



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

CARATTERIZZAZIONE MICROBIOLOGICA DI UN
FORMAGGIO PORTOGHESE COAGULATO CON
CAGLIO VEGETALE: *QUEIJO DE AZEITÃO* DOP.

MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A
PORTUGUESE CHEESE COAGULATED WITH
VEGETABLE RENNET: *QUEIJO DE AZEITÃO* DOP.

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
GIORGIA AUBERT

Relatore:
PROF. ANDREA OSIMANI

Correlatore:
DOTT. SSA FEDERICA CARDINALI

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

A Tommaso

INDICE

ELENCO DELLE TABELLE.....	4
ELENCO DELLE FIGURE.....	5
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	6
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	7
1.1 FORMAGGI E CENNI STORICI.....	7
1.2 IL PROCESSO DI CASEIFICAZIONE.....	9
1.3 USI TRADIZIONALI DELLE PIANTE NEL PROCESSO DI CASEIFICAZIONE.....	12
1.3.1 Uso di piante nel latte prima del processo di caseificazione.....	12
1.3.2 Uso di estratti vegetali per la coagulazione del latte.....	13
1.3.3 Uso di piante nel formaggio dopo coagulazione.....	13
1.4 CYNARA CARDUNCULUS L.: USI E TRADIZIONI.....	14
1.5 FORMAGGI PORTOGHESI: TRADIZIONE E ASPETTI MICROBIOLOGICI.....	16
1.6 FORMAGGIO QUEIJO DE AZEITÃO DOP.....	18
1.6.1 Storia.....	18
1.6.2 Processo di caseificazione e descrizione del formaggi.....	19
CAPITOLO 2: SCOPO.....	24
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI.....	25
3.1 Campionamento.....	25
3.2 ANALISI CHIMICO - FISICHE.....	25
3.2.1 Determinazione di pH.....	25
3.2.2 Determinazione dell'acidità totale titolabile.....	26
3.3 CONTE VITALI.....	26
CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE.....	33
4.1 RISULTATI ANALISI CHIMICO - FISICHE.....	33
4.2 RISULTATI CONTE VITALI.....	34
CONCLUSIONI	38
BIBLIOGRAFIA	39

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 4-1: Valori di pH e TTA nei campioni di formaggio Queijo de Azeitão DOP.....	33
Tabella 4-2: Determinazione della carica microbica del formaggio.....	37

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Rottura della cagliata.....	19
Figura 1-2: Processo di separazione tra siero e massa caseosa.....	20
Figura 1-3: Massa caseosa.....	20
Figura 1-4: Fuscelle di acciaio inox usate durante la formatura del formaggio.....	20
Figura 1-5: Prima maturazione.....	21
Figura 1-6: Seconda maturazione.....	21
Figura 1-7: Fase di confezionamento con utilizzo di carta vegetale lucida bianca.....	22
Figura 1-8: Confezionamento ed etichettatura del formaggio Queijo de Azeitão DOP...	22
Figura 3-1: pH-metro con elettrodo solido HI2031.....	25
Figura 3-2: Strumentazione per la determinazione della TTA.....	26
Figura 3-3: Stomacher 400 circulator.....	27

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

SPP.	Sottospecie
VAR	Variante
DOP	Denominazione di origine protetta
LDL	Low density lipoprotein
HIV	Human immunodeficiency virus
EFSA	Autorità Europea per la sicurezza alimentare
ARCOLSA	Associazione regionale allevatori ovini di latte di Serra de Arràbida
LAB	Lactic acid bacteria
UR	Umidità relativa
TTA	Acidità totale titolabile
RPM	Giri al minuto
CFC	Cetrimide, Acido Fusidico e Cefaloridina
UFC	Unità formanti colonia

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Formaggio: cenni storici

Le prime documentazioni storiche sull'utilizzo dei prodotti fermentati a base di latte sono riconducibili a quanto rinvenuto in testi antichi recuperati in Iraq databili circa 3200 a.C. Sembra che l'arte della caseificazione abbia avuto origine in Asia Minore e una volta giunta in Europa, abbia trovato il suo primo sviluppo attraverso i Romani, infatti in *Naturalis Historia* di Plinio il Vecchio (23-79 d.C.) si comprende l'importanza che il formaggio ricopriva nell'alimentazione.

L'articolo 32 del Regio Decreto (R.D.L) n. 2033 del 15 ottobre 1925, successivamente modificato dall'art. 1 del R.D.L. n. 381 del 6 aprile 1933, afferma che *“il nome di formaggio o cacio è destinato al prodotto che si ricava dal latte intero, ovvero parzialmente o totalmente scremato, oppure dalla crema, in seguito a coagulazione acida o presamica, anche facendo uso di fermenti e di sale da cucina”*.

I formaggi possono essere classificati:

- in base al tipo di latte utilizzato (formaggi vaccini, ovini, caprini, bufalini e misti);
- in base al contenuto di grassi (grasso, semigrasso, leggero e magro);
- in base alla consistenza della pasta (molle, semidura e dura);
- in base al trattamento termico del latte (a latte pastorizzato o a latte crudo);
- in base alla temperatura di lavorazione della pasta (a pasta cruda, a pasta cotta e a pasta semicotta);
- in base ai tempi di stagionatura (freschi, a stagionatura media e a stagionatura lenta);
- in base al processo di lavorazione della pasta (erborinata, filata, pressata e fusa);
- in base al tipo di crosta (fiorita, affumicata e lavata).

La classificazione più comunemente accettata è quella del *Codex Alimentarius* che classifica i formaggi in base alla combinazione di tre parametri che sono:

- consistenza della pasta;
- contenuto di grasso espresso sulla sostanza secca;
- tipo di maturazione.

Il formaggio è ricavato dal latte che è una soluzione acquosa composta da lattosio, sali minerali e vitamine in cui sono disperse proteine in forma colloidale e globuli di grasso in emulsione. È costituito principalmente da acqua, grassi, proteine, zuccheri, acidi organici, sali minerali e vitamine.

La frazione glucidica del latte è costituita principalmente da lattosio che è un disaccaride composto da una molecola di glucosio e una di galattosio.

Oltre al lattosio sono presenti altri zuccheri come il glucosio, galattosio, N-acetilglucosammina e N-acetilgalattosammina che sono legati alle proteine, soprattutto alla k-caseina.

La frazione azotata è costituita da proteine e da sostanze azotate di natura non proteica come l'urea. Tra le proteine troviamo le caseine come componente principale (~ 80%) e in proporzione le sieroproteine che rappresentano circa il 20%. Le proteine del siero sono soprattutto l'attoalbumine e l'attoglobuline che sono di rapida assimilazione. Le caseine sono proteine coniugate e nel latte ne troviamo 4 tipi: α S1-caseina, α S2-caseina, β -caseina e k-caseina.

Le caseine, ad eccezione delle k-caseine, sono molecole idrofobiche in grado, quindi, di formare aggregati definiti micelle costituiti dunque dalle caseine α S1, α S2 e β . Le micelle sono tenute in sospensione grazie alle k-caseine che sono idrofiliche, quindi, anche se sono insolubili in acqua non precipitano. La precipitazione delle caseine avverrà esclusivamente a seguito dell'aggiunta di caglio al latte, con conseguente formazione della massa caseosa.

La frazione lipidica del latte è costituita da trigliceridi, fosfolipidi e steroli. Questa frazione grassa si presenta come un'emulsione di globuli di grasso nei quali nella parte centrale si trovano i trigliceridi e nella porzione esterna è presente una membrana costituita da lipoproteine e fosfolipidi. I trigliceridi permettono di mantenere bassa la tensione superficiale tra i globuli di grasso e la fase sierosa prevenendo in tal modo la separazione delle fasi.

Tra gli acidi organici presenti nel latte quello di maggior importanza è l'acido citrico che rappresenta circa il 90% del totale. L'acido citrico svolge un ruolo fondamentale all'interno del latte in quanto influisce sulla solubilizzazione dello ione Ca^{2+} , contribuendo alla stabilità del complesso caseinato di calcio e alla stabilizzazione delle caseine.

I sali presenti nel latte sono o sotto forma di ioni liberi come il sodio, potassio e cloro, o associati alle proteine come calcio, magnesio e fosforo.

Le vitamine presenti sono le vitamine liposolubili A, E e K e la vitamina idrosolubile C.

1.2 Il processo di caseificazione

Il processo di caseificazione prevede fasi che si mantengono invariate per tutte le tipologie di formaggio; ma ciò che caratterizza le singole produzioni è la modalità con cui queste sono condotte (Croguennec *et al.*, 2008).

Il processo può essere schematizzato in tre fasi principali: l'arrivo del latte al caseificio, la lavorazione del latte nella vasca di coagulazione, la fase in caldaia, e l'ultima fase fuori caldaia che determina il passaggio da cagliata a formaggio.

Il latte crudo portato al caseificio con apposite cisterne refrigerate entro 48 ore dalla mungitura, viene sottoposto in primo luogo a refrigerazione a 4°C con lo scopo di impedire la proliferazione microbica di specie patogene o alterative eventualmente presenti.

A seguito della refrigerazione il latte può essere sottoposto a trattamenti termici diversi in base alla tipologia di formaggio quali: termizzazione o pastorizzazione e al processo di scrematura.

La termizzazione prevede un trattamento termico molto blando con un riscaldamento a 57 °C e 68 °C per 15 secondi. Tale processo ha lo scopo di ridurre la carica microbica anticasearia lasciando inalterata la flora microbica protecnologica.

La pastorizzazione è un trattamento termico che avviene a 72 °C per 15 secondi che viene effettuato per eliminare la microflora batterica patogena.

La scrematura è un processo di separazione del grasso sottoforma di ammassi di globuli, che può avvenire per affioramento all'interno di vasche di affioramento ad una temperatura di ~18°C, tale processo determina una debatterizzazione del latte, o attraverso un processo di centrifugazione che non va ad influenzare particolarmente la qualità microbiologica del latte scremato.

Dopo questi trattamenti il latte può considerarsi pronto per la lavorazione in caldaia.

Quando il latte viene posto in caldaia avviene l'aggiunta dell'innesto o starter che è costituito da colture microbiche specifiche che vanno a modificare la composizione del latte fornendo enzimi in grado di far avviare la fermentazione lattica. Gli innesti possono essere sotto forma di innesti naturali e innesti selezionati.

Gli innesti naturali, come il siero-innesto e il latte-innesto, sono prodotti artigianalmente presso il caseificio mentre quelli selezionati sono prodotti a partire da collezioni di ceppi selezionati presso strutture industriali specializzate.

All'aggiunta dell'innesto segue l'aggiunta di caglio con conseguente coagulazione.

La coagulazione consiste nel cambiamento di struttura del latte che passa dallo stato liquido allo stato di gel grazie alla precipitazione delle caseine e può essere acida o presamica. La coagulazione acida è un processo che può avvenire per acidificazione diretta, mediante aggiunta di acidi organici (es. acido lattico) o mediante acidificazione legata al processo di fermentazione operato da batteri lattici naturalmente presenti o aggiunti sotto forma di starter. La coagulazione si verifica al raggiungimento di un valore di pH pari a 4,6, a tale valore di pH le micelle coagulano a seguito della perdita della loro carica negativa e gli ioni Ca^{2+} vengono espulsi con conseguente formazione di lattato di calcio.

La coagulazione presamica avviene mediante aggiunta di caglio al latte che si trova a temperatura di 30-37°C.

Il caglio può essere di origine animale, quindi estratto dal quarto stomaco dei lattanti bovini, ovini e caprini o può essere di origine vegetale, estratto principalmente da cardo, fico e papaya. Oltre a queste due tipologie di caglio che risultano essere le più utilizzate nel settore della caseificazione esiste il caglio microbico, rappresentato dall'enzima aspartil-proteasi estratto dalla muffa *Mucor miehei*, e il caglio biotecnologico ottenuto da DNA ricombinante delle specie: *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Kluyveromyces lactis* o *Escherichia coli*.

Il caglio animale e/o vegetale contiene degli enzimi proteolitici, quali chimosina e pepsina, che, una volta aggiunti al latte, vanno ad agire sulla caseina idrolizzando il legame peptidico tra gli amminoacidi fenilalanina 105 e metionina 106, determinando in tal modo la liberazione di due frammenti peptidici, la para-k-caseina caseino macropeptide che si andrà a solubilizzare nel siero.

Il distacco del caseino macropeptide andrà a destabilizzare l'equilibrio tra le micelle di caseina che tenderanno ad aggregarsi originando in tal modo il coagulo o cagliata.

Una volta avvenuta la formazione della cagliata, la stessa viene rotta in granuli della dimensione desiderata, attraverso un processo che prende il nome di spinatura. Per i formaggi a pasta cotta, la cagliata viene sottoposta ad un trattamento termico mediante il quale sarà permessa la selezione della microflora lattica, al contrario, per i formaggi a pasta cruda non sarà previsto nessun trattamento termico.

A seguito della coagulazione la cagliata viene estratta e si prosegue con le operazioni fuori caldaia.

In primo luogo, la cagliata viene posta in stampi o fascere per permettere il consolidamento della struttura del formaggio, ovvero la formatura, che avviene grazie al completamento dello spurgo del siero e al raffreddamento progressivo della cagliata. Durante la trasformazione della cagliata avviene il completamento dell'acidificazione o stufatura che avviene ad alta temperatura (25-30°C). Questa permette il massimo sviluppo dei batteri lattici ma nel caso di formaggi a pasta molle un eccesso di acidificazione può modificare la struttura del formaggio rendendolo più friabile.

Successivamente avviene la salatura che viene eseguita a secco o in salamoia.

Il sale è un ingrediente molto importante nella produzione di formaggio in quanto conferisce sapidità, completa lo spurgo del siero, favorisce la formazione della crosta e riduce l'attività dell'acqua inducendo una selezione batterica.

L'ultima fase fuori caldaia è la maturazione o stagionatura che avviene con tempi e modalità variabile a seconda della tipologia di formaggio.

Durante la maturazione avviene:

- riduzione del contenuto di acqua con formazione della crosta;
- trasformazione dei glucidi in quanto il lattosio viene trasformato dai batteri lattici in acido lattico che a sua volta viene trasformato in composti aromatici;
- scissione della caseina in amminoacidi e peptidi che conferiscono aromi e sapori particolari al formaggio;
- trasformazione dei lipidi da parte di enzimi con liberazione di sostanze aromatiche.

1.3 Usi tradizionali delle piante nel processo di caseificazione

Nel latte, soprattutto nel latte crudo nel quale non vengono effettuati trattamenti termici, si può verificare la proliferazione di microrganismi patogeni come *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

La produzione di formaggi da latte crudo ovino o caprino, o da un mix di entrambi, coagulati con l'ausilio di agenti vegetali è diffusa in molte aree dell'Africa (García *et al.*, 2012), dei paesi dell'America Latina (Fox, 1999) e del Mediterraneo, in particolare nella Penisola Iberica (Roseiro *et al.*, 2003) e in Italia (Aquilanti *et al.*, 2011).

L'utilizzo delle piante o di estratti acquosi, derivati da porzioni di piante, durante il processo di caseificazione può avere molteplici scopi quali ad esempio il migliorarne delle proprietà aromatiche, l'incremento delle proprietà tecnologiche o un'azione antimicrobica ed antiossidante.

1.3.1 Uso di piante nel latte prima del processo di caseificazione

Generalmente le piante introdotte nel latte prima del processo di caseificazione sono aggiunte con lo scopo di migliorare le proprietà aromatiche del formaggio. Le erbe e spezie utilizzate comunemente sono pepe nero, pepe verde, cumino, cipolla e paprika, mentre meno frequente risulta essere l'aggiunta di basilico e origano. Tradizionalmente la quantità di spezie o erbe aggiunte è piuttosto bassa pari a circa l'1% della cagliata (Hayaloglu & Farkye, 2011).

L'aggiunta di spezie prima del processo di caseificazione può avere un importante impatto sullo sviluppo della flora microbica del prodotto, un esempio è l'olio di cumino usato nella produzione del formaggio Domiati, il quale aggiunto prima della caseificazione determina una riduzione della carica di microrganismi patogeni durante la conservazione in condizione di refrigerazione (Mahgoub *et al.*, 2013; Hassanien *et al.* 2014).

1.3.2 *Uso di estratti vegetali per la coagulazione del latte*

Durante il processo di caseificazione gli estratti vegetali possono essere aggiunti al fine di migliorare il processo di coagulazione (Shah *et al.*, 2014). Innumerevoli sono le specie vegetali che possono essere utilizzate come caglio, fra queste, frutta come fico, ananas e papaya, o vegetali come zucca e cardo (Roseiro *et al.*, 2003).

L'utilizzo di piante per la coagulazione del latte è molto richiesto in questo momento, ciò è dovuto in particolare all'introduzione di diete come la dieta vegetariana nella quale non è prevista l'assunzione di prodotti di derivazione animale o in relazione a restrizioni religiose (Dupas *et al.*, 2020).

I formaggi prodotti con caglio vegetale, inoltre, risultano più digeribili e più aromatizzati. L'utilizzo del caglio vegetale è sviluppato soprattutto nei paesi che si affacciano sul Mediterraneo e in Portogallo in cui la produzione di formaggio avviene prevalentemente mediante l'utilizzo di caglio vegetale (Dupas *et al.*, 2020).

1.3.3 *Uso di piante nel formaggio dopo coagulazione*

L'uso di piante a seguito della coagulazione è soprattutto legato alla definizione di specifici aspetti estetici e soprattutto per la definizione di specifici *flavours* nel prodotto finale (Collectif, 1998; Froc, 2007; Sicard, 2018). Tradizionalmente possono essere utilizzate erbe o spezie tritate o in alternativa per alcuni formaggi specifici anche intere parti della pianta. In Francia, ad esempio, il formaggio Banon DOP è tradizionalmente fatto maturare avvolto da foglie di castagno che sono in grado di conferire un sapore estremamente peculiare (Décret, 2003). L'uso delle piante nella fase di maturazione oltre a fornire un miglioramento dell'aspetto fisico e organolettico del prodotto finale può apportare un'azione antimicrobica ed antiossidante (Dupas *et al.*, 2020).

1.4 *Cynara cardunculus* L.: usi e tradizioni

Tra le specie vegetali più comunemente utilizzate nella produzione di formaggi il genere *Cynara* è quello più diffuso ed in particolare due sono le specie più frequentemente descritte *Cynara humilis* e *Cynara cardunculus* L.

Quest'ultima specie ampiamente studiata è suddivisa in tre taxa principali (Christaki, *et al.*, 2012):

- *Cynara cardunculus* var. *atilis* DC - cardo domestico;
- *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori - carciofo;
- *Cynara cardunculus* var. *sylvestris* (Larm) Fiori- cardo selvatico.

Dal punto di vista morfologico il genere *Cynara* presenta l'asse floreale eretto, solitamente spinato, dal quale partono delle ramificazioni che presentano delle infiorescenze nella parte terminale. Le foglie sono alterne, grandi e inarcate ed i fiori sono viola o bluastri. La sua presenza si riscontra soprattutto nelle zone del Mediterraneo, infatti la sua crescita e la fioritura sono influenzate dal clima mediterraneo che presenta estati calde e secche ed inverni piovosi e con temperature miti. La crescita della pianta può verificarsi a temperature attorno a 0°C, ma a temperatura inferiore a -2°C la pianta va incontro a morte.

L'inizio della coltivazione di questa specie si suppone sia avvenuto in Sicilia (Crinò *et al.*, 2007) per poi diffondersi successivamente, nel 16 secolo a.C., anche in Toscana e Campania (Ciancolini, 2012). La sua diffusione e il suo utilizzo sono annoverati nel trattato naturalistico *Naturalis Historia* di Plinio il Vecchio (23–79 d.C.) che lo definisce come una delle verdure più apprezzate dell'epoca.

Inizialmente era consumato dai Greci, Egizi e Romani come vegetale per le occasioni importanti, soprattutto per le festività come il Natale (Fernández *et al.*, 2006), con il tempo si è scoperto l'utilizzo dei fiori come coagulante per il latte, quindi per la produzione di formaggio (Shah, Mir, & Paray, 2014).

A seguito di ciò si iniziò a diffondere in tutta la zona del Mediterraneo, soprattutto nella Penisola Iberica e da qui verso il Portogallo (Ciancolini, 2012) dove il suo utilizzo oggi è ancora molto diffuso ed è utilizzato per produrre formaggi di notevole importanza e formaggi protetti dal marchio DOP.

La preparazione del caglio da cardo avviene artigianalmente, raccogliendo cardi maturi, caratterizzati dalla presenza di un fiore violaceo sbocciato.

Il cardo viene reciso a livello basale dello stelo e fatto essiccare a testa in giù per circa 20 giorni. Trascorsi i 20 giorni si effettua l'estrazione degli stami e dei pistilli, azione che deve avvenire con massima accuratezza in quanto durante l'estrazione potrebbero rompersi. Gli stami e i pistilli estratti vengono immersi in una scodella piena di acqua calda a 42°C, il tutto viene coperto e lasciato a riposare per 24 ore a temperatura ambiente. Trascorse le 24 ore, l'acqua viene filtrata e può essere aggiunta direttamente al latte a 40 °C. Il caglio così ottenuto può essere conservato in frigorifero a 10°C. L'aggiunta del caglio al latte determina un processo di coagulazione più lento rispetto a quello che si verifica con l'aggiunta di caglio animale ma ugualmente efficiente.

La proprietà di agente coagulante è definita dalla presenza di enzimi proteolitici o proteasi che hanno la capacità di catalizzare la rottura del legame peptidico tra il gruppo amminico e il gruppo carbossilico delle k-caseine. Nello specifico nei fiori della specie *C. cardunculus*, gli enzimi proteolitici presenti sono la cardosina A e la cardosina B, responsabili dell'idrolisi della caseina in siti di legame analoghi rispettivamente a quelli scissi da chimosina e pepsina (Sousa, 2001).

Il formaggio prodotto con questo tipo di caglio presenta una consistenza burrosa e soffice e il sapore risulta leggermente piccante, definendo così proprietà organolettiche particolari rispetto a quelle riscontrate in formaggi ottenuti dalla coagulazione del latte con il caglio animale.

Dagli studi di Riccieri e Barbagalli effettuati nel 2016 la specie *C. cardunculus* risulta classificata come cibo funzionale grazie alla presenza di silimarina, un composto di origine vegetale derivato dalla famiglia dei flavonolignani.

La sibilimarina ha diverse funzioni:

- funzione epatoprotettiva, ovvero va ad agire come coadiuvante nel trattamento di patologie del fegato.
- funzione anticancerogena, in quanto diminuisce la proliferazione di cellule tumorali.
- funzione ipocolesteromizzante, quindi in grado di abbassare il livello di colesterolo LDL.
- funzione antibatterica blanda.
- funzione anti-HIV data dall'elevato contenuto di polifenoli e dall'inulina che è un composto che va ad agire come probiotico promuovendo la flora intestinale.

1.5 Formaggi portoghesi: tradizione ed aspetti microbiologici

Il Portogallo è uno dei maggiori produttori di formaggi di eccellenza.

I formaggi portoghesi sono prodotti soprattutto a partire da latte ovino o caprino, questo aspetto è strettamente legato alle caratteristiche geografiche del territorio ricco di paesaggi montuosi e collinari che permettono l'allevamento di pecore e capre.

In Portogallo il 21,3% dei formaggi sono prodotti seguendo dei metodi tradizionali, tramandati da generazione in generazione, anche per quanto riguarda formaggi DOP.

I formaggi sono prodotti in piccoli stabilimenti e si basano sull'utilizzo di latte ovini e caprini, la produzione annuale di latte si aggira attorno a $1,2 \times 10^8$ L (INE, 2009), con una produzione di formaggi di circa 17 mila tonnellate all'anno. Una parte molto cospicua dei formaggi prodotti sfrutta cagli di originale vegetale e in particolare cagli ottenuti dai fiori essiccati di *C. cardunculus* e meno frequentemente di *C. humilis*. Nella maggior parte dei casi il nome dei formaggi è determinato sulla base della zona di origine dello stesso e tra i formaggi portoghesi DOP di maggiore rilievo troviamo:

- Azeitão DOP: prodotto da latte di pecora e caglio vegetale a breve maturazione. Presenta una consistenza morbida, un gusto intenso e salato.
- Castelo Branco DOP: prodotto con latte di pecora e di capra con caglio animale o vegetale. Presenta una consistenza semi solida e un profumo speziato.
- Serra da Estrela DOP: prodotto con latte di pecora a breve e media stagionatura. Ha consistenza semisolida e gusto salato, speziato e piccante.

Dal punto di vista microbiologico i formaggi portoghesi seppur mostrando una notevole diversificazione microbica si caratterizzano per una carica piuttosto elevata definita dall'uso di latte crudo e soprattutto dall'assenza di colture starter. Questi aspetti rendono questi formaggi molto interessanti, sollevando però anche molta attenzione da parte della comunità scientifica per i possibili effetti sulla salute del consumatore.

I batteri lattici, definiti convenzionalmente come LAB acronimo del termine inglese *lactic acid bacteria*, rappresentano la porzione microbica predominante nei formaggi artigianali (Reis & Malcata, 2011). In particolare, uno studio condotto da Tavaría e Malcata (1998) sul formaggio Serra da Estrela ha permesso di definire come i gruppi microbici stafilococchi, enterococchi, Enterobacteriaceae e lieviti siano influenzati non solo dall'azienda artigianale di produzione, ma anche dalle pratiche di produzione, dalle condizioni igieniche, dall'aggiunta di sale e dall'assenza di controllo di parametri quali temperatura e umidità nelle celle di maturazione.

Nell'ultimo ventennio molti studi sono stati condotti al fine di definire un miglioramento del profilo microbiologico dei formaggi, mantenendo inalterate le caratteristiche sensoriali tipiche. A tal scopo molti autori hanno investigato al fine di definire l'impatto di ceppi nativi usati colture starter sul profilo sensoriale di formaggi modello (Macedo & Malcata, 1997; Tavarina *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2010).

- l'evoluzione e la definizione delle caratteristiche chimico-fisici e biologiche dei prodotti finiti sono fortemente influenzate da fattori quali: tipo di latte utilizzato, che può essere di capra, di pecora o di mucca.
- area geografica nella quale viene prodotto il formaggio o nella quale avviene l'allevamento degli animali;
- tecnica di produzione del formaggio, diversa per ogni azienda agricola in quanto vengono utilizzati metodi di produzioni tradizionali;
- tipologia di alimentazione dell'animale.

Un aspetto importante in grado di influenzare notevolmente le caratteristiche finali del prodotto stagionato è il periodo di produzione e successiva stagionatura. Uno studio condotto su formaggi Serra de Estrela da Macedo e Malcata (1997) dimostrò come la stagionatura condotta durante il periodo invernale determina formaggi con un elevato contenuto di acido lattico ma un basso valore di pH e calcio, mentre i formaggi stagionati nel periodo estivo determinano formaggi con una bassa umidità relativa e un elevato contenuto di fosforo e acidi grassi liberi.

Uno degli attributi di qualità nei formaggi portoghesi è anche rappresentato dalla texture, caratteristica altamente peculiare strettamente correlata a fattori quali temperatura e umidità.

Anche il grasso è uno dei maggiori fattori che va ad influenzare la consistenza, infatti secondo gli studi effettuati da Muir nel 1997, i formaggi con alto contenuto di grassi, generalmente sono più accettati ed apprezzati rispetto ai formaggi con basso contenuto di grasso. I formaggi con basso contenuto di grasso hanno la matrice proteica più compatta, quindi il formaggio risulta più duro, un alto contenuto di grassi, invece, produce un formaggio con una pasta più soffice e liscia.

1.6 Formaggio Queijo de Azeitão DOP

Il formaggio Queijo de Azeitão DOP è un formaggio tipico portoghese prodotto esclusivamente nei comuni di Palmela, Sesimbra e Setúbal con l'uso di latte crudo ovino addizionato con coagulante vegetale estratto da *C. cardunculus*.

1.6.1 Storia

La produzione di formaggio Queijo de Azeitão inizia a partire dal 1830 grazie a Gaspar Henriquez de Paiva, nato a Beira Baixa. Egli, dovutosi trasferire nella regione di Azeitão, iniziò ad allevare le sue pecore, provenienti dalla sua regione natale, quindi iniziò a produrre formaggio. Presto si rese conto che il suo formaggio possedeva delle caratteristiche peculiari e distintive che vennero subito apprezzate.

Nel 1888 Federico Franco de Paiva, figlio di Gaspar Henriquez de Paiva, decise di presentare il formaggio da loro prodotto all'Esposizione Industriale Portoghese di Lisbona e nel 1905 venne assegnato il nome Queijo de Azeitão. Nel 1930-1940 a causa dell'aumento della richiesta di questo formaggio, fu ampliata l'area di produzione spostandosi nelle regioni vicine, ovvero Setúbal, Palmela e Sesimbra.

Nel 1984 venne creata l'Associazione Allevatori Ovini Serra da Arrábida che è un ente privato nato con il fine di proteggere i produttori di formaggi ovini garantendo controlli e certificazioni e nel 1994 iniziò ufficialmente il processo di controllo e certificazione per il formaggio Queijo de Azeitão da parte di ARCOLSA. Questo ente, ad oggi, rilascia marchi DOP ai formaggi garantendo qualità e notorietà al prodotto.

A partire dal 2005, fino ad oggi, il processo di certificazione e controllo viene effettuato da SATIVA - *Desenvolvimiento Rural* che è, appunto, un ente privato di certificazione e di controllo di prodotti del mondo agricolo.

Attualmente ogni unità commercializzata possiede un marchio di certificazione correttamente numerato e identificato che garantisce qualità e notorietà al prodotto.

Con questa certificazione il prodotto è protetto dal marchio DOP, Denominazione di Origine Protetta. Questo marchio riconosce un prodotto originario di una determinata area geografica ed impone che le caratteristiche del prodotto dipendano esclusivamente o essenzialmente da una determinata area, infatti per ottenere questo marchio occorre che tutte le fasi di produzione, trasformazione e commercializzazione avvengano nella zona geografica stabilita.

1.6.2 Processo di caseificazione e descrizione del formaggio

Il processo di caseificazione del formaggio Queijo de Azeitão DOP è descritto e deve essere conforme a quanto presente nel *Decreto Regulamentar 49/86*.

Il latte crudo ovino proveniente da allevamenti selezionati, localizzati nelle uniche tre regioni previste (Palmela, Setúbal e Sesimbra) viene portato nel caseificio entro 48 ore dalla mungitura e posto immediatamente in tank refrigerati a 4°C.

Tradizionalmente il latte refrigerato viene filtrato con l'ausilio di un filtro di tessuto con una maglia inferiore a 1 mm e successivamente posto in una vasca di coagulazione. Il latte, aggiunto di sale in ragione di circa 20 g L⁻¹, viene riscaldato ad una temperatura di circa 30-32 °C e aggiunto di caglio vegetale in ragione di circa 0.5 g L⁻¹.

Nello specifico, il caglio vegetale viene prodotto a partire dai fiori essiccati di *C. cardunculus*, ai quali, a seguito di una accurata triturazione, viene aggiunta acqua a 42°C in rapporto 1:10. Il tutto viene lasciato in infusione per 24 ore a temperatura ambiente, circa 20-25 °C, a seguito di tale periodo la soluzione acquosa viene filtrata e utilizzata direttamente come coagulante. L'estratto acquoso così prodotto si mantiene stabile per una settimana e può dunque essere utilizzato per più processi di caseificazione

A seguito dell'aggiunta dell'estratto acquoso al latte, riscaldato ad una temperatura di 31-32 °C, la coagulazione si verifica entro 45-60 minuti.

Trascorso questo periodo, la cagliata viene rotta meccanicamente (*Figura 1-1*) ed il siero, destinato alla produzione della ricotta Azeitão, viene diviso dalla massa caseosa (*Figura 1-2*).



Figura 1-1. Rottura della cagliata



Figura 1-2. Processo di separazione tra siero e massa caseosa



Figura 1-2. Massa caseosa

La massa caseosa (*Figura 1-3*) così ottenuta viene dunque posta manualmente in fucelle di acciaio inox per i formaggi da 250 gr (*Figura 1-4*) e di plastica per i formaggi da 100 gr.



Figura 1-3. Fucelle di acciaio inox usate durante la formatura del formaggio.

A seguito della formatura la cagliata viene sottoposta a pressatura manuale, come previsto dal disciplinare; le forme così ottenute vengono poste in una camera di maturazione a 10 °C con un'umidità relativa (UR) variabile dal 93 al 95% per dieci giorni.

In questa prima fase di maturazione le forme vengono capovolte manualmente ogni giorno (*Figura 1-5*) e trascorso tale periodo vengono lavate manualmente con acqua potabile e con l'ausilio di una spazzola morbida.

Le forme sono poi poste nella seconda camera di maturazione dove vengono mantenute a 12°C con un UR pari all' 80% per ulteriori 10 giorni di maturazione con capovolgimenti manuali giornalieri (*Figura 1-6*).



Figura 1-4. Prima maturazione



Figura 1-5. Seconda maturazione

Il formaggio stagionato viene dunque sottoposto ad una seconda operazione di lavaggio. Il lavaggio viene effettuato poiché durante le fasi di maturazione si può assistere alla proliferazione microbica sulla crosta del formaggio che si manifesta con la presenza di una colorazione bianca paglierino, questa se presente, rende il formaggio non edibile sulla base del disciplinare.

Il formaggio ottenuto è ora pronto per essere confezionato (*Figura 1-7*), tale operazione viene fatta utilizzando carta vegetale lucida bianca con l'etichetta stampata o incollata.

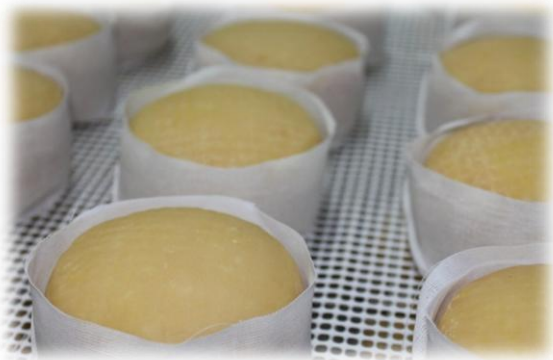


Figura 1-6. Fase di confezionamento con utilizzo di carta vegetale lucida bianca

Su ogni forma di formaggio confezionato viene infine apposta l'etichetta rilasciata da SATIVA, nella quale sono presenti il numero di identificazione e il marchio DOP (*Figura 1-8*).



Figura 1-7: Confezionamento ed etichettatura del formaggio Queijo de Azeitão DOP

Il prodotto finito, pronto per la commercializzazione, si presenta di forma cilindrica a facce piane o convesse con spigolo arrotondato, con scalzo convesso e un diametro di 5-7 cm e un'altezza di circa 3-5 cm; il peso delle forme può essere pari a 100 o 250 g.

La crosta è abbastanza tenera, liscia e sottile, di colore giallo paglierino, mentre la pasta è molle e cremosa di colore bianco con occhiatura molto rada.

L'aroma e il sapore sono caratteristici e inconfondibili in quanto sono un misto di acido e salato con la presenza di sensazioni di amaro e piccante.

Capitolo 2

Scopo

I formaggi tradizionali sono l'espressione di un territorio e rappresentano lo stretto legame tra la popolazione e le tradizioni locali, questi sono spesso riconosciuti dai consumatori come alimenti con qualità sensoriali ed organolettiche eccellenti.

Le materie prime utilizzate sono un elemento chiave per la produzione del formaggio e per la definizione di quelle che sono le caratteristiche specifiche del prodotto stesso. L'importanza di questi prodotti tradizionali è ancor più evidente se si considerano gli aspetti microbiologici legati al patrimonio biologico altamente peculiare e diversificato.

Nell'ultimo decennio, ampio spazio è stato dato alla ricerca e alla caratterizzazione di formaggi a caglio vegetale al fine di valutarne la diversità e la dinamica della flora microbica batterica ed eumicetica.

L'utilizzo del caglio vegetale è sviluppato soprattutto per i formaggi tradizionali italiani, spagnoli e portoghesi e va ad influire soprattutto sulle caratteristiche organolettiche, infatti i formaggi risultano più profumati, cremosi e con una nota amara più spiccata, inoltre, i formaggi prodotti con il caglio vegetale risultano più digeribili e permettono una rapida assimilazione dei sali minerali.

Il formaggio Queijo de Azeitão DOP, è un formaggio tradizionale portoghese prodotto esclusivamente nelle zone di Setúbal, Palmela e Sesimbra con l'uso di latte ovino crudo e di caglio vegetale ottenuto dalla specie vegetale *Cynara cardunculus L.*

Scopo del presente lavoro di tesi sperimentale è stato la caratterizzazione chimico-fisica e microbiologica di tre repliche biologiche di unico lotto produttivo acquistato da un produttore locale della regione di Palmela.

L'analisi chimico-fisica e microbiologica è stata effettuata attraverso la determinazione del pH, della TTA, 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, *Pseudomonas* ed Enterobacteriaceae.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Campionamento

Per l'allestimento delle prove sperimentali 3 formaggi Queijo de Azeitão DOP, appartenenti allo stesso lotto di produzione, sono stati acquistati da un produttore autorizzato nel comune portoghese di Palmela, uno dei territori di produzione previsti dal disciplinare di produzione.

I campioni sono stati trasportati nelle loro confezioni di produzione e commercializzazione standard a temperatura ambiente, e successivamente conservati a + 4°C ed analizzati entro la data di scadenza.

3.2 Analisi chimico-fisiche

Ogni campione è stato sottoposto ad analisi chimico-fisiche per la determinazione di pH e la determinazione dell'acidità totale titolabile.

3.2.1 Determinazione di pH

I campioni di formaggio Queijo de Azeitão sono stati sottoposti a determinazione di pH mediante apposito pH-metro con elettrodo solido HI2031 (*Figura 3-1*). La misurazione è stata condotta in triplicato e il risultato espresso come media \pm deviazione standard.



Figura 3-1: Ph-metro con elettrodo solido HI2031

3.2.2 Determinazione dell'acidità totale titolabile

Per la determinazione dell'acidità totale titolabile, 10g di campioni sono stati aggiunti di 90 mL di acqua demineralizzata e posti in un sacchetto per Stomacher.

Il sacchetto è stato dunque posto all'interno dell'omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 circulator e trattato per 2 minuti a 260 rpm.

L'omogenato è stato posto su un agitatore magnetico ed è titolato con NaOH 0,1 N fino al raggiungimento di un valore di pH di 8,3.

Il valore di acidità titolabile totale è stato espresso come mL di NaOH 0,1 N utilizzati. (Figura 3-2)



Figura 3-2: Strumentazione per la determinazione della TTA

3.3 Conte vitali

Per l'allestimento delle conte vitali in piastra 10 g di formaggio Queijo de Azeitão DOP sono stati prelevati, aggiunti di 90 mL di soluzione acquosa peptonata sterile (0,1% peptone p/v) e posti in un sacchetto Stomacher in condizione di sterilità. Ogni campione è stato sottoposto a trattamento con omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 circulator (Figura 3-3) per 2 minuti a 260 rpm.



Figura 3-3: Stomacher 400 circulator

1 mL di omogenato è stato successivamente utilizzato per l'allestimento di diluizioni scalari decimali sfruttando 9 mL di soluzione acquosa peptonata sterile.

Da ciascuna diluizione decimale sono stati prelevati rispettivamente 1 mL per l'allestimento della semina per inclusione e 0,1 mL per l'allestimento della semina per spandimento su terreni di coltura specifici.

Tutte le analisi sono state eseguite in duplicato e, nel dettaglio, per l'allestimento della semina per inclusione sono stati utilizzati i seguenti terreni di coltura alle specifiche condizioni di crescita esplicate di seguito:

- *M17 Agar addizionato di cicloesimide*: è un terreno di coltura parzialmente selettivo per la crescita di lattococchi e streptococchi capaci di fermentare il lattosio, la cui composizione si basa sulla formulazione proposta da Terzaghi e Sandine (1975). L'aggiunta di cicloesimide determina la selettività di questo terreno inibendo la crescita di lieviti e muffe. In questo terreno le colonie appaiono di colore bianco-crema dopo che le piastre sono state incubate per 2-3 giorni a 22°C (lattococchi mesofili) o 45°C (cocchi termofili) in aerobiosi.

La sua composizione è:

- peptone di soia 5,0 g L⁻¹
- peptone di carne 2,5 g L⁻¹
- peptone di caseina 2,5 g L⁻¹
- estratto di carne 5,0 g L⁻¹
- D (+)-lattosio 5,0 g L⁻¹
- estratto di lievito 2,5 g L⁻¹
- acido ascorbico 0,5 g L⁻¹
- glicerofosfato disodico 19,0 g L⁻¹
- solfato di magnesio 0,25 g L⁻¹
- agar 12,75 g L⁻¹

- *De Man Rogosa e Sharpe (MRS) Agar addizionato di cicloesimide*: terreno di coltura parzialmente selettivo utilizzato per promuovere la crescita dei lattobacilli, la cui composizione è stata formulata da De Man, Rogosa e Sharpe nel 1960. La selettività di questo terreno colturale è stata incrementata aggiungendo l'antibiotico cicloesimide (0,250 g L⁻¹).

In questo terreno le colonie sommerse o superficiali appaiono compatte o con aspetto piumoso; sono generalmente piccole (di diametro compreso tra 1-3 mm), opache, di colore bianco-crema a seguito di incubazione per 2-3 giorni a 37 °C per la crescita di lattobacilli mesofili e a 45°C per la crescita di lattobacilli termofili.

La sua composizione è:

- digerito enzimatico di caseina 10,00 g L⁻¹
- estratto di carne 10,00 g L⁻¹
- estratto di lievito 4,00 g L⁻¹
- glucosio 20,00 g L⁻¹
- idrogenofosfato di potassio 2,00 g L⁻¹
- sodio acetato 5,00 g L⁻¹
- tri-ammonio citrato 2,00 g L⁻¹
- magnesio solfato 0,20 g L⁻¹
- manganese solfato 0,05 g L⁻¹
- agar 13,00 g L⁻¹
- tween 80 (Sorbitan mono-oleato) 1,06 g L⁻¹

- *Plate Count Agar (PCA)*: è un terreno non selettivo e non differenziale utilizzato per la determinazione dei microrganismi mesofili aerobi totali, in origine raccomandato dall'American Public Health Association nel 1978 per il conteggio dei microrganismi presenti negli alimenti, nel latte e nei prodotti lattiero - caseari. Le piastre vengono incubate per 2 giorni a 30 °C in aerobiosi.

Composto da:

- digerito enzimatico di caseina 5,0 g L⁻¹
- estratto di lievito 2,5 g L⁻¹
- glucosio anidro 1,0 g L⁻¹
- agar 15 g L⁻¹

- *Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA)*: il VRBGA è un terreno selettivo e differenziale, impiegato per enumerare ed isolare coliformi totali ed *Escherichia coli*. I sali biliari e il cristal violetto inibiscono la crescita dei Gram positivi, mentre il rosso neutro consente di distinguere i microrganismi lattosio fermentanti da quelli lattosio non fermentanti. Infatti, la fermentazione del lattosio provoca un'acidificazione del mezzo con conseguente viraggio dell'indicatore verso il rossoviola e la precipitazione dei sali biliari. Su questo terreno i microrganismi che fermentano il lattosio producono colonie circolari di diametro inferiore a 0,5-2 mm, colore rosso porpora, talvolta circondate da alone rosso porpora; i microrganismi che non fermentano il lattosio formano, invece, colonie chiare che possono essere circondate da aloni verdastri dopo che le piastre sono state incubate per un giorno a 37°C in aerobiosi.

Composto da:

- peptone 7,0 g L⁻¹
- estratto di lievito 3,00 g L⁻¹
- lattosio 10,00 g L⁻¹
- cloruro di sodio 5,00 g L⁻¹
- sali biliari 1,5 g L⁻¹
- rosso neutro 0,030 g L⁻¹
- cristal violetto 0,002 g L⁻¹
- agar 15,00 g L⁻¹

Per l'allestimento della semina per spatolamento sono stati utilizzati i seguenti terreni di coltura:

- *Mannitol Salt Agar (MSA)*: è un terreno di coltura selettivo e differenziale, utilizzato per l'enumerazione e l'isolamento dei cocchi coagulasi-negativi, la cui composizione è stata definita da Chapman nel 1945. Il terreno contiene un'elevata concentrazione di sodio cloruro che inibisce la crescita di gran parte dei microrganismi, ad eccezione degli stafilococchi.

La fermentazione del mannitolo causa un'acidificazione del mezzo, che determina un viraggio dell'indicatore, il rosso fenolo, da rosso a giallo. I cocchi patogeni coagulasi-positivi crescono ottimamente sul terreno e danno origine a colonie di colore giallo circondate da un alone dello stesso colore, mentre i cocchi coagulasi-negativi, non patogeni, in quanto incapaci di emo-agglutinare, crescono in modo meno rigoglioso e producono colonie piccole con aloni di colore porpora-rossastro dopo che le piastre sono state incubate per 1-2 giorni a 37°C in aerobiosi.

La sua composizione è:

- digerito pancreatico di caseina 5,00 g L⁻¹
- peptone 5,00 g L⁻¹
- estratto di carne 1,00 g L⁻¹
- cloruro di sodio 75,00 g L⁻¹
- D-mannitolo 10,00 g L⁻¹
- rosso fenolo 0,025 g L⁻¹
- agar 15,00 g L⁻¹

- *Slanetz and Bartley Agar (SBA)*: formulato da Slanetz e Bartley nel 1957 per l'enumerazione e l'isolamento degli enterococchi, le cui colonie appaiono di colore rosso, marrone o rosa. Il triptosio fornisce azoto, vitamine, minerali e aminoacidi essenziali per la crescita. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine. Il glucosio è un carboidrato fermentescibile che fornisce carbonio e energia. La sodio azide inibisce la crescita dei batteri Gram negativi. Le piastre vengono incubate per 1-2 giorni a 37 °C in aerobiosi.

La sua composizione è:

- triptosio 20,0 g L⁻¹
- estratto di lievito 5,0 g L⁻¹
- D(+) glucosio 2,0 g L⁻¹
- sodio fosfato monoacido 4,0 g L⁻¹
- sodio azide 0,4 g L⁻¹
- tetrazolio cloruro 0,1 g L⁻¹
- agar 10,0 g L⁻¹

- *Yeast Extract-Peptone-Dextrose Agar (YPD) con aggiunta di cloramfenicolo*: è un terreno di coltura utilizzato per la crescita di vari tipi di lievito. Si tratta di un terreno ricco, contenente nutrienti, come gli aminoacidi, L'estratto di lievito è ottenuto dall'idrolisi di cellule di lievito ed è fonte di precursori di nucleotidi e vitamine, il peptone è una fonte di aminoacidi e il D-glucosio è la fonte di carbonio. Le piastre vengono incubate a 25°C per 1 o 2 giorni.

Composto da:

- estratto di lievito (1%) 10 g L⁻¹
- peptone (2%) 20 g L⁻¹
- glucosio (2%) 20 g L⁻¹
- agar (1,8%) 18 g L⁻¹

- *Pseudomonas Agar Base (PAB) con aggiunta di CFC supplement*: è il terreno selettivo utilizzato per l'isolamento della specie patogena *Pseudomonas* spp. Questo è costituito da una miscela liofilizzata di cetrimide, acido fusidico e cefaloridina e viene impiegato per l'arricchimento selettivo del terreno. Le piastre vengono incubate alla temperatura di 30°C per 24-48 ore.

È composto da:

- peptone di gelatina 16 g L⁻¹
- caseine idrolizzate 10 g L⁻¹
- solfato di potassio 10 g L⁻¹
- cloruro di magnesio 1,4 g L⁻¹
- agar 11,5 g L⁻¹

Le piastre contenenti un numero compreso tra 30 e 300 sono state utilizzate per la determinazione delle Unità Formanti Colonia (UFC) di tutti i generi microbici analizzati.

La carica microbica è espressa come media dei logaritmi delle UFC \pm deviazione standard.

4. Risultati e discussione

4.1 Risultati analisi chimico-fisiche

I risultati delle analisi chimico-fisiche, in particolare della misurazione di pH e TTA dei tre campioni di formaggio Queijo de Azeitão DOP analizzati nel presente lavoro di tesi sono mostrati in *tabella 4-1*.

In particolare, la misurazione di pH ha permesso di evidenziare una totale omologia dei tre campioni analizzati. I valori di pH compresi tra $5,69 \pm 0,26$ e $6,06 \pm 0,04$ sono risultati in linea, o leggermente superiori, rispetto a quanto descritto da altri autori per formaggi portoghesi prodotti con latte crudo ovino coagulato con caglio vegetale come il Serpa PDO (Dos Santos *et al.*, 2017; Araújo-Rodrigues *et al.*, 2020) e il Serra da Estrela (Macedo *et al.* 2004; Fogueiro *et al.*, 2020) ed altri formaggi italiani come il Caciopire della Sibilla (Cardinali *et al.*, 2017).

Contestualmente, la determinazione della TTA nei tre campioni analizzati ha permesso di evidenziare delle differenze statistiche tra i formaggi, in particolare mentre per i campioni A e B il valore di TTA rilevato non risulta statisticamente diverso, con valori pari a $8,33 \pm 0,72$ e $9,53 \pm 0,49$ mL NaOH 0,1N rispettivamente, per il campione C la TTA risulta nettamente superiore con un valore di $12,57 \pm 0,40$ mL NaOH 0,1N.

Tabella 4 -1. Valori di pH e TTA dei campioni di formaggio Queijo de Azeitão DOP

	pH	TTA
		mL NaOH 0,1N
Campione A	$6,06 \pm 0,04^a$	$8,33 \pm 0,72^a$
Campione B	$5,90 \pm 0,05^a$	$9,53 \pm 0,49^a$
Campione C	$5,69 \pm 0,26^a$	$12,57 \pm 0,40^b$

4.2 Risultati conte vitali

I risultati delle conte vitali in piastra allestite per i tre campioni di formaggio in analisi sono mostrati in *tabella 4-2*.

Dai risultati ottenuti si evince che i batteri lattici, quali lattococchi mesofili e termofili e i lattobacilli mesofili e termofili, sono presenti in tutti i campioni analizzati con cariche microbiche prossime a $8 \log \text{ UFC g}^{-1}$. Questi dati sono in linea con quanto descritto per il formaggio Serpa (Barbosa, 2000) ed Évora (Matos, 1993), mentre sono risultati nettamente superiori a quanto descritto per il formaggio Serra da Estrela (Macedo *et al.*, 1997). In particolare, dalle analisi è possibile evidenziare una carica di lattococchi mesofili compresa tra $8,83 \pm 0,08$ e $8,53 \pm 0,07 \log \text{ UFC g}^{-1}$ e una carica di lattococchi termofili compresa tra $7,95 \pm 0,03$ e $8,13 \pm 0,10 \log \text{ UFC g}^{-1}$ in linea con quanto descritto da Cardinali e collaboratori (2017) su formaggio Caciopfiore della Sibilla prodotto con latte crudo ovino e estratto acquoso di *Carlina acanthifolia* All.

Mentre, al contrario, la carica di lattobacilli mesofili compresa tra $7,83 \pm 0,05$ e $8,82 \pm 0,06 \log \text{ UFC g}^{-1}$ e la carica di lattobacilli termofili compresa tra $7,93 \pm 0,03$ e $8,03 \pm 0,13 \log \text{ UFC g}^{-1}$ è risultata inferiore a quanto descritto da Cardinali e collaboratori (2017).

Nelle trasformazioni lattiero-casearie i batteri lattici sono estremamente importanti in quanto responsabili dalla conversione del lattosio in acido lattico e, in particolare, la presenza di batteri lattici nei formaggi a latte crudo è direttamente correlabile alle caratteristiche microbiologiche del latte stesso (Leroy and De Vuyst, 2004).

Dalle analisi microbiologiche è possibile evidenziare una carica di batteri mesofili aerobi totali compresa tra $8,85 \pm 0,01$ e $9,28 \pm 0,04 \log \text{ UFC g}^{-1}$ in linea con quanto descritto da Mimoso e collaboratori (1990; 1992) su campioni di formaggio Queijo de Azeitão DOP. Tali valori risultano, al contrario, nettamente superiori a quanto descritto per il formaggio Serpa da Barbosa (2000).

Per i cocchi coagulasi negativi è stata rilevata una carica batterica variabile da $5,69 \pm 0,01$ a $6,68 \pm 0,11 \log \text{ UFC g}^{-1}$ in accordo con quanto descritto da Fernàndenz del Pozo (1988) in campioni di formaggio La Serena e da Matos (1993) per il formaggio Évora. Valori nettamente inferiori sono stati rilevati in campioni di formaggio Serra de Estrela a 35 giorni di maturazione (Macedo *et al.*, 2004).

I campioni di formaggio sono stati caratterizzati inoltre da una carica di enterococchi pari a $7 \log \text{ UFC g}^{-1}$ analogamente a quanto descritto per il formaggio Serpa (Roseiro & Barbosa, 1996).

Gli enterococchi sono un genere microbico naturalmente presente nel tratto gastro-intestinale dell'uomo e possono entrare nell'ambiente lattiero-caseario attraverso contaminazioni crociate soprattutto nei formaggi prodotti con latte crudo. Questi microrganismi svolgono nel formaggio un ruolo cruciale durante la fase di maturazione grazie alla loro spiccata capacità di adattamento all'ambiente formaggio (Giraffa, 2003) e alla loro capacità di produrre batteriocine (Íspirli *et al.*, 2017).

Dalle analisi è emersa inoltre una carica di Enterobacteriaceae con valori compresi tra $5,25 \pm 0,02$ e $5,93 \pm 0,04 \log \text{ UFC g}^{-1}$ che risultano inferiori a quanto descritto per campioni di formaggio Queijo de Azeitão DOP (Mimoso *et al.*, 1990; Mimoso *et al.*, 1992) e per campioni di formaggio Serra de Estrela (Macedo *et al.*, 2004). Contestualmente i valori riscontrati nel presente lavoro di tesi sono risultati in accordo con quanto descritto per il formaggio Castelo Branco (Mata, 1989; Marques, 1991) e Serpa (Barbosa, 2000).

I microrganismi appartenenti alla famiglia Enterobacteriaceae sono considerati microrganismi anticaseari, in quanto generalmente antagonisti dei batteri lattici, e la loro presenza è un importante indicatore della qualità dell'alimento prodotto. La presenza di Enterobacteriaceae può inoltre definire l'insorgenza di difetti nel formaggio quali, ad esempio, gonfiore, insorgenza di sapori non desiderati o scarsa acidificazione del prodotto.

I batteri del genere *Pseudomonas spp.* sono presenti con valori compresi tra $5,78 \pm 0,06$ e $7,06 \pm 0,03 \log \text{ UFC g}^{-1}$ nel formaggio in esame in contrasto con quanto descritto per campioni di formaggio Serra da Estrela da Macedo (1997) su campioni stagionati 7 giorni. Nel formaggio, i batteri *Pseudomonas spp.* sono responsabili di difetti come la comparsa del sapore amaro e di odori atipici, inoltre possono produrre alterazioni di colore.

Infine, la determinazione della flora microbica eumicetica ha permesso di evidenziare una carica compresa tra $5,38 \pm 0,03$ e $5,95 \pm 0,02$ log UFC g⁻¹.

In particolare i dati ottenuti sono in linea con quanto descritto da Mimoso e collaboratori (1990; 1992) e Freitas & Malcata (2000) per la stessa tipologia di formaggio e per il formaggio Évora (Dias, 1997); mentre la popolazione eumicetica è risultata superiore a quanto descritto per altri formaggi a latte crudo ovino prodotti con l'ausilio di coagulanti vegetali come Castelo Branco (Mata, 1989), Serra da Estrela (Freitas & Malcata; 2000) e la Serena (Fernández del Pozo, 1988; Martínez-Manso & Fernández-Salguero, 1978).

Nell'industria lattiero – casearia le muffe svolgono un ruolo importante poiché possono causare un aumento di pH portando il formaggio ad avere minore acidità e molte volte vengono utilizzati come starter per la produzione di alcuni formaggi definiti erborinati apportando modifiche alle caratteristiche organolettiche. In qualsiasi modo, se presenti in elevata quantità possono causare difetti nel prodotto finito come gonfiori precoci poiché essi effettuano la fermentazione producendo CO₂.

Tabella 4-2. Determinazione della carica microbica del formaggio

	M17 22°C	M17 42°C	MRS 22°C	MRS 42°C	PCA	SBA	MSA	VRBGA	PAB	YPD
A	8,68 ± 0,10 ^a	7,95 ± 0,03 ^a	7,83 ± 0,05 ^c	7,94 ± 0,18 ^a	8,85 ± 0,01 ^b	7,71 ± 0,03 ^a	5,93 ± 0,04 ^b	6,57 ± 0,03 ^a	7,06 ± 0,06 ^a	5,95 ± 0,02 ^a
B	8,83 ± 0,08 ^a	8,01 ± 0,00 ^a	8,82 ± 0,06 ^a	7,93 ± 0,03 ^a	9,28 ± 0,04 ^a	7,61 ± 0,19 ^a	5,69 ± 0,01 ^b	6,26 ± 0,17 ^a	6,85 ± 0,05 ^b	5,38 ± 0,03 ^c
C	8,53 ± 0,07 ^a	8,13 ± 0,10 ^a	8,56 ± 0,01 ^b	8,03 ± 0,13 ^a	8,52 ± 0,06 ^c	7,62 ± 0,04 ^a	6,68 ± 0,11 ^a	5,25 ± 0,02 ^b	5,78 ± 0,06 ^b	5,52 ± 0,06 ^b

Valori espressi come media log UFC g⁻¹ ± deviazione standard. M17 incubato a 22°C: terreno selettivo per la crescita di lattococchi mesofili; M17 incubato a 42 °C selettivo per la crescita di lattococchi termofili; MRS incubato a 22 °C terreno selettivo per la crescita di lattobacilli mesofili; MRS incubato a 42 °C selettivo per la crescita di lattobacilli termofili; PCA terreno selettivo per la crescita di mesofili aerobi totali; SBA terreno selettivo per la crescita degli enterococchi; MSA terreno selettivo per la crescita di cocchi coagulasi negativi; VRBGA terreno selettivo per *Enterobacteriaceae*; PAB: terreno selettivo per *Pseudomonas spp.*; YPD terreno selettivo per lieviti e muffe .

CONCLUSIONI

L'uso di coagulante vegetale nella produzione di formaggio è ampiamente diffuso in molte zone del mondo, in particolare l'uso di estratto acquoso ottenuto dalla pianta erbacea *C. cardunculus* L. è ampiamente diffuso soprattutto in Portogallo e Spagna.

Svariati sono i prodotti inseriti nell'elenco dei formaggi di origine controllata (DOP denominazione di origine protetta) e tra questi è possibile annoverare i formaggi Serra da Estrela, Serpa, Serena, Torta del Casar, Los Pedroches e Azeitão. I formaggi prodotti con caglio vegetale sono spesso prodotti in caseifici a conduzione familiare o caseifici artigianali seguendo i disciplinari di produzione previsti per i prodotti DOP.

Lo stretto legame tra questi prodotti e le aree geografiche di produzione rendono questi prodotti esempi unici e irripetibili di biodiversità microbica e caratteristiche organolettiche specifiche.

Il formaggio Queijo de Azeitão DOP è un esempio importante di formaggio tradizionale portoghese prodotto con latte crudo ovino ed estratto acquoso di *C. cardunculus* L. caratterizzato da proprietà chimico-fisico e organolettiche altamente peculiari definite dalla natura stessa del latte e del coagulante vegetale utilizzato nel processo produttivo.

Dal presente lavoro di tesi sperimentale è stato possibile caratterizzare dal punto di vista chimico-fisico e microbiologico una produzione di formaggio Queijo de Azeitão identificando una buona omologia con i dati presenti in bibliografia.

In relazione alla presenza di pochissimi riferimenti bibliografici presenti è dunque auspicabile la conduzione di ulteriori studi al fine di definire in modo più dettagliato le caratteristiche microbiologiche di questo prodotto tipico ampiamente apprezzato.

BIBLIOGRAFIA

- Aquilanti, L. et al., 2011. Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. *Letters in Applied Microbiology*, 6, 52(6), pp. 651-659.
- Barbosa, M. 2000. Queijos Serra da Estrela e Serpa - 30 Anos de Arte e Ciencia em Retrospectiva. Pages 1–19 in Proc. *Encontro sobre Queijos Tradicionais Ibéricos*, Porto, Portugal.
- 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*, 168, Volume 255, pp. 7-16.
- Cardinali, F. et al., 2016. Yeast and mould dynamics in Caciofiore della Sibilla cheese coagulated with an aqueous extract of *Carlina acanthifolia* All. s.l., *John Wiley and Sons Ltd*, pp. 403-414.
- 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), 64–70. Retrieved
- Ciancolini, A. (2012). Characterization and selection of globe artichoke and cardoon germplasm for biomass, food and biocompound production. *Doctoral dissertation Universite de Toulouse*.
- Collectif (1998). L'inventaire du patrimoine culinaire de la France. Auvergne. *Produits de terroir et recettes traditionnelles*.
- Crino, P., Tavazza, R., Rey Munoz, N. A., Trionfetti Nisini, P., Saccardo, F., Ancora, G., et al. (2007). Recovery, morphological and molecular characterization of globe artichoke 'Romanesco' landraces. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55, 823–833.
- Décret du 23 juillet 2003 relatif à l'appellation d'origine contrôlée « Banon ». (2003).
- Dias, S.M.P. 1997. Caracterizaco das leveduras presentes na massa do queijo artesanal da região de Évora. *Relatório Fim de Curso*. Universidade de Évora, Évora, Portugal.

- Dupas, C. et al., 2020. Plants: A natural solution to enhance raw milk cheese preservation.
- Fernández del Pozo, B., P. Gaya, M. Medina, M. A. Rodríguez-Marin, and M. Núñez. 1988. Changes in the microflora of La Serena ewe's milk cheese during ripening. *J. Dairy*.
- Feutry, F., Oneca, M., Berthier, F. & Torre, P., 2012. Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters. *Food Microbiology*, pp. 33-42.
- Froc, J. (2007). Balade au pays des fromages: Les traditions fromagères en France. Versailles.
- Galán, E., Cabezas, L., & Fernández-Salguero, J. (2012). Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *International Dairy Journal*.
- García-Martínez, N., Andreo-Martínez, P., Almela, L., Guardiola, L., & Gabaldón, J. A. (2017). Microbiological and sensory quality of fresh ready-to eat artichoke hearts packaged under modified atmosphere. *Journal of Food Protection*, 80
- Gonçalves Dos Santos, M. T. P. et al., 2017. Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and -independent DNA approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 4 12, Volume 262, pp. 63-70.
- Gostin, A. I. & Waisundara, V. Y., 2019. Edible flowers as functional food: A review on artichoke (*Cynara cardunculus* L.).
- Hayaloglu, A. A., & Farkye, N. Y. (2011). Cheese with Added Herbs, Spices and Condiments. *In Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 783–789).
- Hassanien, M. F. R., Mahgoub, S. A., & El-Zahar, K. M. (2014). Soft cheese supplemented with black cumin oil: Impact on food borne pathogens and quality during storage. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(3), 280–288.
- M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science & Technology*.
- Macedo, A. C., A. C. Freitas, F. Tavaría, and F. X. Malcata. 1997. Portuguese traditional cheeses: Native microbiota. Pages 55–63 in Proc. of AIR-Concerted action - The influence of native flora on the characteristics cheeses with “appellation d’origine protégée” (AOP) made from raw milk, ed. Tecnograf, Reggio Emilia, Italy.

- Macedo, A.C., Malcata, F.X., 1996. Changes in the major free fatty acids in Serra cheese throughout ripening. *Int. Dairy J.* 6, 1087–1097.
- Macedo, A.C., Malcata, F.X., 1997a. Changes of lactose, lactic acid, and acetic acid contents in Serra cheese during ripening. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 204, 453–455.
- Macedo, A.C., Malcata, F.X., 1997b. Changes of mineral concentrations in Serra cheese during ripening and throughout the cheesemaking season. *J. Sci. Food Agric.* 74, 409–415.
- Macedo, A.C., Tavares, T.G., Malcata, F.X., 2004. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiol.* 21, 233–240.
- Martínez-Manso, P., and J. Fernández-Salguero. 1978. Estudio de algunas floras microbianas del queso de La Serena. *Arch. Zootec.* 27:93–97.
- Mata, F.J.R. 1989. Caracterização e estudo do Queijo de Castelo Branco em quatro queijarias da sua sub-região demarcada. *Relatorio Fim de Curso. Escola Superior Agraria, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco, Portugal.*
- Matos, T.J.S. 1993. Caracterização microbiológica do queijo de Évora. *Relatório Fim de Curso. Universidade de Évora, Évora, Portugal.*
- Muir, D.D., 1997. Comparison of the sensory profiles of regular and reduced-fat commercial cheese spreads. *Int. J. Food Sci. Technol.* 32,279–287.
- P.F., McSweeney, P.L.H., 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Rev.*
- Pereira, C.I., Grac a, J.A., Ogando, N.S., Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 2010a. Influence of bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. *Food Microbiol.* 27, 339–346
- Reis, P. J. & Malcata, F. X., 2011. Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*, 11, 101(1-3), pp. 122-133.
- Roseiro, L.B., Wilbey, R.A., Barbosa, M., 2003. Serpa cheese: technological, biochemical and microbiological characterisation of a PDO ewe's milk cheese coagulated with *Cynara cardunculus* L. *Lait* 83, 469–481.
- Sicard T. (2018). *L'atlas pratique des fromages: origines, terroirs, accords.*

- Tavaria, F.K., Malcata, F.X., 1998. Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its Appellation d'Origine Protégée region. *J. Food Prot.* 61, 601–607.
- Tavaria, F.K., Reis, P.J.M., Malcata, F.X., 2006a. Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *Int. Dairy J.* 16, 895–902
- Tavaria, F., Sousa, M., & Malcata, F. (2001). Storage and lyophilization effects of extracts of *Cynara cardunculus* on the degradation of ovine and caprine caseins. *Food Chemistry*, 72, 79–88. Retrieved from <http>