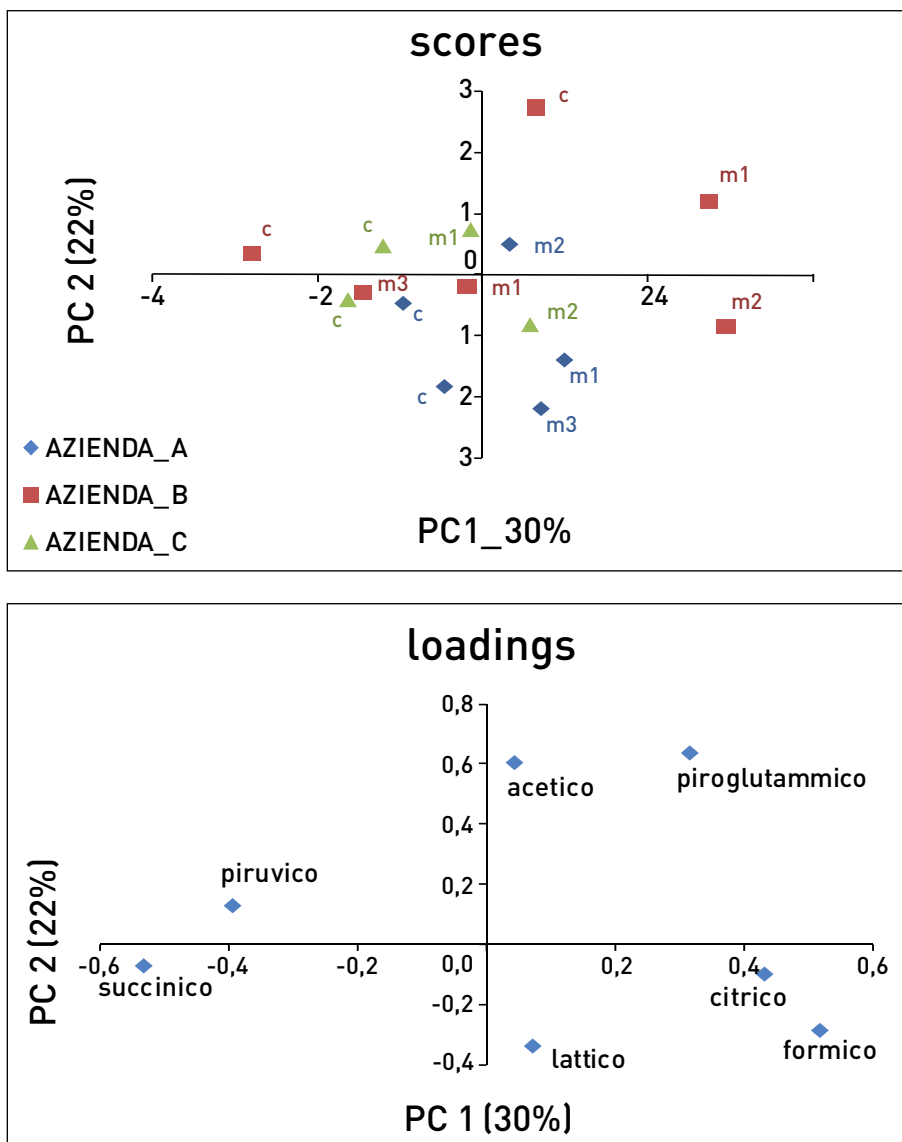


Figura 42 - PCA del contenuto in acidi organici nei campioni di Valtellina Casera allo studio - c = formaggi controllo prodotti senza innesto, m1, m2, m3 = formaggi prodotti usando le tre miscele sperimentali.

dui e degli acidi organici (Figura 41). Anche nel caso del Valtellina Casera non sono stati riscontrati zuccheri residui, e il prodotto principale della fermentazione microbica è risultato essere l'acido lattico, in quantità piuttosto variabile ma non statisticamente differente nei tre gruppi di formaggi. Come già evidenziato per il Bitto, nella frazione degli acidi organici il principale è l'acido acetico, importante per il flavour del prodotto. Inoltre, particolarmente rilevante è risultato il contenuto in acido piruvico nei campioni ottenuti senza innesto (controllo): tale comportamento sembrerebbe im-

putabile ai diversi pattern metabolici che si manifestano in funzione della microflora presente. A differenza di quanto riscontrato per il formaggio Bitto, nel Valtellina Casera non è stato rilevato acido butirrico. L'analisi PCA dei campioni della sperimentazione (Figura 42) non ha evidenziato una separazione dei campioni né in base al produttore, né in base alla lavorazione; è possibile comunque notare la tendenza dei campioni controllo a raggrupparsi a sinistra del plot, in funzione del contenuto degli acidi succinico e piruvico, particolarmente abbondanti in questi formaggi.

CONCLUSIONI

La conservazione e la valorizzazione dei prodotti tipici devono necessariamente fare i conti con la continua evoluzione di tutte le componenti che incidono sul sistema *terroir* e, contrariamente a quanto talvolta si pensa, non possono quindi prescindere da un continuo rinnovamento. Qualsiasi innovazione intrapresa per la difesa della qualità dei prodotti deve avere però come presupposto una conoscenza puntuale dei fattori che influenzano le caratteristiche del prodotto e possibilmente delle loro relazioni, così da evitare il rischio di modificare in senso negativo i tratti tipici.

Il progetto VALTEC ha portato alla definizione delle caratteristiche compositive e microbiologiche dei formaggi DOP valtellinesi, indagando per il Bitto anche le possibili relazioni tra la composizione floristica del pascolo e le caratteristiche del formaggio. Con l'intento di riprodurre il più fedelmente possibile ciò che spontaneamente avviene durante la caseificazione, si sono individuati i batteri lattici maggiormente presenti nelle prime fasi del processo di caseificazione. Lo studio delle caratteristiche di interesse tecnologico degli isolati ha rappresentato, quindi, il primo passo per la selezione di biotipi idonei per la formulazione di miscele starter autoctone che sono state successivamente valutate in produzioni sperimentali.

La ricerca svolta ha evidenziato la presenza in entrambi i formaggi di una preziosa biodiversità microbica: per il Bitto sono stati isolati 211 ceppi di batteri lattici appartenenti a ben 23 specie ed anche una nuova specie, a cui è stato attribuito il nome di "*Enterococcus lactis*"; per il Valtellina Casera sono stati isolati 96 ceppi di

batteri lattici appartenenti a 18 specie. Tra i ceppi autoctoni isolati sono stati selezionati i ceppi per la formulazione delle miscele starter da sperimentare. Tali ceppi si sono dimostrati in grado di prevalere nella cagliata assicurando una corretta acidificazione e, successivamente, sono andati riducendosi in modo significativo nel corso della stagionatura, permettendo alla microflora naturalmente presente nel latte di svilupparsi, determinando le caratteristiche sensoriali del formaggio.

Lo starter ha dimostrato di costituire un ausilio per la corretta conduzione della caseificazione e quindi per l'ottenimento di formaggi con le caratteristiche desiderate, senza però standardizzare la produzione. I formaggi prodotti con gli starter autoctoni sono rientrati, per i parametri chimici considerati (composizione di base, della frazione volatile, degli acidi organici e profilo proteico), nei range di composizione media della DOP.

In particolare, nel caso del Bitto, i formaggi dei diversi produttori presso i quali sono stati sperimentati gli starter sono risultati distinguibili tra loro, dimostrando come, nonostante l'impiego delle stesse miscele di fermenti, l'identità di ciascuna azienda risulti comunque preservata e confermando che le caratteristiche dell'allevamento e la pratica casearia rappresentano elementi determinanti.

La relazione tra il pascolo e la qualità chimica e sensoriale del formaggio Bitto è risultata molto complessa, date le numerosissime variabili coinvolte e la difficoltà a separarne gli effetti.

I risultati ottenuti ribadiscono ancora una volta come nei formaggi di malga prodot-

ti a partire da latte crudo la relazione tra alimentazione e caratteristiche qualitative del prodotto sia di difficile investigazione. Tuttavia, anche in situazioni ambientali tutto sommato non molto difformi in termini ecologici, di modalità di conduzione del pascolo e di lavorazione del latte, quali erano quelle in cui si è operato, il profilo floristico dei cotici è sembrato poter influenzare alcune caratteristiche chimiche del formaggio. Tali effetti non hanno però saputo spiegare la variabilità organolettica, nonostante numerosi legami tra i descrittori sensoriali e varie molecole. Poiché non è realistico ipotizzare una totale insignificanza dell'alimentazione, si deve desumere che fattori estranei ai cotici siano intervenuti ad attenuarne o alterarne gli effetti sul formaggio. Si tratta dei fattori già presenti in fase di pascolamento (animali, carichi istantanei e com-

plexivi per unità di superficie, fenologia delle specie, coefficienti di utilizzazione della biomassa, condizioni meteorologiche e altro ancora), decisivi per la quantità e la qualità dei prelievi, come di tutti i fattori coinvolti nelle successive fasi della mungitura, lavorazione e conservazione del prodotto. L'azione del fattore di interesse potrebbe quindi essere stato mascherato o sovrastato dalla presenza di moltissimi effetti confusi. Si conferma, pertanto, che il *terroir* non può essere fatto discendere da singole componenti del sistema, bensì dal complesso di interazioni tra ambiente, animali e uomo. Il pascolo, le cui prerogative floristiche dipendono, esse stesse, da tali interazioni, ne rappresenta uno dei cardini, nonostante la sua influenza diretta sulla qualità sensoriale dei prodotti caseari non sia, come nel caso esaminato, facilmente spiegabile.





BIBLIOGRAFIA

- Andrighetto C., Borney F., Barmaz A., Stefanon B., Lombardi A. 2002. Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheese. *Int. Dairy J.* 12, 141-144.
- Bastian E.D., Brown R.J. 1996. Plasmin in milk and dairy products: an update. *Int. Dairy J.* 6, 435-457.
- Beresford T., Williams A. 2004. The Microbiology of Cheese Ripening. In Cheese Chemistry, Physics & Microbiology Vol.1, General aspects. Third edition, Edited by P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee, Elsevier Academic Press, London.
- Beuvier E., Buchin S. 2004. Raw Milk Cheeses. In Cheese Chemistry, Physics & Microbiology Vol.1, General aspects. Third edition, Edited by P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee, Elsevier Academic Press, London.
- Bosset J.O., Butikofer U., Gauch R., Sieber R. 1994. Caracterisation de fromages d'alpages subalpains suisses: Mise en evidence par GC/ MS de terpenes et d'hydrocarbures aliphatiques lors de l'analyse par "Purge and Trap" des aromes volatils de ces fromages. *Schweiz Milchw. Forsch.* 23, 37-41.
- Bosset J.O., Jeangros B., Berger T., Bütikofer U., Collomb M., Gauch R., Lavanchy P., Scehovic J., Sieber R. 1999. Comparaison de fromages à pâte dure de type gruyère produits en region de montagne et de plaine. *Rev. Suisse Agric.* 31, 17-22.
- Bouzas J., Kantt C.A., Bodyfelt F., Torres J.A. 1991. Simultaneous determination of sugars and organic acids in Cheddar cheese by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* 56 (1), 276-278.
- Bovolenta S., Ventura W., Malossini F. 2002. Dairy cows grazing an alpine pasture: effect of pattern of supplement allocation on herbage intake, body condition, milk yield and quality and coagulation properties. *Anim. Res.* 51, 15-23.
- Brasca M., Lodi R., Morandi S., Todesco R. 2006. Isolamento e studio della microflora autoctona caratteristica di alcune produzioni casearie lombarde. *Sci. Tecn. Latt. - Cas.* 57, 331-343.
- Brasca M., Morandi S., Lodi R., Tamburini A. 2007. Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1516-1524.
- Braun-Blanquet J. 1928. Pflanzensoziologie. Springer, Verl Wien.
- Buchin S., Martin B., Dupont D., Bornard A., Achilleos C. 1999. Influence of the composition of Alpine highland pasture on the chemical, rheological and sensory properties of cheese. *J. Dairy Res.* 66, 579-588.
- Buchin S., Salmon J. C., Carnat A. P., Berger T., Bugaud C., Bosset J.O. 2002. Identification de composés monoterpéniques, sesquiterpéniques et benzéniques dans un lait d'alpage très riche en ces substances. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 93, 199-216.
- Bugaud C., Buchin S., Hauwuy A., Coulon J.B. 2002. Texture et flaveur du fromage selon la nature du pâturage: cas du fromage d'Abondance. *INRA Prod. Anim.* 15, 31-36.
- Campos A.C., Rodríguez O., Calo-Mata P., Prado M., Barros-Velásquez J. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.* 39, 356-364.
- CLSI 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement. M100-S17. NCCLS, Wayne, Pa.
- Cogan T.M., Barbosa M., Beuvier E., Bianchi-Salvadori B., Cocconcelli P.S., Fernandes I., Gomez J., Gomez R., Kalantzopoulos G., Ledda A., Mediana M., Rea M.C., Rodriguez E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, *J. Dairy Res.* 64, 409-421.
- Coker C.J., Crawford R.A., Johnston K.A., Singh H., Creamer L.K. 2005. Towards the classification of cheese variety and maturity on the basis of statistical analysis of proteolysis data-a review. *Int. Dairy J.* 15, 631-643.
- Cornu A., Carnat A.P., Martin B., Coulon J.B., Lamaison J.L., Berdague J.L. 2001. Solid phase microextraction of volatile components from natural grassland plants. *J. Agric. Food Chem.* 49, 203-209.
- Curioni P.M.G., Bosset J.O. 2002. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy J.* 12, 959-984.
- Dagnelie P. 1986. Analyse statistique à plusieurs variables. Le presses agronomique de gembloux.

- De Noni I, Battelli G. 2008. Terpenes and fatty acid profiles of milk fat and "Bitto" cheese as affected by transhumance of cows on different mountain pastures. *Food Chem.* 109, 299-309.
- Dumont J.P., Adda J. 1978. Occurrence of sesquiterpenes in mountain cheese volatiles. *J. Agric. Food Chem.* 26, 364-367.
- Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Fox P.F., McSweeney P.L.H. 1998. Chemistry and biochemistry of cheese and fermented milks. In *Dairy chemistry and biochemistry*, P.F. Fox and P.L.H. McSweeney Eds., Thomson Science, UK, Chapter 10.
- Framondino V., Gasperi F., Biasioli F., Endrizzi I., Calovi S., Ventura W., Saccà E., Bovolenta S. 2005. Effetto dell'integrazione alimentare di vacche dal latte in alpeggio sulle caratteristiche sensoriali di latte e formaggio. In: *Caratterizzazione di formaggi tipici dell'arco alpino: il contributo della ricerca*. Istituto Agrario San Michele all'Adige, 67-77.
- Giraffa G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215-222.
- Haldemann J. 2010. Caratterizzazione generale dei formaggi d'alpe ticinesi DOP. *ALP science*, 535, 19 pp.
- Hayes M.G., Hurley M.J., Magboul A.A., Larsen L.B., Heegard C.W., Magboul A.A., Oliveira J.C., McSweeney P.L.H., Kelly A.L. 2001. Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D. *J. Dairy Res.* 68, 267-276.
- Hosseini S.V., Arlindo S., Böhme K., Fernández-No C., Calo-Mata P., Barros-Velázquez J. 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strains isolated from non fermented animal foods. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1392-1403.
- Hull M.E. 1947. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of partial hydrolysis of the proteins of milk. *J. Dairy Sci.* 30, 881-884.
- Hurley M.J., Larsen L.B., Kelly A.L., McSweeney P.L.H. 2000. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *Int. Dairy J.* 10, 673-681.
- Janhøj T., Qvist K.B. 2010. The formation of cheese curd. In *Technology of Cheesemaking*, Second Edition, Edited by Barry A. Law and A.Y. Tamime, Blackwell Publishing Ltd, UK.
- Jokovic N., Nikolic M., Begovic J., Jovic B., Savic D., Topisirovic L. 2008. A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *Int. J. Food Microbiol.* 27, 305-311.
- Landolt E. 1977. *Okologische Zeigerwerte zur Schweizer Flora*. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes Eidg. Techn. Hochschule Stiftung Rübel, Heft 64, Zürich.
- Lick S., Keller M., Bockelmann W. 1996 Heller K.J., Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its lacZ gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 74-77.
- Lodi R., Brasca M., Masa B., Tamburini A., Erini S., Turchetti E. 2005. Effetti dell'integrazione alimentare sulle caratteristiche del formaggio Bitto. *Quaderni SOZOOALP 2*, 140-156.
- Mariaca R.G., Berger T.F.H., Gauch R., Imhof M.I., Jeangros B., Bosset J.O. 1997. Occurrence of volatile mono- and sesquiterpenoides in highland and lowland plant species as possible precursors for flavor compounds in milk and dairy products. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4423-4434.
- Martin B., Buchin S., Hauwuy A. 2001. Effet de la nature botanique des pâturages sur les caractéristiques sensorielles du fromage de Beaufort. In: *I formaggi d'alpeggio e loro tracciabilità*. ANFOSC ed. Bella, 230-237.
- Martin B., Coulon J.B. 1995. Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. Influence des caractéristiques des laits de troupeaux et des pratiques fromagères sur les caractéristiques du reblochon de Savoie fermier. *Lait* 75, 133-149.
- McSweeney P.L.H. 2004. Biochemistry of cheese ripening: Introduction and Overview. In *Cheese Chemistry, Physics & Microbiology Vol. 1 General aspects*. Edited by Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan, and Timothy P. Guinee, Elsevier Academic Press, London.
- McSweeney P.L.H., Fox P.F. 1995. Proteolysis of bovine caseins by Cathepsin D: preliminary observations and comparison with chymosin. *Int. Dairy J.* 5, 321-336.
- McSweeney P.L.H., Sousa M.J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* 80, 293-324.
- Meilgaard M., Vance Civile G., Carr B.T. 1999. *Sensory Evaluation techniques*. CRC Press, Boca aton, FA, USA
- Morandi S., Brasca M., Alfieri P., Lodi R., Tamburini A. 2005. Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Lait* 3, 181-192.
- Morandi S., Brasca M., Andrighetto C., Lombardi A., Lodi R. 2006. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *Int. Dairy J.* 16, 867-875.
- Morandi S., Brasca M., Lodi R. 2010. Studio del profilo microbico del formaggio Semuda e caratterizzazione genotipica, fenotipica e tecnologica

- dei batteri lattici isolati. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* 60, 139-152.
- Morandi S., Brasca M., Lodi R. 2011. Technological, phenotypic and genotypic characterization of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. *Dairy Sci. & Technol.* 91, 341-359.
- Peron L. 2000. Statistical analysis of sensory data: data reduction and Generalised Procrustes analysis. *Food Qual. Prefer.* 11, 155-157.
- Piano E. 2010. Progetto ProAlpe I terroir delle Alpi per la caratterizzazione e la difesa delle produzioni casearie d'alpeggio. Schede tecnico divulgative e SIT di terroir. Centro di Ricerca per le produzioni foraggere e lattierocasearie. Lodi.
- Pignatti S. 1982. Flora d'Italia. Edagricole, Bologna, I- II e III.
- Povolo M., Contarini G., Mele M., Secchiari P. 2007. Study on the influence of pasture on volatile fraction of ewes' dairy products by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Dairy Sci.* 90, 556-569.
- Recio I., Amigo L., Ramos M., Lopez-Fandino R. 1997. Application of capillary electrophoresis to the study of proteolysis of caseins. *J. Dairy Res.* 64, 221-230.
- Recio I., Olieman C. 1996. Determination of denaturated serum proteins in the casein fraction of heat treated milk by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 17 (7), 1228-1233.
- Scehovic J. 1990. Tanins ed autres polymers phénoliques dans les plantes des prairies: détermination de leur teneur et de leur activité biologique. *Rev. Suisse Agric.* 22, 179-184.
- Scehovic J. 1991. Considérations sur la composition chimique dans l'évaluation de la qualité des fourrages des prairies naturelles. *Rev. Suisse Agric.* 23, 305-310.
- Upadhyay V.K., McSweeney P.L.H., Magboul A.A.A., Fox P.F. 2004. Proteolysis in Cheese during Ripening. In *Cheese Chemistry, Physics & Microbiology Vol. 1 General aspects*. Edited by Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., and Guinee T.P., Elsevier Academic Press, London.
- Van Hoorde K., Vandamme P., Huys G. 2008. Molecular identification and typing of lactic acid bacteria associated with the production of two artisanal raw milk cheeses. *Dairy Sci. Technol.* 88, 445-455.
- Verdier-Metz I., Pradel P., Coulon J.B. 2002. Influence of the forage type and conservation on the cheese sensory properties. In: *Multi-fonction grasslands: quality forages, animal products and landscapes*. J.L. Durand, J.C. Emile, C. Huyghe and G. Lemaire. British Grassland Society, 604-605.
- Viallon C., Martin B., Verdier-Metz I., Pradel P., Garel J.P., Coulon J.B., Berdagué J.L. 2000. Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat. *Lait* 80, 635-641.
- Walter J.G.W., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR primers. *App. Environ. Microb.* 66, 297-303.
- Werner W., Paulissen D. 1987. Archivio Programma VegBase. Istituto di Fisiologia Vegetale, Dipartimento di Geobotanica Università di Dusseldorf, 21 pp.
- Whittaker R.H. 1967. Gradient analysis of vegetation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 42, 207-264.

DIFFUSIONE DEI RISULTATI

- Brasca M., Povo M., Passolungo L., Morandi S., Erini S., Lodi R. 2010. Effetti dell'introduzione di innesto selezionato di microrganismi caseari autoctoni sulle caratteristiche del formaggio DOP Bitto. II° Congresso Lattiero-Caseario "La ricerca scientifica e la valorizzazione del latte e dei derivati", Torino, 21 Settembre 2010. *Sci. Tecn. Latt. Cas.* (in press).
- Marinoni L., Locci F., Barzagli S., Cattaneo T.M.P. 2009. Determination of Free Amino Acids in Bitto Cheese: a Preliminary Approach. Atti 14th ICNIRS (International Conference on NIRS), 7-12 Novembre 2009, Bangkok, Thailandia.
- Marinoni L., Monti L., Torielli C., Cattaneo T.M.P. 2010. Valutazione delle caratteristiche qualitative di Bitto e Casera mediante tecniche spettroscopiche e chimiche. II° Congresso Lattiero-Caseario "La ricerca scientifica e la valorizzazione del latte e dei derivati", Torino, 21 Settembre 2010. *Sci. Tecn. Latt. Cas.* (in press).
- Monti L., Marinoni L., Locci F., Cattaneo T.M.P. 2010. Formaggio Bitto DOP: caratterizzazione della componente proteica e di alcuni metaboliti prodotti durante la maturazione. II° Congresso Lattiero-Caseario "La ricerca scientifica e la valorizzazione del latte e dei derivati", Torino, 21 Settembre 2010. *Sci. Tecn. Latt. Cas.* (in press).
- Monti L., Marinoni L., Negri S., Torielli C., Cattaneo T.M.P. 2009. Sensory characteristics of Bitto, a PDO Italian cheese, by NIR spectroscopy. Atti 14th ICNIRS (International Conference on NIRS), 7-12 November 2009, Bangkok, Thailandia.
- Morandi M., Brasca M., Lodi R., 2011 Technological, phenotypic and genotypic characterization of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. *Dairy Sci. & Technol.*: 91, 341-359
- Povo M., Cabassi G., Profaizer M., Lanteri S. 2011. Study on the use of Evolved Gas Analysis FT-IR (EGA FT-IR) for the evaluation of cheese volatile fraction. *Open Food Sci. J.* 5, 10-16.
- Convegno di presentazione dei risultati del progetto nell'ambito della 103a Mostra del Bitto Bitto: tipicità e innovazione in un formaggio DOP Morbegno, 15 ottobre 2010 Polo Fieristico Provinciale

METODI

ANALISI CHIMICHE

- Determinazione della sostanza secca del formaggio: metodo ISO 5534:2004
- Determinazione della sostanza grassa del formaggio: metodo ISO 3433:1975 Cheese - Determination of fat content - Van Gulik method.
- Determinazione del contenuto in proteine totali: metodo ISO 8968-3:2004 Milk - Determination of nitrose content - part 3: Block-digestion method (Semi-micro rapid routine method).
- Determinazione dell'azoto non caseinico (NCN) e dell'azoto non proteico (NPN): metodo Kjeldahl dopo precipitazione a pH 4.6 e con soluzione di acido tricloroacetico (TCA) rispettivamente.
- Determinazione del contenuto in ceneri: AOAC (2000). Official Methods of Analysis, vol. 2. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD.
- Estrazione ed analisi della frazione volatile: metodica riportata da Povo e coll. (2007).
- Determinazione della componente proteica: metodica riportata da Recio e Olieman (1996).
- Determinazione degli acidi organici: metodica riportata da Bouzas et al. (1991).

ANALISI MICROBIOLOGICHE, ISOLAMENTO E PRELIMINARE CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI BATTERICI

- Preparazione dei campioni e delle diluizioni: secondo norma ISO 8261/IDF 122: 2001.
- Carica Batterica Standard: Petrifilm Aerobic Plate Count (3M) con incubazione a 30 °C per 72 h secondo norma ISO/FIL 4833:2003;
- Coliformi: Petrifilm Coliform Count Plates (3M) a 30°C per 24 ore.
- *Escherichia coli*: Petrifilm E. coli Count Plates (3M) con incubazione a 30°C per 48 ore.
- Stafilococchi coagulasi positivi: secondo norma ISO 6888-2//IDF 145A: 1997.
- Lattobacilli mesofili (LAB in MRS 30 °C): MRS agar (Scharlau Microbiology) a 30°C per 72 ore in condizioni di anaerobiosi (ANAEROCULT A-MERCK).
- Lattobacilli termofili (LAB in MRS 45 °C): MRS agar a 45°C per 72 ore in condizioni di anaerobiosi.
- Cocchi lattici mesofili (LAB in M17 30 °C): M17 agar (Scharlau Microbiology) a 30°C per 48 ore.
- Cocchi lattici termofili (LAB in M17 45 °C): M17 agar (Scharlau Microbiology) a 45°C per 48 ore.
- Enterococchi: KAA agar (Scharlau Microbiology) a 37°C per 48 ore.
- Batteri lattici eterofermentanti obbligati in MRS brodo (Scharlau Microbiology) con campanella di Durham, incubato per 72 h a 30°C e successivamente a 37°C per 48 h e valutazione del MPN in triplo secondo ISO 7218:2007.

ELABORAZIONE DATI E ANALISI STATISTICA

Per l'elaborazione statistica dei dati si sono utilizzati i software XLSTAT 7.5 (Addinsoft, Francia) e Syn-tax 2000 (Podani).



t i p o g r a f i a

B E T T I N I s.r.l.



Regione Lombardia

Agricoltura

Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura
www.agricoltura.regione.lombardia.it