



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI ED AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

CARATTERIZZAZIONE MICROBIOLOGICA DEL  
FORMAGGIO *SERRA DA ESTRELA* DOP  
MICROBIOLOGICAL CHARACTERISATION *OF SERRA DA*  
*ESTRELA* PDO CHEESE

TIPO TESI: sperimentale

Studente:

NOEMI ANZINI

Relatore:

CHIAR.MO PROF. ANDREA OSIMANI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021



# Sommario

ELENCO TABELLE.....	4
ELENCO FIGURE.....	5
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI .....	6
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI .....	7
Capitolo 1 Formaggi portoghesi a caglio vegetale .....	8
1.1 Impiego del caglio vegetale nella caseificazione.....	8
1.1.1 <i>Cynara cardunculus</i> L. ....	11
1.2.1 Studi microbiologici su formaggi portoghesi a caglio vegetale.....	13
1.3 Formaggio <i>Serra Da Estrela</i> .....	15
1.3.1 Processo di produzione .....	16
1.3.2 Caratterizzazione del formaggio <i>Serra da Estrela</i> .....	19
Capitolo 2 Caratterizzazione microbiologica del formaggio <i>Serra da Estrela</i> (DOP) .....	21
2.1 Materiali e metodi.....	21
2.1.1 Campionamento.....	21
2.1.2 Analisi microbiologiche.....	22
2.1.3 Analisi chimico-fisiche.....	25
2.1.4. Analisi statistica .....	28
2.2. Risultati e discussione .....	28
2.2.1. Caratterizzazione microbiologica.....	28
2.2.2. Caratterizzazione chimico-fisica.....	30
CONCLUSIONI .....	32
BIBLIOGRAFIA .....	33

## ELENCO TABELLE

Tabella 1: Esempi di proteasi vegetali impiegati nella coagulazione del latte: fonte, classificazione, attività coagulante.....	10
Tabella 2: Formaggi caprini e ovini a Denominazione Di Origine Protetta (DOP) e Indicazione Geografica Protetta (IGP) del Portogallo prodotti con estratti acquosi del fiore di <i>Cynara cardunculus</i> L. (Almeida., Simoes., 2018).....	12
Tabella 3: preparato tipico del terreno M17.....	23
Tabella 4: preparato tipico del terreno MRS.....	23
Tabella 5: preparato tipico del terreno VRBGA. ....	24
Tabella 6:preparato tipico per terreno MSA. ....	24
Tabella 7: preparato tipico del terreno ESA.....	25
Tabella 8: formula tipica del terreno RB.....	25
Tabella 9: Risultati delle conte vitali in piastra (espressi in log ufc g-1) nel formaggio Serra da Estrela DOP. I valori sono espressi come media $\pm$ deviazione standard. In ciascuna colonna, lettere differenti indicano valori significativamente differenti ( $P<0,05$ ) .....	29
Tabella 10: parametri chimico-fisici del formaggio Serra da Estrela DOP. I valori sono espressi come media $\pm$ deviazione standard. In ciascuna colonna, lettere differenti indicano valori significativamente differenti ( $P<0,05$ ) .....	30

## ELENCO FIGURE

Figura 1: Fiore di <i>Cynara cardunculus</i> .....	11
Figura 2: Area di produzione del formaggio <i>Serra da Estrela</i> DOP (quaderno delle specifiche Serra da Estrela, 2009) .....	15
Figura 3: Formaggio <i>Serra da Estrela</i> DOP .....	16
Figura 4: Diagramma di flusso del processo di produzione del formaggio <i>Serra da Estrela</i> DOP .....	19
Figura 5: pHmetro e soluzioni tampone.	
Figura 6: Misurazione della TTA attraverso l'ausilio di pHmetro e agitatore magnetico .....	20

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

ACS	Acetil-coenzima A sintetasi
ANOVA	Analysis of Variance, analisi della varianza
AP	Proteasi Aspartiche
CMP	Caseino Macro-Peptide
D-GPT	D-glutammato-piruvato transaminasi
ESA	Enterococcus Selective Agar
IGP	Indicazione geografica Protetta
LAB	batteri lattici
L-LDH	L-lattato deidrogenasi
L-MDH	L-malato deidrogenasi
MCA	Milk Clotting Activity, attività di coagulazione del latte
MRS	Man Rogosa Sharpe
MSA	Mannitol Salt Agar
NAD <sup>+</sup>	Nicotinammide Adenina Dinucleotide
PA	proteolitic activity, attività proteolitica
PDO/DOP	Protected Designation of Origin, Denominazione di Origine Protetta
RB	Rose Bengal Chloramphenicol Agar
SP	Proteasi Seriniche
VRBGA	Violet Red Bile Glucose Agar
TTA	Acidità Totale Titolabile
UFC	Unità Formanti Colonie

## INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

*Serra da Estrela* DOP è un formaggio della tradizione portoghese, di consistenza semi-morbida e dal sapore amaro. Il processo produttivo è caratterizzato dall'utilizzo di latte ovino crudo ed estratti acquosi del fiore *Cynara cardunculus* usati come agenti coagulanti. Queste condizioni permettono la realizzazione di un formaggio dalle caratteristiche uniche impartite anche dall'attività di numerose specie microbiche che, ritrovandosi nel latte non trattato termicamente, vanno a utilizzare e produrre una serie di composti influenzando le caratteristiche chimico-fisiche del prodotto finale.

Negli ultimi anni, l'aumento di specifiche categorie di consumatori quali vegetariani e musulmani, come anche la difficoltà nel reperimento di caglio animale, ha spinto la ricerca a nuovi prodotti che potessero soddisfare le richieste della società odierna. Il formaggio *Serra da Estrela* DOP, essendo prodotto con caglio vegetale, è in grado di venire in contro a queste esigenze. La produzione di formaggi caprini o ovini con cagli vegetali è una pratica comune nel bacino del Mediterraneo, soprattutto in paesi come l'Italia, Spagna e Portogallo. Molti di questi formaggi possiedono lo status di Denominazione di Origine Protetta (DOP).

Ad oggi sono numerosi gli studi effettuati nei riguardi delle caratteristiche chimico-fisiche di questo formaggio, meno invece quelli sulla sua caratterizzazione microbiologica. Lo scopo della seguente tesi è quello di approfondire tali aspetti e comprendere quali e quanti microrganismi caratterizzano il formaggio in questione, confrontando i risultati ottenuti da diversi produttori.

# Capitolo 1

## Formaggi portoghesi a caglio vegetale

Questo capitolo presenta lo stato dell'arte dell'argomento oggetto di studio. Verrà fornita una descrizione generale sull'impiego del caglio vegetale nella caseificazione, seguita da una discussione specifica sul caso dei formaggi portoghesi e della loro caratterizzazione. Sarà, infine, presentato il formaggio *Serra da Estrela* DOP, a cui è dedicata la parte sperimentale della tesi.

### 1.1 Impiego del caglio vegetale nella caseificazione

Con il termine caglio si va ad indicare l'insieme degli enzimi coagulanti, ricavati da diverse fonti, responsabili della coagulazione presamica del latte (intero, parzialmente scremato o totalmente scremato) durante il processo di caseificazione. Ad oggi l'industria casearia utilizza complessivamente quattro tipi di caglio: animale, microbico, sintetico e vegetale. Ciascuno di essi è definito da una serie di enzimi aventi caratteristiche proteolitiche differenti che ne determinano le diverse applicazioni. Il caglio più utilizzato è quello animale, composto principalmente da chimosina (o rennina), isolato dall'abomaso di giovani ruminanti e ritenuto il più efficiente per la produzione di formaggio. La valutazione dell'efficienza del caglio si basa sull'elevata attività di coagulazione del latte nei confronti della k-caseina (*milk clotting activity*, MCA) e sulla bassa attività proteolitica aspecifica, ovvero verso altre proteine del latte (*proteolitic activity*, PA). Queste caratteristiche sono solitamente associate ad una cagliata più forte e ad un sapore ottimale (Ustunol e Hicks 1990; Kumar et al. 2010).

La scelta del caglio dipende dal tipo di formaggio da produrre:

- formaggi duri e a lunga stagionatura: cagli con attività proteolitica aspecifica minima (caglio animale con 90% di chimosina);
- formaggi a media stagionatura: cagli con buona attività proteolitica e lipolitica;
- formaggi freschi: essendo la stagionatura breve se non nulla, si utilizzano cagli poco proteolitici (Galli Volontiero., 2005).

Il rapporto di queste attività (MCA/PA) si è dimostrato cruciale nel valutare l'applicabilità di un preparato enzimatico come sostituto della chimosina animale. Infatti, esso influenza la *texture* e le caratteristiche sensoriali del formaggio.



Benché sia il caglio animale quello più utilizzato nell'industria casearia, diversi formaggi ovini e caprini con lo status di DOP vengono prodotti utilizzando come coagulanti estratti acquosi vegetali. L'impiego di cagli vegetali nella produzione di formaggi è motivato da diversi fattori riguardanti la religione e l'etica (islamismo e giudaismo), dieta (vegetariani) e/o difficoltà nel reperimento del caglio animale. Le proteasi che caratterizzano i diversi tipi di coagulanti impiegati per la coagulazione del latte vengono classificate in base al meccanismo catalitico utilizzato durante il processo idrolitico. Le principali classi sono quelle aspartiche (AP), cisteiniche e seriniche (SP). Numero e tipo di enzima variano secondo la specie e in funzione della parte della pianta da cui questi vengono estratti. Alcuni esempi sono riportati nella tabella 1.

Pianta	Organo	Enzima	Classe	MCA	Referenze
<i>Cynara cardunculus</i>	Fiori	Cardosina	Aspartica	Estratto: $0,131 \pm 0,025$ CAU/ml $0,164 \pm 0,024$ CAU/ml	<i>Sarmento et al. (2009)</i> <i>Ordiales et al. (2012)</i>
<i>Cynara scolymus</i>	Fiori	Cinarasi	Aspartica	30-100 CAU/mg	<i>Sildrach et al. (2005)</i> <i>Chazarra et al. (2007)</i>
<i>Silybum marianum</i>	Fiori	-	Aspartica	Estratto: 0,083 CAU/ml	<i>Vairo-Cavalli et al. (2005)</i>
<i>Cirsium vulgare</i>	Fiori	Cirsina	Aspartica	-	<i>Lufrano et al. (2012)</i>
<i>Citrus aurantium</i>	Fiori	-	-	Estratto: 0,18 CAU/ml	<i>Mazorra-Manzano et al. (2013)</i>
<i>Ficus carica sylvestris</i>	Rami Lattice	Ficina	Cisteinica	1,4 U/mg	<i>Faccia et al. (2012)</i>
<i>Ficus religiosa</i>	Lattice	Religiosina	Serinica	387-803 CAU/ml	<i>Kumari et al. (2012)</i>
<i>Ficus palmata</i>	Gambo in polvere	Ficina	Cisteinica	-	<i>Sbhatu et al. (2020)</i>
<i>Calotropis gigantea</i>	Lattice	Calotropaina	Cisteinica	Estratto: 450 CAU/ml	<i>Abraham et al. (1979)</i>
<i>Actinidia chinensis</i>	Frutta	Actinidina	Cisteinica	Estratto: 244 U/mg	<i>Katsaros et al. (2010)</i> <i>Puglisi et al. (2014)</i>

<i>Cucumis melo</i>	Frutta	Cucumisina	Serinica	25 CAU	<i>Uchikoba et al. (1996)</i>
<i>Morinda citrifolia</i>	Frutta	-	Cisteinica	Estratto: 238,80 ± 5.29 U/mL	<i>Farias et al. (2020)</i>
<i>Zingiber officinale</i>	Rizoma	Zingibaina	Cisteinica	288,3-442.2 CAU/mg	<i>Huang et al. (2011)</i>
<i>Solanum dubium</i>	Semi	Dubiumina	Serinica	Estratto: 880 CAU/ml	<i>Ahmed et al. (2009)</i>
<i>Lactuca sativa</i>	Foglie	Lettucina	Serinica	20 UP	<i>Lo Pietro et al. (2002)</i>
<i>Vallesia glabra</i>	Foglie	-	Cisteinica	0,20 MCU/ml	<i>Gonzalez-Velazquez et al. (2021)</i>

Tabella 1: Esempi di proteasi vegetali impiegati nella coagulazione del latte: fonte, classificazione, attività coagulante.

Le proteasi AP si trovano in molte varietà di piante e sono coinvolte in una serie di processi come risposte a stress e ad agenti patogeni e attività catalitica (scissione dei legami peptidici tra amminoacidi idrofobici). Le proteasi SP sono diffuse nelle piante ed estratte, purificate e caratterizzate in particolare dai frutti. Presentano nei loro siti attivi residui di serina (Amira et al., 2017). L'attività di coagulazione del latte da parte degli enzimi proteolitici (MCA) è una delle proprietà più importanti delle proteasi impiegate nella caseificazione. È definita come la capacità dell'enzima di idrolizzare specificamente la k-caseina del latte (Amira et al., 2017).

La proprietà coagulante del latte dei cagli vegetali dipende da diversi fattori, come tipo e parte della pianta e concentrazione della proteasi. L'elevata attività proteolitica di queste proteasi porta alla produzione di peptidi corti che sono responsabili dell'amarezza dei prodotti lattiero-caseari (Lo Piero, Puglisi e Petrone, 2011) ed è per questo motivo che molti tra questi preparati enzimatici si presentano inadatti per la produzione di formaggio (Egitto et al., 2007).

La caseificazione è il risultato del susseguirsi di eventi enzimatici dovuti all'attività di microrganismi (autoctoni o aggiunti sotto forma di starter) o riconducibili all'azione degli enzimi presenti nel caglio o nativi del latte. La coagulazione enzimatica del latte è caratterizzata da due fasi principali che cominciano con l'aggiunta di caglio (vegetale o animale) al latte, ad una temperatura di 30°-37°C e un pH ottimale di 5.5. Nella prima fase, detta proteolitica, le proteasi idrolizzano il legame tra l'amminoacido Phe105 (fenilalanina) e Met106 (metionina), ovvero la

parte C-terminale della K- caseina. Si formano quindi due residui: il peptide idrofilo rilasciato nel siero, che prende il nome di caseino-macro-peptide (CMP) e quello idrofobo (1-105) che rimane integrato alla micella caseinica, cioè la para-k-caseina. Il distacco del CMP provoca una riduzione dell'idrofilia delle micelle ed un aumento della tendenza all'aggregazione quindi l'inizio della fase di coagulazione. In questa seconda fase le micelle caseiniche precipitano e si aggregano a formare un gel tridimensionale capace di trattenere lattosio, sali minerali e globuli lipidici in quanto viene a mancare l'idratazione superficiale. Il latte si separa così in una fase liquida (siero del latte) ed una solida (coagulo o cagliata).

### 1.1.1. *Cynara cardunculus* L.

Sebbene diversi preparati vegetali abbiano dimostrato di coagulare il latte (ad es. *Solanum* spp., girasole e semi di albiza) (Faro et al., 1992; Egito et al., 2007; Guiama et al., 2010; Lufrano et al., al., 2012; Néstor et al., 2012), l'unico effettivamente utilizzato nella produzione di formaggio è ottenuto dai fiori di cardo.

*C. cardunculus* è una varietà di cardo che produce grandi capolini e fiori viola (figura 1).



Figura 1: Fiore di *Cynara cardunculus*

Cresce spontaneamente in luoghi sassosi e incolti, nonché in prati aridi, principalmente su suolo argilloso nelle regioni mediterranee, meridionali e occidentali, Portogallo meridionale, Isole Canarie e Madeira (Fernández-Salguero, Sanjuán, 1998). L'attività di coagulazione di questa pianta è limitata al fiore e più precisamente allo stigma e stiloell'infiorescenza (Ramalho-Santos et al., 1997), e deriva dall'espressione di proteasi aspartiche quali cardosine A e B (Pimentel et

al.2007). Gli estratti acquosi dei fiori di cardo sono largamente utilizzati nella regione mediterranea per la produzione di formaggi di alta qualità, tradizionalmente lavorati e prodotti su scala artigianale (la maggior parte con il riconoscimento DOP), i quali tendono ad avere una consistenza più cremosa e morbida ed un odore e sapore più intensi rispetto a formaggi realizzati con caglio animale (Farhad Alavi, 2020).

Gli attributi reologici unici e le proprietà sensoriali caratteristiche di questi formaggi hanno sempre dimostrato l'elevata idoneità di *C. cardunculus* all' utilizzo come caglio alternativo di formaggi ovini e caprini. La sua applicazione in scala di produzione industriale è però ostacolata da una serie di fattori quali le limitate risorse dei fiori di cardo e la mancanza di standardizzazione degli estratti vegetali rispetto all'attività enzimatica e alla qualità microbiologica, essendo quest'ultima influenzata notevolmente dalle condizioni ambientali e di conservazione (Martins et al., 1996; Reis e Malcata, 2011).

## 1.2. Formaggi portoghesi a caglio vegetale

*Serra da Estrela DOP*, *Queijo de Azeitão DOP*, *Castelo Branco DOP*, *mestico de Tolosa IGP*, *Èvora DOP*, *Nisa DOP* e *Serpa DOP* sono esempi di formaggi portoghesi tradizionali prodotti tramite coagulazione con caglio vegetale (Macedo et al., 1993; Roseiro et al., 2003); nella tabella 2 ne sono riportate alcune caratteristiche.

<b>Formaggio</b>	<b>Latte</b>	<b>Origine</b>	<b>Marchio EU/anno di ottenimento</b>
Queijo de Azeitão DOP	pecora	Portogallo	DOP/1996
Èvora DOP	pecora	Portogallo	DOP/1996
Nisa DOP	pecora	Portogallo	DOP/1996
Serpa DOP	pecora	Portogallo	DOP/1996
Serra da Estrela DOP	pecora	Portogallo	DOP/1996
Castelo Branco DOP	pecora	Portogallo	DOP/1996
Mestiço de Tolosa IGP	pecora/capra	Portogallo	IGP/2000

Tabella 2: Formaggi caprini e ovini a Denominazione Di Origine Protetta (DOP) e Indicazione Geografica Protetta (IGP) del Portogallo prodotti con estratti acquosi del fiore di *Cynara cardunculus L.* (Almeida., Simoes., 2018).

Questi formaggi vengono prodotti principalmente in piccoli allevamenti a partire da latte crudo di pecora e/o capra, seguendo pratiche artigianali tramandate di generazione in generazione.

Una volta concesso loro lo status di DOP, il processo di produzione diventa regolato in maniera rigida a livello nazionale ed europeo. Tali formaggi prendono tipicamente il nome dalla regione in cui sono prodotti e tutti possiedono caratteristiche uniche associate alle loro modalità di produzione e stagionatura. Tra le caratteristiche che accomunano tutti questi formaggi ci sono una serie di passaggi fondamentali quali: coagulazione (tramite caglio vegetale), rottura della cagliata, formatura (mediante formatura e pressatura manuale) e salatura (aggiunta diretta al latte o per sfregamento sulla superficie della forma). Durante la stagionatura si sviluppano caratteristiche di consistenza e sapore che portano a varietà di formaggi ben distinti.

### **1.2.1 Studi microbiologici su formaggi portoghesi a caglio vegetale**

Nella penisola iberica, la produzione di formaggio conserva una forte tradizione per quanto riguarda l'utilizzo del latte crudo nella caseificazione. In particolare, il marchio DOP comprende tredici formaggi portoghesi tradizionali, tutti prodotti con latte crudo (Freitas et al., 2000). Lo studio dei formaggi portoghesi è fondamentale al fine di migliorare le caratteristiche del formaggio preservando al contempo la tradizione. Gli attributi sensoriali di questi prodotti sono il risultato dell'utilizzo di latte e coagulante, insieme al processo di produzione e all'intervento del microbiota autoctono. I problemi di qualità e sicurezza del formaggio, legati all'elevata suscettibilità ed eterogeneità dei suoi attributi sensoriali finali, favoriscono l'importanza di studi su larga scala focalizzati sugli aspetti biochimici e microbiologici (Araújo-Rodrigues et al., 2019).

Le comunità microbiche svolgono un ruolo fondamentale nella caseificazione in quanto, grazie alla loro attività metabolica, sono i principali responsabili del sapore e gusto caratteristici di ciascun formaggio. Il latte utilizzato per la produzione di questi formaggi non subisce alcun trattamento di tipo fisico o chimico prima della fase di coagulazione con caglio vegetale. Ne consegue che tutte le trasformazioni che avvengono nel corso della maturazione sono dovute all'azione di microrganismi naturalmente presenti nel latte. In particolare, le attività proteolitiche e lipolitiche, nonché la produzione di composti volatili da parte di batteri e funghi presenti all'interno e sulla superficie del formaggio consentono lo sviluppo di sapore e consistenza nel prodotto finale (Araújo-Rodrigues et al., 2020). Nel corso della maturazione vi è, inoltre, un abbassamento del pH a causa della produzione di acido lattico. Questo evento svolge un ruolo importante nelle proprietà e nella sicurezza del prodotto finale in quanto l'aumento di acidità inibisce la crescita di microrganismi patogeni (Alvarenga et al., 2008; Beresford et al., 2001).

Nonostante l'importanza della microbiologia del formaggio, gli studi sulla microbiologia dei formaggi portoghesi a latte crudo con caglio vegetale sono ancora relativamente limitati. Roseiro e Barbosa (1996) hanno analizzato la microflora del latte e del formaggio *Serpa* DOP simile a *Serra da Estrela* DOP, ma prodotto con latte di razza ovina Merino. Secondo questi autori, le comunità microbiche sono simili, essendo dominate da lattobacilli. Durante tutto il periodo della maturazione è stata rilevata una diminuzione dei batteri coliformi e streptococchi insieme ad un aumento dei batteri proteolitici. In un altro studio riguardante la microbiologia dei formaggi *Serra da Estrela* DOP e *Serpa* DOP, gli enterococchi e i batteri lattici (LAB) mesofili sono stati segnalati come i gruppi principali assieme a *Lactococcus* e *Leuconostoc* come i generi prevalenti (Barbosa, 2000).

Un parametro che contribuisce in modo significativo alle variazioni chimiche e microbiologiche nel latte e nel formaggio riguarda le diverse procedure di produzione del formaggio utilizzate nei diversi caseifici (Montel et al., 2014). Roseiro et al. (2003) ha caratterizzato dal punto di vista microbiologico il latte e il formaggio *Serpa* DOP di due caseifici, riscontrando differenze significative tra i prodotti finali di lavorazione artigianale e semi industriale. In termini di profilo microbiologico, è stata segnalata la presenza di batteri lattici, lieviti, muffe e coliformi, nonché alcune specie patogene, come *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Roseiro et al., 2003).

### 1.3 Formaggio Serra Da Estrela DOP

Il formaggio *Serra da Estrela* DOP, chiamato spesso formaggio *Serra*, è un prodotto agroalimentare tradizionale portoghese DOP. Secondo quanto indicato dal disciplinare, la produzione di questo formaggio è limitata ad una regione ben specifica indicata in figura 2.

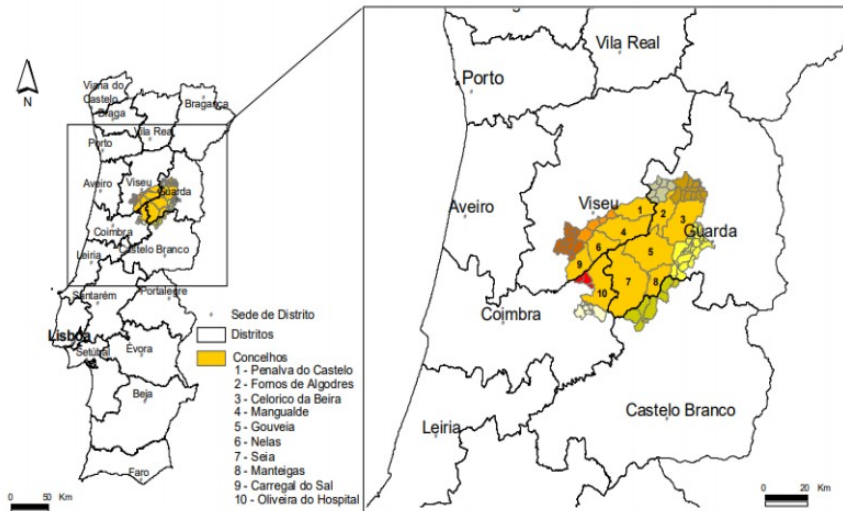


Figura 2: Area di produzione del formaggio Serra da Estrela DOP (quaderno delle specifiche Serra da Estrela DOP, 2009)

*Serra da Estrela* DOP è prodotto esclusivamente a partire da latte crudo (refrigerato e non refrigerato) ottenuto dalla mungitura di pecore di razza Bordaleira Serra da Estrela e/o Churra Mondegueira (Reg. CE n.510/2006), fiore di cardo (*Cynara cardunculus* L.) e sale. Forte aroma, sapore amaro e consistenza semi-morbida sono le caratteristiche che lo contraddistinguono. La crosta si presenta sottile, liscia e di colore giallo paglierino (fig. 3).

Il contenuto di umidità varia dal 61 al 69% e il contenuto di grassi varia dal 45 al 60% (Macedo et al., 1992). Le proprietà finali del formaggio dipendono da una serie di parametri come caratteristiche degli ingredienti utilizzati e fattori di lavorazione. La composizione chimica del latte è influenzata dal tipo di alimentazione delle pecore e dalla fase di lattazione del gregge

(Barron, et al., 2001; Guiné et al., 2016). Questa andrà a sua volta ad influenzare le caratteristiche finali del formaggio (Tavaria, et al., 2003).



Figura 3: Formaggio Serra da Estrela DOP

### 1.3.1 Processo di produzione

Secondo quanto riportato dal disciplinare di produzione di *Serra da Estrela* DOP, una volta raccolto, il latte subisce una macro-filtrazione attraverso teli bianchi. Questo passaggio permette la rimozione di corpi estranei eventualmente introdotti a seguito della mungitura. All'interno di una tradizionale caldaia, il latte filtrato viene scaldato fino al raggiungimento di 28°- 32°C. Nella maggior parte dei caseifici la salagione avviene per aggiunta diretta di sale al latte. Altri però distribuiscono parte di questo sale sulla superficie del formaggio ed è per questo che la salatura si può considerare una fase opzionale successiva alla pressatura.

Segue così l'aggiunta di sale e caglio (*Cynara cardunculus* L.) secondo precise proporzioni. Passati 45-60 minuti, la cagliata è pronta per essere lavorata. Si procede quindi con la rottura, che viene fatta attraverso l'utilizzo di un cucchiaio o di una lira. I granuli così ottenuti vengono lasciati a riposo per un breve periodo affinché vadano a formare una massa. Questa verrà poi estratta e posta in fascere di diametro compreso tra i 13 e i 20 cm avvolta da teli bianchi. Grazie ad una successiva fase di pressatura manuale, la forma verrà spurgata dal siero in eccesso e lavorata in modo da rendere la superficie il più possibile liscia e compatta. A favorire questa operazione è l'impiego di pesi da 4- 5 kg l'uno che vengono posizionati sopra ogni forma per circa 6 ore.

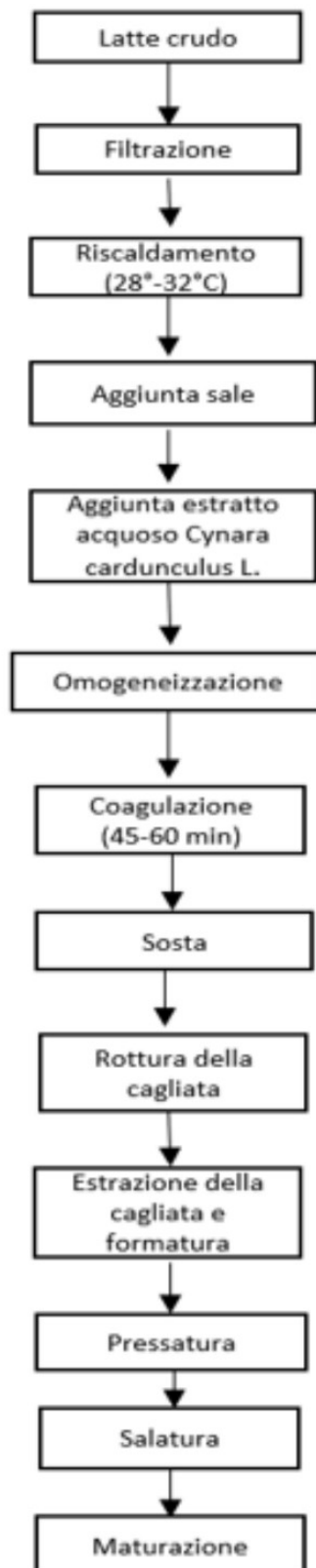


Segue così la fase di maturazione, dove le forme vengono poste in ambiente a temperatura compresa tra i 6° e i 12° C e umidità relativa di 85-95%. Queste condizioni favoriscono una perdita considerevole di umidità da parte del formaggio. Umidità che, localizzandosi sulla superficie, permetterà lo sviluppo microbico favorevole alla stagionatura.

Nei primi 10-15 giorni le forme vengono capovolte e lavate giornalmente. È in questa fase che si assiste ad una serie di complesse trasformazioni chimico-enzimatiche a carico di proteine, grassi (proteolisi e lipolisi), perdita di umidità, abbassamento del pH e formazione della crosta.

A seconda del tempo di stagionatura si distinguono due diverse tipologie di formaggio, “*Serra da Estrela burroso*” (stagionatura di almeno 30 giorni) e “*Serra da Estrela velho*” (stagionatura maggiore di 120 giorni).

Nella seguente figura (fig. 4) è riportato il diagramma di flusso del processo di produzione del formaggio *Serra da Estrela* DOP.



*figura 4:Diagramma di flusso del processo di produzione del formaggio Serra da Estrela DOP*

### 1.3.2 Caratterizzazione del formaggio *Serra da Estrela DOP*

Poiché il latte non è sottoposto ad alcun trattamento chimico o fisico, la naturale variabilità della composizione microbica autoctona qualitativa e quantitativa rispetto, le condizioni igieniche e tecniche di lavorazione dei diversi allevamenti, influenzano fortemente sul profilo microbiologico del formaggio (Macedo et al., 1993). Dahal et al. (2000) hanno confrontato le conte di lattobacilli, lattococchi, enterococchi, lieviti, Enterobacteriaceae e stafilococchi presenti nei formaggi *Serra da Estrela DOP* prodotti con latte non refrigerato in quattro caseifici indipendenti. Attraverso un'analisi della varianza (ANOVA) sono stati confrontati i risultati nei formaggi prodotti con latte non refrigerato e quelli prodotti con latte refrigerato in un caseificio selezionato. L'ANOVA ha rivelato che la refrigerazione, rispetto alla mancata refrigerazione, è significativa per le Enterobacteriaceae e lactobacilli e che il tempo di maturazione è rilevante per le Enterobacteriaceae, lattobacilli, stafilococchi e lieviti. I batteri lattici (lattobacilli, lattococchi, leuconostoc ed enterococchi) sono quantitativamente i gruppi dominanti per tutti i tempi di maturazione e per tutti i caseifici, con conte vitali che vanno da  $10^7$  a  $10^9$  ufc  $g^{-1}$  di formaggio. Questi risultati, tipici dei formaggi a pasta semi dura, sono paragonabili a quelli riportati per altri formaggi artigianali originari del Portogallo (Macedo, Freitas, Tavarina e Malcata, 1997; Tavarina e Malcata, 1998). Una forte riduzione si può osservare nel numero di Enterobacteriaceae e lieviti (80%) tra i 60 e i 180 giorni di maturazione, con la maggior parte della morte microbica dopo 120 giorni. Gli alti valori iniziali di Enterobacteriaceae vengono attribuiti alle scarse condizioni sanitarie durante la raccolta e la maturazione del latte. La loro successiva diminuzione rispetto ai batteri lattici riflette la diminuzione di pH derivante dalle vie metaboliche fermentative che avvengono nel formaggio (Freni., Malclata., 1997).

L'utilizzo di estratti vegetali di fiori di cardo e del siero di latte, influenza quella che è la flora microbiologica totale del formaggio *Serra da Estrela DOP*. Nell'estratto grezzo dei fiori di cardo sono stati trovati lattobacilli, batteri proteolitici e lipolitici e alcuni enterococchi (Hiscox et al., 1941). La flora dominante nel siero di latte, invece, è stata segnalata da Santos (1957) come composta principalmente da streptococchi.



## Capitolo 2

### Caratterizzazione microbiologica del formaggio *Serra da Estrela* DOP

Questo capitolo corrisponde alla parte sperimentale della tesi. La prima parte è dedicata alla descrizione dei materiali e dei metodi utilizzati per condurre lo studio, seguita dalla presentazione e discussione dei risultati.

#### 2.1 Materiali e metodi

##### 2.1.1 Campionamento

Nel presente studio, un totale di otto campioni di formaggio *Serra da Estrela* DOP sono stati collezionati da quattro diversi produttori situati nell'area di Serra da Estrela, in Portogallo. Per ciascun produttore sono stati analizzati due diversi lotti di produzione (fig. 5):

- produttore 1 (campioni SE1a, SE1b) (P1),
- produttore 2 (campioni SE2a, SE2b) (P2),
- produttore 3 (campioni SE3a, SE3b) (P3),
- produttore 4 (campioni SE4a, SE4b) (P4).

Fino al momento delle analisi, i campioni sono stati conservati sottovuoto a + 4 °C.

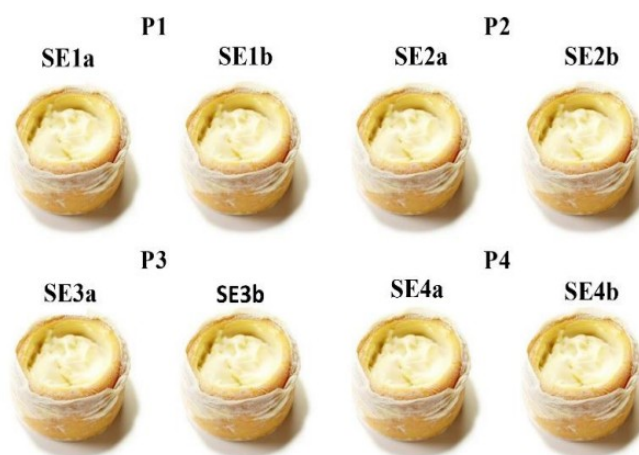


Figura 5: Schema dei campioni analizzati.

### **2.1.2 Analisi microbiologiche**

Per le conte vitali in piastra, 10 g di ciascun campione sono stati omogenizzati con 90 mL di acqua peptonata sterile (peptone: 1 g L<sup>-1</sup>) attraverso l'ausilio di un dispositivo Stomacher (400 Circulator, International PBI, Milano, Italia) per 2 min a 260 rpm (Osimani et al., 2009). Gli omogenati sono stati successivamente diluiti in serie decimali. Per effettuare le diluizioni sono state preparate preventivamente delle provette contenenti 9 mL di acqua peptonata (peptone 0,1%) di un numero tale da poter condurre le diluizioni per gli otto campioni e il corrispettivo doppio tecnico.

I campioni, una volta omogenati e diluiti, sono stati inoculati in opportuni terreni agarizzati per l'enumerazione dei seguenti microrganismi:

- Lattococchi e cocchi termofili su terreno M17 agar, incubato rispettivamente a 22° C (mesofili) e 45° C (termofili) per 48 ore;
- Lattobacilli su terreno De Man Rogosa Sharpe (MRS) incubato a 37°C per 48 ore;
- Enterobatteri su Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) incubato a 37°C per 24 ore;
- Stafilococchi coagulasi positivi su Mannitol Saltar Agar (MSA) incubato a 37°C per 48 ore;
- Enterococchi su *Enterococcus* Selective Agar (ESA) incubato a 37°C per 24-48 ore;
- Lieviti e muffe su Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RB) incubato a 25°C per 48 ore.

#### **2.1.2.1 Composizione dei terreni di coltura**

Le composizioni dei terreni di coltura utilizzati per l'enumerazione dei vari gruppi microbici sono riportate nelle seguenti tabelle:

- M17 agar:

<b>Componente</b>	<b>Concentrazione [g/L]</b>
<i>Idrolizzato triptico di caseina</i>	2,5
<i>Peptone</i>	2,5
<i>Peptone di soia</i>	5
<i>Estratto di lievito</i>	2,5
<i>Estratto di carne</i>	5
<i>Sodio glicerofosfato</i>	19
<i>Magnesio solfato</i>	0,25
<i>Acido ascorbico</i>	0,50
<i>Lattosio</i>	5
<i>Agar</i>	13

Tabella 3: preparato tipico del terreno M17.

La crescita degli streptococchi è evidenziata dallo sviluppo di colonie di forma ellissoidale e di colore giallo-biancastro.

- De Man Rogosa Sharpe (MRS) (WVR Chemicals) (De Man et al., 1960):

<b>Componente</b>	<b>Concentrazione [g/L]</b>
<i>Digerito enzimatico caseina</i>	10
<i>Estratto di carne</i>	10
<i>Estratto di lievito</i>	4
<i>Glucosio</i>	20
<i>Fosfato di dipotassio</i>	2
<i>Sodio acetato</i>	5
<i>Triammonio citrato</i>	2
<i>Magnesio solfato</i>	0,2
<i>Manganese solfato</i>	0,05
<i>Tween 80</i>	1
<i>Agar</i>	15

Tabella 4: preparato tipico del terreno MRS.

- Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) (WVR Chemicals) (Garofalo et al., 2017):

<b>Componente</b>	<b>Concentrazione [g/L]</b>
<i>Digerito enzimatico tessuti animali</i>	7
<i>Estratto di lievito</i>	3
<i>Cloruro di sodio</i>	5
<i>Sali biliari</i>	1,5
<i>Glucosio</i>	10
<i>Rosso neutro</i>	0,03
<i>Cristal violetto</i>	0,002
<i>Agar</i>	15

*Tabella 5: preparato tipico del terreno VRBGA.*

La crescita degli enterobatteri è caratterizzata dalla formazione di colonie di colore viola.

- Mannitol Salt Agar (MSA) (WVR Chemicals) (Chapman, 1945):

<b>Componente</b>	<b>Concentrazione [g/L]</b>
Digerito pancreatico di caseina	5
Digerito peptidico di tessuto animale	5
Sodio cloruro	75
Estratto di carne	1
D-Mannitolo	10
Rosso fenolo	0,025
Agar	15

*Tabella 6: preparato tipico per terreno MSA.*

La crescita di stafilococchi coagulasi positivi è evidenziata dalla formazione di grandi colonie gialle e dal viraggio del terreno dal colore rosa a giallo.



- *Enterococcus* Selective Agar (ESA):

<i>Componente</i>	<i>Concentrazione [g/L]</i>
Tritone	20
Estratti di lievito	5
D (+) Glucosio	2
Disodio idrogeno fosfato monoidrato	4
Azoturo di sodio	0.4
Agar	10
Agar	15

*Tabella 7: preparato tipico del terreno ESA.*

Le colonie presentano forma tondeggiante e di colore marrone.

- Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RB):

<i>Componente</i>	<i>Concentrazione [g/L]</i>
Peptone micologico	5
Potassio fosfato bibasico	1
Magnesio solfato	0,5
Glucosio	10
Rosa bengala	0,05
Agar	15
Cloramfenicolo	0,1

*Tabella 8: formula tipica del terreno RB.*

### **2.1.3 Analisi chimico-fisiche**

#### **2.1.3.1 pH e TTA**

I valori di pH degli otto campioni di formaggio *Serra da Estrela* DOP sono stati determinati con un pH-metro equipaggiato con un elettrodo a solido HI2031 (Hanna Instruments, Padova, Italy), dopo opportuna taratura con soluzioni a pH noto. La sonda è stata mantenuta nel campione di formaggio fino a stabilizzazione.

Lo stesso campione di formaggio utilizzato per la misurazione del pH (10 g) è stato omogeneizzato in 90 mL di acqua demineralizzata per 2 minuti a 260 rpm per la determinazione dell'acidità totale titolabile (TTA) (fig. 6). La TTA è definita dal volume (mL) di NaOH 0,1 M necessario per portare la soluzione ad un pH di 8,3.



*Figura 6: Determinazione della TTA; la soluzione è mantenuta in agitazione magnetica e il pH è costantemente monitorato fino al raggiungimento di un valore di 8,3.*

### **2.1.3.2 Determinazione dell'acido lattico e dell'acido acetico**

Per stabilire la concentrazione di acido lattico e acido acetico sono stati utilizzati dei kit enzimatici di analisi forniti da Megazyme: Megazyme D-/L-Lactic Acid (D-/L-Lactate) (Rapid) test per l'acido lattico e Megazyme Acetic Acid (Acetate Kinase Manual Format) per l'acido acetico. In entrambi i casi, prima dell'uso del kit per la determinazione finale, il campione deve essere diluito e chiarificato.

Si parte da una definita quantità di campione (1 g di formaggio per l'acido lattico e 2 g per l'acido acetico) che viene tagliata finemente e diluita in 70 mL di acqua distillata all'interno di un matraccio da 100 mL. Segue un riscaldamento a 60 °C per 20 minuti all'interno di un bagnetto termostato. Dopo aver portato a volume la soluzione, si lascia raffreddare per 30 minuti a + 4°C. Una volta filtrata, la soluzione è pronta per l'utilizzo del kit; quindi, va pipettata nelle cuvette da

analizzare, si aggiungono le soluzioni fornite in dotazione dal kit, per poi eseguire la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 340 nm.

Per quanto riguarda l'acido lattico, l'analisi si basa sul susseguirsi di due reazioni enzimatiche. La prima è catalizzata dalla L-lattato deidrogenasi (L-LDH); l'acido L-lattico (L-lattato) viene ossidato a piruvato dalla nicotinammide adenina dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) (1).

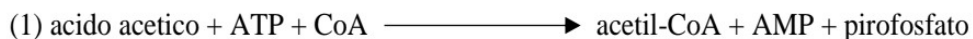


Essendo l'equilibrio fortemente spostato verso l'acido L-lattico e NAD<sup>+</sup>, è necessaria una seconda reazione per fissare il piruvato. Ciò si ottiene mediante la conversione del piruvato in D-alanina e 2-ossoglutarato catalizzata dall'enzima D-glutammato-piruvato transaminasi (D-GPT) in presenza di un grande eccesso di D-glutammato (2).



La quantità di NADH formata nella suddetta reazione accoppiata corrisponde stechiometricamente con le quantità di acido lattico.

Il principio di determinazione dell'acido acetico si basa su una prima reazione catalizzata dall'acetil-coenzima A sintetasi (ACS) che vede la conversione dell'acido acetico in acetil-CoA (1), in presenza di adenosina 5'-trifosfato e coenzima A.



In una seconda reazione l'enzima citrato sintasi (CS), in presenza di acetil-CoA, converte l'ossalacetato in citrato (2).



L'ossalacetato richiesto nella reazione (2) è formato da L-malato e nicotinamide-adenina dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) in presenza di L-malato deidrogenasi (L-MDH) (3). In questa reazione, NAD<sup>+</sup> è ridotto a NADH.



La determinazione si basa sulla formazione di NADH che è misurata dall'aumento dell'assorbanza a 340 nm.

#### **2.1.4. Analisi statistica**

Il test Honest Significant Differences (HSD) di Tukey – Kramer (livello di significatività 0,05) è stato utilizzato per valutare le differenze tra formaggi di diversi produttori attraverso analisi della varianza ad una via (ANOVA).

### **2.2. Risultati e discussione**

#### **2.2.1. Caratterizzazione microbiologica**

I risultati delle conte vitali in piastra (espressi in log ufc g<sup>-1</sup>) sui campioni dei formaggi *Serra da Estrela* DOP di quattro diversi produttori sono riportati nella tabella 8. Solo nel caso dei lattobacilli non sono state osservate differenze significative tra i diversi produttori (P1: 8,40 ± 0,15; P2: 8,51 ± 0,35; P3: 8,46 ± 0,09; P4: 8,13 ± 0,19 log ufc g<sup>-1</sup>); i dati ottenuti sono in accordo con quanto riscontrato da Dahl et al. (2000) nel formaggio *Serra da Estrela* DOP e con quelli di un altro formaggio portoghese a caglio vegetale (*Queijo de Azeitao* DOP), riportati nello studio di Cardinali et al., (2021). Invece, nelle conte di lattococchi (mesofili e termofili), enterococchi, Enterobacteriaceae, stafilococchi, muffe e lieviti sono state evidenziate delle differenze significative tra i produttori, dimostrando l'elevata variabilità probabilmente legata alla materia prima (latte) non trattata termicamente e all'ambiente di lavorazione.

Nello specifico, per quanto riguarda i lattococchi, l'enumerazione ha mostrato valori compresi tra 7,2 e 8,6 log ufc g<sup>-1</sup>, in linea con i risultati osservati in altri formaggi portoghesi tradizionali (Macedo, Freitas, Tavaría e Malcata 1997; Tavaría e Malcata, 1998), seppur siano state riscontrate differenze tra i vari produttori. Infatti, nel caso dei lattococchi mesofili, il produttore 2 e il produttore 3 sono risultati statisticamente differenti (8,66 ± 0,35 vs 7,98 ± 0,20 log ufc g<sup>-1</sup>), mentre per quanto riguarda i lattococchi termofili, nel produttore 1 è stato trovato un valore inferiore di circa un ordine di grandezza rispetto agli altri produttori.

<b>Produttore</b>	<b>Lattococchi mesofili</b>	<b>Lattococchi termofili</b>	<b>Lattobacilli</b>	<b>Enterococchi</b>
<b>P1</b>	8,24 ± 0,17 <sup>a,b</sup>	7,16 ± 0,36 <sup>b</sup>	8,40 ± 0,15 <sup>a</sup>	6,81 ± 0,21 <sup>b,c</sup>
<b>P2</b>	8,66 ± 0,35 <sup>a</sup>	7,95 ± 0,45 <sup>a</sup>	8,51 ± 0,35 <sup>a</sup>	7,57 ± 0,11 <sup>a,b</sup>
<b>P3</b>	7,98 ± 0,20 <sup>b</sup>	8,27 ± 0,70 <sup>a</sup>	8,46 ± 0,09 <sup>a</sup>	6,56 ± 0,12 <sup>c</sup>
<b>P4</b>	8,41 ± 0,22 <sup>a,b</sup>	8,26 ± 0,31 <sup>a</sup>	8,13 ± 0,19 <sup>a</sup>	7,84 ± 0,72 <sup>a</sup>
<b>Produttore</b>	<b>Stafilococchi</b>	<b>Enterobacteriaceae</b>	<b>Muffe</b>	<b>Lieviti</b>
<b>P1</b>	5,42 ± 0,51 <sup>b</sup>	5,99 ± 1,01 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	4,24 ± 0,75 <sup>a</sup>
<b>P2</b>	6,96 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,50 ± 0,37 <sup>a</sup>	4,07 ± 0,58 <sup>a</sup>	3,23 ± 0,32 <sup>a</sup>
<b>P3</b>	5,55 ± 0,31 <sup>b</sup>	5,66 ± 0,51 <sup>a</sup>	<1 <sup>b</sup>	1,27 ± 0,65 <sup>b</sup>
<b>P4</b>	6,38 ± 0,17 <sup>a</sup>	4,20 ± 0,19 <sup>b</sup>	<1 <sup>b</sup>	2,51 ± 0,70 <sup>a,b</sup>

Tabella 9: Risultati delle conte vitali in piastra (espressi in log ufc g<sup>-1</sup>) nel formaggio Serra da Estrela DOP. I valori sono espressi come media ± deviazione standard. In ciascuna colonna, lettere differenti indicano valori significativamente differenti (P<0,05)

Per quanto riguarda gli enterococchi, microrganismi ubiquitari presenti nel suolo, nelle acque di superficie, nei vegetali e, in particolar modo, nei tratti digestivi di animali a sangue caldo, sono state registrate conte vitali comprese tra 6,56 ± 0,12 (P3) e 7,84 ± 0,72 log ufc g<sup>-1</sup> (P4). Dall'analisi statistica è emerso che le differenze tra P3 e P4 sono significative. Classificati come appartenenti al gruppo microbico batteri lattici, gli enterococchi vengono considerati pro-tecnologici nella fermentazione dei prodotti lattiero-caseari, grazie alla produzione di proteasi e lipasi.

Nei campioni di Serra da Estrela DOP del P4, il valore relativo alle Enterobacteriaceae (4,20 ± 0,19 log ufc g<sup>-1</sup>) è risultato inferiore rispetto agli altri produttori: 5,99 ± 1,01, 6,50 ± 0,37 e 5,66 ± 0,51 log ufc g<sup>-1</sup>, rispettivamente per P1, P2 e P3. La presenza di Enterobacteriaceae nel prodotto finito è indice di scarse condizioni igieniche applicate durante il processo di produzione. I risultati ottenuti nel presente studio sono comunque simili a quelli riportati in altri lavori su formaggi tradizionali portoghesi a latte crudo (Roseiro e Barbosa, 1996; Dahl et al., 2000; Freitas e Malcata, 2000; Cardinali et al., 2021).

I risultati riportati in tabella sugli stafilococchi derivano dall'enumerazione di colonie gialle su terreno MSA; questo terreno viene utilizzato per l'identificazione di *S. aureus*, ma anche altre specie di Stafilococchi producono colonie gialle, ad esempio *S. capitis*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. simulans*. Valori di 5,42 ± 0,51 e 5,55 ± 0,31 sono stati trovati rispettivamente nei

campioni dei P1 e P3, statisticamente differenti rispetto ai valori ottenuti per P2 e P4 ( $6,96 \pm 0,05$  e  $6,38 \pm 0,17$  log ufc g<sup>-1</sup>).

I campioni di *Serra da Estrela* DOP del P2 sono gli unici in cui sono state rilevate delle muffe ( $4,07 \pm 0,58$  log ufc g<sup>-1</sup>), mentre negli altri sono stati riscontrati valori inferiori al limite di rilevazione (log ufc g<sup>-1</sup> <1). Infine, per quanto riguarda i lieviti, i valori ottenuti variano tra  $1,27 \pm 0,65$  (P3) e  $4,24 \pm 0,75$  log ufc g<sup>-1</sup> (P1). La variabilità dei risultati delle conte di muffe e lieviti può essere attribuita alle condizioni ambientali e alla manipolazione dei prodotti durante il processo di produzione; il ruolo di questi gruppi microbici è secondario rispetto ai batteri lattici, ma il profilo sensoriale del prodotto finale ne è fortemente influenzato.

## 2.2.2. Caratterizzazione chimico-fisica

I risultati delle analisi chimico-fisiche (pH, TTA, acido lattico e acido acetico) sui campioni di *Serra da Estrela* DOP dei quattro produttori sono riportati nella tabella 9. Per quanto riguarda il pH, sono state osservate differenze significative tra i produttori, con valori medi compresi tra  $5,83 \pm 0,06$  (P1) e  $5,45 \pm 0,09$  (P4). Ciononostante, i risultati sono in accordo con quelli riportati per altri formaggi portoghesi (Roseiro e Barbosa, 2003; Cardinali et al., 2021). Il pH dei formaggi dipende dall'attività metabolica dei batteri lattici, responsabili della produzione di acidi organici dal lattosio.

<i>Produttore</i>	<b>pH</b>	<b>TTA</b> [ml NaOH 0,1 M]	<b>Acido lattico</b> [g/100 g]	<b>Acido acetico</b> [g/100 g]
<b>P1</b>	$5,83 \pm 0,06^a$	$7,52 \pm 1,43^c$	$0,63 \pm 0,09^b$	$0,11 \pm 0,04^a$
<b>P2</b>	$5,71 \pm 0,17^{a,b}$	$9,82 \pm 2,89^{b,c}$	$1,01 \pm 0,09^a$	$0,12 \pm 0,03^a$
<b>P3</b>	$5,54 \pm 0,08^{b,c}$	$13,97 \pm 0,41^a$	$1,13 \pm 0,11^a$	$0,27 \pm 0,08^a$
<b>P4</b>	$5,45 \pm 0,09^c$	$11,8 \pm 1,74^{a,b}$	$1,08 \pm 0,04^a$	$0,26 \pm 0,04^a$

Tabella 10: parametri chimico-fisici del formaggio *Serra da Estrela* DOP. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. In ciascuna colonna, lettere differenti indicano valori significativamente differenti ( $P < 0,05$ )

Altre differenze significative sono state osservate nei valori medi di TTA (ml di NaOH 0,1 M). Infatti, P1 ha mostrato una media inferiore rispetto a P3 e P4, con risultati di  $7,52 \pm 1,43$ .

Per quanto riguarda la determinazione degli acidi organici, i valori di acido lattico sono risultati nettamente più elevati rispetto a quelli dell'acido acetico. I valori di acido acetico registrati sono

compresi tra  $0,11 \pm 0,04$  (P1) e  $0,27 \pm 0,08$  g/100 g (P3); non sono state osservate differenze significative tra i produttori. Invece, valori di acido lattico di  $0,63 \pm 0,09$ ,  $1,01 \pm 0,09$ ,  $1,13 \pm 0,11$  e  $1,08 \pm 0,04$  g/100 g sono stati trovati rispettivamente per il P1, P2, P3 e P4. Il contenuto di acido lattico nei campioni di P1 si è rivelato statisticamente inferiore rispetto agli altri produttori. Questo dato rispecchia il valore di pH più elevato negli stessi campioni.

## CONCLUSIONI

I formaggi a latte crudo coagulati con caglio vegetale rappresentano una fonte di diversità microbica ancora poco conosciuta. *Serra da Estrela* DOP è un formaggio portoghese che nel tempo ha preservato la sua tradizionalità; la produzione con latte non trattato termicamente ed estratti vegetali, lo rendono un prodotto avente una flora microbica eterogenea e dinamica nel corso della maturazione. Nonostante questi presupposti, da questa ricerca è emerso che dal punto di vista quantitativo, la microflora dominante è rappresentata da batteri lattici (lattococchi, lattobacilli, enterococchi). Il confronto delle conte vitali dei formaggi prodotti nei quattro diversi caseifici ha sottolineato delle differenze più o meno sostanziali nell'enumerazione di altri gruppi microbici, importanti dal punto di vista organolettico per la generazione di aromi e dal punto di vista igienico-sanitario (Enterobacteriaceae e stafilococchi). Ulteriori studi, utilizzando tecniche di analisi coltura-indipendenti (es. next generation sequencing), permetteranno di ottenere un quadro più completo sulla caratterizzazione microbiologica del formaggio *Serra da Estrela* DOP.



## BIBLIOGRAFIA

- Abraham, K.I., Joshi, P.N. 1979. Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex I. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Enzimology*, 568, 1. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(79\)90278-X](https://doi.org/10.1016/0005-2744(79)90278-X)
- Ahmed, I.A.M., Mori, N. 2009. Characterisation of partially purified milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* Fresen seeds. *Food Chemistry*, 116, 395-400. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.072>.
- Amira, A. B., Besbes, S., Attia, H., Blecker, C. 2017. Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, S76-S93. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1289959>.
- Araújo-Rodrigues, H., Tavora, F., P.G dos Santos, M. T., Alvarenga, N., Pintado, M. 2020. *International Dairy Journal*, 100, 104561. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104561>.
- Cardinali, F., Ferrocino, I., Milanovic, V., Belleggia, L., Corvaglia, M.R., Garofalo, C., Foligni, R., Mannozi, C., Mozzon, M., Cocolin, L., Osimani, A., Aquilanti, L. 2021. Microbial communities and volatile profile of Queijo de Azeitão ~ PDO cheese, a traditional Mediterranean thistle-curdled cheese from Portugal. *Food Research International*, 147, 110537. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110537>
- Barron, L., Fernández de Labastida, E., Perea, S., Chávarri, F., Vega, C., Vicente, M., Isabel Torres, M., Isabel Nájera, A., Virto, M., Santisteban, A., José, P. E. F., Albisu, M., Salmerón, J., Mendia, C., Torre, P., Clemente, I. F., Renobales, M. 2001. Seasonal changes in the composition of bulk raw ewe's milk used for Idiazabal cheese manufacture. *International Dairy Journal*, 11, 771-778. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00120-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00120-0)
- Chazarra, S., Sidrach, L., Molina, D. (2017). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17, 1393-1400. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.04.010>.
- Dahl, S., Tavora, F.K., Malcata, F.X. 2000. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese through ripening. *International Dairy Journal*, 10, 255-262. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00042-X)
- Egito, A. S., Girardet, J.-M., Laguna, L. E., Poirson, C., Mollé, D., Miclo, L., Humbert, G., Gaillard, J. L. 2007. *International Dairy Journal*, 17, 816-825. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.012>.
- Faccia, M., Picariello, G., Trani, A., Loizzo, P. 2012. Proteolysis of Caciocotta cheese made from goat milk coagulated with caprifig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *European Food Research and Technology*, 234, 527-533. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.009>

Farias., V.A., Oliveira, H.D. 2020. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit as a new source of milk-clotting cysteine proteases. *Food Research International*, 127, 108689. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108689>.

Faro, C.J., Moir, A. J. G. & Pires, E.V. 1992. Specificità di un enzima di coagulazione del latte estratto dal cardo *Cynara cardunculus* L.: Azione su insulina ossidata e k-caseina. *Biotechnol Letters*, 14, 841-846. <https://doi.org/10.1007/BF01029150>.

Fernández-Salguero J., Sanjuán E., (1998). Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese. *Food Chemistry*, 64, 177-183. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00149-6).

Freitas, C., Malcata, F. X. 2000. Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'Origine Protégée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. *Journal of Dairy Science*, 83, 584-602. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74918-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74918-6).

Galli Volontiero A. 2005. *Microbiologia degli alimenti*, Milano. Casa Editrice Ambrosiana

González, D., Mazorra, Martine, M., Huerta, J.A., Vallejo, B., Mora, W., Moreno, J., Ramírez, J. 2021. Exploring the Milk-Clotting and Proteolytic Activities in Different Tissues of *Vallesia glabra*: a New Source of Plant Proteolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193, 389-404. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03432-5>

Guiama, V. D., Ngah, E., Beka, R. G., Ndi, K. C., Maloga, B., Bindzi, J. M., Donh, P., Mbofung, C. M. 2009. Milk-clotting potential of fruit extracts from *Solanum esculentum*, *Solanum macrocarpon* L. and *Solanum melongena*. *African Journal of Biotechnology*, 9, 1797-1802. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1079>.

Guiné, R., Tenreiro, M., Correia, A., Correia, P., Barracosa, P. 2016. Analysis of factors influencing the physical, chemical and sensorial properties of Serra da Estrela cheeses. *Journal Food Measurement and Characterization*, 10, 643-657. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9348-6>

Hiscox, E. R. S. J., Rowland, J., Wolf, and M., Jacob. (1941). Nota acerca da bacteriologia e química do queijo português de leite de ovelha (Serra). *Boletim pecuario*, 9, 163.

Huang, H.W., Ren., F.Z. 2011. Purification, characterization, and milk coagulating properties of ginger proteases. *Journal of Dairy Science*, 94, 2259-2269. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4024>

Katsaros, G., Tavantzis, G., Taoukis, P., (2020). Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 47-51. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.007>.

Kumari, R., Sharma, A., Jagannadham M.V., (2012). Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus Religiosa*. *Food Chemistry*, 131, 1295-1303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.122>

- Lauro Martins, A., P., Pestana de Vasconcelos, M., m., de Sousa R. B., (1996). Thistle (*Cynara cardunculus* L) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *HAL Open Science*, 76, 473-477. <https://doi.org/10.1051/lait:1996536>
- Lo Piero, A.R., Puglisi, I., (2002). Characterization of “Lettucine”, a Serine-like Protease from *Lactuca sativa* Leaves, as a Novel Enzyme for Milk Clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2439-2443. <https://doi.org/10.1021/jf011269k>.
- Lufrano, D., Faro, R., Castanheira, P., Parisi, G., Verissimo, P., Vairo-Cavalli, S., Simoes, I., Faro, C., (2012). Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry*, 81, 7–18, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.05.028>.
- Macedo, A., Freitas, A. C., Tavarã, F. K., Malcata, F. X. 1997. Portuguese traditional cheeses: native microbiota. In: *Microyora* (Mastering the influence of microorganisms on the final properties of raw milk cheeses (pp. 55}63). Editrice Tecnograf, Reggio nell'Emilia, Italy.
- Mazzorra, M.A., Moreno, J.M., Ramirez, J.C., Torres, M.J., González, A.F., Vallejo, B. 2013. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. *Food Science and Technology*, 54, 325-330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.009>.
- Mendiã, P. T., Ibãñez, F. C., de Renobales, M. 2001. Seasonal changes in the composition of bulk raw ewe’s milk used for Odiababal cheese manufacture. *International Dairy Journal*, 11, 771-778. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00120-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00120-0).
- Néstor, G. M., Rubí, C. G., Héctor, J. C. 2012. Exploring the milk-clotting properties of a plant coagulant from the berries of *S. elaeagnifolium* var. Cavanilles. *International Dairy Journal*, 77, 89-94. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02468.x>.
- Pimentel, C., Van Der Straeten, D., Pires, E., Faro, C., Rodrigues-Pousada, C. 2007. Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. *The FEBS Journal*, 274, 2523-2539. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05787.x>,
- Puglisi, I., Lo Piero, A.R., (2014). A kiwi juice aqueous solution as coagulant of bovine milk and its potential in Mozzarella cheese manufacture. *Food and Bioproducts Processing*, 92, 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.07.011>,
- Ramaho-Santos, M., Pissarra, J., Verissimo, P., Pereira, S., Salema. R., Pires, E., Faro, C., 1997. Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 203, 204-212. <https://doi.org/10.1007/s004250050183>,
- Reis, P. J. M., Malcata, X. F. 2011. Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*, 101, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.032>,

- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., Wilbey, R. A. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants - the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 76–85. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00080.x>.
- Sarmento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C. S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., Debyser, G., 2009. Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus L.* *Planta*, 230, 429–439. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0948-9>,
- Sbhatu D.B., Tekle H.T., Tesfamariam K.H. 2020. *Ficus palmata* FORSKÅL (BELES ADGI) as a source of milk clotting agent: preliminary research. *BMC Research Notes*, 13, 446. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05293-x>.
- Sidrach L., García-Cánovas F., Tudela, J., Rodríguez-López J.N. 2005. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus L.*): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66,41-9. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.10.005>.
- Silva, S.V., Malcata, F.X. 2005. *Food Chemistry*, 89, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.074>.
- Tavaria, F.K.; Malcata, F.X., M. 1998. Microbiological characterization of Serra da Estrela cheese throughout its Appellation d'Origine Protegee region. *Journal of Food Protection*, 61, 601-607. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.5.601>.
- Uchikoba T, Kaneda M. 1996. Milk-clotting activity of cucumisin, a plant serine protease from melon fruit. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 56, 325-330. <https://doi.org/10.1007/BF02786962>
- Ustunol, Z., Hicks, C.L. 1990. Effect of milk-clotting enzymes on cheese yield. In *International Dairy Journal*, 73, 8-16. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78639-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78639-0).
- Vairo-Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N., Natalucci, C. 2005. Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *The journal of Dairy Research*, 72, 3. <https://doi.org/10.1017/S0022029905000749>.
- Veríssimo, P., Esteves, C., Faro, C., Pires, E. 1995. The vegetable rennet of *Cynara cardunculus L.* contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology Letters*, 621–626. <https://doi.org/10.1007/BF00129389>.
- Veríssimo, P., Faro, C., Moir, A. J., Lin, Y., Tang, J., Pires, E. 1996. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus L.* *European Journal of Biochemistry*, 273, 762-768. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00762.x>.

## RINGRAZIAMENTI

Non basterebbe un libro per ringraziare tutte le persone che in questi anni mi sono state vicino e mi hanno sostenuta.

Comincio con il ringraziare il professore Andrea Osimani, mio relatore, per la sua grande disponibilità e premura dimostratami per la realizzazione di questa tesi. Ringrazio Giorgia Rampanti per il supporto costante, per la pazienza e per tutti gli insegnamenti trasmessi in laboratorio durante la sperimentazione.

Continuo ringraziando la mia splendida famiglia che, nonostante non abbia ancora imparato il nome del mio corso, mi è sempre stata vicino, pronta a sostenermi in tutte le scelte prese in questi anni con amore e senza giudizio.

Ringrazio infinitamente Sharon e Irene, come anche Errico, per le ripetizioni di fisica e matematica (materie che odio profondamente).

Un grazie va anche a quelle amiche che, nonostante la difficoltà nel vedersi spesso, mi sono sempre rimaste accanto e hanno condiviso con me momenti preziosi ed esperienze indimenticabili: Elena, Nicole, Miriam, Cinzia, Valentina, Alessandra, Simona e tutte le sorelle scout.

Ringrazio immensamente le mie compagne di corso con cui ho condiviso grandi traguardi, delusioni e rabbia provate durante un esame andato male, risate a lezione e serate pazzarelle in PDP. Un grazie speciale ad Antonella, mia compagna di “sventure” per aver condiviso con me questo ultimo periodo carico di ansia e tensione. La tua dolcezza è stata per me fondamentale.

Voglio, inoltre, ringraziare le mie coinquiline con le quali sto sperimentando la bellezza e l'emozione di vivere da “fuorisede” seppur a soli 22 km da casa.

Per ultimo, ma non di certo per importanza, un grazie a Francesco, colonna portante di questo mio percorso. Grazie per essere stato un compagno di studio e di vita, il mio tifoso numero uno. A te devo le emozioni più intense e le gioie più grandi.

Grazie ad ognuno di voi di far parte della mia vita e di condividere con me questo traguardo importante.