

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE E
ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE
SEZIONE DI ISPEZIONE**

TESI DI DOTTORATO IN

**Produzione e Sanità degli alimenti di origine animale
XVIII ciclo**

Caratterizzazione biomolecolare di Clostridi isolati da latte e formaggi

TUTOR

Prof.ssa M.L.Cortesi

COORDINATORE

Prof.ssa M.L. Cortesi

CANDIDATA

Dott.ssa Fabiana Demarco

ANNI ACCADEMICI 2002- 2005

INDICE

Introduzione.....	pag 2
CAPITOLO I	
La produzione casearia in Italia.....	pag 4
Classificazione dei formaggi.....	pag 5
Denominazione di Origine Protetta.....	pag 7
Il Processo produttivo.....	pag 15
CAPITOLO II	
Il Formaggio Grana.....	pag 26
La Tecnologia	pag 30
Aspetti Igienico-Sanitari	pag 33
Le Alterazioni.....	pag 34
Rischio Clostridi.....	pag 39
CAPITOLO III	
Scopo della tesi.....	pag 42
CAPITOLO IV	
Parte Sperimentale.....	pag 44
Materiali e Metodi.....	pag 45
Risultati.....	pag 51
Conclusioni.....	pag 66
Bibliografia.....	pag 67

INTRODUZIONE

La produzione di formaggio consente di allungare nel tempo la durata di fruizione alimentare del latte, che, in quanto tale, deperisce molto in fretta. Proprio per tal motivo il formaggio è stato presente sul mercato alimentare per molti secoli come un prodotto artigianale e locale, reperibile quasi esclusivamente nelle località limitrofe alle zone di produzione.

I derivati del latte, pur contenendo proteine e grassi in quantità variabile, a seconda della composizione della materia prima di partenza e della stagionatura, presentano quantità di carboidrati trascurabili e si collocano, dal punto di vista nutrizionale, tra le fonti più concentrate di calcio. In considerazione di tale peculiarità, essi - intolleranze individuali a parte - andrebbero inseriti quasi quotidianamente nella dieta di ognuno.

Il formaggio è un alimento molto complesso, la cui preparazione richiede una cura particolare, in quanto la sua qualità e le sue peculiarità sono strettamente condizionate, oltre che dalle modalità di produzione, dalle caratteristiche ambientali sia del territorio nel quale vengono allevati gli animali, sia di quello nel quale viene realizzata la stagionatura.

L'avvento della produzione industriale, che di certo non ha favorito il miglioramento qualitativo dei formaggi, determinandone, anzi, una lenta ma inesorabile perdita delle singole specificità nutrizionali ed organolettiche, ha comportato indubbi vantaggi di ordine generale, quali una maggiore affidabilità e sicurezza dal punto di vista igienico, l'abbassamento dei prezzi e, non da ultimo, la sua più capillare diffusione nel circuito commerciale.

Secondo una antica definizione " *il formaggio o cacio è il prodotto che si ricava dal latte intero o parzialmente scremato o scremato, oppure dalla crema in seguito a coagulazione acida o presamica, anche facendo uso di fermenti e di sale da cucina*".

La coagulazione acida si ha a seguito della demineralizzazione delle micelle caseiniche: tale processo determina il formarsi di un coagulo dotato di consistenza ed elasticità molto limitate.

La coagulazione presamica, invece, si ha a seguito del distacco dalla k-caseina di un glicopeptide o proteosi operato dall'enzima chimasi, con contemporanea perdita delle sue

proprietà stabilizzanti nei confronti delle altre caseine che, per intervento del calcio ionico, passano dallo stato disperso a quello di coagulo.

In genere la coagulazione è mista, nel senso che la si realizza sia con apporto di caglio, sia per acidificazione del latte (ottenibile in caldaia ad opera dei batteri lattici), con prevalenza del primo metodo per formaggi a pasta dura, del secondo se la produzione è orientata verso formaggi molli.

Il latte destinato alla produzione del formaggio, in ogni caso, non deve provenire da animali affetti da **mastite** e deve essere esente da:

- **odori sgradevoli**, che pregiudicano le caratteristiche organolettiche del prodotto finito;
- residui di **antibiotici**, che ostacolano la coagulazione.

CAPITOLO PRIMO

La produzione casearia in Italia

CLASSIFICAZIONE DEI FORMAGGI

I formaggi, in considerazione della loro grande varietà, possono essere classificati in base ad una serie di parametri fisici e tecnologici.

I parametri più frequentemente adottati sono i seguenti:

1. Tempo di maturazione

A seconda della sua durata, la maturazione, si distingue in:

- **rapida**: se si protrae al massimo per 30 giorni (*mozzarella, crescenza*);
- **media**: se si protrae per 1-6 mesi (*fontina, gorgonzola*);
- **lenta**: se si protrae per più di 6 mesi (*parmigiano, emmenthaler*).

2. Temperatura della cagliata

Se la temperatura di cottura è superiore a quella di formazione della cagliata si parla di formaggi a:

- pasta **cruda**: se raggiunge al massimo 40 gradi (*crescenza, gorgonzola, mozzarella, taleggio*)
- pasta **semicotta**: se raggiunge al massimo 48 gradi (*fontina, asiago, provolone*)
- pasta **cotta**: se raggiunge al massimo 48-56 gradi (*grana, parmigiano, emmenthal*)
- pasta **filata**: se la cagliata viene messa in acqua a *80-90 gradi* (*mozzarella, provolone*);

3. Consistenza finale della pasta

Si possono avere formaggi:

- **molli** (*crescenza*);
- **semiduri** (*fontina*)
- **duri** (*grana*)

4. Contenuto in grassi

In relazione al “*tenore di grassi sul secco*”, i formaggi si suddividono in tre categorie:

- **grassi**: grasso sul secco superiore al 42%;
- **semigrassi**: grasso sul secco dal 20 al 42%;
- **magri**: grasso sul secco inferiore al 20 %.

Va precisato, peraltro, che da un punto di vista legislativo, il contenuto minimo di materia grassa nei formaggi è disciplinato solo con riferimento ai prodotti a denominazione di origine e a denominazione tipica, per i quali puntuali determinazioni quantitative sono dettate dalla legge 10 aprile 1954, n. 125.

In relazione alle tipologie di formaggi diverse da quelle appena indicate, la normativa vigente, ed in particolare l'art. 53 della legge n. 142/92, si limita ad assicurare la corretta informazione per il consumatore, prescrivendo, a carico del produttore, il solo obbligo di indicare, in etichetta, la natura del formaggio, che deve essere qualificato come “*magro*”, se il contenuto di materia grassa, riferito alla sostanza secca é inferiore al 20% ovvero “*leggero*” se il predetto parametro quantitativo sia compreso tra il 20 ed il 35%.

LA DENOMINAZIONE DI ORIGINE PROTETTA

Nel nostro Paese sono stati recensiti più di 400 tipi di formaggi.

I formaggi che hanno conseguito la qualifica di formaggi a “*Denominazione di Origine Protetta*” sono solo 31 (*Salvadori del Prato, Bologna, 1998*), pur tuttavia, essi costituiscono, nel loro complesso, ben il 44% della produzione casearia nazionale.

Il dato che emerge è che molti di questi formaggi sono prodotti e venduti in *quantità* molto rilevante, (*al primo posto si colloca il Grana Padano, seguito, in ordine decrescente, da Parmigiano Reggiano, Gorgonzola, Pecorino Romano, Provolone Valpadana, Asiago e Mozzarella di bufala campana*).

Ne deriva che particolarmente efficienti e penetranti devono essere, in relazione a tali prodotti, le azioni di vigilanza atte a contrastare le continue frodi che troppo frequentemente si verificano nel comparto e che inevitabilmente prendono di mira i prodotti più diffusi, con grave danno per l'economia nazionale, oltre che per gli specifici interessi dei consumatori e dei produttori.

Per quanto riguarda la valorizzazione e la promozione, invece, non si ravvisa alcuna necessità di iniziative degli organi competenti, trattandosi di prodotti alimentari, il cui pregio qualitativo, sia dal punto di vista nutrizionale, sia dal punto di vista organolettico è oramai largamente noto ed apprezzato in maniera pressoché unanime anche all'estero.

Va precisato, peraltro, che taluni disciplinari, nel regolamentare la produzione di formaggi “minori”, dal punto di vista quantitativo (*Robiola di Roccaverano, ad esempio*), adottano disposizioni troppo permissive e/o generiche, che finiscono con il dare luogo a singole conseguenze negative; della relativa tutela, infatti, fraudolentemente si avvalgono anche i produttori di formaggi che, in realtà, non posseggono affatto o posseggono solo in parte quegli specifici requisiti di provenienza e di qualità che sono i presupposti della normativa di protezione.

Ne deriva la inevitabile penalizzazione proprio di quei formaggi che, essendo caratterizzati da stretti legami con la tradizione o da particolari modalità di produzione, necessitano di più raffinata artigianalità, implicante, magari, maggiori costi o minori rese e si

presentano con caratteristiche organolettiche la cui specificità viene fatta apparire dalla grande distribuzione non come un pregio, bensì come “strana” e non più appetibile.

Merita di essere segnalata, a questo proposito, l'anomalia della D.O.P. assegnata a *Provolone Valpadana*. In questo caso un prodotto storicamente meridionale viene tutelato, invece, in una zona molto lontana dal suo luogo di origine reale; tale singolarità è dovuta alla circostanza che verso la fine dell'Ottocento, pur di avere più latte a disposizione, molti casari del Sud si spostarono in Valpadana, ivi trasferendo la loro attività.

Ciò non toglie, peraltro, che i provoloni migliori vengono ancora oggi prodotti nel Mezzogiorno d'Italia.

Una diversa, ma altrettanto singolare anomalia concerne la *Robiola di Roccaverano*, tradizionalmente prodotta con puro latte di capra, per la quale ed al massimo si poteva consentire l'aggiunta di modesti quantitativi di latte vaccino per produrre qualche formaggella in più.

Per la produzione di tale formaggio, il disciplinare della D.O.P. oggi consente l'utilizzo dell'85 % di latte vaccino, il che equivale praticamente alla totale snaturalizzazione del prodotto originario. Ciò è accaduto perché, al fine di salvare l'economia della originaria zona di produzione (Alta Langa Astigiana), verso la metà del secolo scorso, si permise al caseificio sociale questa miscela di latti.

Anche in questo caso occorre tenere presente, però che le migliori *Robiole di Roccaverano* sono quelle che ancora oggi vengono prodotte esclusivamente con latte caprino.

Emerge da ciò che in taluni casi l'ottenimento di una Denominazione di Origine tende non tanto alla tutela ed alla promozione di un determinato formaggio, quanto alla salvaguardia ed allo sviluppo dell'economia della zona interessata, premiando più che i cultori dei valori tradizionali, i produttori più intraprendenti sotto il profilo commerciale, e meno propensi al rispetto delle regole.

A tal proposito merita di essere ricordata, altresì, la vicenda relativa al formaggio *Taleggio*.

Questo tipo di formaggio ha la sua area storica di produzione nelle piccole valli del bergamasco, dove spesso ancora oggi viene messo a maturare in grotte naturali.

Esso, però, in maniera davvero anomala ed apparentemente inspiegabile, viene prodotto anche in una microzona in provincia di Treviso e, richiesto di fornire chiarimenti in

ordine a tale singolarità, il competente Consorzio di Tutela di questo formaggio ha chiarito che, al momento del riconoscimento di origine, vi fu qualcuno che riuscì a dimostrare di aver prodotto formaggio *Taleggio* nella provincia di Treviso. In seguito anche altre aziende trevigiane chiesero ed ottennero di poterlo produrre. Con il tempo, però, quasi tutti rinunciarono ad avvalersi della facoltà loro concessa ed oggi in provincia di Treviso esiste un solo piccolo produttore di *Taleggio*, che peraltro fa stagionare il proprio prodotto nella provincia di Bergamo.

Molteplici sono quindi le “strane” realtà disciplinate e consentite dal sistema normativo vigente.

Va pure sottolineato che purtroppo, nelle D.O.P., è quasi sempre assente il riferimento alla razza autoctona degli animali da cui deve provenire il latte utilizzabile per le specifiche qualità di formaggio protetto. Ciò ha finito con il determinare, quasi ovunque, la scomparsa della “razza storica”, sia essa caprina, bovina o pecorina, a favore di una nuova “razza globale”, molto più produttiva, ma anche molto meno caratterizzata.

In ogni caso, non può negarsi che sicuramente le D.O.P. svolgono, nel comparto produttivo, una funzione molto rilevante in quanto regolamentano tutto l'iter produttivo dei formaggi presi in considerazione, li tutelano dalle possibili contraffazioni, ne favoriscono la diffusione ed hanno segnato, comunque, una svolta effettiva nel panorama alimentare, dotandolo di regole e prescrizioni e preservandolo, quindi, da possibili abusi.

Va ricordato che le prime D.O.C. risalgono al 1955 e sono state la naturale conseguenza della Convenzione di Stresa del 1951 e della legge n°125 del 1954, prima normativa adottata in Italia a tutela di un comparto alimentare, ma non può essere sottaciuto che i relativi disciplinari tradiscono, in più punti, la loro provenienza più dal mondo politico che da quello produttivo.

E' stato osservato che nel panorama produttivo italiano molti sono i tipi di formaggio che per qualità e per specificità organolettiche potrebbero meritare il riconoscimento di una D.O.P., ma i relativi piccoli produttori, eredi di un patrimonio di storia e cultura legato all'arte casearia, non hanno saputo esprimere la capacità organizzativa ed economica necessaria per affrontare e portare a termine il complesso e costoso iter burocratico teso all'ottenimento di una D.O.P. ed il mondo politico se ne è disinteressato.

Finora, in Italia, l'unica iniziativa finalizzata al conseguimento di effettiva severità ed incisivo rigore nella normativa, si deve al Consorzio di Tutela del Parmigiano Reggiano, che ha

di recente modificato il proprio disciplinare, portando il limite minimo della distanza dei pascoli dalle arterie stradali principali, a 180 metri.

Per quanto riguarda il contenuto dei vari disciplinari, va sottolineato che per ogni formaggio con denominazione di origine protetta devono essere indicate la natura del latte impiegato; le **province** di produzione previste; il **latte** con il quale viene prodotto il formaggio (**V** = latte vaccino **O** = latte ovino **C** = latte caprino; **B** = latte di bufala)

La tabella che segue contiene in sintesi le notizie relative ai formaggi D.O.P. attualmente prodotti sul territorio nazionale.

Denominazione	Province di Produzione	Latte	D.O.C.	D.O.P.
Asiago	Padova, Trento, Treviso, Vicenza	V	21.12.78	Nov. 95
Bitto	Sondrio, Bergamo	V - V/C	10.06.95	Giugno 96
Bra	Cuneo, Torino	V V/C/O	16.12.82	Giugno 96
Caciocavallo Silano	Crotone, Catanzaro, Cosenza, Avellino, Benevento, Caserta, Bari, Napoli, Isernia, Campobasso, Taranto, Brindisi, Matera, Potenza	V	10.05.93	Giugno 96
Canestrato Pugliese	Foggia	O	10.09.85	Nov. 95
Caciotta d'Urbino	Pesaro	O/V	30.03.82	Nov. 95
Casera Valtellina	Sondrio	V	10- 06.95	Giugno 96
Castelmagno	Cuneo	V V/C/O	16.12.82	Giugno 96
Fiore Sardo	Cagliari, Nuoro, Oristano, Sassari	O	28.11.74	Nov. 95
Fontina	Aosta	V	30.10.55	Nov. 95
Formadzo V. Aosta	Aosta	V - V/O-C	10.06.95	Giugno 96
Formai de Mut	Bergamo	V	10.09.85	Nov. 95

dell'Alta Val Brembana				
Gorgonzola	Cuneo, Novara, Vercelli, Bergamo, Brescia, Como, Cremona, Lodi, Milano, Pavia	V	30.10.55	Nov. 95
Grana Padano	Lodi, Bergamo, Brescia, Como, Cremona, Mantova, Milano, Pavia, Sondrio, Varese, Alessandria, Asti, Cuneo, Novara, Torino, Vercelli, Trento, Padova, Rovigo, Treviso, Venezia, Verona, Vicenza, Bologna, Ferrara, Forlì, Piacenza, Ravenna	V	30.10.55	Nov. 95
Montasio	Veneto	V	10.03.86	Nov. 95
Monte Veronese	Verona	V	09.04.93	Giugno 96
Mozzarella di Bufala Campana	Caserta, Salerno, Frosinone, Latina, Napoli, Benevento, Roma	B	17.05.93	Giugno 95
Murazzano	Cuneo	O - O/V	16.12.82	Nov. 95
Parmigiano Reggiano	Reggio-Emilia, Mantova, Modena, Parma, Bologna	V	30.10.55	Nov. 95
Pecorino Romano	Roma, Rieti, Viterbo, Latina, Grosseto, Cagliari, Nuoro, Oristano, Sassari	O	06.06.95	Nov. 95

Pecorino Sardo	Cagliari, Nuoro, Oristano, Sassari	O	10.06.95	Giugno 96
Pecorino Siciliano	Agrigento Caltanissetta, Catania, Enna, Messina, Palermo, Ragusa, Siracusa, Trapani,	O	30.10.55	Nov. 95
Pecorino Toscano	Arezzo, Firenze, Grosseto Livorno Lucca, Massa-Carrara, Perugia Pisa, Pistoia, Prato Siena, Terni, Viterbo	O	17.05.86	Giugno 96
Provolone Valpadana	Brescia, Bergamo Cremona, Mantova, Milano, Padova Piacenza, Rovigo, Trento, Verona, Vicenza,	V	09.04.93	Nov. 95
Quartiolo Lombardo	Cremona, Bergamo, Brescia, Como, Lodi, Milano, Pavia, Varese	V	10.05.93	Nov. 95
Ragusano	Ragusa, Siracusa	V	30.10.55	Giugno 96
Raschera	Cuneo	V - V/O/C	02.05.95	Giugno 96
Robiola di Roccamare	Alessandria, Asti	V/O/C	14.03.79	Giugno 96

Taleggio	Bergamo, Brescia, Como, Cremona, Lodi, Novara, Milano, Pavia, Treviso	V	15.09.88	Nov. 95
Toma Piemontese	Alessandria, Asti, Biella, Cuneo, Novara, Torino, Vercelli	V	10.05.93	Giugno 96
Trentino			16.01.87	Nov. 95

II PROCESSO PRODUTTIVO

Il formaggio è il prodotto derivante da due trasformazioni operate sul latte:

- una **enzimatica**, da parte del caglio
- una **fermentante** da parte dei microorganismi lattici.

Il risultato di queste trasformazioni dipende da moltissimi fattori. Esistono infatti circa **2000 varietà di formaggi** nel mondo, 400 delle quali solamente in Italia, a conferma della nostra importante tradizione gastronomica, davvero insuperabile.

Il complesso processo produttivo del formaggio si articola in più fasi, delle quali appare opportuno esaminare quelle più rilevanti, qui di seguito indicate.

1. LA RACCOLTA DEL LATTE

Ai sensi del D.P.R. 14-1-1997 n. 54 (*Regolamento recante attuazione delle direttive 92/46 e 92/47/CEE in materia di produzione e immissione sul mercato di latte e di prodotti a base di latte*) il latte crudo deve provenire da aziende regolarmente registrate e regolarmente controllate. Tutte le operazioni dovranno essere svolte nel rispetto delle rigorose norme igieniche concernenti sia i locali sia le attrezzature, sia il personale, sia l'attività di mungitura vera e propria, sia la fase della raccolta nell'azienda di trasformazione.

I locali.

Gli ambienti nei quali si effettua la mungitura o il latte viene fatto sostare, manipolato o refrigerato, devono essere situati e costruiti in modo da evitare rischi di contaminazione del latte. Essi devono essere facilmente pulibili e disinfettabili e devono almeno:

- a) avere pareti e pavimenti di agevole pulizia nelle zone in cui possono presentarsi rischi di sudiciume o infezioni;
- b) avere pavimenti costruiti in modo da agevolare il drenaggio dei liquidi e mezzi soddisfacenti per l'evacuazione dei rifiuti;
- c) essere muniti di una ventilazione e di una illuminazione adeguata;
- d) disporre di un impianto adeguato e sufficiente di erogazione di acqua potabile che rispetti i

parametri indicati negli allegati *D* ed *E* del *DPR 236/88*, da utilizzare nelle operazioni di mungitura e di pulizia delle attrezzature e degli strumenti specificati al capitolo III, lettera *B*; nel caso di allevamenti siti in territorio di montagna o comunque disagiato, l'acqua utilizzata, ancorché non riconosciuta come potabile, deve possedere al controllo, i requisiti previsti per l'acqua destinata al consumo umano diretto;

e) presentare un'adeguata separazione da tutte le possibili fonti di contaminazione, quali gabinetti e cumuli di letame;

f) disporre di dispositivi e attrezzature di agevole lavaggio, pulizia e disinfezione.

Inoltre, i locali per il magazzinaggio del latte devono essere muniti di impianti di refrigerazione adeguati, essere opportunamente protetti contro i parassiti ed essere separati dai locali in cui sono stabulati gli animali. Se le femmine da latte sono tenute in stabulazione libera all'aria aperta, l'azienda deve disporre anche di una sala o una zona di mungitura adeguatamente separata dal locale di stabulazione.

Gli animali devono essere tenuti separati dai locali e dai luoghi in cui viene immagazzinato, manipolato o refrigerato il latte.

Le attrezzature.

Le attrezzature e gli strumenti, o le loro superfici, destinati a venir a contatto con il latte (utensili, contenitori, cisterne, ecc., utilizzati per la mungitura, la raccolta o il trasporto del latte) debbono essere fabbricati con un materiale liscio, che sia di agevole lavaggio, pulizia e disinfezione, resistente alla corrosione e tale da non cedere sostanze in quantitativi che possano risultare dannosi per la salute umana, alterare la composizione del latte o avere un'incidenza negativa sulle sue caratteristiche organolettiche.

Dopo l'impiego, gli utensili usati per la mungitura, le attrezzature per la mungitura meccanica e i contenitori che sono stati a contatto con il latte debbono essere lavati, puliti e disinfettati. Dopo ogni viaggio, o ogni serie di viaggi se il lasso di tempo tra lo scarico e il carico successivo è estremamente contenuto, ma ad ogni modo almeno una volta al giorno, i contenitori e le cisterne usati per il trasporto del latte crudo al centro di raccolta o di standardizzazione del latte o allo stabilimento di trattamento o di trasformazione devono essere lavati, puliti e disinfettati prima di una loro riutilizzazione.

I secchi contenenti il latte devono essere coperti finché restano nella stalla. Se il latte è sottoposto a filtrazione, il filtro utilizzato deve essere sostituito o pulito, a seconda del tipo, prima che si esaurisca la sua capacità di assorbimento. Il filtro deve in ogni caso essere sostituito o pulito prima di ciascuna mungitura. È vietato l'uso di tessuti filtranti.

Il personale

Il personale deve trovarsi nelle migliori condizioni di pulizia. In particolare:

- le persone addette alla mungitura e alla manipolazione del latte crudo devono indossare abiti da lavoro idonei e puliti;
- le persone addette alla mungitura devono lavarsi le mani immediatamente prima della mungitura e restare per quanto possibile con le mani pulite per tutta la durata dell'operazione. A questo scopo devono trovarsi installazioni idonee attigue al locale di mungitura per consentire agli addetti alla mungitura e alla manipolazione del latte crudo di lavarsi le mani e le braccia.
- il datore di lavoro deve prendere i provvedimenti necessari per impedire la manipolazione del latte crudo alle persone che potrebbero contaminarlo fintanto che non sia dimostrato che sono atte a manipolarlo senza pericolo.
- le persone addette alla mungitura e alla manipolazione del latte crudo sono tenute a dimostrare di essere munite del libretto di idoneità sanitaria di cui all'articolo 37 del *DPR 327/80* e successive modifiche.

La mungitura.

Tale attività deve essere effettuata nel rispetto delle seguenti condizioni:

- ciascun animale della mandria deve poter essere identificato dal servizio veterinario;
 - durante e immediatamente prima della mungitura non deve essere consentito alcun lavoro che influisca sfavorevolmente sul latte;
 - prima di sottoporre una vacca alla mungitura si deve curare che i capezzoli, la mammella ed eventualmente le parti adiacenti dell'inguine, della coscia e dell'addome siano puliti;
 - prima di mungere una vacca il mungitore deve controllare l'aspetto dei primi getti del latte.
- Qualora si rilevi una qualsiasi anomalia fisica, il latte della vacca in causa deve essere escluso

dalla consegna. Le vacche che presentano malattie cliniche alla mammella devono essere munte per ultime o con una macchina separata oppure a mano ed il loro latte deve essere escluso dalla consegna;

- il trattamento per immersione o per vaporizzazione dei capezzoli delle bovine in fase di lattazione deve essere effettuato soltanto immediatamente dopo la mungitura, salvo diversa autorizzazione dal servizio veterinario. I prodotti chimici utilizzati per tali operazioni devono essere approvati dal Ministero della sanità.

La raccolta.

Il latte, immediatamente dopo la mungitura, deve essere posto in un luogo pulito e attrezzato in modo da evitare eventuali alterazioni delle sue caratteristiche. Qualora la raccolta non venga effettuata entro due ore dalla mungitura, il latte deve essere raffreddato ad una temperatura pari o inferiore a 8 °C in caso di raccolta giornaliera e a 6 °C se la raccolta non viene effettuata giornalmente; durante il trasporto del latte refrigerato sino agli stabilimenti di trattamento e/o di trasformazione la temperatura non deve superare i 10 °C, salvo il caso in cui il latte sia stato raccolto nelle due ore successive alla mungitura.

Per motivi tecnici relativi alla fabbricazione di alcuni prodotti a base di latte, il servizio veterinario può concedere deroghe relative alle temperature di cui al precedente capoverso. Dopo la raccolta con autocisterne o bidoni presso le aziende produttrici, il latte viene ricevuto dal caseificio in un vestibolo dove viene pesato, controllato e filtrato e successivamente passa in una sala dove sono situate le scrematrici a centrifuga o le bacinelle per l'affioramento naturale.

2. LA CORREZIONE DEL GRASSO.

In via preliminare, alcuni latti vengono *scremati* (per affioramento) al fine di ottenere formaggi semigrassi (es. parmigiano reggiano), altri, invece, vengono *addizionati di crema* per consentire la produzione di formaggi grassi (es. gorgonzola e taluni tipi di provolone).

3. LA PASTORIZZAZIONE.

Per la produzione di formaggi freschi e, a volte, al fine di abbassarne la carica microbica, il latte viene sottoposto al trattamento della pastorizzazione, il che consente di ottenere un prodotto più affidabile dal punto di vista igienico, ma comporta un inevitabile appiattimento di sapori ed aromi.

Tale effetto indesiderato deriva dal fatto che le colture microbiche che vengono impiegate sono standardizzate. Di conseguenza il formaggio prodotto con latte pastorizzato si attesta su una qualità standard, che potrà anche essere alta, ma non presenterà le peculiari differenziazioni dovute agli specifici microorganismi propri del luogo di origine.

Nella quasi totalità delle lavorazioni, al latte vengono aggiunte colture microbiche specifiche che ne modificano la composizione, fornendo enzimi in grado di caratterizzare la maturazione del formaggio.

Gli innesti possono essere naturali, se i microorganismi sono quelli naturalmente presenti nel latte, o selezionati, se preparati in laboratorio: questi ultimi si suddividono in lattoinnesti e sieroinnesti.

I **lattoinnesti**, vengono utilizzati per produrre formaggi molli come *crescenza*, *stracchino*, *gorgonzola*. Per questo tipo di innesto le colture sono fatte crescere nel latte

I **sieroinnesti**, invece, vengono utilizzati per produrre formaggi a pasta cotta, come il *parmigiano reggiano* e il grana padano. In questo caso i microorganismi sono coltivati nel siero di latte

Gli **innesti fungini** sono particolari tipi di innesti composti da muffe del tipo *penicillium roqueforti* o *camemberti* o *aspergillus*, che vengono aggiunti in seguito alla formazione della cagliata sotto forma di spore che germineranno durante la maturazione. Grazie a tali innesti si producono i formaggi "blu", come il *gorgonzola*, il *roquefort*, lo *stilton*.

4. L'INNESTO DI FERMENTI LATTICI

Le moderne tecnologie per la produzione di molti formaggi impiegano ormai abitualmente fermenti lattici selezionati. L'aggiunta di innesto apporta al latte una flora batterica che assicura una decisa prevalenza dei batteri caseofili, che conferiscono elevata acidità, favoriscono la coagulazione e contrastano i batteri butirrici (agenti del gonfiore tardivo).

Questo insembramento può essere effettuato in vari modi:

- mediante innesto naturale, che consiste in colture di batteri già presenti naturalmente nel latte il cui sviluppo viene favorito col riscaldamento del latte (latteinnesto) o del siero (sieroinnesto),
- mediante innesto selezionato, che consiste in colture di batteri appositamente selezionati per conferire al formaggio caratteristiche organolettiche omogenee e costanti (lattofermento e sierofermento).

5. LA COAGULAZIONE DEL LATTE.

La coagulazione del latte consiste nel passaggio della caseina dallo stato di *sol* allo stato di *gel*. Il latte che coagula rapidamente è detto "*forte*", mentre, se la coagulazione è lenta, è detto "*fiacco*" o "*pigro*".

Due sono le specie di coagulazione:

La coagulazione acida, che si realizza in conseguenza della demineralizzazione delle micelle caseiniche: si ottiene così un coagulo dotato di consistenza ed elasticità molto limitate.

Utilizzando tale tipo di coagulazione si hanno formaggi acidi o bianchi. In Italia si producono solo due formaggi bianchi: il *mascarpone*, ottenuto da crema coagulata mediante acido acetico o citrico e, in Campania, il *cacio-ricotta*, ottenuto per coagulazione a 90°C con latte intero acidificato spontaneamente.

La coagulazione presamica si ha, invece, a seguito del distacco dalla k-caseina di un glicopeptide o proteosi, operato dall'enzima chimasi, con contemporanea perdita delle sue proprietà stabilizzanti nei confronti delle altre caseine che, per intervento del calcio ionico, passano dallo stato disperso a quello di coagulo (il paracaseinato di calcio coagula formando la cagliata).

Molto utilizzata è la coagulazione mista, che avviene sia per apporto di caglio, sia per acidificazione del latte, con prevalenza del primo metodo per ottenere formaggi a pasta dura e del secondo per i formaggi molli.

Il *caglio* o *presame* è un complesso enzimatico ricavato dalla mucosa superficiale dell'abomaso (il quarto stomaco) del vitello o del capretto lattante. Esso è costituito da due enzimi: la *chimosina* (dotata di forte azione coagulante) e la *pepsina* (dotata di forte azione proteolitica).

In Sardegna si utilizza anche l'estratto del fiore di cardo selvatico, mentre all'estero si utilizza anche lattice di fichi ed estratto di batteri e muffe.

Il processo di coagulazione si conclude con la formazione di una massa gelatinosa di caseina, che si addensa, inglobando la maggior parte del grasso del latte e che prende il nome di *cagliata*

6. SINERESI E SPURGO.

La cagliata formatasi a seguito della coagulazione di latte tende a contrarsi (*sineresi*) espellendo il siero, costituito da acqua, lattosio e sieroproteine. Questo naturale processo espulsivo, detto "*spurgo*", in concreto, viene potenziato dall'azione dell'uomo; la tecnica produttiva prevede, infatti che la cagliata venga sottoposta a *rottura* mediante l'uso di un apposito attrezzo, detto *spino* o *lira* ovvero con l'uso di lamine e fili di acciaio e con un tipico movimento di mescolamento: in questo modo risulta aumentata la superficie dalla quale il siero fuoriesce.

7. LA LAVORAZIONE DELLA CAGLIATA.

A seconda del tipo di formaggio che si intende produrre, la cagliata viene riscaldata a temperature variabili da 38-56 gradi (formaggi cotti e semicotti), per tempi variabili da 15 a 90 minuti; per la produzione di formaggi crudi la cagliata, invece, non subisce alcun riscaldamento.

Quando ha raggiunto la consistenza desiderata, la cagliata viene variamente sminuzzata a seconda del tipo di formaggio che si intende produrre. Ed infatti, per ottenere formaggi molli la cagliata è sminuzzata in pezzi della dimensione di un'arancia o una noce, per ottenere formaggi a pasta semidura i pezzi hanno la dimensione di un fagiolo e per ottenere, formaggi duri la dimensione è quella dei granelli di riso.

Più fine è lo sminuzzamento, infatti, più intenso sarà lo spurgo e più asciutto e duro diventerà il formaggio. Durante la rottura occorre agitare la cagliata e osservare brevi periodi di riposo per favorire lo spurgo: più anticipata è la rottura più rapido è lo spurgo; per i formaggi molli questa operazione avviene in 15-20 minuti dopo la coagulazione, per quelli a pasta dura in 2-4 minuti.

Segue la fase della **giacenza**, che consiste nel lasciare la cagliata a riposo nel proprio siero per 20-30 minuti a 36-38 °C, così consentendo il protrarsi dello spurgo.

A questo punto si estrae la cagliata, la si fraziona secondo il peso desiderato e la si mette in forma entro appositi recipienti ove la forma viene ogni tanto rivoltata.

In questa fase il formaggio si acidifica continuando a spurgare.

La linea di lavorazione fin qui descritta riguarda i formaggi *a pasta molle*.

Per ottenere formaggi *a pasta dura*, invece (ad. es. il *parmigiano reggiano*), occorre effettuare la cottura della pasta prima della giacenza. Durante lo sminuzzamento la temperatura viene aumentata da 32 a 42°C e, dopo una breve sosta, a 56°C nel giro di 15-20 minuti agitando la cagliata.

Alla fase della giacenza segue quella della **formatura**: la cagliata viene posta in appositi contenitori detti *fascere* o *stampi* e sottoposta ad opportuna compressione con appositi pesi per 18-24 ore.

8. LA SALATURA.

Tutti i formaggi sono sottoposti a questa operazione di durata variabile a seconda del tipo di formaggio (meno di un'ora per la *mozzarella*, 20-25 giorni per il *grana*)

La salatura tende a conferire sapidità al prodotto, migliorandone il gusto, a favorire la formazione della crosta, a regolare il tenore di acqua e lattosio della pasta caseosa ed a selezionare la flora microbica, ostacolando alcuni agenti nocivi e favorendo quelli utili.

Può essere realizzata *a secco*, cospargendo il sale da cucina grossolanamente macinato sulla superficie delle forme e *per via umida*, ponendo le forme, per prestabiliti periodi di tempo, in una soluzione di sale alla voluta concentrazione.

La **salatura** può essere fatta a secco, per sfregamento (un po' come si fa con i prosciutti), oppure immergendo le forme in salamoie con il 18-24% di sale. Essa svolge una essenziale funzione protettiva ed è pertanto obbligatoria per tutti i tipi di formaggio. Fa eccezione il solo *Pannerone*, destinato a consumatori ipercolesterolemici

9. LA FORMAZIONE DELLA CROSTA.

La crosta consiste in uno strato protettivo che si forma per indurimento della parte esterna della caseina in seguito alla notevole liberazione di siero, grazie anche alla salatura

Essa sostiene la pasta proteggendola dall'ambiente esterno, limita le perdite per evaporazione e favorisce la maturazione.

10. LA STAGIONATURA O MATURAZIONE

La **maturazione** é la fase in cui la cagliata diviene formaggio.

E' proprio durante il processo di maturazione, infatti, che i fermenti lattici naturalmente presenti nel latte di partenza, nonché quelli aggiunti in seguito, cominciano a riprodursi e a dare al prodotto in formazione le sue caratteristiche organolettiche specifiche.

Si tratta di un processo decisamente complesso. Una volta essa veniva effettuata in grotte dove spesso il formaggio sviluppava una microflora caratteristica che conferiva particolari sapori e aromi (basti pensare al *formaggio di fossa*). Oggi avviene in celle di stagionatura (*casere*) a temperatura e umidità costante, con una durata ben determinato, ma variabile a seconda del formaggio che si intende produrre: da qualche giorno (per la *crescenza*) fino a 12-18 mesi (per la *grana*).

L'atmosfera delle casere è rigorosamente controllata, e la temperatura varia da 5-10°C per i formaggi a pasta molle, a 12-20°C per quelli a pasta cotta. L'umidità relativa è in ogni caso elevata, intorno al 90%.

I formaggi freschi a pasta molle vengono messi a maturare in luoghi caldi e umidi per alcune ore, per completare lo spurgo e facilitare la fermentazione lattica.

I formaggi a pasta dura e lunga stagionatura vengono lasciati spurgare per qualche ora, mentre la maturazione vera e propria inizia dopo la salatura.

I formaggi, a seconda delle modalità con cui si realizzano le fasi della coagulazione e della successiva maturazione, possono classificarsi come segue:

FRESCHI (di pronto consumo, maturazione rapida)	<i>Bel-paese, Caciotta Formaggi-bianchi Mascarpone</i>
PASTA MOLLE (maturazione rapida)	<i>Robiole, Crescenza Stracchino, Brie Camembert</i>
PASTA MOLLE (maturazione media)	<i>Taleggio, Gorgonzola Roquefort, Italico Caciofiore, Vacherin</i>
PASTA FILATA (maturazione rapida)	<i>Mozzarella, Scamorza Provola</i>
PASTA FILATA (maturazione media)	<i>Caciocavallo, Provolone</i>
PASTA DURA cruda (pressata, maturazione media)	<i>Edam, Gouda Cheddar, Bra</i>
PASTA DURA cotta (maturazione media, acidità naturale)	<i>Fontina, Bitto</i>
PASTA DURA cotta (maturazione lenta, acidità naturale)	<i>Emmenthaler, Sbrinz Gruyère, Pecorino</i>
PASTA DURA cotta (maturazione media, sieroinnesto)	<i>Asiago, Montasio Emmenthaler</i>

PASTA DURA cotta (maturazione lenta, sieroinnesto)	<i>Grana-padano</i> <i>Parmigiano reggiano</i>
CRUDI (coagulo con acidità naturale, a maturazione rapida 1 mese)	<i>Robiolini, Robiole</i> <i>Crescenza, Ravaggiolo</i> <i>Fresa</i>
CRUDI (coagulo con acidità naturale, a maturazione media 6 mesi)	<i>Provolone</i> <i>Caciocavallo</i>
CRUDI (coagulo con acidità di fermentazione, a maturazione rapida 1 mese)	<i>Mozzarelle, Scamorze</i> <i>Provature, Provole</i>
CRUDI (coagulo con acidità di fermentazione, a maturazione media 6 mesi)	<i>Gorgonzola-bianco</i> <i>Gorgonzola-verde</i>

CAPITOLO SECONDO

Il formaggio *Grana*

BREVI CENNI DI STORIA DEL GRANA

Il formaggio Grana (*Grana Padano e Parmigiano Reggiano*), così chiamato per la struttura granulosa della sua pasta è un formaggio a più lunga stagionatura e di difficile produzione.

Nelle sue due forme *Grana Padano* e *Parmigiano Reggiano*, è tutelato e riconosciuto DOP e DOC dalla legge europea ed italiana ed è sottoposto al controllo di due diversi Consorzi di Tutela, quello del Grana, con sede a Desenzano e quello del Parmigiano Reggiano, con sede in Reggio Emilia.

Non sono state acquisite, allo stato, certezze circa l'effettiva origine storica del Grana .

Taluni, infatti, affermano che esso sia nato nell'Abbazia di Bibbiano, altri, come il Besana, collocano il suo luogo d'origine nel territorio di Codogno, all'epoca in cui era sottoposto alla signoria di Parma.

E' certo, peraltro, che esso nacque nel tardo del medioevo in Padania allorché, dopo l'abbandono e l'impovertimento delle campagne italiche seguiti alla caduta dell'impero romano, intervenne il fenomeno culturale e sociale del monachesimo che ridiede vita ai campi.

Fu proprio intorno al 1140, con l'avvento delle abbazie cistercensi, che iniziarono le bonifiche agricole dei terreni padani.

Il periodo delle grandi bonifiche interessò dapprima i terreni del basso Milanese, per estendersi, già nel XIII secolo, alla pianura Emiliana ed anche qui gli artefici benemeriti di queste opere furono le abbazie cistercensi. Quella di Chiaravalle, quella di Cerreto e quella di S.Stefano, furono le più attive in questa opera di bonifica di terreni incolti

Alle opere religiose in favore dell'irrigazione dei campi fecero presto seguito quelle civili tese alla irrigazione e ciò fece prosperare la Padania rendendo possibili grandi allevamenti di bestiame con enormi produzioni di latte su quei terreni fertili e grassi, su cui insistevano le "marcite", tradizionali parti irrigue che forniscono fino a nove tagli annui di foraggio, nate nel 1200 nel Milanese, che sono forse le vere responsabili della nascita del Grana.

La necessità di conservare le grandi quantità di latte prodotto portò, come naturale conseguenza, alla fabbricazione di grosse forme di formaggio a pasta dura, ben conservabili nel tempo. Una delle caratteristiche fondamentali del Grana, da allora in poi, consiste, infatti, nella sua grande dimensione,

L'organizzazione socio-economica delle zone rurali padane non tardò ad adeguarsi a questa rivoluzione produttiva che metteva il formaggio tra le prime fonti di ricchezza. E' fu così che sorsero le "cascine" o "casoni" che ancora oggi insistono in quelle terre e nelle quali si concentrava (e in molti casi

ancora si concentra) la produzione del latte e del formaggio, il cui riferimento al *caseus* latino è facilmente rintracciabile.

Dalla stessa radice lessicale discende la figura del “casaro”, mitico personaggio associato, ancora oggi, alla fabbricazione del *Grana*.

Del *Grana* parla anche il Boccaccio nel 1348, come riferisce Pantaleone da Confidenza nel 1478,

Nel XVI secolo la zona del Lodigiano deteneva il primato di produzione di tutto il comprensorio del formaggio *Grana* e, successivamente, la sua fabbricazione si è estesa all'Emilia e in tutto il nord Italia, fino a rappresentare, al giorno d'oggi, con circa un milione di quintali annui ciascuno, per il *Parmigiano* e per il *Grana Padano*, oltre il 39% della intera produzione casearia italiana.

La sua produzione è ancora legata in Italia a tecniche ed attrezzature molto tradizionali, con sporadici tentativi di meccanizzazione che hanno coinvolto soprattutto la parte relativa al trattamento del latte (refrigerazione, bactofugazione, termizzazione, torri di affioramento).

All'estero sono in corso estesi tentativi di imitazione di questo formaggio, che sfruttano tecniche d'avanguardia, che vanno dalla microfiltrazione debatterizzante per il latte, all'ultrafiltrazione.

Il *Grana* è un formaggio semigrasso, a pasta dura, cotta e a lenta maturazione: è uno dei formaggi a più lunga stagionatura (fino ad oltre 2 anni), prodotto da latte vaccino riposato e parzialmente scremato per affioramento.

Si presenta in forme cilindriche, con scalzo leggermente convesso e facce piane; le dimensioni medie delle forme oscillano tra i 35 e i 40 cm di diametro, con una altezza variabile tra i 18 ed i 25 cm ed un peso medio di circa 30- 36 kg. Le forme presentano superficie liscia, con crosta dura e resistente, di color ambra chiaro. La pasta, tipicamente granulosa, è di color paglierino e presenta frattura a scaglie; l'occhiatura normalmente assente o appena visibile, è costituita, quando presente, da cavità di piccolissime dimensioni sparsi nella pasta.

Il sapore è fresco e delicato, stuzzicante, ma mai piccante; l'aroma caratteristico è pungente, dolce e gradevole.

La fabbricazione del *Grana Padano* è regolata da un Consorzio, che ne disciplina la produzione secondo regole molto rigide e ne assicura poi la genuinità applicando sulle forme un marchio riconosciuto in tutto il mondo.

L'altro Grana, il più famoso *Parmigiano-Reggiano*, è anch'esso un formaggio DOP, la cui area di produzione comprende le province di Parma, Reggio Emilia, Modena, Bologna destra Reno e parte delle

province di Piacenza e Mantova, sulla riva destra del fiume Po. Il Consorzio di Tutela del Parmigiano Reggiano ha sede a Reggio Emilia.

Fino al 1983 il *Parmigiano Reggiano* si poteva produrre solamente dal primo aprile all'11.novembre, ma successivamente tali limiti temporali sono stati rimossi e si é consenta la produzione nell'arco di tutto l'anno.

Tra i due tipi di formaggi esistono differenze: il *Grana Padano* ha generalmente pasta più bianca e più granulosa, forme di circa 30-35kg, maturazione lievemente più rapida e gusto tipico, marcato; il *Parmigiano Reggiano* ha forme poco più grandi (in media 34kg), pasta più paglierina e liscia, con granulatura meno evidente, gusto molto morbido e maturazione più lenta.

LA TECNOLOGIA

La produzione del *Grana* deve rispettare la sequenza appresso indicata:

Preparazione del latte

Il latte intero viene fatto riposare per 8-15 ore in vasche poco profonde, per facilitare l'affioramento della crema, che viene asportata fino ad ottenere un latte con il 2,2-2,5% di grasso (all'origine si ha circa il 4%).

Le caratteristiche del prodotto cambiano a seconda della stagione poiché il bestiame si alimenta con erba fresca in primavera ed in estate con foraggio secco negli altri periodi dell'anno.

A seconda del periodo di produzione, si parla di:

- Parmigiano di testa (da marzo a maggio)
- Parmigiano tardivo (da maggio in poi).

Sieroinnesto

Il latte viene travasato in caldaie a forma di campana rovesciata con un doppiofondo di rame nella cui intercapedine scorre il vapore. Si scalda così il latte fino a 20-22 gradi e si aggiunge il sieroinnesto, una coltura naturale di bacilli termofili (*Lactobacillus bulgaricus*, *helveticus*, *casei* e *fermenti*).

Questo innesto si ottiene dal siero del latte lasciato riposare al caldo per 15-30 ore.

Formazione e rottura della cagliata

Il latte viene scaldato a 32 gradi e si aggiunge il *caglio*. Dopo 10 minuti si forma la cagliata, che viene rotta con lo "*spino*", fino a ridurla in piccoli pezzi delle dimensioni di un chicco di frumento. La temperatura viene aumentata lentamente per favorire lo spurgo dal siero e quando si raggiungono i 44 gradi si interrompe l'agitazione.

Cottura della cagliata

Si riprende l'agitazione e si porta la cagliata a 55 gradi (il Parmigiano è un formaggio a "pasta cotta"), dopodiché si interrompe l'agitazione e si lasciano cadere sul fondo i granuli di cagliata. Si controlla il pH, che deve essere di 5.9-6, e si preleva il siero che servirà per l'innesto del giorno dopo.

Messa in forma

I granuli vengono fatti riposare per mezz'ora, poi vengono estratti dalla caldaia con l'ausilio di robuste tele e messe in *fascere* di legno. Dopo ripetuti rivoltamenti e cambi di tele, vengono poste in *fascere* metalliche, che daranno la forma finale. Dopo almeno 10 ore vengono marchiate.

Salagionatura

Dopo tre giorni, terminato lo spurgo, le forme possono essere estratte dalle *fascere* e poste a bagno in una salamoia a 18-20 gradi per poco meno di un mese.

Le forme galleggiano nella salamoia e, quindi, non vi sono immerse completamente. Pertanto devono essere rigirate almeno 2 volte al giorno per consentire la diffusione uniforme del sale.

Maturazione

Le forme vengono sistemate sulle "*scalere*" alla temperatura di 15-18 gradi e umidità dell'85% per i primi 7 mesi, e a 12-16 gradi e il 90% di umidità per il periodo residuo.

Dopo circa un anno vengono battute per controllare la presenza di eventuali cavità interne e quindi messe in vendita dopo 18-24 mesi e, a volte, anche dopo 36 mesi.

Per il *Grana Padano*, il tempo di maturazione è più breve, potendo essere posto in vendita già dopo 15 mesi.

Il *Tosone* è il parmigiano reggiano di un giorno: ovviamente non si può chiamare parmigiano, si trova solo nelle zone di produzione ed è un formaggio fresco piuttosto insapore, che di solito viene mangiato impanato e fritto.

ASPETTI IGIENICO-SANITARI

Dal punto di vista igienico sanitario, il Grana, così come qualsiasi altro formaggio, può essere soggetto a tre diversi tipi di inquinamento:

- l'inquinamento particellare, da materiali estranei;
- l'inquinamento da sostanze chimiche
- l'inquinamento da contaminanti biologici.

Sono considerati materiali estranei inquinanti le particelle di derivazione animale, di derivazione vegetale, di natura minerale e frammenti di varia natura.

L'inquinamento particellare da materiali estranei, può essere evidenziato con uno specifico test, detto "*filth test*" o "saggio sudiciometrico": il formaggio, diluito e passato per alcuni minuti nello stomacher, viene filtrato, quindi successivamente sottoposto a osservazione microscopica. In base al numero e al tipo di particelle presenti, è possibile valutare la qualità igienica del prodotto.

L'inquinamento chimico può essere dovuto a:

1. residui di pesticidi (fitofarmaci, insetticidi, erbicidi) o loro metaboliti, presenti all'origine nel formaggio degli animali lattiferi;
2. residui di presidi di uso veterinario (antibiotici, sulfamidici, anabolizzanti)
3. sostanze chimiche varie (metalli pesanti, diossina, PCB)

La presenza di questi contaminanti, a basse dosi, non rappresenta un rischio immediato per la salute e non dà luogo a forme patologiche acute, ma rappresenta un rischio a lungo termine (forme patologiche croniche).

L'inquinamento biologico:

Tale tipo di inquinamento può assumere una duplice configurazione

a) contaminazione macrobiologica, che in genere è la conseguenza di infestazioni dovute a diversi animali, tra cui gli artropodi, in particolare gli acari che si sviluppano sulle croste dei formaggi a pasta semidura e dura. Per alcuni autori la loro presenza potrebbe essere ritenuta utile mentre altri la ritengono ininfluenza. In ogni caso i danni ad essi riconducibili sono modesti, purché l'azione di erosione resti limitata alla crosta. Gli artropodi vengono di solito eliminati nel corso della tolettatura della crosta. Un caso particolare è rappresentato dalla mosca del formaggio (*piophilus casei*) che deposita le sue uova nella pasta

o sulla crosta quando questa è ancora molle. Successivamente nascono le larve che colonizzano il formaggio, digerendo la pasta e modificandone la struttura.

b) contaminazione microbiologica, dovuta alla presenza di microrganismi dannosi. Questi possono essere presenti nelle materie prime, oppure possono contaminare il formaggio durante la lavorazione, o nella fase della stagionatura o in quella della conservazione del prodotto.

Tali microrganismi, possono provocare due tipi di problemi: possono modificare le caratteristiche dei formaggi, causando alterazioni della pasta e della crosta oppure possono rappresentare un vero e proprio rischio per il consumatore, quando si tratti di potenziali patogeni.

Va ricordato, però, che esistono molteplici fattori, sia fisici che chimici, per esempio l'acidità (pH), il potenziale di ossido- riduzione (Eh) e l'acqua libera (Aw), che da soli o in associazione tendono ad impedire la presenza o quantomeno lo sviluppo di potenziali patogeni.

Un ulteriore fattore di sicurezza, dal punto di vista igienico-sanitario è dato dalla presenza, nella maggior parte dei formaggi, di una microflora naturale o aggiunta (*starter*), che funge da antagonista nei confronti di eventuali microrganismi patogeni.

In alcuni casi si può procedere alla aggiunta di sostanze ad azione batteriostatica o battericida.

LE ALTERAZIONI

I difetti dei formaggi possono essere causati da vari fattori ed in particolare da:

- scarsa igiene, sia nei luoghi di produzione del latte, sia nelle strutture di trasformazione e maturazione;
- alimentazione errata degli animali;
- utilizzo di latte derivato da soggetti malati (per esempio latte *mastitico*);
- utilizzo di latte inquinato o inquinamento dello stesso, nel corso della lavorazione;
- tecniche di lavorazione errate;
- utilizzo di locali non idonei alla lavorazione del latte, alla maturazione e conservazione dei formaggi.

Le alterazioni più frequenti sono: il gonfiore, l'ammuffimento, la comparsa di sapori amari o acidi, la gessosità della pasta.

1. IL GONFIORE.

E' questo il difetto più grave che si può riscontrare in un caseificio. Esso si presenta come un arrotondamento della forma dovuto alla produzione di gas, quali l'anidride carbonica e l'idrogeno, generati da microbi gasogeni. Il gonfiore può essere *precoce* o *tardivo*, a seconda che si manifesti nei primi giorni dopo la fabbricazione o nel corso della stagionatura.

Il gonfiore precoce, si presenta entro pochi giorni dalla lavorazione ed interessa sia le forme, che dall'esterno appaiono rigonfiate, sia la pasta, che diventa spugnosa per la presenza molto fitta di piccole "occhiature" e non permette lo spurgo, acquisendo, nel contempo, sapori ed odori sgradevoli. Può rinvenirsi sia nei formaggi molli che in quelli duri o semiduri ed è originato dalla elevata presenza, nel latte, di batteri del gruppo *Escherichia coli* e *Aerobacter aerogenes*, che, quando la mungitura viene effettuata in condizioni igieniche non idonee, attaccano il lattosio, producendo acido lattico, ma soprattutto quantità rilevanti di anidride carbonica o idrogeno. Può dipendere anche da una troppo prolungata conservazione del latte, prima della lavorazione.

Nella produzione a latte crudo, la prevenzione più ovvia è costituita dalla cura attenta dell'igiene del latte e dei contenitori, oltre che dall'avvio della caseificazione entro due ore dalla mungitura. Nella produzione industriale l'alterazione si controlla termizzando il latte per poi reinnestarlo con fermenti selezionati. Nei casi in cui il gonfiore precoce si manifesti con frequenza, si può attuare la pastorizzazione del latte, che elimina o riduce drasticamente il problema. I Coli, infatti, non resistono ad un innalzamento della temperatura a 65 gradi centigradi, protratta per 30 minuti. Va tenuto presente, comunque, che l'utilizzo di colture pure di fermenti lattici contribuisce a creare un ambiente sfavorevole allo sviluppo dei Coli presenti nel formaggio. Al contrario, la presenza di antibiotici nel latte favorisce indirettamente lo sviluppo dei Coli, che non possono essere contrastati dai batteri lattici, sensibili a queste sostanze.

Se non presentano gravi alterazioni organolettiche, i formaggi interessati da gonfiore precoce possono essere utilizzati per la produzione di grattugiato o porzionato, in caso contrario devono essere esclusi dall'alimentazione umana.

Il gonfiore tardivo, a differenza di quello precoce, è caratteristico dei formaggi cotti ed a stagionatura prolungata e compare dopo che il lattosio è stato trasformato in acido lattico, manifestandosi, pertanto, anche dopo un paio mesi di stagionatura. Anche in questo caso il difetto consiste in una disorganizzazione della pasta che, talora assume una consistenza spugnosa e talora, invece, si manifesta con occhiature, fessurazioni, sfogliature e aperture a carattere cavernoso che interessano in particolare, la parte centrale delle forme, che si gonfiano a pallone e in alcuni casi, addirittura si spaccano del tutto. Il difetto, se marcato, può dare luogo a sapori rancidi ed odori sgradevoli, dovuti alla produzione di acido butirrico ed aldeide acetica, che dequalificano irrimediabilmente la qualità ed il valore commerciale del prodotto, specie se si tratta di formaggi a pasta dura o semi-dura, quali il Parmigiano Reggiano, il Grana Padano, il Provolone, l'Emmental, l'Asiago, il Montasio e la Fontina.

Gli agenti di questa alterazione sono batteri del genere *Clostridium tyrobutyricum*, che attaccano i lattati, dando origine ad acido butirrico, anidride carbonica e idrogeno. Tali batteri giungono al latte dall'ambiente dove siano presenti alimenti male conservati (insilati o fieni fermentati e mal riusciti) ed occorre evitare, pertanto, qualsiasi presenza di questi prodotti in azienda.

I clostridi che interessano le produzioni casearie sono ascrivibili al gruppo dei butirrici, ulteriormente suddivisibile in due sottogruppi fisiologici:

- i saccarolitici (*Clostridium tyrobutyricum* e *Cl. butyricum*), con spiccata capacità fermentativa degli zuccheri e degli acidi organici;

- i proteolitici (*Cl. sporogenes* e *Cl. bifermentans*) che provocano la liberazione di aminoacidi, sui quali esercitano azioni di deaminazione, decarbossilazione, ossidazione e riduzione.

La comparsa del gonfiore tardivo dipende dal numero di spore, in particolare di *Cl. tyrobutyricum*, inizialmente presenti nel latte. La soglia critica di questo valore si attesta ad un livello superiore a 200 spore/l. La germinazione delle spore e, conseguentemente, l'insorgenza del difetto è favorita da acidificazioni lente, anche se il loro numero iniziale risulta inferiore alla soglia critica.

Il *Cl. Sporogenes* compromette l'impiego del prodotto in quanto provoca nella pasta la formazione di zone biancastre centrali ed estese, associate ad odore nauseabondo

MAGGIORI RESPONSABILI DELLE FERMENTAZIONI GASOGENE

Gonfiore precoce circa 1 giorno	Coliformi	98% dei casi
	Lieviti	
Gonfiore tardivo 3-4-5 mesi	Clostridi	produzione elevata di gas (H ₂ infiammabile), produzione di Clostridi odori sgradevoli, crescita lenta ma distruttiva e in assenza di ossigeno
	Propionici	vengono aggiunti per la produzione ad esempio dell'Emmenthal
	Batteri lattici eterofermentanti	producono ac. lattico + gas. Vengono utilizzati spesso per areare il formaggio, a volte creano però microcchiature; conferiscono al formaggio un sapore piccante

2. L' AMMUFFIMENTO

Si possono prevenire ed eliminare le muffe con un migliore spurgo della cagliata, una giusta salatura (il sale ha una azione inibente) ed, infine, con l'uso di *sorbato di potassio* come antimuffa.

Alcune muffe sono dotate di potere proteolitico e possono causare il rammollimento del formaggio, ma nei formaggi a lunga stagionatura questo difetto non è molto frequente.

3. I SAPORI SGRADREVOLI

Il sapore amaro della pasta è dato dalla degradazione della caseina causata da lieviti e micrococchi. Tali fermentazioni anomale sono spesso causate da uno spurgo incompleto della cagliata.

Gli altri sapori sgradevoli possono pervenire al latte dall'alimentazione degli animali, in particolare dall'ingestione di *brassicacee* (colza, rape, ravizzone ecc.), trigonella, iridacee, tarassaco in fiore. Sono pertanto da evitare pascoli ricchi di queste essenze per gli animali in lattazione.

4. IL COLORE ANOMALO DELLA CROSTA

Il colore rosso é causato dall'impiego di sale marino che contiene dei batteri (cocchi) responsabili di questa colorazione. Si deve cambiare il tipo di sale impiegato, lavare accuratamente le tavole su cui si maturano le forme, con acqua e candeggina (10-15 cc/10l) e asciugarle al sole.

Nelle prime fasi di stagionatura possono comparire, colorazioni (azzurro, verde e giallo metallizzato). Le cause sono da ricercarsi nella non idoneità igienica dell'acqua utilizzata per il lavaggio delle attrezzature che può contenere batteri del genere *pseudomonas*, responsabili di queste colorazioni.

5. LE SPACCATURE

Si possono verificare a causa di spremitura eccessiva della pasta, eccesso di caglio, esposizione delle forme a correnti d'aria, stagionatura in locali con temperatura elevata e bassa umidità relativa. Si ricorda che le temperature ottimali degli ambienti per la stagionatura sono comprese tra gli 8 e i 10 °C con umidità relativa dell'80-85%.

6. LO STRACCHINAGGIO

Avviene quando, durante la maturazione, la crosta si rompe e fuoriesce la pasta interna, molle e ricca di siero. Può essere dovuta all'uso di caglio con troppa pepsina e/o alla rottura della cagliata in parti troppo grosse. Lo spurgo insufficiente del siero continua la fermentazione provocando una proteolisi accentuata. Si verifica con temperature troppo basse nei locali di stagionatura (minori di 7°C). Per prevenire questo difetto e favorire lo spurgo del siero può essere effettuata la "stufatura" delle forme, che consiste nel mantenerle, dopo la pressatura, a temperature comprese tra 25 e 30 °C per 2 o 3 ore, rivoltandole più volte.

7. LA GESSOSITA'

Questa, così come anche i *distacchi di pasta*, è causata dalla eccessiva acidità della cagliata per un errato apporto di fermenti o per uno sviluppo troppo elevato dei batteri acidificanti. La pasta assume un aspetto gessoso, friabile, di colore troppo chiaro e di sapore acido.

8. L'INVASIONE DI PARASSITI

Questo ulteriore difetto dei formaggi ovini, che non deve essere sottovalutato, è dato da parassiti quali gli acari e le mosche (*Piophilha casei*). I primi rendono il formaggio polverulento, mentre le mosche depongono le uova nella pasta, da cui si originano i cosiddetti "vermi" del formaggio. In questi casi la prevenzione passa attraverso l'igiene degli ambienti e periodiche disinfestazioni nei locali di stagionatura.

Un controllo degli acari si può effettuare anche con i trattamenti in crosta con olio, olio e cenere o olio e conserva di pomodoro.

RISCHIO CLOSTRIDI

Dai dati elaborati dalla "Associazione Provinciale degli Allevatori di Parma" sta emergendo una realtà decisamente preoccupante. Dalle analisi effettuate sui campioni di latte per il pagamento in base alla qualità, emerge infatti che la positività ai *clostridi* ha avuto il seguente incremento : 9,0% nell'anno 1991, 18,0% nel 1998, 19,50% nel 1999, 22,54% nel 2000, 23,54% nel 2001, 27,81% nel 2002 ed addirittura il 30,25% nel 2003.

Si calcola che il 35 – 40% dei difetti riscontrabili nel formaggio *Parmigiano Reggiano* sia dovuto ai clostridi anaerobi (presenti maggiormente nel formaggio prodotto in primavera ed in estate), per un danno presumibile, nell'ambito del Comprensorio, tra i 15 ed i 20 milioni di Euro.

I clostridi che interessano le produzioni casearie sono ascrivibili al gruppo dei butirrici, ulteriormente suddivisibile in due sottogruppi fisiologici: i saccarolitici (*Clostridium tyrobutyricum* e *Cl. butyricum*) con spiccata capacità fermentativa degli zuccheri e degli acidi organici e i proteolitici (*Cl. sporogenes*) che provocano la liberazione di aminoacidi, sui quali esercitano azioni di deaminazione, decarbossilazione, ossidazione e riduzione.

1. **Clostridium butyricum**: si nutre di zuccheri (preferibilmente lattosio), è strettamente anaerobio e produce anidride carbonica, idrogeno, acido butirrico e acido acetico; agisce solo nei primi giorni di vita del formaggio e soprattutto nel caso in cui l'acidificazione lattica della pasta dovuta al sieroinnesto sia debole.

2. **Clostridium tyrobutyricum**: si nutre di zuccheri e dei sali dell'acido lattico, è anch'esso strettamente anaerobio e produce le stesse sostanze del butyricum. Pur essendo meno presente nel latte rispetto agli altri clostridi, è quello che causa maggiori danni perché può moltiplicarsi facilmente nel corso della stagionatura.

3. **Clostridium sporogenes**: si nutre di proteine, strettamente anaerobio, produce anidride carbonica, sostanze azotate maleodoranti ed acidi organici. E' particolarmente subdolo dato che si può manifestare anche dopo i 12 mesi di stagionatura, non si individua con la battitura e rende il formaggio non

commestibile. Per fortuna pare che sia in netto calo, anche grazie alle misure adottate dal consorzio del formaggio Parmigiano-Reggiano.

La provenienza dei *Clostridi* anaerobi è il terreno ed il contenuto varia in base al tipo di suolo ed al tipo di prato: ad esempio si è constatato che i terreni argillosi ed impermeabili costituiscono un substrato anaerobico favorevole; nei terreni dei prati alterni di erba medica sono mediamente presenti con 50.000 spore/grammo, mentre nei prati permanenti aumentano ad 80.000 spore/grammo. Bisogna inoltre fare attenzione agli eccessivi spandimenti di letame e colaticcio che possono causare un accumulo di spore.

Se non si dispone dell'impianto di aeroessiccazione, occorre fare molta attenzione all'umidità del foraggio alla raccolta, perché il fieno ammuffito o cotto è ricco di contaminanti.

Ancora maggiore attenzione occorre nelle stalle che hanno adottato come metodo di alimentazione il piatto unico, in quanto tutta la polvere e la terra presenti nel fieno finiscono nella miscelata e la presenza contemporanea di acqua e di amidi e zuccheri dei concentrati consente lo sviluppo delle spore dei clostridi.

Tenendo presente che le spore ingerite dalle bovine si moltiplicano nell'intestino per 10-50 volte, è importante pulire la mangiatoia due volte al giorno, pulire periodicamente gli abbeveratoi e le tramogge degli autoalimentatori, svuotare spesso i silos dei concentrati, pulirli e sanificarli con gli appositi fumogeni almeno due volte all'anno, controllare l'umidità e la qualità degli alimenti acquistati.

Risulta importante anche il ricambio dell'aria, non solo per il benessere delle bovine ma anche per allontanare le spore (utili i ventilatori sia in stalla che in sala mungitura).

E' necessario porre attenzione all'idoneità della paglia ed alla quantità utilizzata Per evitare che le bovine si sporchino le mammelle ne occorrono 2 Kg per capo al giorno nella stabulazione fissa o libera con cuccette ed almeno 4 Kg nella stabulazione libera con lettiera permanente o pendente e va aggiunta tutti i giorni.

Con la stabulazione a lettiera permanente occorrono 5 mq per capo nell'area di riposo e 5 mq per capo per l'area di esercizio, che va pulita due volte al giorno. E' comunque molto importante, qualunque sia il tipo di stabulazione, non alloggiare un numero di vacche superiore a quello per cui è stata dimensionata la stalla.

Nel caso della stabulazione fissa, durante la mungitura occorre evitare di fare polvere somministrando fieno, smuovendo la paglia o spazzando. E' importante, inoltre, avere una buona illuminazione ed effettuare un'accurata delle mammelle,

Nel caso della stabulazione libera, bisogna tenere presente che la sala di mungitura deve essere confortevole sia per il mungitore che per gli animali. Anche in questo caso è importante l'illuminazione. La pulizia dei locali e della sala di attesa va fatta almeno due volte al giorno e, se le bovine defecano durante la mungitura, occorre pulire subito.

Se si tiene conto che basta un grammo di feci per inquinare un quintale di latte, si comprende quanto sia importante concentrare il lavoro di pulizia sui capezzoli con eventuale *predipping* a base di acido lattico, lavando e asciugando poi con una salvietta individuale, eliminando i primi tre getti di latte, e dopo la mungitura, effettuando il *dipping* disinfettante dello sfintere del capezzolo.

E' stato accertato che una preparazione accurata della mammella, alla luce delle recenti prove con il *lactocorder* (che misura e registra il flusso di latte), risulta utile anche per ottenere una miglior mungitura.

Nel caseificio bisogna operare in modo che l'affioramento della crema sia ottimale e, per pulire il latte con una debatterizzazione naturale, bisogna utilizzare un sieroinnesto con circa 29 °SH ed un elevato numero di batteri lattici vivi e vitali, trattamento, questo, che crea rapidamente condizioni sfavorevoli allo sviluppo di germi anticaseari.

Si deve fare inoltre molta attenzione alla temperatura di cottura, che deve aggirarsi sui 56 °C, ed alla curva di abbassamento della temperatura del siero (utili le fermentiere termostate con curve termiche programmabili). Occorre cercare di ottenere una cagliata compatta, omogenea ed uniformemente disidratata in grado di assorbire il sale.

CAPITOLO TERZO

Scopo della ricerca

Poiché i formaggi sono spesso soggetti a difetti ed alterazioni che li trasformano in maniera più o meno profonda, arrivando nei casi più gravi ad annullarne quasi completamente il valore commerciale e le caratteristiche nutrizionali ovvero le specificità organolettiche, sono stati esaminati e descritti i difetti di alterazioni più frequenti e ne sono state passate in rassegna le cause.

Ad analitica disamina sono stati sottoposti, in particolare, i possibili interventi preventivi ed a tal fine sono state prese in considerazione, innanzi tutto, le prescrizioni di natura igienico-sanitaria, quali la costante verifica dello stato di salute degli animali da latte, la cura della salubrità del loro ambiente di vita, la correttezza della loro alimentazione, la nettezza degli ambienti di lavoro, la pulizia e le caratteristiche costruttive degli strumenti utilizzati, l'igiene personale e la specifica professionalità degli operatori.

L'esame degli interventi tesi alla salvaguardia dell'alimento è proseguito con la descrizione di tipiche fasi della lavorazione, quali i processi produttivi e la salatura, la stagionatura, e sono state evidenziate, altresì, le opportune metodiche correttive suggerite dalla scienza e dalla esperienza.,

Uno specifico approfondimento è stato riservato al difetto noto come "*gonfiore tardivo*" causato dalla presenza di Clostridi, nei formaggi a pasta cotta dura, quali il Grana (*Grana Padano e Parmigiano-Reggiano*)

Alla fase analiticamente descrittiva delle molteplici forme di alterazione dei formaggi, ha fatto seguito la parte sperimentale, che ha riguardato l'isolamento e l'identificazione di Clostridi, utilizzando metodiche microbiologiche e bio-molecolari.

CAPITOLO QUARTO

Parte sperimentale

Materiali e Metodi

Isolamento dei Clostridi

L'analisi microbiologica prevede l'utilizzo di terreni di coltura, idonei ad enumerare ed identificare i clostridi.

I terreni di coltura utilizzati sono stati:

RCM (Reinforced Clostridial Medium) (OXOID) brodo

RCM + 1.5% agar Bacteriological (OXOID)

RCM + 2% Na-Lattato (sciroppo 50%; Merk).

RCM + 2% Na-Lattato 1.5% agar

RCM + 2% Na-Lattato soft + 0.7% agar

Soluzione fisiologica peptonata

Na-Citrato (2%)

Agar/acqua (2%)

- Campionamento:

Da aziende e stabilimenti inseriti nella filiera di dei formaggi Grana Padano e Parmigiano Reggiano complessivamente sono stati esaminati 72 campioni di cui:

-n° 40 di latte

-n° 30 di formaggio

-n° 1 di terreno

-n° 1 di insilato di mais

Il campionamento e' stato effettuato nella seguente maniera:

- prelevare in assoluta sterilità almeno 10 grammi di campione e porli in un sacchetto sterile "Presto Chiuso"
- aggiungere nel predetto contenitore 90 ml di Na-Citrato (2%) sterile
- omogeneizzare il tutto ("tal quale") in stomacher per 2-3 minuti
- eseguire successive diluizioni decimali (10^{-1} ; 10^{-4}) ed eventualmente diluizione ancora più spinte, se si hanno motivi di ritenere l'alimento particolarmente inquinato

- prelevare 1ml dall'ultima diluizione ed in seminarli nella provetta sterile previamente contrassegnata con l'indicazione della stessa diluizione del prelievo e contenente RCM lattato broth
- ripetere a ritroso,tale operazione dalla diluizione più alta fino ad arrivare al "tal quale"
- prelevare 1ml dall'ultima diluizione ed in seminarli in una "Petri" sterile previamente contrassegnata con l'indicazione della stessa diluizione del prelievo e contenente RCM lattato agar
- ripetere a ritroso,tale operazione dalla diluizione più alta fino ad arrivare al "tal quale"
- prelevare una goccia dall'ultima diluizione ed seminarla su una "Petri" sterile previamente contrassegnata con l'indicazione della stessa diluizione del prelievo e contenente RCM lattato agar
- ripetere a ritroso,tale operazione dalla diluizione più alta fino ad arrivare al "tal quale"

La soluzione "tal quale" e' stata sottoposta al trattamento di pastorizzazione per 10 minuti a 90°C. Questa operazione è finalizzata al mantenimento delle sole spore.

- eseguire successive diluizioni decimali (10^{-1} ; 10^{-4}) ed eventualmente diluizione ancora più spinte, se si hanno motivi di ritenere l'alimento particolarmente inquinato
- prelevare 1ml dall'ultima diluizione ed in seminarli nella provetta sterile previamente contrassegnata con l'indicazione della stessa diluizione del prelievo e contenente RCM lattato broth
- ripetere a ritroso,tale operazione dalla diluizione più alta fino ad arrivare al "tal quale"
- prelevare 1ml dall'ultima diluizione ed in seminarli in una "Petri" sterile previamente contrassegnata con l'indicazione della stessa diluizione del prelievo e contenente RCM lattato agar
- ripetere a ritroso,tale operazione dalla diluizione più alta fino ad arrivare al "tal quale"
- prelevare una goccia dall'ultima diluizione ed seminarla su una "Petri" sterile previamente contrassegnata con l'indicazione della stessa diluizione del prelievo e contenente RCM lattato agar
- ripetere a ritroso,tale operazione dalla diluizione più alta fino ad arrivare al "tal quale"

Le provette sono state quindi incubate in condizioni di stretta anaerobiosi in termostato a 37°C per 24- 48h

Le piastre sono state quindi incubate in condizioni di stretta anaerobiosi in termostato a 37°C per alcuni giorni.

Quando sulle piastre si sono evidenziate delle colonie, queste sono state isolate con uno stuzzicadenti sterile mediante almeno tre successivi passaggi in piastra.

A questo punto le singole colonie sono state fatte crescere in brodo (RCM lattato + glicerolo), centrifugate e congelate.

2 – MPN (Most Probable Number)

1 ml di ciascuna diluizione derivante dal campione pastorizzato e' stato aggiunto a 9 ml di RCM-lattato soft, in provette di vetro, presi in triplo (a; b;c); ai tubi sono stati aggiunti 2 ml di soluzione di agar/acqua, questo solidificando forma un tappo che salta per la produzione di gas qualora siano presenti spore.

1 ml di ciascuna diluizione derivante dal campione non pastorizzato e' stato aggiunto a 9 ml di RCM-lattato soft, in provette di vetro, presi in triplo (a; b;c); ai tubi sono stati aggiunti 2 ml di soluzione di agar/acqua.

Questo, solidificando, forma un tappo che salta per la produzione di gas qualora siano presenti spore.

I tubi sono stati messi in termostato a 37°C per almeno 6-7 giorni.

Con questo sistema, e' stato possibile stimare la quantità di spore presenti.

Test della Catalasi

Molte cellule sintetizzano una varietà di enzimi antiossidanti, uno dei piu' importanti e' la Catalasi, che converte l' H_2O_2 in H_2O ed Ossigeno gassoso.

I Clostridi non hanno l'enzima Catalasi, quindi questo test è stato considerato un buon fattore discriminante durante l'isolamento.

Il test risulta molto semplice e viene fatto sulle colonie nella seguente maniera:

si dispone una goccia di H_2O_2 su un vetrino e vi si stempera la colonia, prelevata con uno stuzzicadenti sterile. Se viene sviluppato O_2 , (l'effetto è evidente), il test e' positivo, in caso contrario e' negativo.

Condizioni di anaerobiosi

Tutte le incubazioni, sia in piastra che in brodo, sono state fatte creando le condizioni di anaerobiosi utilizzando giare a chiusura ermetica, o alternativamente sacchetti, con piatti anaerocult (Merk) come indicatori.

Identificazione dei Clostridi

Estrazione di DNA

Dopo l'isolamento delle colonie, per procedere con l'identificazione tramite PCR, e' stata fatta un'estrazione di DNA mediante elevate temperature, secondo le seguenti modalita

- 5 o 10 µl di acqua mQ sterile in eppendorf da 0.2 ml
- coperta con 4 o 5 µl di olio (Tegiloxan) per evitare l'evaporazione
- trattata con elevate temperature (100 °C), per 10 minuti.

Identificazione

E' stata effettuata in diversi modi:

Nested-PCR specie-specifica per *Cl. tyrobutyricum*

Si procede all'amplificazione del DNA estratto mediante 2 PCR consecutive:

PCR 1

Sono stati utilizzati i primers:

CT1F (5' AACTGAAACAGCATGACT 3')

CT1R (5'GCTTGACCTTTATCTACA 3')

Miscela di reazione per 1 campione in un volume finale 50 µL:

DNA 50ng/ µL	5 µL
Buffer 10x	5 µL
MgCl ₂ 25 mM	5 µL
dNTP 2mM/each	5 µL
25µM primer CT1F	2 µL
25µM primer CT1R	2 µL
Taq 5U/µl	0.5 µL
H ₂ O	25.5 µL

Frammento 233 bp. Ciclo di amplificazione:

Temperatura (°C)	95	95	60	72	72	4
Tempo	1'	15''	15''	30''	8'	∞
Numero di cicli		30	30	30		

PCR 2

Sono stati utilizzati i primers:

CT2F (5' GTTCGGTTTATTTTACTCTG 3')

CT2R (5'CTTAGCTGTATCTAGTATAC 3')

Miscela di reazione per 1 campione in un volume finale di 25 µL:

DNA 50ng/ µL	2.5 µL
Buffer 10x	2.5 µL
MgCl ₂ 25 mM	2.5 µL
dNTP 2mM/each	2.5 µL
25µM primer CT2F	1 µL
25µM primer CT2R	1 µL
Taq 5U/µl	0.5 µL
H ₂ O	12.5 µL

Ciclo di amplificazione come PCR1

Frammento 173 bp. La verifica e' stata fatta su gel di agarosio 1.5%.

RAPD

Questa variante di PCR, che prevede l'utilizzo di un primer singolo, rappresenta un utile sistema di fingerprinting che, evidenziando un profilo caratteristico a livello di ceppo ha consentito uno screening preliminare di tutti gli isolati e quindi il raggruppamento di quelli dello stesso tipo.

Questa tecnica e' stata utilizzata per discriminare ceppi diversi della stessa specie.

In pratica si amplificano mediante PCR segmenti ignoti del genoma batterico utilizzando un singolo

nucleotide come innesco; poiche' quest'ultimo e' composto da un basso numero di nucleotidi e la reazione

avviene in condizioni di bassa astringenza (cioè a temperature di annealing molto basse), i primers possono legarsi anche a regioni del genoma bersaglio con sequenza non esattamente complementare alla propria. Ciò può avvenire su entrambe le eliche del DNA bersaglio, quindi, se due molecole vengono a trovarsi in orientamento opposto nelle due eliche, rendono possibile l'amplificazione della regione tra loro compresa. L'effetto finale sarà la generazione di una serie di frammenti di amplificazione di diversa ampiezza dovuti ai diversi punti di appaiamento dei primers.

PCR:

E' stato utilizzato il primer

RAPD2 (5' AGCAGCGTGG 3')

Miscela di reazione per 1 campione in un volume finale 25 µL:

DNA	5 µL
Buffer 10x	2.5 µL
MgCl ₂ 25 mM	3 µL
dNTP 2mM/each	0.5 µL
100µM primer RAPD2	0.25 µL
Taq 5U/µl	0.5 µL
H ₂ O	13.25 µL

Ciclo di amplificazione:

Temperatura (°C)	94	94	29	*	72	94	55	72	72	4
Tempo	5'	1'	1'	1'30"	2'	30"	30"	30"	5'	∞
Numero di volte		20	20		20	45	45	45		

* = rampa

Le PCR sono analizzate su gel di agarosio al 2% ed il marker di peso molecolare utilizzato è stato quello da 100 bp. Organismi identici devono presentare profili di amplificazione identici.

Risultati

Isolamento Clostridi

<u>Nome di origine</u>	<u>Provenienza</u>	<u>Isolato / identificato</u>
Faby CI 1	Insilato	Si / non ancora identificato
Faby CI 2	Terreno	Si / non ancora identificato
Faby CI 3	Formaggio	Si / non ancora identificato
Faby CI 4	Formaggio	Si / non ancora identificato
Faby CI 5	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 6	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 7	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 8	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 9	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 10	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 11	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 12	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 13	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 14	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 15	Latte	Si / Cl. tyrobutyricum
Faby CI 16	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 17	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 18	Latte	Si / Cl. tyrobutyricum
Faby CI 19	Latte	Si / Cl. tyrobutyricum
Faby CI 20	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 21	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 22	Latte	Si / non ancora identificato

Faby CI 23	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 24	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 25	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 26	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 27	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 28	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 29	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 30	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 31	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 32	Latte	Si / Cl. tyrobutyricum
Faby CI 33	Latte	Si / Cl. tyrobutyricum
Faby CI 34	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 35	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 36	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 37	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 38	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 39	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 40	Latte	Si / Cl. tyrobutyricum
Faby CI 41	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 42	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 43	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 44	Latte	Si / non ancora identificato
Faby CI 45	Parmigiano giovane	Si / non ancora identificato
Faby CI 46	Casera Valtellina III prelievo 11/25	Si / non ancora identificato
Faby CI 47	Casera Valtellina senza ceppi 1/11/04	Si / non ancora identificato
Faby CI 48	Casera Valtellina controllo 2/11/04	Si / non ancora identificato
Faby CI 49	Casera Valtellina 25/11/04	Si / non ancora identificato
Faby CI 50	Casera Valtellina 9/12/04	Si / non ancora identificato
Faby CI 51	Vasca	Si / non ancora identificato
Faby CI 52	Ricotta semistagionata	Si / Cl. tyrobutyricum
Faby CI 53	Emmental negal	Si / non ancora identificato
Faby CI 54	Vasca	Si/ Cl. sporogenes
Faby CI 55	Vasca	Si/ Cl. sporogenes
Faby CI 56	Vasca	Si/ Cl. sporogenes
Faby CI 57	Quemez	Si/ Cl. sporogenes
Faby CI 58	Camember L314	Si / non ancora identificato
Faby CI 59	Camember L 301	Si / non ancora identificato
Faby CI 60	Quemez format S	Si / non ancora identificato
Faby CI 61	Quemez format C	Si / non ancora identificato
Faby CI 62	Pecorino L 321	Si / non ancora identificato
Faby CI 63	Grattugiato x spagna L135/B	Si / non ancora identificato
Faby CI 64	Mix per essiccazione L136/B	Si/ Cl. sporogenes
Faby CI 65	Vasca 137	Si / non ancora identificato

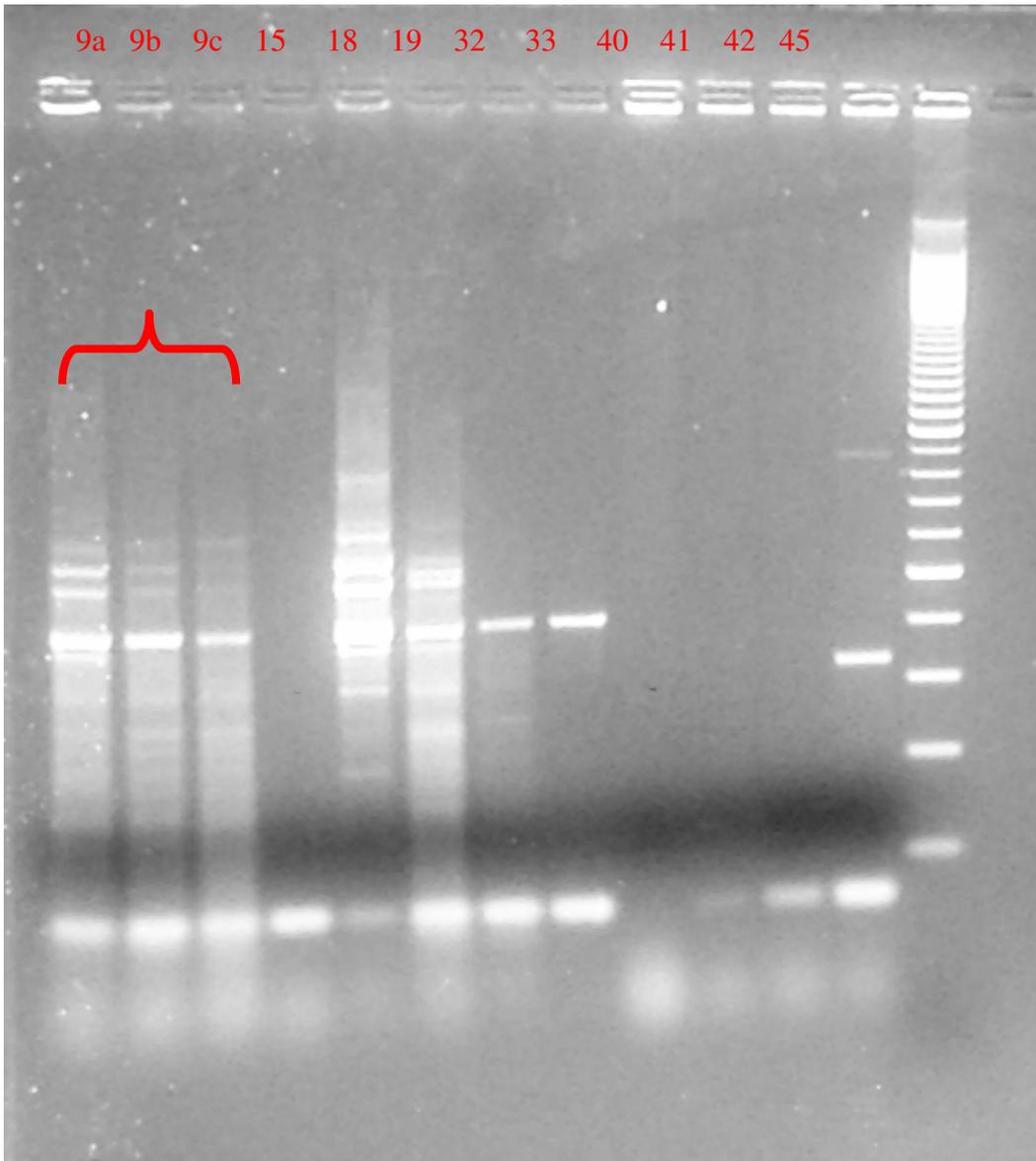
Faby CI 66	Burro	Si / non ancora identificato
Faby CI 67	Mix cresenza-mozzarella	Si / non ancora identificato
Faby CI 68	Biraghi grattugiato	Si/ Cl. butyricum
Faby CI 69	Biraghi croste	Si/ Cl. sporogenes
Faby CI 70	Pecorino	Si / non ancora identificato
Faby CI 71	Valgrana croste	Si/ Cl. tyrobutyricum
Faby CI 72	Valgrana briciola	Si / non ancora identificato

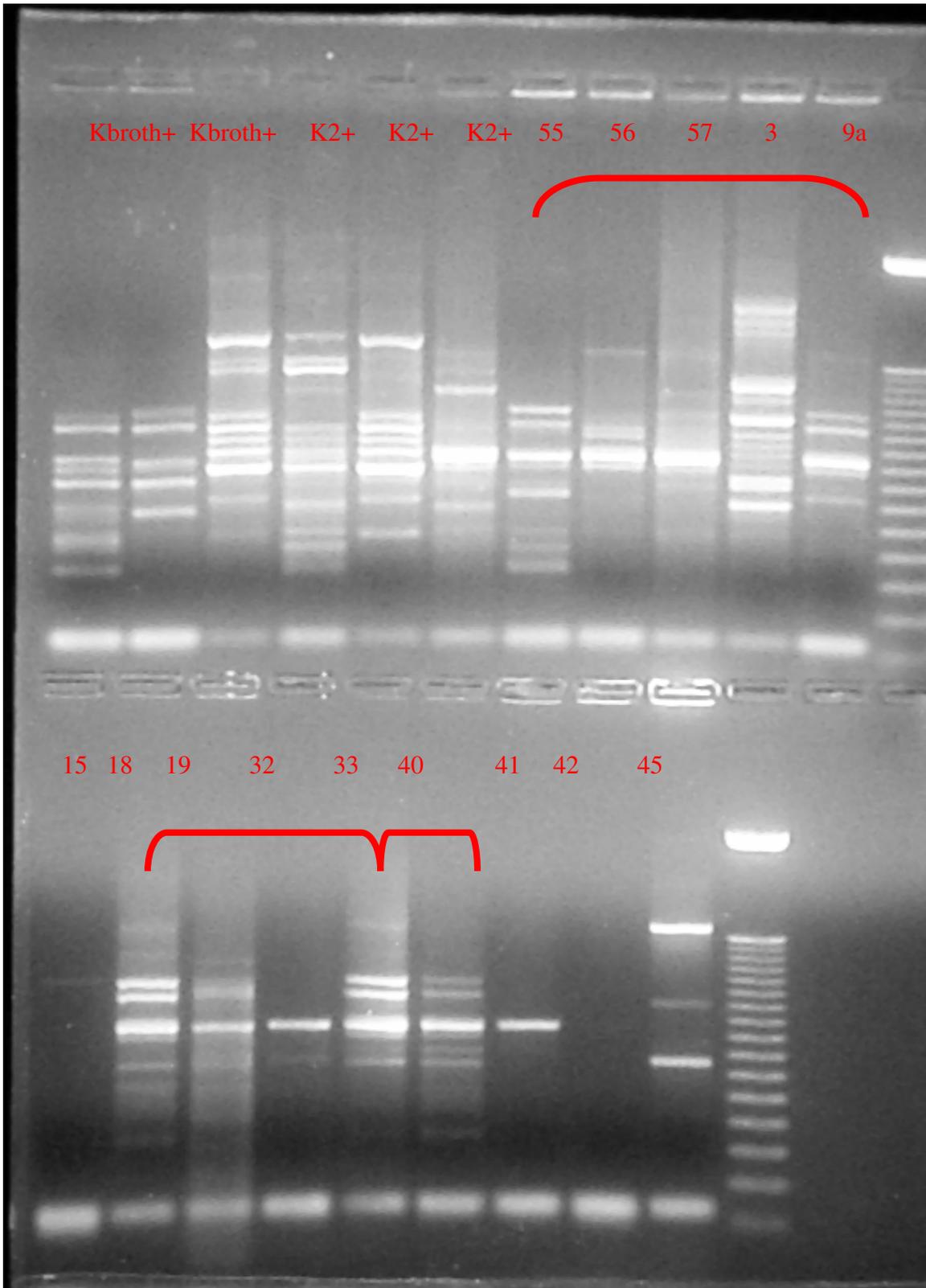
In tutto sono **15 CLOSTRIDI** aggiornato al 02/05/2005

Identificazione dei Clostridi

Per l'identificazione sono state fatte, prima di tutto, Nested-PCR specie-specifiche per il Clostridium tyrobutyricum (Herman L. H. F., De Blok J. H. G.E. et al.).

RAPD
Foto 18.02





NESTED
Fig. 21/02

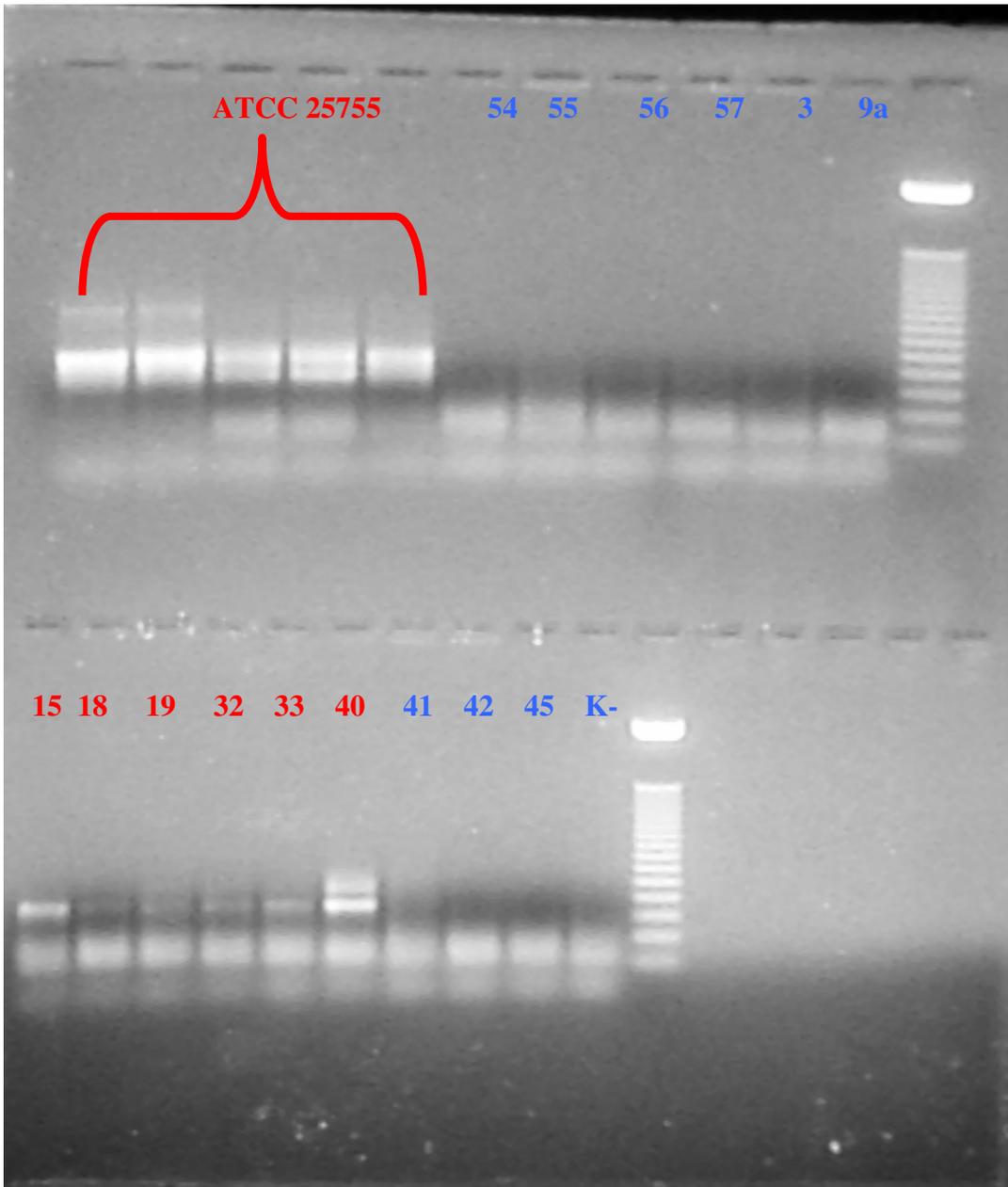
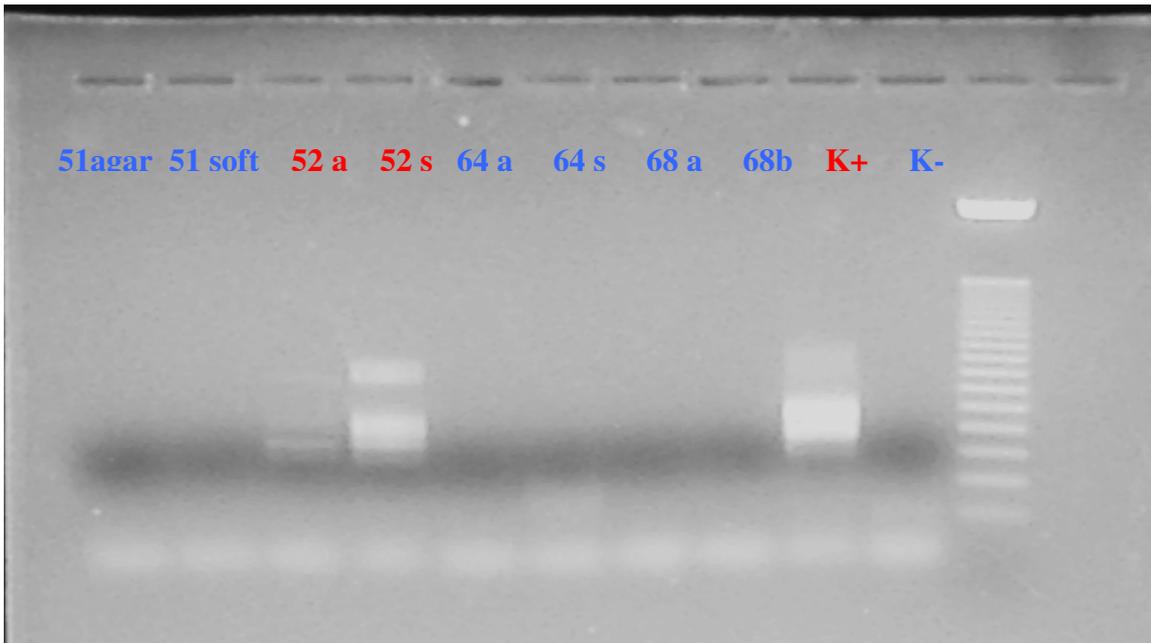


Foto 7/03



Rosso = positivo

Blu = negativi

Sequenziamento Clostridi

Legenda:

Clostridio Faby Cl 54

TGCTTCGGGAGTGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCAA
AGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAATATGAGAGAATCGCAT
GATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGG
TAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA
CATTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCG
CAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGT
AAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACGGTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCG
TAAAGGGTGCGTAGGCGGATGTTTAAGTGGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGG
GGCTGCATTCCAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGT
AGCGGTGAA

Lineage:

Results for Query Sequence: unknown, 577 unique oligos

- no rank root (20) (match sequences)
 - no rank cellular organisms (20)
 - superkingdom Bacteria (20)
 - phylum Firmicutes (20)
 - class Clostridia (20)
 - order Clostridiales (20)
 - family Clostridiaceae (19)
 - genus Clostridium (19)
 - unclassified_Clostridium (19)

X68172	S000016030	0.936	1419	Clostridium botulinum; Langeland NCTC10281;
	S000254627	0.972	1401	Clostridium sporogenes; YE52; AY442816
	S000260209	0.962	1408	Clostridium botulinum (T); DSM 1734; X73442
	S000260307	0.943	1415	Clostridium botulinum; NCTC7272; X68185
	S000260418	0.939	1413	Clostridium botulinum; NCTC7273; X68186
	S000260538	0.936	1347	Clostridium botulinum; KYTO-F; X73844
	S000260539	0.972	1414	Clostridium sporogenes (T); ATCC3584; X68189
	S000261896	0.960	1288	Clostridium sporogenes; AJ579907
	S000357670	0.945	1375	Clostridium sp. MD2; AY321656
	S000357671	0.955	1407	Clostridium sp. MD3; AY321657
	S000375671	0.988	1338	Clostridium sp. SA-4; AY695835
	S000414699	0.958	1357	Clostridium botulinum A (T); L37585
	S000414700	0.936	1331	Clostridium botulinum A; A2; L37586
	S000414701	0.955	1366	Clostridium botulinum B; L37587
	S000414702	0.887	1297	Clostridium botulinum B; BP2; L37588
	S000414703	0.955	1316	Clostridium botulinum B; B3; L37589
	S000414707	0.948	1362	Clostridium botulinum F; L37593
	S000428963	0.972	1368	Clostridium botulinum; LP1284; AF105402
	S000436465	0.889	1234	Clostridium novyi (T); M59100

Clostridio Faby Cl 55

AGAGCTTCTTCGGGAGTGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
CTCAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACATAAGAGAAT
CGCATGATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACATTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGGGTGATGAAGGTCTTCG
GATTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACGGTACCAGAGGAGGAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTAC
TGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGATGTTTAAAGTGGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAA
CCTGGGGGCTGCATTCCAAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCC
TAGTGTAGCGGTGA

Lineage:

Results for Query Sequence: unknown, 579 unique oligos

no rank root (20) (match sequences)

no rank cellular organisms (20)

superkingdom Bacteria (20)

phylum Firmicutes (20)

class Clostridia (20)

order Clostridiales (20)

family Clostridiaceae (19)

genus Clostridium (19)

unclassified_Clostridium (19)

S000016030 0.927 1419 Clostridium botulinum; Langeland NCTC10281;

X68172

S000254627 0.983 1401 Clostridium sporogenes; YE52; AY442816

S000260209 0.972 1408 Clostridium botulinum (T); DSM 1734; X73442

S000260307 0.936 1415 Clostridium botulinum; NCTC7272; X68185

S000260418 0.950 1413 Clostridium botulinum; NCTC7273; X68186

S000260538 0.929 1347 Clostridium botulinum; KYTO-F; X73844

S000260539 0.983 1414 Clostridium sporogenes (T); ATCC3584; X68189

S000261896 0.972 1288 Clostridium sporogenes; AJ579907

S000357670 0.955 1375 Clostridium sp. MD2; AY321656

S000357671 0.948 1407 Clostridium sp. MD3; AY321657

S000357672 0.886 1406 Clostridium sp. MD4; AY321658

S000375671 0.965 1338 Clostridium sp. SA-4; AY695835

S000414699 0.952 1357 Clostridium botulinum A (T); L37585

S000414700 0.929 1331 Clostridium botulinum A; A2; L37586

S000414701 0.948 1366 Clostridium botulinum B; L37587

S000414703 0.965 1316 Clostridium botulinum B; B3; L37589

S000414707 0.941 1362 Clostridium botulinum F; L37593

S000428963 0.983 1368 Clostridium botulinum; LP1284; AF105402

S000436478 0.888 1179 Clostridium sporogenes (T); M59115

Clostridio Faby Cl 56

AGTGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCAAAGTGGGGG
ATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACATAAGAGAATCGCATGATTTTCT
TATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAA
CGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAA
CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGG
GGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCCC
TGTTTTCTGGGACGATAATGACGGTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGG
TGCGTAGGCGGATGTTTAAGTGGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGGGCTGCA
TTCCAAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTG
A

Lineage:

Results for Query Sequence: unknown, 567 unique oligos

no rank root (20) (match sequences)

no rank cellular organisms (20)

superkingdom Bacteria (20)

phylum Firmicutes (20)

class Clostridia (20)

order Clostridiales (20)

family Clostridiaceae (19)

genus Clostridium (19)

unclassified_Clostridium (19)

[S000016030](#) 0.944 1419 Clostridium botulinum; Langeland NCTC10281;

X68172

[S000254627](#) 1.000 1401 Clostridium sporogenes; YE52; AY442816

[S000260209](#) 0.989 1408 Clostridium botulinum (T); DSM 1734; X73442

[S000260307](#) 0.952 1415 Clostridium botulinum; NCTC7272; X68185

[S000260418](#) 0.965 1413 Clostridium botulinum; NCTC7273; X68186

[S000260538](#) 0.945 1347 Clostridium botulinum; KYTO-F; X73844

[S000260539](#) 1.000 1414 Clostridium sporogenes (T); ATCC3584; X68189

[S000261896](#) 0.989 1288 Clostridium sporogenes; AJ579907

[S000357670](#) 0.972 1375 Clostridium sp. MD2; AY321656

[S000357671](#) 0.965 1407 Clostridium sp. MD3; AY321657

[S000357672](#) 0.901 1406 Clostridium sp. MD4; AY321658

[S000375671](#) 0.982 1338 Clostridium sp. SA-4; AY695835

[S000414699](#) 0.965 1357 Clostridium botulinum A (T); L37585

[S000414700](#) 0.942 1331 Clostridium botulinum A; A2; L37586

[S000414701](#) 0.965 1366 Clostridium botulinum B; L37587

[S000414703](#) 0.982 1316 Clostridium botulinum B; B3; L37589

[S000414707](#) 0.958 1362 Clostridium botulinum F; L37593

[S000428963](#) 1.000 1368 Clostridium botulinum; LP1284; AF105402

[S000436478](#) 0.903 1179 Clostridium sporogenes (T); M59115

Clostridio Faby Cl 57

TCTTCGTGTAGTGGATTAGCGGCCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCAA
AGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACATAAGAGAATCGCAT
GATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGG
TAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCA
CATTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCG
CAATGGGGGAAACCTGACGCAGCAACGCCGCGTGGGTGATGAAGGTCTTCGGATTGT
AAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACGGTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTAACT
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCG
TAAAGGGTGCGTAGGCGGATGTTTAAGTGGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGG
GGCTGCATTCCAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATAA

Lineage:

Results for Query Sequence: unknown, 586 unique oligos

no rank root (20) (match sequences)

no rank cellular organisms (20)

superkingdom Bacteria (20)

phylum Firmicutes (20)

class Clostridia (20)

order Clostridiales (20)

family Clostridiaceae (19)

genus Clostridium (19)

unclassified_Clostridium (19)

X68172	S000016030	0.925	1419	Clostridium botulinum; Langeland NCTC10281;
	S000254627	0.980	1401	Clostridium sporogenes; YE52; AY442816
	S000260209	0.969	1408	Clostridium botulinum (T); DSM 1734; X73442
	S000260307	0.933	1415	Clostridium botulinum; NCTC7272; X68185
	S000260418	0.945	1413	Clostridium botulinum; NCTC7273; X68186
	S000260538	0.927	1347	Clostridium botulinum; KYTO-F; X73844
	S000260539	0.980	1414	Clostridium sporogenes (T); ATCC3584; X68189
	S000261896	0.969	1288	Clostridium sporogenes; AJ579907
	S000357670	0.952	1375	Clostridium sp. MD2; AY321656
	S000357671	0.945	1407	Clostridium sp. MD3; AY321657
	S000357672	0.875	1406	Clostridium sp. MD4; AY321658
	S000375671	0.962	1338	Clostridium sp. SA-4; AY695835
	S000414699	0.945	1357	Clostridium botulinum A (T); L37585
	S000414700	0.923	1331	Clostridium botulinum A; A2; L37586
	S000414701	0.945	1366	Clostridium botulinum B; L37587
	S000414703	0.962	1316	Clostridium botulinum B; B3; L37589
	S000414707	0.939	1362	Clostridium botulinum F; L37593
	S000428963	0.980	1368	Clostridium botulinum; LP1284; AF105402
	S000436478	0.881	1179	Clostridium sporogenes (T); M59115

Clostridio Faby Cl 64

CTTCTTCGGGCAGTGGATTAGCGGCCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCT
CAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACATAAGAGAATC

GCATGATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAG
 TTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
 GCCACATTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATAT
 TGCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGGGTGATGAAGGTCTTCGGA
 TTGTAAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACGGTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCT
 AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTG
 GGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGATGTTTAAGTGGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACC
 TGGGGGCTGCATTCCAAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTA
 GTGTAGCGGTGAAA

Results for Query Sequence: unknown, 579 unique oligos

no rank root (20) (match sequences)

no rank cellular organisms (20)

superkingdom Bacteria (20)

phylum Firmicutes (20)

class Clostridia (20)

order Clostridiales (20)

family Clostridiaceae (19)

genus Clostridium (19)

unclassified_Clostridium (19)

X68172	S000016030	0.929	1419	Clostridium botulinum; Langeland NCTC10281;
	S000254627	0.984	1401	Clostridium sporogenes; YE52; AY442816
	S000260209	0.974	1408	Clostridium botulinum (T); DSM 1734; X73442
	S000260307	0.938	1415	Clostridium botulinum; NCTC7272; X68185
	S000260418	0.950	1413	Clostridium botulinum; NCTC7273; X68186
	S000260538	0.931	1347	Clostridium botulinum; KYTO-F; X73844
	S000260539	0.984	1414	Clostridium sporogenes (T); ATCC3584; X68189
	S000261896	0.974	1288	Clostridium sporogenes; AJ579907
	S000357670	0.957	1375	Clostridium sp. MD2; AY321656
	S000357671	0.950	1407	Clostridium sp. MD3; AY321657
	S000357672	0.886	1406	Clostridium sp. MD4; AY321658
	S000375671	0.967	1338	Clostridium sp. SA-4; AY695835
	S000414699	0.950	1357	Clostridium botulinum A (T); L37585
	S000414700	0.927	1331	Clostridium botulinum A; A2; L37586
	S000414701	0.950	1366	Clostridium botulinum B; L37587
	S000414703	0.967	1316	Clostridium botulinum B; B3; L37589
	S000414707	0.943	1362	Clostridium botulinum F; L37593
	S000428963	0.984	1368	Clostridium botulinum; LP1284; AF105402
	S000436478	0.888	1179	Clostridium sporogenes (T); M59115

Clustid Faby Cl 68

TCCTTCGCGGAGTGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCA
 TAGAGGGGAATAGCCTTTTCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAAGATTGTAGTACCGCA
 TGGTACAGCAATTAAGGAGTAATCCGCTATGAGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAG
 TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG
 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
 TTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGATGACGGTCTTCGG

ATTGTAAAGCTCTGTCTTTAGGGACGATAATGACGGTACCTAAGGAGGAAGCCACGGC
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTACT
 GGGCGTAAAGGGAGCGTAGGTGGATATTTAAGTGGGATGTGAAATACCCGGGCTTAAC
 CTGGGTGCTGCATTCCAAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGGAGAATTCCT
 AGTGTAGCGGTGAAA

Lineage:

Results for Query Sequence: unknown, 574 unique oligos

no rank root (20) (match sequences)

no rank cellular organisms (20)

superkingdom Bacteria (20)

phylum Firmicutes (20)

class Clostridia (20)

order Clostridiales (20)

family Clostridiaceae (19)

genus Clostridium (19)

unclassified_Clostridium (19)

S000010778	0.988	1413	Clostridium butyricum; DSM2478; X68177
S000011751	0.937	1343	Clostridium butyricum; ATCC 19398; AB075768
S000013052	0.979	1415	Clostridium butyricum; ATCC43755; X68176
S000015680	0.988	1413	Clostridium butyricum; NCIMB8082; X68178
S000016028	0.988	1341	Clostridium butyricum; strain MW8; AJ002592
S000089460	0.977	1362	Clostridium butyricum; IBUN 22A; AJ289704
S000089461	0.988	1361	Clostridium butyricum; IBUN 125C; AJ289705
S000089903	0.977	1360	Clostridium butyricum; IBUN 64A; AJ289706
S000114790	0.988	1325	Clostridium butyricum; DSM 523; AJ458421
S000116309	0.988	1338	Clostridium butyricum; VPI3266; AJ458420
S000116547	0.932	1395	Clostridium diolis; DSM 5430; AJ458417
S000260681	0.977	1308	Clostridium butyricum; DSM 523; X77834
S000334978	0.943	1348	Clostridium sp. Kas202-1; AB114252
S000334979	0.934	1347	Clostridium sp. UsS101-2; AB114253
S000334980	0.934	1326	Clostridium sp. UsS102-1; AB114254
S000334982	0.934	1332	Clostridium sp. UsIt101-1; AB114256
S000391405	0.988	1182	Clostridium butyricum; YE15; AF316590
S000436450	0.939	1302	Clostridium butyricum (T); M59085
S000437203	0.934	1300	Clostridium saccharoperbutylacetonicum (T); N1-4;

U16122

Clostridio Faby CI 69

TTTTTTCGGGCAGTGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTC
 AAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGCATAACATAAGAGAATCG
 CATGATTTTCTTATCAAAGATTTATTGCTTTGAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGT
 TGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
 CCACATTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
 GCGCAATGGGGGAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGGGTGATGAAGGTCTTCGGAT
 TGTAAGCCCTGTTTTCTGGGACGATAATGACGGTACCAGAGGAGGAAGCCACGGCTA
 ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGG
 GCGTAAAGGGTGGCGTAGGCGGATGTTTAAGTGGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCT

GGGGGCTGCATTCCAAACTGGATATCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAG
TGTAGCGGTGAAT

Lineage:

Results for Query Sequence: unknown, 579 unique oligos

no rank root (20) (match sequences)

no rank cellular organisms (20)

superkingdom Bacteria (20)

phylum Firmicutes (20)

class Clostridia (20)

order Clostridiales (20)

family Clostridiaceae (19)

genus Clostridium (19)

unclassified_Clostridium (19)

[S000016030](#) 0.927 1419 Clostridium botulinum; Langeland NCTC10281;

X68172

[S000254627](#) 0.983 1401 Clostridium sporogenes; YE52; AY442816

[S000260209](#) 0.972 1408 Clostridium botulinum (T); DSM 1734; X73442

[S000260307](#) 0.936 1415 Clostridium botulinum; NCTC7272; X68185

[S000260418](#) 0.948 1413 Clostridium botulinum; NCTC7273; X68186

[S000260538](#) 0.929 1347 Clostridium botulinum; KYTO-F; X73844

[S000260539](#) 0.983 1414 Clostridium sporogenes (T); ATCC3584; X68189

[S000261896](#) 0.971 1288 Clostridium sporogenes; AJ579907

[S000357670](#) 0.955 1375 Clostridium sp. MD2; AY321656

[S000357671](#) 0.948 1407 Clostridium sp. MD3; AY321657

[S000357672](#) 0.886 1406 Clostridium sp. MD4; AY321658

[S000375671](#) 0.965 1338 Clostridium sp. SA-4; AY695835

[S000414699](#) 0.948 1357 Clostridium botulinum A (T); L37585

[S000414700](#) 0.926 1331 Clostridium botulinum A; A2; L37586

[S000414701](#) 0.948 1366 Clostridium botulinum B; L37587

[S000414703](#) 0.965 1316 Clostridium botulinum B; B3; L37589

[S000414707](#) 0.941 1362 Clostridium botulinum F; L37593

[S000428963](#) 0.983 1368 Clostridium botulinum; LP1284; AF105402

[S000436478](#) 0.888 1179 Clostridium sporogenes (T); M59115

Clostridio Faby Cl 71

GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCAAAGTGGGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAG
ATTAATACCGCATAAAGCCAAGTTTCACATGGAATTTGGATGAAAGGAGTAATTCGCT
TTGAGATGGACCCGCGGCGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGACAGC
GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAAGTACTGAGATACGGTCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC
AACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCTCTGTCTTTTGGGACGATA
ATGACGGTACCAAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGTGGCGTAGGCGGATGTT
TAAGTGAGATGTGAAATACCCGGGCTTAACTTGGGTGCTGCATTTCAAAGTGGATATCT
AGAGTGCAGGAGAGGAGAATGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAATGGCGTAGATA

Lineage:

Results for Query Sequence: unknown, 561 unique oligos

no rank root (20) (match sequences)

no rank cellular organisms (20)

superkingdom Bacteria (20)
 no rank unclassified Bacteria (2)
 no rank environmental samples (2)
 unclassified_environmental samples (2)
 S000471694 0.701 0874 uncultured bacterium; cD484811; AJ617911
 S000366842 0.736 0798 uncultured bacterium; IRR-DS7-7; AJ622006
 phylum Firmicutes (18)
 class Clostridia (18)
 order Clostridiales (16)
 family Clostridiaceae (16)
 no rank unclassified Clostridiaceae (1)
 no rank environmental samples (1)
 unclassified_environmental samples (1)
 S000329142 0.702 1329 uncultured Clostridiaceae bacterium; EB1118;

AY395437

 genus Clostridium (15)
 unclassified_Clostridium (15)
 S000444173 0.711 0194 uncultured Clostridium sp.; DGGE fragment C1;

AY773098

 S000022010 0.699 1364 Clostridium sp.; RPec1; Y15985
 S000005089 0.729 1396 Clostridium scatologenes; SL1; Y18813
 S000005987 0.742 1328 Clostridium sp. T7; AF281142
 S000014226 0.711 1383 Clostridium autoethanogenum; DSM 10061;

Y18178

 S000016649 0.702 1338 Clostridium pasteurianum (T); M23930
 S000127639 0.717 1218 Clostridium sp. 'CCUG 42741'; AJ250960
 S000129659 0.729 1312 Clostridium scatologenes; FP; AJ427628
 S000130726 0.725 1350 Clostridium acidisoli (T); CK74; AJ237756
 S000260420 0.759 1310 Clostridium magnum (T); DSM 2767; X77835
 S000399545 0.702 0974 Clostridium ragsdalei; P11; AY170378
 S000399546 0.706 0969 Clostridium carboxidivorans; P7; AY170379
 S000414327 0.984 1425 Clostridium tyrobutyricum; NIZO 51; L08062
 S000436476 0.973 1340 Clostridium tyrobutyricum (T); M59113
 S000400865 0.713 1393 Clostridium sp. C4/1; AY188850

 no rank unclassified Clostridia (2)
 no rank environmental samples (2)
 unclassified_environmental samples (2)
 S000358472 0.718 0645 uncultured Clostridia bacterium; 36346r; AY387325
 S000421451 0.704 0858 uncultured Clostridia bacterium; X9Ba95; AY607225

CONCLUSIONI

Al termine dell'indagine fin qui descritta è emerso che su 72 campioni costituiti da insilato di mais, latte e formaggi in 15 casi è stata evidenziata la presenza di Clostridi con una percentuale quindi pari a 20.8%.

E' da rilevare che il sistema produttivo preso in considerazione con la presente ricerca utilizza largamente la tecnica dell'affioramento del latte, idonea, di per sé, ad assicurare una buona eliminazione delle spore di *Clostridium tyrobutyricum*. Nella maggior parte dei casi, l'affioramento avviene a temperature variabili tra i 12 e i 22°C (più frequentemente tra i 14 ed i 16°C). Secondo il qualificato parere del Bottazzi le caratteristiche del latte di affioramento per la produzione di Grana potrebbero agevolmente essere migliorate trattando il latte in arrivo al caseificio a temperatura di 40°C per un minuto e refrigerandolo, quindi, rapidamente sino alla temperatura di affioramento.

La rapidità di isolamento e identificazione e la definizione delle caratteristiche dei ceppi di Clostridi implicati nell'insorgenza del gonfiore tardivo rappresentano presupposti importanti per attuare modifiche nelle procedure di lavorazione idonee a ridurre l'incidenza della comparsa di difetti ed alterazioni e a garantire quindi la qualità e la sanità degli alimenti, nell'interesse dei produttori e dei consumatori.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALBERTINI A., MENGUZZATO G. (1999). I difetti dei formaggi Grana: la gestione del prodotto non conforme. Igiene alimenti-disinfestazione e igiene ambientale.
- 2) BACCI C., PARISI A., BRINDANI F. Ruolo di *Clostridium* spp in alterazioni el parmigiano reggiano riconducibili a gonfiore tardivo
- 3) BOURGEOIS C.M., MESLE J.F., ZUCCA J. (1990). "Microbiologia alimentare". Ed.Tecniche nuove, Milano.
- 4) BOTTAZZI V. (1983). Clostridi e fermentazione butirrica dei formaggi. L'industria del latte.
- 5) BOTTAZZI V. (1984). Il controllo del gonfiore tardivo nei formaggi: possibilità e limiti dei mezzi oggi disponibili. Scienza e tecnica lattiero-casearia. Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma (Vol. XXII, 2002)
- 6) BOTTAZZI V. (1993). "Microbiologia lattiero-casearia". Ed. Edagricole, Bologna.
- 7) BOTTAZZI V., BATTISTOTTI B. (1978). Indicazioni per il controllo del gonfiore tardivo del formaggio Grana. Scienza e tecnica lattiero-casearia,.
- 8) BOTTAZZI V., BATTISTOTTI B., BIANCHI F. (1989). Direct sem observation of clostridia (*Clostridium butyricum*) in grana cheese. Annali microbiologia.
- 9) BOTTAZZI V., CORRADINI C. (1987). Possibilità e prospettive nel controllo delle fermentazioni gasogene dei formaggi Grana Padano e Provolone. Scienza e tecnica lattiero-casearia.
- 10)) BOTTAZZI V., SCOLARI G.L., BRAMBILLA E., BATTISTOTTI B., BOSI E. (1992). Batteri lattici per la produzione di formaggio Grana. 3° parte: velocità di acidificazione e comparsa di gonfiore. Scienza e tecnica lattiero-casearia,
- 11) BROWN T. A. Genomi. Edises 2000

- 12) CAPELLI P., VANNUCCHI V. (1998). "Chimica degli alimenti-conservazione e trasformazione". Ed. Zanichelli, Bologna.
- 13) CARINI S. (1985). I clostridi butirrici causa del gonfiore tardivo nei formaggi. L'industria del latte,
- 14) EMALDI G. C., TOPPINO P.M., BOSSI M. G., CARINI S., LODI R., VEZZONI A. M., NIZZOLA I., ALBERTINI B. (1977). La presenza di sporigeni anaerobi nei formaggi e nelle feci di bovine da latte. L'industria del latte
- 15) LANSING M. PRESCOTT; J. P. HARLEY; D. A. KLEIN. Microbiologia. Zanichelli 2003
- 16) LOSI G., CASTAGNETTI G. B. (1993). Origine dei principali difetti del formaggio Parmigiano Reggiano e possibili rimedi. Atti del convegno Progeo, Reggio Emilia, 28/01/1993.
- 17) MATTEUZZI D., ANNIBALDI S., SABATINI P. (1972). Importanza di *Clostridium sporogenes* come agente di gonfiore del formaggio Grana. Annali microbiologia,
- 18) OTTAVIANI F. (1991). "L'analisi microbiologica dei prodotti lattiero-caseari". Manuale di tecniche di laboratorio ed ecologia microbica. Ed. Tecniche nuove, Milano.
- 19) OTTOGALLI G. (1991). "Microbiologia lattiero-casearia". Ed Clesav, Milano.
- 20) OXOID Manuale
- 21), PANZANI N. (1993). "Formaggio Grana". Ed. tipografia artigiana, Vignola (MO).
- 22) PECORARI M. (1981). Ricerca sul numero e sulle variazioni stagionali di spore di clostridi butirrici nel latte per Parmigiano Reggiano. Scienza e tecnica lattierocasearia
- 23) SALVADORI DEL PRATO O. (1998). "Trattato di tecnologia casearia". Ed. Edagricole, Bologna.