



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI ED AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

CARATTERIZZAZIONE MICROBIOLOGICA DEL  
FORMAGGIO PORTOGHESE A CAGLIO VEGETALE  
*QUEIJO DA BEIRA BAIXA DOP*

MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE  
PORTUGUESE THISTLE-CURDLED CHEESE  
*QUEIJO DA BEIRA BAIXA PDO*

TIPO TESI: SPERIMENTALE

Studente:  
ELENA URBISAGLIA

Relatore:  
CHIAR.MO PROF. ANDREA OSIMANI

Correlatore:  
DOTT.SSA FEDERICA CARDINALI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

Alle persone che mi sono sempre state a fianco

# SOMMARIO

SOMMARIO .....	3
ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE .....	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI .....	7
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE.....	8
1.1 Il formaggio e la sua storia.....	9
1.2 Processo di caseificazione.....	9
1.2.1 Uso di coagulanti animali .....	11
1.2.2 Uso di coagulanti vegetali.....	12
1.3 Formaggi portoghesi: storia e tradizione .....	15
1.4 Formaggio <i>Queijo da Beira Baixa</i> DOP: storia e caratteristiche.....	16
1.4.1 Processo di caseificazione e descrizione del formaggio .....	17
CAPITOLO 2 SCOPO DEL LAVORO .....	20
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI .....	21
3.1 Campionamento .....	21
3.2 Conte vitali in piastra .....	21
3.3 Analisi chimico-fisiche .....	25
3.3.1 Determinazione del pH.....	25
3.3.2 Determinazione dell'Acidità Totale Titolabile.....	25
3.4 Determinazione del contenuto di Acido Lattico .....	25
3.5 Determinazione del contenuto di Acido Acetico .....	26
3.6 Estrazione del DNA microbico da matrice .....	26
CAPITOLO 4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	29
4.1 Conte vitali in piastra di formaggio <i>Queijo da Beira Baixa</i> DOP .....	29
4.2 Risultati analisi chimico-fisiche.....	31
CONCLUSIONI .....	33

BIBLIOGRAFIA ..... 34

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-1: Pezzature tipiche del formaggio Queijo da Beira Baixa DOP.....	17
Tabella 3-1: Composizione terreno RB .....	22
Tabella 3-2: Composizione terreno MSA .....	22
Tabella 3-3: Composizione terreno ESA .....	23
Tabella 3-4: Composizione terreno M17 .....	23
Tabella 3-5: Composizione terreno MRS .....	24
Tabella 3-6: Composizione terreno VRBGA.....	24
Tabella 4-1: Risultati conte vitali in piastra di campioni di formaggio Queijo da Beira Baixa DOP.....	29
Tabella 4-2: Media e deviazione standard del pH, TTA, acido lattico e acido acetico.....	31

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Diagramma di flusso della caseificazione del formaggio Queijo da Beira Baixa DOP.....	18
--	----

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

# Capitolo 1

## INTRODUZIONE

*“Il nome di "formaggio" o "cacio" è riservato al prodotto che si ricava dal latte intero o parzialmente o totalmente scremato, oppure dalla crema, in seguito a coagulazione acida o presamica, anche facendo uso di fermenti e di sale di cucina”.* Questa è la definizione presente nell’articolo 32, capo IV, del R.D.L. 15 ottobre 1925, n. 2033, “Repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari” (Gazzetta, 1925).

In base all’articolo n. 15 del R.D. 994/9 maggio 1929, tuttora in vigore ,<<per latte alimentare deve intendersi il prodotto della mungitura regolare, interrotta e completo della mammella di animali in buono stato di salute e di nutrizione>>.

Il latte è una soluzione acquosa di colore bianco costituita da proteine in fase colloidale, lipidi, vitamine liposolubili in emulsione, carboidrati e sali minerali in soluzione. Le proteine sono suddivise in caseine e in proteine del siero, mentre nell’ambito della frazione lipidica le componenti più abbondanti sono acidi grassi saturi e colesterolo. Lo zucchero principale è il lattosio, mentre i sali minerali più abbondanti sono calcio, sodio, potassio e fosforo, infine per quanto concerne le vitamine, le più abbondanti sono A, B e D.

Con la parola latte deve intendersi il latte prodotto esclusivamente dalla mungitura della vacca, per il prodotto della mungitura di altri animali deve essere specificato nel nome latte di capra, latte di pecora, ecc.

A seconda del latte utilizzato si otterranno diversi formaggi: formaggi vaccini prodotti con latte vaccino, formaggi pecorini ottenuti da latte pecorino, formaggi caprini ottenuti da latte caprino e così via. Questo è una delle diverse classificazioni dei formaggi, ma quest’ultimi possono essere classificati anche in relazione a:

- ▶ contenuto di grasso (magro, semi-grasso, grasso);
- ▶ temperatura di lavorazione della pasta (pasta cruda, pasta semi-cotta e pasta cotta);
- ▶ consistenza della pasta (molle, semidura, dura);
- ▶ trattamento termico del latte (latte crudo, latte pastorizzato);
- ▶ tempo della stagionatura (fresco, media stagionatura, lunga stagionatura);
- ▶ tipo di crosta (fiorita, lavata, affumicato);



- ▶ lavorazione della pasta (filata, erborinata, pressata, fusa).

## 1.1 Il formaggio e la sua storia

La scoperta del formaggio sarebbe avvenuta nel periodo del Neolitico, attraverso le prime esperienze di addomesticamento di animali che assicuravano latte e carne.

La produzione del formaggio ha avuto origine circa 20 mila anni fa in Mesopotamia e solo nel 5 mila a.C. in Italia si iniziarono ad allevare ovini e caprini. Si pensa che l'origine del formaggio sia avvenuta in modo casuale, quando durante gli spostamenti delle popolazioni arabe nel deserto, il latte fresco veniva trasportato all'interno dello stomaco essiccato di pecora. Con il movimento, gli enzimi, naturalmente presenti, coagularono il latte, trasformandolo in piccoli grumi di formaggio. I primi tentativi di ottenere il formaggio dal latte sono serviti, oltre a facilitarne il trasporto, ad allungare i tempi di conservazione e soprattutto a fornire un prodotto con proprietà nutrizionali molto importanti nella dieta umana (Fox, et al., 2017).

Al tempo la produzione del formaggio avveniva solo a base di latte caprino aggiungendo gli ingredienti che si usano anche ai giorni nostri: sale, caglio e calore. Gli etruschi incominciarono ad usare cagli di tipo vegetale a partire dal cardo, dal carciofo e il latte di fico ma solo i romani intrapresero la produzione di formaggio con il latte vaccino, molto apprezzato durante i banchetti anche dai greci. Nel medioevo, all'interno dei monasteri, vennero perfezionate le tecniche per ottenere i formaggi, attraverso la messa a punto di strumentazioni che facilitavano la produzione, come ad esempio i vasi perforati che permettevano lo spurgo della cagliata.

Nel 19° secolo si verificò il picco del consumo di formaggio, grazie ai miglioramenti delle linee di produzione sia manuale e artigianale sia di tipo industriale (Reis, et al., 2003).

In latino il formaggio veniva denominato come caseus e formaticum: dal latino caseus deriva un termine italiano come "caseificio", "cacio" (da cui, per esempio, "caciocavallo"), ma anche lo spagnolo queso, il portoghese queijo; dalla parola formaticum avrà origine il termine "formaggio" nella lingua italiana.

## 1.2 Processo di caseificazione

La caseificazione è il processo produttivo in cui a partire da latte intero, parzialmente o totalmente scremato, tramite aggiunta di caglio, si ha la coagulazione delle caseine dando origine al formaggio.

Il latte subito dopo la mungitura, viene immediatamente refrigerato a circa 4 °C per inibire la moltiplicazione della microflora mesofila del latte.

Il latte può essere sottoposto a scrematura, un'operazione in cui avverrà l'affioramento dei globuli di grasso lasciando in sosta il latte per 12 ore a 12-13 °C, ottenendo così la separazione dei globuli di grasso e una debatterizzazione.

Il latte, scremato o meno, potrà essere utilizzato come crudo o pastorizzato:

- ▶ nel primo caso non è necessario alcun tipo di risanamento e la salubrità del prodotto è garantita grazie alle azioni preventive di cura delle fasi di allevamento e gestione della stalla;
- ▶ nel secondo caso è un latte, il quale ha subito un trattamento termico a 71-72 °C per 15-20 secondi ed è privo di microrganismi patogeni non sporigeni e loro tossine, con una carica microbica ridotta rappresentata potenzialmente dalle spore batteriche e specie termoresistenti, le quali, sono una piccola percentuale della microflora totale presente sul latte crudo prima del trattamento.

Dopo la pastorizzazione, il latte viene raffreddato fino a raggiungere una temperatura adatta per l'aggiunta dell'innesto, pari a circa 35-40 °C in base alla temperatura ottimale di crescita degli starter, ovvero 30-37 °C per le colture starter mesofile e 42-47 °C per le colture starter termofile.

Una coltura starter può essere definita una preparazione microbica viva e vitale ad elevata concentrazione. Viene aggiunta su un substrato alimentare, ad esempio il latte, allo scopo di standardizzare un processo tecnologico e aumentare la qualità del prodotto. Le colture starter possono essere aggiunte come: siero coltura o siero-innesto, latte-coltura o latte-innesto e scotta o scotta-innesto.

Dopo l'aggiunta dell'innesto si ha la coagulazione, e la formazione della cagliata dovuta alla formazione di un reticolo composto da maglie che intrappolano al loro interno i globuli di grasso e il siero; la coagulazione si può suddividere in due diverse tipologie: acida e presamica.

La coagulazione acida avviene tramite acidificazione attraverso l'aggiunta di acidi o tramite fermentazione da parte della microflora naturalmente presente nel latte o usando microrganismi deliberatamente aggiunti come starter.

La coagulazione presamica avviene attraverso l'aggiunta di caglio di origine animale, vegetale, microbica e biotecnologica, al latte riscaldato a 30-37°C fino ad arrivare ad un pH ottimale di 5.5.

Il caglio è una miscela formata da varie proteasi in grado di idrolizzare la k-caseina tra l'amminoacido Phe105 (fenilalanina) e Met106 (metionina), ottenendo due peptidi: il residuo 1-105 detto para-k-caseina, idrofobo, che andrà nella cagliata, e il residuo 3

106-terminale detto caseino macropeptide (CMP), che andrà nel siero. Questo distacco farà precipitare le micelle caseiniche, che si aggrenderanno andando a formare un reticolo, chiamato cagliata o coagulo.

Nella coagulazione presamica abbiamo tre fasi principali:

- ▶ Fase enzimatica o primaria, idrolisi del legame 105-106;
- ▶ Fase aggregativa o secondaria, aggregazione delle micelle caseiniche con formazione del gel presamico;
- ▶ Fase enzimatica aspecifica o terziaria, idrolisi del fosfoparacaseinato.

La cagliata subirà una spinatura, per rompere i granuli caseosi e facilitare lo spurgo del siero, poi una cottura o semi-cottura, nel caso dei formaggi a pasta semi-cotta e cotta, mentre nel caso di formaggi a pasta cruda questa operazione non avverrà. Successivamente, si ha la fase di formatura, dove continuerà lo spurgo del siero dalla cagliata, messa in stampi o fascere, per ultima, la fase di stufatura a temperature tra 25-35 °C, che permettono un aumento dell'acidità della cagliata.

Alla stufatura, segue la salatura in salamoia o a secco, questa fase migliora il gusto, aumenta la sineresi, inibendo i microrganismi anticaseari, selezionando la microflora casearia. La salatura in salamoia prevede l'immersione dei formaggi in una soluzione di acqua e sale al 16-25% a temperature tra 12-18 °C; la salatura a secco prevede lo spargimento del sale su tutte le facce della forma.

La stagionatura è la maturazione del formaggio durante la quale avvengono delle modificazioni chimico-enzimatiche sui grassi, oltre alla perdita di umidità, aumento del pH, proteolisi e lipolisi e formazione della crosta. I formaggi vengono stoccati in ambienti con temperature tra 4-8 °C per formaggi a pasta molle e 12-16 °C per formaggi a pasta dura e un'umidità tra il 75-95% che verrà abbassata in modo graduale per evitare spaccature sulla superficie.

I tempi di maturazione, inoltre, variano a seconda della tipologia di formaggio.

### 1.2.1 *Uso di coagulanti animali*

Il caglio o presame è un estratto di varie proteasi ottenuto dal quarto stomaco dei ruminanti in lattazione di origine bovina, caprina ed ovina.

Il caglio è una miscela di chimosina e pepsina: la prima, detta anche rennina, ha attività specifica nel rompere il legame tra amminoacido 105-106, un'elevata attività coagulante ed è responsabile della resa finale nel prodotto; la seconda è aspecifica, svolge un ruolo secondario nella coagulazione e può dare aromi indesiderati nei formaggi a lunga stagionatura o idrolizzare molto velocemente la k-caseina abbassando la resa (Monzitta, P., A., 2016).

L'efficienza del caglio viene valutata attraverso due diversi parametri: l'alta attività di coagulazione del latte verso la k-caseina, MCA o *milk-clotting activity*, e la bassa attività proteolitica aspecifica, PA o *proteolitic activity* (Kumari, et al., 2012) (Ustunol & Hicks, 1990).

Il rapporto tra MCA e PA influenzerà la texture e le varie caratteristiche nel prodotto finale.

La proteasi presente in quantità maggiore è la chimosina ma possono essere prodotte delle preparazioni con concentrazioni differenti (Fernandéz-Salguero, et al., 2003).

Il caglio utilizzato per la produzione di formaggi con Denominazione di Origine Protetta (D.O.P.) è quello che deriva dall'abomaso dei vitelli con concentrazioni di chimosina tra 80-90% e pepsina al 10-20%. La produzione tradizionale prevede che gli abomasi pronti per l'estrazione, detti caglioli o pellette, siano congelati all'arrivo in struttura, fatti macerare in salamoia al 10% di sale, dal succo ottenuto vengono estratti gli enzimi utili e attivati in pH acido (Alce). Le modalità di conservazione del caglio sono diverse ad esempio: caglio appeso nel locale al fresco, conservato tramite aggiunta di sale e spezie o congelato (Carbone, et al., 2008).+

Ci sono diversi motivi per il quale si sta cercando di diminuire l'utilizzo di coagulanti animali; infatti, c'è sempre più richiesta di caglio animale e i costi di produzione stanno aumentando.

### 1.2.2 *Uso di coagulanti vegetali*

Nella storia della produzione del formaggio si sono sempre aggiunti vegetali per conferire sapore e aroma peculiari al prodotto, un esempio interessante sono le spezie come timo, paprika, cipolla, aglio, origano, semi di mostarda, basilico o cumino (Dupas, et al., 2020).

Nel tempo si è iniziato ad aggiungere al latte, oltre alle spezie precedenti, anche degli estratti vegetali coagulanti per la produzione del formaggio (Shah, et al., 2014), ad esempio durante il medioevo venivano aggiunti alla coagulazione fiori di cardo o estratti di carciofo (Froc, 2007).

Un'alternativa all'uso di caglio animale è l'utilizzo di proteine aspartiche che derivano dai fiori della pianta di cardo, nello specifico il genere *Cynara L.* (Llorente, et al., 2014) (Ordiales,

et al., 2014), il quale appartiene alla famiglia delle Asteraceae, in particolare la specie più impiegata nella produzione dei formaggi a base di caglio vegetale è *Cynara cardunculus* L.

La specie *C. cardunculus* L. è suddivisa in tre taxa: *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori, il carciofo; *Cynara cardunculus* L. var. *altilis*, cardo domestico; *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* (Larm) Fiori, cardo selvatico (Christaki, et al., 2012).

*C. cardunculus* L. è una varietà di cardo che produce larghe foglie argentate con fiori spinosi viola o bluastri (Góstin & Waisundara, 2019).

Nei fiori, soprattutto lo stigma e lo stilo nell'inflorescenza (Ramalho-Santos, et al., 1997), della specie *C. cardunculus* L. sono state trovate due gruppi principali di proteasi aspartiche: ciprosina (prima chiamata cinarasi) e cardosina (Heimgartner, et al., 1990) (Cordeiro, et al., 1992) (Verissimo, et al., 1995).

Attraverso l'essiccazione dei fiori di *C. cardunculus* L. oppure, in minor utilizzo, una miscela essiccata dei fiori di *C. cardunculus* L. e *C. humilis*, si ottiene un estratto crudo acquoso del cardo (Vioque, et al., 2000).

Tradizionalmente i fiori di cardo vengono raccolti nei mesi di giugno e luglio, tagliando il fiore alla base dello stelo e successivamente essiccati per 20 giorni; originariamente l'essiccazione avveniva all'aria mantenendo i fiori all'ombra; questa pratica però determina una riduzione dell'attività coagulante rispetto all'estratto prodotto con fiori non secchi (Martins, et al., 1996).

A seguito dell'essiccazione gli stami e i pistilli vengono prelevati con molta accuratezza e immersi in acqua a 42 °C per 24 ore a temperatura ambiente. Successivamente il composto così ottenuto viene filtrato, aggiunto al latte riscaldato a 40 °C e in tal modo si otterrà la coagulazione del latte seppur più lentamente rispetto a quella ottenuta con il caglio animale.

Negli estratti dei fiori di *C. cardunculus* L. sono state individuate un gruppo di proteine aspartiche, le quali hanno attività proteolitica, oltre che un'elevata termostabilità, primi tra tutti gli enzimi del tipo cinarasi 1, 2 e 3 (Heimgartner, et al., 1990). Sono state ritrovate altre proteasi dette cardosine di tipo: A, B, C, D, E, F, G e H (Sarmiento, et al., 2009) (Verissimo, et al., 1995), queste sono sintetizzate sotto forma di zimogeno inattivo che viene attivato attraverso la rimozione del prosegmento e dal dominio PSI (inserto pianta specifico), ottenendo enzimi con due catene polipeptidiche tenute insieme da interazioni idrofobiche e legami a idrogeno (Dunn, 2002) (Simoes & Faro, 2004).

Entrambe le cardosine A e B vengono accumulate fino ad arrivare allo stadio dell'inflorescenza, in cui si ha la completa maturazione, queste inoltre, si attivano a pH acido (Faro, et al., 1999) (Vieira, et al., 2001).

Il contenuto delle proteasi nei fiori di cardo varia a seconda della posizione geografica, lo stadio del fiore alla raccolta e le condizioni climatiche, questo aspetto influenza notevolmente il processo di caseificazione determinando possibili disomogeneità nei vari lotti di produzione di uno stesso prodotto (Heimgartner, et al., 1990) (Ordiales, et al., 2012).

La cardosina A è più abbondante nelle parti esterne del fiore e si accumula ad alte concentrazioni nei vacuoli delle papille stigmatiche oltre che nei vacuoli delle cellule epidermiche (Ramalho-Santos, et al., 1997). Con la maturazione del fiore avviene la maturazione della cardosina con l'attacco di una catena pesante ad una catena leggera attraverso la formazione di interazioni idrofobe e legami ad idrogeno (Pereira, 2012).

Ha un'attività simile alla chimosina, in termini di specificità e di cinetica, rompendo il legame peptidico nello stesso punto, Phe105-Met106 (Verissimo, et al., 1995) (Cavalli, et al., 2013).

La cardosina B, localizzata nella parete cellulare e nella matrice extracellulare del tessuto connettivo del fiore, è l'unica cardosina trovata nell'estratto della parte inferiore del pistillo (Vieira, et al., 2001). Si è notata un'attività simile alla pepsina, in termini di attività e specificità (Verissimo, et al., 1995).

La cardosina C è presente nel polline mentre la cardosina D mostra una distribuzione simile alla cardosina A (Pimentel, et al., 2007), la distribuzione delle altre forme di cardosina non è ancora chiarita completamente (Barracosa, et al., 2021).

Le proteasi A e B sono coinvolte nella coagulazione del latte, avendo attività simili alla chimosina e alla pepsina; dopo la rottura del legame tra amminoacido Phe105 e Met106 della k-caseina, le cardosine provocano un'aggregazione delle micelle coinvolgendo anche gli ioni calcio (Cavalli, et al., 2013) (Lucey, 2002) (Ricceri & Barbagallo, 2016), queste, sono responsabili della produzione di formaggi con una consistenza morbida e cremosa con un aroma leggermente piccante.

Dall'estratto crudo del fiore si ottiene una concentrazione di cardosina A del 75% e cardosina B pari al 25%, quest'ultima ha una maggiore attività proteolitica della prima (Barros & Malcata, 2002).

Un'alternativa all'estratto crudo dei fiori di *C. cardunculus* L. è il coagulante in polvere che si ottiene a partire dall'estratto (Fernández-Salguero, et al., 2000); questa è esente da microrganismi, solubile in acqua o nel latte, conservabile in contenitori a tenuta stagna senza l'aggiunta di conservanti.

Vengono pesati circa 150 g dei fiori essiccati e fatti macerare in 1 L di acqua per 24 ore, l'estratto viene filtrato usando un tessuto di cotone e può quindi essere utilizzato come

coagulante vegetale. In alcuni casi, l'estratto può essere congelato a circa -32 °C e dopo il congelamento i campioni vengono liofilizzati alla pressione di 4-13 Pa per circa 24 h. (Fernandéz-Salguero, et al., 2000) (Tejada, 2001).

La raccolta, stoccaggio, gestione e commercializzazione dei fiori di cardo non sono attualmente soggetti alle regolamentazioni governative degli additivi alimentari (Fernandéz-Salguero, et al., 2002).

L'uso dei fiori di caglio come agente coagulante ha permesso la produzione di formaggi con proprietà uniche, infatti, è stato dimostrato come una maggiore rottura delle caseine contribuisce ad esempio alla particolare consistenza morbida di questi prodotti, e all'unicità organolettica di formaggio DOP in Portogallo e Spagna prodotti con latte di pecora (Agboola, et al., 2004) (Nunez, et al., 1991) (Sousa & Malcata, 1998). Se l'utilizzo di caglio vegetale su latte ovino ha portato una grande crescita dal punto di vista della produzione nella Penisola Iberica, non si può dire lo stesso per formaggi prodotti a base di latte bovino nei quali si sono riscontrati difetti di *texture* associati ad un sapore sgradevole, questo a causa della diversità della struttura nella caseina bovina rispetto alla caseina ovina (Roseiro, et al., 2003).

È importante anche capire la quantità adatta di caglio da immettere nel processo, questo perché una quantità eccessiva potrebbe causare un prodotto dal sapore troppo amaro (Roseiro, et al., 2003).

### 1.3 Formaggi portoghesi: storia e tradizione

La produzione artigianale del formaggio fa parte della cultura in molti paesi europei tra Portogallo e Spagna (Cogan & Rea, 1996). Con l'occupazione della penisola iberica da parte dei romani nel periodo delle invasioni, il formaggio veniva utilizzato per scambi e pagamenti di tasse dato il suo alto valore commerciale, permettendo la diffusione della produzione nelle regioni di Castelo Branco e Alentejo (Cruz & Borrego J., 1948).

Un'importante testimonianza della produzione di formaggio all'interno del Portogallo è una ceramica ritrovata nel comune di Penamacor (distretto di Castelo Branco), che sembrerebbe essere una fascera di circa 3000 anni (Reis, et al., 2003).

La maggior parte dei formaggi artigianali è a base di latte ovino e caprino con un picco di produzione in primavera e una diminuzione nel periodo autunnale (Freitas & Malcata, 2000).

Sin dall'antichità, in Portogallo e alcune regioni della Spagna, l'uso di estratti che derivano da fiori essiccati di *C. cardunculus* L. è stato portato avanti per la produzione di vari formaggi di alta qualità derivati da latte ovino e caprino (Reis & Malcata, 2011) (Roseiro, et al., 2003) (Sousa & Malcata, 2002). All'inizio del XVIII secolo i greggi di pecore allevate nelle zone di

Beira Baixa venivano allevati esclusivamente per la fornitura di lana, e solo successivamente il loro latte iniziò ad essere sfruttato per la produzione di formaggio. In particolare, si ritiene che questa esigenza sia stata dettata soprattutto dall' indisponibilità di latte di origine bovina in determinati periodi dell'anno (Dias, 2000).

Il distretto Beira Baixa ha una storia legata ai flussi migratori della transumanza pastorale, con lo spostamento delle mandrie alla ricerca di cibo durante i rigidi inverni. Il flusso migratorio incominciò a partire dallo spostamento del bestiame "Alavão" più sensibile al freddo in zone come "Campinas da Idanha", "Campo Albicastrense" e "Cova da Beira" (Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural). Con il tempo questa pratica è andata in diminuendo a causa del disboscamento per la creazione di terre ad uso agricolo per le coltivazioni intensive che ha ridotto le terre utilizzate dai pascoli (Dias, 1955).

Il Portogallo si può suddividere in 5 regioni: Nord, Centro, Alentejo, Algarve e Lisboa.

Il centro comprende ulteriori suddivisioni, la Beira (formata da Beira Alta, Beira Litoral e Beira Baxa), l'Estremadura e il Ribatejo. In Beira Baixa avviene la produzione dei formaggi denominati "Queijo da Beira Baixa": "Queijo Amarelo da Beira Baixa", "Queijo Castelo Branco da Beira Baixa", "Queijo Picante da Beira Baixa".

Sette su dodici formaggi caprini e ovini con Denominazione di Origine Protetta sono prodotti utilizzando l'estratto crudo del fiore essiccato *C. cardunculus L.*

La caratteristica comune a tutti i formaggi denominati Queijo da Beira Baxa è la pasta morbida con un sapore prelibato, leggermente amaro e a volte piccante. Questi attributi sono per la maggior parte associati ad una proteolisi delle caseine molto più spinta, mediata dagli enzimi vegetali, che determina prodotti con un elevato valore intrinseco (Jacob, et al., 2011).

#### 1.4 Formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP: storia e caratteristiche

Nella regione di "Castelo Branco" la produzione di formaggio di pecora ha avuto inizio attorno al 1870, con l'allevamento di pecore il cui obiettivo primario era lo sfruttamento della lana (Rebelo, 1994). Con l'arrivo delle ferrovie della Beira Baixa, si sono facilitati gli scambi con Lisbona, punto d'arrivo della popolazione proveniente dalle zone di Castelo Branco.

Nel 1905, il professor Joaquim Rasteiro cita il formaggio originariamente chiamato *Queijo de Castelo Branco* come uno dei più antichi e conosciuti, ma solo nel 1940, iniziò lo studio approfondito dei formaggi della Beira Baixa attraverso un programma per incoraggiare lo studio dei formaggi portoghesi (Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural).

Il formaggio denominato originariamente *Queijo de Castelo Branco* riconosciuto come prodotto DOP nel 1996 sotto il nome di *Queijos da Beira Baixa (Queijo de Castelo Branco,*



*Queijo Amarelo da Beira Baixa, Queijo Picante da Beira Baixa* (Regolamento CE 1107/96), nel 2021, a seguito di formale richiesta alla Commissione europea di una modifica del disciplinare della denominazione di origine protetta da parte del Portogallo è stato rinominato in *Queijo da Beira Baixa* (Regolamento di esecuzione (UE) 2021/245).

Il formaggio si caratterizza in quanto prodotto attraverso la sgocciolatura lenta della cagliata dopo la coagulazione del latte crudo con un estratto acquoso di *C. cardunculus* L. . La scelta della razza ovina influenza la composizione del latte, e in particolare per la produzione di questo formaggio tradizionale si utilizza esclusivamente il latte dalle razze pure “*Merino de Beira Baxa*” o “*Assaf*” e incroci di queste due razze (Ferreira, et al., 2009).

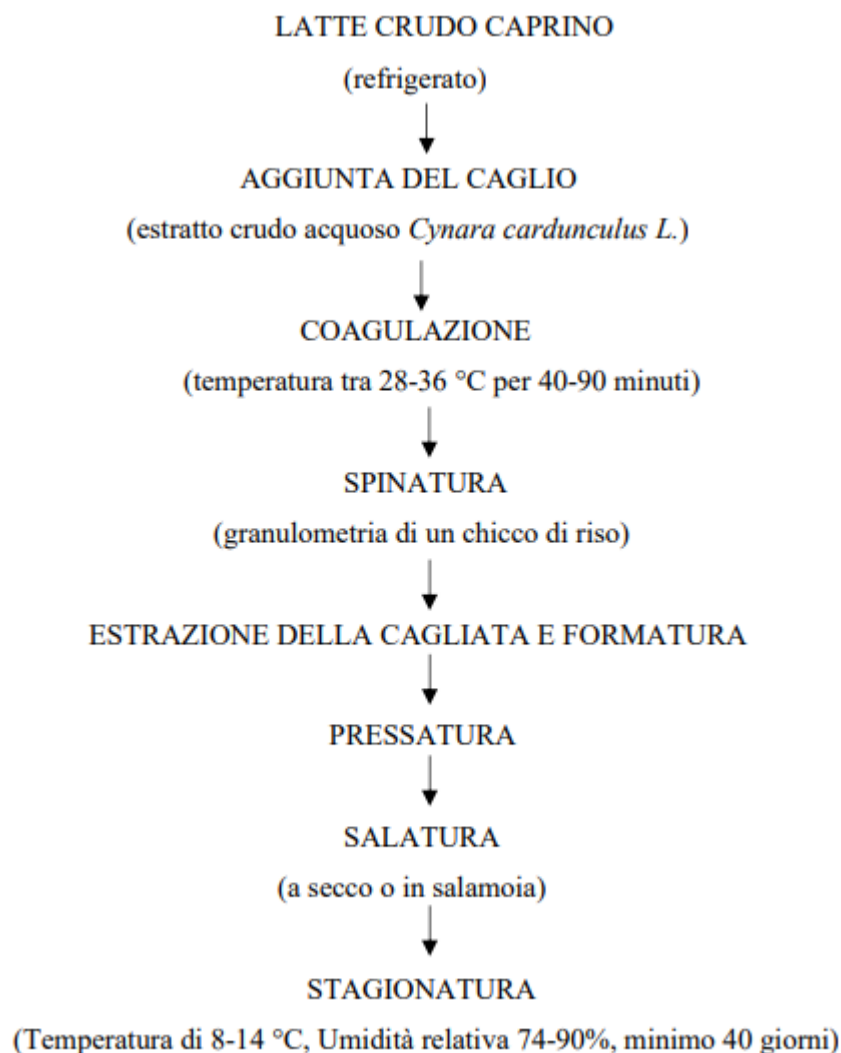
La consistenza della pasta è semidura o semimolle, l’aspetto è untuoso con delle piccole occhiature, l’aroma e il gusto sono marcati con note pungenti e acide, il sapore è leggermente piccante se la maturazione è stata prolungata. Le dimensioni delle forme sono generalmente standardizzate secondo le indicazioni di legge e sono indicate nella Tabella 1 (Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, s.d.).

**Tabella 1-1: Pezzature tipiche del formaggio *Queijo da Beira Baixa DOP***

<b>Altezza (cm)</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Diametro (cm)</b>	<b>Forma</b>	<b>Crosta</b>
5-8	0,8-1,3	12-16	Cilindro basso e regolare	Esterno malleabile che
4-6	0,35-0,55	8-10	con scalzo convesso, lieve rigonfiamento in superficie, bordi non definiti	diventa più compatto all’interno, aspetto omogeneo e ben liscio, colore giallo paglierino tendente al giallo acceso

#### 1.4.1 *Processo di caseificazione e descrizione del formaggio*

Il processo di caseificazione del formaggio *Queijo da Beira Baixa DOP* è illustrato in Figura 1.



**Figura 1: Diagramma di flusso della caseificazione del formaggio Queijo da Beira Baixa DOP**

Il latte crudo ovino a seguito della mungitura viene refrigerato a 4 °C, trasportato in caseificio e lavorato immediatamente.

A seguito del ricevimento in caseificio, il latte viene scaldato a 28-36 °C e aggiunto di caglio; la coagulazione dura circa 40-90 minuti e successivamente la cagliata viene leggermente scolata e tagliata, fino ad ottenere granuli con dimensione di circa un chicco di riso. La cagliata viene poi inserita negli stampi, pressata varie volte fino alla massima perdita del siero e poi salata.

Tradizionalmente la salatura per il *Queijo da Beira Baixa* DOP può essere eseguita mediante spargimento di sale diretto su tutta la superficie, aggiunta diretta nel latte o nella cagliata, secondo la tradizione dei pastori di montagna, oppure immergendo i formaggi nella

salamoia dove rimangono per tempi variabili in funzione del contenuto di sale e delle dimensioni del formaggio.

Si può usare anche un altro metodo: dopo la pigiatura avviene una prima salatura a secco, i formaggi vengono sistemati in locali a temperatura ambiente dove inizierà il processo di stagionatura, posti in contenitori accatastati in strati.

Le varie forme vengono impilate formando un “Castelo” che viene ricoperto di sale, a seconda del grado di spurgo del siero, della quantità di sale utilizzata e le condizioni di umidità e temperatura del locale si lasceranno riposare le forme per 2-3 settimane, le quali vengono regolarmente girate e pulite se necessario.

Dopodiché, i formaggi vengono appoggiati su un “letto” di paglia di segale.

La maturazione può avvenire in maniera tradizionale sfruttando le condizioni naturali di umidità, aerazione e temperatura del caseificio; oppure in condizioni controllate a temperatura di 8-14 °C e umidità pari al 74-90%, per un minimo di 40 giorni. Se si una maturazione prolungata oltre i 90 giorni va aggiunta in etichetta la dicitura “*Velho*”; questo vale per tutti formaggi *Queijos da Beira Baixa*.

Per i formaggi che devono essere commercializzati porzionati, le porzioni degli spicchi vengono tagliati a partire dalla forma, all’interno dell’area geografica al fine di preservare l’integrità del prodotto e garantire le caratteristiche che lo rendono unico. Per evitare variazioni delle caratteristiche devono essere utilizzati i seguenti parametri durante conservazione, trasporto e vendita al dettaglio:

- Conservazione 0-5 °C;
- Trasporto 0-10 °C;
- Vendita al dettaglio 0-12 °C.

Per l’etichettatura oltre alla legislazione obbligatoria deve comparire la seguente dicitura: «*Queijo da Beira Baixa DOP*», e l’indicazione «*Castelo Branco*» (Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural).

## Capitolo 2

### SCOPO DEL LAVORO

I formaggi fanno parte dell'alimentazione umana da migliaia di anni e la loro produzione, seppur legata a processi tradizionali, è continuamente oggetto di studio e di miglioramento tecnologico al fine di ottenere prodotti sempre più rispondenti alle crescenti esigenze dei consumatori.

I formaggi portoghesi prodotti con pratiche artigianali antiche tramandate di generazione in generazione, sono un esempio di questi prodotti, in particolare i formaggi a latte crudo e caglio di origine vegetale sono ampiamente studiati per le loro caratteristiche organolettiche uniche e nutrizionali.

Il formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP, è un formaggio tradizionale portoghese prodotto esclusivamente nei comuni del distretto di Castelo Branco e parte del distretto di Santarém con l'uso di latte ovino crudo e di caglio vegetale ottenuto dalla specie vegetale *C. cardunculus*. Scopo del presente lavoro di tesi sperimentale è stato la caratterizzazione chimico-fisica e microbiologica di due repliche biologiche di un unico lotto produttivo di formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP acquistato da tre differenti produttori locali situati nel Comune di Castelo Branco (Portogallo).

L'analisi chimico-fisica e microbiologica è stata effettuata attraverso la determinazione del pH, della TTA, del contenuto in acido acetico e acido lattico, mentre la valutazione della complessità microbica del formaggio è stata valutata mediante analisi coltura-dipendente per l'enumerazione di lieviti e muffe, lattococchi mesofili e termofili, lattobacilli mesofili e termofili, cocchi coagulasi-negativi, mesofili aerobi totali, enterococchi, ed Enterobacteriaceae.

# Capitolo 3

## MATERIALI E METODI

### 3.1 Campionamento

Per l'allestimento delle prove sperimentali tre formaggi *Queijo da Beira Baixa* DOP, sono stati acquistati da tre diversi produttori del distretto di Castelo Branco. I campioni, trasportati a temperatura ambiente, nelle proprie confezioni di commercializzazione standard sono stati conservati a + 4°C all'arrivo in laboratorio e successivamente analizzati entro la data di scadenza.

### 3.2 Conte vitali in piastra

Per le conte vitali in piastra ogni campione è stato analizzato in doppio, prelevando rispettivamente 10 g per ogni analisi e omogeneizzati con 90 mL di acqua peptonata sterile (peptone 0,1% p/v) usando lo Stomacher (400 Circulator, International PBI, Milano, Italia) per 2 minuti a 260 rpm (Osimani, et al., 2009).

Per l'allestimento delle diluizioni scalari decimali è stato aggiunto 1 mL di omogenato a 9 mL di acqua peptonata sterile (peptone 0,1% p/v). Successivamente, da ciascuna diluizione decimale sono stati prelevati 100 µL per l'allestimento della semina per spandimento sui seguenti terreni di coltura:

- ▶ RB, *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (RBA; VWR International S.r.l., Pennsylvania, Stati Uniti). Il terreno la cui composizione è mostrata in Tabella 3-1: Composizione terreno RB, addizionato con 0,1 g L<sup>-1</sup> di cloramfenicolo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) incubato a 25 °C per 48 h in condizioni di aerobiosi, è specifico per l'enumerazione di lieviti e muffe.

**Tabella 3-1: Composizione terreno RB**

<b>Componente</b>	<b>Composizione (g/L)</b>
<i>Agar</i>	15
<i>Glucosio</i>	10
<i>Peptone micologico</i>	5
<i>Potassio fosfato bibasico</i>	1
<i>Magnesio solfato</i>	0.5
<i>Cloramfenicolo</i>	0.1
<i>Rosa bengala</i>	0.05

- ▶ MSA, *Mannitol Salt Agar* (MSA, VWR International S.r.l.). La Tabella 3-2: Composizione terreno MSA mostra la composizione del terreno MSA, il quale incubato a 37 °C per 24-48 h in condizioni di aerobiosi, è usato l'enumerazione di Stafilococchi coagulasi positivi (Chapman, 1945). Le colonie dei cocci coagulasi-positivi sono di color giallo con un alone giallo, differenti sono i cocci coagulasi-negativi la cui colorazione ed alone è rossastro;

**Tabella 3-2: Composizione terreno MSA**

<b>Componente</b>	<b>Composizione (g/L)</b>
<i>Sodio cloruro</i>	75
<i>Agar</i>	15
<i>D-mannitolo</i>	10
<i>Digerito pancreatico di caseina</i>	5
<i>Digerito peptidico di tessuto animale</i>	5
<i>Estratto di carne</i>	1
<i>Rosso fenolo</i>	0.025

- ▶ ESA, *Enterococcus Selective Agar*. Il terreno (Tabella 3-3: Composizione terreno ESA) incubato a 37 °C per 48 h in condizioni di aerobiosi usato per l'enumerazione dei presunti enterococchi; le cui colonie mostrano una colorazione marrone.

**Tabella 3-3: Composizione terreno ESA**

<b>Componente</b>	<b>Composizione (g/L)</b>
<i>Triptosio</i>	20
<i>Agar</i>	10
<i>Estratti di lievito</i>	5
<i>Disodio idrogeno fosfato monoidrato</i>	4
<i>D(+)</i> glucosio	2
<i>Azoturo di sodio</i>	0.4
<i>2,3,5-Trifeniltetrazolio cloruro</i>	0,1

Contestualmente da ciascuna diluizione decimale sono stati prelevati 1 mL per l'allestimento della semina per inclusione sui seguenti terreni di coltura:

- ▶ M17 agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) (Tabella 3-4) incubato a 22 °C per 48 h è sfruttato per l'enumerazione dei presunti lattococchi mesofili, mentre incubato a 42 °C per 24 h permette per l'enumerazione dei presunti lattococchi termofili, entrambi in condizioni di aerobiosi. Le colonie sono di colore bianco-crema dalla forma ellissoidale;

**Tabella 3-4: Composizione terreno M17**

<b>Componente</b>	<b>Composizione (g/L)</b>
<i>Glicerofosfato disodico</i>	19
<i>Agar</i>	15
<i>Lattosio</i>	5
<i>Estratto di carne</i>	5
<i>Peptone di soia</i>	5
<i>Peptone</i>	2,5
<i>Triptosio</i>	2,5
<i>Estratto di lievito</i>	2,5
<i>Acido ascorbico</i>	0,50
<i>Magnesio solfato</i>	0,25

- ▶ MRS, De Man Rogosa Sharpe (WVR Chemicals) (Tabella 3-5: Composizione terreno MRS incubato a 37 °C per 48 h in condizioni di aerobiosi per

l'enumerazione dei presunti lattobacilli; le colonie sono piccole e di colore bianco-crema;

**Tabella 3-5: Composizione terreno MRS**

<b>Componente</b>	<b>Composizione (g/L)</b>
<i>Glucosio</i>	20
<i>Agar</i>	15
<i>Digerito enzimatico di caseina</i>	10
<i>Estratto di carne</i>	10
<i>Sodio acetato</i>	5
<i>Estratto di lievito</i>	4
<i>Fosfato di dipotassio</i>	2
<i>Triammonio citrato</i>	2
<i>Tween 80</i>	1
<i>Magnesio solfato</i>	0.2
<i>Manganese solfato</i>	0.05

- ▶ VRBGA, *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBGA, VWR International S.r.l.) (Tabella 3-6: Composizione terreno VRBGA incubato a 37 °C per 24 h in condizioni di aerobiosi, per l'enumerazione di *Enterobacteriaceae* (Association, 1978); le colonie sono di colore rosso porpora, può essere presente un alone rosso porpora; i microrganismi lattosio non fermenti danno delle colonie chiare con aloni tendenti al verde.

**Tabella 3-6: Composizione terreno VRBGA**

<b>Componente</b>	<b>Composizione (g/L)</b>
<i>Agar</i>	15
<i>Glucosio</i>	10
<i>Digerito enzimatico tessuti animali</i>	7
<i>Sodio cloruro</i>	5
<i>Estratto di lievito</i>	3
<i>Sali biliari</i>	1.5
<i>Rosso neutro</i>	0.03
<i>Cristal violetto</i>	0.002



### 3.3 Analisi chimico-fisiche

Tutti i campioni di formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP sono stati analizzati per la determinazione delle caratteristiche chimico-fisiche, quali pH e acidità totale titolabile.

#### 3.3.1 Determinazione del pH

La misurazione del pH è stata effettuata mediante pH-metro con elettrodo solido HI2031 (modello 300, Hanna Instruments, Padova, Italia), in triplicato per ogni campione oggetto di analisi e il risultato è stato espresso come media  $\pm$  deviazione standard, previa taratura dello strumento.

#### 3.3.2 Determinazione dell'Acidità Totale Titolabile

L'acidità totale titolabile, espressa come mL di NaOH 0,1 N utilizzati per portare una soluzione pH di 8,3, è stata determinata su un omogenato ottenuto prelevando 10 g di campione, addizionati con 90 mL di acqua demineralizzata in un sacchetto Stomacher e trattati per 2 min a 260 rpm in un omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 circulator. L'omogenato così ottenuto viene titolato con NaOH 0,1 N.

### 3.4 Determinazione del contenuto di Acido Lattico

Per la determinazione del contenuto di acido lattico è stato utilizzato il kit enzimatico Megazyme D-/L- Lactic Acid (D-/L- Lactate) (Rapid) test, fornito da Megazyme, seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

In particolare il kit si basa sullo sviluppo delle seguenti reazioni:

1. L-Lattato + NAD  $\rightarrow$  piruvato + NADH + H<sup>+</sup>;
2. Piruvato + D-glutammato  $\rightarrow$  D-alanina + 2-ossoglutarato

Nella prima reazione si verifica l'ossidazione del L-Lattato a piruvato con contemporanea riduzione della nicotinamide adenina dinucleotide (NAD<sup>+</sup>), ad opera dell'enzima L-lattato deidrogenasi (L-LDH). La reazione ha un equilibrio molto spostato a sinistra e per evitare ciò il piruvato viene convertito in D-alanina e 2-ossoglutarato, attraverso l'enzima D-glutammato-piruvato transaminasi e alla presenza di D-glutammato.

Per la preparazione del campione 1 g di formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP finemente tritato viene posto in un matraccio da 100 mL, si addizionano 70 mL di acqua distillata e riscalda il campione a 60 °C per 20 minuti in un bagnetto termostato. Si porta a volume e si raffredda a 4 °C per 30 minuti, si filtra infine la soluzione ottenuta.

Il campione opportunamente filtrato viene dunque utilizzato seguendo la metodica specifica per il kit e infine si effettua la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 340 nm.

### 3.5 Determinazione del contenuto di Acido Acetico

Per determinare il contenuto di acido acetico è stato utilizzato il kit enzimatico *Megazyme Acetic Acid (Acetate Kinase Manual Format)*, fornito da Megazyme seguendo le indicazioni fornite dall'azienda produttrice.

Le reazioni che avvengono sono le seguenti:

1. Acido acetico + ATP + CoA  $\rightarrow$  Acetil-CoA + AMP + pirofosfato;
2. Acetil-CoA + ossalacetato + H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  Citrato + CoA;
3. L-Malato + NAD<sup>+</sup>  $\rightleftharpoons$  ossalacetato + NADH + H<sup>+</sup>

La prima reazione viene catalizzata dall'enzima acetil-coenzima A sintetasi (ACS) e prevede la conversione di acido acetico in acetil-CoA attraverso la presenza di adenosina 5'-trifosfato e coenzima A.

Nella seconda reazione, l'enzima citrato sintasi catalizza la conversione dell'ossalacetato in citrato in presenza di acetil-CoA.

L'ossalacetato deriva dalla reazione fra L-malato e NAD<sup>+</sup>, catalizzato da L-malato deidrogenasi (L-MDH), mentre il NAD<sup>+</sup> è ridotto a NADH.

2 g di campione di formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP triturato finemente viene messo in un matraccio da 100 mL, e addizionato di 70 mL di acqua distillata, riscaldato a 60 °C per 20 minuti in un bagnetto termostato. Si porta successivamente a volume e si raffredda a 4 °C per 30 minuti, si filtra la soluzione e il campione è l'esecuzione del kit.

Il campione opportunamente filtrato viene dunque utilizzato seguendo la metodica specifica per il kit e infine si effettua la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 340 nm.

### 3.6 Estrazione del DNA microbico da matrice

Per l'estrazione del DNA microbico dai campioni di formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP in analisi è stato utilizzato il kit E.Z.N.A.® Soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Inc., 400 Pinnacle Way, Norcross, GA).

Questo kit permette di isolare DNA microbico di lieviti, funghi, batteri Gram positivi e negativi, a partire dal campione omogenato.

Il protocollo per 100-250 mg di campione è il seguente

1. Il pellet cellulare ottenuto da un 1 ml di omogenato, preparato come descritto nel paragrafo 3.2, viene risospeso in 725  $\mu$ L di buffer SLX-Mlus e trasferito in un Disruptor Tube.
2. Si tratta al vortex alla massima velocità per 3-5 minuti per permettere la lisi del campione.
3. Centrifugare a 500 giri per 5 secondi per rimuovere il surnatante.
4. Aggiungere 72  $\mu$ L di buffer DS e poi vortex per mischiare completamente.
5. Incubare a 70 °C per 10 minuti e agitare con il vortex per una volta durante l'incubazione.
6. Centrifugare a 10 000 giri per 5 minuti a temperatura ambiente.
7. Trasferire 400  $\mu$ L di surnatante in una nuova provetta da 1,5 mL per microcentrifuga.
8. Aggiungere 135  $\mu$ L di buffer P2 refrigerato e 200  $\mu$ L di reagente cHTR, usare il vortex per mescolare completamente.
9. Centrifugare alla massima velocità (> 13 000 giri) per un minuto.
10. Trasferire il surnatante limpido (circa 500  $\mu$ L) in una nuova provetta da 1,5 mL per microcentrifuga.
11. Aggiungere un volume equivalente di buffer XP1 e agitare con il vortex.
12. Inserire un HiBind® DNA Mini Column in una provetta da 2 mL.
13. Trasferire fino a 700  $\mu$ L di campione dallo step 11 al HiBind® DNA Mini Column.
14. Centrifugare a 10 000 giri per 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Gettare via il filtrato e riusare la provetta da 2 mL
16. Ripetere gli steps 13-15 fino a che tutto materiale che ha subito la lisi dallo step 7 non sia passato attraverso HiBind® DNA Mini Column.
17. Aggiunge 500  $\mu$ L di buffer HBC.
18. Centrifugare a 10 000 giri per 1 minuto.
19. Gettare via il filtrato e la provetta.
20. Trasferire HiBind® DNA Mini Column in una nuova provetta da 2 ML.
21. Aggiungere 700  $\mu$ L di buffer per lavaggio del DNA.
22. Centrifugare per 10 000 giri per 1 minuto.
23. Eliminare il filtrato e riusare la provetta.
24. Ripetere i passaggi dallo step 21-23 per un secondo lavaggio con il buffer DNA.

25. Centrifugare il HiBind® DNA Mini Column vuoto alla massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente.
26. Trasferirlo il HiBind® DNA Mini Column in una nuova provetta per microcentrifuga da 1,5 mL.
27. Aggiungere 50-100 µL di buffer da eluizione, riscaldato a 70 °C, al centro della matrice HiBind®.
28. Lasciare depositare a temperatura ambiente per 1-2 minuti.
29. Centrifugare alla velocità massima per 1 minuto.
30. Posizionare il surnatante ottenuto dallo step 29, al centro dello stesso HiBind® DNA Mini Column.
31. Lasciare riposare per 1 minuto a temperatura ambiente.
32. Centrifugare alla massima velocità per un minuto.
33. Conservare il DNA eluito a -20 °C.

## Capitolo 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Conte vitali in piastra di formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP

I risultati delle conte vitali in piastra sui campioni di formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP dei tre differenti produttori presi in esame sono mostrati in Tabella 4-1.

**Tabella 4-1: Risultati conte vitali in piastra di campioni di formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP**

Produttore	M17 22 °C	M17 42 °C	MRS 30 °C	MSA	ESA	VRBGA	RB
<i>Produttore 1</i>	8,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	9,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	6,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	5,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8 ± 1,2 <sup>a</sup>	3,8 ± 1,3 <sup>a</sup>
<i>Produttore 2</i>	7,6 ± 1,8 <sup>a</sup>	7,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	5,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,6 ± 2,2 <sup>a</sup>
<i>Produttore 3</i>	7,6 ± 1,6 <sup>a</sup>	6,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	5,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,9 ± 2,7 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,4 <sup>a</sup>

**MRS:** *de Man Rogosa & Sharpe* agar; **MSA:** *mannitol salt* Agar; **ESA:** *Enterococcus Selective* Agar; **VRBGA:** *Violet Red Bile Glucose* Agar; **RB:** *rose bengal chloramphenicol* agar.

Valori espressi come media log UFC g<sup>-1</sup> ± deviazione standard. Le lettere in apice indicano differenze statistiche tra i campioni in analisi sulla base del *Tukey-Kramer's Honest Significant Difference (HSD) test* ( $\alpha = 0.05$ )

In dettaglio, dalle analisi microbiologiche è possibile identificare una carica di lattococchi mesofili con valori compresi tra 7,6 ± 1,8 log UFC g<sup>-1</sup> e 8,9 ± 0,3 log UFC g<sup>-1</sup>, e una carica di lattococchi termofili con valori compresi tra 6,9 ± 1,0 log UFC g<sup>-1</sup> e 8,7 ± 0,4 log UFC g<sup>-1</sup> in accordo con quanto rilevato in altri formaggi portoghesi prodotti con uso di caglio vegetale come il *Queijo de Azeitão* DOP (Cardinali, et al., 2021). I lattococchi sono normalmente presenti in elevate concentrazioni nel latte crudo e sono i principali responsabili della fermentazione lattica a partire dal glucosio con produzione di acido lattico (Galli, 2005).

Per quanto riguarda i lattobacilli, non sono state rilevate differenze statistiche tra i tre produttori, con valori medi compresi tra 8,2 ± 0,7 log UFC g<sup>-1</sup> e 9,1 ± 0,4 log UFC g<sup>-1</sup> che risultano leggermente superiori con la carica rilevata per il formaggio portoghese *Queijo de Azeitão* DOP (Cardinali, et al., 2021), mentre risulta in linea con i valori riscontrati per altri formaggi prodotti con latte crudo ovino e caglio vegetale, come il *Caciofiore della Sibilla* (Cardinali, et al., 2017).

Dalle analisi si può osservare una carica di stafilococchi coagulasi-negativi compresa tra 4,0 ± 0,4 log UFC g<sup>-1</sup> e 6,4 ± 0,8 log UFC g<sup>-1</sup>, in linea con quanto rilevato da altri autori su

formaggi prodotti con latte ovino o caprino come il formaggio *Évora* DOP (Irlinger, et al., 2012) (Coton, et al., 2012) (Freitas & Malcata, 2000), mentre questi valori risultano più alti rispetto a quanto descritto da altri autori su formaggi *La Serena* DOP e *Caciofiore della Sibilla*, rispettivamente (Freitas & Malcata, 2000) (Cardinali, et al., 2017). Questi microrganismi sono responsabili della produzione di enzimi lipolitici e proteolitici, importante nel caso della maturazione centripeta di alcuni formaggi a crosta fiorita come il Taleggio, la famiglia delle Micrococcaceae attraverso le loro proprietà saccarolitiche, lipolitiche e proteolitiche contribuisce agli aromi nel prodotto finale (Iacumin, et al., 2006) (Aquilanti, et al., 2007). (Galli, 2005).

I formaggi *Queijo da Beira Baixa* DOP analizzati hanno mostrato inoltre una carica di enterococchi con valori compresi tra  $5,4 \pm 0,9 \log \text{ UFC g}^{-1}$  e  $5,9 \pm 0,1 \log \text{ UFC g}^{-1}$ . Gli enterococchi, sono microrganismi ubiquitari, crescono nel suolo, nelle acque e nel tratto gastro-intestinale degli animali e degli umani e possono derivare da contaminazione incrociata se presenti negli alimenti fermentati o in formaggi prodotti con latte crudo (Cardinali, et al., 2021), hanno un'elevata adattabilità all'interno del formaggio durante il periodo di maturazione dello stesso e hanno la capacità di produrre proteasi e lipasi; le proteasi degradano la caseina del latte, incrementando la concentrazione di gruppi amminici e frazioni azotate solubili, contribuendo ad un miglioramento del sapore, aroma, colore, struttura e profilo sensoriale globale dei formaggi, mentre le lipasi causano l'idrolisi dei grassi del latte a opera di esterasi specifiche e la formazione di aromi tipici legati a composti quali acetaldeide, acetoino e diacetile (Bourgeois, et al., 1990) (Jay, 1996) (Tiecco, 1997).

Nei campioni di *Queijo da Beira Baixa* DOP la carica di *Enterobacteriaceae* è risultata non differire statisticamente tra i tre produttori analizzati con valori complessivamente inferiori con quanto riportato da altri autori in formaggi a caglio vegetale come *Queijo de Azeitão* DOP, *Serra da Estrela* (Cardinali, et al., 2017) (Marques, 1991) (Mata, 1989).

I bassi valori di *Enterobacteriaceae* rilevati nei campioni in analisi sono un indice molto importante di salubrità del prodotto in quanto questo gruppo microbico è considerato indice d'igiene durante la mungitura e il processo di caseificazione. Sono microrganismi anti-caseari causando difetti al formaggio attraverso la fermentazione del lattosio, quali ad esempio gonfiore, sapori indesiderati, scarsa acidificazione del prodotto e proteolisi (Galli, 2005).

Infine, la determinazione della flora microbica eumicetica ha permesso di rilevare bassi valori di lieviti e muffe, con valori compresi tra  $1,6 \pm 2,2 \log \text{ UFC g}^{-1}$  e  $3,8 \pm 1,3 \log \text{ UFC g}^{-1}$ . In altri studi sul formaggio Castelo Branco sono state trovate cariche superiori di muffe e lieviti, responsabili della produzione di pigmenti sulla superficie (Freitas & Malcata, 2000). La presenza di muffe nei formaggi può essere attribuita all'ambiente di lavoro e alla

manipolazione dei prodotti stessi. La loro presenza che in taluni casi risulta essere favorevole, come nel caso di formaggi erborinati, in cui le muffe vengono deliberatamente aggiunte come starter partecipando alla maturazione in formaggi come il Taleggio e il Gorgonzola, può invece essere sfavorevole in altri casi determinando difetti, come il gonfiore e alterazioni sensoriali oltre alla possibile produzione di micotossine (Galli, 2005).

#### 4.2 Risultati analisi chimico-fisiche

I risultati delle analisi chimico-fisiche, pH, TTA e contenuto di acido lattico ed acetico, dei tre campioni di formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP, sono mostrati nella Tabella 4-2: Media e deviazione standard del pH, TTA, acido lattico e acido acetico.

**Tabella 4-2: Media e deviazione standard del pH, TTA, acido lattico e acido acetico**

Produttore	pH	TTA [ml NaOH 0,1 M]	Acido lattico [g/100g]	Acido acetico [g/100g]
<i>Produttore 1</i>	4,95 ± 0,18 <sup>a</sup>	21,80 ± 1,13 <sup>a</sup>	1,66 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>
<i>Produttore 2</i>	5,05 ± 0,06 <sup>a</sup>	23,70 ± 1,27 <sup>a</sup>	1,94 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,11 <sup>a</sup>
<i>Produttore 3</i>	5,65 ± 0,25 <sup>a</sup>	13,45 ± 2,05 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>a</sup>

Valori espressi come media ± deviazione standard. Le lettere in apice indicano differenze statistiche tra i campioni in analisi sulla base del *Tukey-Kramer's Honest Significant Difference (HSD) test* ( $\alpha=0.05$ )

I valori di pH dei formaggi *Queijo da Beira Baixa* DOP non hanno mostrato differenze statisticamente significative con valori compresi tra 4,95 ± 0,18 e 5,65 ± 0,25, i risultati sono in linea con quanto riportato da altri autori per formaggi portoghesi prodotti con latte crudo ovino a base di caglio vegetale come *Nisa*, *La Serena* e *Serra da Estrela* (Freitas & Malcata, 2000) (Mata, 1989) (Marques, 1991). Nei formaggi il pH rilevato deriva dall'attività metabolica dei batteri lattici presenti, in particolar modo dalla produzione di acidi organici a partire dal lattosio come acido lattico, in caso di fermentazione eterolattica anche di acido acetico e anidride carbonica. (Galli, 2005) Il pH nei formaggi ha un impatto importante sulla proteolisi del formaggio stesso e sulle proteasi del caglio vegetale, ad esempio le proteasi di *C. cardunculus* le quali mostrano una maggiore attività enzimatica a pH 5.1 (Cardinali, et al., 2021) (Heimgartner, et al., 1990) (Roa, et al., 1999).

Per quanto concerne la determinazione della TTA, valori riscontrati sono compresi tra 13,45 ± 2,05 ml NaOH 0,1 M e 23,70 ± 1,27 ml NaOH 0,1 M, con una differenza statistica riscontrata tra i produttori 1 e 2, i quali mostrato livelli di TTA nettamente più elevati rispetto al produttore 3.

Analogamente, il contenuto di acido lattico rilevato del formaggio *Queijo da Beira Baixa* DOP del produttore 3 risulta statisticamente inferiore rispetto ai valori medi rilevati per gli altri due produttori ( $1,66 \pm 0,35$  g  $100\text{g}^{-1}$  produttore 1 e  $1,94 \pm 0,16$  g  $100\text{g}^{-1}$  produttore 2).

Infine, nessuna differenza statistica è stata evidenziata per i formaggi *Queijo da Beira Baixa* DOP presi in esami per quanto concerne il contenuto di acido acetico, con valori compresi tra  $0,19 \pm 0,01$  g  $100\text{g}^{-1}$  e  $0,28 \pm 0,11$  g  $100\text{g}^{-1}$ .

Valori elevati di acido lattico causano un abbassamento del pH maggiore rispetto all'acido acetico, si noti infatti come i produttori 1 e 2 hanno una concentrazione maggiore di acido lattico ( $1,66 \pm 0,35$  g  $100\text{g}^{-1}$  e  $1,94 \pm 0,16$  g  $100\text{g}^{-1}$ ) e un pH più acido ( $4,95 \pm 0,18$  e  $5,05 \pm 0,06$ ) rispetto al produttore 3 nonostante quest'ultimo abbia una misura maggiore di acido acetico. Questa differenza è riportata anche dall'analisi statistica, in cui il produttore 3 è risultato differire statisticamente rispetto agli altri produttori per quanto riguarda il contenuto di acido lattico.



## CONCLUSIONI

I formaggi a caglio vegetale sono prodotti ad alto valore nutrizionale, ampiamente diffusi in tutto il mondo, ma che trovano massima espressione nell'area mediterranea e in particolar modo nella Penisola Iberica.

Molti sono i formaggi prodotti in Spagna e Portogallo insigniti del marchio DOP (denominazione di origine protetta) e tra questi è possibile annoverare i formaggi Serra da Estrela, Serpa, Serena, Torta del Casar, Los Pedroches, Azeitão e Queijo da Beira Baixa. Questi formaggi prodotti spesso in caseifici artigianali o piccoli caseifici a conduzione familiare sono protetti da disciplinari di produzione specifici che ne tutelano l'unicità e le peculiarità intrinseche.

In particolare, i formaggi a caglio vegetale, prodotti con estratti acquosi di *C. cardunculus* L. rappresentano dei prodotti alimentare di ampio interesse scientifico per le loro caratteristiche microbiologiche e chimico-fisiche che ne determinano delle caratteristiche organolettiche estremamente particolari e uniche.

Nel presente lavoro di tesi sperimentale è stato possibile caratterizzare dal punto di vista chimico-fisico e microbiologico tre diverse produzioni di formaggio *Queijo da Beira Baixa* identificando una buona omologia tra i lotti prodotti in stabilimenti produttivi differenti.

In relazione a tale evidenza e alla presenza di pochi riferimenti bibliografici è dunque auspicabile la conduzione di ulteriori studi al fine di definire in modo più dettagliato le caratteristiche microbiologiche di questo prodotto tipico tradizionale ampiamente apprezzato.

## BIBLIOGRAFIA

- Agboola, S., Chen, S. & Zhao, J., 2004. Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. *Lait*, Volume 84, pp. 567-578.
- Alce, s.d. *Alce*. [Online]  
Available at: <https://alce.eu/prodotti-Caglio-e-Coagulanti-3>  
[Consultato il giorno 31 01 2022].
- Aquilanti, L. et al., 2007. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 120, p. 136–145.
- Association, A. P. H., 1978. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 14th ed a cura di Washington DC: APHA Inc.
- Barracosa, P. et al., 2021. Biochemical diversity of cardoon flowers (*Cynara cardunculus* L.): Predicting PDO Mediterranean cheese textures. *Food Bioscience*, Volume 39.
- Barros, R. M. & Malcata, F. X., 2002. Modeling the kinetics of whey protein hydrolysis brought about by enzymes from *Cynara cardunculus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 50, pp. 4347-4359.
- Bourgeois, C. M., Mescle, J. F. & Zucca, J., 1990. *Aspetti microbiologici della sicurezza e della qualità*. Milano: Tecniche nuove.
- Carbone, K. et al., 2008. The rennet paste: the effects of the production techniques on the enzymatic activity and the role of the lipolytic fraction. *SCIENZA E TECNICA LATTIERO-CASEARIA*, Volume 59, pp. 39-53.
- Cardinali, F. et al., 2021. Microbial communities and volatile profile of Queijo de Azeitao ~ PDO cheese, a traditional Mediterranean thistle-curdled cheese from Portugal. *Food Research International*, Volume 147, pp. 1-15.
- Cardinali, F. et al., 2017. Impact of thistle rennet from *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia* on bacterial diversity and dynamics of a specialty Italian raw ewes' milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 255, pp. 7-16.

- Cavalli, S. V., Lufrana, D., Colombo, M. L. & Priolo, N., 2013. Properties and applications of phytepsins from thistle flowers.. *Phytochemistry*, Volume 92, p. 16–32.
- Chapman, G. H., 1945. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology*, Volume 50, pp. 201-203.
- Christaki, E., Bonos, E. & Florou-Paneri, P., 2012. Nutritional and functional properties of Cynara crops (globe artichoke and cardoon) and their potential applications: A review. *International Journal of Applied Science and Technology*, 2(2), pp. 64-70.
- Cogan, T. M. & Rea, M. C., 1996. Artisanal European cheeses. Studies. T. M. Cogan and M. C. Rea, ed. EUR 16788. *European Commission*.
- Cordeiro, M. et al., 1992. Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from Cynara-Cardunculus—a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft*, 47(11), pp. 683-687.
- Coton, M. et al., 2012. Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiology*, Volume 29, pp. 88-98.
- Cruz, A. A. & Borrego J., D., 1948. Queijo a` ovelheira e queijo a` cabreira. Volume 16, p. 17.
- Dias, J., 1955. *Etnografia da Beira*. IIª Edizione a cura di Lisbona: Livraria Ferin.
- Dias, J., 2000. História do fabrico do Queijo na Beira Baixa. *Via Láctea—Revista de Lacticínio*, Volume 15, pp. 34-36.
- Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural, s.d. *Produtos Tradicionais Portugueses*. [Online] Available at: [https://tradicional.dgadr.gov.pt/images/prod\\_imagens/queijos/docs/CE\\_Queijo\\_Beira\\_Baixa\\_analise.pdf](https://tradicional.dgadr.gov.pt/images/prod_imagens/queijos/docs/CE_Queijo_Beira_Baixa_analise.pdf) [Consultato il giorno 28 01 2022].
- Dunn, B. M., 2002. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Reviews*, Volume 102, pp. 4431-4458.
- Dupas, C. et al., 2020. Plants: A natural solution to enhance raw milk cheese preservation?. *Food Research International*, Volume 130.

- Faro, C. et al., 1999. Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 274, pp. 28724-28729.
- Fernández-Salguero, J., Gómez, R., Tejada, L. & Vioque, M., 2000. A powered vegetal coagulant, procedure for its preparation and application to cheese-making. *Spanish Patent*.
- Fernández-Salguero, J. et al., 2003. Use of recombinant cyprosin in the manufacture of Ewe's milk cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 51, pp. 7426-7430.
- Fernández-Salguero, J., Tejada, L. & Gómez, R., 2002. Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 82, pp. 464-468.
- Ferreira, I., Pinho, O. & Sampaio, P., 2009. Volatile fraction of DOP "Castelo Branco" cheese: Influence of breed. *Food Chemistry*, Volume 112, pp. 1053-1059.
- Fox, P., Guinee, T., Cogan, T. & McSweeney, P., 2017. Cheese historical aspects. *Fundamentals of cheese science*, pp. 1-10.
- Freitas, C. & Malcata, X. F., 2000. Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'Origine Protegée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. *Journal of Dairy Science*, 83(3), pp. 584-602.
- Freitas, C. & Malcata, X. F., 2000. Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'Origine Protégée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. *Journal Dairy Science*, Volume 83, pp. 584-602.
- Froc, J., 2007. *Balade au pays des fromages: Les tradition fromagères en France*. Versailles: Edition Quae.
- Galli, V. A., 2005. *Microbiologia degli alimenti*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana.
- Gazzetta, U., 1925. *Edizioni europee*. [Online] Available at: [http://www.edizionieuropee.it/law/html/11/zn2\\_06\\_002.html#\\_ART0032](http://www.edizionieuropee.it/law/html/11/zn2_06_002.html#_ART0032) [Consultato il giorno 28 Ottobre 2021].
- Góstin, A. I. & Waisundara, V., 2019. Edible flowers as functional food: A review on artichoke (*Cynara cardunculus* L.). *Trends in Food Science & Technology*, Volume 86, pp. 381-389.
- Heimgartner, U. et al., 1990. Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara-Cardunculus*. *Phytochemistry*, 29(5), pp. 1405-1410.

- Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C. & Cocolin, L., 2006. Molecular and technological characterization of *Staphylococcus xylosum* isolated from naturally fermented Italian sausages by RAPD, Rep-PCR and Sau-PCR analysis. *Meat Science*, Volume 74, p. 281–288.
- Irlinger, F. et al., 2012. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 153, pp. 332-338.
- Jacob, M., Jaros, D. & Rohm, H., 2011. Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal Dairy Technologies*, 64(1), pp. 14-33.
- Jay, J. M., 1996. *Modern food microbiology*. New York: Chapman & Hall.
- Kumari, R., Sharma, A. & Jagannadham, M. V., 2012. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus Religiosa*. *Food Chemistry*, Volume 131, pp. 1295-1303.
- Llorente, B. E. et al., 2014. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. *Food Chemistry*, Volume 159, pp. 55-63.
- Lucey, J. A., 2002. Formation and physical properties of milk protein gels. *International Journal of Dairy Science*, Volume 85, pp. 281-294.
- Marques, M. R. F. S., 1991. *Caracterização e estudo do queijo de Castelo Branco em três queijarias da sua sub-região demarcada*, Castelo Branco, Portugal: Relatório Fim de Curso. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco.
- Martins, A. L., de Vasconcelos, M. P. & De Sousa, R. B., 1996. Thistle (*Cynara cardunculus* L) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *Le Lait*, Volume 76, pp. 473-477.
- Mata, F. J. R., 1989. *Caracterização e estudo do Queijo de Castelo Branco em quatro queijarias da sua sub-região demarcada*, Castelo Branco, Portugal: Relatório Fim de Curso. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco.
- Monzitta, P., A., 2016. *Monzitta e fiori*. [Online] Available at: <http://www.monzittafioriformaggi.it/il-caglio/> [Consultato il giorno 31 01 2022].

- Nunez, M. et al., 1991. Effect of vegetable and animal rennet on chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics of La Serena cheese. *International Journal of Dairy Research*, Volume 58, pp. 511-519.
- Ordiales, E. et al., 2012. Technological characterisation by free zone capillary electrophoresis (FCZE) of the vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) used in "Torta del Casar" cheese-making. *Food Chemistry*, Volume 133, pp. 227-235.
- Ordiales, E. et al., 2014. Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical, sensory and rheological characteristics of 'Torta del Casar' cheese. *International Journal of Dairy Technology*, Volume 67, pp. 402-409.
- Osimani, A. et al., 2009. Lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of the Marche Region. *Italian Journal of Food Science*, Volume 21, pp. 269-286.
- Pereira, C., 2012. *Cardosin A molecular determinants and biosynthetic pathways*, Paris, France: Université Paris Sud.
- Pimentel, C. et al., 2007. Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L.. *FEBS Journal*, Volume 274, p. 2523–2539.
- Ramalho-Santos, M. et al., 1997. Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L.. *Planta*, Volume 203, pp. 204-212.
- Ramalho-Santos, M. et al., 1997. Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L.. *Planta*, 203(2), pp. 204-212.
- Rebelo, A., 1994. *Queijaria Racional*. Lisboa: Ministério da Agricultura.
- Reis, P. J. M. & Malcata, F. X., 2011. Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Res*, Volume 101, pp. 122-133.
- Reis, P. M. et al., 2003. *Produção por tecnologias optimizadas de lacticínios tradicionais certificados: PROLACTIS*, s.l.: Universidade Católica Portuguesa, Escola Superior de Biotecnologia.
- Ricceri, J. & Barbagallo, R. N., 2016. Role of protease and oxidase activities involved in some technological aspects of the globe artichoke processing and storage. *Food Science and Technology*, Volume 71, p. 196–201.

- Roa, I., Lopez, M. B. & Mendiola, F. J., 1999. Residual clotting activity and ripening properties of vegetable rennet from *Cynara cardunculus* in La Serena cheese. *Food Research International*, Volume 32, pp. 413-419.
- Roseiro, L., Barbosa, M., Ames, J. & Wilbey, R., 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants - the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal Dairy Technologies*, 56(2), pp. 76-85.
- Sarmiento, A. C. et al., 2009. Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus L.* *Planta*. *Planta*, Volume 230, pp. 429-439.
- Shah, M. A., Mir, S. A. & Paray, M. A., 2014. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking. *Dairy Science & Technology*, 94(1), pp. 5-16.
- Simoës, I. & Faro, C., 2004. Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry*, Volume 271, pp. 2067-2075.
- Sousa, M. J. & Malcata, F. X., 1998. Identification of peptides from ovine milk cheese manufactured with animal rennet or extracts of *Cynara cardunculus* as coagulant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), pp. 4034-4041.
- Sousa, M. J. & Malcata, F. X., 2002. Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait*, 82(2), pp. 151-170.
- Tejada, L., 2001. Proposal of improve of the quality, tecnology and security of artisanal ewe's milk cheese. *PhD Thesis, University of Cordoba*.
- Tiecco, G., 1997. *Igiene e tecnologia alimentare*. Bologna: Edagricole.
- Ustunol, Z. & Hicks, C. L., 1990. Effect of milk-clotting enzymes on cheese yield. *Internatinal Dairy Journal*, Volume 73, pp. 8-16.
- Verissimo, P., Esteves, C., Faro, C. & Pires, E., 1995. The vegetable rennet of *Cynara-cardunculus L* contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnol Lett*, 17(6), pp. 621-626.
- Vieira, M. et al., 2001. Molecular cloning and characterization of the cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus L.* *Plant Molecular Biology*, Volume 45, pp. 529-539.

Vioque, M. et al., 2000. Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 48(2), pp. 451-456.

## RINGRAZIAMENTI

Si conclude così un capitolo della mia vita, nel quale ho acquisito conoscenze fondamentali per intraprendere la mia futura carriera, superando ostacoli e difficoltà che all'inizio sembravano insormontabili, non avrei mai pensato di arrivare a questo punto.

Un sincero e sentito ringraziamento al Professore Osimani Andrea per avermi dato la possibilità di essere il mio Relatore ed avermi affiancato alla Dottoressa Cardinali Federica, mia Correlatrice durante tutto questo progetto, la quale mi è stata vicina durante la parte sperimentale ed aver contribuito alla stesura della tesi, grazie alla sua disponibilità in ogni momento, anche in quelli più difficili.

Vorrei ringraziare il mio ragazzo Carlo per esserci stato sempre dall'inizio di questo percorso universitario fino alla fine, non riesci neanche ad immaginare quanto sei stato fondamentale ogni giorno in ogni istante.

Una dedica speciale ai miei amici che ogni giorno hanno condiviso con me gioie, sacrifici e successi senza voltarmi mai le spalle. Grazie per non avermi mai lasciata sola.

Alle mie amiche dell'università che tra lezioni, esami e serate mi hanno sempre strappato un sorriso anche quando sembrava impossibile.

Ai miei genitori e a mio fratello Francesco, grazie ai quali mi hanno permesso di iniziare questo percorso universitario, rendendomi la persona che sono tutt'ora, standomi vicina sempre e comunque, un semplice grazie non basta.