Studio di Challenge test su *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes, Salmonella* Typhimurium *e Staphilococcus aureus* in Pecorino di Farindola

Gabriella Centorotola, Luigi Iannetti, Diana Neri, Francesco Pomilio, Anna Franca Sperandii, Patrizia Tucci, Giacomo Migliorati

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, Teramo, 64100 - Italia
Corrispondenza: Gabriella Centorotola, g.centorotola@izs.it

Parole chiave
Challenge test,
Escherichia coli O157,
Listeria monocytogenes,
Pecorino di Farindola,
Salmonella Typhimurium,
Staphylococcus aureus.

Riassunto
Lo studio ha previsto l'esecuzione di challenge test microbiologici di processo per la valutazione della dinamica di comportamento di 4 microrganismi patogeni per l'uomo, che frequentemente contaminano i formaggi: Escherichia coli O157, *Listeria monocytogenes, Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus*. Al Laboratorio Sperimentale di Produzione degli Alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM) "G. Caporale" sono stati prodotti, secondo il processo di produzione tradizionale del Pecorino di Farindola, 20 lotti di formaggio: 8 di controllo e 12 contaminati (3 per ciascun microrganismo patogeno). Le determinazioni analitiche sono state effettuate al giorno 0 (latte e cagliata) e ai giorni 1, 7, 14, 21, 35, 49, 63, 77, 91, 121 e 150. Le concentrazioni delle specie batteriche costituenti la flora microbica autoctona hanno mostrato una riduzione con il progredire della stagionatura. Nei lotti di controllo è stata messa in evidenza un'elevata variabilità nelle concentrazioni di alcune specie batteriche *(Enterobacteriaceae,* Enterococchi, stafilococchi coagulasi positivi, muffe e lieviti), molto probabilmente in funzione della qualità microbiologica della materia prima (latte). Nei 12 lotti, contaminati artificialmente, è stata rilevata una progressiva riduzione della concentrazione microbica durante la stagionatura, fino a livelli inferiori al limite di rilevabilità del metodo (LOD) a stagionatura avanzata. I valori δ (potenziale di crescita) dei microrganismi patogeni presi in considerazione sono risultati inferiori a 0,5 log10 UFC/g ai giorni 60, 120 e 150, evidenziando come il Pecorino di Farindola non sia terreno favorevole alla loro crescita dal 60° giorno di stagionatura in poi. Le concentrazioni di *E. coli* O157 e S. Typhimurium sono diminuite fino a un valore al di sotto del LOD a T121 e quella di *L. monocytogenes* a T150. *S. aureus* ha, invece, mostrato per un lotto una maggiore tolleranza all'ambiente salino e leggermente acido del Pecorino di Farindola permanendo fino a T150, per i due lotti rimanenti il microrganismo è risultato non rilevabile a T121 e T150. Sarebbe, pertanto, auspicabile riuscire a limitare la presenza di *S. aureus* nella materia prima utilizzata, considerando la sua capacità di sopravvivere a lungo nel formaggio e di produrre eventualmente tossine.

Introduzione

Il processo produttivo del Pecorino di Farindola è di tipo prettamente artigianale e prevede la trasformazione di latte crudo non sottoposto ad alcun trattamento termico di risanamento. Pertanto, la valorizzazione di questo formaggio tradizionale deve essere supportata da adeguata documentazione su caratteristiche chimico-fisiche, microbiologiche e sicurezza alimentare, non solo in termini di assenza di microrganismi patogeni o sostanze nocive, ma riguardo, soprattutto, alla capacità del prodotto di contrastare in modo attivo la presenza di eventuali microrganismi contaminanti. La capacità del latte crudo di supportare la crescita di microrganismi patogeni è ben documentata (3, 33) e formaggi prodotti con latte crudo sono spesso implicati in episodi di tossinfezioni alimentari (28). Considerando la crescente domanda di formaggi a latte crudo e, in generale, di prodotti tradizionali ad elevata qualità sensoriale, è necessario approfondire lo studio di questo tipo di alimenti, al fine di documentare scientificamente le caratteristiche microbiologiche e chimico-fisiche in grado di inibire ed eliminare gli agenti patogeni potenzialmente presenti. L'esecuzione di challenge test in laboratorio (contaminazioni artificiali) permette di simulare il comportamento degli agenti patogeni negli alimenti, per verificarne sopravvivenza e proliferazione nel corso del processo di produzione e della shelf-life

(4). Inoltre, i challenge test sono espressamente previsti dal regolamento CE 2073/2005 (32), che impone ai produttori di garantire la conformità degli alimenti ai criteri microbiologici anche attraverso l'esecuzione di studi *"per valutare lo sviluppo o la sopravvivenza dei microrganismi in questione che possono essere presenti nel prodotto durante il periodo di conservabilità, in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione".* Il challenge test microbiologico per la valutazione del potenziale di crescita (δ) è uno studio di laboratorio che misura il comportamento di popolazioni batteriche patogene in alimenti artificialmente contaminati e conservati in condizioni normali e di abuso termico in caso di trasporto, distribuzione e stoccaggio (4). Questo tipo di sperimentazione può anche essere applicata ai processi di lavorazione, permettendo di determinare le possibilità di sviluppo dei microrganismi patogeni nelle diverse fasi di produzione dell'alimento.
L'obiettivo del presente studio è stato di produrre evidenze oggettive in grado di documentare la sicurezza microbiologica del Pecorino di Farindola e studiare il prodotto in relazione ai microrganismi patogeni che possono contaminarlo. In particolare sono stati eseguiti challenge test microbiologici per lo studio della dinamica di comportamento di 4 microrganismi patogeni per l'uomo che frequentemente contaminano i formaggi: Escherichia coli O157, *Listeria monocytogenes, Salmonella* Typhimurium, e *Staphylococcus aureus.* Lo studio è stato realizzato nel Laboratorio Sperimentale di Produzione degli Alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM) "G. Caporale". Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Materiali e metodi

Materia prima

Per lo studio sono stati acquistati circa 3.000 litri di latte e prodotte 220 forme di Pecorino di Farindola da circa 1,8 kg ciascuna. La produzione ha previsto otto lotti di controllo e tre lotti contaminati per ciascun microrganismo. Il processo produttivo del Pecorino di Farindola è stato riprodotto in laboratorio sulla base delle informazioni raccolte mediante interviste ai produttori, i cui dati sono stati riportati nel lavoro: "Studio del processo di produzione del Pecorino di Farindola" di Migliorati *et al.* (in pubblicazione). Il latte, conservato a temperatura di refrigerazione in azienda, appartenente al relativo Consorzio di Tutela, è stato trasferito nel laboratorio dell'IZSAM.

Processo produttivo

Le fasi di produzione hanno previsto, dopo il trasferimento del latte crudo in caldaia, il riscaldamento a 35°C ± 2°C e l'aggiunta di caglio suino nella quantità di 2,5ml/l. La precipitazione della caseina, con formazione del coagulo (cagliata), è stata ottenuta in circa 40 minuti. La cagliata è stata, quindi, rotta con l'utilizzo della lira meccanica per 10 minuti e, per dare maggiore consistenza alla pasta, la temperatura è stata innalzata di 2°C (37 - 39°C) per 5 minuti. Si è proceduto con il trasferimento in fuscella (in polietilene), spurgo e pressatura manuale. Successivamente, le forme sono state lasciate sgocciolare per 30 minuti all'interno della vasca di stufatura. La salatura è stata effettuata a secco, cospargendo di sale prima una faccia e, dopo 24 ore, l'altra. In seguito le forme estratte dalle fuscelle sono state poste su ripiani di legno all'interno di celle climatiche (Piardi™ CC2000, Castenedolo, Italia) a temperatura e umidità relativa controllate (18°C ± 1°C e umidità del 65%), per un tempo di stagionatura di circa 150 giorni.

Ceppi batterici e preparazione all'inoculo

Per le contaminazioni sono stati impiegati 4 microrganismi patogeni per l'uomo, *E. coli* O157, *L. monocytogenes, S.* Typhimurium *e S. aureus*. Le sospensioni di inoculo sono state allestite utilizzando un ceppo di riferimento (ATCC) e uno isolato da formaggio (Tabella 1). La preparazione delle sospensioni di inoculo è stata effettuata sulla base delle linee guida del Laboratorio Europeo di Riferimento per *Listeria monocytogenes* (EURL Lm) (4). I ceppi, conservati in Microbank™ (Pro-LAB Diagnostics, Richmond-Hill, Canada) a -70°C, sono stati singolarmente rivitalizzati a 37°C ± 1°C per 2h ± 1h in Brain Heart Infusion (BHI) e reisolati su agar sangue. Successivamente, per ogni ceppo sono state preparate brodocolture in BHI e incubate a 37°C ± 1 C per 24h ± 1h. Al fine di ottenere seconde

Tabella 1. Ceppi impiegati per l'allestimento delle sospensioni di inoculo.

E. coli O157	*L. monocytogenes*	*S.* Typhimurium	*S. aureus*
ATCC25952 (ceppo di riferimento)	ATCC7644 (ceppo di riferimento)	ATCC14028 (ceppo di riferimento)	ATCC33862 (ceppo di riferimento)
C07 EURL E. coli VTEC	EURL 12M0B098LM	IZSAM2012TE52020/6	IZSAM2012TENRG52121

brodocolture adattate alle caratteristiche del prodotto e alla temperatura di lavorazione del latte (35°C ± 2°C), sono state allestite nuove subcolture alle condizioni di adattamento in BHI modificato (pH 6,70 ± 0,2), incubate a 35°C ± 2°C per 24h ± 1h fino al raggiungimento della fase stazionaria di ciascun ceppo batterico (4, 29). Per tutti i microrganismi patogeni sono state preparate le sospensioni di inoculo (mix) costituite dall'unione di parti uguali delle brodocolture adattate dei due ceppi selezionati. Le sospensioni sono state successivamente diluite di un logaritmo per ottenere nel latte una concentrazione di 10^5UFC/ml. Il titolo delle mix utilizzate è stato valutato con conta in piastra su terreno selettivo specifico. In via cautelativa sono stati usati livelli di contaminazione piuttosto elevati (Tabella 2), superiori a quelli indicati nelle linee guida EURL Lm (4) e corrispondenti a quanto indicato per *Listeria monocytogenes* dal National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) per la valutazione del grado di letalità raggiunto da un processo di produzione/trattamento di risanamento (29, 35).
La contaminazione è stata effettuata aggiungendo a 100l di latte in caldaia 1l di mix del relativo microrganismo patogeno, in modo tale da non superare l'1% del volume di materia prima e riducendo al minimo le modifiche delle proprietà chimico fisiche del prodotto. L'inoculo è stato distribuito omogeneamente mantenendo il latte in agitazione per 5 minuti, attraverso l'azione della lira meccanica.

Campionamento e determinazioni analitiche

Per l'esecuzione dei challenge test sono stati previsti campioni di controllo e artificialmente contaminati. Il campionamento è stato effettuato a tempi (T = giorni) prestabiliti, fino al 150° giorno dalla produzione. Per valutare l'eventuale presenza naturale dei microrganismi patogeni oggetto di questo studio sono state effettuate le relative ricerche nel latte prima di ogni contaminazione e produzione. Per ciascun lotto sono stati analizzati latte e cagliata a T0 e i formaggi a T1, T7, T14, T21, T35, T49, T63, T77, T91, T121 e T150. I metodi utilizzati per le diverse determinazioni analitiche sono riportati in Tabella 3. Ogni determinazione analitica è avvenuta in triplicato su un campione di 100g, composto da diverse porzioni della parte edibile e, quindi, rappresentativo dell'intera forma. Il tutto è stato sottoposto ad omogeneizzazione mediante Grindomix™ GM 200 (Retsch, Haan - Germania). L'aliquota da sottoporre a prova, la sospensione iniziale e le diluizioni decimali sono state preparate secondo la norma ISO 6887-1:1999 (10), ISO 6887-5:2010(E) (22) e ISO 707:2008(E) (21).

Calcolo del potenziale di crescita (δ)

Il potenziale di crescita (δ) è la differenza tra la mediana delle concentrazioni alla fine della stagionatura o in fasi intermedie della stessa e la mediana della concentrazione a T0 espresse in log_{10}UFC/g. In tutti i lotti di formaggio contaminato e per tutte le specie batteriche considerate sono state applicate le modalità di calcolo del potenziale di crescita indicate dall'EURL Lm per *L. monocytogenes* (4). In particolare, valori di δ inferiori a 0,5 sono considerati indicativi di un prodotto che non permette la crescita del microrganismo. Il potenziale di crescita è stato calcolato per ciascun microrganismo patogeno a tre diversi tempi di stagionatura (T60, T120, T150).

Risultati

Nel latte utilizzato per la produzione dei lotti di formaggio, i microrganismi patogeni oggetto di studio, sono risultati assenti in 25ml di campione analizzato.

Lotti di controllo

Determinazione attività dell'acqua (a_w)

I valori di a_w hanno mostrato una diminuzione con il procedere della stagionatura. Il valore medio misurato a T1 è stato di 0,972 ± 0,008 (0,962 - 0,983). Nel corso della stagionatura, l'a_w è diminuita gradualmente fino a valori medi di 0,837 ± 0,012 (0,827 - 0,865) a T150 (Figura 1).

Determinazione pH

Il valore medio riscontrato nel latte è stato di 6,77 ± 0,04 (6,73 - 6,82) e nella cagliata è stato di 6,75 ± 0,41 (6,10 - 7,03). Il pH durante la stagionatura si è mantenuto pressoché costante con un valore medio a T150 di 5,57 ± 0,18 (5,31 - 5,83) (Figura 2).

Tabella 2. Concentrazione media delle sospensioni di inoculo di *L. monocytogenes, E. coli* 0157, *S.* Typhimurium e *S. aureus* espresse in log10 UFC/ml.

Lotto	*E. coli* 0157	*L. monocytogenes*	*S.* Typhimurium	*S. aureus*
1	7,37	7,37	7,77	7,25
2	7,46	7,51	7,62w	7,49
3	7,55	7,57	7,16	7,48

Tabella 3. Metodi impiegati per le analisi chimico-fisiche e microbiologiche effettuate sui lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente.

Accertamento	Metodo	Materia prima (latte e caglio)	Lotti di controllo	Lotti contaminati
Ricerca *L. monocytogenes*	ISO 11290-1:96/Amendment 1:2004 (6, 15)	x		
Ricerca *E. coli* 0:157	ISO 16654:2001 (11)	x		
Ricerca *Salmonella* spp.	ISO 6579/2002/Cor 1:2004 (12, 17)	x		
Determinazione attività dell'acqua (a_w)	ISO 21807:2004 (23)		x	
Determinazione pH	Potenziometrico		x	
Carica batterica mesofila nel latte	DM 26 marzo 1992 (2)		x	
Carica batterica mesofila	ISO 4833:2003 (13)		x	
Numerazione Enterobatteriaceae	ISO 21528-2:2004 (18)		x	
Numerazione Enterococchi	NMKL No. 68, 4th Ed. 2004 (30)		x	
Numerazione Lattobacilli a 30°C in aerobiosi	ISO 15214:1998 (7)		x	
Numerazione Lattococchi	Rapporti ISTISAN 08/36 (1)		x	
Numerazione lieviti e muffe in campioni con aw > 0,95	ISO 21527-1:2008 (19)		x	
Numerazione lieviti e muffe in campioni con aw ≤ 0,95	ISO 21527-2:2008 (20)		x	
Numerazione Micrococcaceae	Metodo interno (Baird Parker agar, 37°C ± 1°C per 48h ± 2h)		x	
Numerazione stafilococchi coagulasi positivi (SCP)	ISO 6888-2:1999/Amendament 1:2003 (9, 14)	x	x	x
Numerazione *L. monocytogenes*	ISO11290-2:98/ Amendment 1:2004 (8, 16)			x
Numerazione *E. coli* 0157	Metodo interno (SMAC agar e CT-SMAC agar, 37°C± 1°C per 48 ± 3 h			x
Numerazione *Salmonella* spp	Metodo interno (Rambach agar, 37°C ± 1°C per 24h ± 3 h)			x

Figura 1. Rappresentazione grafica dei risultati dell'attività dell'acqua (aw) negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente. Le barre degli istogrammi rappresentano i risultati medi, le barre lineari i valori minimo e massimo.

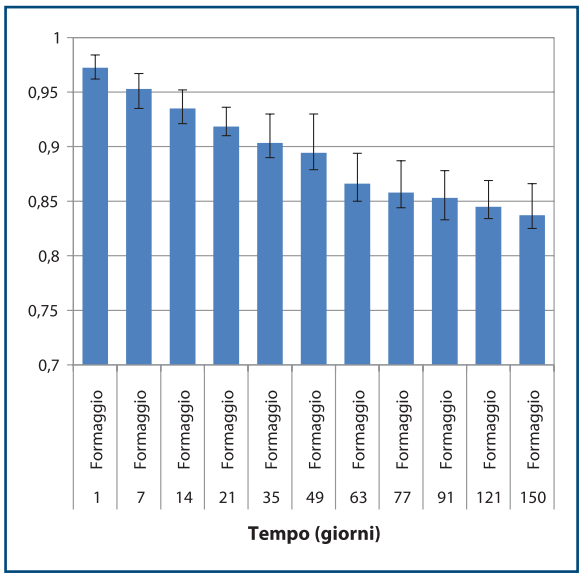
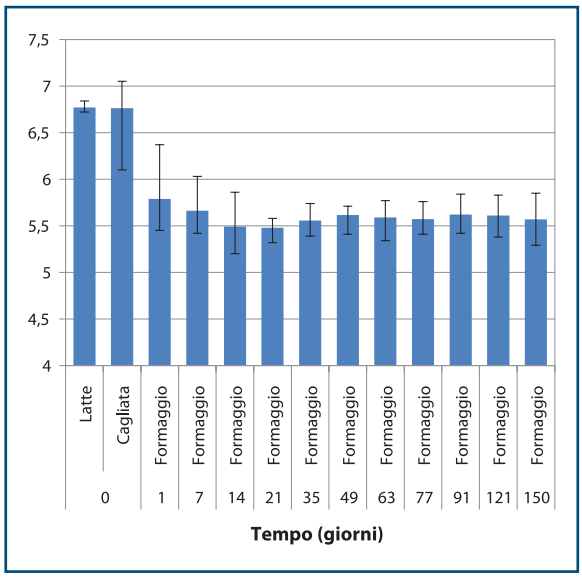


Figura 2. Rappresentazione grafica dei risultati relativi al pH negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente. Le barre degli istogrammi rappresentano i risultati medi, le barre lineari i valori minimo e massimo.



Carica batterica mesofila (CBM)

La CBM nel latte è risultata pressoché variabile con valori medi di 6,39 log_{10}UFC/ml ± 0,99 log_{10}UFC/ml (5,44 - 7,94). Nella cagliata i valori medi sono stati di 6,52 log_{10}UFC/g ± 0,94 log_{10}UFC/g (5,51 - 7,92). Da T7 si è osservata una graduale diminuzione della CBM che ha raggiunto valori medi di 6,47 log_{10}UFC/g ± 0,71 log_{10}UFC/g (5,11 - 7,58) a T150 (Figura 3).

Numerazione Enterobacteriaceae

La concentrazione media nel latte è stata di 4,87 log_{10}UFC/ml ± 0,78 log_{10}UFC/ml (3,42 - 5,66), nella cagliata di 5,25 log_{10}UFC/g ± 0,68 log_{10}UFC/g (4,32 – 6,17). Nel formaggio è stato registrato un aumento della concentrazione delle Enterobacteriaceae fino a T7, con valori medi di 6,58 log_{10}UFC/g ± 0,59 log_{10}UFC/g (5,44 - 7,58). L'andamento della concentrazione di Enterobacteriaceae ha mostrato differenze negli 8 lotti. Nel lotto 1 sono state rilevate fino a T49 con una concentrazione media di 3,29 log_{10}UFC/g ± 0,03 log_{10}UFC/g, nei lotti 3 e 5 fino a T63 con valori medi di 1,59 log_{10}UFC/g ± 0,34 log_{10}UFC/g, nei lotti 2, 4 e 6 fino a T77 con valori medi di 2,29 log_{10}UFC/g ± 0,20 log_{10}UFC/g, nel lotto 8 fino a T91 con una concentrazione di 2,59 log_{10}UFC/g ± 0,02 log_{10}UFC/g e nel lotto 7 le Enterobacteriaceae sono state rilevate fino a T150 con un valore di 2,78 log_{10}UFC/g ± 0,01 log_{10}UFC/g (Figure 4 e 5).

Numerazione Enterococchi

La concentrazione media nel latte è stata di 4,21 log_{10}UFC/ml ± 0,96 log_{10}UFC/ml (3,29 - 5,75), nella cagliata di 4,60 log_{10}UFC/g ± 0,86 log_{10} UFC/g (3,40 - 5,67). Nel formaggio le concentrazioni più elevate di Enterococchi sono state osservate tra T14 e T21. Il valore massimo di 7,39 log_{10}UFC/g ± 0,05 log_{10}UFC/g è stato rilevato nel lotto 1 a T21. Da T21 è stata registrata una graduale diminuzione della concentrazione fino a valori medi di 5,44 log_{10}UFC/g ± 0,78log_{10}UFC/g (4,10 - 6,69)a T150 (Figure 6 e 7).

Numerazione Lattobacilli

La concentrazione media nel latte è stata di 5,67 log_{10}UFC/ml ± 0,88 log_{10}UFC/ml (4,89 - 7,56), nella cagliata di 5,99 log_{10}UFC/g ± 0,87 log_{10}UFC/g (5,01 - 7,73). Nel formaggio la concentrazione massima è risultata compresa tra 8,47 e 8,87 log_{10}UFC/g ed è stata rilevata in tutti i lotti nell'intervallo di tempo compreso tra T7 e T21. Dopo T21 è stato registrato un lieve decremento fino a valori medi di 6,59 log_{10}UFC/g ± 0,46 log_{10}UFC/g (5,67 - 7,26) a T150 (Figura 8).

Numerazione Lattococchi

La concentrazione media nel latte è stata di 6,00 log_{10}UFC/ml ± 1,07 log_{10}UFC/ml (4,59 - 7,49), nella cagliata di 6,02 log_{10}UFC/g ± 0,91 log_{10}UFC/g (5,12 - 7,71). Nel formaggio la concentrazione massima è

Figura 3. Rappresentazione grafica dei risultati della carica batterica mesofila negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente. Le barre degli istogrammi rappresentano i risultati medi, le barre lineari i valori minimo e massimo.

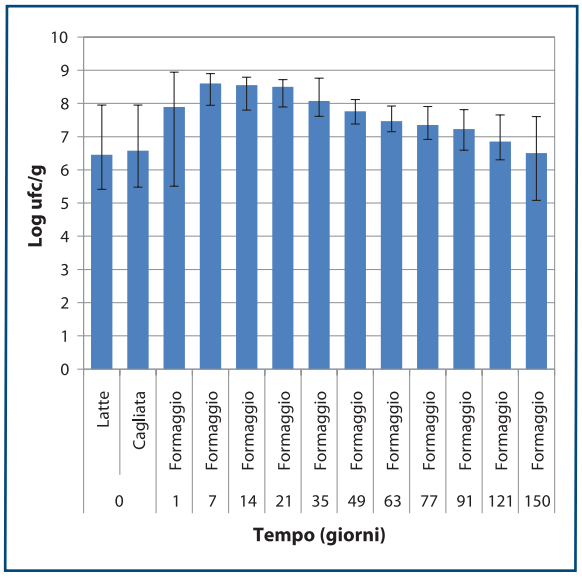


Figura 4. Rappresentazione grafica della numerazione delle Enterobacteriaceae negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente. Le barre degli istogrammi rappresentano i risultati medi, le barre lineari i valori minimo e massimo.

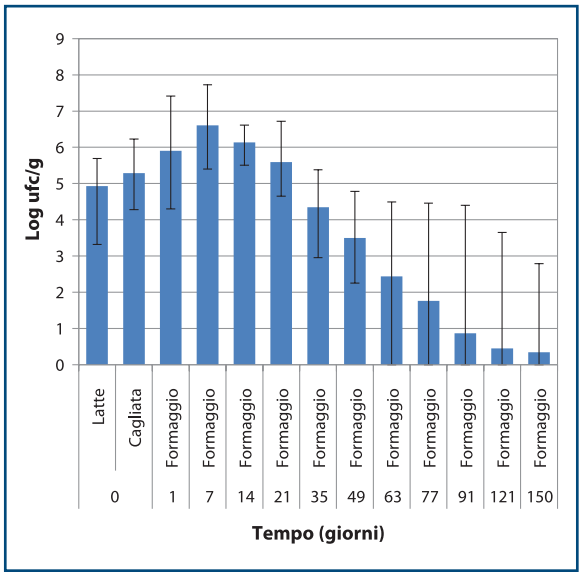


Figura 5. Rappresentazione grafica dell'andamento delle Enterobacteriaceae negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente (ogni lotto è stato riportato singolarmente).

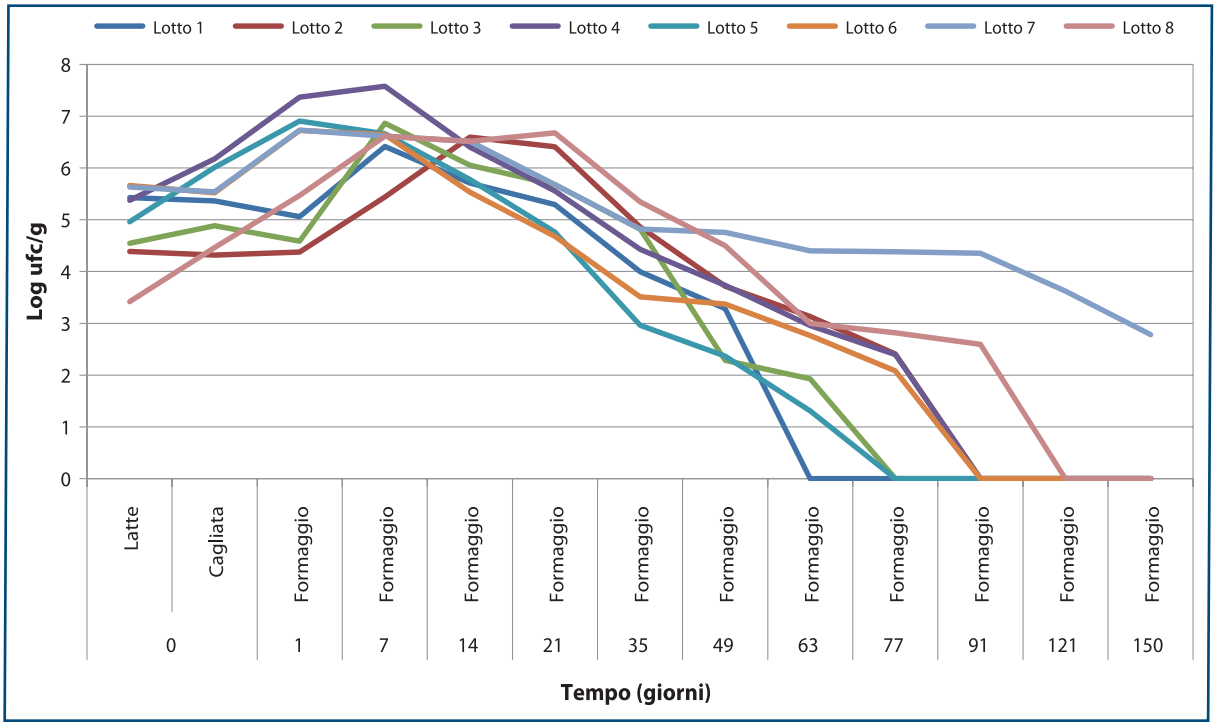
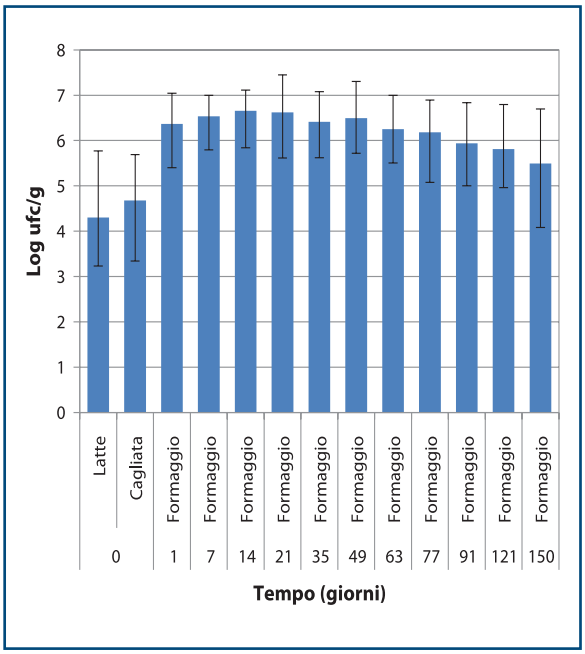


Figura 6. Rappresentazione grafica della numerazione degli Enterococchi negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente. Le barre degli istogrammi rappresentano i risultati medi, le barre lineari i valori minimo e massimo.



risultata compresa tra 8,26 e 8,78 log_{10}UFC/g ed è stata raggiunta in tutti i campioni nell'intervallo di tempo compreso tra T7 e T21. Da T21 è stata rilevata una graduale diminuziwone fino a valori di 5,94 log_{10}UFC/g ± 0,67 log_{10}UFC/g (4,90 - 6,71) a T150 (Figura 9).

Numerazione Micrococcaceae

La concentrazione media nel latte è risultata di 5,02 log_{10}UFC/ml ± 0,54 log_{10} UFC/ml (4,40 - 5,72), nella cagliata di 5,61 log_{10}UFC/g ± 0,58 log_{10}UFC/g (4,99 - 6,62). Durante la stagionatura la concentrazione massima è risultata compresa tra 6,09 e 7,69 log_{10}UFC/g, raggiunta in tutti i formaggi nell'intervallo di tempo tra T7 e T14. Da T14 è stata registrata una graduale diminuzione delle concentrazioni delle Micrococcaceae fino a valori medi di 4,05 log_{10}UFC/g ± 0,69log_{10}UFC/g (3,35 - 5,03) a T150 (Figura 10).

Numerazione di muffe e lieviti

I risultati della numerazione di muffe e lieviti sono La concentrazione media nel latte è stata di 4,98 log_{10}UFC/ml ± 0,44 log_{10}UFC/ml (4,45 - 5,52), nella cagliata di 4,93 log_{10}UFC/g ± 0,47 log_{10}UFC/g (4,49 - 5,88). Nel formaggio la concentrazione di lieviti e muffe ha avuto un andamento variabile, raggiungendo i valori massimi in tempi diversi. La concentrazione massima è stata di 5,23 log_{10}UFC/g ± 0,49log_{10}UFC/g (4,45 - 5,72) ed è stata riscontrata a T7. Nel lotto 1 e nel lotto 2 è stata osservata una graduale diminuzione fino a valori inferiori al LOD rispettivamente a T121 e a T150. Negli altri lotti sono state rilevate, a T150, concentrazioni medie di 2,47 log_{10}UFC/g ± 0,69log_{10}UFC/g (< LOD - 4,29) (Figure 11 e 12).

Figura 7. Rappresentazione grafica dell'andamento degli Enterococchi negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente (ogni lotto è stato riportato singolarmente).

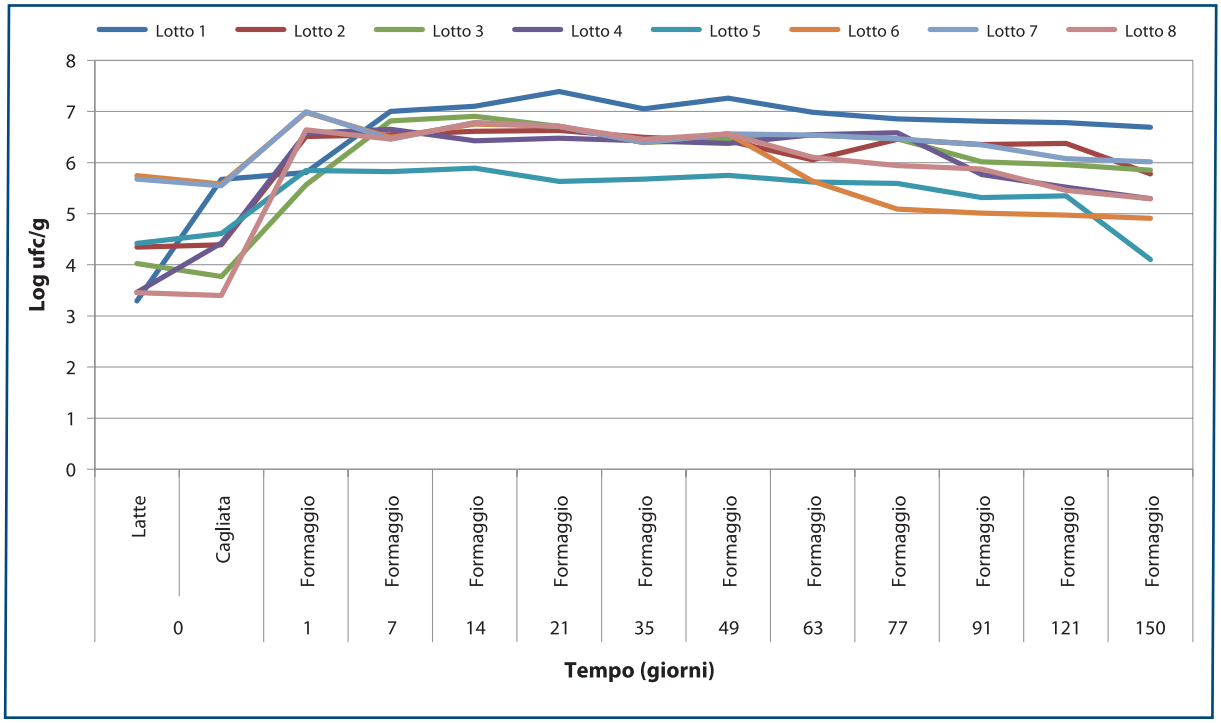


Figura 8. Rappresentazione grafica della numerazione dei Lattobacilli negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente. Le barre degli istogrammi rappresentano i risultati medi, le barre lineari i valori minimo e massimo.

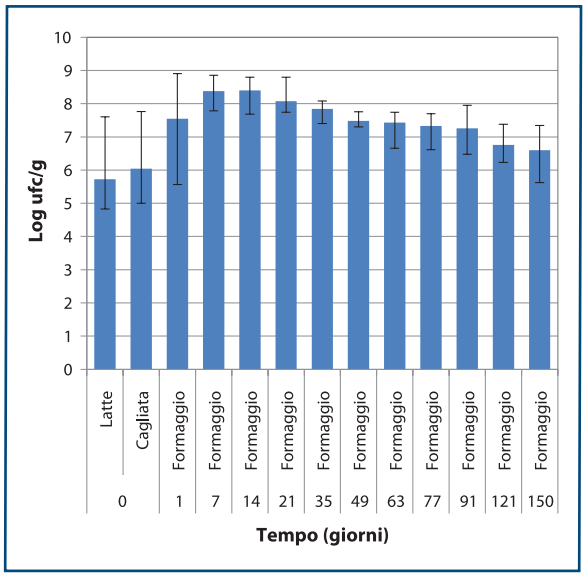
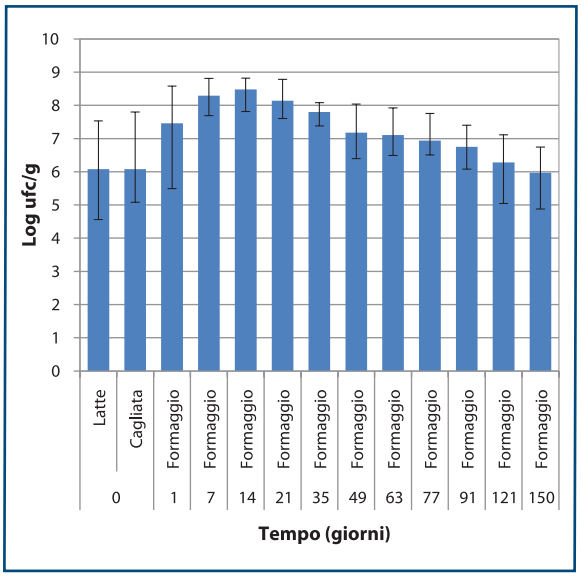


Figura 9. Rappresentazione grafica dei risultati della numerazione dei Lattococchi negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente. Le barre degli istogrammi rappresentano i risultati medi, le barre lineari i valori minimo e massimo.



Numerazione di stafilococchi coagulasi positivi

La concentrazione media nel latte è stata di 3,66 $\log_{10}$UFC/ml ± 0,62 $\log_{10}$UFC/ml (< LOD - 5,20), ad eccezione del lotto 3 in cui la concentrazione di SCP è risultata inferiore al LOD, esclusivamente per la matrice latte, pari a 1UFC/ml. Nella cagliata i valori medi sono stati di 3,72 $\log_{10}$UFC/g ± 0,63 $\log_{10}$UFC/g (< LOD - 5,48), escludendo il lotto 3 in cui la concentrazione è risultata ancora inferiore al LOD. Nei formaggi del lotto 3 la concentrazione di SCP è risultata inferiore al LOD per tutto il periodo di stagionatura. Nei formaggi degli altri lotti, il valore massimo è stato di 6,65 $\log_{10}$UFC/g registrato a T21 nel lotto 2. Nel corso della stagionatura, la diminuzione della concentrazione di SCP ha mostrato un andamento variabile. Nel lotto 6 a T49 la concentrazione media è stata di 2,37 $\log_{10}$UFC/g ± 0,07 $\log_{10}$UFC/g, da T63 è scesa a valori al di sotto

Figura 10. Rappresentazione grafica della numerazione delle Micrococcaceae negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente. Le barre degli istogrammi rappresentano i risultati medi, le barre lineari i valori minimo e massimo.

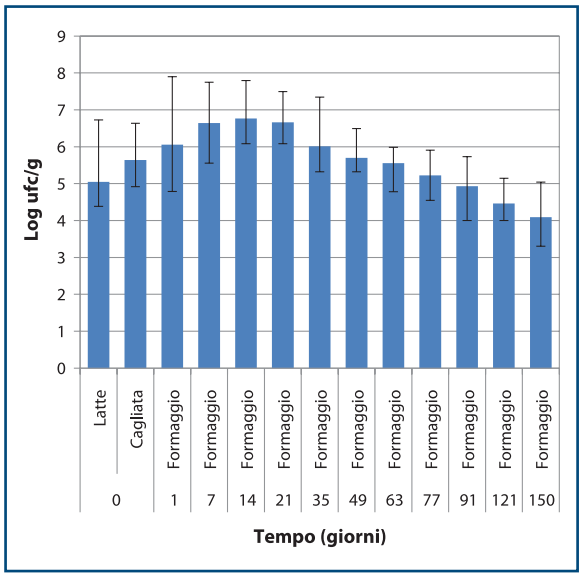


Figura 11. Rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di muffe e lieviti negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente. Le barre degli istogrammi rappresentano i risultati medi, le barre lineari i valori minimo e massimo.

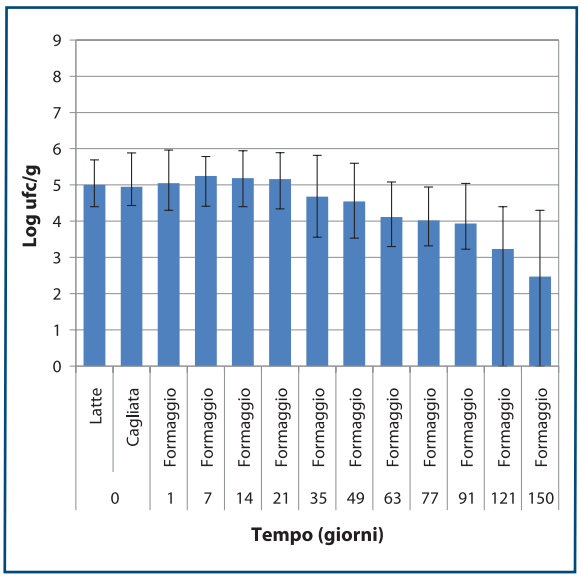
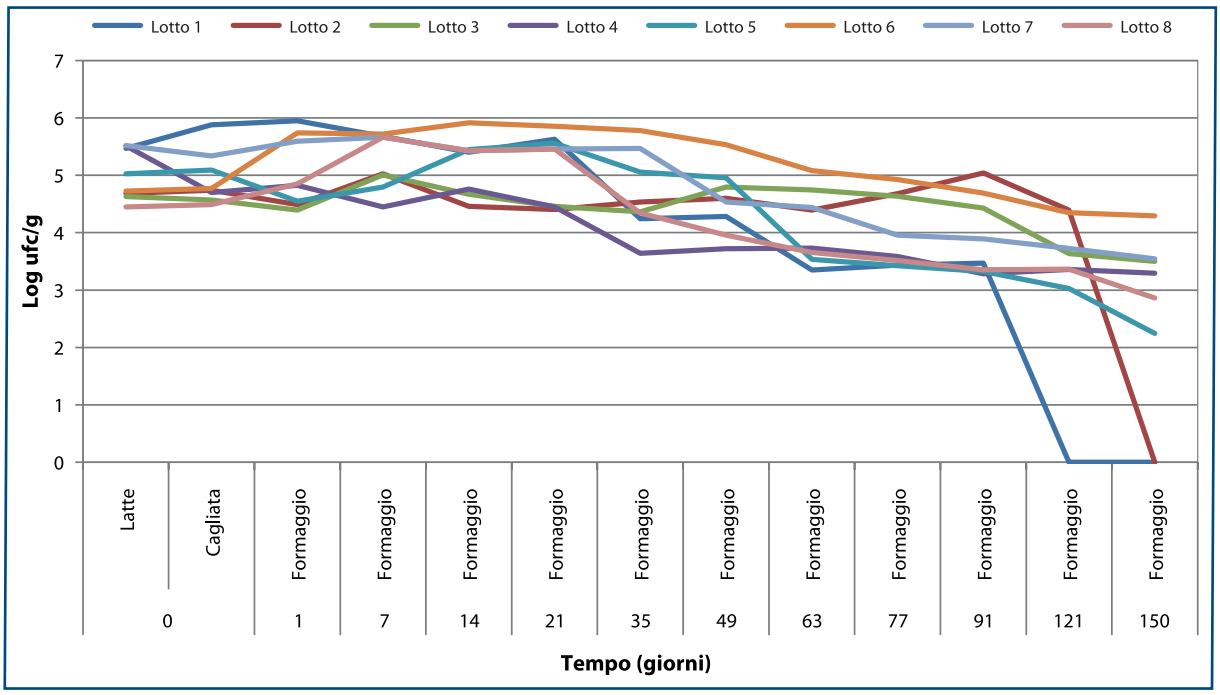


Figura 12. Rappresentazione grafica dell'andamento di muffe e lieviti negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente (ogni lotto è stato riportato singolarmente).



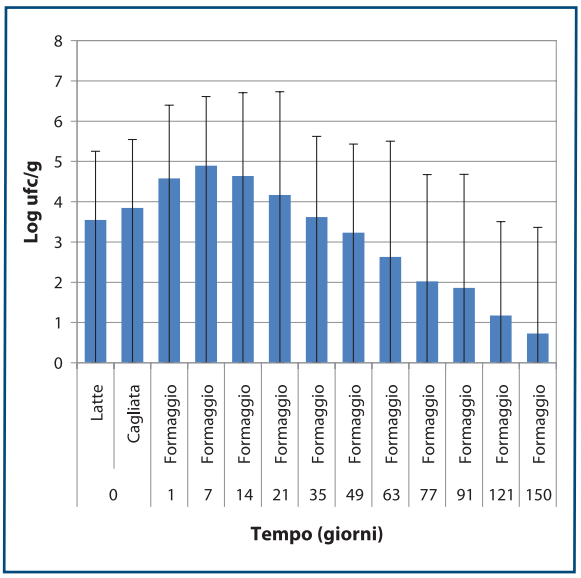
del LOD. Nei lotti 1 e 5 a T63 la concentrazione media è stata di 1,86 log_{10}UFC/g ± 0,69 log_{10}UFC/g, da T77 è scesa a valori al di sotto del LOD. Nel lotto 8 sono stati rilevati a T91 valori di 4,66 log_{10}UFC/g ± 0,02 log_{10}UFC/g, da T121 è scesa a valori al di sotto del LOD. Nel lotto 4 a T121 è stato riscontrato un valore medio di 2,56 log_{10}UFC/g ± 0,07 log_{10}UFC/g e un valore inferiore al LOD a T150. Nei lotti 2 e 7 sono state registrate concentrazioni medie di 2,90 log_{10}UFC/g ± 0,61 log_{10}UFC/g a T150 (Figure 13 e 14).

Lotti di contaminati

Numerazione Escherichia coli O157

Nel latte artificialmente contaminato la concentrazione media di *E. coli* O157 rilevata è stata, nei tre lotti, di 5,55 log_{10}UFC/ml ± 0,09 log_{10}UFC/ml (5,47 - 5,64), nella cagliata di 5,54 log_{10}UFC/g ± 0,13 log_{10}UFC/g (5,39 - 5,62). Nel formaggio è stato osservato un incremento della

Figura 13. Rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di stafilococchi coagulasi positivi negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola. Le barre degli istogrammi rappresentano i risultati medi, le barre lineari i valori minimo e massimo.

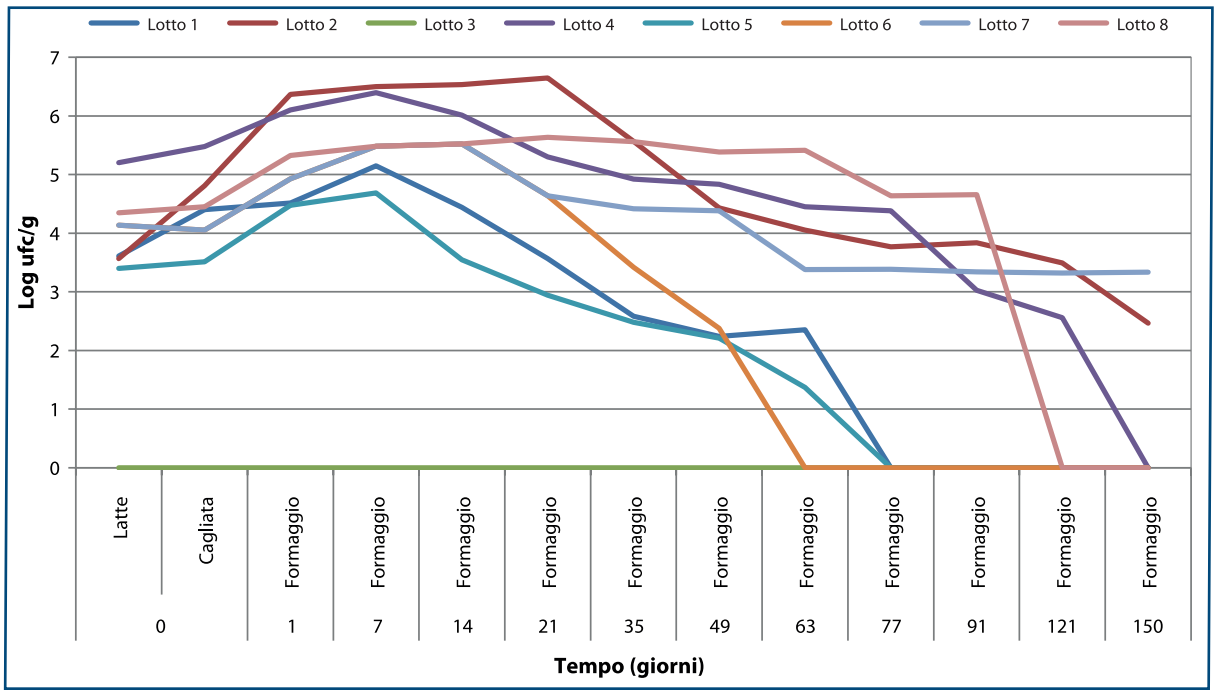


è stata di 5,54 ± 0,14 log_{10} UFC/ml (5,38 - 5,65), nella cagliata di 5,64 ± 0,23 log_{10} UFC/g (5,40 - 5,86). Nel formaggio, nel lotto 3 la concentrazione massima di 5,88 log_{10}UFC/g è stata rilevata a T1, nei lotti 1 e 2 è stata riscontrata a T14 ed è stata rispettivamente di 5,75 log_{10}UFC/g e 5,76 log_{10}UFC/g. Nel lotto 3 a T91 è stata rilevata una concentrazione di 2,94 log_{10}UFC/g, e una diminuzione fino a concentrazioni al di sotto del LOD da T121. Nei lotti 1 e 2 a T121 la concentrazione è risultata compresa tra 2,30 e 2,50 log_{10}UFC/g e a T150 al di sotto del LOD (Figura 16).

Numerazione Salmonella Typhimurium

Nel latte artificialmente contaminato la concentrazione media di *S. Typhimurium* è stata di 5,51 log_{10}UFC/ml ± 0,45log_{10}UFC/ml (5,00 - 5,85), nella cagliata di 5,37 log_{10}UFC/g ± 0,32 log_{10}UFC/g (5,02 - 5,66). Nel formaggio è stato rilevato un aumento della concentrazione fino ad un valore massimo di 6,89 log_{10}UFC/g a T7. Nel lotto 2 la concentrazione è diminuita fino ad un valore medio di 2,08

Figura 14. Rappresentazione grafica dell'andamento degli stafilococchi coagulasi positivi negli 8 lotti di controllo di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente (ogni lotto è stato riportato singolarmente).



concentrazione fino a T7/T14. La concentrazione massima di *E. coli* O157 è stata registrata nel lotto 1 a T1 ed è risultata pari a 7,71 log_{10}UFC/g ± 0,04 log_{10}UFC/g. In tutti e tre i lotti da T14 è stata osservata una progressiva diminuzione fino a valori inferiori al LOD da T121 (Figura 15).

Numerazione Listeria monocytogenes

Nel latte artificialmente contaminato la concentrazione media di *L. monocytogenes* log_{10}UFC/g a T77, da T91 è risultata al di sotto del LOD. Nei lotti 1 e 3 è stata registrata una diminuzione fino a T91 con valori di 2,14 e 2,69 log_{10}UFC/g rispettivamente, da T121 la concentrazione è stata inferiore al LOD (10UFC/g) (Figura 17).

Numerazione Staphylococcus aureus

Nel latte artificialmente contaminato la concentrazione media di *S. aureus* è stata

Figura 15. Rappresentazione grafica dell'andamento di *Escherichia coli* 0157 durante il periodo di stagionatura nei 3 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente e contaminati in laboratorio.

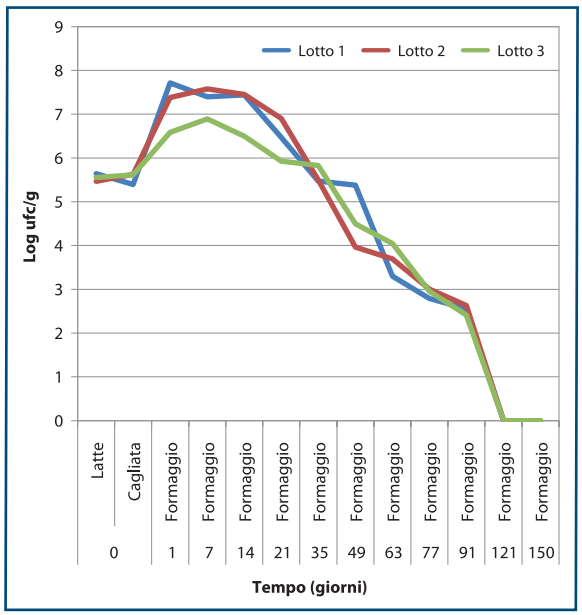


Figura 16. Rappresentazione grafica dell'andamento di *Listeria monocytogenes* durante il periodo di stagionatura nei 3 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente e contaminati in laboratorio.

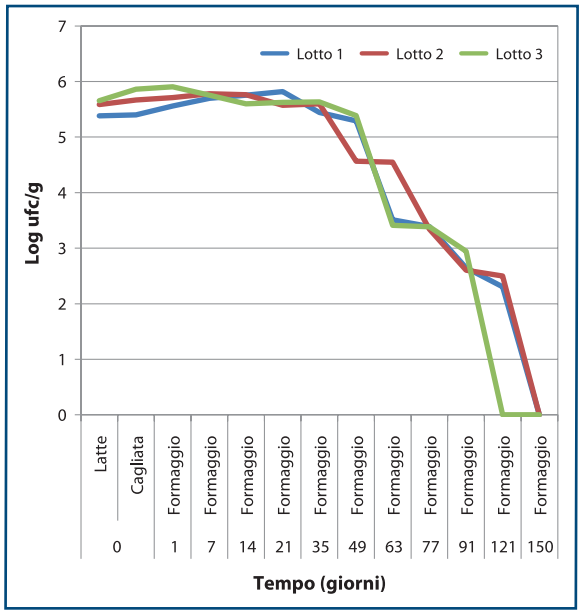


Figura 17. Rappresentazione grafica dell'andamento di *Salmonella* Typhimurium durante il periodo di stagionatura nei 3 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente e contaminati in laboratorio.

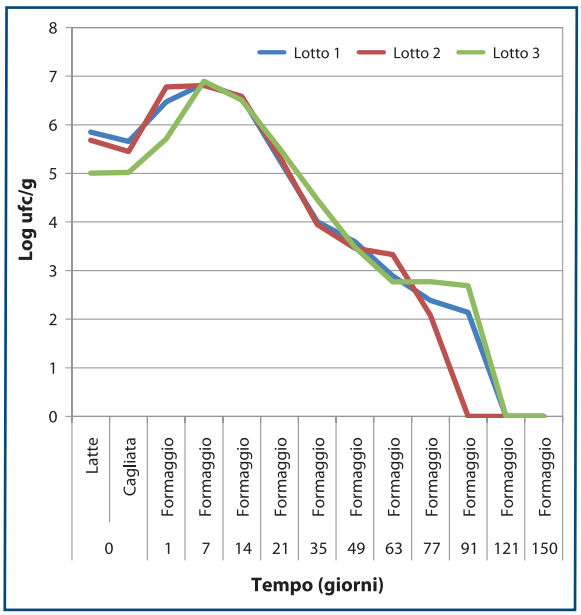
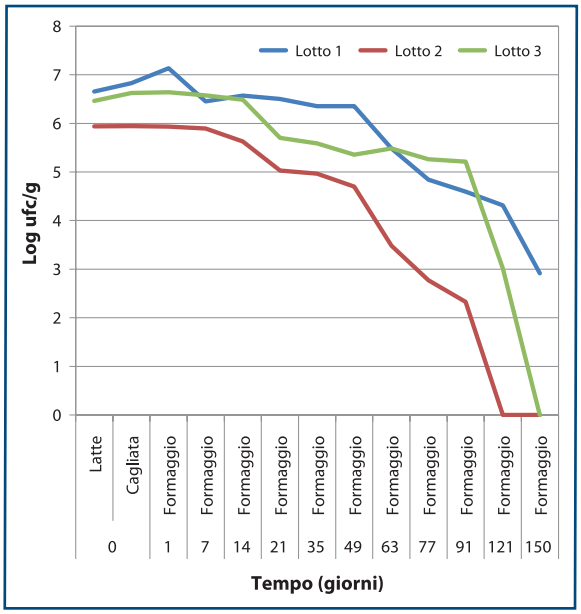


Figura 18. Rappresentazione grafica dell'andamento di *Staphylococcus aureus* durante il periodo di stagionatura nei 3 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente e contaminati in laboratorio.



di 6,35 log_{10}UFC/ml ± 0,37 log_{10}UFC/ml (5,94 - 6,66), nella cagliata di 6,47 log_{10}UFC/g ± 0,47 log_{10}UFC/g (5,94 - 6,83). Nel formaggio la concentrazione massima è stata rilevata nel lotto 1 a T1 con un valore di 7,13log_{10} UFC/g. Nel corso della stagionatura è stata registrata una diminuzione della concentrazione di *S. aureus* fino al di sotto del LOD nei lotti 2 e 3, rispettivamente a T121 e T150. Nel lotto 1 a T150 è stato registrato un valore pari a 2,92 log_{10}UFC/g (Figura 18).

Potenziale di crescita

In tutti i lotti di formaggi contaminati i valori δ ottenuti sono risultati inferiori a 0,5 log_{10}UFC/g. Pertanto, in corrispondenza delle fasi di stagionatura considerate, l'alimento ha mostrato di non supportare la crescita delle specie batteriche studiate inducendone, anzi, una progressiva riduzione come avvalorato dalla rilevazione di valori δ sempre negativi (Tabella 4).

Tabella 4. Potenziale di crescita (δ) di *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus* durante la stagionatura, nei tre lotti contaminati con ciascun microrganismo (L1, L2 e L3).

Giorni	***E. coli* 0157**						***L. monocytogenes***					
	L1		L2		L3		L1		L2		L3	
	log_{10} UFC/g	δ	log_{10} UFC/g	δ	log_{10} UFC/g	δ	log10 UFC/g	δ	log10 UFC/g	δ	log10 UFC/g	δ
T0	5,w61		5,48		5,57		5,36		5,57		5,59	
T60	3,30	-2,31	3,69	-1,79	4,04	-1,53	3,50	-1,85	4,53	-1,04	3,41	-2,19
T120	0*	-5,61	0*	-5,48	0*	-5,57	2,30	-3,06	2,50	-3,07	0*	-5,59
T150	0*	-5,61	0*	-5,48	0*	-5,57	0*	-5,36	0*	-5,57	0*	

Giorni	***S.* Thyphimurium**						***S.* aureus**					
	L1		L2		L3		L1		L2		L3	
	log10 UFC/g	δ	log10 UFC/g	δ	log10 UFC/g	δ	log10 UFC/g	δ	log10 UFC/g	δ	log10 UFC/g	δ
T0	5,83		5,67		5,00		6,65		5,94		6,48	
T60	2,87	-2,96	3,34	-2,33	2,78	-2,22	5,50	-1,15	3,48	-2,46	5,48	-1,00
T120	0*	-5,83	0*	-5,67	0*	-5,00	4,32	-2,33	0*	-5,94	3,02	-3,46
T150	0*	-5,83	0*	-5,67	0*	-5,00	2,91	-3,74	0*	-5,94	0*	-6,48

*Per l'esecuzione dei calcoli è stato inserito il valore 0 (zero) nel caso di risultato inferiore al LOD.

Discussione

Diversi studi sono stati pubblicati al fine di conoscere la flora microbica autoctona dei formaggi pecorini (31, 34, 37). Il presente studio riguarda il primo challenge test microbiologico sul Pecorino di Farindola. La valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche delle forme prodotte per l'esecuzione dei challenge test ha fornito risultati generalmente molto simili a quelli ottenuti nel lavoro: "Studio chimico-fisico e microbiologico del Pecorino di Farindola" di Migliorati *et al.* Nel presente studio, i valori medi di a_w sono stati inferiori a quanto osservato nel lavoro citato, valori comunque simili a quelli dei formaggi prodotti da una delle tre aziende prese in considerazione. Per quanto riguarda la numerazione di Enterobacteriaceae, Micrococcaceae, lieviti e muffe nel latte, i valori medi sono risultati leggermente più alti rispetto a quanto misurato in caseificio e alla vendita nel lavoro citato. Nei lotti artificialmente contaminati, in generale, è stata registrata una riduzione della concentrazione dei microrganismi patogeni durante la stagionatura fino a valori inferiori al LOD dei metodi utilizzati, con potenziali di crescita sempre negativi dai due mesi di stagionatura (tempo minimo di commercializzazione) in poi.

Nei lotti di formaggio contaminato con *E. coli* O157 nelle prime 24 ore dopo la caseificazione è stato osservato un incremento della carica seguito da una progressiva riduzione in accordo con quanto riscontrato da Kasrazadeh (25) in un lavoro effettuato su un tipico formaggio spagnolo ("queso fresco") contaminato artificialmente con *E. coli* O157:H7. Secondo gli autori, la crescita potrebbe essere legata alla mancanza di colture starter e alla presenza di valori di pH vicini alla neutralità, condizioni riferibili anche alle fasi iniziali della produzione del Pecorino di Farindola. Millet *et al.* (27) hanno rilevato, in altri formaggi a latte crudo, l'assenza di crescita di *L. monocytogenes* già dall'ottavo giorno di stagionatura. Tale inibizione potrebbe essere parzialmente attribuita alla diminuzione dell'attività dell'acqua e del pH e alla variazione del contenuto di acido lattico (36). Gli stessi autori non hanno osservato alcuna crescita di *L. monocytogenes* in formaggi con pH inferiore a 5,2 e con un contenuto di lattato di circa 14mg/g. Per quanto riguarda *S. Typhimurium*, nel presente studio è stato rilevato un aumento della concentrazione nelle primissime fasi di stagionatura, in accordo a quanto riscontrato da Leong *et al.* (26) in 6 diversi formaggi contaminati artificialmente. Similmente, Kasrazadeh *et al.* (24) hanno studiato la crescita di Salmonella inoculata in "queso fresco", stoccato a 20°C e hanno riportato una rapida crescita del microrganismo patogeno. Nel corso della stagionatura delle forme di Pecorino di Farindola contaminate è stata anche rilevata una diminuzione costante della concentrazione di *S. aureus*, nonostante l'alta tolleranza di questo microrganismo alla presenza di sale (26). Ingham *et al.* (5) hanno rilevato una maggiore tolleranza di *S. aureus* rispetto a *L. monocytogenes* ad alte percentuali saline e a bassi valori di a_w. In ogni caso, questi due microrganismi sono risultati quelli maggiormente persistenti nei formaggi contaminati nel presente studio, con riduzione delle concentrazioni al di sotto del LOD, solo a T150. Invece, la concentrazione di *E. coli* O157 e *S.* Typhimurium è diminuita fino a valori al di sotto del LOD dopo T121, mostrando una minore tolleranza all'ambiente altamente salino e leggermente acido del Pecorino di Farindola. E' chiaro che, i cambiamenti di pH e di a_w durante la

stagionatura dei formaggi hanno influenzato la crescita dei microrganismi patogeni, in accordo a quanto riscontrato in uno studio effettuato su 67 diversi tipi di formaggio (26). Anche lo sviluppo di specifici batteri, come i Lattobacilli, e la produzione di composti antimicrobici (es. batteriocine) potrebbero aver ostacolato la crescita dei microrganismi patogeni (26).

Conclusioni

Lo studio ha permesso di ottenere informazioni rilevanti sulla sicurezza del Pecorino di Farindola, in relazione alla sua capacità di supportare o meno la moltiplicazione di quattro specie batteriche patogene per l'uomo. Nonostante le peculiari condizioni di lavorazione e stagionatura del prodotto si siano dimostrate sfavorevoli alla sopravvivenza e proliferazione dei microrganismi considerati, è necessario sottolineare l'importanza della salubrità della materia prima per la produzione di un alimento sicuro per il consumatore. Al fine di integrare quanto raccolto in relazione alla persistenza batterica, sarebbero utili ulteriori studi sulla prevalenza di contaminazione dei microrganismi patogeni dalla produzione alla vendita, in modo da poter progettare nuove prove di challenge test che riproducano i reali livelli di contaminazione.

Bibliografia

1. Aureli P., A. Fiore, C. Scalfaro e G. Franciosa, 2008. Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 08/36).
2. Decreto Ministeriale 26 marzo 1992. Attuazione della decisione n. 91/180/CEE concernente la fissazione di metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente. (GU Serie Generale n.90 del 16-4-1992 - Suppl. Ordinario n. 67).
3. Donnelly C.W., 2004. Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese, Chapter 18 in P.F. Fox, P.L.H. Mc Sweeney, T.M. Cogan and T.P. Guinee (eds.). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 3rd ed. Volume 1. Elsevier, NY.
4. EURL Lm Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods - Version 3 - 6 June 2014.
5. Ingham S.C., G. Searls, S. Mohanan and D.R. Buege, 2006. Survival of *Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef jerky and related products stored at 21uC. J. Food Prot., 69: 2263-2267.
6. International Organization for Standardization (ISO), 1996. ISO 11290-1:1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes - Part 1: Detection method.
7. International Organization For Standardization (ISO), 1998. ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 degrees C.
8. International Organization for Standardization (ISO), 1998. ISO 11290-2:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method.
9. International Organization For Standardization (ISO), 1999. ISO 6888-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) - Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.
10. International Organization for Standardization (ISO), 1999. ISO6887-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
11. International Organization for Standardization (ISO), 2001. ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Escherichia coli O157.
12. International Organization for Standardization (ISO), 2002. ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*
13. International Organization For Standardization (ISO), 2003. ISO 4833-1:2003. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique.
14. International Organization for Standardization (ISO), 2003. ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003 Inclusion of precision data.
15. International Organization for Standardization (ISO), 2004. ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.
16. International Organization for Standardization (ISO), 2004. ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004. Modification of the enumeration medium.
17. International Organization for Standardization (ISO), 2004. ISO 6579:2002/Cor 1:2004.
18. International Organization for Standardization (ISO), 2004. ISO21528-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method.

19. International Organization For Standardization (ISO), 2008. ISO21527-1:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.
20. International Organization for Standardization (ISO), 2008. ISO21527-2:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95.
21. International Organization For Standardization (ISO), 2008. ISO707:2008(E) Milk and milk products - Guidance on sampling.
22. International Organization For Standardization (ISO), 2010. ISO6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
23. International Organization For Standardization (ISO), 2004. ISO 21807:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Determination of water activity.
24. Kasrazadeh, M. and C. Genigeorgis, 1994. Potential growth and control of Salmonella in soft Hispanic type cheese. Int. J. Food Microbiol., 22: 127-140.
25. Kasrazadeh, M. and C. Genigeorgis, 1995. Potential growth and control of Escherichia coli O157:H7 in soft Hispanic type cheese. Int. J. Food Microbiol., 25: 289-300.
26. Leong W. M., R. Geier, S. Engstrom, S. Ingham, B. Ingham and M. Smukowski, 2014. Growth of *Listeria monocytogenes, Salmonella spp., Escherichia coli* O157:H7 *and Staphylococcus aureus* on Cheese during extended storage at 25°C. J. Food Protect., 77 (8): 1275-1288.
27. Millet L., M. Saubusse, R. Didienne, L. Tessier and M.C. Montel, 2006. *Control of Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. Int. J. Food Microbiol., 108: 105 - 114.
28. Moosavy M.H., S. Esmaeili, E. Mostafavi, F.B. Amiri, 2014. Isolation of *Listeria monocytogenes* from milks used for Iranian traditional cheese in Lighvan cheese factories. Ann. Agric. Environ. Med., 21(4): 728-729.
29. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods 2010. Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. J Food Prot., 73(1): 140-202.
30. Nordic Committee on Food Analysis. 2004. NMKL 68. *Enterococcus*. Determination in foods and feeds. Enterococcus. NMKL Edition: 2004, 4th ed.
31. Randazzo C.L., R.T. La Cava, C. Restuccia, A.D. Romano e C. Caggia, 2003. Evoluzione della popolazione microbica durante il processo di caseificazione. Scienza e tecnica lattiero casearia, 54 (1): 5-21.
32. Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. OJ L 338, 22.12.2005, p. 1-26.
33. Ross T., 2011. Challenge Testing of Microbiological Safety of Raw Milk Cheeses: The Challenge Trial Toolkit. MAF Technical Paper No: 2011/51. http://www.foodsafety.govt.nz/science/research-projects/reports-projects/ (Consultato il 22 maggio 2015)
34. Schirone M., R. Tofalo, G. Mazzone, A. Corsetti and G. Suzzi, 2011. Biogenic aminecontent and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. Food Microbiol., 28: 128-136.
35. Scott V.N., K.M. J. Swanson, T.A. Freier, W. P. Jr. Pruett, W. H. Sveum, P.A. Hall, L.A. Smoot and D.G. Brown, 2005. Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. Food. Prot. Trends, 15: 818-825.
36. Tienungoon S., D.A. Ratkowsky, T.A. McMeekin and T. Ross, 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. Appl. Environ. Microbiol., 66: 4979-4987.
37. Tofalo R., M. Schirone, G. Fasoli, G. Perpetuini, F. Patrignani, A.C. Manetta, R. Lanciotti, A. Corsetti, G. Martino and G. Suzzi, 2015. Influence of pig rennet on proteolysis, organic acids content and microbiota of Pecorino di Farindola, a traditional Italian ewe's raw milk cheese. Food Chem., 175: 121-127.

Pecorino di Farindola prodotto in laboratorio: capacità dei probiotici di inibire la crescita di *Escherichia coli* O157 e *Listeria monocytogenes*

Patrizia Tucci, Luigi Iannetti, Gabriella Centorotola, Diana Neri, Francesco Pomilio, Anna Franca Sperandii, Giacomo Migliorati

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, Teramo, 64100 - Italia
Corrispondenza: Patrizia Tucci, p.tucci@izs.it

Parole chiave
Biocompetizione, Challenge test, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, Pecorino di Farindola.

Riassunto
Lo studio ha previsto l'esecuzione di challenge test di processo impiegando nel siero-innesto ceppi batterici derivati dalla microflora naturalmente presente nel Pecorino di Farindola, che nelle fasi del progetto dedicate alla caratterizzazione microbiologica avevano mostrato, in vitro, di possedere caratteristiche probiotiche. Sono stati prodotti lotti di formaggio pecorino contaminati artificialmente con *Escherichia coli* O157 e con *Listeria monocytogenes*, con e senza l'aggiunta di due ceppi di *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* capaci di resistere a pH acidi e alla bile, capacità adesiva ai villi intestinali su cellule $CaCo_2$ e produzione di batteriocine. Le concentrazioni delle specie batteriche patogene hanno presentato una riduzione con il progredire della stagionatura, più accentuata nei lotti di pecorino prodotti con l'aggiunta dell'innesto. La diminuzione delle concentrazioni di *L. monocytogenes* e di *E. coli* O157 a valori al di sotto del limite di rilevabilità del metodo (10UFC/g), è stata rilevata al giorno (T) 88 nel lotto prodotto con l'aggiunta di innesto, mentre nel lotto prodotto senza l'aggiunta dell'innesto a T88 i patogeni hanno presentato valori di 2,5 log_{10}UFC/g. Il Pecorino di Farindola "fortificato" con i ceppi probiotici autoctoni ha pertanto dimostrato di contrastare attivamente la proliferazione e sopravvivenza dei microrganismi patogeni considerati.

Introduzione

La qualità e l'identità di un prodotto tradizionale quale il Pecorino di Farindola devono essere valutate anche attraverso la raccolta di dati ed elementi oggettivi in grado di documentare scientificamente i "valori" positivi intrinseci all'alimento. Tra questi elementi è senza dubbio da annoverare la presenza di microrganismi biocompetitivi nei confronti di agenti patogeni. Nel corso degli ultimi decenni i cambiamenti dello stile di vita hanno spinto la maggior parte dei produttori del settore alimentare ad introdurre in commercio alimenti funzionali. Si tratta di alimenti che, oltre ai nutrienti tradizionali, contengono anche alcuni componenti di promozione della salute, quali i probiotici (20). La FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) e la WHO (World Health Organization) definiscono i probiotici come "microorganismi vivi che somministrati in quantità adeguate conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite" (4). Lo studio ha avuto l'obiettivo di verificare la capacità di determinati batteri, naturalmente presenti nel formaggio, di inibire la crescita di microrganismi patogeni e di apportare elementi funzionali al prodotto. Due ceppi di *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* (IZSAM_LAB_B e IZSAM_LAB_AS48), isolati da Pecorino di Farindola in un precedente lavoro "Studio chimico-fisico e microbiologico del Pecorino di Farindola" di Migliorati et al. (in pubblicazione) e sottoposti a specifiche prove di caratterizzazione hanno mostrato caratteristiche probiotiche come resistenza a pH e bile, capacità adesiva ai villi intestinali su cellule $CaCo_2$ e produzione di batteriocine. In particolare, uno dei ceppi è risultato portatore del gene codificante per la batteriocina entAS48 e uno per la batteriocina entB.
Nello studio si è provveduto all'esecuzione di un *challenge test* di processo, sottoponendo a contaminazione artificiale il latte utilizzato per la produzione di Pecorino di Farindola e impiegando nell'innesto i due ceppi di *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* che in vitro hanno mostrato caratteristiche probiotiche. La procedura adattata ha avuto il fine di verificare nel prodotto l'effettiva possibilità di contrastare lo sviluppo e la sopravvivenza di microrganismi patogeni mediante la produzione di un formaggio "fortificato" con batteri probiotici. Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e

tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Materiali e metodi

Produzione formaggio

Sono stati prodotti due lotti di formaggio Pecorino di Farindola: un lotto contaminato artificialmente con *Escherichia coli* O157 e con *Listeria monocytogenes*, l'altro con *E. coli* O157, *L. monocytogenes,* e colture di *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Per la produzione di 26 forme di pecorino (circa 47 kg di formaggio) sono stati acquistati 300 litri di latte. Il processo produttivo tipico del Pecorino di Farindola è stato riprodotto in laboratorio sulla base delle informazioni ottenute dai sopralluoghi effettuati in un precedente lavoro "Studio del processo di produzione del Pecorino di Farindola" di Migliorati et al. (in pubblicazione). Dopo il trasferimento del latte crudo in caldaia sono state aggiunte, solo per la produzione con innesto, colture preparate con i ceppi IZSAM_LAB_B e IZSAM_LAB_AS48 (concentrazione 8,18 $\log_{10}$ UFC/ml). Il latte è stato quindi riscaldato a 35°C ± 2°C e aggiunto il caglio suino (2,5ml/l). La precipitazione della caseina, con formazione del coagulo, è stata ottenuta in circa 40 minuti. Si è proceduto alla rottura della cagliata con lira meccanica e la stessa è stata lasciata riposare per circa 10 minuti. Per dare maggiore consistenza alla pasta, la temperatura è stata innalzata di 2°C (temperatura di 37°C ± 2°C) per 5 minuti. La cagliata è stata, in seguito, trasferita in stampo (fuscella da 2kg) e, dopo le fasi di spurgo e pressatura manuale, le forme sono state salate a secco e poste a stagionare su ripiani di legno all'interno di camere climatiche (Piardi™ CC2000, Castenedolo, Italia) a 18°C ± 1°C e umidità relativa del 65%, per un tempo di 148 giorni.

Ceppi batterici e preparazione dell'inoculo

Le sospensioni di inoculo per la contaminazione sono state allestite utilizzando, per ognuno dei 2 microrganismi patogeni, un ceppo di riferimento (ATCC) e un ceppo isolato da una matrice simile (prodotto lattiero-caseario) (Tabella 1). Per la preparazione dell'innesto sono stati utilizzati due ceppi di *Lattobacillus paracasei subsp. paracasei* (IZSAM_LAB_B e IZSAM_LAB_AS48), isolati da Pecorino di Farindola, di cui sono state precedentemente dimostrate le caratteristiche probiotiche e la capacità di produrre batteriocine.

Tabella 1. Ceppi impiegati per l'allestimento delle sospensioni.

Escherichia coli 0157	*Listeria monocytogenes*	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
ATCC25952 (materiale di riferimento)	ATCC7644 (materiale di riferimento)	IZSAM_LAB_B
EURL E. coli C07	EU-RL 12M0B098LM	IZSAM_LAB_AS48

La preparazione delle sospensioni di inoculo dei ceppi patogeni è stata effettuata in accordo con le linee guida EURL Lm Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods - Version 3 - 6 June 2014 (3). I ceppi, conservati in Microbank™ (Pro-LAB Diagnostics, Richmond-Hill, Canada) a -70°C, sono stati singolarmente rivitalizzati a 37°C ± 1 C per 18h ± 1h in Brain Heart Infusion (BHI). Al fine di ottenere seconde brodoculture distinte e adattate alle caratteristiche del prodotto e alla temperatura di lavorazione del latte (35°C ± 2°C), sono state allestite nuove subcolture alle condizioni di adattamento in BHI modificato (pH 6,70 ± 0,2) incubate a 35°C ± 2°C per 24h ± 1h, fino al raggiungimento della fase stazionaria di ciascun ceppo batterico. Le sospensioni dei microrganismi patogeni sono state successivamente diluite per ottenere nel latte una concentrazione di 10^3UFC/ml (Tabella 2). La miscela dei ceppi di Lattobacilli è stata preparata con la stessa modalità dei microrganismi patogeni e inoculata al latte in modo da avere una concentrazione finale di 10^6UFC/ml nel prodotto. Il titolo delle sospensioni di inoculo è stato valutato con conta in piastra su terreno selettivo specifico.

Tabella 2. Concentrazione media delle sospensioni di inoculo di *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* espresse in log10 UFC/ml.

Lotto	*Escherichia coli* 0:157	*Listeria monocytogenes*	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
Senza innesto	5,33	5,51	Non aggiunto
Con innesto	5,63	5,44	8,18

Modalità di contaminazione

In entrambi i lotti la contaminazione con i microrganismi patogeni è avvenuta in caldaia aggiungendo a 100 litri di latte 1 litro di sospensione costituita da parti uguali di *L. monocytogenes* e di *E. coli* O157 in modo tale da non superare l'1% del volume di materia prima. Anche la sospensione di innesto composta da parti uguali dei due ceppi di *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* è stata aggiunta prima del riscaldamento del latte a 37°C ± 1°C.

Campionamento e determinazioni analitiche

Il latte impiegato è stato testato per la presenza di *L. monocytogenes* e *E. coli* O157. Il campionamento è stato effettuato a tempi prestabiliti, fino T148. Sia nel formaggio con innesto che in quello privo, sono stati analizzati latte e cagliata a T0 e i formaggi a T2, T7, T14, T17, T21, T23, T28, T37, T46, T58, T88, T118 e T148. Le determinazioni analitiche previste per ogni tempo di prelievo e per ogni lotto sono riportate in Tabella 3. Per le analisi chimico-fisiche e microbiologiche, e per ogni tempo di prelievo, è stata prelevata una forma intera sottoposta a tutte le determinazioni eseguite in triplicato. I prelievi sono statati effettuati preparando un quantitativo pari a 100 g di campione, ottenuto prelevando dall'intera forma diverse porzioni di parte edibile di circa 5 g ognuna. Il tutto è stato sottoposto a omogeneizzazione mediante Grindomix™ GM 200 (Retsch, Haan Germania). L'aliquota da sottoporre a prova, la sospensione iniziale e le diluizioni decimali sono state preparate secondo le norme ISO 6887-1:1999 (8), ISO 6887-5:2010(E) (16) e ISO 707:2008(E) (15).

Risultati

Nel latte impiegato per la produzione dei lotti di Pecorino di Farindola, i microrganismi patogeni considerati sono risultati assenti in 25 ml di campione analizzato. Di seguito sono riportati i risultati delle determinazioni eseguite sui 2 lotti (con innesto e senza innesto). I valori espressi in log_{10} (UFC/g o UFC/ml) sono relativi alla media delle tre determinazioni eseguite su ciascun campione.

Determinazione attività dell'acqua (a_w)

I risultati relativi alle determinazioni dell'attività dell'acqua (a_w) dei due lotti sono riportati in Figura 1. Il valore medio di a_w della cagliata del lotto con innesto è stato 0,992 ± 0,005 (0,988 - 0,997), quello della cagliata del lotto senza innesto di 0,994 ± 0,004 (0,989 - 0,997). Nei formaggi del lotto senza innesto è stato rilevato il valore medio a T2 di 0,966 ± 0,001 (0,965-0,966); l'a_w è diminuita fino a un valore medio di 0,819 ± 0,001 (0,818-0,820) a T148. Nel lotto con innesto è stato osservato un valore medio di a_w di 0,957 a T2 per giungere a 0,821 ± 0,001 (0,821 - 0,822) a T148.

Determinazione pH

I risultati relativi alle determinazioni del pH sono riportati in Figura 2. In entrambi i lotti, il valore medio di pH nel latte è stato di 6,85 ± 0,05 (6,79 - 6,88), nella cagliata di 6,74 ± 0,01 (6,73 - 6.74). Nel formaggio il valore medio di pH è stato di 6,61 ± 0,01 (6,60 - 6,61) a T2 in entrambi i lotti. A T148 nel lotto senza innesto sono stati rilevati valori medi di 5,46 ± 0,03 (5,43 -5,48), nel lotto con innesto di 5,26 ± 0,01 (5,25 - 5,26).

Numerazione Enterococchi

I risultati della numerazione degli Enterococchi sono riportati in Figura 3. La concentrazione media rilevata nel latte del lotto con innesto è stata di

Tabella 3. Determinazioni chimico-fisiche e microbiologiche effettuate sui lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente.

Accertamento	Metodo	Materia prima (latte)	Formaggio
Ricerca *L. monocytogenes*	ISO 11290-1:96/Amendment 1:2004 (5, 12)	x	
Ricerca *E. coli* 0:157	ISO 16654:2001(10)	x	
Determinazione attività dell'acqua	ISO 21807:2004 (14)		x
Determinazione pH	Metodo interno (pHmeter Seven Easy Mettler Toledo)		x
Numerazione Enterococchi	NMKL No. 68, 4th Ed. 2004 (19)		x
Numerazione Lattobacilli a 30°C in aerobiosi	ISO 15214:1998 (6)		x
Numerazione Lattococchi	Rapporti ISTISAN 08/36 (1)		x
Numerazione stafilococchi coagulasi positivi (SCP)	ISO 6888-2:1999/Amendament 1:2003 (9, 11)		x
Numerazione *E. coli* 0157	Metodo interno (SMAC agar e CT-SMAC agar, 37 ± 1°C per 48 ± 3 h)		x
Numerazione *L. monocytogenes*	ISO11290-2:1998/ Amendment 1:2004 (7, 13)		x

Figura 1. Rappresentazione grafica dei risultati dell'attività dell'acqua (a_w) nei 2 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente con innesto e senza innesto.

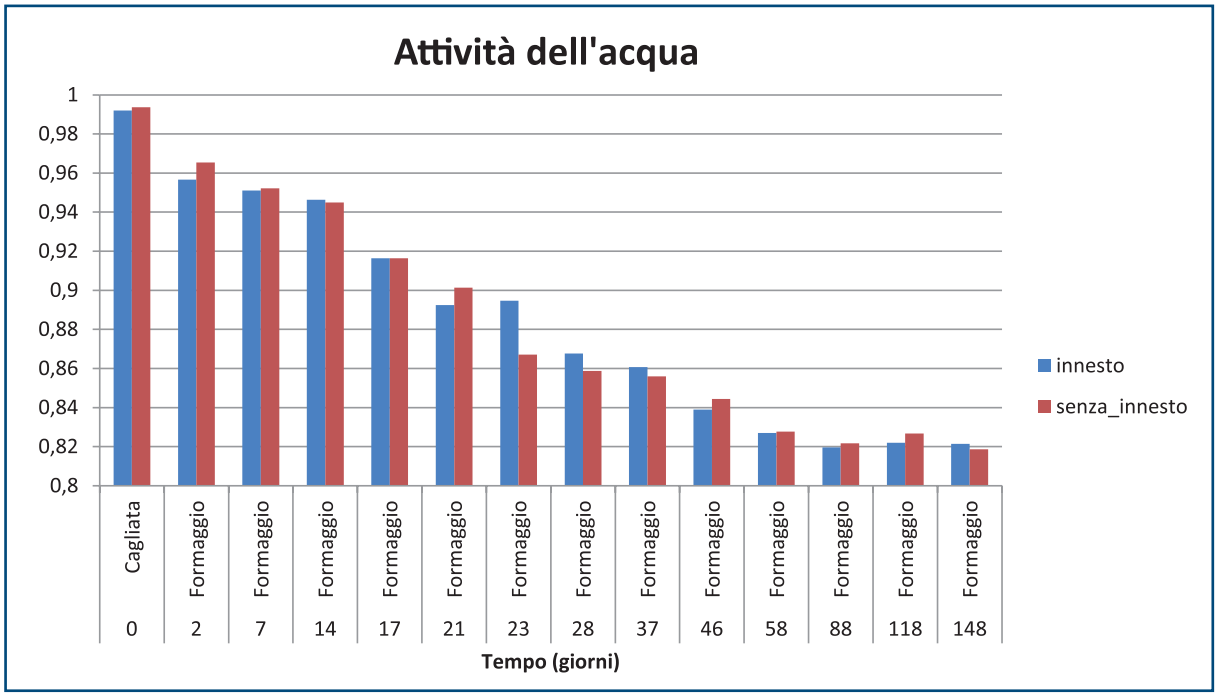
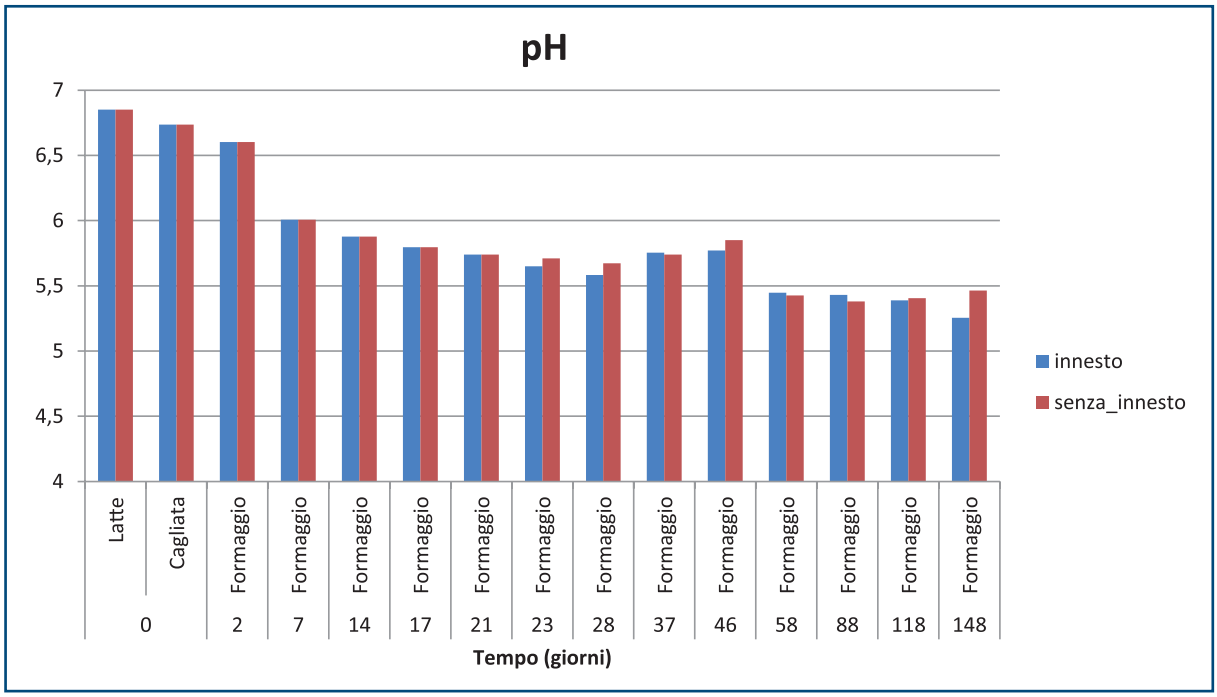
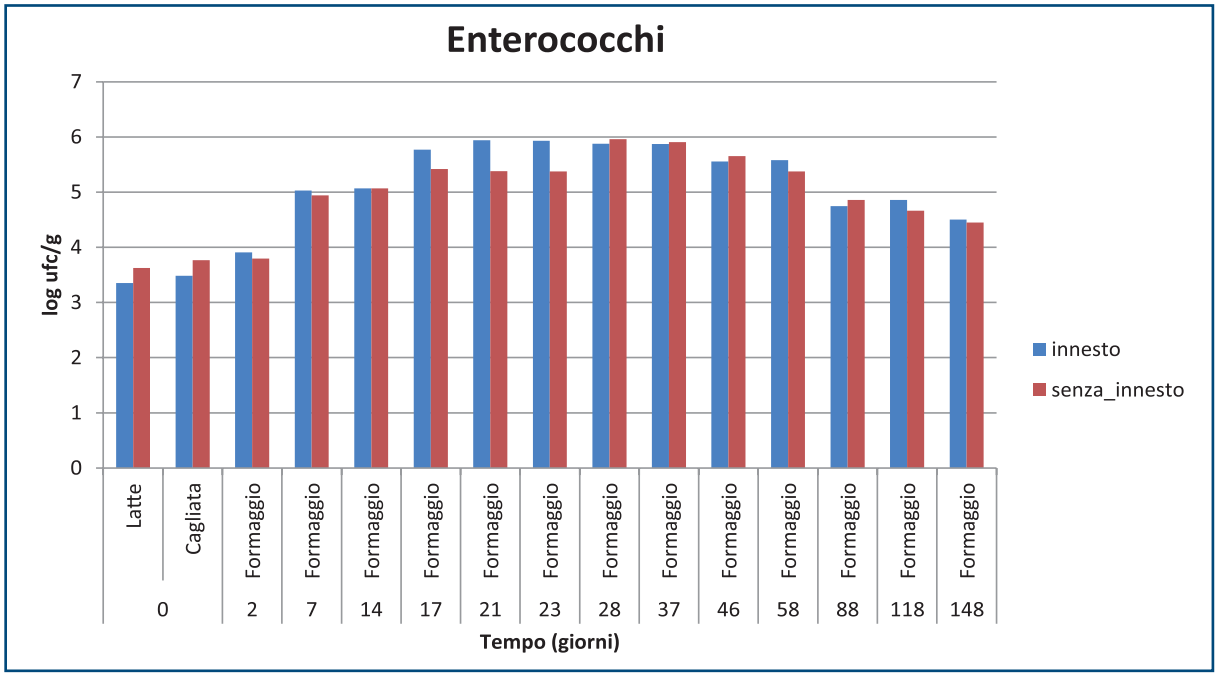


Figura 2. Rappresentazione grafica dei risultati relativi al pH nei 2 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente con innesto e senza innesto.



3,35 log_{10}UFC/ml ± 0,03 log_{10}UFC/ml (3,32 - 3,37), nel lotto senza innesto di 3,62 log_{10}UFC/ml ± 0,02 log_{10}UFC/ml (3,61 - 3,65). La concentrazione media di Enterococchi nella cagliata del lotto con innesto è stata di 3,48 log_{10}UFC/g ± 0,03 log_{10}UFC/g (3,46 - 3,51), nel lotto senza innesto di 3,77 log_{10}UFC/g ± 0,03 log_{10}UFC/g (3,74 - 3,79). Nel formaggio a T2, nel lotto con innesto la concentrazione media è stata di 3,91 log_{10}UFC/g ± 0,01 log_{10}UFC/g (3,90 - 3,91), nel lotto senza innesto è stata di 3,80 log_{10}UFC/g ± 0,02 log_{10}UFC/g (3,78 - 3,82). Nel lotto senza innesto, la concentrazione massima è stata osservata a T28 ed è risultata in media di 5,96 log_{10}UFC/g ± 0,03 log_{10}UFC/g (5,94 - 5,99). Nel lotto con innesto la concentrazione massima è stata osservata a T21 ed è risultata in media di 5,94 log_{10}UFC/g ± 0,02 log_{10}UFC/g (5,93 - 5,96). A T148, nel lotto con innesto la concentrazione media è stata di 4,50 log_{10} UFC/g ±

Figura 3. Rappresentazione grafica dei risultati della numerazione degli Enterococchi nei 2 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente con innesto e senza innesto.

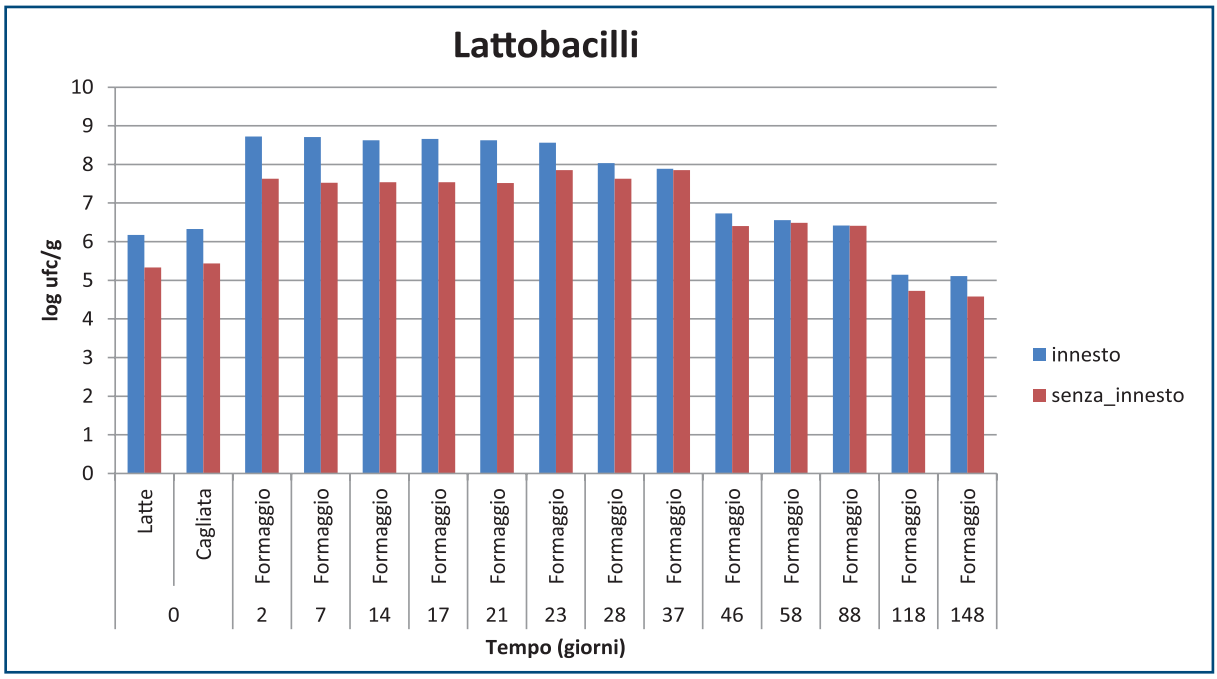


0,15 log_{10}UFC/g (4,34 - 4,64), nel lotto senza innesto di 4,45 log_{10}UFC/g ± 0,10 log_{10}UFC/g (4,36 - 4,55).

Numerazione Lattobacilli

I risultati della numerazione dei Lattobacilli sono riportati in Figura 4. Nel latte senza innesto, la concentrazione media di Lattobacilli è stata di 5,33 log_{10}UFC/ml ± 0,02 log_{10}UFC/ml (5,32 - 5,36), nel latte con innesto di 6,18 log_{10}UFC/ml ± 0,05 log_{10}UFC/ml (6,13 - 6,22). La concentrazione media di Lattobacilli nella cagliata del lotto con innesto è stata di 6,33 log_{10}UFC/g ± 0,04 log_{10}UFC/g (6,28 - 6,36), in quella del lotto senza innesto è stata di 5,44 log_{10}UFC/g ± 0,05 log_{10}UFC/g (5,39 - 5,48). Nel formaggio prodotto con l'aggiunta di innesto la concentrazione massima è risultata 8,73 log_{10}UFC/g ± 0,02log_{10}UFC/g (8,71 - 8,75) ed è stata raggiunta a T2, nel formaggio prodotto

Figura 4. Rappresentazione grafica dei risultati della numerazione dei Lattobacilli nei 2 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente con innesto e senza innesto.



senza l'aggiunta dell'innesto il valore massimo è stato rilevato a T23 ed è stato di 7, 85 log_{10}UFC/g ± 0,03 log_{10}UFC/g (7,83 - 7,88). A T148 sono stati rilevati valori medi di 5,11 log_{10}UFC/g ± 0,03log_{10}UFC/g (5,08 - 5,14) nel formaggio con innesto e di 4,58 log_{10}UFC/g ± 0,06log_{10}UFC/g (4,51 – 4,61) nel formaggio senza innesto.

Numerazione Lattococchi

I risultati relativi alla numerazione dei Lattococchi sono riportati in Figura 5. La concentrazione media nel latte, dopo l'aggiunta di innesto, è stata di 6,33 log_{10}UFC/ml ± 0,01 log_{10}UFC/ml (6,32 - 6,34), nel latte senza innesto di 5,55 log_{10}UFC/ml ± 0,02 log_{10}UFC/ml (5,54 - 5,58). Nella cagliata i valori medi sono stati di 6,53 log_{10}UFC/g ± 0,03 log_{10}UFC/g (6,50 - 6,55) e 5,61 log_{10}UFC/g ± 0,02 log_{10}UFC/g (5,59 - 5,63), rispettivamente, nel lotto con e senza innesto. Nel formaggio senza innesto la concentrazione massima di Lattococchi è stata di 8,72 log_{10}UFC/g ± 0,02 log_{10}UFC/g (8,71 - 8,74) a T7, in quello con innesto di 8,78 log_{10}UFC/g ± 0,02 log_{10}UFC/g (8,76 - 8,80) a T14. A T148 il valore medio riscontrato è stato di 5,68 log_{10}UFC/g ± 0,06log_{10}UFC/g (5,62 – 5,74) nel pecorino con innesto e di 5,27 log_{10}UFC/g ± 0,07log_{10}UFC/g (5,19 – 5,32) in quello senza innesto.

Numerazione stafilococchi coagulasi positivi

I risultati della numerazione di stafilococchi coagulasi postivi sono riportati in Figura 6. Il valore medio rilevato nel latte con innesto è stato di 4,42 log_{10}UFC/ml ± 0,03 log_{10}UFC/ml (4,39 - 4,45), nel latte senza innesto di 4,48 log_{10}UFC/ml. Nella cagliata, il valore medio è stato di 4,51 log_{10}UFC/g ± 0,04 log_{10}UFC/g (4,48 - 4,55) sia per il lotto con innesto che per quello senza innesto. Il valore massimo della concentrazione di stafilococchi coagulasi positivi nel formaggio è stato rilevato a T2, con un valore medio di 5,02 log_{10}UFC/g ± 0,03 log_{10}UFC/g (5,00 - 5,05), sia nel campione con innesto che in quello senza innesto. A T88 il valore medio è stato di 3,32 log_{10}UFC/g ± 0,09 log_{10}UFC/g (3,26 - 3,39) nel prodotto con innesto e di 3,47 log_{10}UFC/g ± 0,04log_{10}UFC/g (3,44 - 3,51) in quello senza innesto. La concentrazione di staflococchi coagulasi positivi a T148 ha raggiunto, in entrambi i lotti, valori medi al di sotto del limite di rilevabilità del metodo(LOD) (10UFC/g).

Numerazione *Escherichia coli* O157

I risultati della numerazione di *E. coli* O157 sono riportati in Figura 7. Nel latte con innesto, la concentrazione media di *E. coli* O157 è stata di 3,63 log_{10}UFC/ml ± 0,02 log_{10}UFC/ml (3,61 - 3,65), nel latte senza innesto di 3,77 log_{10}UFC/ml ± 0,02 log_{10}UFC/ml (3,75 - 3,79). Nella cagliata del lotto con aggiunta di innesto sono stati rilevati valori medi di 3,41 log_{10}UFC/g ± 0,05 log_{10}UFC/g (3,36 - 3,45), in quella del lotto senza innesto di 3,49 log_{10}UFC/g ± 0,04 log_{10}UFC/g (3,45 -3,53). Dopo un iniziale incremento, fino ad un valore massimo di 4,01 log_{10}UFC/g ± 0,02 log_{10}UFC/g (4,00 - 4,03) a T2 nel formaggio con innesto e di 4,05 log_{10}UFC/g ± 0,02 log_{10}UFC/g (4,03

Figura 5. Rappresentazione grafica dei risultati della numerazione dei Lattococchi nei 2 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente con innesto e senza innesto.

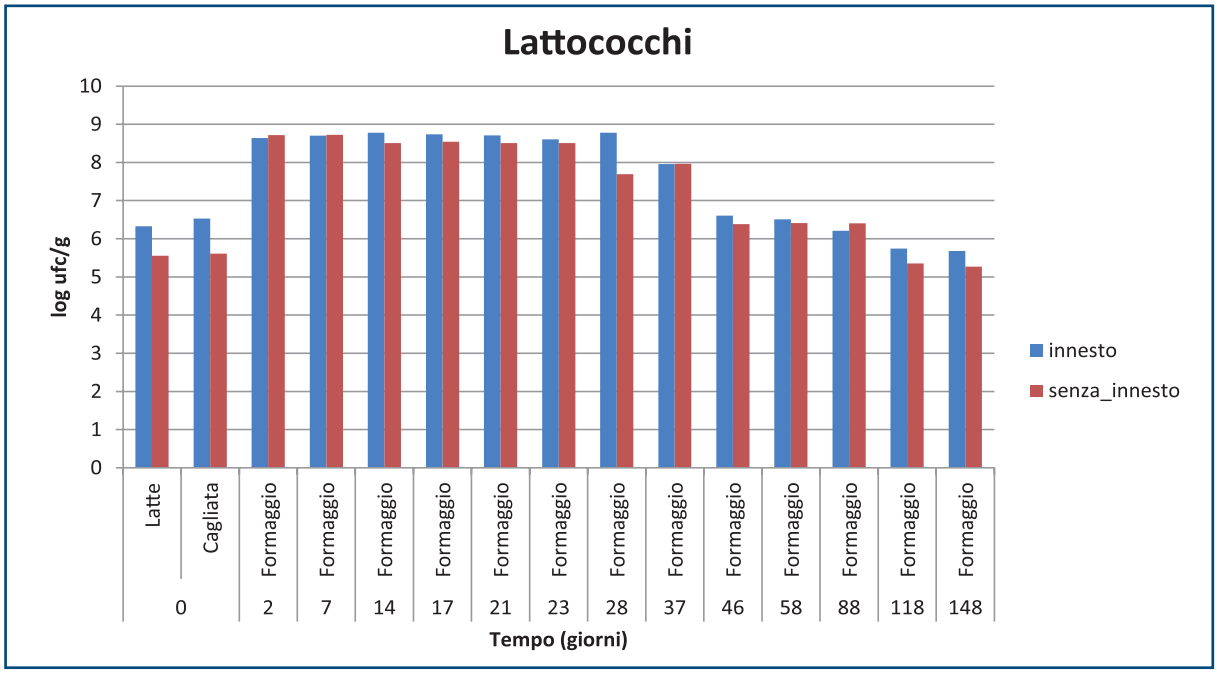
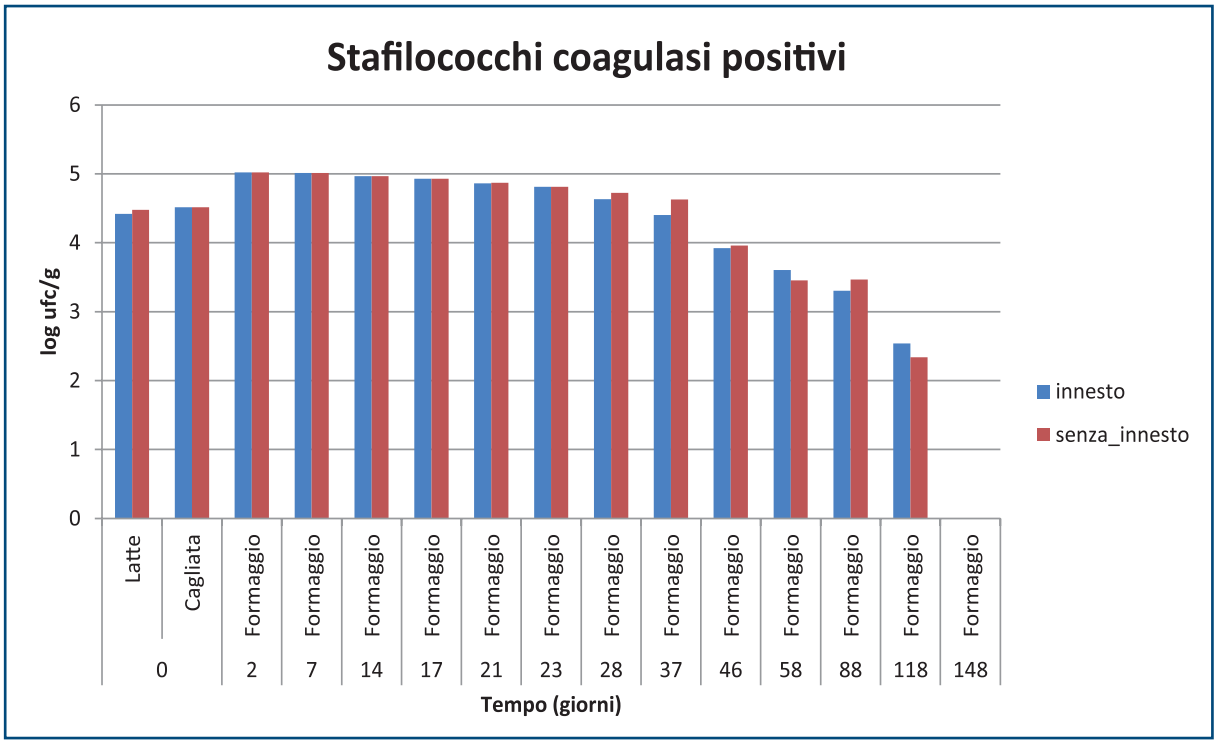
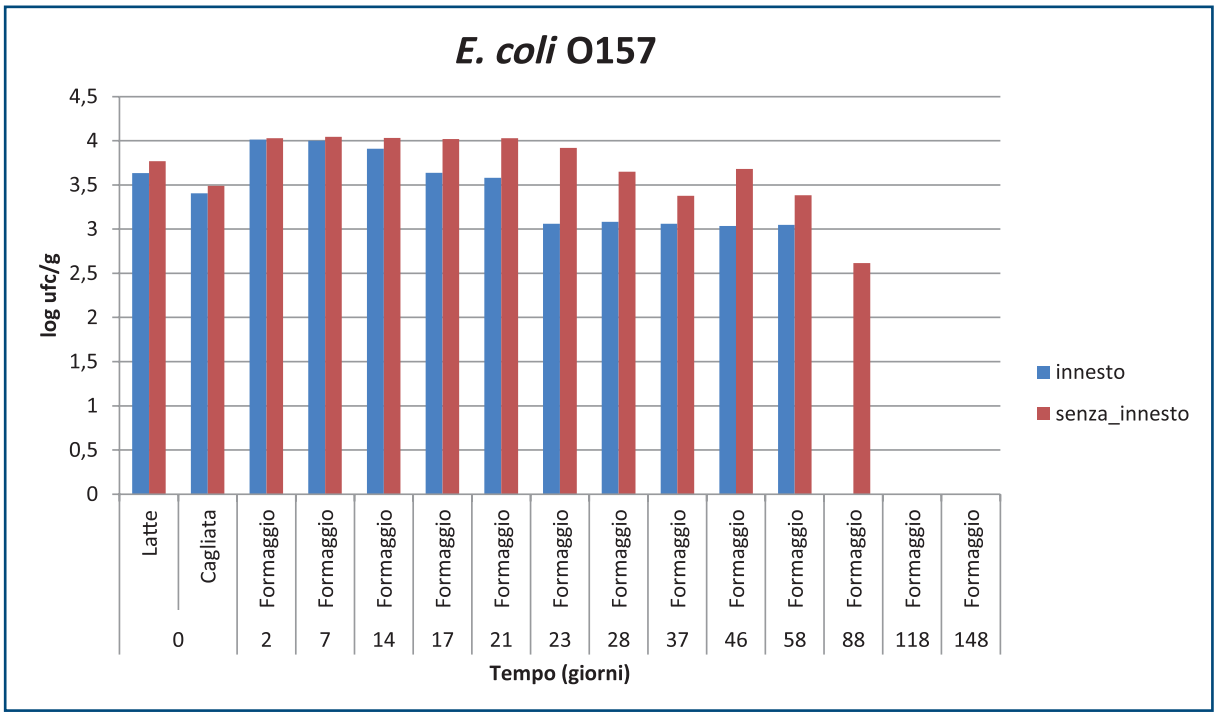


Figura 6. Rappresentazione grafica dei risultati della numerazione degli stafilococchi coagulasi positivi nei 2 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente con innesto e senza innesto.



- 4,06) a T7 in quello senza innesto, è stata rilevata una graduale diminuzione della concentrazione di *E. coli* O157. La concentrazione del microrganismo patogeno nel formaggio prodotto con l'aggiunta di innesto ha raggiunto valori medi inferiori al LOD (10UFC/g) a T88, invece nel campione senza innesto è stata rilevata una concentrazione pari a 2,62 $\log_{10}$UFC/g ± 0,05$\log_{10}$UFC/g (2,58 - 2,67) a T88, per raggiungere valori al di sotto del LOD (10UFC/g) da T118.

Figura 7. Rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di *Escherichia coli* O157 nei 2 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente con innesto e senza innesto.



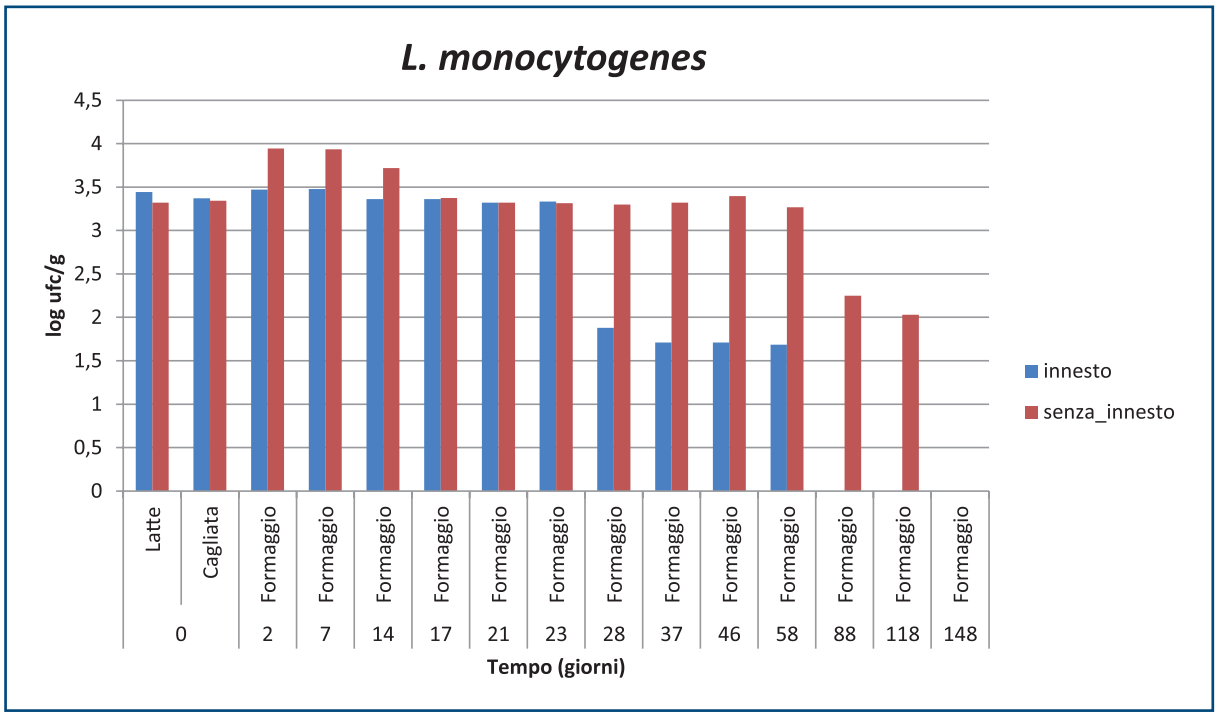
Numerazione *Listeria monocytogenes*

I risultati relativi alla numerazione di *L. monocytogenes* sono riportati in Figura 8. Nel latte con innesto, la concentrazione media di *L. monocytogenes* è stata di 3,44 log_{10}UFC/ml ± 0,05 log_{10}UFC/ml (3,39 - 3,49), nel latte senza innesto di 3,32 log_{10}UFC/ml ± 0,02 log_{10}UFC/ml (3,30 - 3,34). Nella cagliata del lotto con innesto sono stati rilevati valori medi di 3,37 log_{10}UFC/g ± 0,06 log_{10}UFC/g (3,32 - 3,44), nella cagliata del lotto senza innesto di 3,34 log_{10}UFC/g ± 0,06 log_{10}UFC/g (3,30 - 3,41). Nel formaggio con innesto, il valore massimo della concentrazione di *L. monocytogenes* è stato di 3,48 log_{10}UFC/g ± 0,04 log_{10}UFC/g (3,44 - 3,51) a T7, nel lotto senza innesto di 3,95 log_{10}UFC/g ± 0,02 log_{10}UFC/g (3,93 - 3,96) a T2. Nel lotto con innesto a T88 sono stati raggiunti valori inferiori al LOD, (10UFC/g), nel lotto senza innesto è stato rilevato un valore medio pari a 2,25 log_{10}UFC/g ± 0,06 log_{10}UFC/g (2,21 - 2,32), per raggiungere valori al di sotto del LOD (10UFC/g) a T148.

Discussione

I risultati relativi alle caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche del Pecorino di Farindola, prodotto in laboratorio per verificare la capacita' dei probiotici di inibire la crescita di *E. coli* O157 e *Listeria monocytogenes* sono molto simili a quelli ottenuti in un precedente lavoro dal titolo "Studio chimico-fisico e microbiologico del Pecorino di Farindola" di Migliorati *et al* (in pubblicazione). Le concentrazioni delle specie batteriche patogene hanno sempre mostrato una riduzione con il progredire della stagionatura, risultata più accentuata nei lotti di pecorino prodotti con l'aggiunta dell'innesto di *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Infatti, le concentrazioni di *L. monocytogenes* e di *E. coli* O157 a T88 sono scese a valori al di sotto del LOD (10UFC/g) nel lotto con innesto. In quello senza innesto, a T88 i microrganismi patogeni hanno presentato valori di 2,5 log_{10}UFC/g, raggiungendo valori inferiori al LOD solamente da T118. Nel lotto con innesto i microrganismi patogeni considerati hanno mostrato cariche inferiori a quelle del lotto senza innesto soprattutto da T21 in poi, particolarmente, per quel che riguarda *L. monocytogenes*. Quest'ultimo microrganismo, infatti, ha mostrato di tollerare meno la competizione con i Lattobacilli innestati, con livelli spesso inferiori di almeno 2 logaritmi rispetto ai lotti senza innesto. L'effetto inibitorio è probabilmente correlato alla naturale competizione con popolazioni microbiche perfettamente adattate all'ambiente del formaggio in stagionatura, ma anche alla possibile produzione di sostanze antibatteriche. Infatti, studi effettuati anche recentemente, soprattutto su formaggi spalmabili e molli, hanno dimostrato l'effetto inibente delle batteriocine prodotte dai Lattobacilli su *L. monocytogenes* (2, 18). Quanto rilevato è, inoltre, compatibile con uno studio effettuato in passato su un formaggio tradizionale spagnolo (17) con caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle del Pecorino di Farindola, contaminato artificialmente con *E. coli* O157:H7. In questo caso

Figura 8. Rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di *Listeria monocytogenes* nei 2 lotti di Pecorino di Farindola prodotti sperimentalmente con innesto e senza innesto.



è stato osservato un incremento delle cariche in assenza di colture starter, evidenziando l'importanza della biocompetizione in relazione allo sviluppo dei microrganismi patogeni.

Conclusioni

Lo studio ha permesso di valutare la capacità dei microrganismi appartenenti alla naturale microflora del Pecorino di Farindola di inibire la crescita di due specie batteriche patogene per l'uomo che, frequentemente, contaminano i formaggi. La documentazione oggettiva della presenza di componenti benefiche per la salute e, soprattutto, in grado di favorire alla conformità del prodotto finito ai criteri di sicurezza imposti dall'Unione Europea, rientra nel complessivo processo di valorizzazione di questo prodotto tradizionale che il presente studio ha contribuito a conoscere. I risultati ottenuti hanno confermato l'efficacia del ricorso a innesti di microrganismi autoctoni per contrastare in modo "naturale" gli agenti patogeni. Questo non deve, comunque, sottovalutare l'importanza dell'igiene del processo di produzione e della qualità microbiologica della materia prima, fattori fondamentali per assicurare al consumatore un prodotto sicuro e qualitativamente eccellente.

Bibliografia

1. Aureli P., A. Fiore, C. Scalfaro e G. Franciosa, 2008. Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano. Roma: Istituto Superiore di Sanità (Rapporti ISTISAN 08/36).
2. Ennahar S., O. Assobhel and C. Hasselmann, 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. J. Food Prot., 61(2): 186-191.
3. EURL Lm Technical guidance document for conducting shelf life studies on *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods (Anses ,Versione 3 - 6 giugno 2014).
4. FAO/WHO, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina, 1-4 October.
5. International Organization for Standardization (ISO), 1996. ISO 11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method.
6. International Organization for Standardization (ISO), 1998. ISO 15214. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony- count technique at 30 degrees C.
7. International Organization for Standardization (ISO), 1998. ISO 11290-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method.
8. nternational Organization for Standardization (ISO), 1999. ISO 6887-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
9. International Organization for Standardization (ISO), 1999. ISO 6888-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.
10. International Organization for Standardization (ISO), 2001. ISO 16654. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection *of Escherichia coli* O157.
11. International Organization for Standardization (ISO), 2003. ISO 6888-2:1999/Amd 1. Inclusion of precision data.
12. International Organization for Standardization (ISO), 2004. ISO 11290-1:1996/Amd 1. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.
13. International Organization for Standardization (ISO), 2004. ISO 11290-2:1998/Amd 1. Modification of the enumeration medium.
14. International Organization for Standardization (ISO), 2004. ISO 21807. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Determination of water activity.
15. International Organization for Standardization (ISO), 2008. ISO 707(E). Milk and milk products - Guidance on sampling.
16. International Organization for Standardization (ISO), 2010. ISO 6887-5. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
17. Kasrazadeh M. and C. Genigeorgis, 1995. Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese. Int. J. Food Microbiol, 25 (3): 289-300.
18. Martinez RC, CD Staliano, AD Vieira, ML Villarreal, SD Todorov, SM Saad and BD Franco, 2015. Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. Food Microbiol., 48: 143-152.
19. Nordic Committee on Food Analysis, 2004. NMKL 68. Enterococcus. Determination in foods and feeds. Enterococcus. NMKL Edition: 4 ed.
20. Sharma M. and M. Devi, 2014. Probiotics: a comprehensive approach toward health foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 54: 537-552.

Caratteristiche chimiche e valore nutrizionale del Pecorino di Farindola

Mirella Bellocci, Arianna Stramenga, Francesca Marchegiani, Silvia Cianciavicchia, Antonio D'Aloise, Valeria Melai, Giacomo Migliorati

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM) "G. Caporale", Campo Boario, Teramo, 64100 - Italia
Corrispondenza: Mirella Bellocci, mbellocci@izs.it

Parole chiave
Acido grasso,
Amminoacido libero,
Elemento chimico,
Pecorino di Farindola,
Profilo chimico,
Valore nutrizionale,
Zucchero.

Riassunto
Il Pecorino di Farindola è un formaggio tradizionale Abruzzese, prodotto nel versante orientale della catena del Gran Sasso d'Italia, ottenuto da latte ovino crudo con l'impiego di caglio suino. Lo studio ha coinvolto 101 formaggi prelevati da 4 aziende appartenenti al Consorzio di Tutela del Pecorino di Farindola al fine di delinearne il profilo nutrizionale. E' stato necessario mettere a punto metodi analitici per la determinazione dei componenti presi in esame. Per la determinazione di proteine, grassi, sale e umidità è stata impiegata la spettroscopia nel vicino infrarosso. L'analisi di acidi grassi, amminoacidi liberi e zuccheri è stata effettuata mediante tecniche cromatografiche classiche. La composizione in elementi è stata ottenuta mediante spettroscopia di emissione atomica e spettrometria di massa inorganica. I risultati ottenuti hanno permesso di rilevare in 100g di Pecorino di Farindola i seguenti valori medi: 36,62g di grassi, 29,38g di proteine, 25,52g di umidità e 1,86g di sale. Nei campioni esaminati è stata riscontrata la presenza di sostanze essenziali come acidi grassi della serie omega 6 e omega 3, isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA), amminoacidi liberi (leucina, lisina e valina), ed elementi in quantità significative (calcio, zinco e selenio). Il contenuto medio di galattosio e glucosio è risultato, rispettivamente, pari a 33mg/kg e 18mg/kg, non è stato rilevato lattosio. Da un punto di vista nutrizionale, in base ai LARN (Livelli di assunzione di riferimento di nutrienti ed energia per la popolazione italiana), il consumo di una porzione di pecorino equivalente a 50g apporta il 16% di sale, il 59% di calcio, il 15% di zinco e il 18% di selenio.

Introduzione

L'Italia ha un grande patrimonio caseario, espressione della varietà del territorio e delle culture locali, che coinvolge una moltitudine di prodotti con spiccati caratteri distintivi ottenuti da latte di diverse specie animali e differenti tecniche di produzione. Nel corso degli anni molti di questi prodotti si sono affermati a livello nazionale e internazionale e hanno ottenuto marchi di Denominazione di Origine Protetta (DOP) e di Indicazione Geografica Protetta (IGP) (28).
Nell'ultimo decennio sono mutate le esigenze dei consumatori sempre più consapevoli e attenti alla qualità dei prodotti alimentari. Accanto al consumo di prodotti a marchio DOP e IGP si è potuto osservare con maggiore frequenza il consumo di prodotti tipici locali anch'essi eccellenti per caratteristiche organolettiche e nutrizionali. Un prodotto tipico è espressione della storia e delle tradizioni locali di un'area geografica circoscritta. È caratterizzato e reso unico dalle condizioni ambientali del territorio di produzione, dalla qualità della materia prima impiegata e dalla tecnica di preparazione nella quale si rispecchia l'esperienza degli artigiani e l'impiego di strumenti e metodologie tramandate nel tempo (3). Questi fattori, pur conferendo caratteristiche peculiari al prodotto, ne limitano la conoscenza per le piccole quantità realizzate.
La notorietà dei formaggi a marchio si riscontra anche in ambito scientifico dove la disponibilità di dati riguardanti la loro caratterizzazione chimica è ampia (5, 22) e, invece, scarse sono le informazioni relative ai prodotti tipici e di nicchia.
Tra le produzioni tipiche abruzzesi si colloca il Pecorino di Farindola, formaggio del versante orientale della catena del Gran Sasso d'Italia, ottenuto da latte ovino crudo con l'impiego di caglio suino (6). Questo formaggio è stato incluso tra i Prodotti Agroalimentari Tradizionali (PAT), in quanto le metodiche di lavorazione, conservazione e stagionatura sono risultate consolidate nel territorio da almeno 25 anni, come previsto dal D.M. 8 settembre 1999 n. 350 (25).
In letteratura sono riportati studi sul Pecorino di Farindola finalizzati alla valutazione dell'impatto che il consumo di tale prodotto ha sulla salute umana

attraverso la valutazione del profilo chimico e microbiologico, con particolare attenzione al contenuto in ammine biogene (33, 34). Per approfondire ulteriormente le conoscenze su questo formaggio, lo studio ha avuto l'obiettivo di delinearne il valore nutrizionale mediante la valutazione di parametri come proteine, grassi, umidità, sale, acidi grassi, amminoacidi liberi, zuccheri ed elementi. I risultati ottenuti, integrati con le conoscenze attualmente disponibili, potrebbero permettere di individuare aspetti peculiari del Pecorino di Farindola in grado di distinguerlo dallo scenario di prodotti analoghi. Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Materiali e metodi

Nel periodo febbraio - aprile 2014 sono stati prelevati 101 campioni di Pecorino di Farindola (forme o parti di esse) prodotti tra gennaio 2013 e gennaio 2014 da 4 aziende appartenenti al Consorzio di Tutela del Pecorino di Farindola (Tabella 1).

Tabella 1. Aziende produttrici del Pecorino di Farindola sottoposte a campionamento e numero di campioni prelevati.

Azienda	Numero di campioni prelevati
1	48
2	31
3	12
4	10

Proteine, grassi, umidità e sale

La determinazione di proteine, grassi, umidità e sale nei campioni di pecorino è stata effettuata mediante spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) con lo strumento FoodScan™ Lab Analyzer (FOSS, Hillerød - Danimarca), Figura 1, con Software ISI Scan.
Il campione omogeneizzato è stato posto su piastra Petri in polistirene (90x15mm) applicando una leggera pressione. La piastra è stata riempita per circa 2/3 dell'altezza, e la lettura è stata eseguita in doppio su 8 distinte aree per tre volte, utilizzando una curva di calibrazione adattata alla matrice in esame. E' stato necessario ottimizzare la curva di calibrazione "Pecorino", presente nello strumento, poiché quello di Farindola si differenzia dai campioni di pecorino inclusi nel database Foss. A tal fine il 10% dei campioni analizzati con FoodScan sono stati processati anche con metodi di riferimento (12,13, 24, 27) e i risultati ottenuti sono stati inclusi nel database rielaborando la curva di calibrazione.

Acidi grassi saturi, monoinsaturi e polisaturi

L'estrazione del grasso è stata effettuata secondo la metodica descritta da Folch et al. (17). In particolare, a circa 3,00g di campione omogeneizzato sono stati addizionati con 60ml di miscela cloroformio/metanolo in rapporto 2:1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO - USA) e posti su agitatore orizzontale a 130 giri/min per due ore (Universal Table Shaker 709, ASAL, Milano - Italia). Il campione è stato filtrato con filtri di carta Whatman41(Whatman, Little Chalfont, Buckinghamshire - Regno Unito) e trasferito in un imbuto separatore. Dopo aver aggiunto 12ml di una soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% (NaCl,

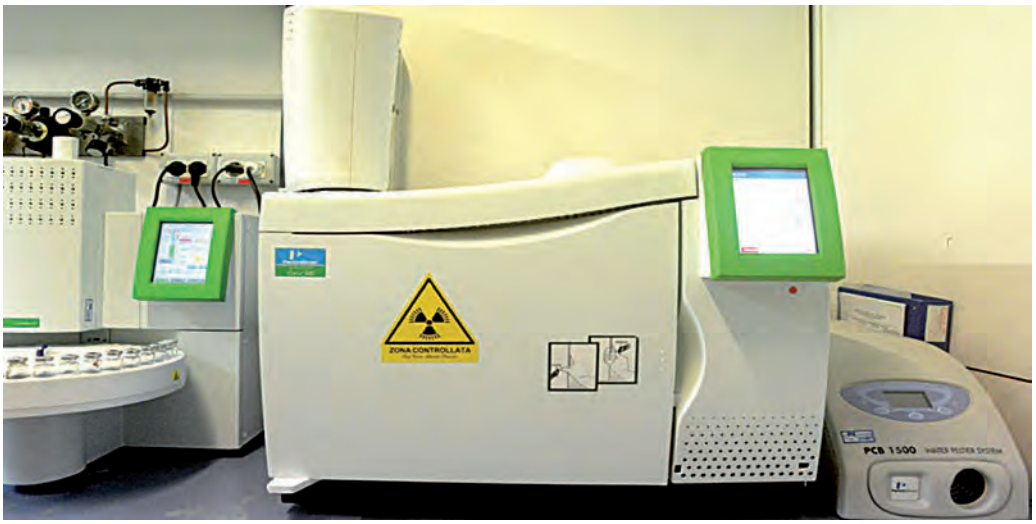
Figura 1. FoodScan™ Lab Analyzer, FOSS.

Sigma-Aldrich), la soluzione è stata sottoposta ad energica agitazione per alcuni secondi e lasciata a riposo tutta la notte per consentire la separazione delle fasi. Successivamente, la sottostante fase in cloroformio è stata recuperata previa filtrazione su filtri di carta Whatman41 in presenza di sodio solfato anidro (Na_2SO_4, Sigma-Aldrich). L'estratto organico è stato portato a secco mediante evaporatore rotante con bagno ad acqua a 50°C (Strike 300 verticale, Steroglass, Perugia - Italia) e il grasso è stato recuperato e conservato a -20°C. Gli esteri metilici degli acidi grassi sono stati preparati per transesterificazione a freddo del grasso con una soluzione di idrossido di potassio 2N in metanolo (KOH, Sigma-Aldrich) (14) e in seguito sottoposti ad analisi gascromatografica con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID, GC Clarus® 680, PerkinElmer, Waltham, MA – USA), Figura 2. In particolare, a 0,10g di grasso sono stati addizionati 2ml di esano e si è agitato manualmente fino alla completa dissoluzione. Successivamente, sono stati aggiunti 0,2ml di KOH 2N e circa 50mg di Na_2SO_4 per rimuovere eventuali residui di acqua.

Tabella 2. Condizioni cromatografiche e strumentali per l'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi.

Sistema GC-FID	Gascromatografo Clarus 680 dotato di autocampionatore e rivelatore FID, PerkinElmer
Temperatura rivelatore	260°C
Colonna	Agilent HP-88 (100m x 0,25mm x 0,20µm)
Programma temperatura	70°C per 4min, fino a 160°C a 13°C/min, a 160°C per 90min, fino a 215°C a 20°C/min, a 215°C per 40min
Durata corsa cromatografica	144min
Flusso elio (carrier gas)	1,0ml/min
Iniettore	PTV
Temperatura iniettore	80°C per 1min, fino a 280°C per 5min
Flusso di splittaggio	20ml/min
Rapporto di splittaggio	20:1
Volume iniezione	1ml
Software	TotalChrom Navigator

Figura 2. Gascromatografo Clarus, PerkinElmer.



Dopo vigorosa agitazione, i campioni sono stati centrifugati a 1800giri/min per 2min (Heraeus Multifuge 3SR+ centrifuge, Thermo Scientific, Langenselbold - Germania). Prima di procedere all'analisi strumentale, i surnatanti sono stati diluiti 1:2 in esano (Sigma-Aldrich). Le condizioni cromatografiche e i parametri strumentali adottati sono riportati in Tabella 2.

L'identificazione qualitativa dei picchi del campione in analisi è stata condotta confrontando i tempi di ritenzione degli analiti presenti nel campione con i tempi di ritenzione dei picchi dello standard di riferimento, costituito da una miscela di 37 esteri metilici degli acidi grassi (FAME MIX C4-C24, Supelco, Bellefonte, PA - USA) e da una miscela degli esteri metilici dell'acido linoleico coniugato (CLA, Sigma-Aldrich). Per l'analisi quantitava della composizione acidica, è stato utilizzato il metodo della normalizzazione interna, in cui si presume che la totalità dei componenti del campione sia rappresentata sul cromatogramma, in modo che il totale delle aree sotto i picchi costituisca il 100% dei costituenti (eluizione totale). Il contenuto di ciascun componente, espresso come percentuale in massa degli esteri metilici, è stato calcolato determinando la percentuale rappresentata dall'area del picco

corrispondente relativa alla somma delle aree di tutti i picchi, usando la formula seguente:

$$A_i / \Sigma A \times 100$$

dove:

A_i = area sottesa al picco corrispondente al componente i-esimo;

ΣA = somma delle aree sottese a tutti i picchi.

Le condizioni strumentali sono state ottimizzate per ottenere un limite di rivelazione (LOD) pari a 0,01%. In ogni ciclo di analisi quantitativa è stato processato un materiale di riferimento con tenori dichiarati degli analiti in esame (espressi come saturi, monoinsaturi e polinsaturi).

Aminoacidi liberi

Per la determinazione degli amminoacidi liberi a circa 1,00g di campione omogeneizzato, posto in tubo da estrazione in polipropilene da 50ml, sono stati aggiunti 18ml di acqua ultrapura 18,2MW/cm (PURELAB option-Q, Elga, Pordenone - Italia). Il campione è stato estratto mediante agitatore orizzontale a 180giri/min per 30min (Universal Table Shaker 709, ASAL) e bagno a ultrasuoni (Sonorex super RK1050, Bandelin, Berlino - Germania) per ulteriori 10min. In seguito sono stati aggiunti 2ml di una soluzione di acido cloridrico 1N (HCl 37%, Sigma-Aldrich) ed è stata ripetuta nuovamente l'estrazione. Successivamente il campione è stato centrifugato a 4500giri/min per 10min (Heraeus Multifuge 3SR+ centrifuge, Thermo Scientific, Langenselbold - Germania). Un'aliquota da 2ml dell'estratto è stata posta in vial eppendorf, centrifugata a 13000giri/min per 10min (MiniSpin, Eppendorf, Amburgo - Germania) e filtrata su filtro 0,2µm (Puradisc™ 25 TF, Whatman). L'analisi strumentale, condotta con cromatografo ionico ICS3000 e rivelatore amperometrico integrato e pulsato, Dionex (Sunnyvale, CA - USA) (Figura 3), è stata eseguita su un'aliquota di 50µl dell'estratto filtrato e diluito con 5ml di una soluzione di norleucina a 5µg/ml. Quest'ultima è stata preparata in una soluzione acquosa di sodio azide a 20µg/ml (NaN_3, Sigma-Aldrich). Tutti gli standard sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich. Le soluzioni madre di ciascun amminoacido sono state preparate alla concentrazione di 25000µg/ml. Gli amminoacidi lisina, alanina, treonina, glicina, valina, serina, prolina e istidina sono stati disciolti in acqua ultrapura, isoleucina e fenilalanina in una soluzione di idrossido di ammonio 1N (NH_4OH 28-30%, Sigma-Aldrich), leucina, metionina, acido glutammico, cistina e tirosina in una soluzione di HCl 1N e acido aspartico in una soluzione di HCl 0,5N. La norleucina è stata disciolta in una soluzione di HCl 0,5N. Le soluzioni di lavoro degli amminoacidi e della norleucina sono state preparate in HCl 0,1N alla concentrazione di 250µg/ml. Per l'allestimento della curva di calibrazione sono state preparate cinque soluzioni standard alle concentrazioni di 0,1 - 0,5 - 1,0 - 2,5 - 5,0µg/ml nella soluzione di norleucina a 5µg/ml. La linearità strumentale è stata verificata negli intervalli 0 - 2,5µg/ml per alanina e valina, 0 - 1,0µg/ml per istidina, fenilalanina, cistina e tirosina e 0 - 5,0µg/ml per i restanti analiti in esame. Per la preparazione delle fasi mobili sono stati utilizzati una soluzione di idrossido di sodio al 50% (NaOH, Sigma-Aldrich) e acetato di sodio (CH_3COONa, Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA - USA). Le condizioni cromatografiche e i parametri

Figura 3. Cromatografo ionico ICS3000, Dionex.

strumentali adottati sono riportati in Tabella 3 (20, 29) e il potenziale applicato all'elettrodo di lavoro in Tabella 4 (1).
L'identificazione qualitativa dei picchi del campione in analisi è stata condotta confrontando i tempi di ritenzione degli analiti nel campione con i tempi di ritenzione dei picchi dello standard di riferimento rappresentato da una miscela dei 16 amminoacidi in esame, inoltre, sono stati presi in considerazione i tempi di ritenzione relativi degli analiti rispetto al tempo di ritenzione della norleucina (standard di iniezione) con una tolleranza del 2,5%. L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante curva di calibrazione in solvente. Le condizioni strumentali sono state ottimizzate in modo da garantire il raggiungimento di un LOD pari a 20mg/100g.

Zuccheri

Per la determinazione di galattosio, glucosio e lattosio è stato messo a punto un metodo analitico utilizzando i dati riportati in letteratura (18, 31) e una nota applicativa della Dionex (30). A circa 2,00g di campione omogeneizzato sono stati addizionati 3,5ml di Carrez I, preparato con acetato di zinco diidrato (Panreac, Milano - Italia) e acido acetico glaciale (Sigma-Aldrich), e 3,5ml di Carrez II, preparato con ferrocianuro di potassio (Carlo Erba, Milano - Italia) e 18ml di soluzione di sodio azide 3mM (NaN_3, Sigma-Aldrich). Il campione è stato posto su agitatore orizzontale a 180giri/min per 10min (Universal Table Shaker 709) e, successivamente, termostatato in stufa a 70°C per 30min (VT6, Heraeus, Hanau - Germania). Dopo centrifugazione a 3500giri/min per 5min (Heraeus Multifuge 3SR+ centrifuge), il surnatante è stato filtrato con filtri

Tabella 4. Parametri operativi del rivelatore amperometrico per l'analisi degli amminoacidi liberi.

Tempo (min)	Potenziale (V) vs pH	Integrazione
0,00	+0,13	Off
0,04	+0,13	Off
0,05	+0,33	Off
0,21	+0,33	On
0,22	+0,55	On
0,46	+0,55	On
0,47	+0,33	On
0,56	+0,33	Off
0,57	-1,67	Off
0,58	-1,67	Off
0,59	+0,93	Off
0,60	+0,13	Off

Tabella 3. Condizioni cromatografiche e strumentali per l'analisi degli amminoacidi liberi.

Sistema AE-IPAD	Cromatografo ionico ICS3000 dotato di autocampionatore e rivelatore amperometrico integrato e pulsato, Dionex				
Elettrodo di lavoro	Elettrodo d'oro certificato per analisi degli amminoacidi				
Elettrodo di riferimento	Elettrodo combinato di riferimento a pH/Ag/AgCl				
Colonna	AminoPac PA10 (2 x 250mm) munita di precolonna (2 x 50mm)				
Temperatura colonna	30°C				
Flusso fase mobile	0,25ml/min				
Durata corsa cromatografica	80min				
Volume iniezione	25ml				
Software	Chromeleon 6.8				
Programma fase mobile	**Tempo (min)**	**H_2O (%)**	**NaOH 0,25M (%)**	**CH_3COONa 1M (%)**	**Profilo gradiente**
	0,0	80	20	0	5
	12,0	80	20	0	5
	16,0	68	32	0	8
	24,0	36	24	40	8
	40,0	36	24	40	5
	40,1	0	50	50	8
	50,0	0	50	50	5
	50,1	80	20	0	8
	80,0	80	20	0	5

0,2µm in polipropilene (Whatman) e sottoposto ad analisi strumentale mediante cromatografo ionico ICS4000 con rivelatore amperometrico pulsato, Dionex, Figura 4. Le condizioni cromatografiche e i parametri strumentali adottati sono riportati in Tabella 5 e il potenziale applicato all'elettrodo di lavoro in Tabella 6.
L'identificazione qualitativa dei picchi del campione in analisi è stata condotta confrontando i tempi di ritenzione degli analiti nel campione con i tempi di ritenzione dei picchi dello standard di riferimento rappresentato da una miscela dei tre zuccheri in esame.
L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante curva di calibrazione esterna costruita con miscele standard nel range 0 - 10mg/l. Le condizioni strumentali sono state ottimizzate in modo da garantire il raggiungimento di un LOD pari a 3,0mg/kg.

Figura 4. Cromatografo ionico ICS4000 , Dionex.

Tabella 6. Parametri operativi del rivelatore amperometrico per l'analisi degli zuccheri.

Tempo (min)	Potenziale (V) vs pH	Integrazione
0,00	+0,10	Off
0,20	+0,10	On
0,40	+0,10	Off
0,41	-2,00	Off
0,42	-2,00	Off
0,43	+0,60	Off
0,44	-0,10	Off
0,50	-0,10	Off

Elementi

Gli elementi oggetto d'indagine sono stati i metalli alcalini, sodio (Na) e potassio (K), gli alcalino-terrosi, calcio (Ca) e magnesio (Mg), alcuni elementi di transizione, ferro (Fe), zinco

Tabella 5. Condizioni cromatografiche e strumentali per l'analisi degli zuccheri.

Sistema HPAE-PAD	Cromatografo ionico ICS4000 dotato di autocampionatore e rivelatore amperometrico pulsato, Dionex	
Elettrodo di lavoro	Elettrodo d'oro certificato per analisi dei carboidrati	
Elettrodo di riferimento	Elettrodo combinato di riferimento a pH/Ag/AgCl	
Colonna	CarboPac PA20 (0,4 x 150mm) munita di precolonna (0,4 x 35mm)	
Temperatura colonna	30°C	
Flusso fase mobile	0,010ml/min KOH 16mM	
Durata corsa cromatografica	15min	
Volume iniezione	0,4µl	
Software	Chromeleon 6.8	
Programma fase mobile	Tempo (min)	KOH (mM)
	0,0	16
	15,0	16
	15,1	200
	23,0	200
	23,1	16
	34,0	16

(Zn), manganese (Mn), rame (Cu) e selenio (Se). Il principio del metodo applicato prevede la distruzione della matrice organica del campione mediante mineralizzazione con un sistema combinato di microonde, alta temperatura e pressione, previo trattamento con acido nitrico (HNO_3 69% TraceSELECT, Sigma-Aldrich) e perossido d'idrogeno (H_2O_2 30% suprapuro, Merck, Darmstadt - Germania) e successiva analisi strumentale (9, 10, 11). Visto che la concentrazione degli elementi in tracce nei reagenti deve essere bassa in modo da non inficiare i risultati analitici per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione, sono stati utilizzati reagenti per analisi in tracce e acqua ultrapura con resistività pari a 18,2MW/cm prodotta da un sistema PURELAB Option-Q (Elga). Prima dell'analisi tutte le apparecchiature destinate al contatto diretto con il campione sono state lavate con acido nitrico 1% e, in seguito, risciacquate con acqua ultrapura. Tutte le soluzioni standard di riferimento alla concentrazione di 1000mg/l sono state fornite da Sigma-Aldrich e conservate a temperatura di 4°C. Circa 1,00g di campione omogeneizzato è stato pesato direttamente in un contenitore di teflon del mineralizzatore a microonde e addizionato con 5ml di HNO_3 69% TraceSELECT e 1ml di H_2O_2 30% suprapuro. La digestione è stata eseguita in un sistema a microonde (Multiwave 3000, Anton Paar, Graz - Austria) secondo i parametri strumentali riportati in Tabella 7. Dopo raffreddamento, le soluzioni campione sono state trasferite in matracci tarati e diluite al volume esatto di 15ml con acqua ultrapura. L'analisi quantitativa di sodio, potassio, calcio, magnesio, ferro e zinco è stata effettuata con uno spettrofotometro con plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-OES, Optima 7000 DV, PerkinElmer - Figura 5a), utilizzando una curva di calibrazione esterna. L'analisi quantitativa di manganese, rame e selenio, analizzati mediante spettrometro di massa con plasma ad accoppiamento induttivo (Q-ICP-MS, Elan DRCII, PerkinElmer - Figura 5b) è stata eseguita mediante curva di calibrazione in matrice e il ^{71}Ga come standard interno mediante cui sono stati calcolati i fattori di risposta per ciascun elemento. In ogni ciclo di mineralizzazione è stato processato un materiale di riferimento con tenori dichiarati degli analiti in esame e/o un campione fortificato con gli stessi. Le condizioni strumentali sono riportate nelle Tabella 8 - 10.

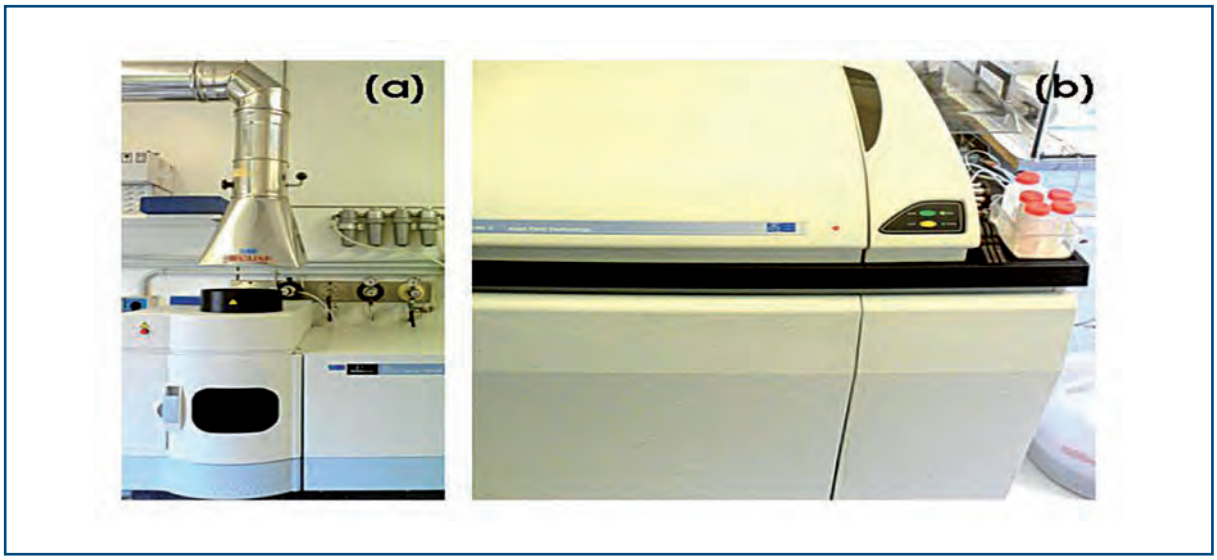
Tabella 7. Parametri strumentali del mineralizzatore a microonde.

Step	Potenza (Watt)	Rampa (°C/min)	Durata (min)	Ventilazione
1	450	1	4	1
2	800	5	8	1
3	1000	5	15	1
4	0	-	15	3

Tabella 8. Condizioni strumentali per manganese e rame (Q-ICP-MS).

Software	Elan v. 3.3 Hotfix 3
Elemento	Manganese, Rame (^{55}Mn, ^{63}Cu)
Standard interno	Gallio (^{71}Ga)
Modalità operativa	Cella dinamica di reazione (DRC)
Gas di reazione	Ammoniaca
Potenza della radio frequenza	1300 Watt
Flusso del gas di reazione	0,45ml/min (mediato sui segnali di ottimizzazione di ^{55}Mn e ^{63}Cu)
Parametri di Mathieu	
- parametro di taglio q	0,40
- parametro di taglio a	0

Figura 5. (a) Spettrofotometro con plasma ad accoppiamento induttivo, Optima 7000 DV, PerkinElmer; (b) Spettrometro di massa con plasma ad accoppiamento induttivo, Elan DRCII, PerkinElmer.



Le condizioni strumentali sono state ottimizzate in modo da garantire il raggiungimento di un LOD pari a 0,50mg/kg per calcio, sodio, potassio e magnesio, 0,10mg/kg per ferro e zinco e 0,030mg/kg per rame, manganese e selenio.

Risultati

Grassi, proteine, umidità e sale

Nei campioni di Pecorino di Farindola analizzati i contenuti medi di grassi, proteine, umidità e sale sono stati, rispettivamente, pari a 36,62g/100g e 29,38g/100g, 25,52g/100g e 1,86g/100g.
In Tabella 11 sono riportati: intervallo di variabilità, valore medio, deviazione standard (SD) e deviazione standard relativa (RSD) dei parametri esaminati.

Acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi

Per ciascun componente identificato, espresso come percentuale di massa degli esteri metilici degli acidi grassi, sono riportati: intervallo di variabilità, valore medio, SD ed RSD nelle Tabelle 12 - 14. L'elaborazione dei risultati è stata eseguita solo sui campioni in cui la quantità dell'analita è risultata superiore al limite di rivelazione.
Tra gli acidi grassi saturi il più abbondante è stato l'acido palmitico (29,03%), seguito da acido miristico (12,74%), caprico (9,30%), stearico (8,63%) e laurico (4,89%). L'acido oleico (17,00%), secondo per importanza tra tutti gli acidi grassi, ha rappresentato, inoltre, la quasi totalità della componente monoinsatura. Tra gli acidi grassi polinsaturi, l'acido linoleico, è stato il più abbondante con valore medio di 1,63%, seguito dall'acido linolenico con valore medio pari a 0,80%. Questi acidi sono stati i principali costituenti, rispettivamente, della serie omega 6 (ω6) e omega 3 (ω3). Il contenuto medio della somma degli acidi grassi per gli ω6 è stato pari a 1,75% e per gli ω3 0,91%. Nei campioni analizzati la somma degli isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA) ha presentato valori nell'intervallo 0,12 - 1,15% con variabilità del 52%. La medesima variabilità è stata riscontrata valutando la somma degli isomeri dei CLA all'interno delle singole aziende come mostrato in Tabella 15. Le somme degli acidi grassi saturi hanno presentato un valor medio di 72,30%, quelle dei monoinsaturi e polinsaturi, rispettivamente, di 19,11% e 3,30% (Tabella 16).

Aminoacidi liberi

Tra gli amminoacidi liberi presenti nei campioni esaminati i più abbondanti sono stati: acido glutammico (349mg/100g), leucina (341mg/100g), lisina (264mg/100g) e valina (253mg/100g). In Tabella 17 per ciascun amminoacido sono riportati: intervallo di variabilità, valore medio, SD ed RSD. L'elaborazione dei risultati è stata eseguita solo sui campioni in cui la quantità dell'analita è risultata superiore al limite di rivelazione.

Tabella 9. Condizioni strumentali per selenio (Q-ICP-MS).

Software	Elan v. 3.3 Hotfix 3
Elemento	Selenio (^{78}Se)
Standard interno	Gallio (^{69}Ga)
Modalità operativa	Cella dinamica di reazione (DRC)
Gas di reazione	Metano
Flusso del gas di reazione	0,30ml/min (regolato sul segnale di ottimizzazione del ^{78}Se)
Potenza della radio frequenza	1300Watt
Parametri di Mathieu	
- parametro di taglio q	0,30
- parametro di taglio a	0

Tabella 10. Condizioni strumentali per ferro, zinco, sodio, potassio, calcio e magnesio (ICP-OES).

Software	WinLab 32					
Elemento	Ferro	Zinco	Sodio	Potassio	Calcio	Magnesio
Lunghezza d'onda di emissione (nm)	238,204	213,857	589,592	766,490	317,933	279,077
Modalità operativa	assiale	assiale	radiale attenuato	radiale	radiale attenuato	radiale
Potenza della radio frequenza (Watt)	1300					

Tabella 11. Livelli di grassi, proteine, umidità e sale nei campioni di Pecorino di Farindola.

Analita	Valore minimo	Valore medio	Valore massimo	SD	RSD
	g/100g				%
Grassi (su tal quale)	27,32	36,62	44,78	2,84	8
Proteine	25,46	29,38	36,28	1,79	6
Umidità	14,87	25,52	39,07	3,88	15
Sale	0,41	1,86	3,31	0,57	30

Tabella 12. Livelli di acidi grassi saturi nei campioni di Pecorino di Farindola.

Acidi grassi	Valore minimo	Valore medio	Valore massimo	SD	RSD
	%				
Acido butirrico C4:0	1,34	1,72	2,36	0,25	14
Acido caproico C6:0	1,14	1,74	2,36	0,20	12
Acido caprilico C8:0	1,00	2,01	2,64	0,28	14
Acido caprico C10:0	3,91	9,30	13,90	1,73	19
Acido undecanoico C11:0	0,03	0,07	0,15	0,03	39
Acido laurico C12:0	2,26	4,89	7,82	1,15	23
Acido tridecanoico C13:0	0,05	0,08	0,12	0,02	21
Acido miristico C14:0	9,19	12,74	16,02	1,42	11
Acido pentadecanoico C15:0	0,70	0,93	1,09	0,09	10
Acido palmitico C16:0	24,48	29,03	34,60	1,84	6
Acido eptadecanoico C17:0	0,40	0,57	0,73	0,06	11
Acido stearico C18:0	5,08	8,63	13,24	2,01	23
Acido arachico C20:0	0,14	0,22	0,38	0,05	21
Acido eneicosanoico C21:0	0,04	0,08	0,13	0,02	25
Acido beenico C22:0	0,07	0,14	0,22	0,04	29
Acido tricosanoico C23:0	0,04	0,08	0,13	0,03	31
Acido lignocerico C24:0	0,03	0,06	0,11	0,02	34

Tabella 13. Livelli di acidi grassi monoinsaturi nei campioni di Pecorino di Farindola.

Acidi grassi	Valore minimo	Valore medio	Valore massimo	SD	RSD
	%				
Acido miristoleico C14:1 cis-9	0,09	0,14	0,35	0,04	25
Acido palmitoleico C16:1 cis-9	0,50	0,63	0,89	0,08	12
Acido vaccenico C18:1 trans-11	0,31	1,27	2,75	0,71	56
Acido oleico C18:1 cis-9	11,66	17,00	24,94	2,85	17
Acido gadoleico C20:1 cis-11	0,01	0,03	0,09	0,01	41
Acido erucico C22:1 cis-13	0,01	0,02	0,30	0,05	191
Acido nervonico C24:1 cis-15	0,01	0,02	0,03	0,004	24

Tabella 14. Livelli di acidi grassi polinsaturi nei campioni di Pecorino di Farindola.

Acidi grassi	Valore minimo	Valore medio	Valore massimo	SD	RSD
	%				
Acido linoleico C18:2 cis-9,12 (ω6)	0,84	1,63	2,40	0,33	20
Acido gamma linolenico C18:3 cis-6,9,12 (ω6)	0,01	0,03	0,06	0,01	27
Acido linolenico C18:3 cis-9,12,15 (ω3)	0,12	0,80	1,45	0,25	32
CLA (somma degli isomeri)	0,12	0,48	1,15	0,25	52
Acido eicosadienoico C20:2 cis-11,14 (ω6)	0,01	0,05	0,12	0,03	54
Acido eicosatrienoico C20:3 cis-8,11,14 (ω6)	0,01	0,02	0,03	0,003	16
Somma acido arachidonico C20:4 cis-5,8,11,14 e acido eicosatrienoico C20:3 cis-11,14,17	0,06	0,15	0,22	0,03	21
Acido eicosapentaenoico C20:5 cis-5,8,11,14,17 (ω3)	0,03	0,07	0,10	0,02	25
Acido docosadienoico C22:2 cis-13,16 (ω6)	0,01	0,02	0,03	0,01	36
Acido docosaesanoico C22:6 cis-4,7,10,13,16,19 (ω3)	0,01	0,05	0,07	0,01	29
Somma ω6	0,90	1,75	2,50	0,32	18
Somma ω3	0,28	0,91	1,61	0,28	30

Tabella 15. Livelli dei CLA (espressi come somma degli isomeri dell'acido linoleico coniugato) nei campioni di Pecorino di Farindola delle aziende produttrici esaminate.

Azienda	Valore minimo	Valore medio	Valore massimo	SD	RSD
			%		
1	0,12	0,56	0,97	0,22	39
2	0,14	0,27	0,34	0,04	16
3	0,20	0,41	0,66	0,17	42
4	0,29	0,87	1,15	0,24	28

Tabella 16. Somme degli acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi nei campioni di Pecorino di Farindola.

Acidi grassi	Valore minimo	Valoremedio	Valore massimo	SD	RSD
			%		
Somma acidi grassi saturi	62,57	72,30	80,19	3,82	5
Somma acidi grassi monoinsaturi	12,93	19,11	27,93	3,18	17
Somma acidi grassi polinsaturi	1,82	3,30	4,59	0,52	16

Tabella 17. Livelli di amminoacidi liberi nei campioni di Pecorino di Farindola.

Amminoacidi	Valore minimo	Valore medio	Valore massimo	SD	RSD
		mg/100g			%
Lisina	57	264	557	108	41
Alanina	39	179	655	84	47
Treonina	21	59	131	21	36
Glicina	21	60	233	34	57
Valina	97	253	411	68	27
Serina	21	39	107	16	40
Prolina	24	164	358	83	51
Isoleucina	26	173	329	60	35
Leucina	149	341	523	87	26
Metionina	24	88	171	33	37
Istidina	22	62	146	26	41
Fenilalanina	51	128	234	36	28
Acido glutammico	56	349	942	208	60
Acido aspartico	63	211	490	104	49
Cistina	NR(<20)	NR(<20)	NR(<20)		
Tirosina	21	35	81	11	32

Legenda: NR = Non Rilevabile

Zuccheri

Nei campioni esaminati le concentrazioni medie di galattosio e glucosio sono state, rispettivamente, di 33mg/kg e 18mg/kg, la concentrazione del lattosio è risultata inferiore al limite di rivelazione pari a 3,0mg/kg. In Tabella 18 sono riportati: intervallo di variabilità, valore medio, SD ed RSD.

Elementi

Nei campioni analizzati i contenuti medi di sodio e potassio sono stati, rispettivamente, di 982mg/100g e 129mg/100g, quelli di calcio e magnesio di 940mg/100g e 50mg/100g. Il ferro e lo zinco hanno presentato, rispettivamente, valori medi di 0,31mg/100g e 3,1mg/100g, il manganese e il rame di 0,045mg/100g e 0,077mg/100g, la concentrazione media di selenio è stata pari a 20µg/100g. In Tabella 19 per ciascun elemento sono riportati: intervallo di variabilità, valore medio, SD ed RSD. L'elaborazione dei risultati è stata eseguita solo sui campioni in cui la quantità dell'analita è risultata superiore al limite di rivelazione.

Tabella 18. Livelli di zuccheri nei campioni di Pecorino di Farindola.

Zuccheri	Valore minimo	Valore medio	Valore massimo	SD	RSD
	mg/kg				%
Galattosio	3,1	33	232	42	128
Glucosio	3,3	18	110	25	142
Lattosio	NR(<3,0)	NR(<3,0)	NR(<3,0)		

Tabella 19. Livelli degli elementi nei campioni di Pecorino di Farindola.

Elementi	Valore minimo	Valore medio	Valore massimo	SD	RSD
	mg/100g				%
Sodio	457	982	1898	347	35
Potassio	88	129	232	31	24
Calcio	578	940	1301	147	16
Magnesio	24	50	85	15	29
Ferro	0,012	0,31	1,9	0,23	75
Zinco	1,9	3,1	4,0	0,4	13
Manganese	0,021	0,045	0,14	0,024	54
Rame	0,024	0,077	0,20	0,041	53
	µg/100g				%
Selenio	11	20	55	6	30

Discussione

Grassi, proteine, umidità e sale

Il contenuto in grassi e proteine riscontrato nei campioni di Pecorino di Farindola è stato in accordo con quanto riportato nel suo Disciplinare di produzione (6) e in precedenti studi condotti da Schirone et al. (34).
I valori di umidità e di sale hanno mostrato un'ampia variabilità, probabilmente, riconducibile alle diverse dimensioni delle forme di pecorino e al grado di stagionatura. Infatti nel Disciplinare non sono stabilite le dimensioni delle forme, ma viene indicato solo che: "… sono circolari, con le facce di diametro maggiore dell'altezza dello scalzo" inoltre, i campioni di pecorino coinvolti nella sperimentazione, sono stati prelevati da un minimo di 100 ad un massimo di 444 giorni dalla produzione, nel rispetto di quanto previsto dal Disciplinare che stabilisce un periodo minimo di stagionatura di tre mesi. Tuttavia il valore medio del contenuto in sale rispecchia i valori riportati da Coda et al. (5) in uno studio di caratterizzazione chimica e microbiologica di nove pecorini italiani.
Dal punto di vista nutrizionale il consumo di una porzione di pecorino, pari a 50g (37), apporta un quantitativo di sale pari al 16% del consumo di riferimento giornaliero fissato nell'allegato XIII, parte B del Regolamento (UE) n.1169/2011 (27).

Acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi

Negli ultimi anni è stata rivolta particolare attenzione alla frazione polinsatura, in particolare, ai CLA e agli acidi grassi essenziali della serie ω3 e ω6. Ai CLA è riconosciuto prevalentemente un ruolo protettivo nei confronti di cancro e arteriosclerosi (4), gli ω3 e ω6 sono componenti fondamentali delle membrane cellulari, sono importati precursori di sostanze che regolano la pressione sanguigna e le risposte infiammatorie, sono coinvolti nel metabolismo del colesterolo e nei processi di coagulazione del sangue (15, 16). Un'elevata variabilità del contenuto dei CLA si riscontra nei campioni di Pecorino di Farindola indipendentemente dall'azienda produttrice. Dai dati riportati in letteratura i fattori che incidono sul contenuto dei CLA sono: alimentazione, tipologia di allevamento, età dell'animale e stagione (35). I dati a disposizione in questo studio, tuttavia, non sono stati sufficienti per comprendere le cause dell'andamento riscontrato e ricondurlo, eventualmente, alla diversa alimentazione e

stagionalità, poiché non si hanno né campioni di pecorino prodotti dalla stessa azienda in periodi diversi né campioni prodotti dalle altre aziende nel periodo di riferimento. Il contenuto medio di acidi grassi ω3 e ω6, espresso su 100g di parte edibile, si ottiene moltiplicando la percentuale della somma degli acidi grassi per il contenuto di grasso medio e un fattore di conversione come riportato da Greenfield et al. (19). I valori calcolati per gli acidi grassi ω3 e ω6 sono, rispettivamente, 0,31g e 0,61g. Il rapporto ω6/ω3 è pari a 2, valore ritenuto in grado di contrastare la proliferazione di cellule tumorali in pazienti affetti da cancro al colon e alla mammella e i processi infiammatori in soggetti con artrite reumatoide. Il rapporto reale della dieta dei paesi occidentali è solitamente sbilanciato verso gli ω6, quindi, un incremento degli acidi grassi ω3 sarebbe favorevole per il ripristino del giusto equilibrio fra le due serie di acidi grassi (36). Con il consumo di 100g di Pecorino di Farindola, l'apporto di ω3 è superiore al valore dietetico di riferimento (DRV) negli adulti pari a 0,25g/giorno stabilito dall'EFSA come in grado di ridurre il rischio di cardiopatie (8).

Aminoacidi liberi

La proteolisi è uno dei più importanti processi che avvengono durante la maturazione dei formaggi e, in particolare, in quelli a lunga stagionatura. È legata all'azione di specifici enzimi derivanti da latte, caglio e microflora naturale. Le caratteristiche della materia prima, le condizioni di caseificazione e stagionatura hanno un ruolo essenziale nel determinare il corredo enzimatico che regola l'intensità e le modalità dei fenomeni proteolitici del formaggio. Gli amminoacidi liberi rappresentano il prodotto finale di tali fenomeni, pertanto, lo studio della composizione in amminoacidi liberi fornisce indicazioni utili per la caratterizzazione del prodotto (32). Come riportato da Mcsweeney et al., gli amminoacidi liberi, anche se parzialmente, contribuiscono allo sviluppo di aromi e sapori nel formaggio, in particolare, l'acido glutammico conferisce il gusto umami, l'alanina e la lisina quello dolce (23). Tuttavia, da riferimenti bibliografici recenti, emerge che non sempre la concentrazione di amminoacidi liberi e lo sviluppo di particolari caratteristiche organolettiche nel formaggio sono tra loro strettamente correlate, infatti, diversi tipi di formaggio pur mostrando analoghe concentrazioni e relative proporzioni in amminoacidi liberi hanno sapori molto diversi (21). Tra gli amminoacidi liberi determinati nei campioni di pecorino, si è osservata la presenza di un elevato contenuto in amminoacidi essenziali come leucina, lisina e valina. Gli amminoacidi essenziali come tali non possono essere prodotti dall'uomo ma devono essere introdotti con la dieta per garantire il corretto funzionamento dell'organismo, quindi, la loro presenza nel Pecorino di Farindola ne esalta il valore nutrizionale.

Zuccheri

Il Pecorino di Farindola, come altri formaggi stagionati e semi-stagionati, non presenta contenuti rilevabili di lattosio, questa caratteristica del prodotto ne permette il consumo a soggetti intolleranti, carenti dell'enzima lattasi, che ha la funzione di metabolizzare il lattosio in modo da permetterne l'assorbimento (7). La minore concentrazione del glucosio rispetto a quella del galattosio potrebbe essere attribuita alla maggiore facilità con cui questo zucchero è utilizzato dalla flora microbica per il proprio metabolismo (2).

Elementi

Gli elementi sono nutrienti essenziali da introdurre con la dieta in quanto, pur non apportando direttamente energia, contribuiscono ad espletare diverse funzionalità biologiche nell'organismo umano. Il calcio ha una funzione plastica andando a costruire come fosfato la matrice minerale del tessuto osseo, inoltre, è coinvolto nella regolazione della pressione arteriosa insieme a sodio, potassio e magnesio. Lo zinco è un cofattore di numerosi enzimi ed è necessario per il rilascio di vitamina A dal fegato, il selenio ha un'azione antiossidante (2, 26). Il calcio, lo zinco e il selenio meritano particolare attenzione poiché, in accordo con quanto riportato nell'Allegato XIII del Regolamento 1169/2011, nei campioni le quantità riscontrate di questi tre elementi sono significative. Infatti, il loro contenuto medio è superiore al 15% dei valori nutritivi di riferimento per 100g di prodotto, in particolare, i valori medi di calcio e zinco sono maggiori, rispettivamente, di 120mg/100g e 1,5mg/100g, quello del selenio è maggiore di 8,3µg/100g (27).
Da un punto di vista nutrizionale, in base ai LARN (Livelli di assunzione di riferimento di nutrienti ed energia per la popolazione italiana), il consumo di una porzione di pecorino equivalente a 50g copre il 59% dell'assunzione di riferimento giornaliera per il calcio, il 15% per lo zinco e il 18% per il selenio (37).

Conclusioni

Lo studio condotto sulle caratteristiche chimiche del Pecorino di Farindola ha permesso di raccogliere utili informazioni per delinearne il profilo nutrizionale. Il suo consumo apporta sostanze essenziali fondamentali per il corretto funzionamento dell'organismo e per contrastare patologie infiammatorie e tumorali. Per

alcuni componenti esaminati, la variabilità riscontrata potrebbe rispecchiare la natura di prodotto tradizionale. Variabilità riconducibile al grado e al luogo di stagionatura e alle diverse metodologie di produzione, in quanto, ciascun produttore applica modalità operative proprie e tramandate nel tempo. Tuttavia per poter affermare che la composizione chimica rilevata sia peculiare del Pecorino di Farindola è necessaria la comparazione con altri pecorini..

Bibliografia

1. Application Note 179 2007. Carbohydrate and Amino Acid Analysis Using 3-D Amperometry. LPN, 1839. Dionex Corporation.
2. Cabras P. e A. Martelli, 2004. Chimica degli alimenti. Piccin Editore, Padova.
3. Chessa I., P. Sambo e D. Romano, 2009. I prodotti agroalimentari e floricoli tipici tra conservazione e innovazione. Ital. J. Agron., 3 suppl.: 87-92.
4. Cicognini F.M., F. Rossi, S. Sigolo, A. Gallo and A. Prandini, 2014. Short communication Conjugated linoleic acid isomer (cis9,trans11 and trans10,cis12) content in cheeses from Italian large-scale retail trade. Int. Dairy J., 34: 180-183.
5. Coda R., E. Brechany, M. De Angelis, S. De Candia, R. Di Cagno and M. Gobbetti, 2006. Comparison of the Compositional, Microbiological, Biochemical, and Volatile Profile Characteristics of Nine Italian Ewes' Milk Cheeses. J. Dairy Sci., 89: 4126-4143.
6. Disciplinare di produzione del Pecorino di Farindola. http://www.pecorinodifarindola.it/index.php?option=com_content&view=article&id=55&Itemid=68 (Consultato il 7 ottobre 2015).
7. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) 2010. Scientific Opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. EFSA Journal, 8(9): 1777.
8. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) 2010. Scientific Opinion on principles for deriving and applying Dietary Reference Values. EFSA Journal, 8(3): 1458.
9. Ente Nazionale Italiano di Unificazione Norma Europea (UNI EN) 2002. Metodo 13805: Prodotti alimentari. Determinazione di elementi in tracce. Digestione sotto pressione.
10. Ente Nazionale Italiano di Unificazione Norma Europea (UNI EN) 2012. Metodo 15621: Mangimi per animali. Determinazione di calcio, sodio, fosforo, magnesio, potassio, zolfo, ferro, zinco, rame, manganese e cobalto dopo digestione sotto pressione mediante spettrometria di emissione atomica al plasma induttivamente accoppiato (ICP-AES).
11. Ente Nazionale Italiano di Unificazione Norma Europea (UNI EN) 2013. Metodo 13804: Prodotti alimentari. Determinazione di elementi e loro specie chimiche. Considerazioni generali e requisiti specifici.
12. Ente Nazionale Italiano di Unificazione Norma Europea Organizzazione Internazionale per la Normazione (UNI EN ISO) 2002. Metodo 8968-1 (IDF 20-1:2001): Latte. Determinazione del contenuto di azoto metodo Kjeldahl.
13. Ente Nazionale Italiano di Unificazione Norma Europea Organizzazione Internazionale per la Normazione (UNI EN ISO) 2005. Metodo 1735 (IDF 5:2004): Formaggi e formaggi fusi. Determinazione del contenuto di grasso metodo gravimetrico (metodo di riferimento).
14. Ente Nazionale Italiano di Unificazione Organizzazione Internazionale per la Normazione (UNI ISO) 2002. Metodo15884 (IDF 182:2002): Milk fat. Preparation of fatty acid methyl esters.
15. European Food Information Council (EUFIC) 2008. L'importanza degli omega-3 e degli omega-6. http://www.eufic.org/article/it/nutrizione/grassi/artid/Limportanza-degli-omega-3-degli-omega-6/ (Consultato il 7 ottobre 2015).
16. European Food Information Council (EUFIC) 2015. Omega-6 fatty acids associated with lower risks of heart disease and death. http://www.eufic.org/page/it/show/latest-sciencenews/page/LS/fftid/Omega_6_fatty_acids_associated_with_lower_risks_of_heart_disease_and_death/ (Consultato il 7 ottobre 2015).
17. Folch J., M. Lees and G.H.S. Stanley, 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem., 226: 497-509.
18. Gopal P.K. and R.K. Richardson, 1996. A rapid and sensitive method for estimation of galactose in Parmesan Cheese. Int. Dairy J., 6: 399-406.
19. Greenfield H. and D.A.T. Southgate, 2003. Food Composition data, FAO Publishing Management Service, Roma.
20. Hanko V. and J. Rohrer, 2007. Improvements in the Gradient program for Amino Acid Analysis Using Anion-Exchange Chromatography and Integrated Pulsed Amperometric Detection. LPN, 1913 rev 01. Dionex Corporation.
21. Hassan F.A.M., M.A.M. Abd El-Gawad and A.K. Enab, 2013. Flavour Compounds in Cheese (Review). Research on Precision Instrument and Machinery, 2: 15-29.
22. Manzi P., S. Marconi, M.G. Di Costanzo e L. Pizzoferrato, 2007. Composizione di formaggi DOP italiani. La Rivista di Scienze dell'Alimentazione, 36: 9-22.
23. Mcsweeney P.L.H. and M.J. Sousa, 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. INRA, EDP Sciences, Lait 80: 293-324.
24. Ministero delle politiche agricole e forestali 1986. Decreto Ministeriale del 21 aprile 1986. Approvazione dei metodi ufficiali di analisi per i formaggi. Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale serie generale, 2/10/1986, n. 229: Determinazione della materia secca nel formaggio e nel formaggio fuso: pp. 8-9.
25. Ministero delle politiche agricole e forestali 1999. Decreto Ministeriale del 8 settembre 1999, n. 350. Regolamento recante norme per l'individuazione dei prodotti tradizionali. Gazzetta Ufficiale, 12 ottobre 1999, n. 240.
26. Navarro-Alarcon M. and C. Cabrera-Vique, 2008. Selenium in food and the human body: A review. Sci. Total Environ., 400: 115-141.
27. Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea (UE) 2011. Regolamento n. 1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011 relativo

alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori. Gazz Uff, L 304, 22.11.2011, 61. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?qid=1435141671501&uri=CELEX:02011R1169-20140219 (Consultato il 24 giugno 2015).

28. Parlamento Europeo (UE) 2012. Regolamento del Parlamento Europeo n. 1151/2012 del 21 novembre 2012 sui regimi di qualità dei prodotti agricoli e alimentari. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?qid=1444214867797&uri=CELEX:02012R1151-20130103 (Consultato il 7 ottobre 2015).
29. Product Manual AminoPac PA10 AAA-Direct 2006. Document No.031481 rev 12. Dionex Corporation.
30. Product Manual for capillary CarboPac PA20 2010. Document No. 065362 rev 02. Dionex Corparation.
31. Rapporto ISTISAN 96/34 1996. Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti. Carboidrati singoli o in miscela metodo per cromatografia ionica: pp. 63-65.
32. Resmini P., J.A. Hogenboom, C. Pazzaglia e L. Pellegrino, 1993. Gli amminoacidi liberi nella caratterizzazione analitica del formaggio Grana Padano. Scienza e tecnica lattiero-casearia, 44: 7-19.
33. Schirone M., R. Tofalo, G. Fasoli, G. Perpetuini, A. Corsetti, A.C. Manetta, A. Ciarrocchi and G. Suzzi, 2013. High content of biogenic amines in Pecorino cheeses. Food Microbiol., 34: 137-144.
34. Schirone M., R. Tofalo, G. Mazzone, A. Corsetti and G. Suzzi, 2011. Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. Food Microbiol., 28: 128-136.
35. Sieber R., M. Collomb, A. Aeschlimann, P. Jelen and H. Eyer, 2004. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - A review. Int. Dairy J., 14: 1-15.
36. Simopoulos A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed Pharmacother, 56(8): 365-379.
37. Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU), 2014. LARN Livelli di Assunzione di riferimento di Nutrienti ed energia per la popolazione italiana IV Revisione. SICS Editore Srl, Milano.

Censimento e georeferenziazione delle essenze vegetali nelle aree a pascolo impiegate per la produzione di latte ovino destinato alla caseificazione del Pecorino di Farindola

Michelina Colonna, Dante Rosati, Andrea Albino, Giacomo Carlone

Agenzia Regionale per lo Sviluppo Agricolo, Rurale e della Pesca (ARSARP), Via G. Vico n. 4, Campobasso, 86100 - Italia
Corrispondenza: Michelina Colonna, michelina.colonna@arsarp.it

Parole chiave
Censimento,
Essenza foraggera,
Georeferenziazione,
Latte,
Pascolo,
Pecorino di Farindola,
Rilievo botanico.

Riassunto
Lo studio ha avuto l'obiettivo di evidenziare le principali essenze foraggere caratterizzanti le aree a pascolo impiegate per la produzione di latte ovino destinato alla caseificazione del Pecorino di Farindola. Il lavoro ha messo in evidenza la presenza di foraggere leguminose, appartenenti ai generi *Medicago* e *Trifolium*, e graminacee, appartenenti ai generi *Bromus, Cynosurus* e *Anthoxantum*. E' stata riscontrata una buona copertura vegetale e una buona composizione floristica di specie minori.

Introduzione

Il Pecorino di Farindola è un formaggio tipico che si produce con latte di pecore allevate in aree a pascolo comprendenti il territorio di 9 Comuni, tra le province di Pescara e Teramo (Abruzzo - Italia), con un'altitudine media compresa tra 500 e 1200m s.l.m. Lo studio ha avuto l'obiettivo di rilevare le principali essenze foraggere nelle zone di pascolo per verificare la presenza di specie caratteristiche, capaci di influenzare il profilo sensoriale e la composizione chimica del formaggio. Si è proceduto, quindi, ad un rilievo in campo che ha permesso sia il riconoscimento delle specie botaniche presenti che una valutazione quantitativa del grado di copertura di ogni singola specie individuata. Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Materiali e metodi

La prima fase dello studio ha riguardato l'individuazione e il riconoscimento delle singole essenze ricadenti nelle aree campione delle tre aziende prescelte per l'indagine. La seconda fase, detta fitosociologica, ha riguardato la forma biologica che definisce l'aspetto simile che assumono piante differenti per poter vivere in condizioni climatiche particolari.
La scelta delle aree di campionamento è stata effettuata all'interno delle aree a pascolo delle tre aziende più rappresentative per la produzione del Pecorino di Farindola denominate, nello studio: azienda 1, azienda 2 e azienda 3.

L'Agenzia Regionale per lo Sviluppo Agricolo, Rurale e della Pesca (ARSARP), pertanto, ha stabilito le modalità di intervento con l'effettuazione dei seguenti rilievi:

- di georeferenziazione, per determinare la corretta individuazione catastale di ciascuna azienda;
- per l'individuazione dei siti, al fine di effettuare osservazioni sulle essenze vegetali presenti nei pascoli e/o prati di ciascuna azienda individuata;
- botanici e floristici, con la compilazione di schede di osservazione secondo il metodo Braun - Blanquet;
- fotografici dei siti a pascolo/prato di ciascuna azienda, con esecuzione di particolari per il miglior riconoscimento delle specie foraggere presenti.

Per i siti d'indagine, si è provveduto alla georeferenziazione dei territori (sistema GPS).

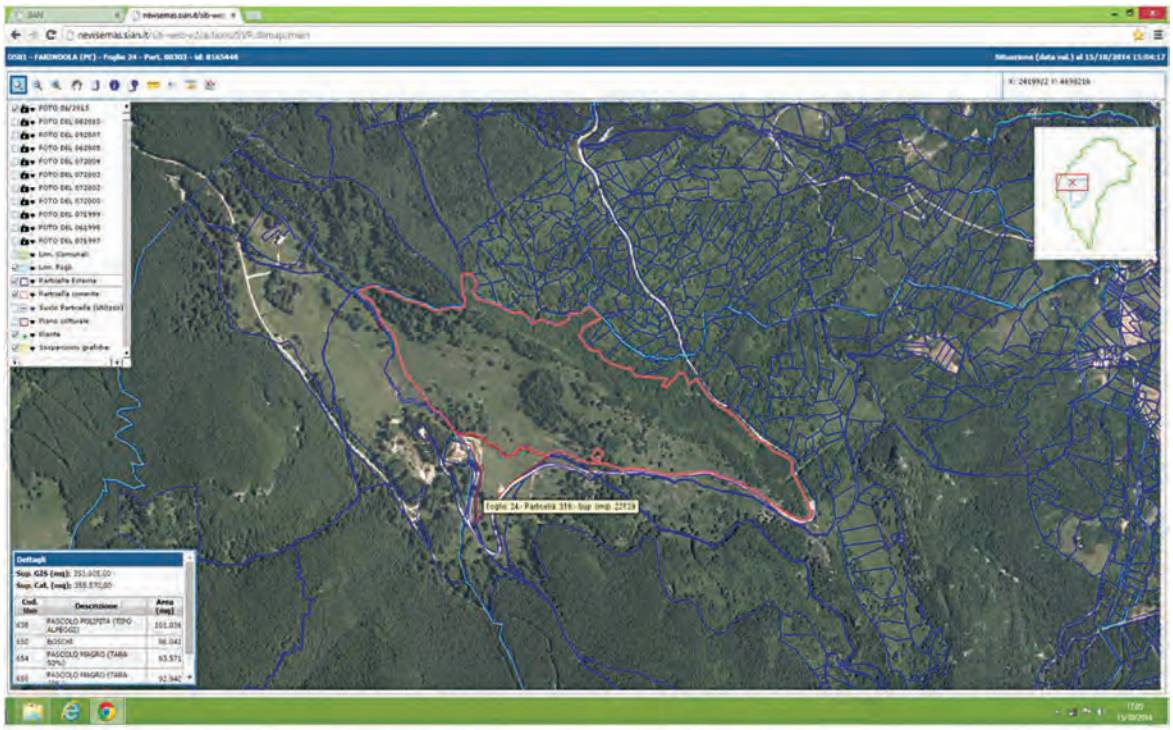
Inoltre, utilizzando le mappe catastali dell'Agenzia per le Erogazioni in Agricoltura, (AGEA) sono state delimitate le aree destinate a pascolo in ciascuna azienda, individuando nel contempo anche i riferimenti catastali di foglio e particelle. I siti individuati per i rilievi botanici sono stati selezionati in funzione della loro rappresentatività all'interno del territorio a pascolo oggetto di studio. L'effettuazione dei rilievi floristici è stata ipotizzata sia prima che dopo il pascolamento al fine di ottenere indicazioni utili sull'offerta pabulare dei pascoli e per stabilire l'incidenza sulla conseguente caratterizzazione del profilo sensoriale del pecorino. I rilievi delle essenze foraggere presenti in ciascun sito georeferenziato è stato effettuato nel periodo di massima fioritura. Per lo studio vegetazionale è stato utilizzato il metodo di osservazione Braun Blanquet (1928) (3). Lo stesso studio si sarebbe potuto effettuare con differenti metodologie di rilievo, ognuna delle quali avente lo scopo di realizzare un inventario più o meno dettagliato delle piante presenti e assegnare ad ognuna un indice di abbondanza o un oggettivo valore percentuale relativo alla propria presenza. Il metodo utilizzato ha consentito di individuare, all'interno di ciascuna area di saggio, le famiglie botaniche delle specie erbacee presenti e ha permesso di attribuire a ciascuna delle stesse una percentuale in termini di copertura del suolo rispetto al totale delle aree considerate. Per ogni azienda, pertanto, è stata riportata la scheda di rilevamento secondo il citato metodo di osservazione che ha compreso i dati stazionali e la composizione floristica, la documentazione fotografica delle principali essenze rilevate, nonché la mappa catastale con in evidenza le aree a pascolo.

Risultati

Azienda 1

L'area a pascolo individuata è risultata nella zona di Rigopiano nel comune di Farindola (PE), a circa 6Km dal paese, in linea retta dal centro aziendale, effettuando una transumanza verticale ad una altitudine di 1115m s.l.m., N. 42.25.55,47 E. 13.47.05,64 con esposizione sud. Riferimenti catastali: comune di Farindola, foglio n. 24, particelle n. 303-316 per un totale di 12.32.00Ha c/a. L'azienda dispone di altri pascoli e utilizza, una volta effettuati i raccolti, anche le superficie a seminativo (Figure 1 - 8).

Figura 1. Mappa catastale dell'Agenzia per le Erogazioni in Agricoltura (AGEA) con in evidenza le aree a pascolo dell'azienda 1.



Mappa catastale di AGEA - Azienda Martinelli Pietropaolo del comune di Farindola (PE), foglio n. 24, particelle n. 303-3016

Figura 2. Azienda 1, unità di misura con principali essenze.

Figura 3. Azienda 1, particolare di alcune famiglie botaniche in piena fioritura.

Figura 4.. Azienda 1, panoramica con in evidenza cespi di *Brachypodium* non pabulati.

Figura 5. Azienda 1, inizio emergenza di specie leguminose dopo pascolamento primaverile.

Figura 6. Azienda 1, misto di alcune specie di graminacee maggiormente rappresentate.

Figura 7. Azienda 1, pascolamento al momento del rilievo.

Figura 8. Scheda di rilevamento floristico, secondo il metodo Braun Blanquet, relativa all'azienda 1.

ARSIAM - Progetto PECOPLUS

SCHEDA RILEVAMENTO FLORISTICO
metodo Braun-Blanquet

Data del rilievo:	09/07/2014	Azienda n°:	1
Comune:	FARINDOLA (PE)	Alt m. slm:	1115
Esposizione:	SUD	Pendenza %:	30
Coordinate Lat. (N):	42°25'55,47''	Coordinate Long. (E):	13°47'05,64''

Copertura strato erbaceo %:	90	Altezza strato erbaceo cm:	20
Copertura strato arbustivo % :	10	Altezza strato arbustivo cm:	150
Rocciosità affiorante %:	20	Pietrosità %:	

Note: Pascolo pascolato da pecore

FAMIGLIA	SPECIE	g. abb. /soc. *	FAMIGLIA	SPECIE	g. abb. /soc. *
Graminaceae o Poaceae	*Brachypodium pinnatum* L.	2.3	Euphorbiacee	*Euphorbia spp.*	+.1
	Bromus inermis Leys.	+.1	Rubiacee	*Galium odoratum* (L.) Scop.	1.2
	Dactylis glomerata L.	1.2	Plantaginacee	*Plantago major* L.	+.1
	Cynosurus cristatus L.	1.2	Rosacee	*Potentilla reptans* L.	+.1
	Holcus lanatus L.	2.2			
	Lolium perenne L.	1.2			
	Anthoxantum odoratum L.	1.2			
	Festuca rubra L.	++.1			
Leguminosae o Fabaceae	*Trifolium repens* L.	2.3			
	Trifolium campestre Schreb.	+.1			
	Trifolium pratense L.	2.3			
	Trifolium montanum L.	+.1			
	Lotus corniculatus L.	1.2			
	Ononis spinosa L.	1.2			
Compositae o Asteraceae	*Bellis perennis* L.	++.1			
	Cichorium intybus L.	+.1			
	Cirsium vulgare (Savi) Ten.	++.1			
	Leontodon hispidus L.	+.+			
	Taraxacum officinale Web.	1.2			
Labiatae o Lamiaceae	*Mentha arvensis* L.	1.2			
	Prunella vulgaris L.	1.2			
Cruciferae	*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik.	++.1			
Apiaceae	*Eryngium amethystinum* L.	++.1			
Juncacee	*Luzula multiflora* (Ehrh.) Lej.	++.+			

* Grado di abbondanza-dominanza (1° num. in colonna)/Rilevazione sociabilità (2° num. in colonna)

5=100-75%
4=75-50%
3=50-25%
2=25-10%
1=10-1%
+=trascurabile

5=specie tendenti a formare popolamenti puri
4=specie formanti tappeti o colonie estese su più della metà della superficie del rilievo
3=individui ammassati in piccole colonie
2=individui riuniti in gruppi
1=individui isolati

Esempio: *Dactylis glomerata* 4.4 significa che la specie *Dactylis glomerata* ricopre un'area del rilievo compresa tra il 75 e il 50% e tende a formare colonie estese su più della metà del rilievo

Azienda 2

L'area di riferimento è risultata situata nelle vicinanze del centro aziendale ad una altitudine di 505m s.l.m., N. 42.28.36,15 E. 13.46.17,32 con esposizione nord-est. Riferimenti catastali: comune di Arsita (PE), foglio 13, particelle n. 16-17-30-42-203 per un totale di 6.2100Ha c/a. L'azienda dispone di altre superficie a pascolo ed effettua anche pascolamenti in altri terreni limitrofi al centro aziendale (Figure 9-14).

Figura 9. Mappa catastale dell'Agenzia per le Erogazioni in Agricoltura (AGEA) con in evidenza le aree a pascolo dell'azienda 2.

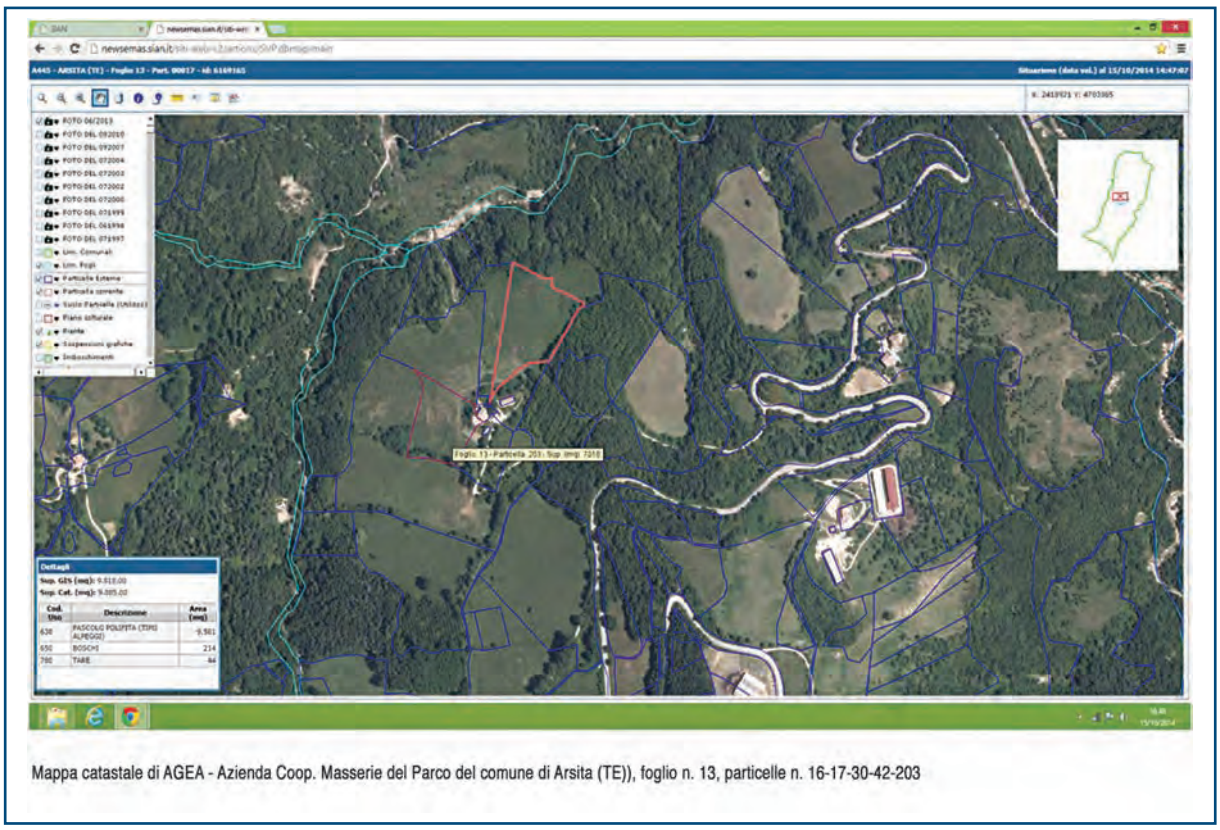


Figura 10. Azienda 2, panoramica di pecore al pascolo.

Figura 11. Azienda 2, vista d'insieme del centro aziendale e dei relativi pascoli.

Figura 12. Azienda 2, unità di misura con principali essenze.

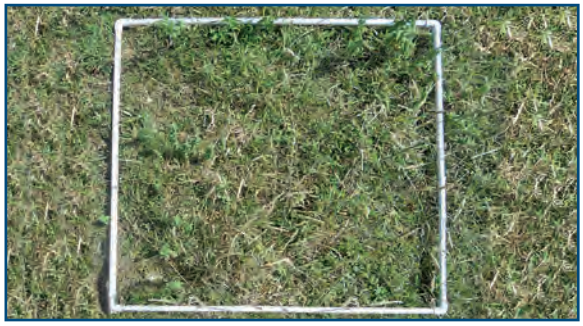


Figura 13. Azienda 2, misto di graminacee e leguminose con in evidenza il Trifolium pratense L. in fioritura.

Figura 14. Scheda di rilevamento floristico, secondo il metodo Braun Blanquet, relativa all'azienda 2.

ARSIAM - Progetto PECOPLUS

SCHEDA RILEVAMENTO FLORISTICO
metodo Braun-Blanquet

Data del rilievo:	09/07/2014	Azienda n°:	2
Comune:	ARSITA (TE)	Alt m. slm:	505
Esposizione:	NORD-OVEST	Pendenza %:	30
Coordinate Lat. (N):	42°28'36,15''	Coordinate Long. (E):	13°46'17,32''

Copertura strato erbaceo %:	95	Altezza strato erbaceo cm:	30
Copertura strato arbustivo % :	5	Altezza strato arbustivo cm:	100
Rocciosità affiorante %:	5	Pietrosità %:	

Note: Prato-pascolo pascolato da pecore

FAMIGLIA	SPECIE	g. abb. /soc. *	FAMIGLIA	SPECIE	g. abb. /soc. *
Graminaceae o Poaceae	*Brachypodium pinnatum* L.	1.2	Apiaceae	*Bifora radians* M. Bieb.	+.1
	Bromus inermis Leys	+.1	Convolvulaceae	*Convolvulus arvensis* L.	+.1
	Cynosorus cristatus L.	+.1	Plantaginaceae	*Plantago lanceolata* L.	+.1
	Dactylis glomerata L.	++.1	Primulaceae	*Anagallis arvensis* L.	+.1
	Holcus lanatus L.	2.2	Rubiaceae	*Cruciata leavipes* Opiz	+.1
	Poa pratensis L.	+.1		*Galium odoratum* (L.) Scop.	1.2
	Lolium perenne L.	1.1	Rosaceae	*Potentilla reptans* L.	++.1
Leguminosae o Fabaceae	*Trifolium repens* L.	1.2		*Agrimonia eupatoria* L.	+.1
	Trifolium campestre Schreb.	+.1	Dipsacaceae	*Dipsacus fullonum* L.	+.1
	Trifolium pratense L.	1.2			
	Lotus corniculatus L.	++.1			
	Medicago lupolina L.	+.+			
	Galega officinalis L.	+.+			
Compositae o Asteraceae	*Cichorium intybus* L.	+.1			
	Anthemis tinctoria L.	1.2			
	Anthemis arvensis L.	+.2			
	Xanthium italicum Moretti	+.+			
	Cirsium vulgare (Savi) Ten.	+.1			
	Bellis perennis L.	1.1			
	Picris hieracioides L.	+.1			
Labiatae o Lamiaceae	*Prunella vulgaris* L.	+.2			
	Mentha arvensis L.	1.2			
	Lamium album L.	+.1			

* Grado di abbondanza-dominanza (1° num. in colonna)/Rilevazione sociabilità (2° num. in colonna)

5=100-75%
4=75-50%
3=50-25%
2=25-10%
1=10-1%
+=trascurabile

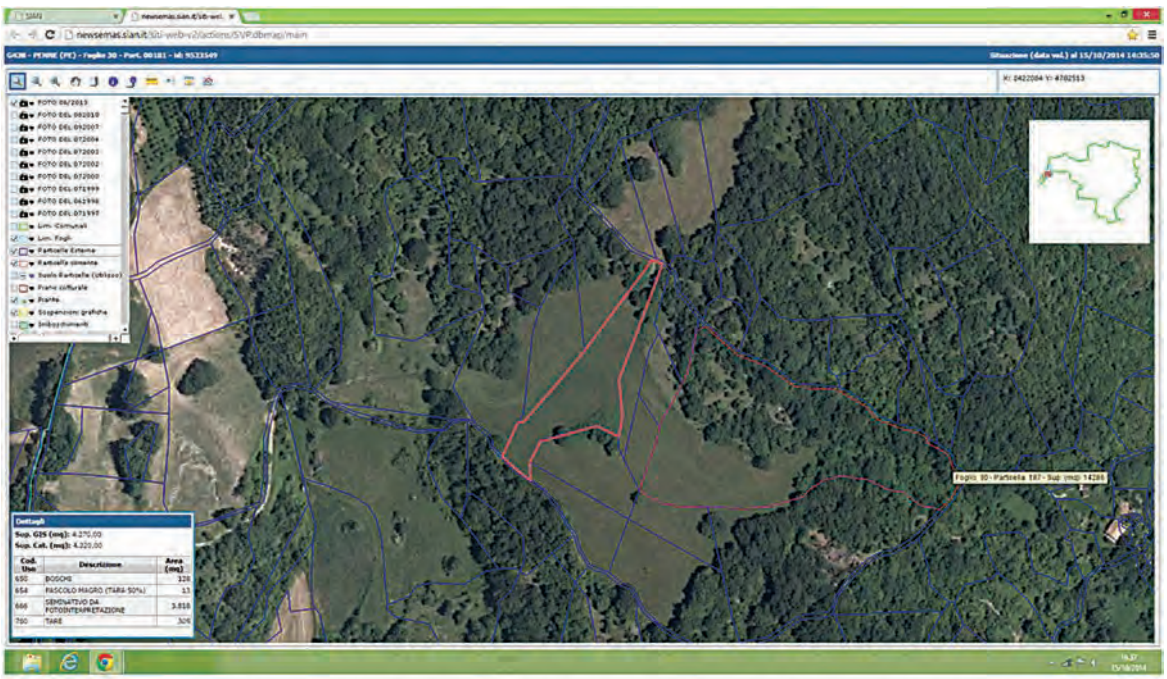
5=specie tendenti a formare popolamenti puri
4=specie formanti tappeti o colonie estese su più della metà della superficie del rilievo
3=individui ammassati in piccole colonie
2=individui riuniti in gruppi
1=individui isolati

Esempio: *Dactylis glomerata* 4.4 significa che la specie *Dactylis glomerata* ricopre un'area del rilievo compresa tra il 75 e il 50% e tende a formare colonie estese su più della metà del rilievo

Azienda 3

L'area di riferimento è risultata situata nelle vicinanze del centro aziendale ad una altitudine di 813m s.l.m., N. 42.28.11 E. 13.48.22,08 con esposizione sud. Riferimenti catastali: comune di Penne (PE), foglio 30, particelle n. 177-179-180-181-182-184-185-187-188-189-375-376 per un totale di 4.60.00Ha c/a. L'azienda dispone di altri pascoli sempre in prossimità del centro aziendale e utilizza una volta effettuati i raccolti anche le superfici a seminativo (Figure 15 - 20).

Figura 15. Mappa catastale dell'Agenzia per le Erogazioni in Agricoltura (AGEA) con in evidenza le aree a pascolo dell'azienda 3.



Mappa catastale di AGEA - Azienda Astolfi del Comune di Penne (PE), foglio n. 30, particelle n. 177-179-180-181-182-184-185-187-188-189-375-376

Figura 16. Azienda 3, unità di misura con principali essenza.

Figura 17. Azienda 3, particolare di essenze non pabulate oltre il perimetro del pascolo aziendale.

Figura 18. Azienda 3, pascolo aziendale dopo lo sfalcio.

Figura 19. Azienda 3, sopravvivenza di trifoglio dopo il pascolamento.

Figura 20. Scheda di rilevamento floristico, secondo il metodo Braun Blanquet, relativa all'azienda 3.

ARSIAM

ARSIAM - Progetto PECOPLUS

SCHEDA RILEVAMENTO FLORISTICO
metodo Braun-Blanquet

Data del rilievo:	09/07/2014	Azienda n°:	3
Comune:	PENNE (PE)	Alt m. slm:	800
Esposizione:	SUD-OVEST	Pendenza %:	25
Coordinate Lat. (N):	42°28'11''	Coordinate Long. (E):	13°48'22,08''

Copertura strato erbaceo %:	100	Altezza strato erbaceo cm:	20
Copertura strato arbustivo % :		Altezza strato arbustivo cm:	
Rocciosità affiorante %:	10	Pietrosità %:	

Note: Prato-pascolo pascolato da pecore

FAMIGLIA	SPECIE	g. abb. /soc. *	FAMIGLIA	SPECIE	g. abb. /soc. *
Graminaceae o Poaceae	*Brachypodium pinnatum* L.	1.2			
	Bromus spp.	++.1			
	Dactylis glomerata L.	1.2			
	Holcus lanatus L.	1.2			
	Poa pratensis L.	++.1			
	Lolium perenne L.	1.2			
Leguminosae o Fabaceae	*Trifolium repens* L.	2.2			
	Trifolium hybridum L.	1.2			
	Trifolium pratense L.	1.2			
	Medicago spp.	+.1			
Compositae o Asteraceae	*Cichorium intybus* L.	++.1			
	Taraxacum officinale Web.	1.2			
	Cirsium vulgare (Savi) Ten.	++.1			
	Bellis perennis L.	1.2			
	Crepis tectorum L.	+.1			
	Senecio erucifolius L.	+.1			
Labiate	*Prunella vulgaris* L.	1.2			
Poligonacee	*Rumex obtusifolius* L.	1.2			
Plantaginacee	*Plantago lanceolata* L.	1.2			
Rubiacee	*Galium odoratum* (L.) Scop.	2.2			
Rosacee	*Potentilla reptans* L.	++.1			
Linacea	*Linum perenne* L.	+.+			

* Grado di abbondanza-dominanza (1° num. in colonna)/Rilevazione sociabilità (2° num. in colonna)

5=100-75%
4=75-50%
3=50-25%
2=25-10%
1=10-1%
+=trascurabile

5=specie tendenti a formare popolamenti puri
4=specie formanti tappeti o colonie estese su più della metà della superficie del rilievo
3=individui ammassati in piccole colonie
2=individui riuniti in gruppi
1=individui isolati

Esempio: *Dactylis glomerata* 4.4 significa che la specie *Dactylis glomerata* ricopre un'area del rilievo compresa tra il 75 e il 50% e tende a formare colonie estese su più della metà del rilievo

Discussione

Nel complesso si può affermare che nelle tre stazioni esaminate esiste una buona copertura erbacea che preserva il terreno dai fenomeni degradativi dovuti all'erosione a prescindere dalla sua composizione specifica. La copertura erbacea stessa, inoltre, garantisce una maggiore produzione di foraggio. Le specie quantitativamente più rappresentate che mostrano un'elevata pabularità e un discreto indice foraggero appartengono ai generi: *Trifolium, Medicago, Cynosurus, Bromus, Anthoxantum*. Nel complesso è possibile affermare che i pascoli studiati, per grado di copertura e composizione floristica, si possono definire di buona qualità. L'unica area indagata che accusa un certo "affaticamento" e che si presenta di qualità più scadente è il pascolo dell'azienda 2. Nello stesso, infatti, sono visibili, in alcune aree, oltre a percorsi di camminamento con conseguenti compattamenti del terreno, una selezione di specie di scarso o nullo valore foraggero (*Urtica, Lamium*, ecc.) e un inizio di copertura arbustiva. Nel pascolo dell'azienda 1, in alcune zone, è presente il *Brachypodium pinnatum* con un grado di abbondanza/sociabilità pari a 2,3. Si può notare, dalla documentazione fotografica, la presenza di colonie di *Brachypodium* notoriamente non appetibili agli ovini (classe di appetibilità pari a zero). I pascoli dell'azienda 1, utilizzati prevalentemente dagli ovini, si possono considerare marginali dal punto di vista floristico e anche per la loro estensività. In ogni caso nei tre punti di osservazione non sono state individuate essenze velenose, tipo felce aquilina, come pure varie specie di ranuncoli, che per la loro tossicità vengono scartate dal bestiame. Dalle situazioni a confronto si può ipotizzare, attraverso il censimento floristico e lo studio della vegetazione, che le unità di pascolo siano abbastanza omogenee.

Conclusioni

Il pascolo risulta il miglior veicolo per il trasferimento di marcatori aromatici dalle essenze foraggere al latte e, quindi, al formaggio. Sulla base di tale affermazione, con il presente studio sono state gettate le basi per l'individuazione di un metodo di ricerca che metta in relazione i diversi fattori responsabili della costruzione della qualità che parte dal pascolo e arriva al prodotto trasformato. Pertanto, risultano indispensabili ulteriori approfondimenti al fine di chiarire quanto incida sia la variabile per la definizione della qualità che il risultato dell'interazione tra le variabili prese in considerazione, quali ad esempio: offerta pabulare prima - dopo il pascolamento e in diversi periodi dell'anno, il latte del singolo pascolamento e la relativa trasformazione e stagionatura del formaggio, il profilo sensoriale del pecorino di ogni singolo pascolamento, la razza allevata e le sostanze percepite nell'analisi sensoriale anche con metodi di laboratorio.

Bibliografia

1. Argenti G., E. Bianchetto, F. Ferretti e N. Staglianò, 2006. Proposta di un metodo semplificato di rilevamento pastorale nei piani di gestione forestale. *Forest@*, 3(2): 275-280.
2. Biondi E., M. Baldoni e A. Loiotile, (1997). Utilizzazione del territorio e successioni diacroniche della vegetazione in un'area dell'Appennino umbro-marchigiano (Italia centrale). Atti del Convegno Nazionale: "La pianificazione del paesaggio tra ri-naturazione ed iper-antropizzazione". Accademia Marchigiana di Scienze, Lettere ed Arti, Ancona, pp. 103-159.
3. Braun-Blanquet J., 1928. Pflanzensoziologie. Grundzüge der Vegetationskunde. Springer, Wien, AT.
4. Falinski, J. B., 1988. Succession, regeneration and fluctuation in the Białowie˙za Forest (NE Poland). *Vegetatio* 77: 115-128.
5. Herben, T., 1996. Permanent plots as tools for plant community ecology. *Veg Sci*, 7: 195-202.
6. Pelleri F. e S. Fontana, 2003. Primi interventi selvi-colturali per la valorizzazione degli acero-frassineti di neoformazione realizzati nella Comunità Montana Agno-Chiampo (VI). *Sherwood - Foreste ed Alberi*, Oggi 91 (7-8/03): 7-14.
7. Pelleri F., M. Milandri e F. Ferretti, 2004. L'avanzamento del bosco nell'Appennino Tosco-Romagnolo: il caso di Premilcuore. Atti IV Congresso Nazionale SISEF: "Meridiani Foreste". Potenza, 7-10 Ottobre 2003, pp. 135-140.
8. Regione Molise, 1992. Inventario Regionale della Risorsa Pascolo-Rapporto tecnico finale. Associazione Provinciale Allevatori Campobasso. Tomo I-II.
9. Shannon C.E. and W. Weaver, 1949. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
10. Tappeiner U. e A. Cernusca, 1993. Rapporti dinamici fra pascoli abbandonati e bosco. In: "Seminario di Studio sui Pascoli Alpini", 1991. ISAFA, Trento, pp. 67-80.
11. Ubaldi D., 1976. La vegetazione dei campi abbandonati delle Marche e in Romagna: aggruppamenti erbacei e arbustivi. *Not. Fitosoc*. 12: 49-56.
12. Schauer T., 2014. Guida all'identificazione delle piante. Casa editrice Zanichelli.
13. Baldoni R. e L., Giardini, 2002. Coltivazioni erbacee. Casa editrice Pàtron Editore.
14. Tavole delle malerbe. CIBA-GEIGY Edizioni, 1981.

Caratterizzazione sensoriale di campioni di Pecorino di Farindola mediante Analisi Descrittiva Quantitativa (QDA)

Cosimo Carmine Cassetta

Agenzia Regionale per lo Sviluppo Agricolo, Rurale e della Pesca (ARSARP), Via G. Vico n. 4, Campobasso, 86100 - Italia
Corrispondenza: Cosimo Cassetta, cosimo.cassetta@arsarp.it

Parole chiave
Analisi della varianza (Anova),
Analisi delle componenti principali (PCA),
Analisi descrittiva quantitativa (QDA),
Pecorino di Farindola,
Profilo sensoriale.

Riassunto
Il Pecorino di Farindola è un formaggio ottenuto da latte ovino crudo e caglio suino. La zona tipica di produzione è situata nella regione Abruzzo (Italia), in un'area che comprende il territorio di 9 comuni, tra le province di Pescara e Teramo. Lo studio ha previsto l'Analisi sensoriale su alcuni campioni di Pecorino di Farindola, prodotti da tre aziende, per identificare gli attributi sensoriali che maggiormente caratterizzano il prodotto, verificare se esistono differenze percepibili tra i campioni delle tre aziende e per ricercare eventuali attributi olfattivi-aromatici riconducibili ad essenze foraggere presenti nell'areale di pascolo del territorio di origine. Lo studio è stato condotto utilizzando l'Analisi descrittiva quantitativa (QDA), con un panel di nove giudici. I risultati delle valutazioni sono stati elaborati mediante Analisi della varianza (Anova). Sono stati evidenziati 17 attributi sensoriali, di cui 4 gustativi (dolce, acido, umami e salato), 5 olfattivi (intensità globale, lattico, animale e di frutta secca), 6 strutturali (elasticità, durezza, friabilità, granulosità, adesività e solubilità), uno chemestetico (astringenza) e uno gustativo-aromatico (persistenza). Per ciascun attributo, è stato misurato anche il valore dell'intensità percepita e sono stati costruiti i grafici (spider plot) rappresentanti i profili sensoriali dei campioni di pecorino delle tre aziende. Con l'Anova sono state evidenziate le differenze sensoriali esistenti tra i campioni, con l'Analisi delle componenti principali (PCA) sono state indicate le correlazioni tra ciascun campione e gruppo di attributi. In tutti i campioni è stato percepito l'odore di fieno, anche se con differente grado d'intensità, ma non sono stati trovati attributi olfattivo-aromatici riconducibili a particolari essenze pascolive.

Introduzione

Negli ultimi anni l'industria alimentare ha fatto ricorso di routine all'Analisi sensoriale, sia durante il processo produttivo che successivamente, per il controllo della qualità sensoriale e la valutazione della sua durabilità *(shelf life)*. Questo tipo di analisi è diventato uno strumento imprescindibile per accertare la conformità dei prodotti tipici (DOP e IGP) ai rispettivi disciplinari. Se è vero che la composizione chimica, gli aspetti nutrizionali e la sicurezza igienico-sanitaria di un prodotto rivestono un ruolo fondamentale nella definizione della qualità, è altrettanto vero che la qualità sensoriale non può essere ignorata, soprattutto quando si tratta di valutare l'impatto nei confronti del consumatore (2).

Recentemente, l'Analisi sensoriale è stata anche utilizzata per la valorizzazione delle produzioni eno-gastronomiche locali che sono importanti leve di sviluppo endogeno per il territorio. In questi casi, la valutazione sensoriale è utile per descrivere e identificare un prodotto (caratterizzazione) e, a volte, per migliorarlo e garantire la ripetibilità delle sue caratteristiche sensoriali tipiche. Attualmente questi obiettivi sono possibili in quanto l'Analisi sensoriale si è affrancata dalla soggettività valutativa del passato ed è divenuta scienza, capace di fornire attendibilità e validabilità dei risultati. A ciò ha contribuito l'impiego di strumenti statistici appropriati, lo sviluppo di tecniche molto rigorose e lo studio delle correlazione tra parametri sensoriali e indici chimici e fisici. In futuro, sarà più stretto l'approccio multidisciplinare, maggiori saranno i contributi che questa disciplina potrà dare alla conoscenza e allo sviluppo delle produzioni agroalimentari.

In considerazione di quanto detto, per la caratterizzazione, è stata utilizzata l'Analisi sensoriale. E' stato rilevato il profilo sensoriale di alcuni campioni di Pecorino di Farindola provenienti da tre aziende la cui produzione è risultata pari al

75% di quella complessiva. Questo formaggio, la cui origine risale all'epoca romana, forse è l'unico ad essere ancora prodotto con latte ovino crudo e caglio suino. E' un formaggio a pasta semidura, canestrato, salato a secco solo sulle due facce, con un periodo di stagionatura minimo di tre mesi. Prende il nome dal paese di Farindola, ma il suo areale tipico comprende anche altri otto paesi limitrofi, posti tra le province di Pescara e Teramo, sul versante orientale del massiccio del Gran Sasso (Abruzzo - Italia). Il metodo di produzione è regolato da un Disciplinare di Produzione, il cui controllo è affidato ad un Consorzio di Tutela. Il Pecorino di Farindola rientra nell'elenco nazionale dei Prodotti Agroalimentari Tradizionali (PAT), ai sensi dell'art. 3 del Decreto Ministeriale 350/99 (7).
Lo studio ha avuto l'obiettivo di individuare le proprietà sensoriali di questo formaggio e di identificare gli attributi che meglio contribuiscono alla sua caratterizzazione. Si è voluto anche verificare l'esistenza di differenze sensoriali apprezzabili tra i campioni prodotti dalle tre diverse aziende, tali da renderli distinguibili, e ricercare eventuali percezioni odorose o aromatiche da poter associare ad essenze foraggere caratterizzanti i pascoli del territorio di origine. Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Materiali e metodi

Campionamento

Per la definizione del profilo sensoriale del Pecorino di Farindola sono stati utilizzati sette forme di pecorino (campioni), prodotti da tre aziende ricadenti nella zona tipica, le cui produzioni complessive hanno rappresentato il 75% dell'intera produzione. I campioni sono stati forniti dal Consorzio per la Tutela del Pecorino di Farindola (PE), tramite l'Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM) "G. Caporale", che li ha consegnati all'ARSARP nel mese di febbraio 2015.
Prima delle analisi, ad ogni azienda è stato assegnato un codice numerico (1 - 2 - 3) e ai campioni di ciascuna azienda una lettera (a - b - c).
Dei sette campioni analizzati, tre sono risultati provenire dalla azienda 1 (1a; 1b; 1c), tre dall'azienda 2 (2a; 2b; 2c) e uno dall'azienda 3 (3a).
Tutti i formaggi esaminati, come riferito dall'IZSAM, sono stati prodotti nel mese di luglio 2014, con una stagionatura, al momento dell'analisi, di circa sette mesi.

Analisi descrittiva quantitativa

Per i formaggi di ciascuna azienda, è stato definito un profilo sensoriale, mediante Analisi descrittiva quantitativa (QDA); infine, è stato operato un confronto tra i tre Profili ottenuti ed è stata effettuata l'analisi delle componenti principali (PCA). Le procedure adottate hanno fatto riferimento alle norme UNI EN ISO 13299 (2010) (12) e UNI 11107 (2004) (13). Le valutazioni sono state eseguite da un panel, costituito da nove giudici selezionati e addestrati in conformità alle norme UNI EN ISO 8586-1 (1993) (15) e UNI EN ISO 8586-2 (2008) (14), coordinato e diretto da un Panel Leader in possesso anche della qualificazione professionale di Sensory Project Manager (10), ai sensi degli art. 7 e 8 della Legge n. 4/2013 (6). I test sono stati condotti nel laboratorio di Analisi sensoriale dell'ARSARP Molise, realizzato in conformità alla norma UNI EN ISO 8589 (2010) (11).
La procedura utilizzata ha previsto due fasi:

1. *Qualitativa*: generazione dei descrittori sensoriali dei pecorini sottoposti ad esame ("Conventional profiling") e individuazione degli standard di riferimento più appropriati per ciascun descrittore. Per la valutazione dell'intensità di ciascun descrittore è stata impiegata una scala lineare continua con estremi "1" (debole) e "7" (intenso), costruita in funzione degli standard di riferimento.
2. *Quantitativa:* misurazione dell'intensità dei descrittori mediante assegnazione di un punteggio su scala lineare continua. Il disegno sperimentale adottato è stato quello della randomizzazione a blocchi completi con tre repliche (in giorni diversi) per ciascuna azienda. Per l'azienda 3, le valutazioni sono state effettuate, sempre con tre repliche, sull'unico campione a disposizione. I sette campioni sono stati presentati con ordine casuale generato da una master card preventivamente predisposta e identificati con codice a tre cifre. I dati sensoriali sono stati raccolti con sistema informatizzato ed elaborati mediante Analisi della varianza (Anova) utilizzando il pacchetto statistico FIZZ (Biosystèmes).

Valutazione

I formaggi sono stati conservati a 4°C e portati a temperatura ambiente (20°C) 30 minuti prima della valutazione. Per stabilire l'aspetto della pasta, i campioni sono stati tagliati e presentati in singole fette (sub-campioni) dello spessore di circa 1cm e del peso di circa 50 grammi (Figura 1). Per l'analisi delle caratteristiche strutturali, i formaggi, privati di crosta, sono stati presentati sotto forma di parallelepipedi

Figura 1. Fetta di Pecorino di Farindola (sub-campione).

("provini" dei sub-campioni), ottenuti praticando un taglio della fetta, parallelo allo scalzo, in prossimità della regione distale. Infine, per le caratteristiche olfattive, gustative, aromatiche, chemestetiche e trigeminali i "provini" sono stati ricavati praticando un taglio, ortogonale allo scalzo, nella parte centrale della fetta (Figura 2) (5). Tra una valutazione e l'altra è stato utilizzato del pane (pan bauletto) e dell'acqua non frizzante per neutralizzare il gusto e ripristinare la capacità fisiologica di percezione (3).

Figura 2. "Provini".

Risultati

Prima dei test in cabina, si è proceduto, in seduta collegiale, alle misurazioni e alle valutazioni degli aspetti esteriori dei campioni. I dati ottenuti sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.
Successivamente, si è proceduto ai test in cabina per la definizione, mediante QDA, del profilo sensoriale dei pecorini. Le caratteristiche sono state valutate adottando il profilo convenzionale. Pertanto, nelle sessioni preliminari di analisi, i giudici, a partire dall'intero set di campioni, hanno generato un lessico descrittivo di 17 attributi sensoriali comprendente 4 attributi gustativi (dolce, acido, umami e salato), 5 olfattivi (intensità globale, lattico, animale e di frutta secca), 6 strutturali (elasticità, durezza, friabilità, granulosità, adesività e solubilità), uno chemestetico (astringenza) e uno gustativo-aromatico (persistenza). Gli attributi sono stati riportati nella scheda utilizzata dai giudici per i test in cabina. Il valore dell'intensità di ciascun attributo è stato valutato in funzione degli appositi standard di riferimento (Tabelle 3 e 4).
I dati sensoriali ottenuti dalle valutazioni e l'elaborazione statistica della varianza calcolata sono riportati in Tabella 5, nella cui colonna "differenze

Tabella 1. Misurazione delle caratteristiche esterne dei campioni di ciascuna azienda (valori medi).

Caratteristiche	Azienda		
	1	2	3
Diametro facce	14,5cm	15,5cm	14,5cm
Altezza scalzo	10,5cm	7,33cm	7,5cm
Peso	2.063g	1.606g	1.504g
Forma facce	piane	leggermente convesse	leggermente concave
Forma scalzo	convesso	convesso	convesso

Tabella 2. Caratteristiche dell'aspetto dei campioni di ciascuna azienda.

Descrittore	Azienda		
	1	2	3
Colore della crosta	marrone ambrato	giallo-paglia	giallo
Aspetto della crosta	rugoso, canestrato, untuoso con morchia	rugoso, canestrato, untuoso	rugoso, canestrato, untuoso
Unghia	evidente (0,6cm÷1,3 cm) e irregolare	poco pronunciata (0,5cm) e regolare	evidente (1cm) e regolare
Colore della pasta	giallo-paglierino con bassa opacità	giallo-paglierino con bassa opacità	giallo-paglia con bassa opacità
Superficie pasta	fine rugosità e bassa umidità	fine rugosità e moderata umidità	fine rugosità e moderata umidità
Presenza cristalli	elevata	media	media
Presenza distacchi	elevata	bassa	media
Presenza occhiature	moderata-alta	media	moderata
Distribuzione occhiature	irregolare	irregolare	regolare
Forma occhi	irregolare	regolare	irregolare
Dimensione occhi	0,2cm÷0,5cm	0,1cm÷0,5 cm	0,2cm÷0,5 cm

Tabella 3. Standard di riferimento per sapori e attributi chemestetici (1).

Descrittore	Sostanza	Matrice	Concentrazione	Livello d'intensità rappresentato
Salato	cloruro di sodio	ricotta	250mg/100g	2 su 7
			600mg/100g	6 su 7
Acido	acido tartarico	ricotta	100mg/100g	1 su 7
			300mg/100g	6 su 7
Amaro	caffeina	ricotta	46 mg/100g	2 su 7
			76mg/100g	6 su 7
Dolce	fruttosio	ricotta	390mg/100g	2 su 7
			1.200mg/100g	6 su 7
Umami	glutammato di sodio	ricotta	100mg/100g	4 su 7
Astringente	acido tannico	acqua	100mg/100ml	6 su 7

Tabella 4. Standard di riferimento per descrittori strutturali e di superficie (4).

Descrittore	Definizione sensoriale	Riferimento d'intensità 1	Riferimento d'intensità 7
Elasticità	"attitudine di un campione a recuperare il suo spessore iniziale dopo essere stato compresso e deformato"	burro molle o carota cruda	wurstel
Durezza	"resistenza che presenta il campione ad un piccolo spostamento delle mascelle"	formaggino	carota cotta 5 minuti
Friabilità	"attitudine che presenta il campione all'inizio della masticazione, a generare numerosi frammenti"	albume di uovo sodo	biscotto di pasta frolla tipo "danese"
Adesività	"lavoro della lingua necessario per staccare un prodotto incollato al palato e ai denti"	albume di uovo sodo	formaggino
Solubilità	"sensazione che si sviluppa quando il campione fonde molto rapidamente nella saliva"	biscotto madeleine (valore d'intensità 3)	meringa
Grado di rugosità della superficie	"percezione di grani in superficie"	mela Granny Smith	biscotto (sezione di savoiardo)
Grado di umidità in superficie	"percezione di un film liquido in superficie"	guscio di noce secca	mela Granny Smith (sezione)

significative tra le aziende", sono espressi i livelli di significatività della varianza attribuibili a differenze tra le aziende (8).
Per un migliore confronto visivo, i profili dei pecorini delle tre aziende, ottenuti tramite QDA (Analisi descrittiva quantitativa) sono stati rappresentati con l'ausilio di un grafico *spider plot* (Figura 3), che ha permesso di far risaltare, per ciascun attributo esaminato, le similitudini e le diversità tra le aziende.
Per evidenziare le correlazioni tra i pecorini di ciascuna azienda e gruppo di descrittori è stata utilizzata l'Analisi delle componenti principali (PCA), riportata graficamente in Figura 4, in cui sono stati mostrati i descrittori che maggiormente hanno caratterizzato i pecorini di ciascuna azienda.

Discussione

Le misurazioni delle caratteristiche esterne dei formaggi (Tabella 1) hanno rilevato un peso medio e un'altezza media (scalzo) dei campioni dell'azienda 1 decisamente superiore ai campioni delle altre due

Tabella 5. Valori medi e differenze tra le aziende per ogni singolo attributo.

Attributi	Azienda			Analisi della varianza						
	1	2	3	D. F.	S. S.	M. S.	F	Differenze significative tra le aziende	L. S. D.	Comparazione
Int. odor. glob.	5,66	5,13	5,32	2	3,81	1,9	3,26	*	0,56	ABC
Odore attico	4,69	4,7	4,62	2	0,12	0,06	0,32	n. s.	/	/
Odore fieno	3,51	3,12	3,22	2	2,2	1,1	5,78	**	0,32	A BC B
Odore animale	2,88	2,37	3,09	2	7,36	3,68	14,82	***	0,36	AC B
Odore frutta secca	1,93	1,87	1,82	2	0,17	0,09	0,5	n. s.	/	/
Sapore dolce	1,6	2,37	1,71	2	9,36	4,68	33,17	***	0,27	AC B
Sapore acido	4,28	3,53	4,28	2	10,16	5,08	20,32	***	0,35	AC B
Sapore umami	1,82	2,03	2,08	2	1,02	0,51	4,3	*	0,25	A BC
Sapore salato	4,41	3,35	4,34	2	18,92	9,46	40,47	***	0,35	AC B
Astringenza	1,71	1,18	1,63	2	4,35	2,18	13,13	***	0,3	AC B
Elasticità	1,57	2,59	2,25	2	14,73	7,37	29,42	***	0,36	A BC
Durezza	3,92	3,14	3,32	2	9,02	4,51	11,97	***	0,45	A BC
Friabilità	3,7	2,81	2,98	2	12,14	6,07	26,35	***	0,35	A BC
Granulosità	4,03	2,03	2,5	2	59,09	29,54	125,32	***	0,35	A B C
Adesività	2,57	2,48	2,62	2	0,26	0,13	0,5	n. s.	/	/
Solubilità	3,06	2,74	2,87	2	1,38	0,69	3,32	*	0,33	ABC
Persistenza flavour	5,41	4,28	5,36	2	21,87	10,93	40,5	***	0,38	AC B

Legenda: D.F. = gradi di libertà; S.S. = somma dei quadrati; M.S. = S.S./D.F.; F. = Rapporto di varianza; * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; n. s. = differenza non significativa; L.S.D: = Minima differenza significativa.

Figura 3. Profilo in relazione all'Analisi descrittiva quantitativa (QDA) del Pecorino di Farindola. Confronto tra le aziende.

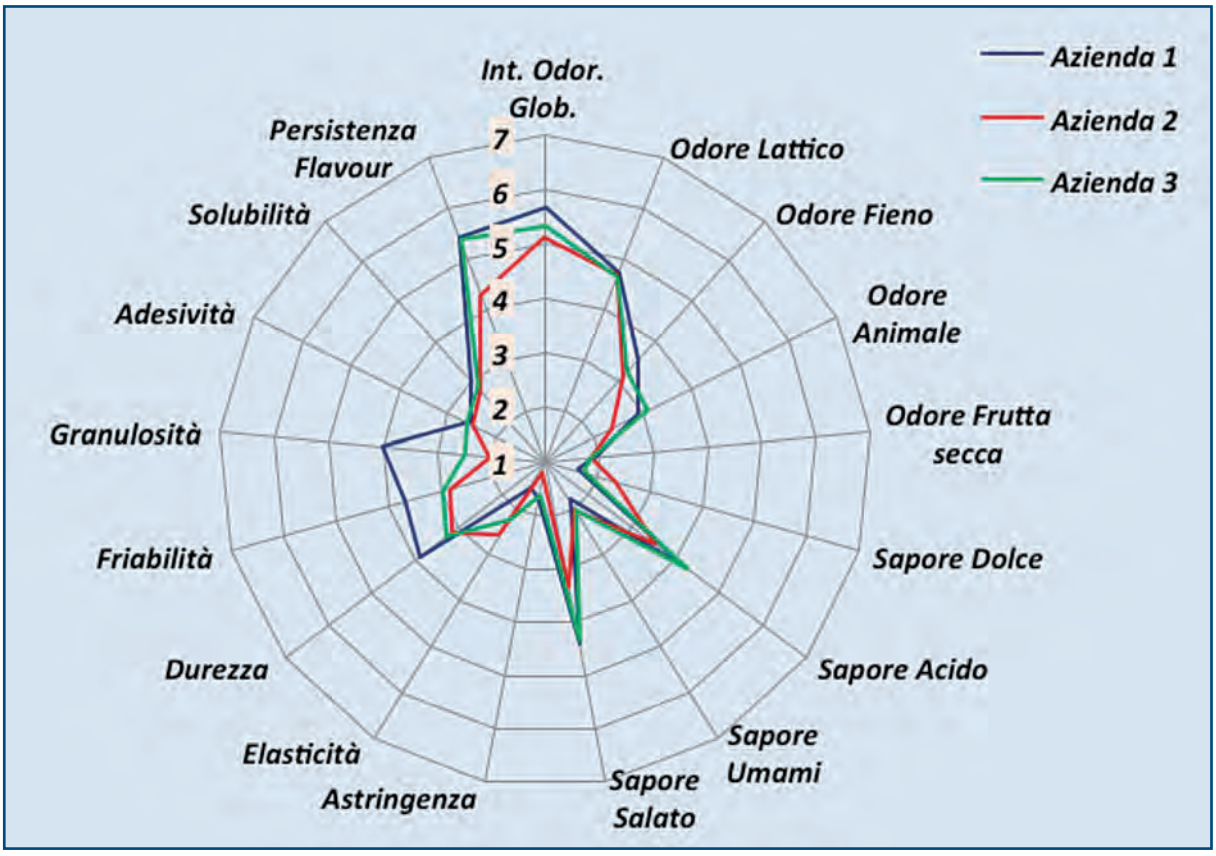
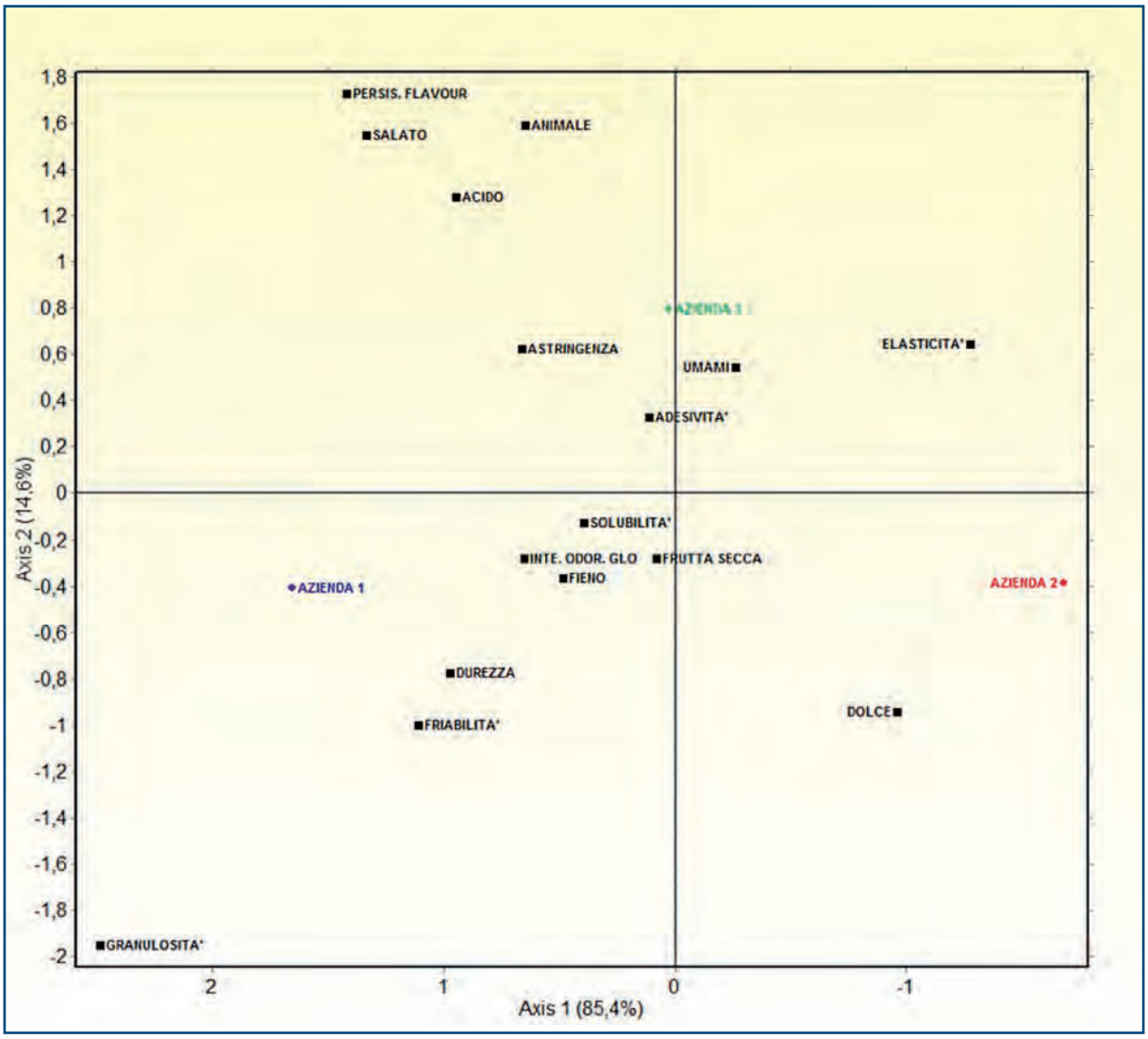


Figura 4. Analisi delle componenti principali (PCA). Confronto tra le aziende.



aziende (2 - 3), che invece sono apparsi più simili tra loro. Così pure le caratteristiche dell'aspetto (Tabella 2 e Figure 5-7), sempre per l'azienda 1, hanno mostrato, rispetto ai campioni delle altre due aziende, un'elevata presenza di cristalli (punti bianchi) e di distacchi (interruzioni della pasta) e una maggiore presenza di occhiature (alveoli).

In Tabella 5, in cui si sono riportati i valori medi e le differenze tra le aziende per ciascun attributo e i risultati dell'Analisi della varianza, è stato evidenziato che, fra i 17 attributi sensoriali valutati, solo tre (odore lattico, odore di frutta secca e adesività) hanno presentato differenze non significative (n.s.) tra le aziende. Gli altri 10 attributi, invece, hanno mostrato differenze attribuibili, con alto livello di probabilità statistica (*** = p<0,001), a differenze esistenti tra le aziende. Per ciascuno di questi attributi si è proceduto anche con il Test di confronto multiplo, al fine di identificare i pecorini significativamente diversi e raggrupparli omogeneamente. A tale scopo si è utilizzata la procedura statistica della "minima differenza significativa" (colonna L.S.D.) (8). Ciò ha permesso di evidenziare, come riportato nella colonna "confronti", che per gli attributi strutturali (elasticità, durezza, friabilità, granulosità) e per il gusto "umami" (glutammato sodico) i campioni dell'azienda 1 si sono discostati dai campioni delle altre due aziende (2 e 3), che invece sono apparsi più omogenei. Per gli altri attributi di sapore (salato, dolce e acido), per l'astringenza e per l'odore "animale", invece, sono stati i campioni dell'azienda 2 che hanno presentato le maggiori differenze e si sono discostati dai campioni delle altre due aziende (1 e 3).

Dal punto di vista olfattivo, l'analisi sensoriale non ha evidenziato odori di essenze foraggere specifiche degli areali tipici di produzione, ma solo l'odore riconducibile alla famiglia "fieno". All'interno di questo descrittore, le differenze significative tra i pecorini delle tre aziende sono di livello medio (** = p<0,01), con i campioni dell'azienda 1 che si sono diversificati per intensità dal gruppo delle aziende 2 e 3.

Figura 5. Caratteristiche esterne e aspetto della pasta dei campioni dell'azienda 1.

Figura 6. Caratteristiche esterne e aspetto della pasta dei campioni dell'azienda 2.

Figura 7. Caratteristiche esterne e aspetto della pasta dei campioni dell'azienda 3.

E' apparso evidente che la maggiore variabilità tra i prodotti si sia manifestata soprattutto per alcuni attributi strutturali. In particolare, i campioni dell'azienda 1 hanno mostrato le maggiori differenze sia come aspetto, sia come texture, come è reso anche visivamente dalla sovrapposizioni degli *spider plot* della Figura 3.

Infine, l'Analisi delle componenti principali (PCA), riportata in Figura 4, ha identificato gli attributi che maggiormente caratterizzano i pecorini di ciascuna azienda: i campioni dell'azienda 1 sono apparsi positivamente correlati agli attributi durezza, friabilità e granulosità; quelli dell'azienda 2, invece, hanno presentato la più alta correlazione con il sapore dolce e quelli dell'azienda 3 si sono distinti per adesività e sapore umami.

L'analisi sensoriale dei campioni di Pecorino di Farindola delle tre aziende, effettuata mediante QDA, ha permesso di definire un profilo costituito da 17 descrittori sensoriali. Per la maggior parte di essi (10 su 17) è stata percepita una differenza d'intensità capace di discriminare i formaggi prodotti dalle tre aziende. In particolare, per gli attributi di sapore, ad eccezione dell'*umami*, e per l'odore animale è stata riscontrata un'analogia tra i campioni dell'azienda 1 e i campioni dell'azienda 3, a differenza dei campioni dell'azienda 2 che sono risultati diversi. Per gli attributi strutturali (elasticità,

durezza, friabilità e granulosità), a presentare la maggiore diversità sono stati i formaggi dell'azienda 1. Poiché gli attributi sensoriali di struttura spesso dipendono dalla stagionatura, è probabile che i campioni dell'azienda 1 abbiano subito un processo di maturazione in locali o condizioni ambientali differenti rispetto ai campioni delle altre due aziende. Questo troverebbe conferma anche nella maggior presenza di cristalli (tirosina) evidenziati nell'aspetto visivo della pasta, in dipendenza di una più spinta azione proteolitica, e nella più bassa intensità di sapore dolce.
Il profilo olfattivo-aromatico non ha evidenziato percezioni riconducibili a particolari essenze foraggere o ad essenze pascolive caratterizzanti il territorio di origine. E' stato percepito l'odore di fieno con differenze d'intensità di livello medio tra le aziende, differenze, probabilmente, differenti dalla qualità del foraggio utilizzato per l'alimentazione delle pecore. Inoltre, in tutti i campioni delle tre aziende è stato percepito, anche se di debole intensità, un pregevole odore di frutta secca.

Conclusioni

Alla luce dei risultati emersi, se uno degli obiettivi del Consorzio di Tutela fosse quello di esaltare maggiormente la tipicità del Pecorino di Farindola, sarebbe auspicabile, nel rispetto delle preziose identità aziendali, ridurre quelle diversità più marcatamente percepibili che attualmente esistono tra i prodotti delle diverse aziende, così da garantire, all'interno del territorio di origine, una maggiore uniformità del prodotto, requisito molto richiesto dai consumatori di prodotti tipici.

Bibliografia

1. Bèrodier F., P. Lavanchy, M. Zannoni, J. Casals, L. Herrore e C. Adamo, 1997. Programma AIR 2039. Guida per la valutazione olfatto-gustativa dei formaggi a pasta dura e semidura. G. E. CO. TE. F. T., Poligny.
2. Caffarri E., 2009. Studio della maturazione di formaggi pecorini stagionati in stabilimento e in grotta, [Dissertationthesis], Alma Mater Studiorum Università di Bologna. Dottorato di ricerca in Biotecnologie degli alimenti, 21 Ciclo. DOI 10.6092/unibo/amsdottorato/1759. (Consultato il 2/02/2015).
3. Comendador F.J., E. Moneta e M. Peparaio, 2011. Formaggi ovini tradizionali dell'Irpinia: qualità sensoriale e confronto con alcuni rinomati pecorini DOP. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 62 (2): 41-51.
4. European Commission, 1999. Eur 18829 - cost 95: Improvement of the quality of the production of raw milk cheeses - A guide the sensory evaluation of the texture of hard and semi-hard ewes' milk cheeses. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 17-35.
5. Gasperi F., M. Zannoni e S. Abbà (a cura di), 2012. I Formaggi. Atlante sensoriale dei prodotti alimentari. Tecniche Nuove, Milano, 193-241.
6. Italia, Legge n. 4 del 14 gennaio 2013, Disposizioni in materia di professioni non organizzate. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana, Serie Generale n. 22 del 26.01.2013, artt. 7 e 8.
7. Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, 2015. Quindicesima revisione dell'elenco nazionale dei prodotti agroalimentari tradizionali in attuazione dell'art. 3, comma 3, del decreto ministeriale 8 settembre 1999, n. 350. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana n. 168 del 22 luglio 2015, supplemento ordinario n. 43.
8. Pagliarini E., 2009. Valutazione sensoriale. Hoepli, Milano, 83-96.
9. Progetto: Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola. Acronimo PecoPlus, 2013. Piano di Sviluppo Rurale 2007-2013 della Regione Abruzzo. Misura 1.2.4. Art. 29 del Regolamento (CE) n. 1698/05.
10. Regolamento dell'Associazione Società Italiana Scienze Sensoriali, art. 6/http://www.scienzesensoriali.it/ilregolamento.page "Consultato il 2/02/2015".
11. UNI EN ISO 8589, 2010. Analisi Sensoriale. Criteri generali per la progettazione di locali destinati all'analisi sensoriale. Ente Nazionale Italiano di Unificazione, Milano.
12. UNI EN ISO 13299, 2010. Analisi sensoriale - Metodologia - Guida generale per la definizione del profilo sensoriale. Ente Nazionale Italiano di Unificazione, Milano.
13. UNI 11107, 2004. Formaggi - Analisi sensoriale - Metodo per la definizione del profilo. Ente Nazionale Italiano di Unificazione, Milano.
14. UNI EN ISO 8586-2, 2008. Analisi sensoriale - Guida generale per la selezione, addestramento e verifica periodica dei giudici - Parte 2: Giudici esperti di Analisi sensoriale. Ente Nazionale Italiano di Unificazione, Milano.
15. UNI EN ISO 8586-1, 1993. Sensory analysis General guidance for the selection, training and monitoring of assessors - Part : Selected assessors. International Organization for Standardization, Geneva.

Misura del rapporto isotopico dello stronzio mediante Spettrometria di Massa a Ionizzazione Termica (TIMS) per la tracciabilità del Pecorino di Farindola

Maria Laura di Vacri [a,b], Marco Ferrante [a,b], Stefano Nisi [a]

[a] Servizio di Chimica, Laboratorio Nazionale del Gran Sasso-INFN, Via G. Acitelli, 22, 67100 Assergi, Italia
[b] Dipartimento di Scienze Fisiche e Chimiche, Università degli Studi dell'Aquila, Via Vetoio, 67100 Coppito, L'Aquila, Italia
Corrispondenza: Stefano Nisi, stefano.nisi@lngs.infn.it

Parole chiave
Cluster,
Pecorino di Farindola,
Rapporto isotopico,
Spettrometria di Massa a Ionizzazione Termica (TIMS),
Stronzio,
Tracciabilità

Riassunto
In questo lavoro il rapporto isotopico dello stronzio $^{87}Sr/^{86}Sr$, misurato mediante Spettrometria di Massa a Ionizzazione Termica (TIMS), è stato impiegato per studiare l'origine geografica e il legame con il territorio di provenienza di campioni di Pecorino di Farindola. Lo stronzio in natura è presente con quattro isotopi stabili: ^{88}Sr, ^{87}Sr, ^{86}Sr e ^{84}Sr e la sua composizione isotopica varia in funzione del decadimento β del ^{87}Rb che si trasforma in ^{87}Sr con un tempo di decadimento (T1/2) pari a 4,7 x 10^{10} anni. La combinazione naturale Rb-Sr genera rapporti isotopici $^{87}Sr/^{86}Sr$ sulla crosta terrestre unicamente in funzione dell'età e della diversa concentrazione degli elementi Rb e Sr. Questo aspetto permette di correlare la composizione isotopica dello stronzio, presente in un campione, con la sua connotazione geologica e, di conseguenza, con la sua origine geografica, indipendentemente da fenomeni locali quali variazioni di temperatura e processi biologici. In questo studio sono stati analizzati 15 campioni di Pecorino di Farindola e 26 campioni di pecorino proveniente da altre tre zone di produzione italiane. Il rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$, misurato attraverso la tecnica TIMS, si è dimostrato un valido parametro per il riconoscimento geografico del 73% dei campioni in esame.

Introduzione

Il problema della salvaguardia di prodotti del settore agroalimentare sta riscuotendo crescente interesse in un contesto globalizzato che ha portato nel tempo alla diffusione sempre maggiore di fenomeni quali la contraffazione dei marchi e l'adulterazione dei prodotti con aumenti delle frodi commerciali e ricadute negative sulla salute del consumatore. Per ridurre questi aspetti negativi è stato emanato un regolamento a livello europeo (7) che contiene norme sulle indicazioni geografiche e sulle denominazioni di origine di prodotti agricoli ed alimentari. Parallelamente sta crescendo anche l'interesse verso metodi scientifici che possano dare risposte a queste problematiche, in grado di determinare l'autenticità dei prodotti, riconoscendone l'origine geografica e certificando, indirettamente, qualità e corrispondenza merceologica.
Il pecorino, formaggio ottenuto dal latte di pecora, è particolarmente diffuso nell'Italia centrale, meridionale e insulare. Per la tutela di alcuni prodotti, resi peculiari da specifiche tecniche di produzione e zone di provenienza del territorio italiano, sono stati riconosciuti dalla Comunità Europea formaggi pecorini a Denominazione di Origine Protetta (DOP). Inoltre, la volontà di salvaguardare prodotti della tradizione locale tipici e di qualità ottenuti con metodi di lavorazione, conservazione e stagionatura consolidati nel tempo ha portato all'introduzione, in Italia, del riconoscimento "Prodotti Agroalimentari Tradizionali" (PAT) (6).
Il Pecorino di Farindola è un formaggio incluso nell'elenco dei PAT (5), ottenuto secondo un caratteristico metodo di lavorazione, prodotto in un'area molto limitata, posta sul versante orientale del massiccio montuoso del Gran Sasso d'Italia, che comprende il comune di Farindola e pochi altri comuni limitrofi. In questo prodotto la catena "pascolo-latte-formaggio" si realizza all'interno della stesso territorio secondo quanto stabilito dal relativo Disciplinare di produzione. Il latte utilizzato può derivare solo da pecore allevate stabilmente per tutto l'anno nell'area di produzione e alimentate esclusivamente con foraggi di provenienza locale (3).
La composizione isotopica di alcuni elementi, tra cui lo stronzio (1, 11), costituisce un parametro significativo per studi di tracciabilità alimentare. La Spettrometria di Massa con sorgente a Ionizzazione Termica (TIMS) consente di

effettuare misure di rapporti isotopici con elevata precisione.
L'eventuale uso congiunto di ulteriori parametri quali la composizione elementale e organica completa la caratterizzazione del prodotto.
Lo stronzio in natura è presente con quattro isotopi stabili: ^{88}Sr, ^{87}Sr, ^{86}Sr e ^{84}Sr e la sua composizione isotopica varia in funzione del decadimento β del ^{87}Rb che si trasforma in ^{87}Sr con un tempo di decadimento (T1/2) pari a 4,7 x 10^{10} anni. La combinazione naturale Rb-Sr genera rapporti isotopici $^{87}Sr/^{86}Sr$ diversi che rispecchiano il differente contenuto dell'isotopo radiogenico ^{87}Rb inizialmente presente. Di conseguenza, la varietà con cui questo rapporto isotopico si manifesta sulla crosta terrestre è unicamente funzione dell'età e della diversa concentrazione degli elementi Rb e Sr. Diventa allora possibile correlare la composizione isotopica dello stronzio, presente nel campione, con la sua connotazione geologica e, di conseguenza, con la sua origine geografica, indipendentemente da fenomeni locali quali variazioni di temperatura e processi biologici. La determinazione del rapporto isotopico dello stronzio $^{87}Sr/^{86}Sr$ può essere normalizzata con la misura contestuale del rapporto $^{86}Sr/^{88}Sr$ invariante, il cui valore comunemente accettato è pari a 0,1194 ed è riconosciuto dalla International Union of Geosciences e certificato da un International Interlaboratory (10). In questo modo il risultato è reso indipendente da fattori strumentali come il frazionamento isotopico (dipendente dalla temperatura del filamento) e la discriminazione di massa.
Lo studio ha avuto l'obiettivo di caratterizzare geograficamente il Pecorino di Farindola mediante il rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$, confrontato successivamente con i rapporti isotopici $^{87}Sr/^{86}Sr$ di pecorini prelevati in altre zone del territorio italiano.
La matrice in esame è di una intrinseca complessità, non solo per la sua natura e il conseguente trattamento chimico preliminare alla misura isotopica ma, soprattutto, per la sua formazione. Il rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$, caratteristico della geologia del terreno, è trasmesso al formaggio attraverso una catena complessa: pascolo-latte-formaggio. Ne consegue che, per il riconoscimento geografico, si impone la certezza che tale catena non subisca l'intrusione di elementi esterni quali foraggi aggiuntivi nel periodo invernale o complementi di latte di provenienze diverse favorite da una commercialità globalizzata.
Gli studi sulla tracciabilità dei prodotti alimentari che utilizzano la misura del rapporto isotopico si basano sull'assunzione che il rapporto $^{87}Sr/^{86}Sr$ nel prodotto agricolo rifletta quello nella frazione biodisponibile del terreno. Per questa ragione è importante studiare la relazione tra la composizione isotopica del prodotto e quella delle tre frazioni del suolo in cui Sr è normalmente ripartito: biodisponibile, carbonatica e silicatica. Il valore numerico del rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$ è compreso nell'intervallo cha va dal valore di circa 0,716 per le rocce più antiche (graniti) a valori generalmente compresi tra 0,702 e 0,705 per quelle più giovani (basalti) (12). Nei campioni oggetto di studio la concentrazione di stronzio, dotato di un rapporto isotopico localmente caratteristico del terreno, è riconducibile alla quantità di elemento biodisponibile che entra nel ciclo suolo-pianta-animale.
Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Materiali e metodi

Origine e selezione dei campioni

Lo studio ha previsto la costruzione di un cluster di riferimento del Pecorino di Farindola con cui confrontare campioni provenienti da altre aree geografiche.
L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM) ha reperito i campioni necessari alla sperimentazione. Sono stati analizzati 41 campioni di formaggio pecorino così suddivisi: 15 campioni di Pecorino di Farindola (prodotti nel territorio definito nel disciplinare e di seguito indicati come Farindola), 4 prodotti in Abruzzo (Anversa degli Abruzzi - AQ), 15 prodotti in Sardegna e 7 pecorini prodotti in Toscana. Queste regioni sono state scelte perché importanti produttrici di pecorino in Italia.
Per la verifica della correlazione tra il rapporto isotopico misurato nel prodotto finale con il territorio di pascolo, in via del tutto preliminare, sono stati campionati e misurati quattro suoli di aree impiegate per il pascolo da due produttori del consorzio del "Pecorino di Farindola".

Preparazione dei campioni di pecorino

Circa 1,5g di pecorino sono stati sottoposti a mineralizzazione mediante incenerimento in muffola a 700°C per 3 ore utilizzando crogioli in quarzo precedentemente condizionati e misurati, al fine di escludere eventuali contaminazioni di stronzio e/o rubidio. Il campione incenerito è stato in seguito solubilizzato in stufa a 95°C per un'ora con 10mL di una soluzione al 10% di acido nitrico ultrapuro ottenuto con distillatore sub-boiling DUOPur (Mileston, Bergamo - Italia). Allo

scopo di ottimizzare il metodo analitico per la determinazione del rapporto isotopico dello Sr nei campioni di pecorino, 100µl della soluzione ottenuta è stata sottoposta ad analisi mediante ICP MS con analizzatore quadrupolare (7500a, Agilent Technologies, Santa Clara - California - Stati Uniti) per valutare il contenuto di Sr, Rb ed elementi significativi come Ca, Na, K. Le concentrazioni misurate di Sr e Rb sono state dell'ordine di 10ppm e 1ppm rispettivamente, quelle di Ca, Na e K di qualche migliaia di ppm. La restante aliquota di soluzione è stata trattata con resine di estrazione cromatografica selettive per lo stronzio (SR Resin-R, Triskem International, Bruz - Francia) per la separazione e concentrazione dell'analita dagli altri elementi interferenti, principalmente Rb in quanto l'isotopo ^{87}Rb è isobaro del ^{87}Sr. La successiva analisi ICP MS della soluzione ha dimostrato un'eccellente efficienza di separazione dello Sr dagli elementi interferenti, nonché un recupero dell'analita di circa il 90%. La soluzione ottenuta contenente Sr è stata quindi evaporata e ripresa con un volume di acido nitrico all'1% (qualche decina di µl) tale da garantire una concentrazione di Sr sufficiente per l'analisi TIMS.

Indagine preliminare sul legame prodotto-territorio

Per poter studiare in via del tutto preliminare il legame del prodotto finito con il territorio di origine sono stati prelevati quattro campioni di suolo nelle zone di pascolo di due produttori di Pecorino di Farindola. Per ogni campione, 0,5 grammi di suolo sono stati mineralizzati in vial aperta su piastra a 100°C in diversi step utilizzando miscele di acido nitrico ultrapuro e fluoridrico iperpuro (Panreac, Barcellona - Spagna) a composizione variabile ottenendo la dissoluzione completa del campione. La soluzione ottenuta è stata trattata con le resine per la separazione dello Sr, come descritto per i campioni di pecorino, ed è stata effettuata un'analisi al TIMS per la determinazione della composizione isotopica dello Sr totale del terreno. Per l'analisi della frazione biodisponibile, che solitamente risulta essere una piccola percentuale rispetto al totale, i campioni sono stati lisciviati con soluzione di NH_4NO_3 (9). Lo Sr è stato quindi separato da tale soluzione con la stessa tecnica di estrazione cromatografica, ed è stata eseguita l'analisi isotopica.

Spettrometria di massa

Nelle applicazioni di tracciabilità la sperimentazione richiede spesso di discriminare tra valori isotopici molto vicini, ma sufficienti per distinguere provenienze geografiche diverse. L'assegnazione determinante di un valore numerico ha carattere di veridicità solo se lo si può corredare di parametri statistici coerenti con l'obiettivo dell'investigazione. Le ricerche nell'ambito della tracciabilità alimentare si fondano sulla discriminazione tra rapporti isotopici che si differenziano spesso per valori ≤0,1% e, di conseguenza, necessitano della combinazione tra precisione interna della misura e accuratezza <0,02%. Come standard isotopico è stato utilizzato l'SRM 987 (NIST-USA) il cui certificato dichiara il rapporto $^{87}Sr/^{86}Sr = 0{,}71034 \pm 0{,}00026$ che corrisponde a una precisione interna pari allo 0,037%. Per applicazioni di questo tipo, la deviazione standard interna relativa (RISD) del valore $^{87}Sr/^{86}Sr$ deve essere compresa tra 0,001 e 0,003% (10 - 30ppm). La spettrometria di massa TIMS consente di raggiungere questo obiettivo. In questo lavoro è stato impiegato uno spettrometro TIMS (Finnigan262 VMC, Thermo Scientific GmbH, Brema - Germania). Il campione è stato depositato su filamenti di renio zone refined (H. Cross., Moonachie, New York - USA). I parametri mass calibration e gain calibration del multicollettore sono stati controllati quotidianamente insieme allo standard isotopico SRM 987 con un'accuratezza e una precisione interna della misura sempre migliori di 40ppm.

Ai fini della rappresentazione dei risultati in un grafico a doppio ingresso, oltre al rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$, il solo utile in ragione della sua variabilità, è necessario un fattore (Δ‰) da correlare al rapporto isotopico misurato. Oltre alla rappresentazione grafica, questo fattore permette di comparare più facilmente i risultati essendo ottenuto dalla normalizzazione con uno standard di riferimento comunemente accettato.

Il fattore si ricava dall'equazione (a):

$$\Delta(‰) = ({}^{87}Sr/{}^{86}Sr_{analyzed} / {}^{87}Sr/{}^{86}Sr_{standard} - 1) \times 1000$$

Lo spettrometro di massa, disponendo di un multi collettore variabile, focalizza le masse ^{84}Sr, ^{85}Rb, ^{86}Sr, ^{87}Sr e ^{88}Sr contemporaneamente. Essendo la massa 85 presente unicamente nel Rb, e non nella composizione isotopica dello Sr, questa può essere continuamente monitorata per conoscere indirettamente la presenza del ^{87}Rb e, con un opportuno programma di riscaldamento del filamento, verificarne la scomparsa. Solo a questo punto inizia l'acquisizione del segnale utilizzando un software aggiornato (Spectromat, Brema - Germania). La pressoché totale assenza della massa interferente del Rb, la stabilità anche nel lungo tempo del segnale emesso dal filamento di Re sono responsabili dell'elevata precisione interna della misura, difficilmente paragonabile con qualunque altro strumento non TIMS (8).

Risultati

Le analisi effettuate hanno consentito di determinare i valori dei rapporti isotopici $^{87}Sr/^{86}Sr$ sui 41 campioni di pecorino. Tramite l'equazione (a) sono stati ricavati i valori di Δ‰ (Tabella 1).
I campioni sono stati raggruppati in base alle 4 diverse provenienze allo scopo di ricavare quattro cluster da studiare. In Tabella 2 è riportato il valore medio di ciascun cluster e la relativa dispersione.
I cluster ottenuti dall'analisi dei campioni provenienti dalle diverse zone (rispettivamente Abruzzo, Sardegna e Toscana) sono stati confrontati con il cluster relativo ai campioni di Pecorino di Farindola (Figure 1-3).
I 4 cluster ottenuti in funzione del solo rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$ per i pecorini analizzati sono riportati in Figura 4. Il cluster del Pecorino di Farindola confrontato con i cluster relativi ai terreni analizzati è riportato in Figura 5.

Discussione

Nonostante il numero di campioni di pecorino indagati sia stato limitato, lo studio ha, comunque, permesso di acquisire indicazioni preliminari sul legame tra prodotto e territorio.
Il cluster Farindola, costituito da 15 campioni, ha presentato una dispersione molto contenuta. Infatti la variazione del rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$ ha interessato la quarta cifra decimale per ± due unità (~250ppm). Il risultato si è mostrato in accordo con le aspettative trattandosi di un'area geografica molto circoscritta con caratteristiche geologiche e geomorfologiche quasi del tutto omogenee. I valori di $^{87}Sr/^{86}Sr$ sono risultati compresi tra il valore minimo di 0,70893 e quello massimo di 0,70950 (Tabelle 1-2).
Il cluster Abruzzo, costituito da soli 4 campioni, ha mostrato un valore medio del rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$ e una dispersione paragonabili al cluster Farindola (Tabelle 1-2 e Figura 1) assecondando le aspettative di due aree appartenenti allo stesso massiccio montuoso con caratteristiche geologiche molto simili.
Il cluster Sardegna, costituito da 15 campioni, ha evidenziato una dispersione significativamente

Tabella 2. Valori medi e relativa deviazione standard dei rapporti isotopici $^{87}Sr/^{86}Sr$ misurati su 41 campioni di pecorino suddivisi per località di provenienza.

Provenienza	Campione	Media	STD DEV
FARINDOLA	15	0,70927	0,000179
ABRUZZO	4	0,70912	0,000192
SARDEGNA	15	0,70969	0,00114
TOSCANA	7	0,70976	0,000457

Tabella 1. Rapporti isotopici $^{87}Sr/^{86}Sr$ e Δ‰ relativi a 41 campioni di pecorino suddivisi per provenienza.

FARINDOLA			ABRUZZO			SARDEGNA			TOSCANA		
n	$^{87}Sr/^{86}Sr$	Δ‰	n	$^{87}Sr/^{86}Sr$	Δ‰	n	$^{87}Sr/^{86}Sr$	Δ‰	n	$^{87}Sr/^{86}Sr$	Δ‰
1	0,70932	-1,43	16	0,70933	-1,42	20	0,71094	0,84	35	0,70962	-1,02
2	0,70946	-1,24	17	0,70900	-1,89	21	0,70739	-4,15	36	0,70997	-0,52
3	0,70893	-1,98	18	0,70924	-1,55	22	0,70875	-2,23	37	0,70963	-1,00
4	0,70932	-1,44	19	0,70892	-1,99	23	0,71041	0,10	38	0,71068	0,47
5	0,70933	-1,42				24	0,71008	-0,37	39	0,70962	-1,02
6	0,70941	-1,32				25	0,70972	-0,87	40	0,70924	-1,55
7	0,70933	-1,42				26	0,70962	-1,01	41	0,70956	-1,10
8	0,70913	-1,71				27	0,70917	-1,65			
9	0,70911	-1,73				28	0,70923	-1,57			
10	0,70950	-1,18				29	0,71070	0,50			
11	0,70944	-1,26				30	0,71089	0,78			
12	0,70942	-1,30				31	0,71108	1,05			
13	0,70928	-1,50				32	0,71044	0,14			
14	0,70918	-1,64				33	0,70931	-1,45			
15	0,70894	-1,97				34	0,70764	-3,80			

Figura 1. Cluster relativi al Pecorino di Farindola (rosso) e al pecorino prodotto in Abruzzo (verde).

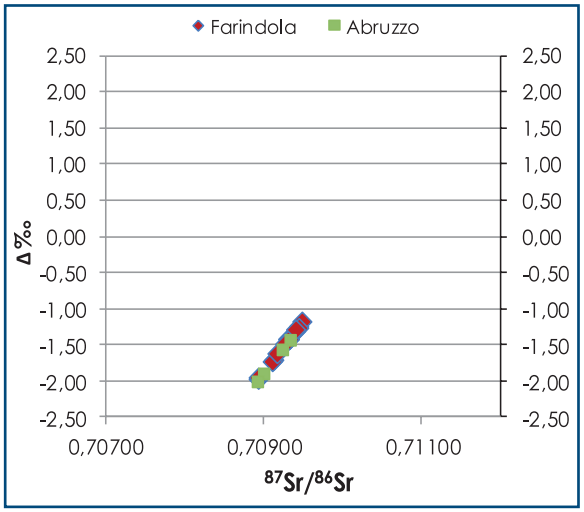


Figura 2. Cluster relativo al Pecorino di Farindola (rosso) e dispersione dei risultati del cluster Sardegna (viola).

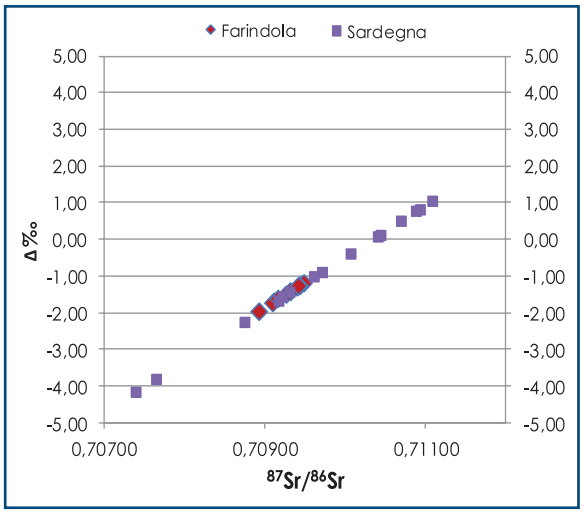


Figura 3. Cluster relativo al Pecorino di Farindola (rosso) e dispersione dei risultati del cluster Toscana (azzurro).

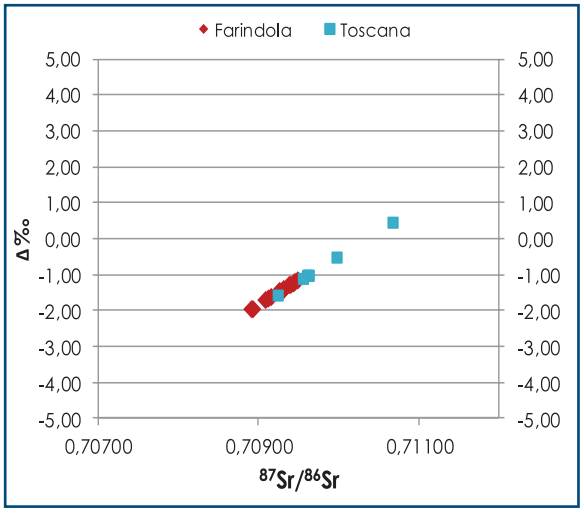


Figura 4. Distribuzione dei 41 campioni di formaggio in funzione del solo rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$. Il cluster relativo al Pecorino di Farindola è rappresentato dall'intervallo compreso tra le due linee tratteggiate (0,70893 - 0,70950).

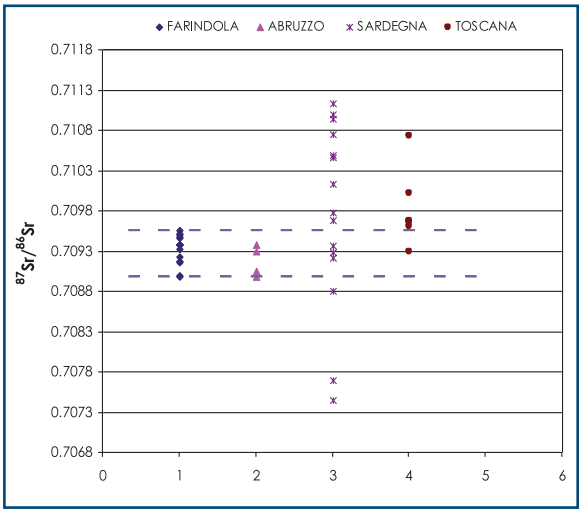
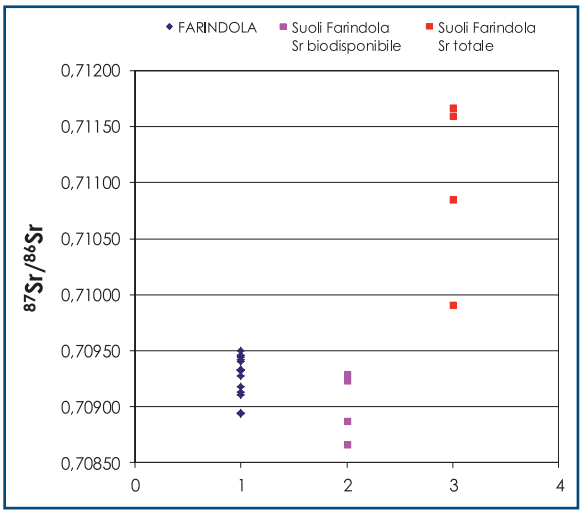


Figura 5. Rapporti isotopici $^{87}Sr/^{86}Sr$ relativi ai campioni di Pecorino di Farindola e ai campioni di suolo prelevati nelle aree di pascolo del territorio di Farindola dopo estrazione dello stronzio totale e della frazione biodisponibile.



ampia che ha interessato la terza cifra decimale con la variazione di ± una unità (~1600ppm) (Tabelle 1-2). Anche questo risultato ha assecondato le aspettative. L'area geografica sarda è molto vasta e riflette, in maniera più o meno completa, alcuni dei grandi eventi geodinamici degli ultimi 400 milioni di anni (varisico, tetideo e alpino). Infatti, vi affiorano rocce sedimentarie, vulcaniche, intrusive e metamorfiche responsabili, nel tempo, del formarsi di suoli geologicamente diversi (2). Il cluster, incentrato sul valore medio 0,70969, ha mostrato una differenza di circa 4 unità sulla quarta cifra decimale rispetto al valore medio del cluster Farindola. L'ampia dispersione ha distribuito i valori del cluster Sardegna in gran parte lontano dal cluster Farindola (Figura 2), soprattutto nella

parte superiore del piano. Soltanto 3 campioni hanno mostrato compatibilità con i valori relativi al Pecorino di Farindola.
Il cluster Toscana, costituito di 7 campioni, ha presentato una dispersione compresa tra 4 e 5 unità sulla quarta cifra decimale del rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$ (~600ppm) (Tabelle 1-2). Se si considera l'intera regione Toscana valgono le considerazioni di avvicendamento geologico nel tempo fatte per la Sardegna: una distribuzione di varietà geologiche caratterizzanti territori diversi (4). Il cluster, incentrato sul valor medio 0,70976, ha mostrato una differenza di circa 4 unità sulla quarta cifra decimale rispetto al valor medio del cluster Farindola. I valori del cluster Toscana si sono collocati tutti, tranne uno, all'esterno del cluster Farindola e in posizione superiore (Figura 3).
Per una più immediata visualizzazione e facile comparazione tutti i campioni di pecorino sono stati riportati in Figura 4. L'origine geografica del 73% dei campioni (Abruzzo+Sardegna+Toscana) è risultata differenziabile dal cluster di riferimento (Farindola). Date le similitudini geologiche dei siti Anversa degli Abruzzi e Farindola, se si considerano come campioni esterni solo quelli extraregionali la capacità di discriminazione è stata superiore all'81%. Per un miglioramento di questo risultato sarebbe necessario disporre di un maggior numero di campioni georeferenziati che in considerazione delle vastità delle aree Sardegna e Toscana, permettano la costruzione di sottoinsiemi (o mini cluster).
Inoltre, le prime indagini effettuate sui campioni di suolo hanno fornito valori di $^{87}Sr/^{86}Sr$ per la frazione biodisponibile compatibili con quelli misurati nei campioni di Pecorino di Farindola prodotti nello stesso territorio e come atteso, valori più elevati sono stati ottenuti per lo Sr totale (Figura 5).

Conclusioni

Il rapporto isotopico $^{87}Sr/^{86}Sr$, misurato mediante la TIMS, si è dimostrato un valido parametro per il riconoscimento geografico del 73% dei campioni in esame. In ragione della complessità della matrice, per aumentare ulteriormente il potere discriminante, si potrebbero affiancare altre tecniche di indagine come l'analisi multielementale e la risonanza magnetica nucleare. La combinazione dei risultati ottenuti, con l'ausilio dell'analisi statistica multivariata, potrebbe verosimilmente permettere la tracciabilità del Pecorino di Farindola.

Bibliografia

1. Baffi C. and P.R. Trincherini, 2015. The application of mass spectrometry with the use of the Sr isotopic ratio for food traceability. A review (in preparazione).
2. Carmignani L., G. Oggiano, S. Barca, P. Conti, A. Eltrudis, A. Funedda, S. Pasci e I. Salvadori, 2005. Memorie descrittive della carta geologica d'Italia. Geologia della Sardegna (Note illustrative della carta geologica della sardegna a scala 1:200.000). Servizio Geologico Nazionale. Istituto Poligrafico e zecca dello Stato, Roma.
3. Disciplinare di produzione del Pecorino di Farindola, http://www.pecorinodifarindola.it/index.php?option=com_content&view=article&id=55&Itemid=68 (Consultato il 25 aprile 2015).
4. http://www.regione.toscana.it/-/banche-dati-cartografia-geologica (Consultato il 23 aprile 2015).
5. Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali 2015. Quindicesima revisione dell'elenco nazionale dei prodotti agroalimentari tradizionali. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 22 luglio 2015, n. 168 supplemento ordinario n. 43.
6. Ministero delle politiche agricole e forestali 1999. Decreto Ministeriale del 8 settembre 1999, n. 350. Regolamento recante norme per l'individuazione dei prodotti tradizionali. Gazzetta Ufficiale, 12 ottobre 1999, n. 240.
7. Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea 2012. Regolamento (UE) 1151/2012 del 21 novembre 2012 sui regimi di qualità dei prodotti agricoli e alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 14 dicembre 2012, L. 343/1.
8. Rosner M., 2010. Geochemical and instrumental fundamentals for accurate and precise strontium isotope data of food samples: Comment on "Determination of the strontium isotope ratio by ICP-MS ginseng as a tracer of regional origin" (Choi et al., 2008). Food Chem., 121: 918-921.
9. Song B.Y., J.S. Ryu, H.S. Shin and K.S. Lee, 2014. Determination of the source of bioavailable Sr using $^{87}Sr/^{86}Sr$ tracers: a case study of hot pepper and rice. J. Agr. Food Chem., 62: 9232-9238.
10. Steiger R.H. and E. Jäger, 1977. Subcommission on Geochronology: convention on the use of decay constants in Geo- and Cosmochronology. Earth Planet. Sc. Lett., 36: 359-362.
11. Trincherini P.R., C. Baffi, P. Barbero, E. Pizzoglio and S. Spalla, 2014. Precise determination of strontium isotope ratios by TIMS to authenticate tomato geographical origin. Food Chem., 145: 349–355.
12. Voerkelius S., G.D. Lorenz, S. Rummel, C.R. Quétel, G. Heiss, M. Baxter, C. Brach-Papa, P. Deters-Itzelsberger, S. Hoelzl, J. Hoogewerff, E. Ponzevera, M. Van Bocxstaele and H. Ueckermann, 2010. Strontium isotopic signatures of natural mineral waters, the reference to a simple geological map and its potential for authentication of food. Food Chem., 118(4): 933-940.

Riconoscimento del Pecorino di Farindola con approccio di tipo "untargeted" mediante spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare ad Alta Risoluzione del Protone (^{1}H HR-NMR)

Alessandra Micozzi, Salvatore Milone

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM) "G. Caporale", Campo Boario, 64100 Teramo - Italia
Corrispondenza: Salvatore Milone, s.milone@izs.it

Parole chiave
Analisi del Discriminante Lineare (LDA),
Analisi statistica multivariata,
Analisi untargeted,
Food fingerprinting,
Modello di classificazione,
Pecorino di Farindola,
Risonanza Magnetica Nucleare (HR-NMR)

Riassunto
Le matrici alimentari possono essere indagate riguardo l'origine geografica, le varietà di specie, le possibili adulterazioni, ecc. per mezzo di analisi chimiche spettroscopiche o spettrometriche "untargeted" seguite da una valutazione statistica multivariata dei dati acquisiti. Con tale approccio non vengono selezionati a priori solo particolari metaboliti noti ma viene presa in considerazione la totalità delle informazioni analitiche (segnali spettrali) che forniscono una sorta di "impronta digitale" dell'alimento. In questo studio sono stati analizzati estratti acquosi di Pecorino di Farindola e di altri pecorini italiani mediante spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare ad Alta Risoluzione del Protone (^{1}H HR-NMR) abbinata all'analisi statistica multivariata. Lo scopo è stato quello di costruire un modello di classificazione pilota in grado di discriminare il Pecorino di Farindola dagli altri pecorini. L'approccio "untargeted" è stato applicato a 211 campioni di cui 121 di Pecorino di Farindola e 90 di diversi pecorini provenienti da quattro territori italiani (Abruzzo, Emilia Romagna/Marche, Sardegna, Toscana). Tramite l'analisi statistica multivariata dei dati spettrali ottenuti è stato costruito e validato un modello di classificazione di cui, in seguito, è stata valutata l'abilità predittiva. Il 98,9% dei campioni analizzati sono stati correttamente predetti nelle rispettive classi di appartenenza ("Pecorini di Farindola", "Altri Pecorini"). Nonostante il modello ottenuto abbia mostrato buone performance predittive, basandosi solo su 211 campioni, non può essere utilizzato al momento per predire campioni in routine ma offre buone prospettive per la creazione di una banca dati completa e aggiornabile. Banca dati con la quale produrre un modello robusto e dinamico che possa essere utilizzato come strumento per la verifica di autenticità di pecorini di Farindola di dubbia provenienza o da certificare.

Introduzione

Nelle matrici alimentari la tipologia di metaboliti e la concentrazione derivano dalla combinazione di numerosi fattori concomitanti legati a: zona di produzione, materie prime, tecniche produttive, alimentazione degli animali, stagionalità ecc. Tale combinazione di fattori potrebbe caratterizzare il prodotto stesso al punto di fornire una sorta di "impronta digitale" dell'alimento.

Il profilo dei metaboliti presenti in una matrice alimentare può essere ottenuto tramite la spettroscopia HR-NMR, tecnica che sta riscuotendo crescente consenso nella ricerca in ambito alimentare (3, 6).

Gli alimenti possono essere indagati riguardo: origine geografica, varietà di specie, adulterazioni, ecc. per mezzo di analisi chimiche spettroscopiche o spettrometriche "untargeted" seguite da una valutazione statistica multivariata dei dati acquisiti. Con l'approccio "untargeted" non vengono selezionati a priori solo particolari segnali spettrali di metaboliti noti ma considerata la totalità degli stessi, inclusi quelli sconosciuti, che contribuiscono a elaborare il miglior modello predittivo possibile.

Gli approcci "untargeted" basati sullo studio delle "impronte digitali degli alimenti" (food fingerprinting) sono considerati sempre più potenti mezzi di indagine nei processi di autenticazione per la caratterizzazione di matrici alimentari complesse (7). L'interesse nei confronti di metodi analitici in grado di rispondere a problematiche emergenti legate alla tutela dei prodotti alimentari sta crescendo notevolmente, parallelamente alla diffusione sempre maggiore di pratiche sleali quali frodi, contraffazioni e adulterazioni.

Il Pecorino di Farindola, formaggio tradizionale abruzzese, viene prodotto con materie prime originarie della zona di produzione e con un particolare metodo di lavorazione del latte crudo (2). Tali condizioni potrebbero impartire peculiari caratteristiche al prodotto rendendolo differenziabile da altri pecorini posti in commercio.
In questo studio sono stati analizzati estratti acquosi di Pecorino di Farindola e di altri pecorini italiani attraverso la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare ad Alta Risoluzione del Protone (^{1}H HR-NMR) abbinata all'analisi statistica multivariata. Lo scopo è stato quello di costruire un modello di classificazione pilota in grado di discriminare il Pecorino di Farindola dagli altri pecorini.
Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Materiali e metodi

Piano di Campionamento

Nel periodo febbraio - ottobre 2014 sono stati prelevati 121 campioni di Pecorino di Farindola prodotto da 5 aziende appartenenti al relativo Consorzio di Tutela (Tabella 1).
Nel periodo luglio 2014 - febbraio 2015 sono stati prelevati, in alcuni punti vendita abruzzesi, 90 pecorini prodotti in 4 territori italiani (Tabella 2).
Ogni campione è stato suddiviso in due parti. Una parte è stata conservata a temperatura inferiore a -18°C, l'altra, privata della crosta, è stata trattata con omogeneizzatore a lame a 6000g/m. per 20sec (Grindomix GM-200, Retsch, Hann - Germania). L'omogeneizzato è stato conservato in congelatore a temperatura inferiore a -18°C fino al momento delle analisi.

Analisi NMR

Al fine di sottoporre ad analisi tramite spettroscopia ^{1}H HR-NMR, i 211 campioni di formaggio sono stati estratti in ossido di deuterio (D_2O) e trattati fino all'ottenimento di una soluzione limpida. A 1,00g di omogeneizzato di ciascun campione sono stati addizionati 5ml di D_2O (Deuterium Oxide, 99,8 atom %D, Armar Chemicals, Döttingen - Svizzera). Il tutto è stato posto su agitatore orizzontale (Universal Table Shaker 709, ASAL, Cernusco sul Naviglio - Italia) per 10min a 180giri/min e successivamente centrifugato a 4500giri/min per 10min a 18°C (Heraeus Multifuge 3SR+ centrifuge, Thermo Scientific, Langenselbold - Germania). La soluzione surnatante, separata dal precipitato, è stata filtrata utilizzando filtri con dimensione dei pori di 0,2µm (Puradisc™ 25 TF, Whatman, Little Chalfont, Buckinghamshire - Regno Unito) e ne è stato misurato il pH (con pHmetro HI9321, HANNA Instruments, Padova - Italia).
Ad una aliquota di 800µl dell'estratto sono stati aggiunti 20µl di una soluzione stabilizzante di NaN_3 (Sodium Azide, ≥99,5%, Sigma Aldrich, Steinheim - Germania) in D_2O (8mg/ml) e 20µl di una soluzione di standard interno di TSP (3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d_4 acid, sodium salt, 98 atom%D, Sigma Aldrich) in D_2O (4mg/ml) e 600µl della soluzione ottenuta (indicata nel testo come "filtrata") sono stati sottoposti ad analisi ^{1}H HR-NMR. L'utilizzo di D_2O consente l'estrazione dei metaboliti presenti nelle matrici alimentari in modo rapido e diretto. La procedura determina l'estrazione parziale anche delle macromolecole con la conseguente presenza di segnali "allargati" nei corrispondenti spettri NMR (6). Le prime indagini effettuate hanno confermato la presenza di tali segnali che potrebbero da un lato mascherare la presenza di altri metaboliti presenti in bassa concentrazione nella miscela, dall'altro contribuire al profilo metabolico globale dell'estratto in analisi. Non potendo prevedere il contributo positivo o negativo di tali segnali al fine di una possibile differenziazione e classificazione dei campioni di Pecorino di Farindola rispetto agli altri pecorini prodotti in altri territori d'Italia, si è deciso di allontanare dalle soluzioni campione le macromolecole attraverso dispositivi di ultrafiltrazione, utilizzati con successo per problematiche analoghe (8,9), e di sottoporre ad analisi entrambi gli estratti, filtrati e ultrafiltrati.

Tabella 1. Aziende produttrici di Pecorino di Farindola sottoposte a campionamento e numero di campioni prelevati

Azienda	Numero di campioni prelevati
1	53
2	36
3	12
4	15
5	5
Totale	121

Tabella 2. Territori di produzione dei diversi pecorini e numero di campioni prelevati

Territorio di produzione	Numero di campioni prelevati
Abruzzo	10
Emilia Romagna - Marche	23
Sardegna	41
Toscana	16
Totale	90

Pertanto, un'altra aliquota dell'estratto pari a 2,5ml è stata ultrafiltrata attraverso dispositivi di centrifugazione con membrane aventi cut-off di 3kDa (Microsep™ Advance Centrifugal Devices, 3K Omega, Pall Corporation, New York - USA). La soluzione campione, posta nel dispositivo di centrifugazione con membrana, è stata centrifugata a 4500giri/min per 30min a 18°C. Prima di essere utilizzati, i dispositivi di ultrafiltrazione sono stati lavati per 10 volte centrifugandoli in presenza di acqua demineralizzata al fine di eliminare il glicerolo presente. Il completo allontanamento del glicerolo è stato verificato eseguendo un ultimo lavaggio con D_2O ed effettuando lo spettro ^1H HR-NMR della soluzione di lavaggio. Ad 1ml della soluzione ultrafiltrata sono stati addizionati 25µl di soluzione TSP e 25µl di soluzione NaN_3 con le stesse concentrazioni e modalità della soluzione filtrata. Una quantità pari a 600µl della soluzione ottenuta (indicata nel testo come "ultrafiltrata") è stata posta in tubo NMR e sottoposta ad analisi ^1H HR-NMR.
Gli esperimenti di Risonanza Magnetica Nucleare sono stati effettuati automaticamente tramite il software IconNMR 4.6.6 build 19 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten - Germania) utilizzando uno spettrometro NMR Bruker AVANCE III 400 Ultrashield (Bruker BioSpin AG, Fällanden - Svizzera) con probe BBI-z (Broadband Inverse Probe-z gradient) operante a 400,13 MHz sulla frequenza del protone e dotato di autocampionatore B-ACS 60 (Bruker BioSpin GmbH) (Figura 1).

Figura 1. Spettrometro NMR utilizzato per analizzare i campioni.

Il tubo NMR, contenente la soluzione in analisi, è stato introdotto all'interno dello spettrometro NMR e lasciato equilibrare per 5min a 300K. Sono state effettuate automaticamente le procedure di lock sul solvente, matching, tuning e shimming, è stato ottimizzato l'impulso a 90° e il segnale dell'acqua è stato soppresso tramite presaturazione su una finestra spettrale di 25Hz. È stato effettuato l'esperimento "noesygppr1d" utilizzando una finestra spettrale di 20ppm e 64k punti di acquisizione. L'esperimento è stato condotto con diverso numero di scansioni (32 e 512) sia per le soluzioni filtrate che ultrafiltrate.
L'elaborazione dei dati spettrali (trasformata di Fourier, fasatura, correzione della linea di base e calibrazione dello spettro rispetto al TSP) è stata effettuata attraverso il software TopSpin 3.1 (Bruker BioSpin GmbH). Gli spettri ^1H HR-NMR acquisiti con 512 scansioni sui campioni preparati a partire dalle soluzioni dopo filtrazione e ultrafiltrazione hanno costituito i set di dati sui quali sono state effettuate le elaborazioni statistiche.

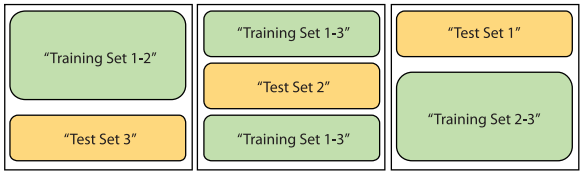
Analisi Statistica Multivariata

Per poter applicare l'analisi statistica multivariata è stata costruita una "bucket table" tramite il software Amix 3.9.12 (Bruker BioSpin GmbH) utilizzando un bucketing rettangolare con ampiezza dei bucket di 0,01ppm su una finestra spettrale compresa tra 0,5 - 10,0ppm escludendo la regione 4,71 - 4,82ppm in cui è presente il segnale residuo dell'acqua. L'integrazione è stata effettuata come somma delle intensità dei segnali.
Ogni spettro è stato ugualmente suddiviso in 938 regioni di ampiezza e posizione identica (bucket) e su ciascuna di esse è stata calcolata l'area totale sottesa. Ripetendo questa operazione su tutti i bucket e i campioni è stata ottenuta una matrice di dati formata da 211 righe (campioni) e 938 colonne (variabili) che è stata processata con il software R (R version 3.1.0 (2014-04-10) "Spring Dance" Copyright (C) 2014 The R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria. URL http://www.R-project.org/ consultato il 25 giugno 2015). Su questa matrice sono state effettuate operazioni matematiche che hanno trasformato la stessa in una nuova matrice in cui tutte le colonne hanno media zero (centratura) e varianza unitaria (scalatura) (Novomestky F. 2012. matrixcalc: Collection of functions for matrix calculations. R package version 1.0-3. http://CRAN.R-project.org/package=matrixcalc consultato il 25 giugno 2015). È stata quindi effettuata un'analisi esplorativa dei dati con la Principal Component Analysis (PCA) (1) anche per verificare l'assenza o meno di eventuali outlier.

Il passo successivo è stato quello di produrre un modello di classificazione e valutare la capacità dello stesso di poter discriminare i pecorini analizzati in due classi ben distinte "Pecorini di Farindola" e "Altri Pecorini" (il vettore di questa classificazione nota per ogni pecorino è stato fornito e matematicamente processato con la matrice iniziale). La classificazione è stata ottenuta tramite la Linear Discriminant Analysis (LDA) preceduta dal metodo Random Forest (5) (parametri: ntree = 5000, mtryFactor = 1) per la selezione delle migliori variabili di classificazione (Diaz-Uriarte R. 2010. varSelRF: Variable selection using random forests. R package version 0.7-3. http://CRAN.R-project.org/package=varSelRF consultato il 25 giugno 2015). Il processo è stato reiterato per poter valutare la stabilità delle variabili selezionate e poter produrre più modelli classificatori a diverso numero di variabili. Attraverso questo procedimento è stato possibile selezionare le variabili più significative per la classificazione e successivamente valutare le prestazioni dei modelli su di esse costruiti. Le variabili ottimali per il set di dati costituito dagli spettri ^{1}H HR-NMR acquisiti dalle soluzioni filtrate e ultrafiltrate sono risultate, rispettivamente, 42 e 34. Con le variabili selezionate è stata ripetuta l'analisi PCA e tramite la LDA è stata effettuata la classificazione dei dati e generati i modelli di classificazione (indicati di seguito come Global Model) (1).

I Global Model sono stati validati tramite validazione interna e sono state calcolate le performance di predizione dei campioni interni ad esso. Tali performance però sono basate solo sulla predizione di campioni con cui in realtà i modelli stessi sono stati costruiti. In questo modo non si ottengono informazioni su come si comportano i modelli ottenuti al di fuori dei campioni con cui vengono generati. Per valutare la stabilità dei Global Model e l'abilità predittiva nei confronti di campioni sconosciuti è stata condotta una "convalida trasversale" generando da tutti i dati del modello tre differenti submodelli più piccoli che sono stati utilizzati per predire tre relativi gruppi di campioni esterni (incogniti). Quindi, ogni matrice che ha originato il Global Model è stata divisa in tre parti (costituite da 71, 70 e 70 campioni) ognuna contenente campioni rappresentativi di entrambe le classi ("Pecorini di Farindola" e "Altri Pecorini") come riportato schematicamente in Figura 2. A rotazione, due di queste parti hanno costituito una nuova matrice più piccola con cui è stato generato un submodello indicato come "Training Set" e la terza parte ha costituito un gruppo "Test Set" di campioni incogniti che, con il nuovo submodello generato, verranno predetti. Quindi, dal Global Model sono stati ottenuti tre submodelli: "Training Set 1-2" costituito dalle parti 1 e 2 con cui predire il gruppo di campioni incogniti "Test Set 3" ; "Training Set 1-3" costituito dalle parti 1 e 3 con cui predire il gruppo di campioni incogniti "Test Set 2"; "Training Set 2-3" costituito dalle parti 2 e 3 con cui predire il gruppo di campioni incogniti "Test Set 1". Tutti i submodelli ottenuti sono stati validati e sono state calcolate le performance di classificazione e predizione interna ed esterna.

Figura 2. Schema sperimentale della "convalida trasversale" del modello di classificazione.



Legenda
- Training Set 1-2: submodello costituito dalle parti 1 (71 campioni) e 2 (70 campioni);
- Test Set 3: parte 3 costituita da 70 campioni incogniti al Training Set 1-2;
- Training Set 1-3: submodello costituito dalle parti 1 (71 campioni) e 3 (70 campioni);
- Test Set 2: parte 2 costituita da 70 campioni incogniti al Training Set 1-3;
- Training Set 2-3: submodello costituito dalle parti 2 (70 campioni) e 3 (70 campioni);
- Test Set 1: parte 1 costituita da 71 campioni incogniti al Training Set 2-3.

Risultati

Analisi NMR

Lo studio è stato condotto utilizzando uno spettrometro NMR che ha consentito di ottenere spettri ^{1}H HR-NMR di estratti "acquosi".

A titolo di esempio si riporta l'ingrandimento dello spettro ^{1}H HR-NMR di un estratto filtrato di Pecorino di Farindola (Figura 3) e la sovrapposizione degli spettri ottenuti dopo filtrazione e ultrafiltrazione (Figura 4) per uno stesso campione.

I profili spettroscopici hanno mostrato numerosi segnali dovuti alla presenza di diversi composti idrosolubili presenti nella matrice.

Analisi Statistica Multivariata

Un'indagine preliminare sui campioni analizzati è stata effettuata attraverso la PCA.

In Figura 5 si riportano gli score plot della PCA effettuata sugli spettri ^{1}H HR-NMR delle soluzioni ultrafiltrate considerando tutte le 938 variabili e solo le 34 variabili selezionate tramite Random Forest.

Si può osservare come la selezione delle variabili produca un miglioramento in termini di separazione delle due classi "Pecorini di Farindola" / "Altri Pecorini".

Figura 3. Ingrandimento dello spettro ^{1}H HR-NMR di un estratto "acquoso" filtrato di Pecorino di Farindola.

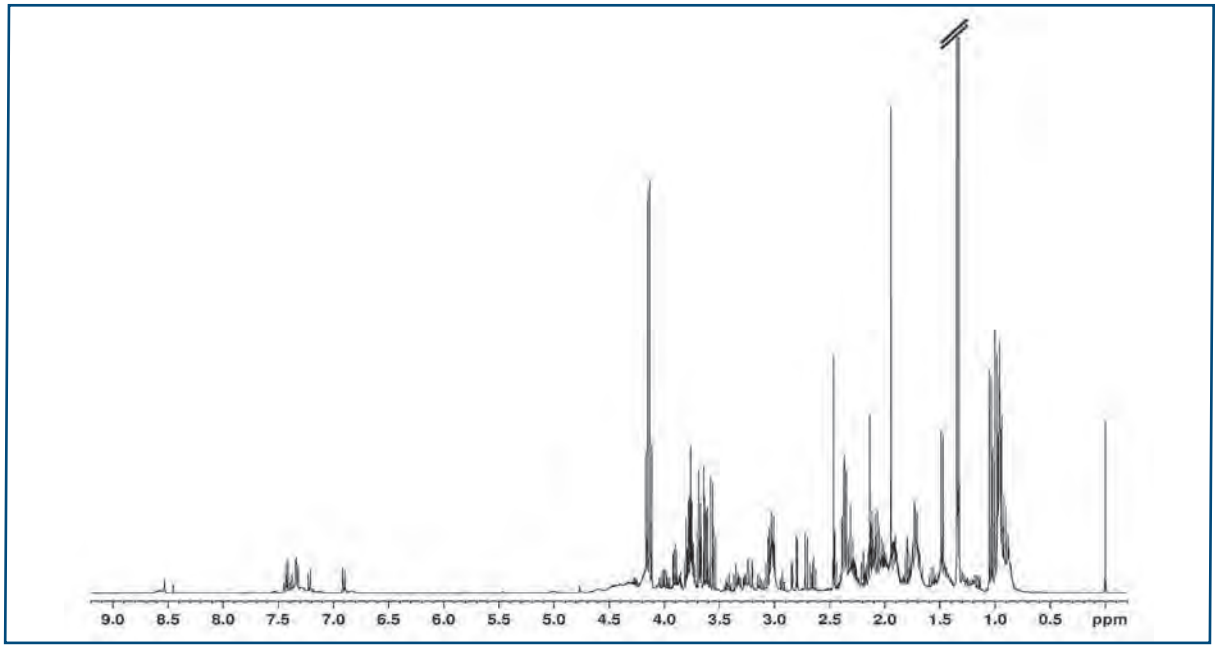
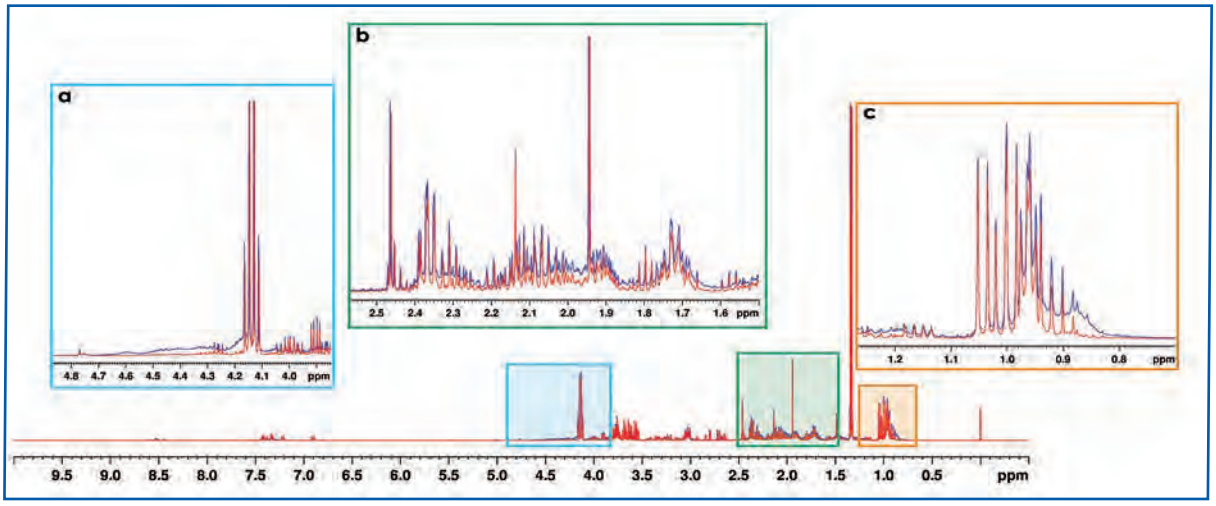
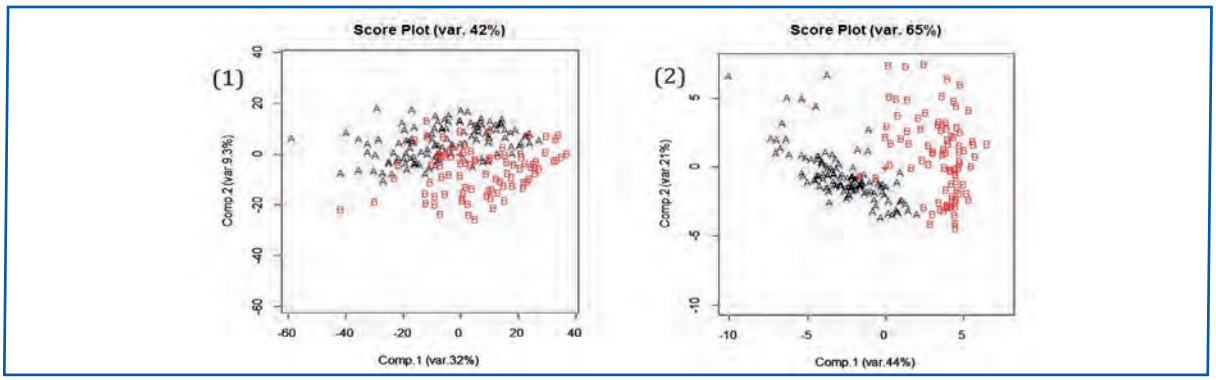


Figura 4. Spettri ^{1}H HR-NMR relativi ad estratti "acquosi" di un campione di Pecorino di Farindola con gli ingrandimenti di alcune regioni spettrali (a, b, c).



Legenda
- blu: spettro dell'estratto dopo filtrazione;
- rosso: spettro dell'estratto dopo ultrafiltrazione.

Figura 5. Score plot della PCA ottenuta con tutti gli spettri ^{1}H HR-NMR delle 211 soluzioni campione ultrafiltrate considerando tutte le 938 variabili (1) e solo le 34 variabili selezionate tramite Random Forest (2).



Legenda
- A: campioni appartenenti alla classe "Pecorini di Farindola";
- B: campioni appartenenti alla classe "Altri Pecorini".

Tramite la LDA è stato ottenuto il modello di classificazione, Global Model, con le migliori performance. Questo modello è stato validato tramite i campioni interni e tramite "convalida trasversale". I risultati sono riportati nelle Tabelle 3 e 4. In particolare, in Tabella 3 sono riportate le matrici di confusione relative alla validazione tramite campioni interni (Global Model) e alla "convalida trasversale" (Training Set 1-2, Training Set 1-3 e Training Set 2-3) e in Tabella 4 sono riportate le rispettive percentuali di campioni correttamente assegnati in cross validation e prediction.

Discussione

Il formaggio pecorino, matrice oggetto di questo studio, si è presentato come una miscela complessa all'analisi NMR. Negli spettri ^{1}H HR-NMR ottenuti

Tabella 3. Matrici di confusione della LDA ottenuta considerando gli spettri ^{1}H HR-NMR delle 211 soluzioni campione ultrafiltrate.

	Training set						Test set		
	Cross validation			Prediction			Prediction		
Global Model		A	B		A	B			
	A	121	0	A	121	0			
	B	4	86	B	2	88			
Training Set 1-2		A	B		A	B		A	B
	A	81	0	A	81	0	A	40	0
	B	4	56	B	1	59	B	2	28
Training Set 1-3		A	B		A	B		A	B
	A	81	0	A	81	0	A	39	1
	B	1	59	B	1	59	B	1	29
Training Set 2-3		A	B		A	B		A	B
	A	78	2	A	80	0	A	41	0
	B	3	57	B	2	58	B	0	30

Legenda
- A: campioni appartenenti alla classe "Pecorini di Farindola";
- B: campioni appartenenti alla classe "Altri Pecorini";
- In nero è riportato il numero di campioni correttamente assegnati alle rispettive classi in seguito ai processi di cross validation e prediction;
- In rosso è riportato il numero di campioni di una classe che vengono erroneamente assegnati all'altra classe in seguito ai processi di cross validation e prediction.

Tabella 4. Percentuale di campioni correttamente predetti da LDA attraverso i processi di cross validation e prediction considerando gli spettri ^{1}H HR-NMR delle 211 soluzioni campione ultrafiltrate.

	Training set		Test set
	Cross validation (%)	Prediction (%)	Prediction (%)
Global Model	97,8	98,9	
Training Set 1-2	96,7	99,2	96,7
Training Set 1-3	99,2	99,2	97,1
Training Set 2-3	96,3	98,3	100,0
Mean*	97,4	98,9	97,9
Standard Deviation*	1,6	0,5	1,8

Legenda
*riferiti e calcolati esclusivamente rispetto ai valori dei tre submodelli (Training Set 1-2, Training Set 1-3, Training Set 2-3).

dopo filtrazione (Figura 3), accanto ai numerosi segnali "stretti" relativi ai metaboliti a basso peso molecolare, si è osservata la presenza di segnali "larghi" in diverse regioni dello spettro riconducibili a macromolecole presenti nell'estratto (4, 6). Una netta riduzione di tali segnali allargati e una migliore definizione dei segnali relativi ai metaboliti presenti in miscela si è osservata dopo ultrafiltrazione (Figura 4).

La successiva analisi statistica multivariata dei dati ^{1}H HR-NMR ha permesso di generare due modelli (l'uno costruito sugli estratti dei campioni dopo filtrazione e l'altro dopo ultrafiltrazione) che sono risultati molto simili. In questo studio sono riportati i dati del solo modello ottenuto dagli estratti ultrafiltrati che ha mostrato performance leggermente migliori.

Come riportato in Tabella 4, dopo validazione, il 98,9% dei campioni interni al modello "Global Model" sono stati correttamente predetti dal modello stesso.

Inoltre, i risultati ottenuti dalla "convalida trasversale" hanno mostrato un ottimo accordo con i risultati previsti dal modello globale. Infatti, il Global Model ha evidenziato un 97,8% di campioni interni correttamente classificati in "cross validation" e un 98,9% di campioni correttamente predetti. La media della percentuale dei campioni esterni (quindi incogniti ai submodelli) correttamente predetti è stata del 97,9% con una deviazione standard di 1,8.

Conclusioni

Lo studio effettuato, utilizzando l'approccio "untargeted" sugli spettri ^{1}H HR-NMR dei campioni presi in considerazione, in combinazione con l'analisi statistica multivariata, ha prodotto un modello formato da 211 campioni che è risultato in grado di differenziare analiticamente e con buone performance i Pecorini di Farindola da altri pecorini presenti in commercio e prodotti in diverse regioni del territorio nazionale. Nonostante il modello ottenuto mostri buone performance predittive, basandosi solo su 211 campioni, non può essere utilizzato al momento per predire campioni in routine ma offre buone prospettive per la creazione di una banca dati completa e aggiornabile. Banca dati con la quale produrre un modello robusto e dinamico che possa essere utilizzato come strumento per la verifica di autenticità di pecorini di Farindola di dubbia provenienza o da certificare.

Bibliografia

1. Dell'Omodarme M., 2012, *Esercitazioni di statistica biomedica*, alcune note su R. http://cran.r-project.org/doc/contrib/DellOmodarme-esercitazioni-R.pdf (consultato il 25 maggio 2015).
2. Disciplinare di produzione del Pecorino di Farindola, http://www.pecorinodifarindola.it/index.php?option=com_content&view=article&id=55&Itemid=68 (consultato il 25 maggio 2015).
3. Lamanna R., 2013, *Proton NMR Profiling of Food Samples*, Ann. R. NMR S., 80: 239-291.
4. Lamanna R., A. Braca, E. Di Paolo and G. Imparato, 2011, *Identification of milk mixtures by ^{1}H NMR profiling*, Magn. Reson. Chem., 49: S22–S26.
5. Liaw A. and M. Wiener, 2002, *Classification and Regression by randomForest*, R News, 2 (3): 18-22.
6. Mannina L., A.P. Sobolev and S. Viel, 2012, *Liquid state ^{1}H high field NMR in food analysis,* Prog. Nucl. Mag. Res. Sp., 66: 1-39.
7. Riedl J., S. Esslinger and C. Fauhl-Hassek, 2015, *Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication*, Anal. Chim. Acta, 885: 17-32.
8. Sundekilde U.K., N.A. Poulsen, L.B. Larsen and H.C. Bertram, 2012, *Nuclear magnetic resonance metabonomics reveals strong association between milk metabolites and somatic cell count in bovine milk*, J. Dairy Sci., 96: 290-299.
9. Tiziani S., A.H. Emwas, A. Lodi, C. Ludwig, C.M. Bunce, M.R. Viant and U.L. Günther, 2008, *Optimized metabolite extraction from blood serum for ^{1}H nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Anal. Biochem., 377: 16-23.

Conclusioni generali

Il progetto rappresenta la prima indagine scientifica completa sul Pecorino di Farindola.
Lo studio iniziale ha permesso di documentare i processi di produzione del formaggio e del caglio suino utilizzato per la caseificazione. Ha evidenziato procedure comuni e consolidate di produzione che sono garanzia dell'unicità del prodotto. Ha permesso di acquisire anche risultati utili per la riproduzione in laboratorio, indispensabili per l'esecuzione di challenge test di contaminazione artificiale. Lo studio è stato anche di ausilio per conoscere il contesto produttivo e commerciale del prodotto.
Le differenze statisticamente significative dei risultati microbiologici relativi alla materia prima utilizzata dalle diverse aziende, inducono a ritenere questo aspetto determinante per le caratteristiche igienico-sanitarie e organolettiche del prodotto. Da un punto di vista microbiologico, può essere considerata importante per la sicurezza alimentare e, quindi, per il consumatore, l'assenza di stafilococchi coagulasi positivi riscontrata nei prodotti posti in commercio. Visto che il processo di produzione prevede l'impiego di latte crudo, gli autori auspicano il rispetto delle prassi corrette di mungitura e la loro introduzione nel piano di autocontrollo aziendale.
In relazione alla flora autoctona rilevata nel pecorino, il prodotto esaminato può essere considerato una buona riserva di microrganismi potenzialmente produttori di batteriocine. In futuro l'IZSAM si riserva di condurre studi con tecniche complesse come la RT-PCR-DGGE e la metagenomica con l'obiettivo di studiare i microrganismi che contribuiscono alle caratteristiche finali del prodotto per migliorarne la qualità organolettica, nutrizionale e igienico-sanitaria.
In seguito alla valutazione della flora lattica autoctona naturale i risultati hanno permesso di isolare due ceppi di Lactobacillus paracasei come potenziali ceppi probiotici da poter aggiungere come innesti naturali nella produzione del Pecorino allo scopo di incrementarne le caratteristiche di salute e sicurezza.
In relazione allo studio sulla valutazione da parte del prodotto di favorire la moltiplicazione di alcune specie batteriche patogene per l'uomo è stato confermato come la stagionatura riduca drasticamente fino all'eliminazione i microrganismi considerati. Nonostante questo aspetto rassicurante è necessario sottolineare l'importanza della salubrità della materia prima. Al fine di integrare quanto raccolto in relazione alla persistenza batterica, sarebbe utile determinare i reali livelli di contaminazione durante le fasi di produzione per nuove prove di challenge test. La presenza nella microflora naturale del Pecorino di Farindola di batteri in grado di inibire la crescita di alcune specie patogene per l'uomo, che frequentemente contaminano i formaggi, ha confermato l'efficacia del ricorso a innesti di microrganismi autoctoni per contrastare in modo "naturale" gli agenti patogeni, assicurando di conseguenza il rispetto dei criteri microbiologici imposti dall'Unione Europea a tutela del consumatore.
La composizione chimica e il relativo profilo nutrizionale hanno permesso di stabilire come il consumo del Pecorino di Farindola apporti sostanze utili per il funzionamento dell'organismo e per contrastare patologie infiammatorie e tumorali. Per alcuni componenti chimici la variabilità riscontrata potrebbe essere ricondotta a grado e luogo di stagionatura ma anche alle diverse modalità operative impiegate dalle aziende. Tuttavia, per poter affermare che la composizione chimica rilevata sia peculiare del Pecorino di Farindola è necessaria la comparazione con altri pecorini, obiettivo che l'IZSAM ha incluso nei propri progetti futuri.
Lo studio sulle essenze vegetali dei pascoli impiegati per la produzione del latte ovino, destinato alla caseificazione, ha permesso di rilevare le specie botaniche e il loro livello di abbondanza. Risultano indispensabili ulteriori approfondimenti per chiarire quanto la composizione e la variabilità riscontrata nelle diverse stagioni possano incidere insieme ad altri fattori, come ad esempio la razza allevata, sul profilo sensoriale.
Alla luce dei risultati emersi con le analisi sensoriali, sarebbe auspicabile, nel rispetto delle preziose identità aziendali, ridurre quelle diversità più marcatamente percepibili che attualmente esistono tra i prodotti delle diverse aziende, così da garantire, all'interno del territorio di origine, una maggiore uniformità del prodotto, requisito richiesto dai consumatori di prodotti tipici.
Il rapporto isotopico 87Sr/86Sr, misurato mediante Spettrometria di Massa a Ionizzazione Termica, si è dimostrato un valido parametro per il riconoscimento geografico del 73% dei campioni in esame. In ragione della complessità della matrice, per aumentare ulteriormente il potere discriminante, si potrebbero affiancare altre tecniche di indagine che potrebbero permettere la tracciabilità del Pecorino di Farindola.
Lo studio effettuato mediante la Risonanza Magnetica Nucleare in combinazione con l'analisi statistica multivariata ha prodotto un modello costituito da 211 campioni che è risultato in grado di differenziare analiticamente e con buone performance i Pecorini di Farindola da altri pecorini presenti in commercio e prodotti in diverse regioni del territorio nazionale. Nonostante il modello ottenuto mostri buone performance predittive, basandosi solo su 211 campioni, non può essere utilizzato al momento per predire campioni in routine ma offre buone prospettive per la creazione di una banca dati completa e aggiornabile. Banca dati con la quale produrre un modello robusto e dinamico che possa essere utilizzato come strumento per la verifica di autenticità di pecorini di Farindola di dubbia provenienza o da certificare.

FoodAbruzzo: il sistema informativo per la catalogazione, caratterizzazione e valorizzazione dei prodotti agroalimentari tipici regionali

Cos'è FoodAbruzzo?

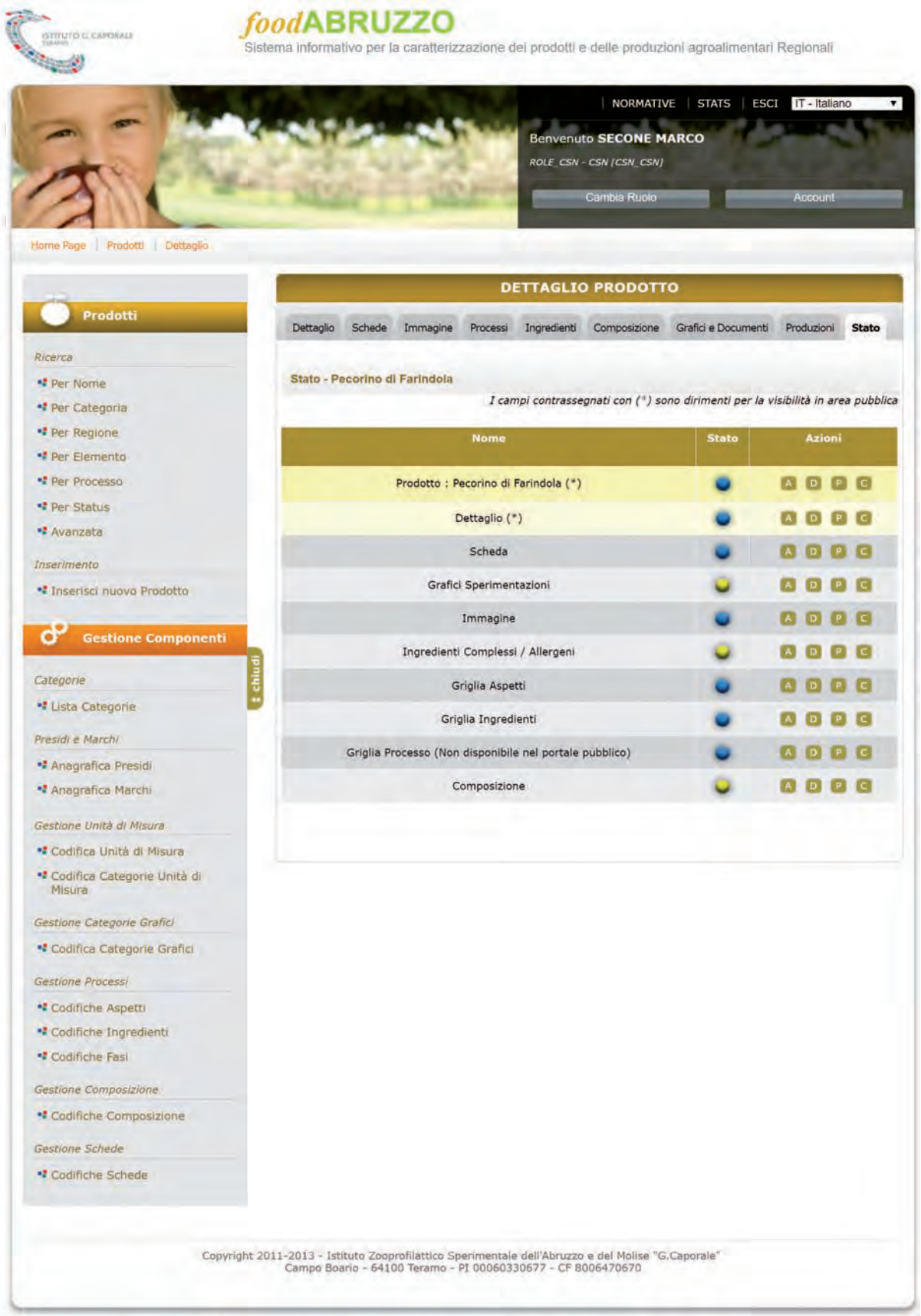
FoodAbruzzo è la banca dati dei prodotti tipici regionali realizzata per valorizzare le eccellenze agroalimentari abruzzesi, E' stata sviluppata, negli anni 2011/2012, dal Centro Elaborazione Dati (CED) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM). Si tratta di uno strumento di comunicazione molto efficace nella diffusione e documentazione delle informazioni su: caratteristiche dei prodotti, sistemi di produzione, aziende produttrici, legami con il territorio attraverso il sistema di tracciabilità, ma anche impieghi del prodotto in preparazioni gastronomiche come espressione dell'arte culinaria regionale.
FoodAbruzzo, raggiungibile in rete all'URL http://foodabruzzo.izs.it, si integra con altri sistemi informativi e servizi forniti dal Centro Servizi Nazionale dell'IZSAM che, per conto del Ministero della Salute, gestisce a Teramo la Banca Dati Nazionale delle anagrafi zootecniche (BDN). Inoltre, permette di coordinare le attività relative ai controlli ufficiali e agli autocontrolli con il Sistema Informativo Nazionale Veterinario della Sicurezza Alimentare (SINVSA). L'obiettivo principale di questo sistema informativo è quello di fornire una serie di servizi, a valore aggiunto, dedicati alla sicurezza alimentare e alla valorizzazione e caratterizzazione di prodotti, produttori e produzioni agroalimentari abruzzesi. Servizi indirizzati a tutti gli operatori del settore agroalimentare, inclusi i cittadini visti come utenti finali, aprendo così un dialogo con i consumatori per orientarli nel consumo consapevole dei prodotti tipici.
FoodAbruzzo consente di gestire le informazioni relative all'anagrafe "prodotti" (ad es. Pecorino di Farindola, Montepulciano d'Abruzzo, ecc.), all'anagrafe "produttori" (aziende e stabilimenti), all'anagrafe "produzioni" (ad es. lo specifico form aggio pecorino o lo specifico vino prodotti da una determinata azienda o stabilimento) e all'anagrafe "codifiche" (categorie di prodotto, presidi, marchi, consorzi, allergeni, ecc.).
FoodAbruzzo si differenzia rispetto ad altre banche dati dei prodotti alimentari in quanto, oltre alle informazioni commerciali generali, consente una serie di caratterizzazioni complesse di dettaglio dei prodotti stessi: ingredienti, aspetti (shelf life, descrizioni morfologiche e merceologiche), processo di produzione, risultati delle analisi di controllo, aspetti nutrizionali, sperimentazioni microbiologiche (challenge test e storage test), sicurezza alimentare (autocontrolli, microrganismi patogeni, indicatori di igiene e tecnologici ecc.). Il Sistema permette di documentare le tipicità dei prodotti regionali e di dimostrare oggettivamente le tipicità del prodotto e del processo produttivo mediante la loro caratterizzazione, raccogliendo in un unico contenitore tutti i dati utili per la relativa catalogazione e caratterizzazione. FoodAbruzzo garantisce l'uniformità dei criteri con cui i dati vengono raccolti, catalogati e resi disponibili e permette di gestire e pubblicare informazioni relative alla sicurezza alimentare, consentendo anche la registrazione degli esiti degli autocontrolli. Inoltre, presenta normative di riferimento, studi e test di microbiologia sui singoli alimenti, grafici e andamenti temporali dii agenti chimici e microbici.

La struttura di FoodAbruzzo

Il sistema informativo è strutturato in due distinti applicativi: un'area "riservata" per la completa gestione delle informazioni in banca dati da parte di consorzi, laboratori, aziende, stabilimenti; un'area "pubblica", vetrina on line dei prodotti agroalimentari abruzzesi, a disposizione del consumatore.
Nell'area "riservata", previa autenticazione, è possibile gestire un insieme di informazioni strutturate. Nell'anagrafe "prodotti" ogni alimento è collegato a categorie alimentari di riferimento, a loro volta riconducibili a quelle stabilite nello Standard Sample Description (SSD) dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). L'anagrafe "produttori", gestita in completa cooperazione applicativa con la BDN delle aziende e degli stabilimenti del SINVSA, contribuisce alla creazione di un'anagrafe unica regionale per il settore agroalimentare. L'anagrafe "produzioni" associa ad ogni stabilimento i prodotti realizzati. L'anagrafe "codifiche", infine, permette la gestione e l'aggiornamento di attributi relativi al prodotto (categorie merceologiche, presidi, marchi, consorzi, ecc.
L'area "pubblica" di FoodAbruzzo fornisce ai consumatori un catalogo, navigabile e consultabile, con informazioni complete e aggiornate sui prodotti agroalimentari abruzzesi "appoggiandosi" ai dati registrati nell'area "riservata" descritta. Per quanto riguarda i prodotti, vengono riportate informazioni generali e schede a connotazione regionale. Per i produttori, il sistema mette a disposizione le informazioni sulle relative generalità e, per le produzioni, vengono rese pubbliche informazioni e schede a connotazione aziendale (shelf-life, ingredienti, andamento di contaminanti chimici e microbici, allergeni, ecc.). Anche le codifiche del prodotto sono visibili all'utente dell'area "pubblica". A discrezione del produttore parti della caratterizzazione delle produzioni possono essere portate in area "pubblica" e rese di conseguenza visibili al consumatore. Nell'area, sono presenti informazioni relative alla sicurezza alimentare: sezioni dedicate alla microbiologia predittiva, studi di shelf life, challenge test e risultati di analisi di laboratorio a tutela del consumatore.

FoodAbruzzo e PecoPlus

Il sistema informativo "FoodAbruzzo" è stato utilizzato nel progetto "PecoPlus" di valorizzazione delle peculiarità e caratterizzazione del Pecorino di Farindola. Affinché "PecoPlus" lasci un'eredità concreta e fruibile è necessario che le attività e i risultati degli studi effettuati siano catalogati, memorizzati e resi disponibili on-line. Ci si è avvalsi, pertanto, del sistema informativo "FoodAbruzzo" per documentare in dettaglio e oggettivamente i prodotti tipici della regione.


foodABRUZZO
Sistema informativo per la caratterizzazione dei prodotti e delle produzioni agroalimentari Regionali
NORMATIVE | STATS | ESCI | IT - Italiano
Benvenuto SECONE MARCO
ROLE_CSN - CSN [CSN_CSN]
Cambia Ruolo
Account
Home Page | Prodotti | Dettaglio
Prodotti
Ricerca
Per Nome
Per Categoria
Per Regione
Per Elemento
Per Processo
Per Status
Avanzata
Inserimento
Inserisci nuovo Prodotto
Gestione Componenti
Categorie
Lista Categorie
Presidi e Marchi
Anagrafica Presidi
Anagrafica Marchi
Gestione Unità di Misura
Codifica Unità di Misura
Codifica Categorie Unità di Misura
Gestione Categorie Grafici
Codifica Categorie Grafici
Gestione Processi
Codifiche Aspetti
Codifiche Ingredienti
Codifiche Fasi
Gestione Composizione
Codifiche Composizione
Gestione Schede
Codifiche Schede
chiudi
DETTAGLIO PRODOTTO
Dettaglio | Schede | Immagine | Processi | Ingredienti | Composizione | Grafici e Documenti | Produzioni | Stato
Stato - Pecorino di Farindola
I campi contrassegnati con (*) sono dirimenti per la visibilità in area pubblica
Nome | Stato | Azioni
Prodotto : Pecorino di Farindola (*)
Dettaglio (*)
Scheda
Grafici Sperimentazioni
Immagine
Ingredienti Complessi / Allergeni
Griglia Aspetti
Griglia Ingredienti
Griglia Processo (Non disponibile nel portale pubblico)
Composizione
Copyright 2011-2013 - Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G.Caporale"
Campo Boario - 64100 Teramo - PI 00060330677 - CF 8006470670

ISTITUTO G. CAPORALE
food ABRUZZO
Abruzzo
Caratterizzazione dei prodotti e delle produzioni agroalimentari Regionali
(beta 1.3.0)
Chi siamo
Dove siamo
Contatti
Area Protetta
Ricerca
Ricerca Avanzata
Aziende
Cerca
Abruzzo
CATEGORIE
PRODOTTI
PRODUZIONI
Formaggi
Pecorino di Farindola
Pecorino di Farindola
Regioni
ABRUZZO
Categorie
Formaggi
Presidi
Slow Food
Descrizione
Prodotto a Farindola e comuni limitrofi in provincia di Teramo e Pescara. E' uno dei prodotti più antichi del firmamento italiano, risalendo all'epoca romana.
© 2011-2013 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G.Caporale"
Campo Boario - 64100 Teramo - PI 00060330677 - CF 8006470670

food ABRUZZO

Caratterizzazione dei prodotti e delle produzioni agroalimentari
(beta 1.3.0)

Chi siamo | Dove siamo | Contatti | Area Protetta

Cerca

Prodotto

Pecorino di Farindola

Aspetti | Ingredienti | Composizione

Allergeni | Shelf Life | Controlli | Grafici

Dettaglio

Codifiche

Categorie: Formaggi
Presidi: Slow Food

Immagine: -

Aspetto del Prodotto

Formaggio a pasta semidura o dura, stagionato da 2-3 mesi fino a 1 anno, a base di latte di pecora intero, crudo, di una o due mungiture.
Ha forma cilindrica con facce piane del diametro di 14-22 cm, scalzo convesso di 7-12 cm.
La pezzatura è variabile, usualmente di 1,4-2,5 Kg, ma si trovano anche forme che arrivano a 7 kg.
Presenta superficie solcata, crosta di colore da nocciola chiaro a marrone-bruno in funzione della durata della stagionatura.
Pasta compatta, di colore paglierino con occhiatura irregolare, variabile per dimensione e distribuzione.

Regioni

ABRUZZO

Descrizione Breve

Prodotto a Farindola e comuni limitrofi in provincia di Teramo e Pescara. E' uno dei prodotti più antichi del firmamento italiano, risalendo all'epoca romana.

Produzioni Associate

Produttore

Produzione

2304 Pecorino di Farindola DOMENICONE GABRIELE AZ. AGR.
1202 Pecorino di Farindola MARTINELLI PIETRO PAOLO AZ. AGR.
1942 Pecorino di Farindola MASSERIE DEL PARCO SOC. COOP.
2342 Pecorino di Farindola LIBERATI FRANCO AZ. AGR.
2162 Pecorino di Farindola ASTOLFI GABRIELE
2262 Pecorino di Farindola DI MARCANTONIO IVANA AZ. AGR. ALL. SUINI
79962 Pecorino di Farindola VERVENNA CARLO
81282 Pecorino di Farindola LANARI OMOBUONO VALENTINO
81382 Pecorino di Farindola COTRACCI PATRIZIA
81302 Pecorino di Farindola ISTITUTO CAPORALE TERAMO
81262 Pecorino di Farindola FRISA ANTONIO
81402 Pecorino di Farindola D'AGOSTINO DANIELE
77542 Pecorino di Farindola MARCELLA MIRKO
2464 Pecorino di Farindola SARTO SILVIO AZ. AGR.

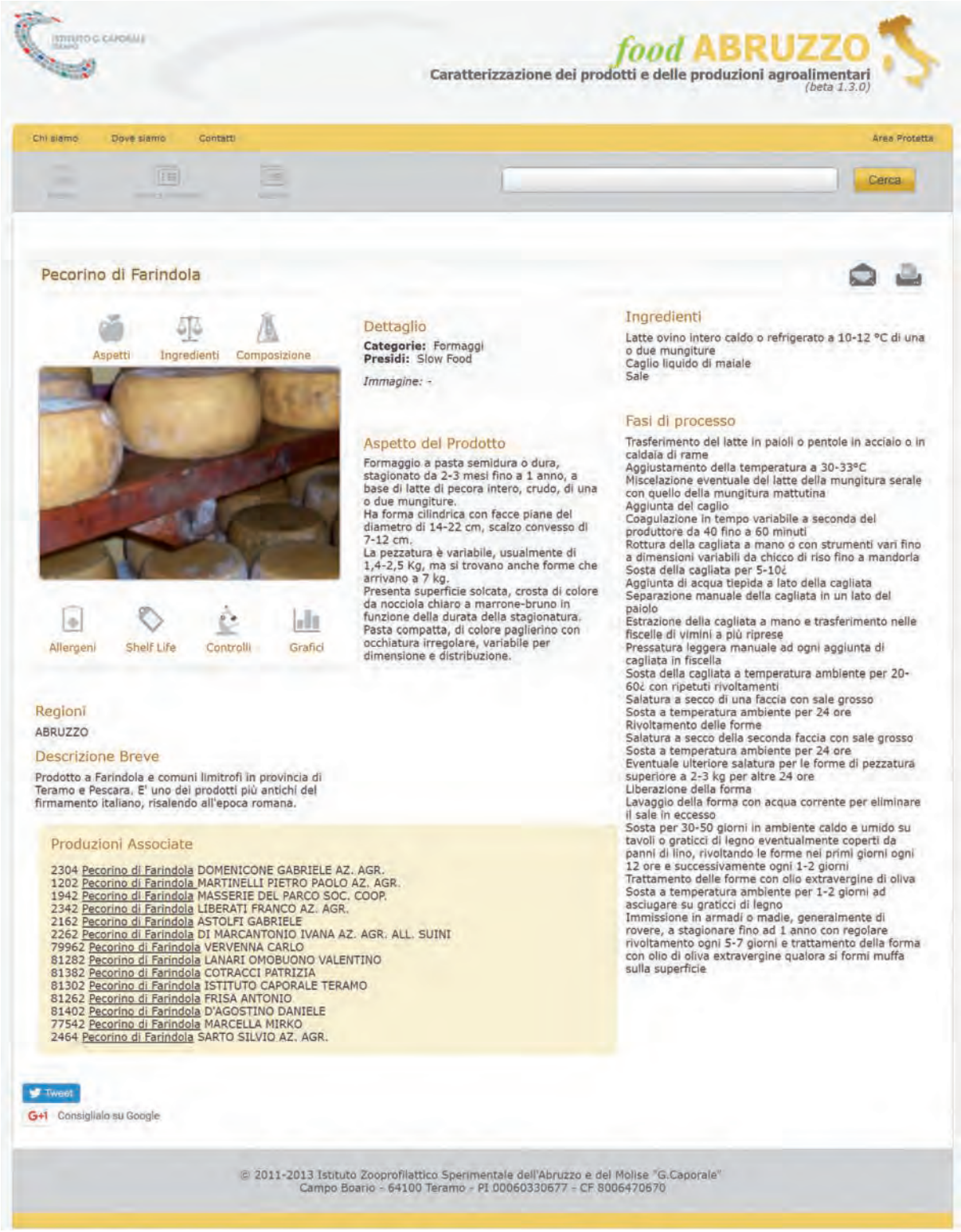
Ingredienti

Latte ovino intero caldo o refrigerato a 10-12 °C di una o due mungiture
Caglio liquido di maiale
Sale

Fasi di processo

Trasferimento del latte in paioli o pentole in acciaio o in caldaia di rame
Aggiustamento della temperatura a 30-33°C
Miscelazione eventuale del latte della mungitura serale con quello della mungitura mattutina
Aggiunta del caglio
Coagulazione in tempo variabile a seconda del produttore da 40 fino a 60 minuti
Rottura della cagliata a mano o con strumenti vari fino a dimensioni variabili da chicco di riso fino a mandorla
Sosta della cagliata per 5-10¿
Aggiunta di acqua tiepida a lato della cagliata
Separazione manuale della cagliata in un lato del paiolo
Estrazione della cagliata a mano e trasferimento nelle fiscelle di vimini a più riprese
Pressatura leggera manuale ad ogni aggiunta di cagliata in fiscella
Sosta della cagliata a temperatura ambiente per 20-60¿ con ripetuti rivoltamenti
Salatura a secco di una faccia con sale grosso
Sosta a temperatura ambiente per 24 ore
Rivoltamento delle forme
Salatura a secco della seconda faccia con sale grosso
Sosta a temperatura ambiente per 24 ore
Eventuale ulteriore salatura per le forme di pezzatura superiore a 2-3 kg per altre 24 ore
Liberazione della forma
Lavaggio della forma con acqua corrente per eliminare il sale in eccesso
Sosta per 30-50 giorni in ambiente caldo e umido su tavoli o graticci di legno eventualmente coperti da panni di lino, rivoltando le forme nei primi giorni ogni 12 ore e successivamente ogni 1-2 giorni
Trattamento delle forme con olio extravergine di oliva
Sosta a temperatura ambiente per 1-2 giorni ad asciugare su graticci di legno
Immissione in armadi o madie, generalmente di rovere, a stagionare fino ad 1 anno con regolare rivoltamento ogni 5-7 giorni e trattamento della forma con olio di oliva extravergine qualora si formi muffa sulla superficie

© 2011-2013 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G.Caporale"
Campo Boario - 64100 Teramo - PI 00060330677 - CF 8006470670



food ABRUZZO

Caratterizzazione dei prodotti e delle produzioni agroalimentari
(beta 1.3.0)

Chi siamo | Dove siamo | Contatti | Area Protetta

Cerca

Pecorino di Farindola

Aspetti | Ingredienti | Composizione

Dettaglio

Categorie: Formaggi
Presidi: Slow Food

Immagine: -

Aspetto del Prodotto

Formaggio a pasta semidura o dura, stagionato da 2-3 mesi fino a 1 anno, a base di latte di pecora intero, crudo, di una o due mungiture.
Ha forma cilindrica con facce piane del diametro di 14-22 cm, scalzo convesso di 7-12 cm.
La pezzatura è variabile, usualmente di 1,4-2,5 Kg, ma si trovano anche forme che arrivano a 7 kg.
Presenta superficie solcata, crosta di colore da nocciola chiaro a marrone-bruno in funzione della durata della stagionatura.
Pasta compatta, di colore paglierino con occhiatura irregolare, variabile per dimensione e distribuzione.

Allergeni | Shelf Life | Controlli | Grafici

Ingredienti

Latte ovino intero caldo o refrigerato a 10-12 °C di una o due mungiture
Caglio liquido di maiale
Sale

Fasi di processo

Trasferimento del latte in paioli o pentole in acciaio o in caldaia di rame
Aggiustamento della temperatura a 30-33°C
Miscelazione eventuale del latte della mungitura serale con quello della mungitura mattutina
Aggiunta del caglio
Coagulazione in tempo variabile a seconda del produttore da 40 fino a 60 minuti
Rottura della cagliata a mano o con strumenti vari fino a dimensioni variabili da chicco di riso fino a mandorla
Sosta della cagliata per 5-10¿
Aggiunta di acqua tiepida a lato della cagliata
Separazione manuale della cagliata in un lato del paiolo
Estrazione della cagliata a mano e trasferimento nelle fiscelle di vimini a più riprese
Pressatura leggera manuale ad ogni aggiunta di cagliata in fiscella
Sosta della cagliata a temperatura ambiente per 20-60¿ con ripetuti rivoltamenti
Salatura a secco di una faccia con sale grosso
Sosta a temperatura ambiente per 24 ore
Rivoltamento delle forme
Salatura a secco della seconda faccia con sale grosso
Sosta a temperatura ambiente per 24 ore
Eventuale ulteriore salatura per le forme di pezzatura superiore a 2-3 kg per altre 24 ore
Liberazione della forma
Lavaggio della forma con acqua corrente per eliminare il sale in eccesso
Sosta per 30-50 giorni in ambiente caldo e umido su tavoli o graticci di legno eventualmente coperti da panni di lino, rivoltando le forme nei primi giorni ogni 12 ore e successivamente ogni 1-2 giorni
Trattamento delle forme con olio extravergine di oliva
Sosta a temperatura ambiente per 1-2 giorni ad asciugare su graticci di legno
Immissione in armadi o madie, generalmente di rovere, a stagionare fino ad 1 anno con regolare rivoltamento ogni 5-7 giorni e trattamento della forma con olio di oliva extravergine qualora si formi muffa sulla superficie

Regioni

ABRUZZO

Descrizione Breve

Prodotto a Farindola e comuni limitrofi in provincia di Teramo e Pescara. E' uno dei prodotti più antichi del firmamento italiano, risalendo all'epoca romana.

Produzioni Associate

2304 Pecorino di Farindola DOMENICONE GABRIELE AZ. AGR.
1202 Pecorino di Farindola MARTINELLI PIETRO PAOLO AZ. AGR.
1942 Pecorino di Farindola MASSERIE DEL PARCO SOC. COOP.
2342 Pecorino di Farindola LIBERATI FRANCO AZ. AGR.
2162 Pecorino di Farindola ASTOLFI GABRIELE
2262 Pecorino di Farindola DI MARCANTONIO IVANA AZ. AGR. ALL. SUINI
79962 Pecorino di Farindola VERVENNA CARLO
81282 Pecorino di Farindola LANARI OMOBUONO VALENTINO
81382 Pecorino di Farindola COTRACCI PATRIZIA
81302 Pecorino di Farindola ISTITUTO CAPORALE TERAMO
81262 Pecorino di Farindola FRISA ANTONIO
81402 Pecorino di Farindola D'AGOSTINO DANIELE
77542 Pecorino di Farindola MARCELLA MIRKO
2464 Pecorino di Farindola SARTO SILVIO AZ. AGR.

Tweet
G+1 Consiglialo su Google

© 2011-2013 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G.Caporale"
Campo Boario - 64100 Teramo - PI 00060330677 - CF 8006470670

© 2018 Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"
Campo Boario, 64100 Teramo - Italia