



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
Dipartimento di Chimica

MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DI METODOLOGIE ANALITICHE IMPIEGANTI MARKER ENZIMATICI ENDOGENI PER L'INDIVIDUAZIONE DI BLANDI TRATTAMENTI TERMICI SU PRODOTTI DEL COMPARTO LATTIERO-CASEARIO. STUDI E APPLICAZIONE SUL LATTE E FORMAGGI OVINI SARDI.

Il Coordinatore

Prof. Giampaolo Giacomelli

*Tesi di Dottorato del
Dr. CARLO PIGA*

Il Tutore

Prof. Gavino Sanna

XX° Ciclo 2004-2007

I miei più sentiti e sinceri ringraziamenti al Prof. Gavino Sanna per aver supportato scientificamente questo lavoro di Tesi e per i preziosi insegnamenti che ha saputo donarmi.

Desidero ringraziare il Prof. Giuseppe Pulina per avermi dato la possibilità di svolgere questa Tesi di Dottorato presso l'Agenzia AGRIS Sardegna.

Un doveroso grazie alla Dott.ssa Francesca Scintu e al Dott. Giovanni Piredda per aver messo a mia completa disposizione i laboratori di chimica dell'Agenzia AGRIS Sardegna, e soprattutto le loro competenze sulla chimica e la biologia del latte, sulla qualità e sulla certificazione dei prodotti alimentari, che per osmosi sono entrate a far parte del mio bagaglio professionale.

Un grazie alla Dott.ssa Margherita Addis per i preziosi e puntuali consigli.

Un grazie particolare al Dott. Pietro Paolo Urgeghe per avermi fatto scoprire quanto sia più piacevole il lavoro quando lo si condivide con un amico e che un'apparecchiatura è sempre scomponibile in n pezzi.

Un grazie a Riccardo di Salvo, con il quale ho condiviso gioie e dolori dell'accreditamento dei laboratori, per avermi accompagnato nelle mie dissertazioni statistiche.

Un grazie a Sara Ielmini, Carla Pugliati, Marilena Frassetto, Annamaria Pischedda, Michele Corona, Adriano Porcu e Marco Trentadue per aver alleggerito con la loro presenza il peso della ricerca scientifica.

Infine ma non per ultimi desidero ringraziare i miei genitori e la mia sorellina per aver condiviso con me i successi e le sconfitte che fino ad oggi hanno accompagnato il mio percorso scientifico, ma soprattutto il mio grazie più sentito va a Sara che con la sua pazienza ha condiviso ogni momento di questa Tesi di Dottorato.

INDICE GENERALE

INTRODUZIONE	7
1 QUALITÀ ALIMENTARE	9
1.1 Il mercato alimentare in un sistema economico globale	9
1.2 Le denominazioni d'origine.....	12
1.3 I prodotti DOP.....	13
1.3.1 Il sistema dei controlli nelle produzioni lattiero-casearie sarde.....	16
2 IL LATTE	20
2.1 Introduzione	20
2.2 Produzione e utilizzo del latte	22
2.3 Composizione e variabilità del latte.....	28
2.4 Il lattosio	33
2.5 I lipidi	34
2.5.1 Composizione della membrana	36
2.6 Le proteine.....	38
2.6.1 Eterogeneità delle proteine del latte	39
2.6.2 Caseine	41
2.6.3 Le micelle caseiniche	42
2.7 Le proteine del siero.....	44
2.8 Gli enzimi.....	45
2.9 Le vitamine	47
2.10 I sali minerali.....	48
3 IL FORMAGGIO	50
3.1.1 L'utilizzo del latte crudo	52
3.2 Fasi di produzione.....	55

3.2.1	La coagulazione presamica.....	56
3.2.2	La coagulazione acida	57
3.2.3	Maturazione del formaggio	58
3.3	La produzione lattiero casearia in Italia	60
3.3.1	La produzione lattiero casearia in Sardegna.....	62
3.3.2	I formaggi DOP prodotti in Sardegna.....	64
4	I TRATTAMENTI TERMICI	67
4.1	Modifiche indotte dai trattamenti termici.....	71
4.1.1	Modifiche a carico del lattosio	72
4.1.2	Modifiche a carico dei globuli di grasso	74
4.1.3	Modifiche a carico delle proteine del siero	76
4.1.4	Modifiche a carico delle caseine	77
4.1.5	Modifiche a carico degli enzimi	79
5	INDICI DEI TRATTAMENTI TERMICI	83
5.1	Quadro normativo Europeo	84
5.2	Ricerca di nuovi indici	86
5.3	Enzimi endogeni del latte come indici dei blandi trattamenti termici.....	90
5.3.1	α -L-fucosidasi (E.C. 3.2.1.51).....	92
5.3.2	γ -glutamilttransferasi (E.C. 2.3.2.2)	94
6	DETERMINAZIONE DELL'ALPHA-L-FUCOSIDASI E DELLA GAMMA- GLUTAMILTRANSFERASI NEL LATTE OVINO	99
6.1.1	Introduzione	99
6.2	Sviluppo della metodica spettrofotometrica	101
6.2.1	Chiarificazione del latte.....	102
6.3	Protocollo per la determinazione spettrofotometrica della γ-glutamilttransferasi nel latte ovino	110
6.3.1	Materiali e metodi	110
6.3.2	Retta di taratura	111
6.3.3	Conversione in Unità di attività enzimatica (U).....	111
6.4	Protocollo per la determinazione spettrofotometrica dell' α-L-fucosidasi nel latte ovino	112
6.4.1	Materiali e metodi	112
6.4.2	Retta di taratura	113
6.4.3	Conversione in Unità di attività enzimatica (U):.....	113

6.5	Sviluppo della metodica RP-HPLC	115
6.6	Protocollo per la determinazione RP-HPLC dell' α-L-fucosidasi nel latte ovino.....	116
6.6.1	Materiali e metodi	116
6.7	Protocollo per la determinazione RP-HPLC della γ-glutamilttransferasi nel latte ovino.....	118
6.7.1	Materiali e metodi	118
6.8	Conclusioni	121
7	VALIDAZIONE DELLE METODICHE ANALITICHE	122
7.1	Limiti di rivelabilità e quantificazione	123
7.2	Linearità e range di applicabilità.....	125
7.3	Specificità.....	128
7.4	Accuratezza.....	129
7.4.1	Stima della precisione	130
7.4.2	Stima dell'errore sistematico: il bias	134
7.5	Conclusioni	137
8	INATTIVAZIONE TERMICA DELLA GAMMA-GLUTAMILTRANSFERASI E DELL'ALPHA-L-FUCOSIDASI NEL LATTE OVINO.....	138
8.1.1	Procedura sperimentale	138
8.2	α-L-fucosidasi	141
8.3	γ-glutamilttransferasi.....	146
8.4	Conclusioni	150
9	VARIABILITÀ DELL'ATTIVITÀ ENZIMATICA DELLA GAMMA- GLUTAMILTRANSFERASI E DELL'ALPHA-L-FUCOSIDASI NEL LATTE OVINO E NEL FORMAGGIO.....	152
9.1	Attività enzimatica in funzione del pH.....	152
9.2	Attività enzimatica nel latte scremato	154
	Variabilità dell'attività enzimatica in funzione dei parametri stagionali e alimentari.....	155
9.2.1	Piano sperimentale	155

9.2.2	Influenza dei parametri alimentari.....	156
9.2.3	Influenza della lattazione.....	164
9.2.4	Analisi multivariata.....	168
9.3	Valutazione dell'attività enzimatica in allevamenti di tipo estensivo	172
9.3.1	Attività enzimatica nel latte.....	173
9.4	Attività enzimatica nel formaggio.....	174
9.5	Conclusioni	178
10	CONCLUSIONI	180
11	BIBLIOGRAFIA.....	183

0 Introduzione

I prodotti lattiero-caseari italiani non si limitano a costituire una parte considerevole della nostra alimentazione, ma rappresentano una produzione tradizionale di rilevante importanza economica, culturale e ambientale. Il consumatore mostra oggi una sempre maggiore attenzione verso la qualità dei suoi alimenti, sia per motivi nutrizionali che igienico-sanitari, e considera con grande interesse aspetti quali la “tracciabilità“, il “prodotto tipico“, il “controllo di qualità“, tanto che li ricerca attraverso etichette che ne possano garantire la provenienza e la lavorazione. Marchi quali DOP (Denominazione d’Origine Protetta), IGP (Identificazione Geografica Protetta), e STG (Specialità tradizionale Garantita) rivestono oggi un’importanza sempre maggiore nella nostra cultura alimentare garantendo la provenienza delle materie prime e la loro trasformazione.

In Sardegna vengono prodotti tre formaggi a Denominazione d’Origine Protetta, il Pecorino Romano, il Fiore Sardo e il Pecorino Sardo. Uno degli aspetti che ne differenzia la tecnologia di produzione è il trattamento termico subito dal latte prima della caseificazione (**Tabella 0-1**).

<i>Prodotto</i>	<i>Tipologia di latte utilizzato per la caseificazione</i>
Fiore Sardo* DOP	Crudo
Pecorino Romano** DOP	Termizzato
Pecorino Sardo*** DOP	Crudo, termizzato, pastorizzato

* DPR del 28-11-1974. ** DPCM del 3-8-1993. *** DPCM del 4-11-1991

Tabella 0-1: Tipologia di latte previsto nei disciplinari di produzione per la caseificazione dei formaggi DOP Sardi.

La caseificazione del latte crudo garantisce il mantenimento della flora casearia originale e di gran parte del corredo enzimatico assunti direttamente dagli animali durante il pascolo e, poiché questi contribuiscono allo sviluppo di sapori e di profumi tipici, un prodotto di tal tipo evidenzia ai massimi livelli il legame intercorrente tra formaggio e territorio.

Il latte utilizzato per questo tipo di caseificazione deve essere ineccepibile dal punto di vista microbiologico in quanto un'eventuale presenza di microrganismi patogeni o di flora anticasearia comprometterebbe la qualità dei prodotti da esso ottenuti. A fronte di questo, attraverso dei trattamenti di bonifica termica (termizzazione o pastorizzazione) è possibile abbattere la carica batterica ottenendo la sanificazione del latte. Per contro, questi trattamenti comportano una modifica dei componenti del latte azzerando la flora casearia originale e gran parte del corredo enzimatico con conseguenze sulle proprietà nutrizionali e sensoriali dei suoi prodotti. Per questo motivo il tipo di trattamento termico effettuato viene espressamente indicato nel disciplinare di produzione e nell'etichetta dei prodotti lattiero-caseari.

Attualmente sui prodotti lattiero-caseari non è possibile distinguere l'utilizzo di latte crudo o termizzato, ed esistono dei concreti problemi relativi agli indici della pastorizzazione; per tali ragioni vi sono consistenti sforzi in atto da parte della comunità scientifica per cercare di individuare dei marker oggettivi volti alla discriminazione del trattamento termico subito dal latte. Ovviamente le ricerche sono state sinora rivolte al latte di origine vaccina, mentre esiste una profonda lacuna di conoscenze relative all'alimento di altra origine, soprattutto ovina.

Lo scopo di questo lavoro di Tesi di Dottorato è quello di colmare, per quanto possibile, questo gap conoscitivo, conducendo studi volti innanzitutto alla ricerca di tali marker nel latte e nel formaggio ovino, alla loro quantificazione tramite metodi sensibili, precisi ed accurati ed al loro monitoraggio in funzione di variabili intrinseche ai prodotti ed alle tecnologie di lavorazione. Questo permetterebbe di verificare, in ottemperanza a quanto espresso dall'articolo 11 del regolamento (CE) 510/2006, il rispetto del disciplinare di produzione dei formaggi ovini DOP, tra i quali anche quelli prodotti in Sardegna, e di verificare quanto riportato in etichetta nei prodotti ovini a latte crudo.

1 Qualità alimentare

1.1 Il mercato alimentare in un sistema economico globale

Lo scenario che caratterizza i mercati agro-alimentari nazionali, comunitari ed extracomunitari vede l'affermarsi di alcune tendenze, nei comportamenti dei vari attori coinvolti, che possono essere così sintetizzate:

- affermazione di nuove forme di distribuzione organizzata, costituite da operatori estremamente esigenti con i propri fornitori riguardo la garanzia della qualità dei processi produttivi;
- crescita culturale dei consumatori, che pretendono sempre maggiori informazioni e garanzie riguardo i prodotti alimentari che consumano.

Tale scenario è reso più complesso dal processo di integrazione economica internazionale in atto, che sta conducendo le grandi aziende multinazionali ad invadere sempre più i mercati nazionali con prodotti alimentari estremamente standardizzati, con una forte componente di servizio e, nella maggior parte dei casi, anche a basso prezzo. Per contro le piccole e medie aziende agro-alimentari sono costrette a ricercare nuovi mercati all'estero o ad affidare i propri prodotti alle grandi catene di distribuzione.

La globalizzazione, e con essa la circolazione delle materie prime e dei prodotti alimentari su scala mondiale, ha modificato il rapporto del consumatore con gli alimenti. Se in passato era possibile avere garanzie "di prima mano" sulla salubrità, l'origine e i processi di trasformazione di un prodotto attraverso un contatto diretto col produttore oggi, a causa della distanza sempre crescente tra produttore e consumatore, risulta necessario affidare queste garanzie a una serie di norme, etichette e riconoscimenti accettati a livello internazionale.

Una conseguenza della necessità di offrire garanzie al consumatore circa la salubrità dei prodotti è la diffusione del sistema HACCP (*Hazard Analysis Critical Control*

Point), che mira a valutare in ogni fase della produzione i rischi igienico-sanitari che possono influenzare la sicurezza degli alimenti, attuando misure preventive sulle singole fasi di produzione piuttosto che concentrare l'attività di controllo solo sul prodotto finito. Il sistema venne ideato negli anni sessanta negli Stati Uniti ed è stato introdotto in Europa nel 1993 con la direttiva 43/93/CE (recepita in Italia con il decreto legislativo 26 maggio 1997, n. 155), che prevede l'obbligo di applicazione del protocollo HACCP per tutti gli operatori a qualsiasi livello della catena alimentare.

A queste direttive obbligatorie si aggiungono delle norme che vengono applicate su base volontaria dagli operatori del settore alimentare, quali ad esempio lo Standard ISO 22000:2005. Questo è stato pubblicato dall'Ente di Normazione Internazionale ISO nel settembre 2005 al fine di armonizzare gli standard (nazionali e internazionali) preesistenti in materia di sicurezza alimentare e HACCP. Lo standard è stato scritto da un gruppo di lavoro composto da esperti provenienti da 23 diverse nazioni e da rappresentanti di organizzazioni internazionali, quali la Codex Alimentarius Commission, l'Associazione internazionale degli hotel e dei ristoranti, la Global Food Safety Initiative (GFSI) e la Confederazione delle Industrie agro-alimentari dell'Unione Europea (CIAA). Lo standard è basato sui principi dell'HACCP definiti dal Codex Alimentarius, ed è allineato con i precedenti ISO 9000 e ISO 14000. Può essere adottato da tutti gli operatori della filiera alimentare, non solo direttamente coinvolti nel processo di produzione degli alimenti, ma anche indirettamente coinvolti (es. produttori di imballaggi, servizi di pulizia e derattizzazione ecc.). Ogni singolo anello nella catena di produzione è responsabile dell'applicazione dello standard, che non è comunque volto alla certificazione dell'intera filiera. Sebbene non sia obbligatorio, esso si pone come punto di riferimento per gli operatori per l'applicazione dei regolamenti comunitari in materia di igiene e sicurezza alimentare.

La libera circolazione dei prodotti non determina esigenze solo per gli aspetti relativi alla salubrità del prodotto ma ha determinato la necessità di definire le proprietà e le caratteristiche che ognuno di questi deve possedere. Affinché nelle diverse parti del mondo sia possibile ricondurre allo stesso nome lo stesso prodotto, tutelando così sia chi lo produce sia chi lo consuma, è oggi operante un complesso ed articolato sistema di organismi e commissioni, operanti sia su base governativa sia su base volontaria.

La FAO (l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura) ed il WTO (l'Organizzazione mondiale del commercio) hanno istituito nel 1963 il Codex

Alimentarius per definire gli standard alimentari. Questo è costituito da una Commissione intergovernativa che rappresenta 173 Paesi più la Comunità Europea e opera per salvaguardare la salute del consumatore e garantire la concorrenza leale nel commercio alimentare. Ai lavori della Commissione, che si riunisce una volta all'anno per revisionare ed aggiornare il *Codex Alimentarius Procedural Manual*, partecipano esperti di diverse discipline scientifiche dell'alimentazione, tra cui autorità di controllo del cibo, esperti scientifici e tecnici alimentari, rappresentanti di associazioni dei consumatori, dei produttori, dell'industria e del commercio. Tutti contribuiscono alla stesura delle regole del *Codex*, che poi possono servire da base per le normative nazionali e alla quale l'Organizzazione mondiale del commercio fa riferimento per decidere se un determinato prodotto può circolare liberamente a livello internazionale.

Nel comparto dei prodotti lattiero-caseari la FIL-IDF (Federation Internationale de Laiterie, International Dairy Federation) costituisce il punto di riferimento mondiale per gli operatori del settore. E' un'organizzazione non governativa che è stata fondata nel 1903, nella quale gli specialisti del settore, provenienti da tutte le parti del mondo, si incontrano per risolvere, su base scientifica, problemi relativi alla definizione, produzione e commercializzazione dei prodotti lattiero-caseari. L'IDF lavora a stretto contatto con organizzazioni internazionali come il Codex Alimentarius la Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), la World Organization for Animal Health (OIE), l'International Organization for Standardization (ISO), il World Health Organization (WHO), l'International Federation for Agricultural Producers (IFAP), l'Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), e con altri corpi internazionali a carattere governativo e non-governativo.

L'IDF mantiene una stretta collaborazione con il Codex Alimentarius per ciò che riguarda la consulenza scientifica; questa, libera da pregiudizi nazionali, ha permesso di raggiungere una protezione unica nel suo genere contro le imitazioni dei prodotti artigianali con l'adozione del "Codex General Standard for the Use of Dairy Terms".

Questo insieme di regole, associazioni e organizzazioni permettono da un lato il rispetto di norme igienico-sanitarie internazionalmente riconosciute a tutela del consumatore, e dall'altro la tutela delle produzioni alimentari garantendone la libera commercializzazione.

1.2 Le denominazioni d'origine

In un mercato alimentare sempre più globale e regolato da organizzazioni internazionali, l'orientamento dei consumatori si è subito rivolto verso i prodotti di tipo industriale, che ad un prezzo sempre più competitivo garantiscono comunque la sicurezza dal punto di vista igienico-sanitario. Negli ultimi decenni la crescente attenzione dei consumatori all'aspetto nutrizionale dei propri alimenti e le frequenti crisi legate a scandali alimentari ha condotto tuttavia a privilegiare quelli che, a fronte di un prezzo leggermente maggiore, uniscano gli aspetti di salubrità che di qualità alimentare. La moderna accezione del termine qualità, intesa come *“la capacità di soddisfare le aspettative, esplicite o implicite, che il consumatore ha verso il prodotto”*, trova oggi una sua concretizzazione nei prodotti agricoli o agro-alimentari aventi una origine geografica determinata, o che siano frutto di specifiche tradizioni produttive, genericamente definiti come “Prodotti Tipici” o “Prodotti Tradizionali”. Questi rappresentano infatti il frutto di una sperimentazione alimentare condotta nei secoli, che è sinonimo di garanzia per il consumatore.

La massima espressione dell'identificazione e verifica delle qualità di un prodotto in rapporto al territorio di produzione è oggi la DOP, Denominazione d'Origine Protetta, istituita con regolamento (CE) 2081/92 (Commissione Europea, 1992a) e normata oggi dal regolamento (CE) 510/2006.

Affinché un prodotto ottenga la Denominazione d'Origine Protetta deve essere esplicitato e presentato in maniera univoca il metodo di ottenimento del prodotto alimentare, solitamente tramandato oralmente di padre in figlio, tale da non dare adito ad interpretazioni diverse. Allo stesso modo devono essere definiti e verificati gli elementi che comprovano il legame con il territorio, superando una generica attribuzione territoriale per valutare e dimostrare quali elementi, anche storici e sociali, legati al territorio, rendono la produzione unica ed inimitabile.

Contestualmente devono essere definite le caratteristiche chimiche, fisiche, microbiologiche, metriche e sensoriali che agiscono come agenti distintivi del prodotto e lo caratterizzano rispetto a produzioni similari. Nello stesso tempo dovrà essere valutata e codificata la capacità delle aziende di garantire che la loro produzione abbia le



Figura 1-1: bollino che identifica i prodotti D.O.P:

caratteristiche attese. Sebbene quanto detto sia improntato alla definizione dei prodotti DOP (**Figura 1-1**), che costituiscono oggi la massima espressione per la tutela di un formaggio, esistono anche altri livelli di tutela e valorizzazione dei prodotti agro-alimentari che rendono manifesta la tipicità degli stessi. A livello comunitario oltre alla DOP sono contemplate la IGP (Indicazione Geografica



Figura 1-3: bollino che identifica i prodotti S.T.G.

Protetta) (**Figura 1-2**) di cui al regolamento (CE) 510/2006, e la STG (Specialità Tradizionale Garantita) (**Figura 1-3**), definita con il regolamento (CE) 509/2006.

Queste attribuzioni, riconosciute a livello comunitario ed inserite anche in trattati commerciali con altre nazioni, testimoniano livelli di specificità diversi. Il livello massimo, come precedentemente evidenziato, è costituito dalla DOP, che vincola tutte le fasi produttive ad un territorio. Leggermente inferiore come specificità è la IGP, che non lega necessariamente tutte le fasi produttive ad un territorio, pur mantenendo questo come elemento centrale, mentre con la STG viene tutelato il metodo di fabbricazione di un prodotto indipendentemente dal luogo di produzione. Si tratta quindi di strumenti che, oltre a tutelare i produttori, intendono garantire il consumatore circa la qualità del prodotto attraverso l'azione di controllo operata dagli stati membri.



Figura 1-2: bollino che identifica i prodotti I.G.P.

1.3 I prodotti DOP

La distribuzione merceologica delle DOP e IGP in Europa risulta piuttosto variegata e l'Italia, con i suoi 159 marchi a denominazioni d'origine, si conferma la prima per numero di produzioni totali. Ogni nazione possiede una posizione di leadership in un diverso settore; così la Francia risulta la nazione con il maggior numero di marchi nel settore delle carni fresche, mentre l'Italia in quello dei prodotti a base di carne, la Gran Bretagna si distingue per molluschi e pesci, mentre il Portogallo e la Spagna spiccano rispettivamente nel settore dei mieli e della panetteria, la Germania, infine, primeggia come numero di birre ed altre bevande. Il comparto maggiormente tutelato

in Europa risulta quello lattiero caseario con 151 marchi registrati, seguito da quello dei prodotti ortofrutticoli e cereali.

In Italia i prodotti a Denominazione d'Origine hanno assunto un'importanza crescente nel settore agricolo e alimentare, raggiungendo una PLV (Produzione Lorda Vendibile) superiore ai 3 miliardi di euro, circa il 7% dell'intera PLV totale dell'agricoltura nazionale, ed occupando 300.000 addetti [ERSAT 2006].

Oltre che ad una crescita del fatturato e delle produzioni dei prodotti già registrati si è assistito anche ad un aumento del numero di tutele, passando da circa 120 nel 2002 a 159 nel 2007, segno di una forte fiducia nei confronti di questo tipo di riconoscimento da parte dei produttori, ma soprattutto dei consumatori.

I prodotti più tutelati in Italia risultano quelli appartenenti al settore ortofrutticolo, che, insieme a quelli relativi al settore degli oli, vantano rispettivamente 45 e 37 marchi. Segue quello lattiero-caseario che, con 31 prodotti, si conferma la terza categoria, davanti ai prodotti a base di carne con 28 marchi.

La regione che vanta il maggior numero di prodotti con marchi DOP e IGP è l'Emilia Romagna con 25 marchi, seguita rispettivamente dal Veneto e da Lombardia con 21 e 20 prodotti.

Fonte: Unione Europea

	<i>ITALIA</i>	<i>TOTALE UE</i>
Formaggi	31	151
Prodotti a base di carne	28	69
Carne fresca	2	98
Pesce e molluschi	-	7
Altri prodotti di origine animale	2	23
Oli e grassi – olio d'oliva	37	93
Olive da tavola	2	16
Ortofrutticoli e cereali	45	146
Prodotti della panetteria	3	13
Birre; acque minerali; gomme e resine	-	6
Altre bevande	-	8
Prodotti non alimentari o di altro tipo	3	9
Altri prodotti	2	5
Totale	155	644

Tabella 1-1: Distribuzione merceologica delle DOP e IGP in Italia e in Europa.

A questi prodotti si devono sommare quelli del settore vitivinicolo, al quale si applica una diversa normativa. L'Italia rappresenta il secondo paese europeo produttore di vino con 447 vini DOCG, DOC e IGT, pari al 60% della produzione totale italiana, con un fatturato di 8 miliardi euro ed un'esportazione di 2,5 miliardi euro.

In Sardegna vi sono sei prodotti che hanno ricevuto la Denominazione d'Origine: il Pecorino Romano DOP, il Pecorino Sardo DOP, il Fiore Sardo DOP, l'Agnello di Sardegna IGP e i più recenti Olio d'Oliva DOP e Zafferano di Sardegna DOP. Queste denominazioni vantano storie diverse per quel che riguarda l'evoluzione del disciplinare e il controllo delle produzioni, pur insistendo sullo stesso territorio ed utilizzando, nel caso dei formaggi, una materia prima prodotta dalle stesse aziende con gli stessi sistemi di allevamento.

Sul versante della domanda, si registra tuttora una scarsa informazione da parte del consumatore, non sempre in grado di percepire, forse anche a causa di una carente comunicazione dal settore, il differenziale di qualità e quindi di prezzo.

Oltrefrontiera, i fenomeni di contraffazione del *Made in Italy* stanno assumendo dimensioni preoccupanti che richiedono risposte concrete. La Coldiretti ha stimato che, nel 2007, tali fenomeni abbiano generato un giro d'affari di un miliardo e mezzo di euro, con danni incalcolabili sulla salute e sull'ambiente, oltre che sull'immagine dei prodotti e sull'economia delle produzioni contraffatte. Chiede pertanto l'immediata introduzione dell'obbligo di indicare in etichetta l'origine di tutti gli alimenti per consentire la rintracciabilità delle produzioni e il rafforzamento dei controlli, ma anche per combattere i fenomeni speculativi sui prezzi che si annidano proprio nella mancanza di trasparenza. Vendita di falsi prodotti a denominazione di origine, etichettatura non conforme alla realtà, mancanza di informazioni obbligatorie per legge come l'indicazione di origine dell'ortofrutta fresca e prodotti stranieri spacciati come italiani sono tra i principali illeciti registrati. Secondo la Coldiretti le truffe trovano spazio anche grazie alle maglie larghe della legislazione nazionale e comunitaria, che consente che più della metà dei soldi spesi dai consumatori per l'acquisto degli alimenti siano destinati a prodotti "anonimi" per i quali non è obbligatorio indicare la provenienza del prodotto agricolo utilizzato: dai salumi ai formaggi, dalla carne di maiale a quella di agnello, dalle conserve vegetali ai succhi di frutta, ma anche per il latte a lunga conservazione. Risulta necessario quindi rafforzare le attività sul fronte dei controlli, individuando quei parametri oggettivi che permettano di distinguere l'origine e i processi subiti delle materie prime. Attualmente

in Italia operano 134 organismi privati e 25 pubblici scelti dai consorzi di tutela per vigilare e controllare le produzioni a Denominazione d'Origine Protetta.

1.3.1 Il sistema dei controlli nelle produzioni lattiero-casearie sarde

La presenza di un disciplinare e la necessità di verificare che sia pienamente rispettato porta all'esigenza di esercitare un controllo sulle produzioni finalizzato alla concessione dell'uso della denominazione, permettendo così di ottenere la piena valorizzazione delle produzioni e contemporaneamente dare le giuste garanzie al consumatore. Nell'ambito isolano, l'applicazione dapprima del regolamento (CE) 2081/92 e, più recentemente, il regolamento (CE) 510/2006 ha determinato l'attuazione di un sistema di controlli per i formaggi a DOP prodotti in Sardegna.

I produttori sardi hanno deciso di dare vita ad una nuova struttura su base consortile, che fosse vicina e consapevole della particolare realtà socioeconomica della Sardegna, inserita nel tessuto delle piccole aziende sarde e tale da ottimizzare il rapporto costi/benefici per i produttori stessi.

Il Consorzio per la Tutela del Formaggio Pecorino Romano, il Consorzio per la Tutela del Formaggio Pecorino Sardo ed il Consorzio per la Tutela del Formaggio Fiore Sardo, in collaborazione con l'Istituto Zootecnico e Caseario per la Sardegna (oggi confluito in AGRIS) e con l'Ente Regionale di Sviluppo e Assistenza Tecnica in Agricoltura (oggi scisso in Laore e Argea), hanno conseguentemente costituito l'organismo consortile OCPA. Questo organismo è stato immediatamente indicato dai rispettivi consorzi quale organismo di controllo dei formaggi DOP Pecorino Romano, Pecorino Sardo e Fiore Sardo e, più recentemente, dell'Agnello di Sardegna IGP.

Questo organismo di controllo, in ottemperanza di quanto disposto dal regolamento (CE) 510/2006, è organizzato secondo quanto richiesto dalla norma EN 45011 (ISO, 1998), che regola la costituzione ed il funzionamento degli organismi di certificazione e dispone che questi sottostiano a principi di trasparenza, indipendenza e professionalità. Per garantire questo esiste una netta separazione tra la gestione societaria e la gestione dei controlli previsti dal regolamento (CE 510/2006. La gestione di tali controlli è infatti affidata a Comitati di Certificazione di cui fanno parte, in forma paritetica, tecnici di comprovata esperienza e professionalità in rappresentanza dei diversi soggetti della filiera di questi prodotti. Esiste un Comitato

di Certificazione per ogni denominazione controllata costituito, per i formaggi, da un rappresentante dei produttori di latte, da uno delle industrie private di trasformazione, da uno delle cooperative, da uno espresso dal Consorzio di Tutela della denominazione su cui opera quel Comitato, nonché da un rappresentante dei consumatori ed da uno degli organismi di ricerca operanti in campo lattiero-caseario; nel caso specifico del Pecorino Romano, fa parte del Comitato anche un rappresentante della realtà produttiva del Lazio.

L'attività di controllo, sottoposta alla valutazione finale dei Comitati di Certificazione, viene effettuata sulla base di un Piano di Controllo della singola DOP elaborato dall'OCPA e approvato dal Gruppo tecnico di Valutazione del Ministero delle Politiche Agricole e Forestali appositamente costituito. La vera e propria attività di controllo consta di verifiche sulla documentazione prodotta dall'azienda, di visite ispettive eseguite periodicamente presso gli stabilimenti di produzione e di determinazioni analitiche sul prodotto.

Queste ultime comprendono la determinazione del tenore in grasso, della sostanza secca e la verifica dell'assenza di latte vaccino. Risulta ancora assente il controllo del trattamento termico subito dal latte prima della caseificazione, in quanto non è stato individuato fino ad ora un parametro chimico in grado di discriminare efficacemente il formaggio in base ai blandi trattamenti termici subiti dal latte prima della caseificazione. Questo è un aspetto estremamente importante in quanto differenzia le tipologie di produzione dei tre formaggi DOP (**Tabella 1-2**), e - come vedremo in seguito - è un parametro fortemente correlato alla qualità del latte e del formaggio da esso ottenuto.

<i>Prodotto</i>	<i>Tipologia di latte utilizzato per la caseificazione</i>
Fiore Sardo* DOP	Crudo
Pecorino Romano** DOP	Termizzato
Pecorino Sardo*** DOP	Crudo, termizzato, pastorizzato

Tabella 1-2: Tipologia di latte previsto nei disciplinari di produzione per la caseificazione dei formaggi DOP Sardi. * DPR del 28-11-1974. ** DPCM del 3-8-1993. * DPCM del 4-11-1991**

L'attività di controllo si è svolta a partire dall'annata casearia 1999/2000 per il Pecorino Romano ed il Pecorino Sardo e a partire dall'annata casearia 2002/2003

per il Fiore Sardo. Nel **Grafico 1-1** sono riportati i dati relativi al Pecorino Romano; essi evidenziano che le quantità controllate sono abbastanza stabili, intorno alle 30.000 tonnellate di prodotto per anno. Per contro, si assiste ad una progressiva diminuzione degli stabilimenti di produzione, passati dai 49 del 2000 ai 37 del 2006, a dimostrazione di una progressiva concentrazione delle produzioni in stabilimenti più grandi.

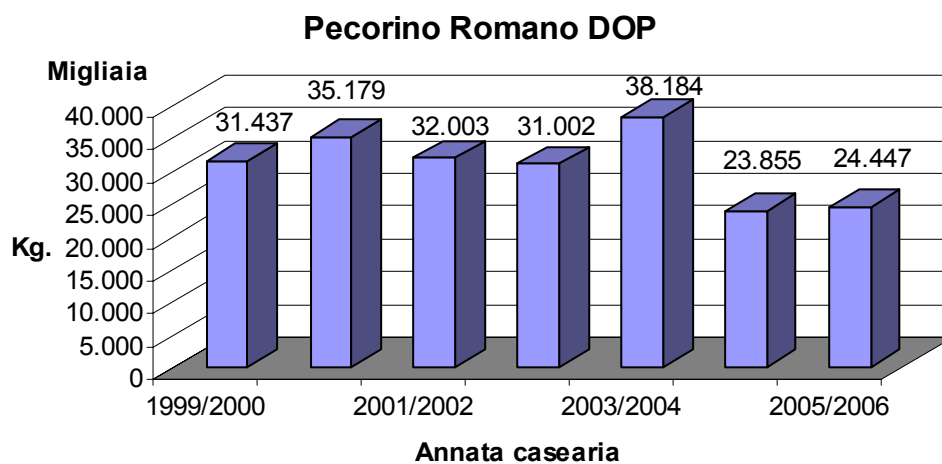


Grafico 1-1: Pecorino Romano DOP prodotto in Sardegna e nel Lazio e controllato dall'OCPA nelle annate casearie dal 1999 al 2006

Riguardo il Pecorino Sardo si evidenzia un netto aumento delle produzioni controllate (**Grafico 1-2**), cui corrisponde un aumento del numero di caseifici inseriti nel sistema dei controlli, segno di un crescente interesse per questa produzione tutelata.

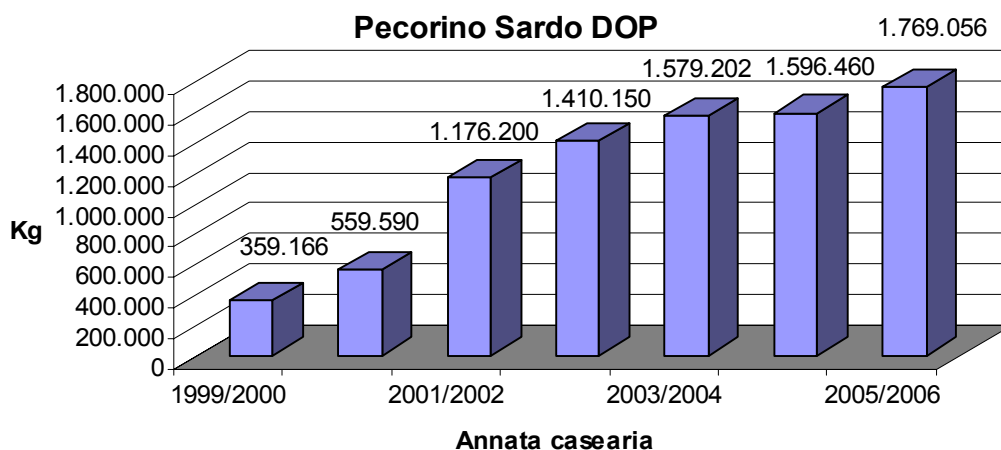


Grafico 1-2: Pecorino Sardo DOP prodotto in Sardegna e controllato dall'OCPA nelle annate casearie dal 1999 al 2006

Nel caso del Fiore Sardo (**Grafico 1-3**) si registra un sensibile aumento delle produzioni e delle aziende controllate, soprattutto tra il primo e secondo anno, segno di una crescente fiducia nel sistema di controllo, e una successiva stabilizzazione delle produzioni intorno alle 500 tonnellate. Le aziende produttrici sono passate da 32 nel 2002/2003 a 48 nel 2005/2006, delle quali le 3 di tipo industriale realizzano circa il 30% dell'intera produzione.

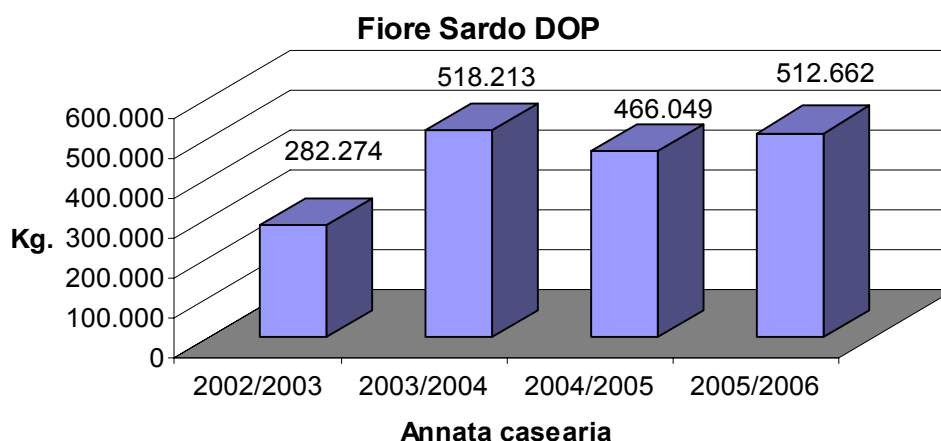


Grafico 1-3: Fiore Sardo DOP prodotto in Sardegna e controllato dall'OCPA nelle annate casearie dal 2002 al 2006

2 Il latte

2.1 Introduzione

Il latte, definito come *il prodotto ottenuto dalla mungitura regolare e continua delle ghiandole mammarie* [CODEX STAN 206-1999] è il primo alimento della vita che ogni mammifero utilizza per soddisfare sia le esigenze nutrizionali, con l'apporto di proteine, lipidi, zuccheri e vitamine; che funzioni di tipo immunologico, introducendo con esso elementi di difesa quali ad esempio gli anticorpi. La sua composizione è estremamente varia e, delle circa 4000 specie di mammiferi presenti sulla terra, è nota la composizione del latte di 180 specie, e solo per 50 di queste i dati possono essere considerati realmente attendibili (sufficiente numero di campioni, campionamento rappresentativo delle razze e del periodo di lattazione) [Fox, 1998]. Per l'uomo, la funzione del latte nella dieta non si esaurisce nelle prime fasi della vita in quanto esso costituisce un importante componente del regime alimentare di molte popolazioni.

La necessità di garantire il costante approvvigionamento di questo importante alimento ha fatto sì che circa 10.000 anni fa si sviluppasse la pastorizia, la prima attività produttiva dell'uomo [Fox, 1998]. A causa della sua facile deperibilità, fin dai tempi antichi l'uomo si è dedicato alla trasformazione del latte, così da conservarne più a lungo nel tempo parte delle proprietà nutrizionali. Nei secoli si sono quindi sviluppati migliaia di prodotti di trasformazione, diversi per natura della materia prima, per condizioni climatiche e tecnologia di lavorazione, tutti espressione degli aspetti culturali, sociali e tradizionali delle popolazioni che li producono e li consumano.

Numerose sono state le specie animali individuate come idonee a produrre latte nelle più diverse condizioni ambientali. Pecore e capre sono state le prime ad essere addomesticate, e sono rimaste le specie più diffuse nelle regioni con difficili condizioni ambientali, distribuite principalmente intorno all'area mediterranea.

Vacche e bufale furono introdotte molto più tardi, e rappresentano oggi le principali specie produttive nelle aree ad intensiva produzione lattifera [Fox, 1998]. Recentemente anche il latte d'asina sta ricevendo una crescente attenzione in Europa. Questo prodotto, tipico dell'Asia centrale, presenta una composizione molto simile a quello umano ed è considerato prodotto dietetico [Fox, 1998]. Questi cinque animali costituiscono oggi le principali specie lattifere che danno materia prima per una vasta gamma di prodotti alimentari, ognuno dei quali con peculiari caratteristiche sensoriali, nutrizionali e di conservabilità.

Il latte si forma principalmente nell'epitelio ghiandolare della ghiandola mammaria; dove il sangue trasporta le sostanze di base (glucosio, acetati, amminoacidi, acidi grassi ec...) che poi vengono trasformate nelle cellule epiteliali (cellule secretorie). Qui, seguendo diversi chimismi, vengono trasformati negli elementi principali del latte; mentre sono pochissime le sostanze che trasportate dal sangue passano direttamente nel latte senza subire processi di trasformazione. Le glandole mammarie delle diverse specie hanno la stessa struttura di base e sono localizzate esternamente al corpo. Queste, con la loro particolare costituzione cellulare, regolano la successione delle varie fasi della sintesi e della secrezione del latte. La costituzione dei caratteristici composti e la relativa organizzazione strutturale avviene nelle cellule secretorie (figura 1). Queste cellule formano uno strato all'interno degli alveoli della ghiandola mammaria, tutt'intorno al lumen in cui si accumula il latte. I precursori, trasportati dal sangue, entrano attraverso la membrana basale nelle cellule secretorie dalle quali, trasformati nei componenti del latte, sono secreti nel lumen attraverso la membrana apicale.

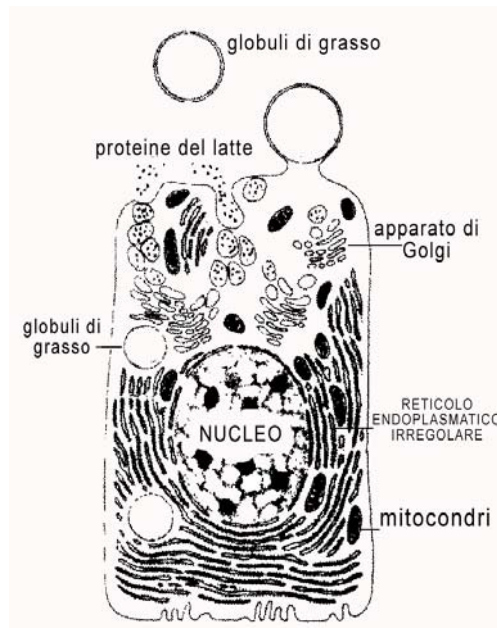


Figura 2-1: Rappresentazione schematica di una cellula dell'epitelio secretorio di una ghiandola mammaria [Corradini, 1995]

2.2 Produzione e utilizzo del latte

Il latte e i prodotti ad esso correlati sono consumati probabilmente in tutte le parti del mondo ma le regioni in cui costituisce uno dei cardini dell'alimentazione sono l'Europa, le Americhe, l'Australia, e la Nuova Zelanda [Fox, 1998].

Il latte crudo, inteso come materia prima, racchiude in se molte importanti caratteristiche [Fox, 1998]:

- Essendo stato concepito per l'alimentazione dei neonati, esso contiene tutti i nutrienti necessari alla crescita nella forma più facilmente assimilabile. Nessun altro alimento è così completo se non l'intera carcassa di un animale, incluse le ossa...
- I principali costituenti del latte (lipidi, proteine e carboidrati) possono essere facilmente separati e purificati attraverso delle semplici metodiche ed utilizzati come ingredienti in altri prodotti alimentari.
- Il latte può essere facilmente convertito in altri prodotti ad elevato contenuto nutrizionale e spiccate caratteristiche sensoriali.

- La moderna industria alimentare vede gli animali da latte (ed in particolare i bovini) come un efficiente convertitore di materiale vegetale; per esempio le proteine ottenute dalla produzione del latte sono maggiori in termini di chilogrammo per ettaro, di quelle ottenute dalla produzione della carne; essi sono in tale compito sicuramente meno efficienti di alcune piante (es. soia e cereali) ma forniscono proteine con proprietà funzionali e nutrizionali ineguagliabili e differenti da quelle prodotte dai vegetali.
- Il latte crudo è un'eccellente matrice per lo sviluppo di microrganismi. Questo lo rende facilmente deperibile. E' quindi necessario intervenire mediante tecnologie atte a "prolungarne la vita" o volte a convertirlo in altri alimenti a più lunga conservazione.

Tali alimenti sono quelli tradizionali, quali ad esempio il burro, il formaggio, o latte fermentato, o quelli sviluppati più recentemente negli ultimi 100 anni, quali ad esempio gelati e prodotti a base di proteine del latte. La moderna tecnologia ha parimenti permesso di poter disporre di interessanti forme di latte a lunga conservazione, quali latte in polvere, latte sterilizzato o latte UHT.

Recente è inoltre la possibilità di operare un frazionamento del latte nei suoi costituenti principali (caseine, proteine del siero, grassi, immunoglobuline e sali minerali) volta ad un più razionale sfruttamento di tali alimenti, che possono esser consumati tal quali o come ingredienti per nuovi prodotti alimentari. Questi costituenti possono essere ottenuti direttamente sia dal latte come materia prima che dai prodotti di scarto ottenuti durante la lavorazione dei prodotti tradizionali (**Tabella 2-1**) [Fox, 1998].

<i>Processo</i>	<i>Prodotto primario</i>	<i>Prodotti secondari</i>
Separazione per centrifugazione	Crema	Burro, olio di burro, burro liquido.
		Crema a diverso contenuto di grasso. Crema di formaggio.
	Latte scremato	Latte in polvere, caseine, formaggio, concentrati di proteine.
Concentrazione per evaporazione termica o ultrafiltrazione		Latte concentrato UHT o sterilizzato.

Concentrazione per essiccamento		Latte in polvere intero. Prodotti per l'infanzia. Prodotti dietetici.
Coagulazione enzimatica	Formaggio	1000 varietà di formaggio; prodotti derivanti dal formaggio (salse, filanti, formaggi fusi).
	Caseina presamica	Formaggio
Coagulazione acida	Siero	Siero in polvere, siero in polvere demineralizzato, concentrato di proteine del siero, proteine del siero isolate, proteine del siero singole, proteine nutraceutiche. Lattosio e derivati del lattosio.
	Formaggio	Formaggi freschi e prodotti a base di formaggio.
Fermentazione	Caseina isoelettrica	Prodotti per applicazione funzionale es creme per caffè. Prodotti ad applicazione nutrizionale.
	Siero	Siero in polvere, siero in polvere demineralizzato, concentrato di proteine del siero, proteine del siero isolate, proteine del siero singole, proteine neutraceutiche. Lattosio e derivati del lattosio.
Raffreddamento eterogeneo		Prodotti del latte fermentato, es. yogurt Gelati Prodotti per cioccolato.

Tabella 2-1: Frazionamento del latte nei suoi costituenti principali [Fox, 1998]

Storicamente i prodotti lattiero-caseari venivano realizzati a livello artigianale per poi passare, intorno al XIX secolo a produzioni di tipo industriali. Oggi la produzione di tipo artigianale è rimasta in particolari aree a vocazione pastorale e nei paesi sottosviluppati.

Ogni anno nel mondo vengono prodotte circa 500 milioni di tonnellate di latte, delle quali 130 milioni in Europa, 80 milioni nel Nord America e 25 milioni nelle regioni del

Pacifico [Fox, 1998]. Il latte ed i suoi derivati costituiscono tuttora il prodotto maggiormente commercializzato al mondo; l'indotto economico generato dall'esportazione dei prodotti lattiero caseari è stimato essere intono ai 23×10^9 USD l'anno, e i maggiori flussi di esportazione provengono principalmente dall'Europa, Nuova Zelanda, Australia e America (Figura 2-2) [Fox, 1998].

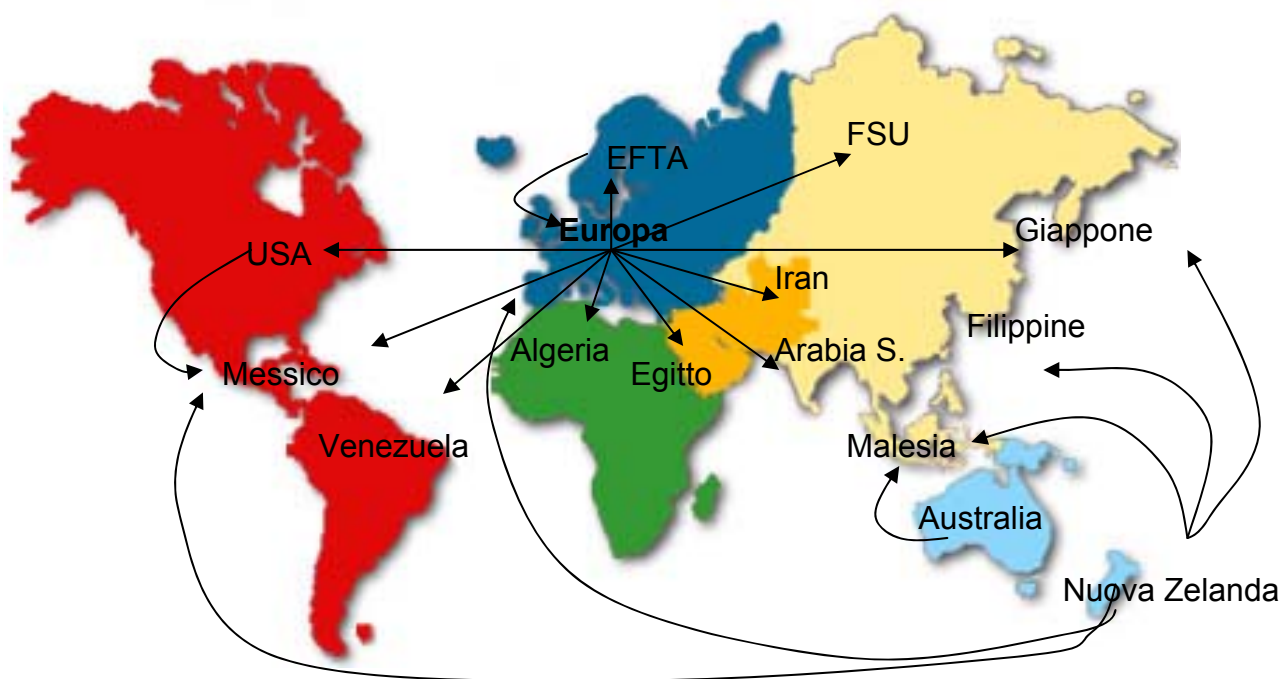


Figura 2-2: Flussi di esportazione dei prodotti lattiero-caseari

In Europa i maggiori produttori di latte sono la Germania e la Francia che, rispettivamente con 26 milioni e 22 milioni di tonnellate di latte prodotto, controllano circa il 45% dell'intera produzione europea. Seguono quindi Regno Unito e Olanda, rispettivamente con 13 e 10 milioni di tonnellate (Grafico 2-1) [fonte ISTAT 2006].

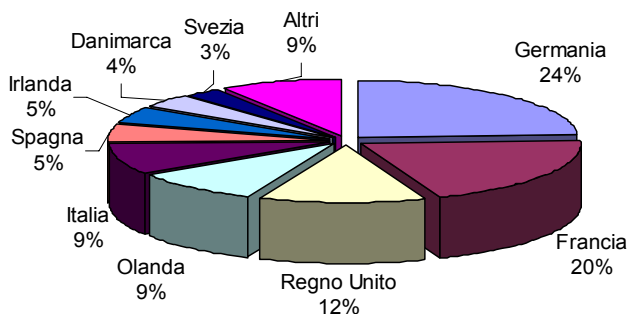


Grafico 2-1: Ripartizione della produzione Mondiale di latte vaccino

L'Italia, con circa 10 milioni di tonnellate di latte vaccino prodotto ogni anno, si posiziona fra i primi cinque maggiori produttori davanti a Spagna (5%), Portogallo (<1%) e Grecia (<1%), con un trend produttivo piuttosto costante negli ultimi 6 anni [fonte ISTAT 2006]. La distribuzione territoriale italiana assegna alle imprese del Nord l'81% della produzione con 8 milioni di tonnellate, e il restante quasi equamente distribuito tra Centro e Mezzogiorno, rispettivamente con 800 mila tonnellate (8%) e 1 milione (11%) [fonte ISTAT]. La Sardegna produce circa 227 mila tonnellate di latte vaccino, posizionandosi in tal modo tra le prime dieci regioni produttrici (**Grafico 2-2**) [fonte ISTAT 2006].

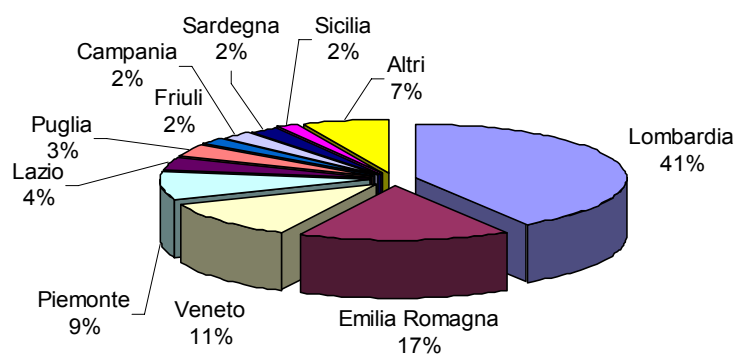


Grafico 2-2: Ripartizione della produzione italiana di latte vaccino

Il latte ovino, con circa 500 mila tonnellate (5% del totale nazionale), rappresenta la seconda tipologia di latte prodotta in Italia. La maggior produzione di latte ovino si registra nel Mezzogiorno con 300 mila tonnellate (71%) e al Centro con 135 mila tonnellate (28%), mentre nel Nord si raccolgono appena 3500 tonnellate (0,7%) [fonte ISTAT]. La Sardegna, con 330 mila tonnellate (67%) di produzione annua, rappresenta il maggior produttore in Italia seguita da Toscana (14%) e Lazio (10%) [fonte ISTAT 2006].

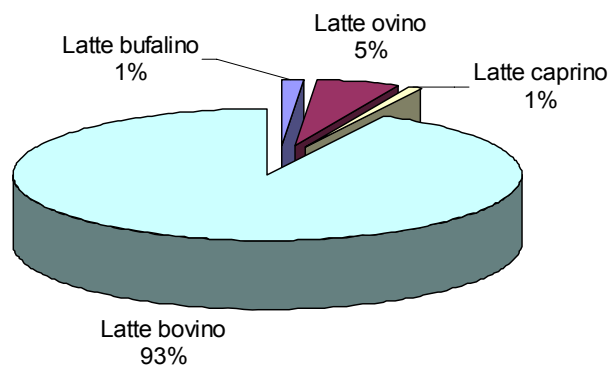


Grafico 2-3: Ripartizione per tipologia di latte della produzione Italiana

La produzione mondiale di latte ovino è concentrata soprattutto nei paesi mediterranei. Italia e la Grecia sono i maggiori produttori rispettivamente con il 33% e 34%, seguono Spagna, Francia e Portogallo.

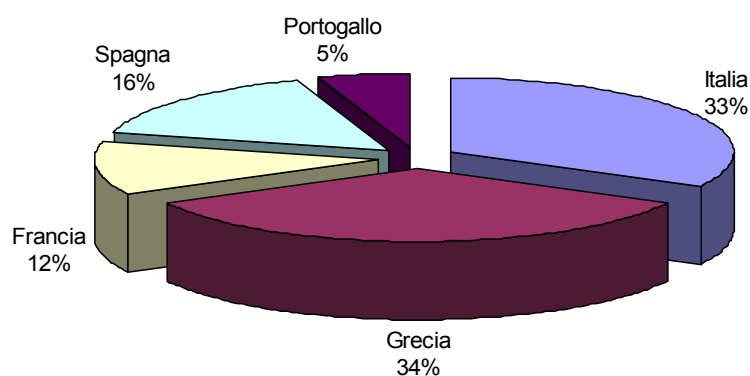


Grafico 2-4: Ripartizione della produzione Europea di latte ovino

In questo contesto la Sardegna produce il 23% della produzione mondiale, confermandosi uno dei maggiori bacini di produzione per questo genere alimentare.

2.3 Composizione e variabilità del latte

Il latte si presenta come un liquido uniforme, bianco e torbido; costituito da diversi elementi strutturali che stabiliscono con la fase disperdente (l'acqua) rapporti di emulsione, dispersione o soluzione colloidale e soluzione vera.

Osservando il latte a diversi ingrandimenti è possibile individuare alcuni di questi elementi strutturali:

- Al microscopio ottico si possono notare delle goccioline sferiche che ruotano in un liquido torbido che viene definito plasma.
- Al microscopio elettronico si può vedere come queste particelle sferiche presenti nel plasma siano degli aggregati proteici (micelle e submicelle caseiniche).
- Sempre al microscopio elettronico, ma con particolari tecniche, è possibile osservare i globuli di grasso e la membrana che li riveste.
- La separazione della frazione macrocorpuscolata (globuli di grasso, micelle e submicelle caseiniche) permette di osservare il siero. Questo è un liquido ancora opalescente in quanto contiene disperse altre particelle, di dimensioni molto piccole; costituite da proteine globulari e lipoproteine.
- Sempre nel siero, ma in soluzione vera ci sono gli altri componenti del latte: carboidrati (principalmente costituiti dal lattosio), proteine, lipidi, acidi organici ed inorganici, composti azotati, sostanze minerali ed elementi in tracce.

In relazione con il composto maggioritario (l'acqua), i globuli di grasso si trovano in emulsione, le micelle caseiniche in dispersione pseudocolloidale, le proteine del siero in soluzione e le particelle lipoproteiche in dispersione colloidale [Corradini, 1995].

Latte				
	Globuli di grasso	Plasma		
		Micelle caseiniche	Siero	
			Proteine globulari	Particelle lipoproteiche
Componenti principali	Grasso	Caseine, acqua Sali minerali	Proteine del siero	Lipidi e proteine
Stato fisico	emulsione	sospensione pseudocolloidale	soluzione colloidale	dispersione colloidale
Diametro delle particelle	0,1-10 µm	10-300 nm	3-6 nm	10 nm
Separabile con	scrematrice	centrifuga ad alta velocità	filtrazione su gel	filtrazione su gel
Flocculazione	Per aggregazione	con acidi o coagulanti	col calore	

Tabella 2-2: Elementi strutturali del latte

Nella **Tabella 2-3** è riassunta la composizione percentuale dei principali costituenti del latte in rapporto alla specie. E' possibile notare come la composizione di questo alimento, vari in rapporto alle esigenze nutrizionali della specie permettendo al nascituro di far fronte alle particolari condizioni ambientali attraverso questo unico apporto alimentare. Ad esempio, il contenuto in lattosio è minore in animali con un lento sviluppo corporeo: una minore quantità di questo costituente, accompagnata da un maggior contenuto di grasso, si verifica per quegli animali che vivono nelle zone fredde e negli oceani dov'è necessario un maggiore apporto energetico; ad esempio la balena produce un latte la cui percentuale di grasso si aggira intorno al 35%, mentre le percentuali di acqua e lattosio sono rispettivamente del 53,5% e dello 0,7%.

Il contenuto proteico invece è direttamente correlato alla velocità di crescita del mammifero, e questo spiega le principali differenze tra il latte umano e quello delle specie equine e bovine, che presentano uno sviluppo più rapido rispetto a quello umano.

Come già detto, il latte più utilizzato ai fini dell'alimentazione umana, sia come alimento diretto sia come derivati, proviene solo da poche specie animali (bovino, pecora, capra, asino, cavallo e bufalo); la specie che fornisce il latte più diffuso a livello mondiale è quella bovina. Il contenuto proteico di questo latte si aggira

mediamente intorno al 3,2-3,5%. Per quanto riguarda la qualità delle sostanze azotate, il latte vaccino differisce sostanzialmente da quello umano: il primo è di tipo caseinoso (prevalenza del contenuto in caseina), mentre il secondo è di tipo albuminoso (prevalenza del contenuto in sieroproteine). Si evidenziano anche differenze nel contenuto in grasso ed in lattosio: infatti il latte umano è più ricco di grassi insaturi a lunga catena (più facilmente assimilabili), contiene una maggiore quantità di lattosio, ma presenta un minor contenuto totale di sali minerali rispetto al latte vaccino, anche se i contenuti di ferro, rame e iodio sono proporzionalmente maggiori.

Dopo quello di vacca, il latte di pecora è quello più utilizzato per la produzione di prodotti lattiero-caseari. Esso ha un colore leggermente giallognolo ed un sapore e odore caratteristici molto spiccati. Il suo contenuto in grasso è circa doppio rispetto a quello del latte vaccino ed anche il suo contenuto proteico è più elevato (**Tabella 2-3**), questa caratteristica composizione lo rende particolarmente adatto alla caseificazione.

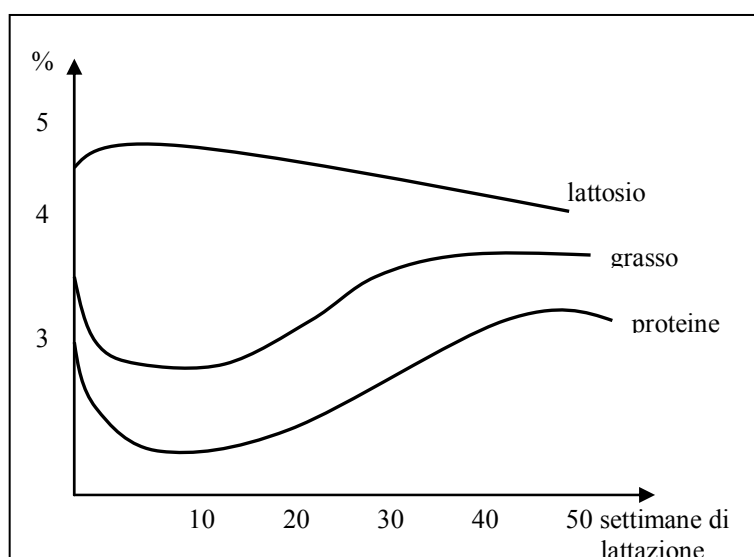
Il latte d'asina ha una composizione chimica molto simile a quello umano e questa somiglianza si manifesta anche nei rapporti delle componenti proteiche e nel tipo di acidi grassi. Per queste caratteristiche era utilizzato fino a qualche decennio fa per l'alimentazione infantile. Il latte d'asina è caratterizzato da un elevato contenuto in lattosio, da cui deriva il caratteristico sapore dolciastro, e da un basso contenuto in grasso, deve essere inoltre consumato velocemente in quanto si altera anche a seguito della stessa ebollizione.

Specie	Solidi totali	Grasso	Proteine	Lattosio	Ceneri
Donna	12,2	3,8	1,0	7,0	0,2
Asina	11,7	1,4	2,0	7,4	0,5
Vacca	12,7	3,7	3,4	4,8	0,7
Pecora	19,3	7,4	4,5	4,8	1,0
Capra	12,3	4,5	2,9	4,1	0,8
Scrofa	18,8	6,8	4,8	5,5	-
Cavalla	11,2	1,9	2,5	6,2	0,5
Renna	33,1	16,9	11,5	2,8	-
Coniglia	32,8	18,3	11,9	2,1	1,8
Bisonte	14,6	3,5	4,5	5,1	0,8
Elefantessa	31,9	11,6	4,9	4,7	0,7
Orsa polare	47,6	33,1	10,9	0,3	1,4
Foca	67,7	53,1	11,2	0,7	-

Tabella 2-3: Composizione percentuale dei principali costituenti del latte in rapporto alla specie [Fox, 1998]

Anche all'interno della stessa specie il latte può subire variazioni nella sua composizione: queste, in alcuni casi, possono influenzare sensibilmente le caratteristiche dei suoi elementi strutturali e, di conseguenza, le sue proprietà chimico-fisiche.

Cause di origine genetica possono influire notevolmente sia sulla quantità del latte prodotto che sulla sua composizione. Per questo motivo negli anni si



sono selezionate diverse razze in funzione delle diverse esigenze produttive.

Lo stato fisiologico influisce notevolmente sulla composizione del latte, per esempio nel caso della vacca, grasso e proteine tendono a diminuire fino a raggiungere valori minimi, rispettivamente al 5° e 2° mese dall'inizio della lattazione (**Grafico 2-6**), per poi aumentare in misura sempre più marcata man mano che ci si avvicina alla fine della stessa. Un andamento completamente opposto si osserva invece nel contenuto in lattosio, che aumenta nella fase iniziale della lattazione per poi diminuire. Un andamento simile si registra anche per la curva di produttività, che raggiunge il suo massimo tra il 1° e il 3° mese per scendere poi a valori circa pari all'85% del valore massimo. Anche le malattie infettive possono provocare una diminuzione della produzione del latte e alterazioni della sua composizione. Particolarmente importanti in questo caso sono i fenomeni mastitici, in quanto provocano delle alterazioni ostative alla caseificazione, con una diminuzione in grasso, lattosio, caseina e fosfocaseinato di calcio. Questi ultimi due parametri sono particolarmente importanti per una corretta coagulazione del latte. La risposta di difesa immunitaria dell'animale determina l'aumento delle cellule somatiche nel latte con conseguente arricchimento di enzimi di origine cellulare.

Influenze sulla composizione del latte possono essere determinate anche da fattori di tipo ambientale e climatico: lunghi periodi di siccità portano a diminuzioni del residuo secco magro e, a volte, anche di residuo secco totale; temperature eccessive possono comportare perdite di produzione ed abbassamento nella concentrazione di tutti i componenti principali; temperature troppo basse invece possono avere effetti negativi sulla formazione degli aggregati tra i globuli di grasso. Anche la stagionalità influenza la composizione del latte con ripercussioni sul grasso e sul corredo vitaminico. In realtà queste variazioni sono probabilmente legate ai cambiamenti di tipo alimentare cui vengono incontro i diversi animali nel corso della stagione. L'alimentazione gioca infatti un ruolo importantissimo sulla composizione del latte influenzando in modo particolare il contenuto in grasso ed in microelementi.

La variabilità riportata nel **Grafico 2-6** è riferita al singolo capo vaccino, infatti nel latte bovino di massa, costituito dalla raccolta del latte proveniente da tutti gli animali a diverso stadio di lattazione, si registra un profilo mediato di composizione che rimane costante nel tempo. Questo aspetto è estremamente importante dal punto di vista analitico in quanto a seconda dell'effetto che si intende studiare occorre differenziare opportunamente il tipo di latte. In Sardegna, la produzione di latte ovino è fortemente condizionata dal mercato degli agnelli, la cui richiesta commerciale si

concentra essenzialmente nei periodi di Natale e di Pasqua. Per poter avere abbondanza di prodotto in questi due periodi dell'anno è necessario procedere alla sincronizzazione dei calori nelle greggi. Per tale ragione, le pecore si trovano tutte pressappoco allo stesso stadio di lattazione, entro un range di circa un mese. Per queste ragioni il latte di massa ovino in Sardegna presenta lo stesso andamento, in termini di composizione, del latte del singolo capo [Carta et al., 1995].

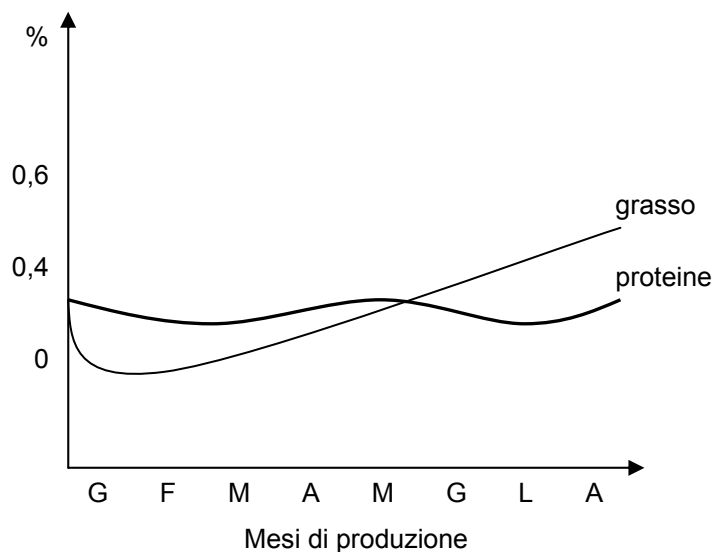


Grafico 2-6: curva di lattazione della pecora

2.4 Il lattosio

Il lattosio è il principale carboidrato presente nel latte di tutti i mammiferi e anche il costituente più solubile con una concentrazione nel latte di pecora compresa tra 4,5 e 5,0 g/100 mL. Gli altri zuccheri, come glucosio e fruttosio, sono contenuti esclusivamente in tracce. La concentrazione del lattosio varia in base alla specie e alla razza, allo stadio di lattazione ed in funzione della presenza di processi infettivi nell'animale. Assieme agli ioni sodio, potassio e cloruro, il lattosio gioca un importante ruolo nel mantenimento della pressione osmotica nel sistema mammario. Quindi un incremento in concentrazione di lattosio deve essere compensato da un corrispondente decremento di concentrazione di uno degli elettroliti. Questo spiega

perché ci sia una relazione di proporzionalità inversa tra la concentrazione di lattosio e il valore in ceneri di un latte.

Il lattosio, sintetizzato essenzialmente dalla secrezione mammaria a partire dal glucosio trasportato dal sangue, è un disaccaride composto da galattosio e glucosio. Una molecola di glucosio viene prima isomerizzata a galattosio e quindi legata attraverso un legame di tipo β -glicosidico ad un'altra molecola di glucosio attraverso un preciso processo enzimatico. Nel latte i due isomeri del lattosio, α e β , sono in equilibrio tra loro con una distribuzione percentuale del 37,7% e 62,3% rispettivamente.

Il lattosio è il substrato indispensabile per le moltissime fermentazioni che si sviluppano nel latte, tra le quali la più importante è la fermentazione lattica. Questa, trasformando il lattosio in acido lattico, avvia un processo di coagulazione (definita appunto coagulazione acida) che è alla base della produzione di diversi derivati come ad esempio lo yogurt.

Gli impieghi industriali del lattosio sono piuttosto limitati, sia a causa dello scarso potere edulcorante (pari a un quinto del saccarosio) sia per la sua scarsa solubilità. Tuttavia esso trova impiego nell'industria dolciaria e farmaceutica per la capacità di assorbire coloranti e pigmenti; e nelle ditte produttrici di alimenti per l'infanzia al fine di rendere la composizione del latte vaccino più simile a quella umana.

Alcuni individui, o addirittura intere popolazioni, possono presentare un'intolleranza al lattosio, a causa della carenza di un gruppo di enzimi (le lattasi). Spesso questa carenza è dovuta a uno scarso consumo di latte nella dieta e conseguente perdita della capacità di sintetizzare questi enzimi da parte dell'organismo. Per affrontare questo problema esiste una produzione industriale di latte delattosato, cioè sottoposto a dei trattamenti enzimatici che idrolizzano il lattosio in misura del 70% [Fox, 1998] [Corradini, 1995].

2.5 I lipidi

La principale funzione alimentare dei lipidi è quella di garantire al neonato l'apporto energetico necessario al suo sviluppo; per questo motivo i lipidi sono contenuti nel latte di tutti i mammiferi e in concentrazione proporzionale all'energia richiesta dalla

diverse specie. Essi costituiscono un'importante apporto di acidi grassi essenziali (es. acido linoleico) e vitamine liposolubili (es. A, D, E, K), e contribuiscono a fornire le caratteristiche reologiche e sensoriali dei prodotti lattiero-caseari.

Per molti anni il valore economico del latte si è basato esclusivamente sul suo contenuto in grasso, questa pratica probabilmente si è affermata grazie alla possibilità di determinare il grasso (piuttosto che proteine e lattosio) attraverso metodiche analitiche relativamente semplici. Per questo motivo negli anni è cresciuto l'interesse ad aumentare il contenuto di grasso nel latte, sia attraverso apporti nutrizionali che selezioni genetiche. Tuttavia, enucleandoci dal contesto oggettivo, tale stima qualitativa trova adeguato riscontro solo in un limitatissimo numero di applicazioni specifiche, come per esempio la produzione di burro.

Il latte bovino ha un contenuto in grasso del 3,5%, circa la metà di quello ovino, che con il suo 7,4% si conferma il latte più grasso fra quello delle specie comunemente utilizzate a scopo alimentare. La componente grassa è costituita da strutture globulari emulsionate in matrice acquosa, costituite da gliceridi rivestiti da una patina di materiale interfacciale (membrana) dello spessore di 10 nm. Le proprietà di individualità, stabilità e possibilità di formare aggregati dei globuli di grasso regolano il comportamento della fase lipofila del latte alle sollecitazioni di natura chimico-fisica e meccanica durante i trattamenti tecnologici. Anche alcune proprietà ottiche del latte dipendono dallo stato della dispersione del grasso nei globuli, questi infatti sono responsabili dei fenomeni di scattering della luce rendendo opalescente il latte. I globuli di grasso hanno un diametro variabile tra 0,1 e 10 μm e sono costituiti principalmente da tre parti:

- la parte esterna, detta membrana, alla cui complessa composizione concorrono diverse sostanze, tra le quali proteine, fosfolipidi, e colesterolo, e che permette ai globuli di conservare lo stato di emulsione;
- la parte intermedia, costituita da lipidi ad alto punto di fusione;
- la parte interna, costituiti da lipidi a basso punto di fusione, generalmente liquidi a temperatura ambiente.

2.5.1 Composizione della membrana

La composizione chimica della membrana dei globuli di grasso è tuttora oggetto di studio. I dati sinora ottenuti non sono univoci in quanto i diversi procedimenti con cui la membrana può essere separata dal globulo tendono ad alterare l'oggettività del dato analitico. Nella **Tabella 2-4** è riportata una composizione della membrana che, seppure indicativa, fornisce informazioni sulle classi di sostanze più rappresentate cui corrispondono numerosi composti.

	<i>mg/100g del globulo di grasso</i>	<i>mg/m² di superficie del globulo di grasso</i>	<i>% (w/w) della membrana totale.</i>
Sostanze proteiche	900	4,5	41
Fosfolipidi	600	3,0	27
Cerebrosidi	80	0,4	3
Colesterolo	40	0,2	2
Gliceridi neutri	300	1,5	14
Acqua	280	1,4	13

Tabella 2-4: Composizione indicativa della membrana dei globuli di grasso

Le sostanze proteiche presenti nella membrana comprendono fino a 40 proteine aventi pesi molecolari compresi tra 15000 e 240000. Fra queste, le più rappresentate sono la xantinaossidasi e le glicoproteine. La parte zuccherina di queste glicoproteine è costituita da glucosio, galattosio, esosamine e acido sialico, tutti composti riscontrati in piccole quantità nel materiale della membrana. Oltre alla xantinaossidasi, anche altri enzimi sono presenti nella membrana, sebbene in quantità inferiori, come ad esempio le fosfatasi acide e alcaline, la γ -glutamilttransferasi, la 5'-nucleotidasi e la solfidrilossidasi.

I fosfolipidi di membrana sono circa il 60% dei fosfolipidi totali del latte; la **Tabella 2-5** riporta un'indicazione della composizione dei fosfolipidi del latte nelle principali classi costituenti. I lipidi di membrana sono essenzialmente neutri (trigliceridi con una composizione in acidi grassi alquanto differente da quella media del grasso di latte). Tra i componenti della membrana vi sono infine piccole quantità di squalene, carotenoidi, vitamina A, oltre ad alcuni metalli come Fe, Mo e Cu.

	%
fosfatidiletanolamina	29,5-46,9
fosfatidilcolina	22,5-38,0
sfingomieline	19,9-32,0
fosfatidilserina	2,3-4,6
fosfatidilinositolo	1,5-4,6

Tabella 2-5: Composizione percentuale dei fosfolipidi del latte.

La membrana dei globuli di grasso ha un'organizzazione che giustifica la sua importanza nel conservare la stabilità fisica degli stessi nel latte e che, nel contempo, spiega perché la superficie esterna è la prima ad essere interessata nelle reazioni e interazioni riguardanti i globuli. Quest'ultima proprietà comporta che, nella struttura della membrana, ci sia una composizione ordinata ma asimmetrica dei componenti con diverse proprietà funzionali. Ciò è conseguente al fatto che la membrana non è altro che lo strato interfacciale tra una fase grassa e una fase acquosa. Sulla sua superficie interna dovranno prevalere quindi i siti idrofobici, mentre nella superficie esterna quelli idrofilici. Questa considerazione, e le osservazioni conseguenti a numerose indagini, hanno portato a proporre alcuni modelli sull'organizzazione e struttura della membrana, tra i quali è abbastanza recente quello riportato in **Figura 2-3**.

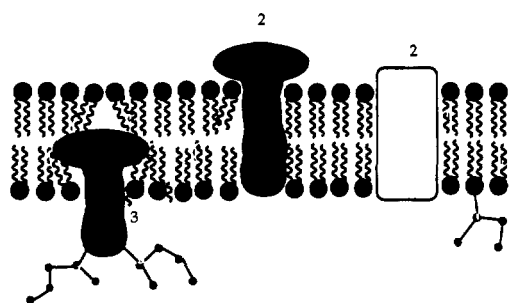


Figura 2-3: Rappresentazione schematica della membrana dei globuli di grasso: 1) fosfolipidi, 2) proteine, 3) glicoproteine.

I fosfolipidi sono disposti su un doppio strato, la catena idrocarburica apolare è orientata verso l'interno ed è libera di ruotare così da costituire uno stato continuo

idrocarburico; la regione idrofilica invece è rivolta verso l'esterno ed è relativamente rigida. In questo doppio strato, ogni molecola lipidica può muoversi lateralmente, conferendo fluidità e flessibilità allo stesso. Alcune delle proteine globulari sono parzialmente inserite nella membrana, mentre altre la attraversano completamente; l'entità della penetrazione è data dalla composizione amminoacidica e dalla struttura secondaria e terziaria delle proteine. Questo rende le proteine simili a dei pezzi di mosaico inseriti in uno strato lipidico fluido. [Fox, 1998] [Corradini, 1995]

2.6 Le proteine

La funzione naturale delle proteine del latte è di fornire ai mammiferi gli amminoacidi essenziali necessari allo sviluppo muscolare e degli altri tessuti proteici, ed altre proteine biologicamente attive come immunoglobuline e ormoni proteici. Poiché gli stadi di sviluppo dei lattanti differiscono a seconda della specie, il contenuto proteico riflette queste differenze e varia, oltre che in funzione della specie, anche in funzione dello stato di lattazione del mammifero in relazione direttamente proporzionale alla sua velocità di crescita (**Grafico 2-7**).

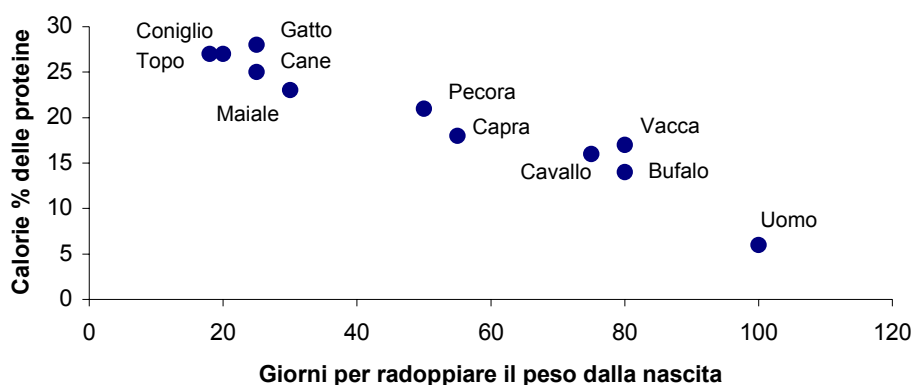


Grafico 2-7: Contenuto proteico % in rapporto alla velocità di sviluppo delle diverse specie

Oltre che costituire una fonte alimentare di alto valore biologico, le proteine del latte determinano le caratteristiche tecnologiche della materia prima quando essa viene utilizzata nella produzione di alimenti a lunga conservazione. Ad esempio il sistema delle caseine, per la sua alta stabilità al calore, permette la produzione di numerosi

prodotti sterilizzati e disidratati. La gelificazione a seguito di una limitata proteolisi permette la produzione di formaggi; dal siero si possono inoltre ottenere alimenti interessanti come la polvere di latte magro, i caseinati e i concentrati proteici. Per questi motivi l'alto contenuto in grasso e proteine tipico del latte ovino lo qualifica come prodotto ad alta resa casearia.

<i>Specie</i>	<i>Caseine</i>	<i>Proteine del siero</i>	<i>Proteine totali</i>
Uomo	0,4	0,6	1,0
Vacca	2,8	0,6	3,4
Pecora	4,6	0,9	5,5
Capra	2,5	0,4	2,9
Cavallo	1,3	1,2	2,5
Maiale	2,8	2,0	4,8
Asino	1,0	1,0	2,0

Tabella 2-6: Contenuto proteico in funzione della specie

Per tali ragioni, il contenuto proteico del latte è stato affiancato a quello della sostanza grassa per stabilirne il valore economico.

2.6.1 Eterogeneità delle proteine del latte

Inizialmente si riteneva che il latte contenesse un solo tipo di proteine, ma circa 100 anni fa è stato dimostrato che le proteine del latte potevano essere frazionate in due gruppi ben distinti. Attraverso l'acidificazione a pH 4,6 (pH isoelettrico) a circa 30°C, si osserva la precipitazione dell'80% delle proteine totali del latte vaccino; questa frazione è nota oggi con il nome di *caseine*, le proteine che rimangono in soluzione in queste condizioni vengono definite *proteine del siero*. Il rapporto tra le caseine e le proteine del siero varia a seconda della specie (**Tabella 2-6**), in funzione delle esigenze nutrizionali e fisiologiche necessarie allo sviluppo dei mammiferi nelle prime fasi della loro vita.

Le maggiori differenze tra le proteine del siero e le caseine sono:

- Rispetto alle caseine, le proteine del siero non precipitano dalla soluzione a pH 4,6. Questa caratteristica viene generalmente utilizzata per la definizione operativa di caseina. Questa differenza tra i due gruppi principali delle proteine del latte viene sfruttata nella produzione industriale delle caseine e di alcune varietà di formaggi. Solo la frazione caseinica viene generalmente interessata nella produzione del formaggio, mentre le proteine del siero vengono perse durante la caseificazione.
- La chimosina ed altre proteinasi (note come caglio) producono un leggero cambiamento nelle caseine che, in presenza di Ca^{2+} , coagulano. Le proteine del siero invece non subiscono nessuna modifica. La capacità di coagulare delle caseine per mezzo dell'azione del caglio è alla base della produzione di moltissime varietà di formaggi e della produzione di caseine presamiche.
- Le caseine sono molto stabili alle alte temperature, il latte può essere riscaldato, al suo pH naturale, fino a 100°C per 24h senza coagulare, resistendo fino a 140°C per 20 minuti. Trattamenti termici così elevati producono comunque dei cambiamenti, come ad esempio la produzione di acidi a partire dal lattosio. Questi, abbassando il pH e modificando l'equilibrio di alcuni sali, possono provocare la precipitazione delle caseine. Le proteine del siero invece sono relativamente termolabili subendo la completa denaturazione a seguito di un trattamento a 90°C per 10 min.
- Le caseine sono fosfoproteine contenenti in media lo 0,85% di fosforo, mentre le proteine del siero sono completamente prive di fosforo. I gruppi fosforici sono responsabili di molte delle proprietà delle caseine, specialmente la loro capacità di legarsi facilmente al calcio conferisce alle caseine un alto valore nutrizionale. Il fosfato contribuisce notevolmente alla stabilità termica delle proteine e alla coagulazione presamica in presenza di calcio.
- Le caseine hanno un bassissimo contenuto in zolfo, mentre le proteine del siero ne sono relativamente ricche. Lo zolfo presente nelle caseine è dovuto essenzialmente alla presenza della metionina, mentre la cisteina e la cistina sono assenti o presenti in bassissime concentrazioni. Per tali ragioni le caseine sono quasi prive di struttura secondaria e vengono definite proteine naturalmente denaturate. Le proteine del siero invece contengono, oltre alla metionina, elevate quantità di residui cisteinici e cistinici, e sono responsabili della loro denaturazione a causa dei trattamenti termici.

- Le caseine sono sintetizzate solo ed esclusivamente nella glandola mammaria. Le proteine del siero invece possono essere sintetizzate sia nella glandola mammaria o trasferite direttamente dal sangue.
- Le proteine del siero sono disperse nel latte sotto forma di soluzione e hanno una semplice struttura quaternaria. Le caseine hanno una struttura quaternaria complicata e si trovano disperse nel latte sotto forma di aggregati colloidali, noti come micelle caseiniche, con massa intorno ai $10^6 - 10^9$ Da.
- Sia le caseine del siero che le proteine sono estremamente eterogenee, ognuna delle due classi contiene molte proteine differenti.

2.6.2 Caseine

La caseina è la frazione proteica del latte che, a 20°C, precipita per acidificazione a pH 4,6. Il suo contenuto in azoto concorre all'azoto totale del latte per circa il 76-78% e, da un punto di vista proteico, è costituita da quattro componenti principali (le caseine α_{s1} , α_{s2} , β e κ) e da altri componenti da essi derivati (le caseine γ e le caseine λ). In 100 parti di caseina totale, le singole caseine rappresentano mediamente le seguenti frazioni percentuali: $\alpha_{s1} = 38$, $\beta = 36$, $\kappa = 13$, $\alpha_{s2} = 10$, $\gamma_1 + \gamma_2 + \gamma_3 = 2$; $\lambda < 1$. La loro eterogeneità dipende anche dal grado di fosforilazione o di glicosilazione oltre che dal polimorfismo genetico.

Le caseine presentano una scarsa organizzazione in strutture secondarie e terziarie e possono, pertanto, essere considerate delle proteine a struttura aperta a causa della loro linearità.

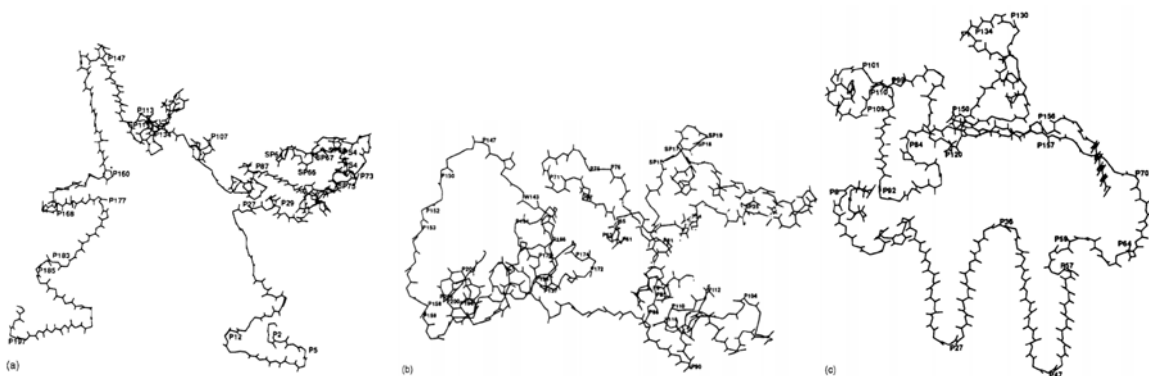


Figura 2-4: Modello della struttura terziaria delle caseine α_{s1} (a), β (b) e κ (C). [Fox, 1998]

Questo le rende più suscettibili all'azione delle proteasi rispetto alle proteine del siero. In particolare, la forte tendenza della caseina κ ad avere tratti della catena peptidica senza alcuna rotazione elicoidale in prossimità del legame 105-106 Phe-Met, sensibile alla chimasi, favorirebbe il formarsi di legami idrogeno con i siti attivi dell'enzima con il complesso attivato.

Tutte le caseine hanno la proprietà di dare polimeri anche di grosse dimensioni; dalle associazioni caseiniche derivano anche le micelle e le submicelle presenti nel latte fin dall'origine e alla cui proprietà è strettamente connessa la stabilità del latte e il suo comportamento nel processo di caseificazione. Nelle associazioni tra le molecole delle caseine giocano un ruolo importante gli ioni calcio; soprattutto le caseine α_{s1} , α_{s2} e β possono legare un numero considerevole di questi ioni fino a dar luogo a precipitati veri e propri.

Infatti, la combinazione con gli ioni calcio riducono le cariche negative della molecola rendendo possibile l'associazione delle caseine; quando però la concentrazione di ioni calcio disponibili è troppo elevata, le associazioni proteiche aumentano di dimensioni, fino a costituire particelle troppo grosse per rimanere in soluzione colloidale.

L'associazione tra le caseine α_{s1} , β e κ può avvenire anche in assenza di ioni calcio mediante legami di natura idrofobica, grazie alla particolare distribuzione delle cariche e dei gruppi idrofobici e idrofilici nella molecola di queste proteine. Le molecole delle caseine α_{s1} , β e κ hanno tutte carattere anfifilico, questo significa che nella loro catena amminoacidica si possono distinguere zone idrofile e zone idrofobe. In particolare, nella loro molecola è stato individuato un tratto, definito peptide acidico, che è caratterizzato da una concentrazione di cariche negative e che presenta la proprietà di formare nel suo intorno uno strato di solvatazione grazie alla sua prevalente capacità idrofilica.

2.6.3 Le micelle caseiniche

Il 95% delle caseine è presente nel latte sotto forma di particelle colloidali note come micelle. Le micelle caseiniche contengono circa il 94% di proteine e il 6% di sostanze a basso peso molecolare come ioni calcio, magnesio, fosfato e citrato. Sono estremamente idratate, per ogni grammo di proteina ci sono circa 2 g di H_2O ; sono visibili nel latte attraverso il microscopio elettronico, hanno una forma sferica, un

diametro che va dai 50 ai 500 nm ed una massa compresa tra 10^6 e 10^9 Da. A causa della loro dispersione colloidale, provocano dei fenomeni di scattering della luce conferendo il tipico colore bianco al latte, che viene perso nel caso in cui si provochi la distruzione delle micelle, per esempio allontanando il fosfato di calcio, aumentando il pH o aggiungendo urea o sodiododecilsolfato (SDS).

Vari modelli sulla struttura delle micelle caseiniche sono stati proposti e corretti negli ultimi 40 anni. Per molti anni si è ritenuto che le micelle fossero composte da submicelle di massa $\approx 10^6$ Da ed un diametro di 10 – 15 nm. Questo modello è stato introdotto nel 1967 da Morr e prevedeva che le submicelle fossero unite tramite il fosfato di calcio colloidale, conferendo alle micelle una struttura porosa.

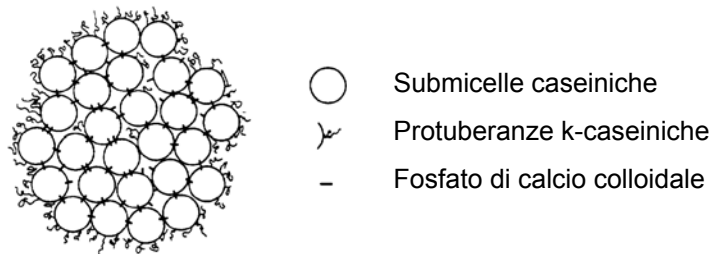


Figura 2-5: Rappresentazione schematica delle micelle caseiniche.

Rimuovendo il fosfato di calcio colloidale le micelle vengono disgregate, la stessa azione può essere ottenuta attraverso l'aggiunta di urea, SDS, o alcalinizzando a pH maggiori di 9. Tali accorgimenti non agiscono a livello della solubilizzazione del fosfato di calcio colloidale, ma intervengono indebolendo altre forze, come legami idrogeno e idrofobici, che contribuiscono a mantenere coesa la struttura delle micelle.

Il contenuto in κ -caseina non è omogeneo nelle micelle caseiniche. Si è notato che le zone interne della micella sono completamente prive di κ -caseina, mentre la superficie esterna delle micelle è me ricca in κ -caseina. Su questa superficie sono disposti anche alcuni residui di α_{s1} , α_{s2} e β . Si ritiene che la



Figura 2-6: Modello delle micelle caseiniche [Holt, 1994]

regione idrofila C-terminale della κ -caseina protruda all'esterno della micella caseinica, formando uno strato spesso tra i 5 e i 10 nm che conferisce alle micelle un aspetto simile a quello dei capelli. Questo strato di "capelli" conferisce stabilità alla micella caseinica, così che, se questi vengono rimossi attraverso l'idrolisi specifica

della κ -caseina, o collassati con l'aggiunta di etanolo, viene compromessa la stabilità delle micelle caseiniche colloidali che precipitano o coagulano.

Diversi modelli sono tuttora oggetto di studio per meglio definire la struttura delle micelle e submicelle caseiniche, tutti però partono dalle proprietà "cementificanti" del fosfato di calcio colloidale e quelle stabilizzanti dei "capelli" κ -caseinici.

2.7 Le proteine del siero

Le proteine del siero costituiscono circa il 20% delle proteine totali del latte, fra queste le più rappresentate sono la β -lattoglobulina, l' α -lattalbumina, la sieralbumina, le immunoglobuline e i componenti della frazione dei proteo peptoni, vi sono inoltre altri componenti proteici presenti in piccole quantità, quali la lattoferrina, transferrina, ceruloplasmina.

Le proteine del siero possiedono una relativamente scarsa stabilità al calore, ciò è dovuto principalmente alla presenza di residui cisteinici. Il calore rompe i ponti disolfuro intramolecolari formati dai residui cisteinici, modificando la struttura della proteina. La successiva formazione di legami disolfuro intramolecolari porta alla formazione di aggregati intermolecolari che, raggiunte certe dimensioni, precipitano. In alcuni casi le proteine del siero, termicamente denaturate, si legano anche alle micelle caseiniche per dar luogo a micelle complesse.

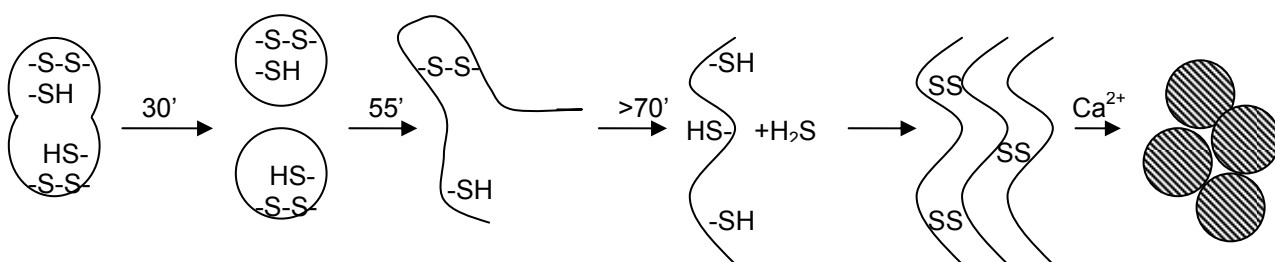


Figura 2-6: Rappresentazione schematica delle trasformazioni subite dalla β -lattoglobulina per effetto del calore.[Corradini, 1995]

Lo schema rappresenta le fasi di denaturazione ed apertura della β -lattoglobulina a 70°C , e la sua successiva polimerizzazione e aggregazione alle micelle caseiniche.

La presenza di composti solforati nella loro sequenza amminoacidica, come ad esempio la cisteina, rende queste proteine particolarmente importanti dal punto di vista nutrizionale, a tal proposito negli ultimi anni si sono sviluppate delle tecniche che permettono di ottenere il frazionamento delle proteine seriche senza denaturazione. Il crescente consumo nel mercato alimentare di integratori proteici, e la possibilità di ottenere questa materia prima direttamente da quello che fino ad ora veniva considerato un prodotto di scarto hanno stimolato l'attenzione nei confronti del siero, delle sue applicazioni alimentari e delle tecniche per il suo frazionamento. [Fox, 1998] [Corradini, 1995]

2.8 Gli enzimi

Sebbene quantitativamente trascurabili, gli enzimi del latte rivestono comunque una grande importanza per la definizione delle caratteristiche sensoriali del latte e dei suoi prodotti. La loro attività catalitica permette infatti la produzione di quelle molecole che conferiscono i sapori e i profumi caratteristici per ogni tipo di prodotto. Gli enzimi presenti nel latte possono avere differente origine, ma solo quelli definiti endogeni possono essere considerati componenti del latte veri e propri. Gli enzimi endogeni sono circa 100, ma solo 60 di questi sono stati isolati e caratterizzati. Essi possono provenire da tre distinte fonti:

- dal sangue, attraverso la membrana della cellula mammaria;
- dal citoplasma delle cellule secretorie. Alcuni enzimi vengono inglobati all'interno dei globuli di grasso al momento della loro formazione;
- direttamente dalla membrana dei globuli di grasso, il cui strato esterno deriva dalla membrana apicale delle cellule secretorie. Questa è probabilmente la fonte principale degli enzimi endogeni del latte.

Il latte non contiene i substrati necessari a tutti gli enzimi, e molti di loro sono inattivi a causa delle condizioni sfavorevoli, ad esempio di temperatura o di pH. La presenza degli enzimi è utile dal punto di vista tecnologico, in quanto essi possono essere implicati:

- nel deterioramento (lipasi, proteinasi o fosfatasi acida) o conservazione (sulfidril ossidasi, superossidismutasi) della qualità del latte;
- come indici dei trattamenti termici subiti dal latte: fosfatasi alcalina, γ -glutamilttransferasi e lattoperossidasi;
- come indici di infezioni mastitiche, causa l'aumento di enzimi di origine cellulare, nella fattispecie la catalasi o fosfatasi acida;
- nell'attività antimicrobica, come ad esempio per lisozima e lattoperossidasi;
- come fonte commerciale di enzimi: ribonucleasi e lattoperossidasi.

Dopo la mungitura e a seguito dello sviluppo dei microrganismi presenti, il latte può tuttavia arricchirsi di altri enzimi, definiti di origine microbica, che possono influire, spesso ancor più che dei nativi, sulle caratteristiche organolettiche e tecnologiche.

Al pari degli altri componenti del latte, anche l'attività enzimatica, può essere soggetta a variazioni in funzione di alcuni parametri come l'alimentazione, il periodo di lattazione, la specie, la razza, lo stato fisiologico, evidenziando specifiche diversità per ognuno dei 100 enzimi endogeni presenti nel latte.

Secondo quanto previsto dalla *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* gli enzimi vengono raggruppati in sei diverse classi, a seconda della loro attività catalitica:

- EC 1 - *Ossidoreduttasi*: catalizzano reazioni di ossidoriduzione;
- EC 2 - *Transferasi*: catalizzano il trasferimento di un gruppo funzionale;
- EC 3 - *Idrolasi*: catalizzano l'idrolisi di vari tipi di legame chimico;
- EC 4 - *Liasi*: catalizzano la rottura di vari legami attraverso metodi alternativi all'idrolisi o all'ossidazione;
- EC 5 - *Isomerasi*: catalizzano le isomerizzazioni all'interno di una molecola;
- EC 6 - *Ligasi*: catalizzano il legame tra due molecole attraverso un legame covalente.

Nel latte la maggior parte degli enzimi appartiene alle prime tre classi, mentre non sono stati ancora individuati in esso enzimi appartenenti all'ultima classe: le ligasi.

L'aggiunta di enzimi agli alimenti per favorire la produzione di alcuni prodotti è una pratica utilizzata fin dalla preistoria: l'adozione del caglio nella produzione del formaggio o l'aggiunta di foglie di papaya per intenerire la carne ne sono solo alcuni esempi. L'aggiunta di enzimi esogeni nei prodotti alimentari è tuttora una pratica

molto diffusa nell'industria alimentare per la loro capacità di indurre, negli alimenti, specifici cambiamenti che, a differenza delle modifiche apportate per azioni di natura chimico-fisiche, non producono effetti indesiderati. Alcuni prodotti si possono ottenere esclusivamente per aggiunta di enzimi esogeni, come ad esempio nel caso della coagulazione presamica del formaggio.

Per molto tempo si è ritenuto che gli enzimi endogeni del latte non avessero alcun ruolo nell'essere di ausilio alla definizione delle proprietà qualitative, nutrizionali e sensoriali del latte. Ciò ha portato in passato a privilegiare, ad un approccio cognitivo, uno – più sbrigativo – di tipo fisico-tecnologico volto ad esempio all'abbattimento di carica microbica e flora anticasearia attraverso processi di denaturazione termica. Tale scelta ha portato molto spesso alla realizzazione di prodotti uniformati, privi di quelle molecole che, frutto dei processi catalitici dei diversi enzimi, conferiscono ai prodotti gli attributi sensoriali caratteristici della zona e delle tecnologie di produzione. Il recente interesse per i prodotti a latte crudo, tutelati oggi da precise norme comunitarie, ha accentuato l'attenzione sui trattamenti termici, considerandoli, da un lato, un utile strumento di sanificazione del latte, ma dall'altro, un elemento gravemente ostativo all'affermazione delle specificità produttive. [Fox, 1998] [Corradini, 1995]

2.9 Le vitamine

Oltre agli enzimi, tra i componenti del latte ve ne sono altri che, sempre presenti in piccole quantità, sono parimenti importanti dal punto di vista biologico. Ad esempio, le vitamine e le sostanze a loro assimilabili rappresentano nel latte crudo un completo e qualificato corredo di principi nutritivi. Il contenuto delle varie vitamine nel latte è molto variabile in funzione di diversi fattori, quali la razza, lo stadio di lattazione, il tipo di alimentazione e la stagione. Nel corredo vitaminico del latte si possono verificare perdite dovute a diversi processi, i più comuni dei quali sono quelli fermentativi, dovuti all'azione di microrganismi che utilizzano le vitamine come nutrienti. Anche i processi di natura chimico-fisica, quali le ossidoriduzioni e l'azione del calore, possono provocare alterazioni quali-quantitative nel corredo vitaminico del

latte in quanto alcune di esse sono inattivate dal calore, da processi ossidoriduttivi o fotolitici. [Fox, 1998] [Corradini, 1995]

2.10 I sali minerali

Anche i sali minerali sono tra i componenti minoritari del latte, costituendo in esso solo lo 0,6-0,7% (dato espresso come ceneri). Essi però svolgono un ruolo importantissimo nel mantenimento di alcuni equilibri del latte, ne è un esempio la già discussa influenza dello ione Ca^{2+} sulla costituzione delle micelle caseiniche e sulla loro tendenza a coagulare.

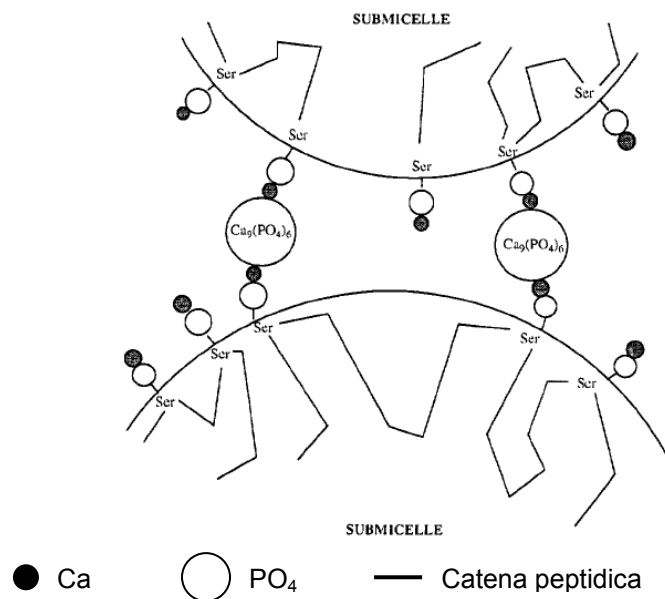


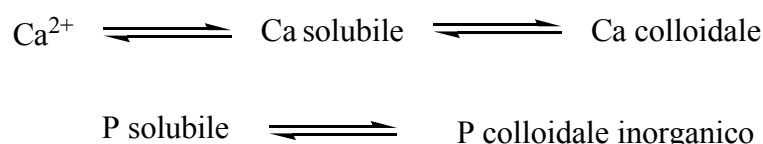
Figura 2-8: Rappresentazione schematica dell'associazione tra il fosfato di calcio colloidale ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e il gruppo serinico delle caseine [Fox, 1998].

In funzione della loro concentrazione nel latte, i componenti minerali si possono dividere in due gruppi: il primo (frazione minerale maggioritaria) è costituito da quelli che contribuiscono significativamente alla composizione del latte, il secondo dai cosiddetti *oligoementi*, presenti solo in piccolissime quantità. Anche questi elementi, possono assumere un'importanza rilevante, sia nel catalizzare alcune trasformazioni a carico di componenti principali del latte, che nel conservarne alcune peculiari

funzioni e proprietà, in quanto componenti di enzimi (Cu, Fe, Mn, Mo, Zn) e vitamine (Co).

I componenti minerali del latte si trovano in parte come composti solubili nel siero e, in parte, nella fase proteica colloidale o nei globuli di grasso. La distribuzione tra fase solubile e fase colloidale è però diversa per i vari componenti minerali, in quanto dipendente dalle forme che questi assumono nel latte. I componenti minerali più rappresentati, gli ioni cloruro, sodio e potassio, si trovano quasi totalmente nel siero presamico e si ritiene che nel latte siano presenti quasi esclusivamente sotto forma di ioni.

Fra quelli presenti in forma colloidale, il calcio e il fosforo sono gli elementi più abbondanti. Essi si trovano in un rapporto di equilibrio tra le forme solubili e quelle insolubili presenti nella fase colloidale secondo l'equilibrio sotto riportato.



Il riscaldamento sposta questi equilibri verso destra, l'incremento dell'acidità, invece, li sposta verso sinistra. Con il variare di tali equilibri varia anche la stabilità della fase proteica colloidale del latte nella quale calcio, gruppi fosforici e fosfato di calcio colloidale giocano un ruolo essenziale nell'organizzazione delle micelle e submicelle caseiniche. In genere, l'acidificazione provoca un passaggio dei componenti minerali nella forma solubile.

Il calcio è presente nel latte anche come citrato di calcio che è poco solubile e poco dissociato. Lo ione citrico, pertanto, agisce da sequestrante di calcio stesso sottraendolo agli equilibri con i fosfati e alle associazioni con le proteine.

3 Il formaggio

Alimento di origini antichissime la cui produzione è stata tramandata per migliaia di anni attraverso un connubio di arte e tradizione, rappresenta la forma più antica di conservazione del latte. Si ritiene che le sue origini risalgano fino alla Rivoluzione Neolitica (6000 a.C.), quando l'uomo si trasforma lentamente da cacciatore a domatore e poi in pastore di pecore. Il primo formaggio conosciuto dall'uomo fu probabilmente prodotto all'interno dello stomaco di un animale lattante quando, utilizzato come contenitore per il latte, gli enzimi presenti al suo interno diedero vita ad una serie di chimismi che ancora oggi sono alla base della sua produzione.

Considerato per anni un alimento poco nobile, tanto da lasciare un limitato numero di tracce nella storia e nelle letterature occidentali, soprattutto in confronto ad altri alimenti quali il pane, il vino o la carne, ha rappresentato fino ad oggi un'efficiente forma di conservazione delle proprietà nutritive del latte. Le varie popolazioni hanno cercato di utilizzare al meglio questa caratteristica così che, nei diversi secoli, si sono sviluppati migliaia di prodotti che costituiscono oggi un patrimonio alimentare, economico e sociale per le nazioni che lo producono.

Attualmente circa un terzo della produzione mondiale di latte viene utilizzato per la produzione di formaggio, per un totale di 14 milioni di tonnellate annuali [Fox, 1998], delle quali il 50% nella sola Unione Europea, e il 40% nel Nord America; il restante è prodotto principalmente nel Sud America, Australia, Nuova Zelanda, e una piccola quota anche in Nord Africa [Fox, 1998].

Il formaggio è un alimento ad alto valore nutrizionale, ricco di proteine, calcio e fosforo, che vanta anche proprietà anticarcinogeniche. Esso è comodo e versatile da consumare, facilmente confezionabile ed offre un'enorme varietà di profumi e consistenze. Queste caratteristiche ne hanno determinato un crescente utilizzo nel settore dei servizi alimentari, con un conseguente aumento della vendita, che tra il 2003 e il 2007 ha registrato una crescita del 9,8% (**Tabella 3-1**) [Farkye N. Y., 2004].

	1998	2003	2007	Crescita % 2003-2007
Latte	76 080	73 067	78 242	1,4
Formaggio	66 584	67 810	74 439	9,8
Yogurt	24 363	23 334	34 002	20,0
Crema	8 863	8 934	9 769	13,7
Latte in polvere	6 539	6 003	7 309	21,8
Produzione totale dei prodotti lattiero-caseari	218 881	222 971	247 944	11,2

Tabella 3-1: Vendita dei principali prodotti lattiero-caseari (USD) [Farkye N. Y., 2004].

Le diverse varietà prodotte in tutto il mondo hanno reso difficile la sua definizione, tanto che questo ha rappresentato negli anni una fonte di discussione tra i maggiori esperti del settore. Oggi, secondo quanto riportato nel *Codex Alimentarius* [CODEX STAN A-6-1978, Rev. 1-1999, Amended 2006], il formaggio è *“...il prodotto, stagionato o fresco, spalmabile, morbido, semimorbido o duro, nella quale il rapporto tra le proteine del siero e le caseine non supera quello del latte di provenienza.”*

Questo può essere ottenuto dalla:

- coagulazione completa o parziale delle proteine del latte, latte scremato, latte parzialmente scremato, crema, crema di siero, o qualsiasi combinazione di questi, attraverso l'azione presamica o di qualsiasi altro agente coagulante, e attraverso il parziale drenaggio del siero ottenuto dalla coagulazione. Rispetto al principio che la caseificazione risulti una concentrazione delle proteine del latte (in particolare la frazione caseinica), il contenuto proteico del formaggio deve essere, conseguentemente, nettamente superiore di quello delle miscele dei suddetti materiali dal quale il formaggio può essere prodotto;
- tecniche di lavorazione che implicano la coagulazione delle proteine del latte e/o prodotti ottenuti dal latte che diano un prodotto finale con caratteristiche fisiche, chimiche e organolettiche simili a quelle definite nel punto precedente.

Rispetto ad altre definizioni, in questa viene specificato che il rapporto tra proteine del siero e caseine non può superare quello del latte originale, escludendo in tal modo i prodotti ottenuti dalla sola coagulazione delle proteine del siero. Questo è stato un punto molto dibattuto negli anni, che divide gli esperti tra chi considera il formaggio come il prodotto ottenuto dalla coagulazione delle caseine e chi, più in

generale, lo considera come il prodotto ottenuto dalla coagulazione delle proteine, siano esse caseine o proteine del siero.

Secondo quanto riportato nella definizione, i formaggi possono essere morbidi, semimorbidi (o semiduri), duri e molto duri, in funzione della loro umidità residua. La tecnica utilizzata per la coagulazione del latte (acida o presamica) rappresenta un parametro utile per la classificazione generale dei formaggi, in quanto influenza notevolmente la struttura, le caratteristiche e la compattezza. Formaggi ottenuti dalla coagulazione acida risultano, in genere, più morbidi (es. yogurt), mentre più duri risultano essere quelli ottenuti dalla coagulazione presamica (es. Parmigiano Reggiano) [Farkye N. Y., 2004].

3.1.1 L'utilizzo del latte crudo

La caseificazione del latte crudo garantisce il mantenimento della flora filocasearia autoctona e di gran parte del corredo enzimatico assunti direttamente dagli animali durante il pascolo. Poiché questi contribuiscono al conferimento di sapori e di profumi tipici, un prodotto di tal tipo evidenzia ai massimi livelli il legame intercorrente tra formaggio e territorio, e unitamente alle diverse tecniche di produzione permette di ottenere un formaggio unico e inimitabile.

L'utilizzo del latte crudo rappresenta una forma di produzione molto antica, tipica soprattutto di quelle nazioni ad elevata tradizione lattiero-casearia che ancora oggi producono questo tipo di formaggio, i più famosi dei quali sono riassunti nella **Tabella 3-2**.

<i>Formaggio</i>	<i>Paese produttore</i>
Parmigiano Reggiano	
Grana Padano	
Bitto	Italia
Fiore Sardo	
Ragusano	
Emmental	Svizzera
Roquefort	
Camembert	
Sainte Maure	Francia
Comtè	
Baufort	
Queso de la Serena	
Queso Manchego	
Queso Torta del Casar	Spagna
Queso Mahòn	
Queso Ibores	
Ladotiri	Grecia

Tabella 3-2

Questo tipo di produzione però, comporta due tipi di rischi legati alla presenza di microrganismi, costituiti da:

1. flora anticasearia
2. patogeni

Nel primo caso si possono verificare dei problemi durante la caseificazione o la stagionatura del prodotto da esso ottenuto, con la comparsa di una serie di difetti che di fatto ne abbassano il valore commerciale sino – nei casi



Figura 3-1: Formaggio alterato dalla presenza di clostridi

estremi – a renderlo inutilizzabile. Per esempio la presenza dei clostridi (*Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum*) causa la produzione di gas (H₂ e CO₂) con la conseguente rottura della forma e l'alterazione del sapore dovuta alla produzione degli acidi acetico, butirico e propionico, rendendo il prodotto inutilizzabile.

Il secondo caso invece costituisce un rischio per il consumatore in quanto i microrganismi patogeni presenti nel latte potrebbero essere ancora presenti nel prodotto finale.

Questi rischi possono essere efficacemente contrastati adottando dei trattamenti di bonifica termica, che sono, in genere, la termizzazione (63-65°C per 15-30 s) e la pastorizzazione (71,7°C per 15 s).

Per contro essi provocano la distruzione della microflora (sia quella anticasearia che la filocasearia) e la perdita di buona parte del corredo enzimatico, determinando una maturazione più lenta e attributi sensoriali significativamente differenti da quelli di un formaggio prodotto a latte crudo [Pirisi et al., 1999 a-b].

Per poter produrre formaggio dal latte trattato termicamente è necessario reintrodurre i fermenti lattici (flora filocasearia) attraverso l'aggiunta di microrganismi selezionati o starter naturali. In questo modo è sicuramente più facile ottenere un formaggio senza imperfezioni o senza fermentazioni indesiderate, ma si tratterà di un prodotto in cui il legame con il territorio che lo ha espresso risulterà essere quantomeno affievolito.

Il rischio della contaminazione rappresentato dall'utilizzo di latte crudo contenente microrganismi patogeni è comunque ridotto dalla maturazione del formaggio. Infatti, così come la pastorizzazione garantisce l'abbattimento di tali microrganismi, anche le condizioni tipiche della stagionatura, come l'abbassamento del pH (sotto 5,2) e la riduzione dell'attività ionica dell'acqua, dovuta alla salatura e all'affumicatura, garantiscono delle barriere naturali dapprima allo sviluppo indi alla sopravvivenza dei microrganismi patogeni, assicurando una protezione rispetto ai rischi derivanti dall'utilizzo di latte crudo tal quale [Fox, 1998].

La direttiva CEE 92/46, sulla base di questi fatti, consente l'utilizzo di latte crudo solo per i formaggi con maturazione superiore ai 60 giorni (periodo necessario affinché si verifichi la scomparsa degli agenti patogeni), mentre impone l'utilizzo di latte a bassissimo contenuto di carica batterica o la pastorizzazione per i prodotti a breve periodo di maturazione. Questo regolamento si trova a conciliare le posizioni contrastanti assunte dalle diverse nazioni all'interno della Comunità Europea. Le

nazioni del nord Europa, produttrici soprattutto di prodotti industriali spesso a brevissimo periodo di maturazione, preferiscono utilizzare sistemi per ridurre alla fonte i rischi alimentari anche a discapito delle peculiarità sensoriali e nutrizionali degli (altrui...) prodotti. Le nazioni del sud Europa invece, forti della loro consolidata tradizione lattiero-casearia e spesso orientate a produzioni artigianali, considerano l'utilizzo di latte crudo uno strumento di difesa delle peculiarità dei prodotti tipici.

Non a caso recentemente si è assistito alla nascita di associazioni atte a difendere l'utilizzo di latte crudo, spesso rappresentate dai consorzi di tutela che vigilano e promuovono questo tipo di prodotti, o associazioni di consumatori tra le quali la Slow Food, che considera i formaggi a latte crudo una difesa *“per la varietà biologica degli alimenti e per la prelibatezza gastronomica dei cibi”*.

3.2 Fasi di produzione

Le fasi di produzione del formaggio si possono riassumere generalmente in 5 passaggi: la coagulazione, l'acidificazione, la sineresi (espulsione del siero), la formatura e la salatura.

Il punto focale del processo di produzione del formaggio è costituito dalla coagulazione del latte, il momento in cui le micelle e le submicelle caseiniche si aggregano tra loro a formare una struttura proteica costituita da un coagulo, denominato cagliata. Questa può essere ottenuta attraverso la coagulazione presamica, che avviene per l'aggiunta di enzimi (provenienti dal caglio) che, intervenendo sulle caseine presenti nelle micelle caseiniche ne favoriscono l'agglutinamento (coagulazione presamica). Oppure attraverso la coagulazione acida, in cui i processi fermentativi originati dai microrganismi producono acido lattico e abbassano il pH del latte, provocando una variazione degli equilibri minerali che ha come conseguenza la destabilizzazione delle micelle.

La tecnologia casearia utilizza entrambe le tecniche e, modulando la prevalenza dell'una o dell'altra, ottiene una gran varietà di formaggi, spaziando dai formaggi duri a coagulazione prettamente presamica, alle paste fresche a coagulazione acida.

3.2.1 La coagulazione presamica

Come discusso nel capitolo 2, le micelle caseiniche sono stabilizzate dalla k-caseina, che, attraverso la porzione idrofilica C-terminale che protrude verso l'esterno (**Figura 3-2 a**)), carica negativamente la superficie esterna, impedendo l'aggregazione delle micelle e tenendole stabili in fase colloidale. Attraverso l'aggiunta del caglio, ottenuto generalmente dal quarto stomaco (presame) del vitello o di altri animali lattanti, vengono apportati enzimi proteolitici come chimosina e pepsina, in grado di produrre l'idrolisi specifica del legame Phe₁₀₅-Met₁₀₆ della porzione idrofilica della k-caseina (**Figura 3-2 b**)); il residuo caseinico idrofobico, che rimane attaccato alla micella (f1-105) viene definito para-k-caseina, mentre quello C-terminale (f106-169), idrofilico, definito glicomacropeptide, passa in soluzione nel siero. La perdita della porzione idrofilica che protrude dalla micella impedisce la stabilizzazione della loro carica superficiale, con la conseguenza di ridurre notevolmente la stabilità della fase colloidale. Avviene così che, quando l'85% di questi legami viene idrolizzato, le micelle coagulano (**Figura 3-2 c**)), formando un gel a viscosità crescente. In questa fase, che richiede temperature relativamente alte e non avviene a temperature inferiori ai 20°C, il Ca²⁺ svolge un ruolo fondamentale. Essendo infatti uno ione bivalente permette l'instaurarsi dei legami tra le "nuove" micelle caseiniche, così da formare un reticolo gelatinoso (**Figura 3-2 d**)), che conferirà struttura e compattezza al formaggio. D'altra parte, la temperatura accresce gli urti tra le micelle caseiniche che, a seguito della perdita del glicomacropeptide, possono associarsi tra loro, attraverso legami idrogeno, ponti disolfuro o legami salini, così da costituire quella che viene definita la cagliata (**Figura 3-2 e**)).

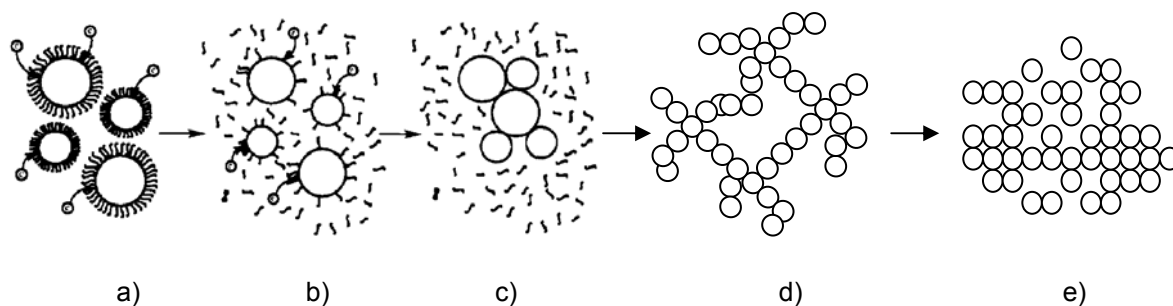


Figura 3-2: Rappresentazione schematica dell'aggregazione delle micelle caseiniche in coagulo

L'acidità del latte influisce su questo processo, in quanto contribuisce ad abbassare la carica superficiale delle micelle caseiniche tanto che, a valori molto più bassi di quelli del latte (pH 6,6), si ha la coagulazione anche quando l'idrolisi della k-caseina, non raggiunge i valori sopra indicati.

La formazione del nuovo reticolo provoca l'espulsione del siero (sineresi), mentre nelle maglie del reticolo proteico sono trattenuti, oltre al grasso e a frazioni dello stesso siero, tutti i componenti (tra i quali microrganismi ed enzimi) indispensabili per trasformare, durante la stagionatura, la cagliata nel formaggio desiderato.

Il processo di sineresi viene favorito da operazioni tecnologiche quali il taglio della cagliata e il riscaldamento di questa (semicottura o cottura a seconda delle temperature). Quando il processo di sineresi è completo, la cagliata viene separata dal siero e introdotta nei contenitori che conferiscono ai diversi formaggi la loro forma caratteristica. Qui continua il drenaggio del siero fino all'ottenimento del livello di umidità desiderato.

Il formaggio viene quindi salato. Questa pratica, comune a tutti i processi di caseificazione, può avvenire per immersione in salamoia oppure per sfregamento del sale direttamente sulla cagliata. La salatura svolge un ruolo importante nella produzione del formaggio, in quanto:

- è il fattore principale che, abbassando notevolmente l'attività ionica dell'acqua, impedisce la formazione e lo sviluppo di batteri e riduce l'attività di molti enzimi, influenzando e controllando i processi biochimici durante la stagionatura del formaggio.
- favorisce la sineresi, riducendo l'umidità nel formaggio.
- ha un effetto positivo sugli attributi sensoriali del formaggio.
- contribuisce all'apporto dietetico del sodio.

3.2.2 La coagulazione acida

L'abbassamento del pH determina una diminuzione delle funzioni acide ionizzate della caseina (acido aspartico, acido glutammico, fosfoserina) con conseguente diminuzione della carica superficiale delle micelle caseiniche e riduzione delle affinità per il calcio che tende a solubilizzarsi.

D'altra parte, tutto il fosfato di calcio che si trova nelle micelle caseiniche è completamente solubilizzato con conseguente disgregazione delle micelle in submicelle, mentre a livello molecolare si raggiunge una completa demineralizzazione al punto isoelettrico. Questo permette l'interazione tra le submicelle che, aumentando il loro peso molecolare, flocculano. Questo fenomeno è favorito dalle temperature relativamente alte e non avviene al di sotto dei 5°C.

I legami che si formano nella flocculazione sono di natura elettrostatica e idrofobica e il coagulo che si forma è friabile, continuo e senza capacità di acquistare consistenza, come invece avviene, per azione del Ca^{2+} , nei coaguli ottenuti per via enzimatica (coagulazione presamica). Questo riduce il processo di sineresi della cagliata che presenta, quindi, un contenuto superiore in umidità. L'elevata attività ionica dell'acqua permette la formazione e lo sviluppo di microrganismi patogeni, per questo motivo i formaggi prodotti attraverso la coagulazione acida sono ottenuti da latte bonificato termicamente, e devono essere consumati entro un breve periodo.

Tradizionalmente l'acidificazione è ottenuta direttamente *in situ* attraverso la fermentazione del lattosio, che in presenza di *Lattococci*, viene convertito in acido lattico.

3.2.3 Maturazione del formaggio

La maturazione è il periodo che intercorre tra la salatura e il consumo del formaggio, durante il quale il prodotto tende ad acquisire i propri caratteri sensoriali tipici.

Mentre i formaggi ottenuti dalla coagulazione acida vengono solitamente consumati immediatamente dopo la loro produzione, quelli ottenuti dalla coagulazione presamica vengono sottoposti ad un processo di maturazione (stagionatura), che può variare dalle 3 settimane (per la mozzarella) a più di 2 anni per il Parmigiano o il Cheddar. Durante questo periodo una complessa serie di processi biologici, chimici e biochimici producono molecole in grado di esaltare gli attributi sensoriali e modificare la struttura del formaggio. Perché queste trasformazioni avvengano in modo corretto e non si manifestino difetti, dovuti a reazioni anomale di vario genere, è necessario che nel formaggio si instaurino le condizioni ottimali per il loro sviluppo.

Gli agenti che maggiormente influiscono su questi aspetti sono:

- Il latte: in esso sono contenuti oltre 60 enzimi endogeni, molti dei quali entrano nella cagliata in quanto sono associati al grasso o alle micelle caseiniche; gran parte degli enzimi idrosolubili vengono invece persi nel siero durante la sineresi, anche se una piccola parte può essere inglobata nel reticolo proteico e passare quindi nel formaggio. Poiché gli enzimi sono termosensibili, i trattamenti termici condotti sul latte prima o durante la caseificazione, influenzano notevolmente i processi di stagionatura, così come qualsiasi altro trattamento tecnologico che ne modifichi la loro attività.
- Il caglio: generalmente liquido, viene perso nel siero. Approssimativamente circa il 6% della chimosina introdotta con il caglio, viene ritrovata poi in formaggi tipo Cheddar o simili. La quantità di caglio trattenuta nel formaggio è inversamente proporzionale all'aumento del pH ed al drenaggio del siero. La quantità residua nel formaggio è tuttavia sufficiente per originare processi di idrolisi delle caseine.
Il caglio in pasta, particolarmente utilizzato in alcune produzioni Italiane, è ricco di lipasi, questo conferisce un maggior contributo alla maturazione lipolitica nel formaggio, con una spiccata produzione di acidi grassi liberi, precursori di altre sostanze (alcoli, aldeidi, metilchetoni, δ -lattoni), che conferiscono il tipico sapore di piccante ai formaggi prodotti secondo questa tecnica.
- Colture filocasearie (starter e non starter): la coltura batterica raggiunge il massimo sviluppo durante le prime 24 h dalla produzione, per poi diminuire durante la stagionatura. I microrganismi più numerosi e principali utilizzatori a scopo energetico del latte sono i batteri lattici, microbi eterotrofi appartenenti alle famiglie *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae*. Il loro sviluppo è alla base di tutti i processi biochimici della produzione e maturazione del formaggio. Pertanto, l'utilità o meno di una specie di microrganismi o di un particolare ceppo è da valutarsi in funzione della capacità di elaborare enzimi utili alle trasformazioni dei principali componenti del latte.
- Microflora anticasearia: il formaggio ottenuto da latte pastorizzato o di alta qualità prodotto in fattorie dotate di moderni mezzi di produzione, contiene una carica batterica estremamente bassa (<100 UFC/g) nei primi giorni, ma questa può aumentare fino a 10^7 - 10^8 UFC/g in periodi successivi, ad una velocità che è direttamente proporzionale alla temperatura. Quando i microrganismi

anticaseari costituiscono la microflora dominante del formaggio durante la sua stagionatura, essi producono molecole che contribuiscono a peggiorare gli attributi sensoriali del prodotto.

Il basso valore di pH, l'elevato contenuto in sale che abbassa l'umidità, dell'ambiente anaerobico e l'insufficienza di carboidrati disponibili alla fermentazione sono aspetti, tipici della stagionatura, che rappresentano un elemento ostativo allo sviluppo di anticaseari nel formaggio garantendone la salubrità.

A questi fattori possono aggiungersi quelli direttamente introdotti durante la produzione, ovvero l'aggiunta di batteri fermentanti, di enzimi esogeni o di ogni altro prodotto che contribuisca alla maturazione del formaggio ma che non sia contenuto nel latte di partenza.

I processi biochimici che svolgono un ruolo primario nella maturazione sono: la proteolisi, la glicolisi e la lipolisi. Il decorso di questi, unitamente ai fattori sopraelencati, conferiscono al formaggio attributi sensoriali e strutturali differenti a seconda delle loro espressioni.

3.3 La produzione lattiero casearia in Italia

In Italia i prodotti lattiero-caseari non solo rivestono una parte considerevole dell'alimentazione, ma costituiscono una produzione tradizionale di rilevante importanza economica, culturale e ambientale; tanto che la produzione casearia Italiana è una delle prime al mondo sia per il numero di formaggi prodotti che per le peculiarità e le qualità di molte produzioni. Dalla produzione formaggiera italiana è derivata la rilevante produzione degli "Italian type cheeses" che, nonostante somiglino poco ai prodotti originari, costituiscono un fattore di concorrenza e confusione per il consumatore estero.

In genere, i formaggi italiani hanno ben precise individualità che si tende a riconoscere con l'estensione ad un sempre maggior numero di formaggi della Denominazione d'Origine. Questo riconoscimento presuppone la definizione e il rispetto di precise regole di produzione e di composizione, anche se ancora sono allo

studio parametri chemiometrici che permettano di distinguere in modo attendibile le produzioni tipiche dai prodotti simili o di imitazione.

I formaggi DOP rappresentano la seconda categoria, dopo i vegetali, nell'ambito della gamma dei prodotti tipici italiani con ben 31 varietà. Sono definiti dagli esperti come "attivatori economici territoriali" in quanto rappresentano il 60% delle vendite totali dei prodotti tipici. I formaggi DOP hanno un ruolo di primo piano nell'influenzare l'andamento della bilancia economica del settore lattiero caseario e - in generale - di quello alimentare italiano. Da anni l'Italia si conferma al primo posto nella classifica mondiale dei paesi produttori di formaggi a denominazione d'origine con una totale di 450 mila tonnellate prodotte nel 2006. In generale l'intero settore lattiero caseario si riconferma uno dei settori trainanti dell'intera produzione italiana.

La produzione appare sempre più concentrata (**Grafico 3-1**): Grana Padano e Parmigiano Reggiano da soli rappresentano più del 60% della produzione casearia DOP italiana. La terza produzione nazionale è rappresentata dal Gorgonzola che, nel giro di un decennio, ha vissuto una significativa dinamica espansiva arrivando ad una produzione annua di circa 46.000 tonnellate. Seguono poi il Pecorino Romano, la Mozzarella Bufala Campana, l'Asiago e il Provolone Valpadana che, se aggiunti ai primi tre, raggiungono più del 90% della produzione complessiva.

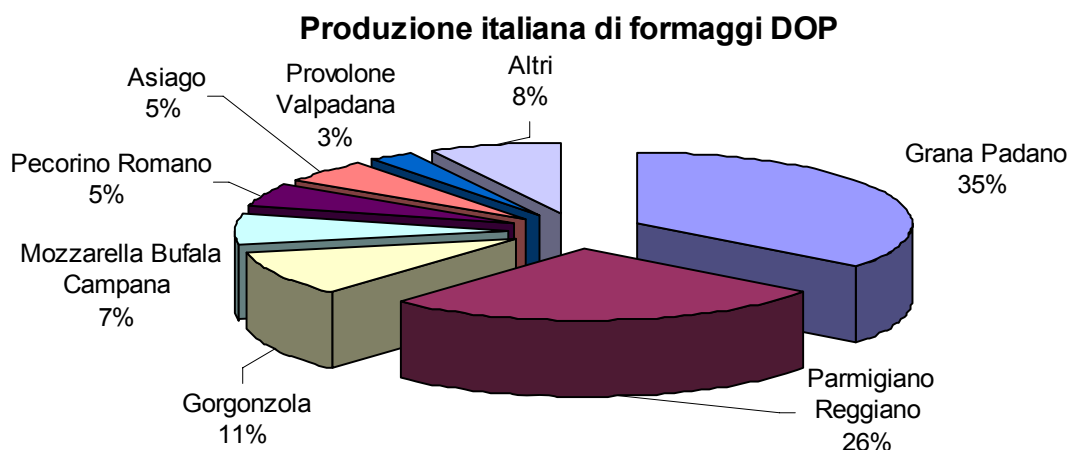


Grafico 3-1: Ripartizione della produzione italiana di formaggi a Denominazione d'Origine Protetta. [Fonte: Assolatte].

Il 18% dell'intera produzione è destinato invece, alla trasformazione di formaggi ovini e caprini. Fra questi il più rappresentato è il Pecorino Romano, formaggio a

denominazione d'origine prodotto in Sardegna e nel Lazio, mentre ai formaggi caprini spetta solo l'1,5% dell'intera produzione nazionale.

Anche se i volumi di questi ultimi, così come quelli dei formaggi ovini e di altre 20 DOP italiane, possono sembrare di poco conto rispetto a quelli del Grana Padano e del Parmigiano Reggiano, essi comunque contribuiscono a rappresentare e a diversificare la grande offerta della produzione casearia italiana.

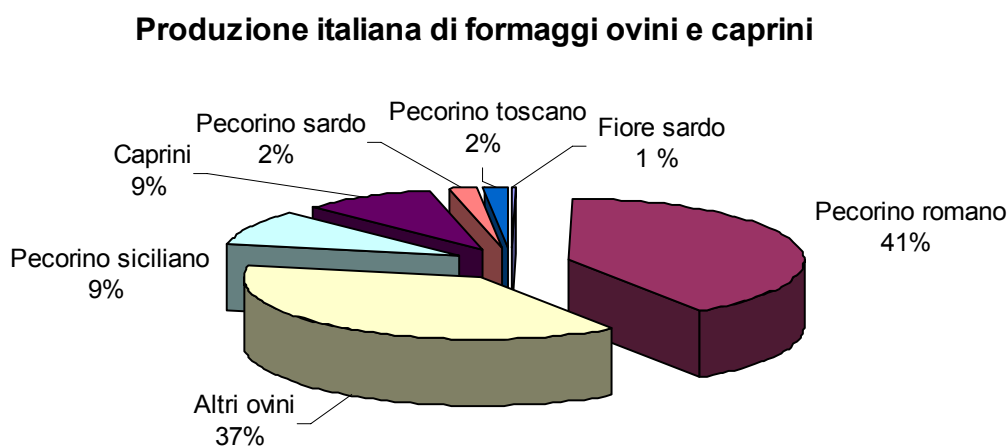


Grafico 3-2: Ripartizione della produzione Italiana di formaggi ovini e caprini

3.3.1 La produzione lattiero casearia in Sardegna

L'attività zootecnica ed i prodotti da essa derivati hanno da sempre caratterizzato la storia della Sardegna: la stessa cucina sarda si fonda su tre importanti componenti delle industrie agrarie, ed in particolare sui latticini che - assieme al pane - sono alla base dell'alimentazione della popolazione rurale. L'allevamento della pecora, soprattutto finalizzato alla produzione di latte, per secoli fu l'unica fonte di sostentamento degli isolani, così da rappresentare un'attività molto antica e diffusa che ancora oggi costituisce un'importante fonte di guadagno economico rappresentando il 20% della produzione lorda vendibile.

Usualmente, il latte di pecora prodotto è sempre stato quasi completamente destinato alla fabbricazione del formaggio. Per tradizione, infatti, il fabbisogno regionale di latte alimentare veniva soddisfatto dagli allevamenti bovini e caprini; così che il latte ovino potesse essere destinato alla più conveniente caseificazione.

Il nucleo della produzione lattiero casearia era la capanna del pastore: "Sa Pinnetta", una costruzione di struttura circolare di pietre a secco con un tetto conico realizzato

da frasche. Al suo interno si trovava il focolare, alimentato a legna, sul quale era posto un recipiente rustico dove il latte appena munto veniva versato insieme al caglio. Il formaggio prodotto veniva stagionato su un canneto, solitamente sospeso sopra il focolare nella parte superiore della Pinnetta.

Accumulatane una determinata quantità, il pastore provvedeva alla vendita lasciando per sé solo il prodotto necessario per il proprio consumo. Esso, assieme ai formaggi freschi e alla ricotta, era la base della sua alimentazione.

Ad essere allora prodotto era un formaggio assimilabile al “Fiore Sardo”, formaggio ovino ottenuto dalla coagulazione presamica con caglio in pasta d’agnello o capretto. Ancora oggi questo formaggio viene prodotto seguendo queste antiche tradizioni e rappresenta il fiore all’occhiello tra i formaggi DOP sardi.

Per secoli la trasformazione del latte in formaggi è rimasto un processo assolutamente circoscritto alla singola unità pastorale, fino a quando, alla fine del 1800, nell’isola si insediarono i primi stabilimenti industriali. Dal quel momento in poi, la fabbricazione del formaggio ha assunto un carattere sempre più industriale, con la non trascurabile copresenza, in alcune zone, di piccole realtà artigianali. I vantaggi che ne sono derivanti hanno riguardato sia l’atto trasformativo vero e proprio, che si è potuto evolvere positivamente sul fronte dell’efficienza tecnica ed economica che la diversificazione della gamma tipologica delle produzioni. L’industrializzazione dell’attività casearia è stata altresì occasione di grande progresso civile e sociale per il ceto pastorale che, trasferendo all’esterno la caseificazione, ha potuto migliorare notevolmente le proprie condizioni di vita e di lavoro ed ha, nel contempo, potuto intensificare le relazioni con l’ambiente circostante.

Oggi vengono prodotte in Sardegna circa 560 mila tonnellate annue di latte, delle quali il 62% di origine ovina, che viene interamente destinato alla trasformazione. Il restante 36% è costituito da latte vaccino e poco più dell’1% da latte caprino. Sebbene quest’ultimo possa sembrare una quantità irrilevante rispetto agli altri volumi, rappresenta comunque il 50% dell’intera produzione nazionale. [Fonte: ISTAT]

Le 63 mila tonnellate di formaggio prodotto ogni anno in Sardegna sono ripartite in circa 15 varietà di prodotti delle quali il 50% è dato dai formaggi DOP.

3.3.2 I formaggi DOP prodotti in Sardegna

In Sardegna i formaggi che hanno ottenuto la DOP sono: il Pecorino Romano, il Pecorino Sardo ed il Fiore Sardo.

Queste produzioni sono caratterizzate dalla coesistenza di caseifici di medie dimensioni, che producono principalmente Pecorino Romano e Pecorino Sardo, con strutture via via più piccole fino ad arrivare ai piccoli caseifici aziendali, ove il pastore-casaro produce soprattutto Fiore Sardo. Le tre denominazioni, pur insistendo sullo stesso territorio ed utilizzando una materia prima prodotta con gli stessi sistemi di allevamento e spesso dalle stesse aziende, vantano storie ben diverse per quel che riguarda l'evoluzione del disciplinare e il controllo delle produzioni.

Formaggio di antichissima tradizione, il Pecorino Romano ha nell'omonimo Agro la sua area di origine. Le notizie di formaggi pecorini prodotti con sistemi di caseificazione analoghi a quello del Pecorino Romano sono antiche di millenni. Studiosi come Varrone, Ippocrate e Plinio il Vecchio parlano dettagliatamente nei loro libri delle antiche tecniche di caseificazione ed il confronto con le moderne non evidenzia modifiche sostanziali. Fortunatamente questa tradizione antichissima si è infatti tramandata fino al secolo scorso, momento in cui il baricentro produttivo si è spostato dal Lazio alla Sardegna, regione che costituisce ora il principale produttore di Pecorino Romano con oltre il 90% della produzione. Attualmente il Pecorino Romano rappresenta uno dei principali formaggi DOP italiani e *leader* indiscusso fra i formaggi pecorini. Caratteristica peculiare di questa DOP è, inoltre, la sua rilevante presenza sui mercati esteri, in particolare negli Stati Uniti, Paese che oggi ne importa circa il 70% della produzione complessiva.

Il Pecorino Romano è uno dei primi prodotti tipici italiani ad aver ottenuto riconoscimenti nazionali e internazionali. Già nel 1951, in occasione della Convenzione di Stresa, è stato riconosciuto internazionalmente come denominazione di origine tutelata. Nel 1996, in conformità alla normativa comunitaria, il Pecorino Romano entra a pieno titolo fra i prodotti DOP. Infine, nel giugno del 1997, al Pecorino Romano viene riconosciuto dall'United States Patent and Trademark Office il marchio "Roman cheese made from sheep's milk", che consente al formaggio italiano di porsi parzialmente al riparo da eventuali speculazioni commerciali in territorio statunitense.

L'importanza economica del formaggio Pecorino Romano può essere compresa a fondo se valutata in rapporto a quella degli altri formaggi pecorini italiani (Fiore Sardo, Pecorino Sardo, Pecorino Siciliano, Pecorino Toscano). Complessivamente tale comparto rappresenta circa 18% del mercato di formaggi DOP italiani, ma il solo Pecorino Romano raggiunge in tale ambito una quota del 92%. Inoltre nel contesto italiano spetta a questa DOP il ruolo leader in relazione al significativo peso che essa riveste nella bilancia commerciale, in quanto alimenta un forte flusso verso l'estero. Spetta, infatti, al Pecorino Romano il 30% della quota di esportazione di formaggi DOP, contro il 28% del Grana Padano, il 18% del Gorgonzola e il 12% del Parmigiano Reggiano (dati forniti dal Consorzio per la Tutela del Formaggio Pecorino Romano).

Il Pecorino Romano ha avuto sin dagli anni settanta un Consorzio per la tutela particolarmente attivo che ha ben operato sia nel proporre ed ottenere modifiche del disciplinare che tenessero conto della naturale evoluzione del prodotto, sia nell'effettuare la vigilanza sulla produzione. Questa viene effettuata in caseifici moderni, con impianti tecnologicamente all'avanguardia che garantiscono elevati standard igienico-sanitari ma in cui il processo di trasformazione segue i metodi tradizionali riportati nel disciplinare di produzione. Accanto alle industrie di produzione operano altre imprese con funzioni di stagionatura e confezionamento e porzionatura. Complessivamente a tale fase della filiera corrisponde un bacino occupazionale di circa 40 mila addetti. A monte la filiera si dilata. Si stima che circa 24 mila imprese agricole e circa 50 mila addetti supportino la produzione di Pecorino Romano (fonte Nomisma).

Il Pecorino Sardo è prodotto in impianti prevalentemente di tipo industriale, di piccole o medie dimensioni, secondo un disciplinare che, per quanto pubblicato nel 1992, riconduce alla tradizionale tecnologia del pecorino "semicotto", formaggio di origine artigianale ampiamente prodotto in Sardegna. Il latte proviene dagli stessi allevamenti che producono la materia prima per il Pecorino Romano, tanto che nei caseifici non viene praticata una separazione del latte per i due tipi di formaggio ma solitamente avviene uno stoccaggio unico dal quale il latte viene prelevato per essere avviato alle diverse linee di lavorazione. Questo implica che il prezzo del latte ovino, poiché i disciplinari non fissano specifiche particolari per la qualità del latte in relazione al tipo di formaggio da produrre, è indipendente dal tipo di produzione a cui

il latte è destinato, e viene, di fatto, governato dal mercato del Pecorino Romano che assorbe circa il 50% della materia prima.

Il Fiore Sardo infine continua ad essere il formaggio tradizionalmente prodotto dal pastore presso l'ovile secondo le più antiche tecniche di produzione. Questo se da un lato ha fatto sì che la sua tecnologia di produzione, tramandata di padre in figlio, garantisca un rispetto assoluto del disciplinare, dall'altro ha obbligato dall'altro ad un adeguamento delle strutture aziendali ai requisiti delle attuali norme igienico sanitarie, con un complessivo positivo effetto sul prodotto.

Attualmente si assiste ad un aumento del numero di aziende di produzione e dei quantitativi di formaggio Fiore Sardo, in quanto il processo di adeguamento delle strutture produttive ai requisiti di legge non è ancora completato. Infatti le aziende attualmente autorizzate alla sola produzione di latte, man mano che ottengono le necessarie autorizzazioni sanitarie attestanti l'adeguatezza degli impianti di trasformazione, chiedono di essere incluse nel sistema dei controlli della DOP.

La produzione del Fiore Sardo avviene anche in stabilimenti industriali ma si deve rilevare che, dal momento che il disciplinare di produzione prevede di utilizzare esclusivamente latte crudo, la materia prima destinata alla trasformazione deve avere livelli di carica microbica contenuti e essere lavorata entro breve tempo dalla mungitura, con immediate conseguenze sulla dimensione del bacino di raccolta. Il latte destinato alla produzione di Fiore Sardo viene quindi raccolto e stoccato separatamente dagli altri tipi di latte, ma al momento non risulta esistere alcun accordo ufficiale che fissi un prezzo differenziato per il latte destinato a questa produzione.

4 I trattamenti termici

Il latte è una soluzione neutra, fortemente tamponata, ricca in sostanze nutritive dei quattro gruppi: glucidi, lipidi, protidi e sali, che contiene dei fattori di crescita come le vitamine, specialmente quelle del gruppo B. Se questo permette di soddisfare le esigenze nutritive dei mammiferi al momento della loro crescita, costituisce anche un buon mezzo di coltura per diversi microrganismi. Sebbene infatti l'evoluzione abbia cercato di preservare questa materia prima, attraverso delle caratteristiche che ostacolano lo sviluppo di alcuni organismi (**Tabella 4-1**), e il passaggio diretto del latte dalla mammella alla bocca del piccolo durante l'allattamento evita il più possibile ogni contaminazione esterna; le fasi di mungitura, conservazione e trasformazione, che permettono all'uomo di usufruire di questa materia prima, possono risultare un fattore di rischio per lo sviluppo di alcuni tipi di microrganismi.

<i>Caratteristiche del latte</i>	<i>Forme di difesa</i>
Fonte glucidica costituita principalmente dal lattosio	È uno zucchero molto meno metabolizzato del glucosio dai batteri e dai lieviti.
Bassa quantità di amminoacidi liberi e peptidi	Fattore limitante per numerose specie batteriche
Presenza di sostanze antibatteriche	Proteggono il latte dall'invasione di alcuni microbi

Tabella 4-1: Principali caratteristiche del latte ostative allo sviluppo di alcuni microrganismi [Alais, 1984]

La proliferazione di microrganismi indesiderati ha come conseguenza la perdita delle caratteristiche sensoriali e tecnologiche del latte o la perdita delle caratteristiche igieniche indispensabili per tutti i prodotti alimentari. Per ovviare a questi rischi il latte può essere sottoposto a trattamenti di bonifica termica o alla riduzione del contenuto di acqua.

La temperatura necessaria per la distruzione dei microrganismi varia in funzione della loro natura e della loro quantità, per questo sono stati individuati dei trattamenti termici differenti a seconda della finalità (**Tabella 4-2**).

Trattamento	Obiettivo	Tempo/temperatura
Termizzazione	Distruzione degli <i>psicotrofi</i>	15–20 s; 63–65 °C
Pastorizzazione	Distruzione del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15–30 s; 75–85 °C
Pastorizzazione di alta qualità	Distruzione del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15–30 s; 72–75 °C
Sterilizzazione	Distruzione di enzimi e agenti patogeni (incluse le spore)	20 min; 100–120 °C
Sterilizzazione UHT	Distruzione di enzimi e agenti patogeni (incluse le spore)	2–3 s; 135–150 °C

Tabella 4-2: Obiettivo dei maggiori trattamenti termici applicati nell'industria lattiero-casearia [Raynal-Ljutovac et al., 2007]

Scopo della termizzazione è quello di ridurre la flora anticasearia presente, al fine di evitare i difetti dei formaggi causati dai microrganismi mesofili non desiderati (flora anticasearia), senza alterare eccessivamente le proprietà casearie del latte. L'obiettivo della pastorizzazione è, invece, quello di garantire l'abbattimento di tutti i germi patogeni assicurando la salubrità del latte e migliorandone la conservabilità a bassa temperatura. Con la sterilizzazione del latte liquido si ottiene l'abbattimento totale della flora microbica al fine di prolungare la conservabilità del latte anche a temperatura ambiente.

Gli effetti del calore sulla microflora presente non dipendono solo dalla temperatura raggiunta durante i trattamenti termici, ma anche dai tempi cui il latte sosta alle diverse temperature. L'effetto inibitore sui microrganismi dipende, infatti, dalla quantità di calore fornita al latte.

Malgrado il latte venga considerato un alimento relativamente stabile al calore, questi trattamenti termici comportano comunque delle modifiche sui suoi componenti, perturbandone gli equilibri e provocando dei cambiamenti sulle caratteristiche nutrizionali e sensoriali del latte a discapito delle proprietà qualitative del prodotto finale. Per questa ragione, risulta necessario non eccedere rispetto ai parametri minimi individuati per l'abbattimento dei microrganismi, così da ottenere l'effetto desiderato senza alterare eccessivamente le caratteristiche del latte.

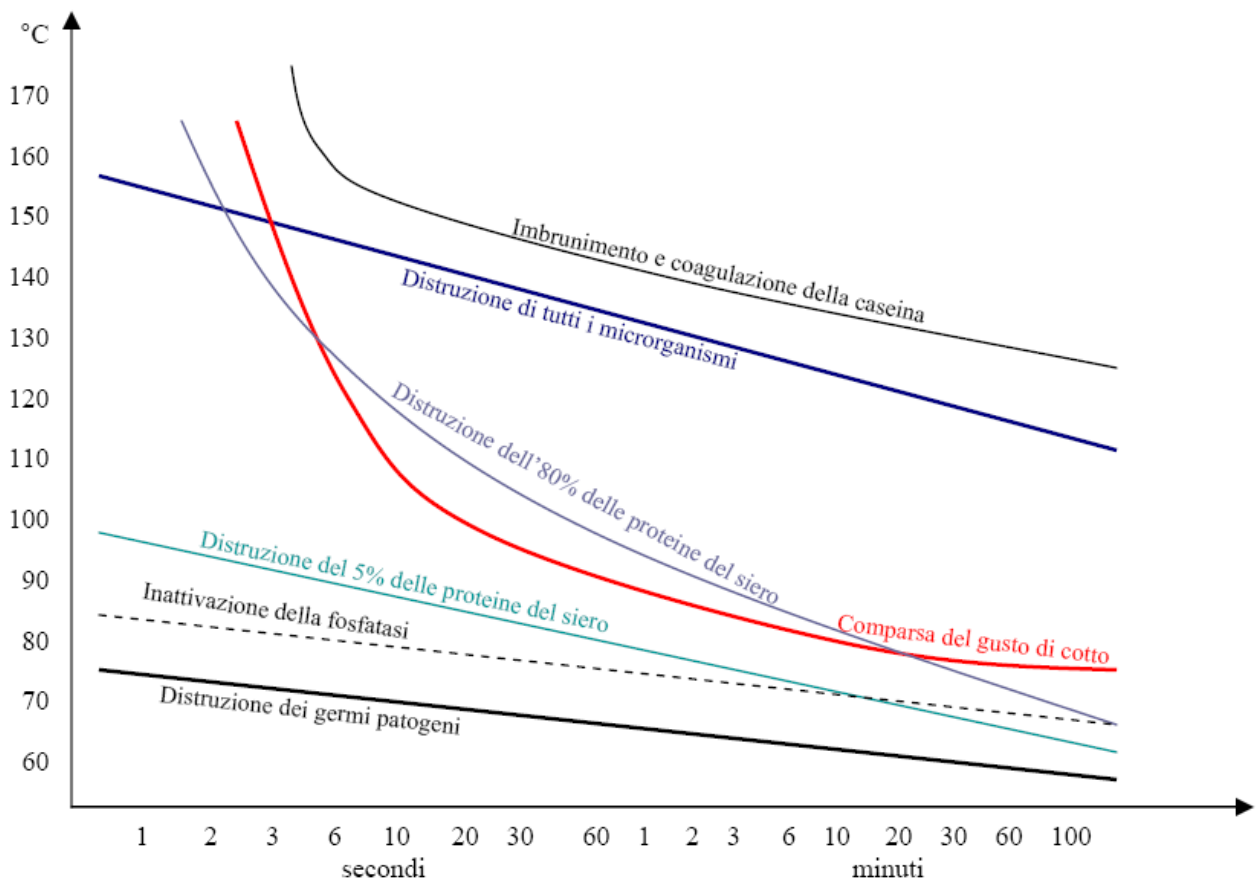


Figura 4-1: Diagrammi tempo/temperatura dei fenomeni di denaturazione di alcuni componenti del latte e della distruzione dei microrganismi [Corradini, 1995].

Tale necessità è favorita oggi dalla possibilità di portare il latte a temperature piuttosto alte per tempi sufficientemente brevi grazie a moderni apparati che permettono di ottenere trattamenti a flusso continuo. Vengono utilizzati per questo gli scambiatori di calore, a piastre o tubolari, in cui gli scambi termici avvengono attraverso una sottile parete metallica che separa i due fluidi (caldo e freddo) circolanti in senso opposto. Attraverso questi apparecchi è possibile portare il latte a temperature elevate anche solo per pochi secondi. Così, nel caso della pastorizzazione HTST (High Temperature Short Time) e della sterilizzazione UHT (Ultra High Temperature), è possibile operare a temperature più alte delle tradizionali, ma per tempi più brevi, in modo che si possano ottenere gli effetti desiderati sui microrganismi ma con un ridotto decadimento qualitativo del prodotto. Questo sistema sfrutta infatti la diversa influenza che l'incremento delle temperature ha sulla velocità delle reazioni di distruzione delle spore rispetto a quello sulle trasformazioni chimiche.

Tali strumentazioni però rimangono una prerogativa delle produzioni di tipo industriale, in quanto costose e inadatte alla lavorazione di piccole quantità di latte. Anche nel caso delle produzioni artigianali è però possibile effettuare trattamenti di bonifica termica. A causa dei brevi tempi di lavorazione del latte, questi trattamenti sono volti unicamente all'abbattimento della flora anticasearia e non vanno oltre la termizzazione. In genere questa pratica avviene in una caldaia a doppio fondo, dove tutto il latte viene portato alla temperatura desiderata (attorno ai 65°C) e poi raffreddato alla temperatura di coagulazione. In questo processo risulta difficile non eccedere nella quantità di calore fornita, in quanto il tempo necessario affinché l'intera massa di latte raggiunga la temperatura stabilita è sicuramente maggiore a quello fornito dai sistemi a flusso continuo.

4.1 Modifiche indotte dai trattamenti termici

Il latte è un liquido uniforme costituito da diversi elementi strutturali in equilibrio tra loro, che stabiliscono con la fase disperdente (l'acqua) rapporti di emulsione, dispersione, soluzione colloidale o soluzione vera. Ogni forma di riscaldamento turba l'equilibrio chimico-fisico esistente nel latte e l'entità del cambiamento dipende, soprattutto, dalla severità del trattamento subito. Questi trattamenti, oltre che modificare la struttura dei componenti del latte, ne favoriscono le loro interazioni (**Tabella 4-3**).

<i>Sostanze modificate</i>	<i>Modificazioni possibili</i>	<i>Principali conseguenze</i>
Lattosio	Decomposizione con formazione di acidi organici	Influenza sulla crescita dei batteri lattici Abbassamento del pH
Lattosio + proteine	Reazione tra gruppi aldeidici ed amminici; prodotti di condensazione colorati (Reazione di Maillard)	Diminuzione del valore nutritivo delle proteine Formazione di composti riducenti Imbrunimento
Sieroproteine (Principalmente β -lattoglobulina)	Comparsa di gruppi SH attivi e di composti solforati liberi. Denaturazione	"Gusto di cotto" Sistema riducente Flocculazione
Sieroproteine e caseina	Formazione d'ammoniaca. Formazione di complessi caseina k + β -lattoglobulina (*)	Influenza sul gusto Formazione di "pelle" del latte
Caseina	Degradazione della molecola (defosforilazione, rottura del legame peptidico) e modificazione dello stato micellare.	Flocculazione delle sospensioni di caseina ad alta temperatura
Sostanze minerali	Spostamento dell'equilibrio Ca/P solubile Ca/P insolubile	Insolubilizzazione dei sali di calcio Influenza sulla stabilità delle micelle
Grasso	Idrolisi, formazione di lattoni	Liberazione di acidi grassi Sapore sgradevole
Vitamine	Distruzione: soprattutto B ₁ , C e B ₁₂	Diminuzione del valore nutritivo
Enzimi	Inattivazione a temperature abbastanza basse	Arresto delle attività enzimatiche
Gas	Perdita di CO ₂	Leggero innalzamento del pH

(*) Degradazione delle catene laterali, formazione di legami isopeptidici.

Tabella 4-3: Effetti del riscaldamento sui costituenti del latte [Alais, 1984]

La conseguenza di queste modifiche è l'alterazione di alcune delle proprietà strutturali (modifica delle micelle caseiniche), nutrizionali (distruzione delle vitamine e di alcuni amminoacidi essenziali) e sensoriali (deterioramento dei globuli di grasso,

inattivazione degli enzimi e della flora endogena) del latte e dei suoi prodotti proporzionalmente alla severità del trattamento.

4.1.1 Modifiche a carico del lattosio

Il lattosio è un disaccaride riducente, costituito da galattosio e glucosio uniti da un legame (1-4)- β -glicosilico, che, così come gli altri zuccheri, se sottoposto al calore subisce numerosi cambiamenti, come la mutarotazione, isomerizzazione, o la formazione di numerosi composti volatili. In ambiente acido il lattosio è degradato a monosaccaride per effetto del trattamento termico, mentre in condizioni basiche subisce il riarrangiamento di Lobrey de Bruyn-Alberda van Ekenstein (LA) che lo converte da aldoso in chetoso.

Uno dei prodotti del riarrangiamento di LA provoca la formazione del lattulosio, uno degli epimeri del lattosio in cui il glucosio viene isomerizzato a fruttosio. Questo è assente nel latte crudo, in quello pastorizzato e nel latte HTST (high temperature short time) in quanto nei primi due casi la temperatura non è sufficiente affinché avvenga la sua formazione, e nell'ultimo caso, nonostante si operi ad alte temperature, il tempo di trattamento è talmente breve che non permette la sua formazione. Risulta invece essere presente sia nel latte sterilizzato in caldaia che in quello UHT (Ultra-high temperature), in cui le alte temperature e il lungo tempo di trattamento ne provocano la sua formazione. [O'Brien J., 1995]

Se il latte viene portato a temperature prossime ai 100°C si ottiene la degradazione del lattosio ad acidi organici. Fra questi il più rappresentato è l'acido formico, mentre solo il 5% del lattosio è convertito in acido lattico. L'aumento dell'acidità titolabile che si ottiene a seguito di queste trasformazioni influisce pesantemente sulla stabilità termica del latte. Infatti se questo viene sottoposto alla temperatura di 130°C per circa 20 minuti, il suo pH si porta a valori intorno a 5,8 e si osserva coagulazione. Questa è dovuta in parte alla formazione di acidi organici a carico del lattosio e in parte alla precipitazione del fosfato di calcio e alla defosforilazione delle caseine. [Fox, 1998]

Il lattosio è uno zucchero riducente e può prendere parte alla reazione di Maillard, portando ad un imbrunimento non enzimatico del latte e conferendo a questo il sapore caratteristico del latte cotto. La reazione di Maillard avviene a causa

dell'attacco nucleofilo dell'azoto amminoacidico (generalmente quello della lisina) al gruppo carbonilico elettrofilico di un aldeide o chetone (in questo caso il lattosio).

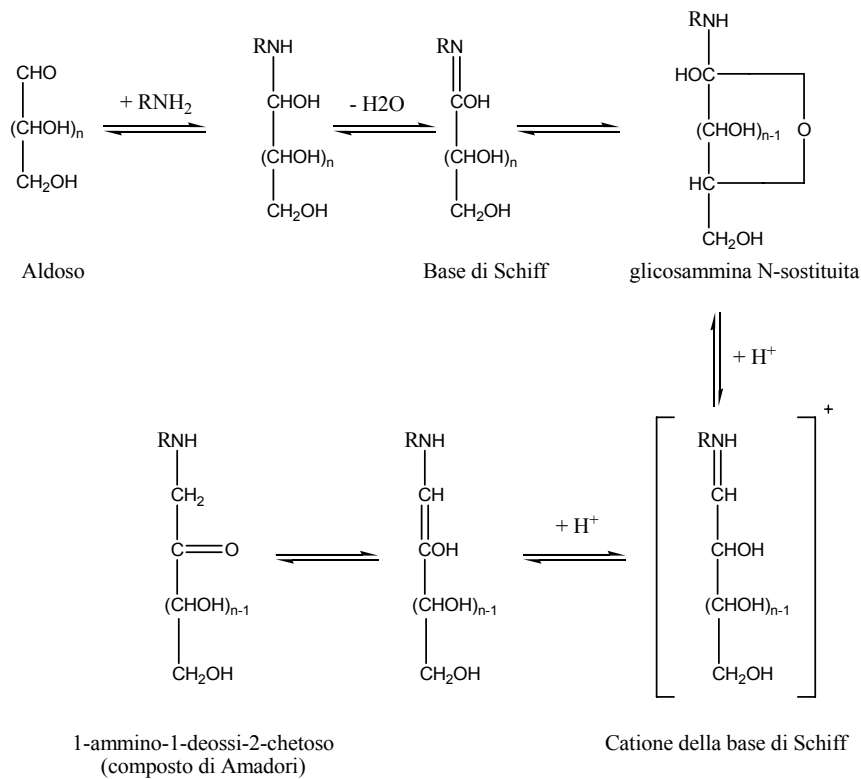


Figura 4-2: Step iniziali della reazione di Maillard, incluso il riarrangiamento di Amadori [Fil-IDF, 1995]

La reazione procede con l'eliminazione di una molecola d'acqua a formare una base di Schiff, che successivamente si riarrangia per formare la corrispondente glicosammina N-sostituita. Questo intermedio, estremamente instabile, reagisce attraverso il riarrangiamento di Amadori per formare il corrispondente amminodeossichetoso (composto di Amadori).

Dal punto di vista delle caratteristiche sensoriali, in questa fase non si ha la formazione di composti colorati o profumati. Tuttavia viene compromessa la disponibilità di aminoacidi essenziali quali la lisina.

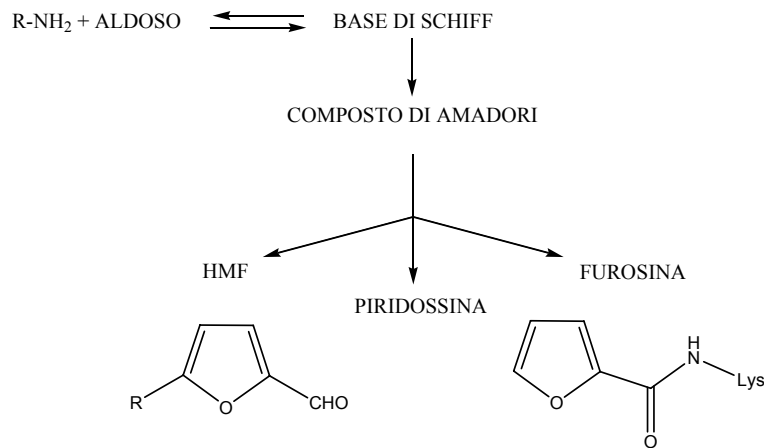


Figura 4-3: Rappresentazione schematica della reazione di Maillard e formazione della furosina.
 [Corradini, 1995]

I composti di Amadori possono decomporsi seguendo due strade: attraverso una reazione di disidratazione in ambiente acido o basico oppure per via di una scissione non idrolitica e termicamente indotta dei legami C-C o C-N. I prodotti che si formano, come ad esempio il 5-idrossimetil-2-furaldeide (HMF), la furosina o la piridosina, conferiscono al latte il tipico sapore di cotto. I composti ad alto peso molecolare noti come melanoidine, derivanti probabilmente dalla polimerizzazione dei prodotti carbonilici insaturi intermedi e l'HMF, conferiscono al latte un colore bruno, tipico dei prodotti tostati. Mentre la reazione di Maillard è ricercata in diversi alimenti come il pane, i toast ed il caffè, nel latte ha delle conseguenze negative, come l'alterazione delle caratteristiche sensoriali e una perdita del valore nutrizionale dovuta alla distruzione di aminoacidi essenziali e alla formazione di composti tossici. La temperatura ha un effetto estremamente importante sulla reazione di Maillard nel latte, in quanto la sua velocità aumenta di circa 40 mila volte se la temperatura del latte è incrementata da 0 ad 80°C. Per questo motivo, molto spesso i prodotti derivanti da questa reazione vengono utilizzati come indici dei trattamenti termici nel latte. [O'Brien J., 1995]

4.1.2 Modifiche a carico dei globuli di grasso

Il riscaldamento provoca cambiamenti nella struttura della membrana dei globuli di grasso con conseguenti interazioni con le proteine del siero e cessione di alcuni componenti lipidici. Questi cambiamenti non sono però provocati esclusivamente dal

calore, ma assumono una notevole importanza le sollecitazioni meccaniche che si verificano ad elevate temperature, quali ad esempio l'omogeneizzazione, con effetti più o meno marcati sulle proprietà dei globuli a seconda che lo stesso trattamento termico sia effettuato in modo diretto o indiretto. [Corradini, 1995]

Il grasso è presente nel latte sotto forma di globuli, protetti da una membrana che ne stabilizza la dispersione in fase acquosa. A causa delle differenti densità tra la fase grassa e quella acquosa i globuli affiorano, formando uno strato superficiale di grasso. Nel latte di alcune specie, ad esempio quello bovino, la velocità di affioramento è molto più elevata rispetto a quella predetta dalla legge di Stokes, in quanto l'aggregazione dei globuli è promossa da un gruppo di immunoglobuline che, interagendo tra loro, ne favoriscono l'agglutinamento. L'assenza di queste immunoglobuline nel latte ovino e caprino comporta una velocità di affioramento del grasso nettamente inferiore. [Walstra P., 1983]

Quando il latte viene scaldato a temperature intorno ai 70°C per circa 15 min, le immunoglobuline vengono irreversibilmente denaturate con la conseguente riduzione della velocità di affioramento del grasso [Fox, 1998]. Il riscaldamento intorno ai 70°C provoca anche la denaturazione delle proteine della membrana, con la conseguente esposizione e attivazione di vari residui amminoacidici, principalmente quelli cisteinici. Questo può causare il rilascio di acido solfidrico (H₂S), che altera le proprietà sensoriali del latte e promuove sia la formazione di legami S-S con le proteine del siero che l'interazione con il lattosio, dando origine ai prodotti della reazione di Maillard. [Walstra et al., 1983]

Gran parte del rame presente nel latte è associato alla membrana dei globuli di grasso. Se il latte viene sottoposto ad alte temperature, > 100°C, la membrana può rilasciare nella fase acquosa, oltre che i suoi principali costituenti quali proteine e fosfolipidi, anche gran parte del rame ad essa associato, con una conseguente riduzione delle proprietà ossidative del grasso. [Fox, 1998]

Infine trattamenti ancora più energici possono convertire gli idrossiacidi a lattoni, e provocare l'isomerizzazione dei doppi legami a carico degli acidi grassi.

4.1.3 Modifiche a carico delle proteine del siero

Le proteine del siero hanno una geometria globulare con un alto livello di struttura secondaria e terziaria, per questo risultano essere particolarmente suscettibili ai trattamenti termici. Questo fatto è spesso sfruttato nell'industria casearia per il recupero di alcune proteine, come per esempio la lattoalbumina, che coagula portando il siero a 90°C per 10 min a pH 6.

L'ordine di stabilità delle diverse proteine varia a seconda del sistema usato per studiarne la loro resistenza termica (**Tabella 4-4**).

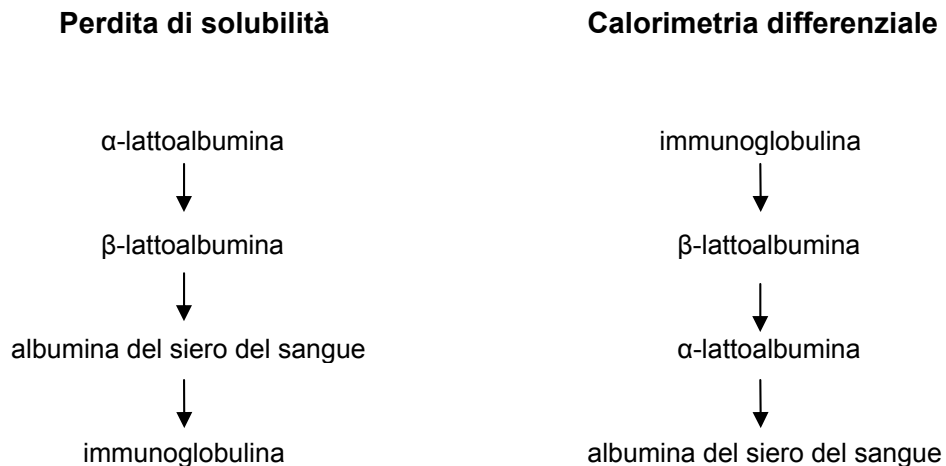


Tabella 4-4: Denaturazione delle proteine seriche del latte [Fox, 1998].

Questa differenza può essere spiegata, nel caso della α -lattoalbumina, dalla presenza di un legame con il Ca che ne provocherebbe la sua rinaturazione.[Fox, 1998]

Le temperature di inattivazione sono intorno ai 65-75°C per l' α -lattoalbumina e la β -lattoalbumina, mentre si aggirano intorno agli 80°C per le siero albumine e le immunoglobuline. [Jelen et al., 1995]

Alcune delle più importanti conseguenze della denaturazione termica delle proteine è l'esposizione dei gruppi tiolici dei residui cisteinici, che possono provocare i seguenti effetti:

- Formazione di legami S-S tra β -lattoglobulina e κ -caseina e tra α -lattoalbumina e α_{s2} -caseina, con profondi effetti sulla funzionalità del sistema proteico, come la coagulazione presamica.
- Formazione di acido solfidrico e di dimetilsolfossido responsabili del gusto di cotto nei prodotti trattamenti termicamente, ad esempio nel latte UHT. La volatilità del primo e l'instabilità del secondo determinano la loro sparizione dopo una settimana dal trattamento, per questo il latte UHT migliora le sue caratteristiche sensoriali durante le prime settimane dalla produzione.
- I gruppi serinici, siano essi fosfatati che glicosilati, e i residui cisteinici e cistinici possono subire una β -eliminazione con la formazione di deidroalanina. Un composto estremamente reattivo nei confronti di vari residui amminoacidici, specialmente la lisina, con la quale formano dei legami inter ed intra molecolari che riducono la solubilità, la digeribilità e il valore nutritivo delle proteine.

Il latte contiene inoltre una buona quantità di proteine biologicamente attive, quali vitamine, immunoglobuline, proteine antibatteriche e vari fattori di crescita come gli ormoni, che possiedono un'importante funzione nutrizionale e fisiologica nei neonati. Tutte queste proteine sono relativamente termolabili e vengono inattivate parzialmente durante trattamenti HTST e completamente durante i trattamenti UHT o trattamenti più severi.

4.1.4 Modifiche a carico delle caseine

Le caseine, a causa della ridottissima presenza di residui cisteinici nella loro sequenza amminoacidica, (**Tabella 4-5**) presentano una scarsa organizzazione in strutture secondarie e terziarie, tanto da essere definite "proteine naturalmente denaturate" [Alais, 1984]. Questo le rende particolarmente stabili nei confronti dei trattamenti termici tanto da poter essere sottoposte ad un trattamento di 140°C per 1 h senza subire visibili cambiamenti fisico-chimici. [Fox, 1998]

<i>Caseina</i>	<i>N° di residui cisteinici</i>
α_{s1}	0
α_{s2}	2
β	0
κ	2

Tabella 4-5: Residui cisteinici nelle sequenze amminoacidiche delle quattro principali caseine.

Le caseine presentano uno spiccato carattere idrofobico che le rende particolarmente sensibili ai cambiamenti di temperatura influenzandone la tendenza ad associarsi.

Ad esempio la β -caseina, che è quella che possiede il maggior carattere idrofobico, presenta una struttura monometrica tra 0 e 4°C, mentre forma aggregati di circa 40-50 monomeri a temperatura ambiente. Intorno ai 40°C, temperatura fisiologica, le caseine sono presenti nel latte sotto forma di micelle, mentre eventuali riduzioni di temperatura ne provocano la loro disgregazione. Questa tendenza è frutto di una sinergia con il fosfato di calcio colloidale, il cui equilibrio in soluzione risulta anch'esso fortemente influenzato dalla temperatura. Ad esempio, attorno ai 70°C la velocità di coagulazione si riduce notevolmente, non a causa della denaturazione delle caseine ma della ridotta concentrazione del fosfato di calcio colloidale che a quelle temperature precipita.

Poiché le interazioni tra le caseine sono di tipo elettrostatico, formate principalmente da legami idrogeno e di van der Waals, i cambiamenti causati dalle variazioni di temperatura tra 0 e 70°C presentano un carattere di reversibilità. [Singh, 1995]

A temperature superiori ai 70°C iniziano a verificarsi invece modifiche di tipo strutturali dal carattere irreversibile, per esempio tra i 110 e i 150°C si verifica la defosforilazione delle caseine e la loro proteolisi.

I trattamenti termici e/o l'esposizione in ambiente basico possono portare a sostanziali cambiamenti nella struttura covalente delle proteine, con modifiche a carico dei residui amminoacidici e la formazione di legami covalenti inter ed intra molecolari. Per esempio gli ϵ -ammino gruppi della lisina reagiscono, in presenza di zuccheri riducenti, per dar luogo ai prodotti della reazione di Maillard. [Singh, 1995]

Sebbene le caseine possiedano un basso numero di residui cisteinici (**Tabella 4-5**) questi possono comunque dar luogo a reazioni intramolecolari se sottoposti ad alte

temperature [Singh, 1995]. Tra queste interazioni assume particolare importanza quella tra la κ -caseina e la β -lattoglobulina, che avviene già a 65°C e presenta il massimo della formazione a 85°C, temperatura oltre la quale la formazione del complesso è inibita a causa della degradazione dei residui cisteinici.

L'interazione tra la κ -caseina e la β -lattoglobulina, se molto marcata, può avere degli effetti negativi sulla coagulazione presamica del latte. Secondo quanto riportato nel **Capitolo 3**, tale coagulazione avviene quando l'enzima presente nel caglio, idrolizzando la porzione idrofilica della κ -caseina, destabilizza le micelle caseiniche che, agglutinando tra loro, coagulano. La presenza della β -lattoglobulina impedisce all'enzima di attaccare la κ -caseina e quindi di avviare questo tipo di processo.

Il grado di interazione tra la κ -caseina e la β -lattoglobulina è influenzato dal tempo e dalla temperatura di riscaldamento, dal rapporto di concentrazione tra le due proteine e dalla presenza di sali. [Long, J. et al., 1963]

4.1.5 Modifiche a carico degli enzimi

Come riportato nel **Capitolo 2**, gli enzimi endogeni del latte sono circa 60, ai quali possono aggiungersi quelli prodotti dai microrganismi a seguito del loro sviluppo nel latte dopo la mungitura. Fra questi alcuni possono contribuire positivamente allo sviluppo delle caratteristiche sensoriali dei prodotti lattiero-caseari, soprattutto durante la stagionatura, mentre altri possono dar luogo a reazioni non desiderate che compromettono la stabilità e le caratteristiche del latte alimentare e dei suoi prodotti. I trattamenti termici spesso hanno come obiettivo anche quello di ridurre questo secondo tipo di corredo enzimatico. La lipasi lipoproteica, per esempio, è il principale responsabile dell'irracidimento idrolitico. Per prevenire la lipolisi di alcuni prodotti, vengono effettuati trattamenti termici, come la pastorizzazione.

L'inattivazione termica degli enzimi è spesso oggetto di studio in quanto la loro attività residua può essere utilizzata come indice dei trattamenti termici subiti dal latte prima o durante la caseificazione. L'attività della fosfatasi alcalina, per esempio, viene utilizzata come indice per la verifica dei trattamenti di pastorizzazione. [IDF. 1971] [ISO/DIS. 1992]

Possiamo raggruppare gli enzimi sulla base della loro resistenza ai trattamenti termici. Avremo così:

- 1) enzimi termoresistenti (denaturazione oltre i 90°C)

- fosfatasi Acida
 - ribonucleasi
 - lisozima
- 2) enzimi poco termoresistenti (denaturazione al di sopra dei 60°C per 30 min)
- fosfatasi alcalina
 - catalasi
 - perossidasi
 - proteasi
 - xantinossidasi
 - γ -glutamiltransferasi
- 3) enzimi termolabili (denaturazione al di sotto dei 60°C per 30 min)
- α -fucosidasi
 - α -amilasi
 - lipasi lipoproteica

Ogni enzima possiede un proprio range di inattivazione termica, che varia in funzione della specie, del pH, della presenza di attivatori o inibitori (**Figura 4-4**).

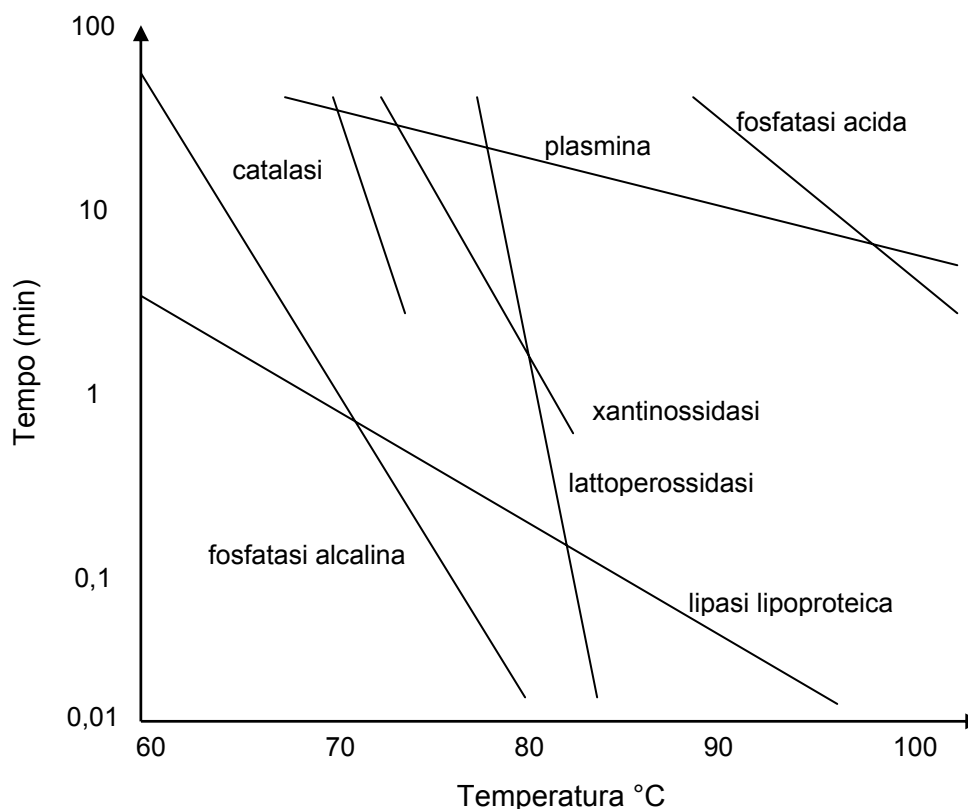
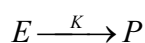


Figura 4-4: Combinazione tempo/temperatura necessaria per la denaturazione termica di alcuni enzimi endogeni del latte [Fox, 1998]

La denaturazione termica dipende dalla severità del trattamento. In assenza di fattori perturbanti, come ad esempio la proteolisi, la denaturazione termica degli enzimi segue una cinetica del primo ordine, secondo l'equazione:



Dove E è la concentrazione iniziale dell'enzima (attività enzimatica), P è l'attività dopo il trattamento termico e K è la costante della velocità di reazione. Pertanto la derivata della conversione dei reagenti nei prodotti è data dall'equazione:

$$-\frac{dE}{dt} = k[E] = \frac{dP}{dt}$$

Quindi a basse concentrazioni enzimatiche, la velocità di inattivazione è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima [Farkye et al., 1995] e sarà uguale a:

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = -kt$$

Dove $[E]$ è l'attività enzimatica al tempo t e $[E_0]$ è l'attività enzimatica al tempo t_0 [Marangoni, 2003].

Un parametro generalmente usato per caratterizzare la stabilità enzimatica è il valore di D , dove D è il tempo richiesto per procurare una riduzione di 10 volte dell'attività enzimatica a quella determinata temperatura, ovvero il tempo necessario per avere una riduzione dell'attività enzimatica pari a un \log_{10} . Esso è dato dal coefficiente angolare della retta ottenuta riportando in grafico il $\log[E]/[E_0]$ rispetto al tempo t .

$$\log \frac{[E]}{[E_0]} = -\frac{t}{D}$$

È relazionata, nelle reazioni che hanno una cinetica del primo ordine, alla velocità di reazione secondo l'equazione:

$$D = \frac{2,303}{k}$$

Il valore di D è un parametro utile nello studio dell'inattivazione termica in quanto rappresenta il tempo necessario per avere una riduzione del 90% dell'attività enzimatica a quella determinata temperatura. [Marangoni, 2003], [Farkye et al., 1995]

Alcuni enzimi inattivati termicamente, come ad esempio la fosfatasi alcalina, la catalasi e la perossidasi, possono andare incontro, durante la stagionatura, a dei processi di riattivazione. Il meccanismo non è ancora chiaro, ma si ritiene che, in questo caso, l'alterazione della struttura terziaria e secondaria durante i trattamenti termici non avvenga in maniera totalmente irreversibile, e pertanto questa si possa ricostituire nei periodi successivi alla sua denaturazione. Tale aspetto rappresenta un problema ove si voglia utilizzare questi enzimi come indici dei trattamenti termici, in quanto la loro riattivazione potrebbe fornire un falso positivo. [Farkye et al., 1995] [Lyster et al., 1962] [Murthy et al., 1976]

5 Indici dei trattamenti termici

I trattamenti termici rappresentano una delle più importanti cause di modificazione delle caratteristiche tecnologiche, sensoriali e nutrizionali. Se da un lato il trattamento termico permette di ottenere la sanificazione del latte o il prolungamento della sua shelf-life, dall'altro induce in esso delle reazioni indesiderate che possono peggiorare le caratteristiche sensoriali e nutrizionali del latte e dei suoi prodotti. L'identificazione di tali trattamenti attraverso degli indici analitici rappresenta, pertanto, un aspetto estremamente rilevante per esprimere la qualità dei prodotti lattiero-caseari. [Pellegrino et al., 1995]

Le norme legislative che definiscono le modalità dei trattamenti termici si preoccupano solo di garantire la salubrità di un latte attraverso i trattamenti di bonifica termica, individuando degli indici analitici che dimostrino il raggiungimento delle soglie minime per l'abbattimento della carica batterica. Tali norme non richiedono per contro di verificare che non si ecceda rispetto a tali soglie, evitando di alterare oltre misura le caratteristiche del latte.

Attualmente l'esigenza di tracciare i processi tecnologici all'interno dei sistemi di qualità pone l'esigenza di disporre di metodi analitici che vadano oltre la verifica delle soglie minime previste dalla legge per garantire la salubrità dei prodotti. Si presenta così la necessità di poter verificare esattamente le condizioni di tempo e temperatura alla quale è stato sottoposto un campione incognito, sia esso di latte o di un suo derivato. Inoltre, le nuove combinazioni di tempo/temperatura introdotte dall'industria lattiero-casearia rendono gli indici proposti nelle vecchie norme insufficienti a soddisfare queste nuove esigenze [Burton, 1988]. Pertanto la comunità scientifica, negli ultimi anni, ha moltiplicato i suoi sforzi per adattare i vecchi indici alle nuove esigenze o individuarne di nuovi [FIL-IDF, 1995]. In questo contesto la FIL-IDF lavora affinché le classi dei trattamenti termici vengano differenziate sulla base delle modifiche indotte da questi sul prodotto finale, piuttosto che fissare a priori le condizioni tecnologiche di processo (tempo e temperatura) e andare a cercare degli indici che le caratterizzino. Inoltre, la FIL-IDF propone che, per ogni tipo di

trattamento, vengano individuati almeno due indici analitici che possiedano energie di attivazione piuttosto differenti e dei quali siano note le cinetiche di inattivazione. Questo nuovo approccio permetterebbe di verificare, sul prodotto finale, la corrispondenza tra quanto riportato in etichetta e il trattamento termico realmente subito durante la sua lavorazione, offrendo gli strumenti necessari alla tutela dei consumatori e dei produttori [Pellegrino et al., 1995 b].

5.1 Quadro normativo Europeo

La direttiva comunitaria 92/46 CEE, recepita in Italia con il D.P.R. 54 del 1997 disciplina il “*regolamento in materia di produzione e immissione sul mercato di latte e di prodotti a base di latte*”. Questa fissa i requisiti sanitari che deve possedere un latte al momento della raccolta, e fornisce indicazioni in merito a seconda che questo venga destinato al consumo alimentare diretto o alla sua trasformazione e a seconda che lungo la linea di produzione sia previsto (oppure no...) un trattamento termico. La direttiva classifica pertanto le diverse tipologie di trattamento termico definendo quanto segue:

1. *«latte crudo»: il latte prodotto mediante secrezione della ghiandola mammaria di una o più vacche, pecore, capre o bufale non sottoposto ad una temperatura superiore a 40°C né ad un trattamento avente un effetto equivalente;*
2. *«termizzazione»: riscaldamento del latte crudo per almeno 15 secondi a una temperatura compresa tra 57°C e 68°C di modo che dopo tale trattamento il latte presenti una reazione positiva al test della fosfatasi;*
3. *«trattamento termico»: ogni trattamento mediante calore avente come effetto, immediatamente dopo la sua applicazione, una reazione negativa al test della fosfatasi;*
4. *«latte alimentare trattato termicamente»:*
 - a. *Il latte pastorizzato:*
 - i. *ottenuto mediante un trattamento che comporti un'elevata temperatura per un breve periodo di tempo (almeno 71,7 °C per 15 secondi o qualsiasi altra combinazione equivalente) o*

mediante un trattamento di pastorizzazione che impieghi diverse combinazioni di tempo e temperatura raggiungendo un effetto equivalente;

- ii. deve presentare una reazione negativa alla prova di fosfatasi e positiva alla prova di perossidasi. È tuttavia autorizzata la produzione di latte pastorizzato che presenta una reazione negativa alla prova di perossidasi, a condizione che sul latte figuri un'indicazione del tipo: «pastorizzazione alta»;

b. Il latte UHT:

- i. - ottenuto mediante applicazione al latte crudo di un procedimento di riscaldamento a flusso continuo che richieda l'impiego di una temperatura elevata per un breve periodo di tempo (almeno + 135°C per almeno un secondo) allo scopo di inattivare tutti i microrganismi residui o le loro spore, e l'impiego di recipienti opachi o resi tali dall'imballaggio e asettici per il confezionamento, in modo tale che le variazioni chimiche, fisiche e organolettiche siano ridotte al minimo;

Secondo quanto espresso sopra, la direttiva considera trattamenti termici solo quelli superiori o uguali alla pastorizzazione, e ne fissa il relativo parametro di controllo (reazione della fosfatasi alcalina). Non fissa invece un parametro di controllo che possa distinguere il latte crudo da quello termizzato (**Tabella 5-1**).

<i>Tipo di trattamento</i>	<i>Temperatura/tempo</i>	<i>PARAMETRO DI CONTROLLO</i>	
		<i>reazione della fosfatasi alcalina</i>	<i>reazione della perossidasi</i>
UHT	135°C/1 s	saggio negativo	Non definito
Pastorizzazione alta		saggio negativo	saggio negativo
Pastorizzazione	71,7°C/15 s	saggio negativo	saggio positivo
Termizzazione	57-68°C/15 s	saggio positivo	Non definito
Crudo	< 40°C	saggio positivo	Non definito

Tabella 5-1: Tabella riassuntiva della direttiva 92/46 CEE in materia di trattamenti termici

Poiché la legge ha l'obiettivo di garantire la sicurezza igienico-sanitaria di un prodotto, individua degli indici che attestino l'avvenuto trattamento di bonifica termica (pastorizzazione). Tali indici però non sono utilizzabili per verificare che il trattamento termico non sia stato eseguito, e quindi inadeguati a garantire che un latte crudo sia realmente tale piuttosto che sottoposto ad un trattamento di temizzazione.

L'attività della fosfatasi alcalina e della perossidasi vengono utilizzati anche a livello internazionale come indicatori della pastorizzazione e alta pastorizzazione [IDF, 1971] [ISO/DIS, 1992]. Studi successivi hanno dimostrato però che, a seconda del trattamento termico subito, l'inattivazione di questi enzimi è reversibile fornendo, in caso di controllo, un falso positivo [Lyster et al., 1962] [Murthy et al., 1976]. L'attività enzimatica delle fosfatasi alcalina nel latte ovino e la sua inattivazione a seguito dei trattamenti di temizzazione e pastorizzazione è stata studiata da Scintu [2001], l'alta attività enzimatica in questa matrice rispetto al latte vaccino e la sua variabilità in funzione dello stadio di lattazione, rendono difficile la determinazione di valori limite atti a discriminare le diverse tipologie di latte. La perossidasi presenta uno spiccato carattere idrosolubile che determina il suo passaggio nel siero durante la caseificazione, tale da rendere impossibile la sua determinazione in alcune matrici lattiero-casearie (es. formaggio). [Blel et al., 2001]

Pertanto gli indici proposti risultano attualmente insufficienti a soddisfare le nuove esigenze dell'industria lattiero-casearia e si rende necessario individuarne di nuovi, applicabili a tutti i diversi tipi di latte e i prodotti da esso derivati.

5.2 Ricerca di nuovi indici

Due tipi di reazioni chimiche possono essere utilizzate per individuare i trattamenti termici subiti dal latte:

1. la formazione di nuove sostanze a seguito delle reazioni chimiche indotte dai trattamenti termici, ad esempio lattulosio o i prodotti della reazione di Maillard, affatto o minimamente presenti nel latte crudo;
2. la denaturazione o inattivazione di proteine o enzimi termolabili presenti nel latte crudo.

La formazione di nuovi prodotti, che definiamo di neoformazione per distinguerli da quelli presenti prima che il latte venga sottoposto a trattamenti tecnologici, avviene solitamente a temperature elevate. La determinazione quantitativa del lattulosio e della furosina sono esempi applicativi di questa situazione, utilizzati per verificare l'adulterazione dei prodotti caseari con latte in polvere.

Qualora i trattamenti siano più blandi, inferiori alle combinazioni tempo/temperatura utilizzate per la sterilizzazione, è solitamente necessario verificare le variazioni di attività di enzimi endogeni del latte. La determinazione delle attività fosfatasica e perossidasi costituisce ad esempio un'applicazione di questi fenomeni.

L'individuazione di indici analitici in una matrice complessa come il latte presenta comunque delle limitazioni. L'enorme variabilità, in termini di composizione, legata a fattori naturali (stadio di lattazione), ambientali (alimentazione, clima), genetici (razza) che la matrice può presentare (**Capitolo 2**) spesso pone un ostacolo all'utilizzo di indici del "primo tipo", mentre l'assenza di metodi sufficientemente sensibili può essere un fattore limitante per gli indici del "secondo tipo". Inoltre, se consideriamo che spesso la determinazione di questi indici deve essere effettuata nei prodotti lattiero-caseari derivati, risulta quasi sempre necessario "riadattare" il metodo analitico messo a punto per la matrice latte. [Pellegrino et al., 1995]

La ricerca di nuovi indici analitici risulta quindi un'operazione estremamente complessa, che deve tenere necessariamente conto di tutte le problematiche sopra riportate e delle caratteristiche di ogni caso particolare.

In letteratura, diversi indici sono stati proposti per la determinazione dei trattamenti termici sul latte vaccino [FIL/IDF, 1995], mentre esiste una profonda lacuna per tutto ciò che in merito riguarda il latte ovino. Dal momento che questa matrice, e quindi i prodotti da essa ottenuti, sono profondamente diversi da quelli di origine vaccina (**Capitolo 2**), l'applicabilità di tali indici nel latte ovino e nei suoi prodotti risulta essere passo obbligato ed ineludibile.

A tal proposito, lo scopo di questo lavoro di tesi è quello di individuare dei marker che attestino l'utilizzo di latte crudo, termizzato o pastorizzato, nel formaggio prodotto con latte ovino e – in generale – in tutta la filiera di produzione di tali derivati. Questo permetterebbe di verificare, in ottemperanza a quanto espresso dall'articolo 11 del regolamento (CE) 510/2006, il rispetto del disciplinare di produzione dei formaggi ovini DOP, tra i quali anche quelli prodotti in Sardegna, il Fiore Sardo DOP, il Pecorino Romano DOP e il Pecorino Sardo DOP, che presentano delle differenze

per quanto riguarda il trattamento termico subito dal latte prima della caseificazione (**Tabella 5-2**), o di verificare quanto riportato in etichetta nei prodotti ovinici a latte crudo.

<i>Prodotto</i>	<i>Tipologia di latte utilizzato per la caseificazione</i>
Fiore Sardo* DOP	Crudo
Pecorino Romano** DOP	Termizzato
Pecorino Sardo*** DOP	Crudo, termizzato, pastorizzato

* DPR del 28-11-1974. ** DPCM del 3-8-1993. *** DPCM del 4-11-1991

Tabella 5-2: Tipologia di latte previsto nei disciplinari di produzione per la caseificazione dei formaggi DOP Sardi.

Ogni modifica indotta nel latte dai trattamenti termici (**Capitolo 4**) potrebbe costituire un indice utile all'identificazione della natura di tali trattamenti (**Tabella 5-3**). Al fine di soddisfare i requisiti necessari al raggiungimento del nostro obiettivo, occorre che tali indici possiedano almeno le seguenti caratteristiche:

- ✓ presentare significativa variazione di un'osservabile fisica al di sotto dei 72°C;
- ✓ essere determinabili in tutta la filiera dei prodotti lattiero-caseari.

<i>Sostanza</i>	<i>Trattamento</i>	<i>Modifiche provocate</i>	<i>Indice analitico</i>
Lattosio	0-80°C	Reazione di Maillard	HMF, furosina
	100°C	Degradazione ad acidi organici	acido formico
Sieroproteine	135°C (UHT)	Isomerizzazione	lattulosio
	> 70°C	Denaturazione	α-lattoalbumina
	> 75°C	Denaturazione	β-lattoalbumina
	> 79°C	Denaturazione	immunoglobuline
	> 87°C	Denaturazione	siero albumine
Sieroproteine-caseine	65-85°C	Denaturazione-interazione	complesso β-lattoglobulina-κ-caseina
Caseine	110-150°C	Denaturazione	defosforilazione
	120-140°C	Denaturazione	proteolisi
Grasso	70°C	Denaturazione delle proteine della membrana	formazione di H ₂ S complessi con sieroproteine
	>100°C	Denaturazione del globulo	fosfolipidi, proteine, Cu in soluzione
Vitamine	>75°	Denaturazione	
Enzimi endogeni	45-100°C	Inattivazione	assenza di attività enzimatica

Tabella 5-3: Modifiche indotte dai trattamenti termici ai principali costituenti del latte.

Riassumendo le principali modifiche irreversibili indotte dai trattamenti termici (**Tabella 5-3**), è possibile osservare come la formazione di nuove sostanze, ad esempio l'isomerizzazione del lattosio a lattulosio e la reazione di Maillard, avvengano a temperature che solitamente superano i 75°C. Ad esempio furosina e HMF, prodotti della reazione di Maillard (che pure avviene anche a temperatura ambiente) vengono proposti come indici per la distinzione tra latte pastorizzato e latte UHT [Resini et al., 1990] in quanto la sua cinetica aumenta di circa 40.000 volte passando da 0°C a 80°C.

La denaturazione delle proteine non può essere un indice utilizzabile in quanto le caseine sono estremamente termostabili, e le sieroproteine vengono perse nel siero durante la caseificazione, rendendo difficile la loro determinazione nei prodotti lattiero-caseari. Anche la formazione di complessi tra caseine e sieroproteine non è applicabile in quanto avviene significativamente solo a seguito della denaturazione di queste ultime, e quindi intorno ai 70°C.

Infine anche le modifiche a carico dei globuli di grasso avvengono a temperature prossime a quelle della pastorizzazione, senza considerare che l'alta variabilità in termini di concentrazione, legata a fattori ambientali, naturali e genetici, renderebbe inadatto questo indice.

Gli enzimi endogeni del latte presentano per contro un'inattivazione in un ampio campo di temperature, compreso tra i 45 e 100°C, e molti di loro sono determinabili anche nei prodotti lattiero-caseari. Per questo motivo alcuni vengono proposti come indici per la distinzione dei blandi trattamenti termici subiti dal latte prima e durante la caseificazione [FIL-IDF, 1995].

5.3 Enzimi endogeni del latte come indici dei blandi trattamenti termici

Gli enzimi endogeni presenti nel latte sono circa 100, ma solo 60 di questi sono stati isolati e caratterizzati. Ognuno di loro presenta un'inattivazione in un range di temperature ben distinto, e ciò li rende potenziali candidati a divenire indici di trattamenti termici sul latte e sui suoi prodotti [FIL-IDF, 1995].

Diversi studi sono stati effettuati per verificare la loro termolabilità nel latte vaccino (**Tabella 5-4**), mentre esiste una profonda lacuna cognitiva per quel che riguarda il latte ovino.

Enzima	Codice enzimatico	Range di inattivazione °C	Autori
fosfatasi alcalina	3.1.3.1	60-80	Andrews [1987] Fil-IDF [1995]
fosfatasi acida	3.1.3.2	65-80	Mullen [1950]
lattoperossidasi	1.11.1.7	75-85	Fil-IDF [1995]
α -L-fucosidasi	3.2.1.51	52-62	Andrews [1987], Zehetner [1996]
α -D-mannosidasi	3.2.1.24	76-86	Andrews [1987], Zehetner [1996]
fosfoexosoisomerasi	5.3.1.9	56-66	Zehetner [1996]
fosfodiesterasi I	3.1.4.1	65-78	Zehetner [1996]
γ -glutamilttransferasi	2.3.2.2	65-75	Andrews [1987], Zehetner [1996]
N-acetil- β -glucosamminidasi	3.2.1.30	70-80	Andrews [1987]
lipasi lipoproteica	3.1.1.34	60-75	Andrews [1987]
5'-nucleotidasi	3.1.3.5	70-80	Andrews [1987]
xantinossidasi	1.2.3.2	75-90	Andrews [1987]

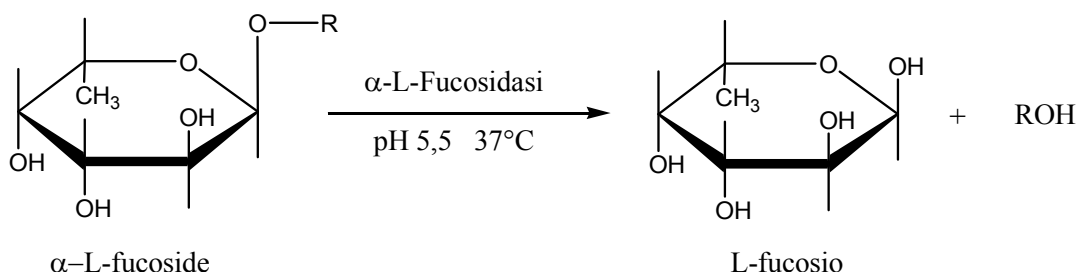
Tabella 5-4: Temperature di inattivazione dei principali enzimi endogeni del latte

Fra questi enzimi, i più termolabili sembrano essere l' α -L-fucosidasi, la fosfoexosoisomerasi e la γ -glutamilttransferasi. Per questo diversi autori propongono l'adozione di primi due come indice inferiore e superiore della termizzazione e del terzo per evidenziare la pastorizzazione [Zehetner et al., 1996].

L' α -L-fucosidasi e la γ -glutamilttransferasi presentano pertanto le caratteristiche necessarie alla distinzione tra il latte crudo, termizzato e pastorizzato nel latte vaccino. Al fine di proporre la loro applicabilità come indici nel latte ovino occorre tuttavia verificarne l'esistenza nel latte ovino, quantificarne la loro attività enzimatica, studiarne la cinetica di inattivazione, la variabilità dell'attività enzimatica in relazione ai fattori naturali e ambientali, ed implementare i metodi messi a punto per il latte in diverse matrici lattiero casearie, quali ad esempio il formaggio.

5.3.1 α -L-fucosidasi (E.C. 3.2.1.51)

L' α -L-fucosidasi è una glicosidasi lisosomiale che idrolizza i fucosiloligosaccaridi o i fucosilpolisaccaridi in fucosio ed alcool [Lehninger et al., 1994]



La sua attività è stata riscontrata in una grande varietà di organismi, compresi batteri, protozoi, funghi e muffe [Johnson et al., 1991]. Nei mammiferi è stata studiata in numerosi tessuti, cellule, fluidi, nei reni, nel cervello, nel fegato. La sua ubiquità è dovuta alla presenza di un esteso gruppo di composti idrofobici o idrofilici glicoconiugati contenenti fucosio dai quali viene idrolizzato questo zucchero. La fucosidosi, assenza o riduzione dell'attività della fucosidasi, è una malattia che implica l'accumulo di composti fucosilconiugati nel cervello e nei tessuti viscerali [Johnson et al., 1991] provocando una rapida neurodegenerazione e l'alterazione delle funzioni mentali e motorie [Sulzenbacher et al., 2004].

L' α -L-fucosidasi è stata determinata nella frazione scremata del latte vaccino [Andrews et al., 1987], [Mellors et al., 1968] e in quello umano [Widerschain et al., 1995 e 1996]. La sua attività nel corso della lattazione sembra essere costante nel latte vaccino (21,5 % di variazione rispetto alla media, [Zehetner et al., 1996]), mentre nel latte umano si riduce da 1500 U a 500 U nel corso dei primi 50 giorni, per poi ritornare intorno ai valori di 2000 U nel corso dei restanti 270 giorni [Widerschain et al., 1995].

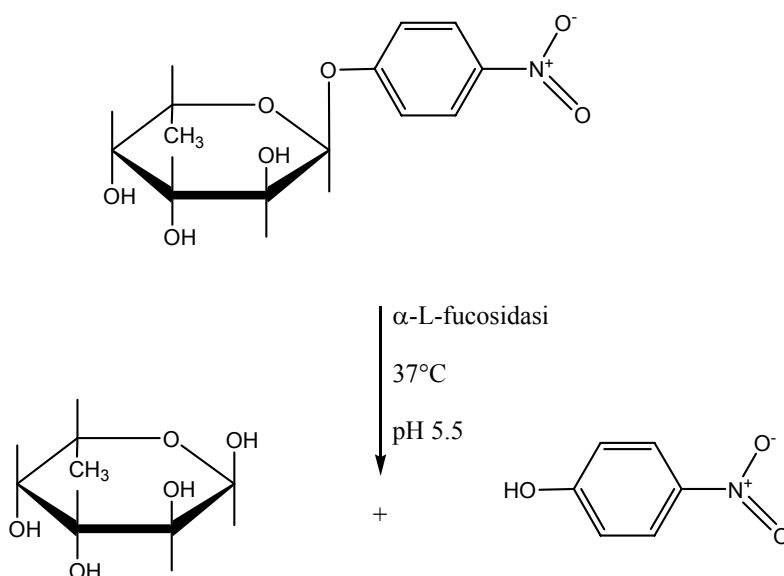
L' α -L-fucosidasi presenta attività in un ampio range di pH, con valori massimi tra 4 e 6 [Johnson et al., 1991], [Widerschain et al., 1996].

E' fra gli enzimi più termolabili, evidenziando un range di inattivazione tra temperature comprese tra 52 e 62 °C [Andrews 1987], ed un'attività residua del 7% se sottoposto alla temperatura di 62°C per 25 s [Zehetner et al., 1996]. Per questo motivo diversi autori propongono la misura della sua attività residua come indice

dell'avvenuta termizzazione [Andrews et al., 1987], [Zehetner et al., 1996], [McKellar et al., 2000].

La sua energia di attivazione è risultata essere pari a $378 \pm 11 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ [Zehetner et al., 1996], in contrasto con quanto precedentemente riscontrato $204 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ [Andrews et al., 1987].

L'attività enzimatica viene misurata per reazione con un substrato sintetico, il p-nitrofenil-fucopiranoside, che in soluzione tamponata a pH 5,5 ed incubata alla temperatura di 37°C rilascia fucosio e p-nitrofenolo; quest'ultimo viene determinato spettrofotometricamente [Andrews et al., 1987]



[Zehetner et al., 1996],

colorimetricamente [McKellar et al 2000] o per via RP-HPLC [De Noni, 2006].

La quantità rilasciata di p-nitrofenolo viene calcolata per mezzo di una retta di taratura e trasformata in unità di attività enzimatica(U), definita come la quantità di enzima che idrolizza 1 nmol/h di p-nitrofenil-fucopiranoside a pH 5.5 e 37°C .

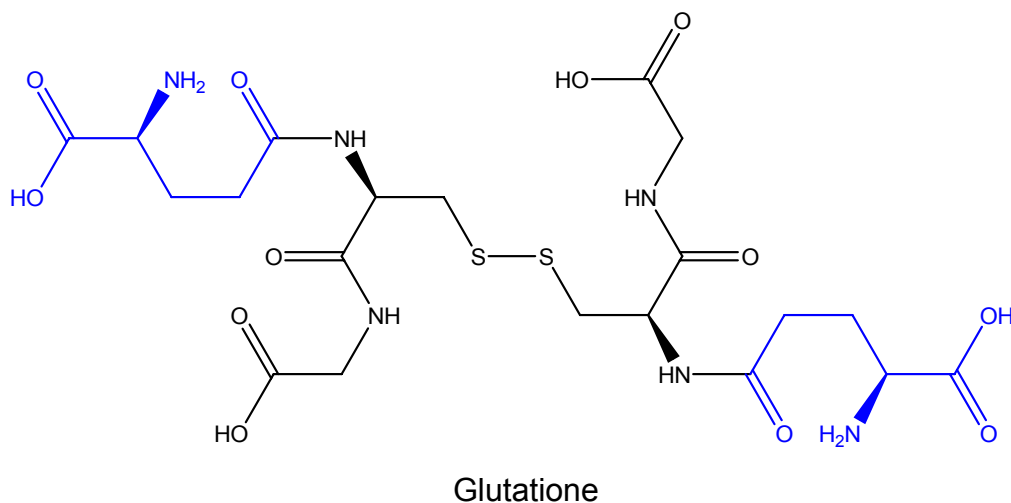
Recentemente De Noni [2006] ha studiato la sua attività nel latte vaccino in funzione dei parametri stagionali e geografici. Secondo l'autore non si è evidenziato alcun trend in funzione dei parametri stagionali, mentre l'ampia variabilità imputabile all'area di provenienza potrebbe rendere l'enzima un parametro non adatto alla discriminazione dei trattamenti di termizzazione. Questo sembrerebbe confermare, secondo quanto riportato per il latte umano da Widerschain e Newburg [1995], che l'attività dell' α -L-fucosidasi possiede un'influenza dal punto di vista genetico.

Nessun autore ha mai riportato i valori di attività enzimatica in prodotti lattiero caseari.

5.3.2 γ -glutamyltransferasi (E.C. 2.3.2.2)

La γ -glutamyltransferasi o γ -glutamyltranspeptidasi (γ -GT) è un enzima associato alla membrana del globulo di grasso del latte, ed è in larga misura distribuito nei tessuti mammari [Meister e Tata, 1976]. L'elettroforesi in gel di poliaccrilammide indica che l'enzima si compone di due subunità glicoproteiche con pesi molecolari di 57.000 e di 25.500 [Baumrucker, 1980].

È ampiamente accettato che la sua attività riveste un ruolo essenziale nel trasporto degli aminoacidi e nella sintesi proteica [Baumrucker e Pocius, 1978]. La sua attività catalitica implica il trasferimento dei residui γ -glutammici dal glutatione (donatore) ad un aminoacido libero (accettore), in genere la cisteina [Meister e Anderson, 1983] [Morita et al., 1994] [Hanigan et al., 1998] [Wolff et al., 1998].



L'attività della γ -GT nel latte umano è molto alta nel colostro, intorno alle prime 4 settimane di lattazione, con un andamento decrescente (circa 10 volte) nei 6 mesi successivi [Challier et al., 2005]. Questa tendenza è stata riscontrata anche nei vitelli, poiché a seguito dell'ingestione del colostro la γ -GT si trasferisce nel plasma sanguigno, la sua attività rappresenta un utile indice del consumo di colostro dei vitelli [Baumrucker et al., 1994].

È un enzima relativamente stabile al calore, esso viene infatti inattivato se sottoposto a temperature superiori ai 70°C, e presenta un'attività residua del 10% se sottoposto ad un trattamento di 75°C per 15 s e completa inattivazione a seguito di un trattamento di 79°C per 16 s [Andrews et al., 1987], [McKeller et al., 1991].

Il 74% della sua attività è presente nella fase scremata del latte, e del restante 23%, relativo alla frazione grassa, solo il 6,6% si trova direttamente legato alla membrana dei globuli di grasso [Baumrucker, 1979].

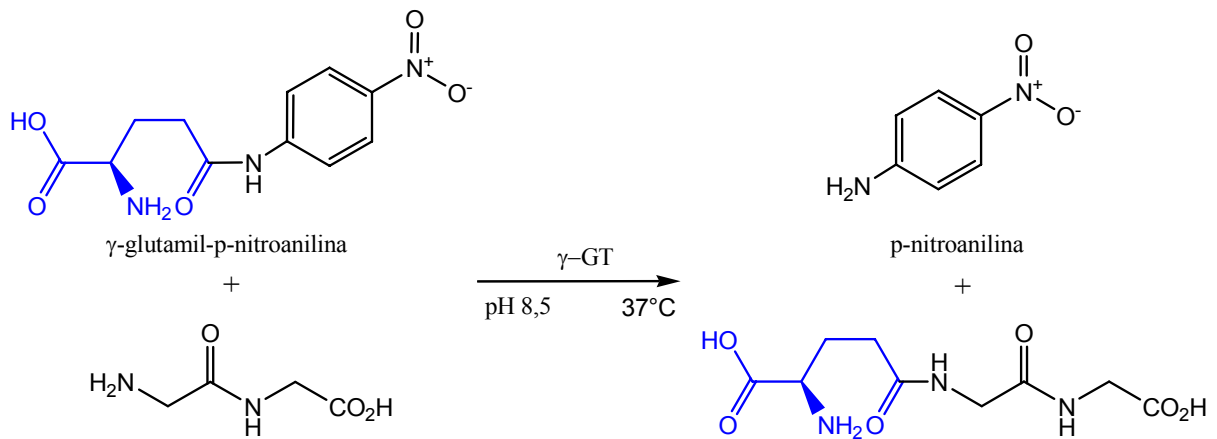
<i>Frazione</i>	<i>Distribuzione %</i>
Latte	100
Fase scremata	74,3
Caseine	18,4
Siero	53,8
Crema	23,2
Fosfolipidi (trigliceridi)	18,3
MFGM (fosfolipidi)	6,6

MFGM membrana dei globuli di grasso

Tabella 5-5: Ripartizione della γ -glutamilttransferasi nelle diverse fasi del latte [Baumrucker 1979].

Secondo l'autore la bassa percentuale di enzima legata ai globuli è causata dal suo rilascio durante le operazioni di separazione dal burro, palesando un debole legame tra l'enzima e la membrana.

La sua attività enzimatica sembra essere piuttosto costante durante la lattazione, mostrando nel latte vaccino un coefficiente di variazione rispetto alla media del 16,4% [Zehetner et al., 1996] e del 7% secondo quanto riportato da [McKellar et al., 1991]. E' stato possibile determinare la sua attività anche nei prodotti lattiero-caseari, nei quali non presenta riattivazione [McKellar et al., 1991], [Blel et al., 2002]. Queste sue caratteristiche lo rendono un indice migliore della fosfatasi alcalina per i trattamenti di pastorizzazione [Andrews et al., 1987], [Zehetner et al., 1996], [Dos Anjos et al., 1998], [McKellar et al., 1991], [Blel et al., 2002].



L'attività enzimatica della γ -GT nel latte vaccino viene determinata per reazione tra la γ -glutamyl-p-nitroanilina, un substrato sintetico che funge da donatore di gruppi glutammici, e la diglicina come substrato accettore a pH 8,5 e 37°C. La quantità di p-nitroanilina rilasciata viene determinata spettrofotometricamente e calcolata per mezzo di una retta di taratura. Una unità di attività (U) è stavolta definita come la quantità di enzima che rilascia 1 μ mol/min di p-nitroanilina a 37°C e pH 8,5.

PARTE SPERIMENTALE

Le determinazioni spettrofotometriche sono state eseguite impiegando uno spettrofotometro Varian Cary 1E doppio raggio dotato di monocromatore a reticolo.

Di seguito sono riportate le condizioni operative:

- Ampiezza della banda passante (SBW) 2 nm
- Tempo medio di campionamento del segnale 0,067 s
- Velocità di scansione 600,000 nm/min

Le determinazioni HPLC sono state eseguite impiegando un sistema cromatografico equipaggiato con:

- Autocampionatore Varian mod. 9100
- Sistema di pompaggio dell'eluente Varian mod. 9065600 E
- Rivelatore UV/VIS a lunghezza d'onda variabile Waters 486

La separazione cromatografica è stata condotta mediante eluizione a gradiente su colonna a fase inversa (PLRP-S 250X4.6 i.d., diametro delle particelle 8 µm).

6 Determinazione dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamiltransferasi nel latte ovino

6.1.1 Introduzione

Sulla base di quanto esposto nel precedente capitolo, ci è parso plausibile poter intraprendere, per riconoscere i blandi trattamenti termici sul latte ovino, la strada dell'identificazione e della valutazione dell'attività di marker enzimatici endogeni del latte che si mostrassero sensibili anche a modeste escursioni termiche della matrice. Una indicazione in tal senso proveniva anche dai lavori di Zehetner [1996] e di Blel [2002] che avevano dimostrato che l' α -L-fucosidasi e la γ -glutamiltransferasi enzimi endogeni del latte bovino, potevano esser utilizzabili come marker di blandi trattamenti termici in tale matrice, mettendo parallelamente a punto un metodo spettrofotometrico UV-Vis per la determinazione quantitativa delle rispettive attività enzimatiche.

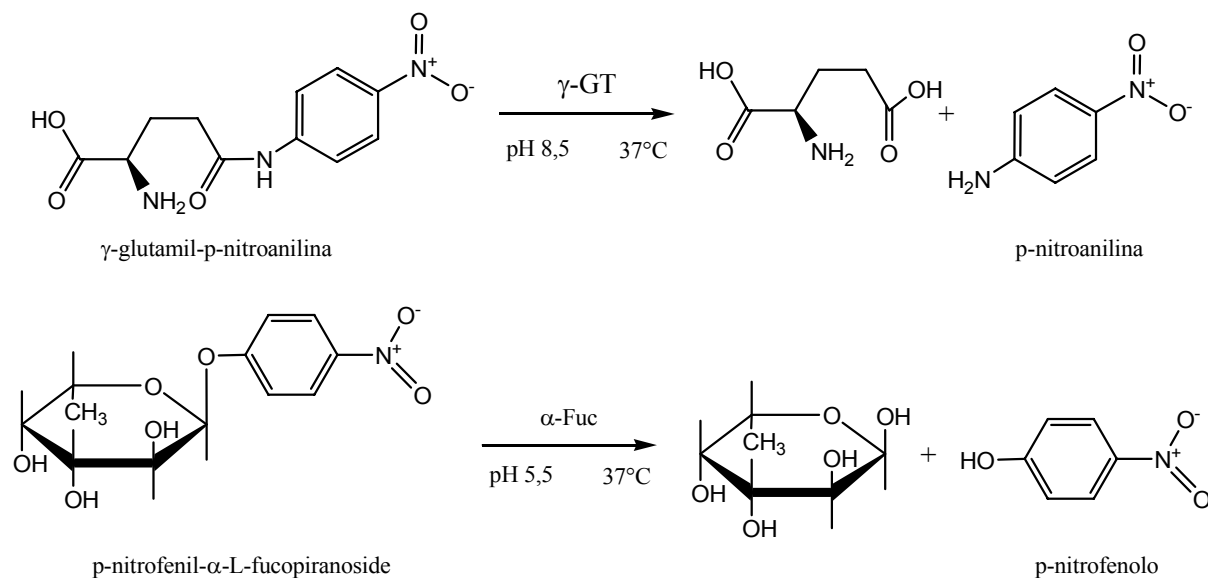
Tale risultato non appariva trasferibile in maniera scontata sulla matrice latte ovino, causa le note differenze di costituzione chimica. Ad esempio, sino ad oggi manca in letteratura ogni evidenza della presenza di tali enzimi nella matrice in oggetto. Il primo passo della ricerca è stato pertanto cercare di identificare detti enzimi nel latte ovino. Ovviamente si è cercato di trarre spunto dalle metodiche già presenti in letteratura, ma un po' per lo scarso dettaglio chimico delle procedure descritte nei lavori pubblicati, un po' per la tangibile differenza della matrice oggetto della caratterizzazione, non si è riusciti ad andare più in là di una mera probabile identificazione dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamiltransferasi nel latte di origine ovina. Per poter effettuare delle analisi quantitative – *conditio sine qua non* poter proseguire la ricerca - appariva necessario sviluppare ed ottimizzare nuovi protocolli analitici.

Come noto, due tra le maggiori differenze tra il latte ovino e quello bovino riguardano il contenuto di sostanza grassa e di proteine (rispettivamente pari a circa il 200 ed il 150% dei valori tipici per il latte bovino). Tale vistosa differenza era probabilmente responsabile di uno dei maggiori problemi relativi allo scale-up del metodo spettrofotometrico di Blel [2002] alla nostra matrice: la mancata chiarificazione del latte prima della lettura spettrofotometrica. In vista poi della possibilità tutt'altro che remota di dover effettuare misure in matrici a bassa attività enzimatica (causa fluttuazioni stagionali o ridotto trasferimento dell'enzima al prodotto di caseificazione), si è ipotizzato di mettere a punto delle metodiche indipendenti via RP-HPLC.

Sono stati quindi messi a punto un set di nuovi metodi spettrofotometrici UV-Vis e RP-HPLC per la determinazione dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamyltransferasi su latte ovino. I successivi paragrafi daranno dettagliato riscontro delle attività di ricerca che hanno portato all'ottenimento di tali risultati.

6.2 Sviluppo della metodica spettrofotometrica

Entrambi gli enzimi vengono determinati attraverso il dosaggio spettrofotometrico di un cromoforo rilasciato, a seguito dell'attività catalitica dell'enzima, da un substrato sintetico opportunamente aggiunto alla soluzione.



La sospensione colloidale delle micelle caseiniche e i globuli di grasso in emulsione nella fase acquosa rendono il latte opaco alla luce, inficiando la lettura spettrofotometrica. Risulta quindi necessario procedere alla chiarificazione del latte, un'operazione che viene praticata a valle dell'incubazione del campione in quanto risulta essere distruttiva per i componenti del latte.

Le operazioni d'analisi vengono condotte secondo questa sequenza:

- aggiunta del latte alla soluzione tamponata contenente il substrato
- incubazione della soluzione con formazione del cromoforo
- chiarificazione della soluzione
- lettura spettrofotometrica

6.2.1 Chiarificazione del latte

I lavori pionieristici sull'argomento furono effettuati attorno agli anni settanta. Nel 1970, Nakai e Anh Chi Le [1970] determinarono spettrofotometricamente le proteine totali e il grasso nel latte vaccino. Successivamente Bosset [1977] mise a punto delle soluzioni alcaline in presenza/assenza di solventi organici (THF) utilizzabili per la determinazione delle proteine del latte vaccino. Da quegli anni in poi continuarono gli sforzi per offrire delle soluzioni chiarificanti dotate di prestazioni sempre superiori, in grado di permettere una minore diluizione del campione, una riduzione dei tempi di analisi, una maggiore sensibilità e l'uso di solventi e reagenti meno aggressivi (**Tabella 6-1**).

<i>Riferimento</i>	<i>Composizione chimica del reagente</i>	<i>Applicazioni</i>
Nakai & Anh Chi Le 1970	(a) H ₂ O + acido acetico (b) urea+imidazolo	Determinazione delle proteine (reagente a) e del grasso (reagente a+b) nel latte vaccino
Bosset et al. 1977a	H ₂ O + NaOH +	Determinazione delle proteine nel latte vaccino
Bosset et al. 1977b	H ₂ O + NaOH +THF	Determinazione delle proteine nel latte vaccino
Linden & Paquet, 1981	n-butilammina + cicloesanoone + Triton X-100	Determinazione dalla fosfatasi alcalina nel latte, formaggio e crema di latte.
Owen & Andrews, 1984	H ₂ O + EDTA + Triton X-100	Determinazione dei gruppi SH, NH ₂ e delle proteine nel latte vaccino
Linden et al. 1987 (Clarifying Reagent®)	H ₂ O + SDS+ NaOH + Triton X-100 + n-butanone	Tabella 6-2

Tabella 6-1: Composizione chimica dei reagenti utilizzati per la dissoluzione del latte [Humbert 2006].

Nel 1987 Linden et al. misero a punto e brevettarono il Clarifying Reagent®, una miscela di solventi organici, tensioattivi ed alcali che permette di ottenere la completa chiarificazione del latte intero con un assorbimento residuo di 0,090 e 0,140 unità di assorbanza a 340 e 400 nm rispettivamente [Humbert, 2006].

L'azione chiarificante è il concorso di molteplici contributi. Ad esempio, l'alcalinità della soluzione [Bosset, 1977] è responsabile della distruzione dei legami ad idrogeno ed i ponti di disolfuro provocando la denaturazione della struttura quaternaria, terziaria e secondaria delle strutture proteiche. L'ambiente alcalino riduce inoltre la solubilità del calcio allontanandolo dalle micelle caseiniche e provocando la loro dispersione (**Capitolo 2**). Esso provoca anche la denaturazione della membrana dei globuli di grasso facilitandone la dissoluzione. L'aggiunta di un composto anfipatico come il SDS permette di solubilizzare sia composti lipofili che quelli idrofili. Un detergente non ionico (Triton X 100) riduce la tensione superficiale e migliora le performance degli altri agenti. La combinazione di questi effetti permette l'eliminazione delle sospensioni e delle emulsioni rendendo il latte una soluzione omogenea e limpida, adatta per una misura spettrofotometrica. L'effetto viene garantito all'interno di un lasso di tempo di 10 minuti dalla chiarificazione, entro il quale deve avvenire la misura spettrofotometrica.

L'utilizzo del Clarifyng Reagent[®] è stato applicato con successo in diversi protocolli (**Tabella 6-2**).

<i>Applicazioni</i>	<i>Riferimento</i>	<i>Matrice</i>
Determinazioni chimiche		
Gruppi NH ₂	Humbert et al. 1990	Latte e formaggio
Gruppi SH	Guingamp et al. 1993	Latte crudo e latte trattato termicamente
Composti colorati (A ₃₄₀)	Guingamp et al. 1999	Latte crudo e latte trattato termicamente
Ammoniaca , urea	Guingamp et al. 1994	Latte e siero
Determinazioni enzimatiche		
Fosfatasi alcalina	Linden & Paquet, 1981†; Linden et al. 1982†	Latte e formaggio
Proteasi	Linden et al. 1982†; Humbert et al. 1982†	Latte e formaggio
Lattoperossidasi	Blel et al. 2001	Latte e formaggio
N-acetil-β-glucosaminidasi	Humbert et al. 1995	Latte

Lipasi	Humbert et al. 1997	Latte
Plasmina	Saint-Denis et al. 2001a	Latte crudo e latte trattato termicamente
γ -glutamilttransferasi	Blel et al. 2002	Latte e formaggio

Tabella 6-2: Protocolli per la determinazione chimica ed enzimatica che impiegano il Clarifying Reagent® per la chiarificazione del latte [Humbert, 2006]

Nel 2002 Blel et al. propongono un protocollo per la determinazione della γ -glutamilttransferasi nel latte vaccino e nel Camembert, un formaggio a pasta molle ottenuto da latte vaccino crudo, che prevede l'utilizzo del Clarifying Reagent® per la chiarificazione del campione.

La metodica, precisa, accurata e abbastanza sensibile per il latte bovino, non si è tuttavia dimostrata trasferibile al latte ovino. Nelle stesse condizioni operative, infatti, i campioni di latte ovino risultavano essere solo parzialmente chiarificati, inficiando così i presupposti alla base delle determinazioni spettrofotometriche.

L'opalescenza residua è stata quantificata effettuando delle letture contro bianco. La **Figura 6-1** dà conto dell'effetto.

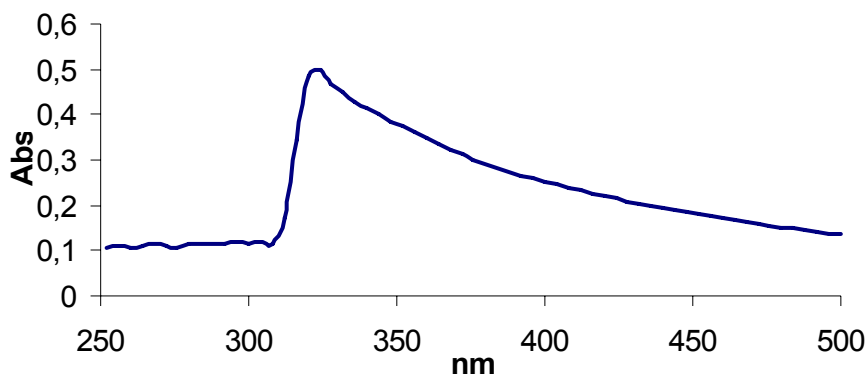


Figura 6-1: Spettro di assorbimento del campione di latte ovino parzialmente chiarificato.

Si può notare che l'assorbanza residua registrata a 340 e 400 nm è pari rispettivamente a 0,4139 e 0,2529 U.A., valori nettamente superiori a quelli recentemente riportati da Humbert et al [2006] per soluzioni chiarificate da latte bovino.

Stante questa osservazione, si è ritenuto in prima analisi che il maggior contenuto in proteine che caratterizza il latte ovino rispetto a quello bovino potesse essere

responsabile dell'opalescenza residua. Per cercare di risolvere l'interferenza, si è innanzitutto tentato di innalzare il pH nella fase di chiarificazione, in maniera tale da promuovere un maggior grado di denaturazione delle proteine del latte ovino. Sfortunatamente l'alcalinizzazione spinta in fase di chiarificazione da una parte migliora l'azione del Clarifyng Reagent[®] permettendo l'ottenimento di soluzioni prive di opalescenza, ma d'altro canto promuove l'idrolisi alcalina del substrato precursore del cromoforo, con liberazione di *p*-nitroanilina non prodotta per via enzimatica. Si è quindi tentato un altro approccio metodologico, basato stavolta sulla complessazione degli ioni calcio. Come noto, le micelle caseiniche tendono ad associarsi in aggregati sempre più complessi e sempre meno solubili al crescere delle interazioni con gli ioni calcio. In linea di principio, quindi, l'allontanamento del calcio (ed esempio mediante complessazione con opportuni reagenti chelanti) dovrebbe permettere alle micelle caseiniche di proporsi in forma maggiormente disaggregata e quindi potenzialmente meglio aggredibile dal Clarifyng Reagent[®]. Sulla base di tale intuizione si è provveduto a modificare opportunamente il metodo proposto da Blel aggiungendo, in fase di chiarificazione, piccole aliquote di una soluzione di EDTANa₄ 0,2 M al fine di complessare il calcio presente in sospensione. La figura sotto riportata mostra l'effetto dell'aggiunta di 100 µL di soluzione 0,2 M di EDTANa₄ ad un campione di latte ovino in fase di chiarificazione. La riduzione dell'assorbanza, indice di una perfetta azione chiarificante, è evidente e pone la tecnica da noi messa a punto su livelli di sensibilità ben superiori a quella a suo tempo descritta da Blel. È importante in tal contesto notare che il valore di pH determinato dall'aggiunta del Clarifyng Reagent[®] è perfettamente compatibile con un alto valore della costante condizionale tra EDTA e ioni Ca²⁺, presupposto indispensabile per il successo dell'intervento correttivo.

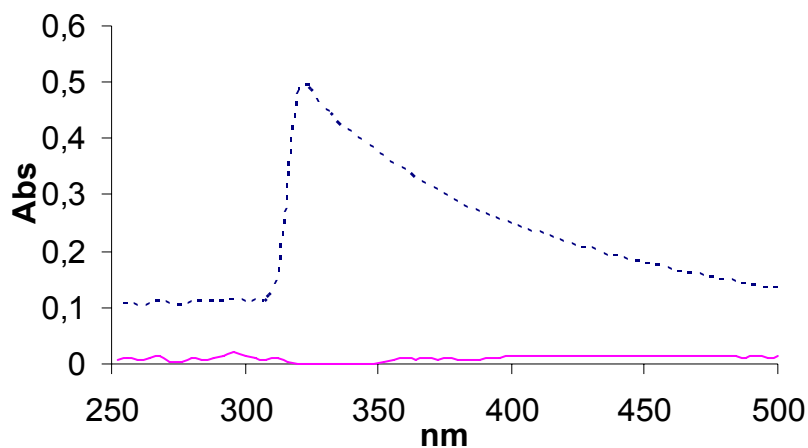


Figura 6-2: Spettri di assorbimento dei campioni di latte ovino chiarificati attraverso il Clarifying Reagent® senza (curva tratteggiata) e con (curva intera) l'aggiunta di EDTANa₄.

In presenza di EDTANa₄ il campione di latte ovino mostra un assorbimento residuo pari a 0,0015 e 0,0134 U.A. rispettivamente a 340 e 400 nm, valori, nettamente inferiori a quanto a suo tempo riportato da Humbert per il latte vaccino [Humbert et al., 2006] (**Tabella 6-3**).

<i>Matrice</i>	<i>A (U.A.)</i>	
	<i>340 nm</i>	<i>400 nm</i>
Latte vaccino*	0,1400	0,0900
Latte ovino	0,4139	0,2529
Latte ovino con EDTA	0,0015	0,0130

* [Humbert et al. 2006]

Tabella 6-3

Tale accorgimento permette di ottenere, operando su latte ovino additivato con concentrazioni crescenti di p-nitroanilina, rette di calibrazione lineari e sovrapponibili a quelle ottenute per il latte bovino nel range di concentrazioni di analita comprese tra 10 e 150 µM. (**Grafico 6-1**).

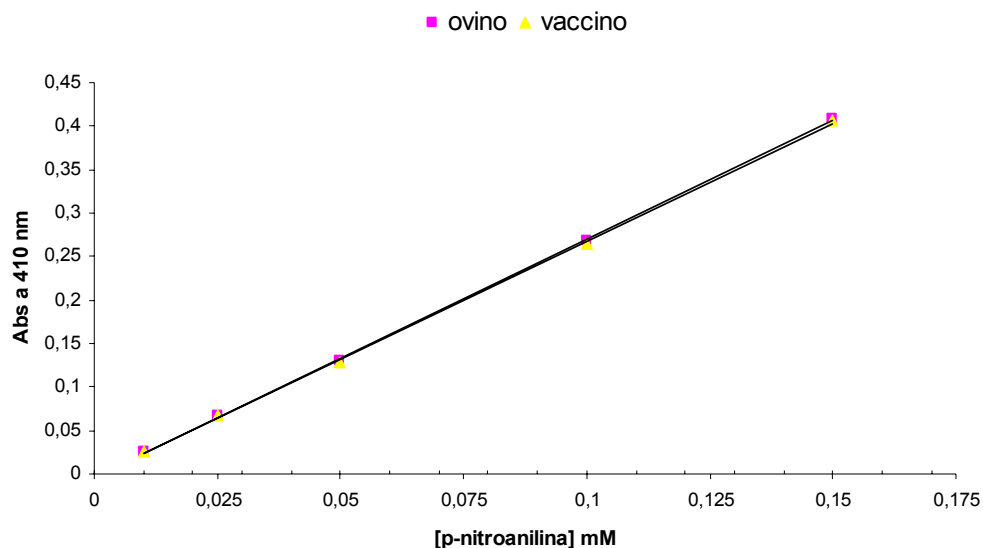


Grafico 6-1: Funzione di calibrazione della p-nitroanilina ottenuta nel latte ovino e vaccino.

Latte	Equazione della retta	r^2
Vaccino	$y = (2,713 \pm 0,033)x - 0,003 \pm 0,002$	0,999
Ovino	$y = (2,724 \pm 0,024)x - 0,003 \pm 0,002$	0,999

Tabella 6-4

Attraverso il test t di Student sono stati confrontati i coefficienti angolari e le intercette delle due rette. I t_c calcolati secondo l'**Equazione 6-1** sono riportati nella **Tabella 6-5**.

$$t_c = \frac{\bar{x}_a - \bar{x}_b}{\sqrt{\frac{(n_a - 1)s_a^2 + (n_b - 1)s_b^2}{n_a + n_b - 2} \cdot \left(\frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b}\right)}}$$

Equazione 6-1

Dove \bar{x}_a e \bar{x}_b sono le medie delle due serie, s_a e s_b le deviazioni standard, e n_a e n_b il numero di osservazioni effettuate per ogni punto determinato nelle due rette.

	t_c	$t_{t\ 0,05/2,4}$
Coefficienti angolari	0,584	2,776
Intercette	0,515	2,776

Tabella 6-5

Avendo trovato che in tutti i due i casi $t_c < t_{t, 0,05/2,4}$ si può affermare che le due rette coincidano.

Lo step di chiarificazione da noi ottimizzato appare tra l'altro in grado di permettere anche la determinazione accurata dell'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi. Infatti, operando in maniera del tutto analoga a quella descritta per la γ -glutamyltransferasi, si riesce ad ottenere la completa chiarificazione ed una significativa sovrapposibilità delle rette di calibrazione ottenute anche per le aggiunte di p-nitrofenolo a latte ovino e bovino nel range di concentrazione compreso tra 10 e 150 μ M (**Grafico 6-2**), ottenendo anche in questo caso risultati migliori di quelli sinora noti in letteratura [Zehetner, 1996] per il solo latte vaccino.

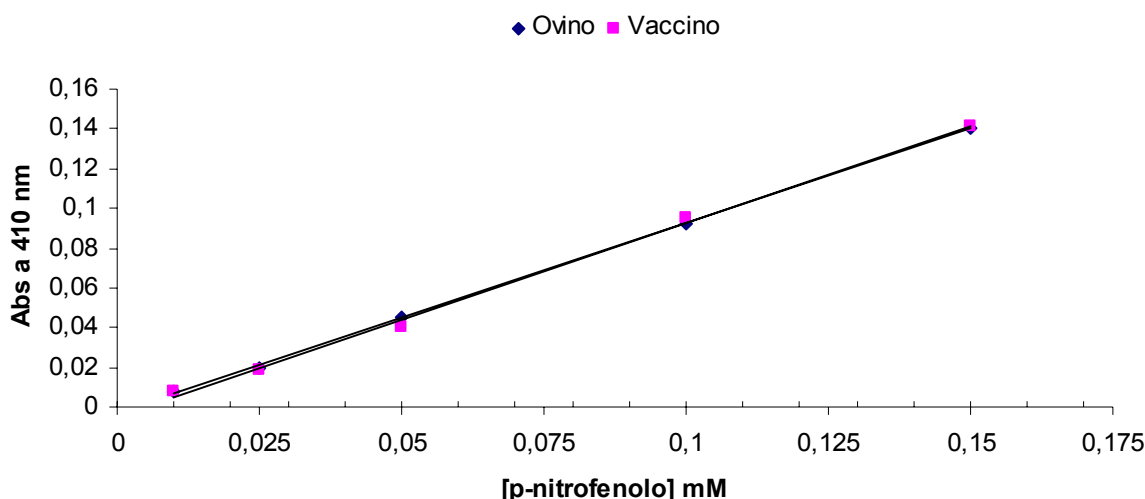


Grafico 6-2: Funzione di calibrazione del p-nitrofenolo ottenuta nel latte ovino e vaccino.

Latte	Equazione della retta	r^2
Vaccino	$y = (0,971 \pm 0,027)x - 0,004 \pm 0,002$	0,997
Ovino	$y = (0,953 \pm 0,007)x - 0,003 \pm 0,001$	0,999

Tabella 6-6

Anche in questo caso sono stati confrontati i coefficienti angolari e le intercette delle due rette attraverso il test t di Student. I t_c calcolati secondo l'**Equazione 6-1** precedentemente espressa sono riportati nella **Tabella 6-7**.

	t_c	$t_{t\ 0,05/2,4}$
Coefficienti angolari	1,333	2,776
Intercette	1,680	2,776

Tabella 6-7

Avendo trovato che in tutti i due i casi $t_c < t_{t\ 0,05/2,4}$ si può affermare che anche in questo caso le due rette coincidano.

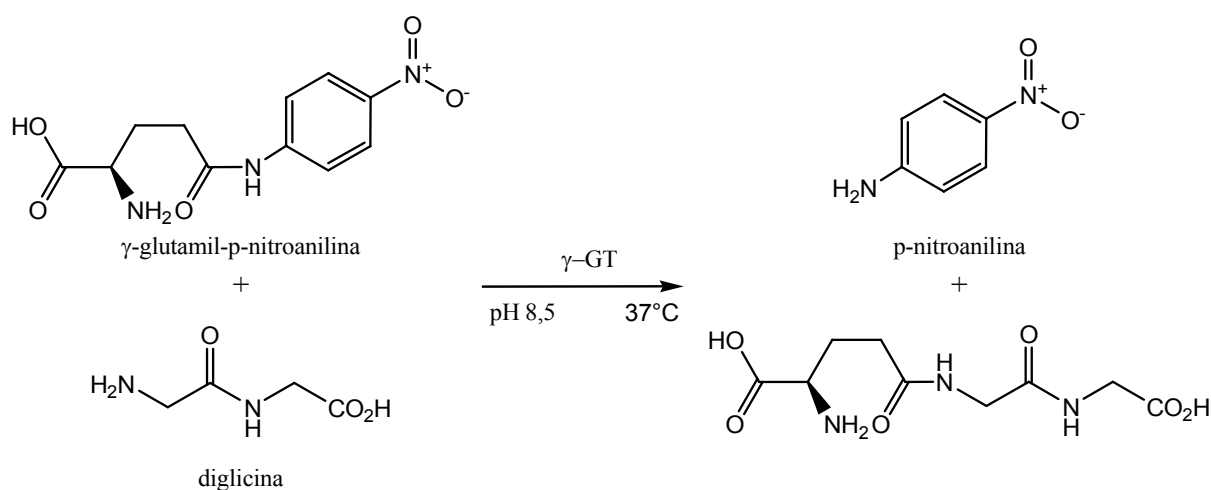
La determinazione dell'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi appare tuttavia essere meno sensibile di quella relativa alla γ -glutamilttransferasi in quanto, alla lunghezza d'onda di lavoro ($\lambda = 410$ nm) l'assorbanza specifica del p-nitrofenolo è circa il 35% di quella della p-nitroanilina. La necessità di operare alla lunghezza d'onda di 410 nm è stata determinata dal fatto che al massimo valore di assorbanza del cromoforo si verifica l'interferenza spettrale da parte del substrato sintetico sia per il p-nitrofenolo che per la p-nitroanilina.

L'elevato tenore della sostanza grassa del latte ovino non pare pregiudicare in alcun modo l'efficienza dello step di chiarificazione. Infatti, come dimostrato dai **Grafici 6-1 e 6-2**, e oggettivato dal confronto statistico attraverso il test t di Student (**Tabella 6-5 e 6-7**) non si riscontra una differenza significativa tra i valori di assorbimento nella matrice ovina e in quella vaccina per entrambi i cromofori, nonostante il contenuto in grasso nel latte ovino sia circa il doppio rispetto a quello vaccino.

Superati questi importanti aspetti preliminari è stato possibile mettere a punto il protocollo analitico per la determinazione spettrofotometrica UV-Vis della γ -glutamilttransferasi e dell' α -L-fucosidasi nel latte ovino.

6.3 Protocollo per la determinazione spettrofotometrica della γ -glutamyltransferasi nel latte ovino

L'attività enzimatica della γ -glutamyltransferasi viene determinata per via spettrofotometrica, attraverso la quantificazione della p-nitroanilina (p-NA), cromoforo che viene rilasciato quando l'enzima presente nel latte trasferisce il residuo γ -glutammico dalla γ -glutamyl-p-nitroanilina (γ -GPNA) alla diglicina (Glygly) in soluzione tamponata a pH 8,5 a 37°C.



6.3.1 Materiali e metodi

A 2 mL di soluzione substrato-tampone 4 mM in γ -GPNA (Sigma-Aldrich), 40 mM in Glygly (Sigma-Aldrich), e 0,2 M in tampone TRIS-HCl a pH = 8,5 (Sigma-Aldrich), preventivamente incubata per 2 min a 37°C, vengono aggiunti 100 μ L di latte ovino, intero o scremato. Dopo aver incubato la sospensione a 37°C per 15 min vengono aggiunti 2 mL di Clarifyng Reagent® (Fluka) e 100 μ L di EDTANa₄ 0,2 M (Sigma-Aldrich), la sospensione viene agitata vigorosamente e incubata a 37°C per 2 min prima della lettura spettrofotometrica. L'assorbanza della soluzione chiarificata viene determinata a 410 nm rispetto a bianco reattivi in una cuvetta di quarzo entro 10 min dalla chiarificazione.

Il bianco reattivi è costituito da una soluzione contenente tutti i composti sopraelencati incluso il latte cui però viene preventivamente inattivato l'enzima mediante trattamento termico a 100°C per 5 minuti. Ovviamente il bianco subisce tutti gli step di analisi del campione, compresa l'incubazione a 37°C per 15 min.

La concentrazione della p-NA viene determinata per mezzo di interpolazione di idonea retta di calibrazione e convertita in unità di attività enzimatica (U).

Nel caso in cui un campione presenti un'attività enzimatica troppo elevata viene opportunamente diluito con del latte inattivato.

6.3.2 Retta di taratura

Da una soluzione di standard primario contenente p-NA (Sigma-Aldrich) a concentrazione 0,5 mM, vengono preparate altre due soluzioni standard a concentrazione 0,10 mM e 0,25 mM.

Attraverso le opportune diluizioni vengono preparate 5 soluzioni ciascuna 40 mM in Glygly e 0,2 M in TRIS-HCl a pH 8,5, e concentrazioni di p-NA crescenti e pari a 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM e 150 µM.

A 2 mL di ognuna delle 5 soluzioni vengono aggiunti 100 µL di latte inattivato, la soluzione viene incubata per 15 min a 37°C e chiarificata secondo quanto riportato sopra.

L'assorbanza della soluzione viene letta a 410 nm contro il bianco reattivi entro 10 min.

6.3.3 Conversione in Unità di attività enzimatica (U)

Una unità di attività enzimatica di γ -glutamilttransferasi (*U*) viene definita come la quantità di enzima capace di rilasciare 1 µmol di p-NA per min a 37°C e pH 8,5.

La conversione viene effettuata tenendo conto della concentrazione di p-NA in soluzione, dei tempi di incubazione e dell'eventuale fattore di diluizione (*D*) secondo l'equazione:

$$U = \frac{[pNA]mmol \cdot 2mL \cdot 1000 \cdot (D)}{1000mL \cdot 15 \text{ min}} = \mu mol \cdot \text{min}^{-1}$$

Semplificando:

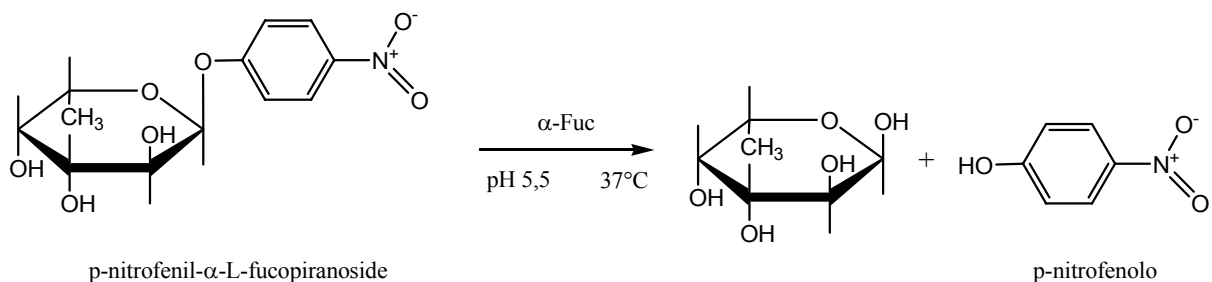
$$U = [pNA] \cdot 0,1\bar{3} \cdot (D) = \mu mol \cdot \text{min}^{-1}$$

Le unità di attività enzimatica per mL di latte corrisponderanno quindi a:

$$U / mL = \frac{[pNA] \cdot 0,1\bar{3} \cdot (D)}{0,1mL} = \mu mol \cdot \text{min}^{-1} \cdot mL^{-1}$$

6.4 Protocollo per la determinazione spettrofotometrica dell' α -L-fucosidasi nel latte ovino

L'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi viene determinata attraverso l'analisi spettrofotometrica del p-nitrofenolo (p-NF), il cromoforo rilasciato quando l'enzima presente nel latte idrolizza il substrato sintetico, il p-nitrofenil- α -L-fucopiranoside (p-NFP) in soluzione tamponata a pH 5,5 e 37°C.



6.4.1 Materiali e metodi

A 100 μL di soluzione substrato-tampone 5 mM in p-NFP (Sigma-Aldrich) e 0,5 M in tampone CH_3COONa a $\text{pH} = 5,5$ (Sigma-Aldrich), vengono aggiunti 100 μL di latte, intero o scremato. Dopo aver incubato la sospensione a 37°C per 4 h vengono aggiunti 1,5 mL di soluzione acquosa 1 M di TRIS Base (Sigma-Aldrich) a $\text{pH} = 10,0$, 2 mL di Clarifyng Reagent[®] (Fluka) e 100 μL di soluzione 0,2 M di EDTANa_4 (Sigma-Aldrich). La sospensione viene agitata vigorosamente e incubata a 37°C per 2 min prima della lettura spettrofotometrica. L'assorbanza della soluzione chiarificata viene determinata a 410 nm rispetto al bianco reattivi in una cuvetta di quarzo entro 10 min dalla chiarificazione.

Il bianco reattivi è costituito da una soluzione contenente tutti i composti sopraelencati incluso il latte cui però viene preventivamente inattivato l'enzima mediante trattamento termico a 100°C per 5 minuti. Ovviamente il bianco subisce tutti gli step di analisi del campione, compresa l'incubazione a 37°C per quattro ore. La concentrazione del p-NF viene determinata per mezzo di una retta di taratura e convertita un unità di attività enzimatica (U).

6.4.2 Retta di taratura

Da una soluzione di standard primario contenete p-NF (Sigma-Aldrich) a concentrazione 0,5 mM vengono preparate, attraverso le opportune diluizioni, 5 soluzioni ciascuna 0,5 M in CH_3COONa , $\text{pH} 5,5$ e concentrazioni di p-NF crescenti e pari a 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM e 150 μM .

A 100 μL di ognuna delle 5 soluzioni vengono aggiunti 100 μL di latte inattivato, la soluzione viene incubata per 15 min a 37°C e chiarificata secondo quando riportato sopra.

L'assorbanza della soluzione viene letta a 410 nm contro il bianco reattivi entro 10 min.

6.4.3 Conversione in Unità di attività enzimatica (U):

Una unità di attività enzimatica di α -L-fucosidasi (U) è definita come la quantità di enzima capace di rilasciare 1 nmol di p-NF per ora a 37°C e $\text{pH} 5,5$.

La conversione viene effettuata tenendo conto della concentrazione di p-NF in soluzione e dei tempi di incubazione secondo l'equazione:

$$U = \frac{[pNF] \text{mmol} \cdot 0,2 \text{mL} \cdot 1 \times 10^6}{1000 \text{mL} \cdot 4 \text{h}} = \text{nmol} \cdot \text{h}^{-1}$$

Semplificando

$$U = [pNF] \cdot 50 = \text{nmol} \cdot \text{h}^{-1}$$

Le unità di attività enzimatica per mL di latte corrisponderanno quindi a:

$$U / \text{mL} = \frac{[pNF] \cdot 50}{0,1 \text{mL}} = \text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$$

6.5 Sviluppo della metodica RP-HPLC

La messa a punto e l'ottimizzazione delle due procedure spettrofotometriche per la determinazione dell'attività enzimatica della γ -glutamilttransferasi e dell' α -L-fucosidasi nel latte di origine ovina è certamente un risultato analitico di rilievo, che rende possibile poter affrontare lo studio dell'efficacia dei due enzimi come marker di blandi trattamenti termici in tale tipologia di matrice. E' necessario comunque riconoscere che la presenza dello step di chiarificazione del latte, una delle fasi cruciali del metodo spettrofotometrico, accresce in maniera significativa la complessità operativa della misura rendendola inoltre meno precisa e sensibile, soprattutto in quelle situazioni in cui è necessario misurare una bassa attività enzimatica. Ritenendo che tale aspetto fosse ostativo all'ottimale svolgimento delle attività di ricerca (ad esempio nell'analisi di latte trattato termicamente, o nell'ambito di una grande variabilità stagionale del parametro sotto monitoraggio, oppure ove si presenti la necessità di trasferire la metodica a matrici a minor attività enzimatica (formaggi), si è deciso di mettere a punto una metodica alternativa di analisi auspicabilmente più sensibile. E' stata quindi approntata una metodica RP-HPLC per la determinazione di entrambi gli enzimi in oggetto nel latte ovino sulla base del protocollo proposto da De Noni [2006] per la determinazione dell' α -L-fucosidasi nel latte vaccino. Anche in questo caso l'attività enzimatica viene quantificata monitorando il cromoforo rilasciato dall'enzima per reazione con il substrato aggiunto in soluzione, però a differenza dei protocolli spettrofotometrici le operazioni di chiarificazione vengono sostituite da una precipitazione delle proteine previa trattamento con etanolo e successiva centrifugazione. La maggiore stabilità della soluzione chiarificata (15 giorni a 4°C) e la maggiore semplicità operativa del protocollo permettono anche di processare contemporaneamente tutti i campioni.

Inoltre l'efficienza cromatografica delle moderne fasi stazionarie disponibili sul mercato consente di condurre la separazione dell'analita dalla frazione lipidica contenuta nell'estratto etanolicco senza ricorrere a fasi di clean-up.

L'ottimizzazione del protocollo di De Noni è stata effettuata sia per la determinazione della γ -glutamilttransferasi che quella dell' α -L-fucosidasi nel latte ovino. Nonostante la maggior complessità del latte ovino rispetto a quello bovino, i risultati ottenuti per l' α -L-fucosidasi appaiono del tutto confrontabili con quelli riportati dall'Autore per il latte

vaccino, mentre la determinazione RP-HPLC della γ -glutamilttransferasi nella matrice latte è del tutto priva di precedenti in letteratura. La maggior sensibilità della metodica ha permesso inoltre di compiere significativi progressi anche nella determinazione di tali enzimi nel formaggio, che in precedenza si era dimostrato matrice difficilmente analizzabile per via spettrofotometrica.

6.6 Protocollo per la determinazione RP-HPLC dell' α -L-fucosidasi nel latte ovino

6.6.1 Materiali e metodi

La determinazione dell'attività enzimatica via RP-HPLC si basa sempre sul dosaggio del p-NF idrolizzato dal substrato sintetico per mezzo dell'enzima presente nel latte (**Paragrafo 6-4**). A 100 μ L di soluzione substrato-tampone 5 mM in p-NFP (Sigma-Aldrich) e 0,5 M in tampone CH₃COONa a pH = 5,5 (Sigma-Aldrich), vengono aggiunti 100 μ L di latte, intero o scremato. Dopo aver incubato la sospensione a 37°C per 4 h. Portata a termine l'incubazione vengono aggiunti al campione 1,5 mL di Tris base (Sigma-Aldrich) 1 M a pH = 10,0 per bloccare l'attività enzimatica e 3,5 mL di etanolo (Sigma-Aldrich). La soluzione viene centrifugata a 4500 *rpm* per 5 min a temperatura ambiente. 50 μ L del surnatante limpido vengono quindi analizzati tramite metodo RP-HPLC con rivelazione UV-Vis. La **Tabella 6-8** dà dettaglio delle condizioni operative.

Tempo (min)	Composizione percentuale (flusso 1 mL min ⁻¹)	
	Acetonitrile	H ₂ O
	(1% CH ₃ COOH)	(1% CH ₃ COOH)
0	10%	90%
16	42%	58%
18	100%	0%
20	100%	0%
25	10%	90%

λ = 315 nm

Tabella 6-8: Condizioni strumentali operative per la determinazione RP-HPLC del p-nitrofenolo nel latte ovino.

La fase di quantificazione del p-NF avviene per interpolazione con idonea curva di calibrazione nel range 5 – 150 μM. L'attività enzimatica viene calcolata come segue:

$$U = \frac{[pNF] \text{ mmol} \cdot 0,2 \text{ mL} \cdot 1 \times 10^6}{1000 \text{ mL} \cdot 4 \text{ h}} = \text{nmol} \cdot \text{h}^{-1}$$

Semplificando

$$U = [pNF] \cdot 50 = \text{nmol} \cdot \text{h}^{-1}$$

Le unità di attività enzimatica per mL di latte corrisponderanno quindi a:

$$U / \text{mL} = \frac{[pNF] \cdot 50}{0,1 \text{ mL}} = \text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Il cromatogramma acquisito (**Figura 6-3**) mostra i tempi di ritenzione del substrato (12,3 min) e del cromoforo (18,2 min) rispettivamente. Si noti l'assenza di specie interferenti nel range di tempi di ritenzione interessati alla eluizione di substrato e

cromoforo e la netta separazione e risoluzione a livello della linea di base di ambe le specie.

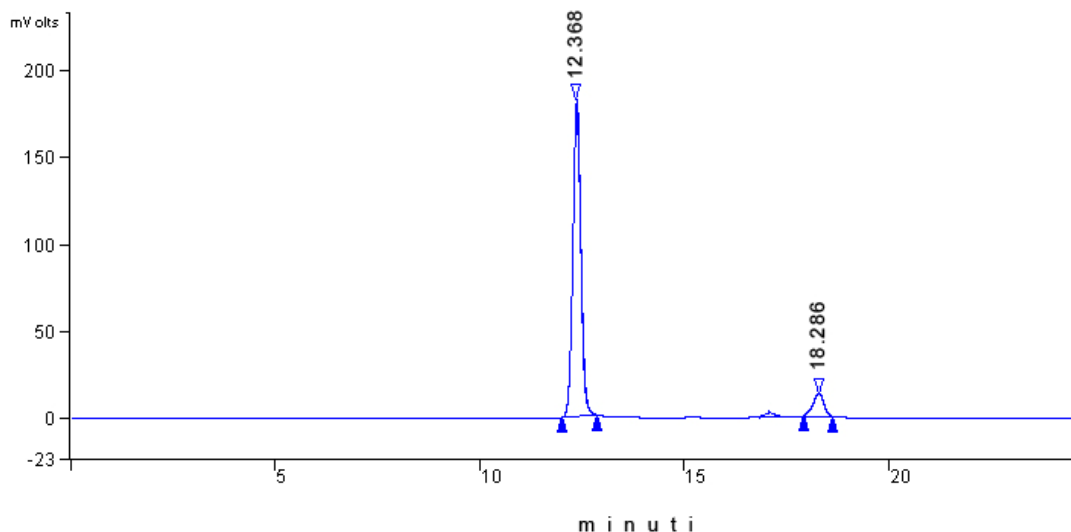


Figura 6-3: Tipico cromatogramma acquisito nella determinazione RP-HPLC del p-nitrofenolo nel latte ovino

6.7 Protocollo per la determinazione RP-HPLC della γ -glutamyltransferasi nel latte ovino

6.7.1 Materiali e metodi

Anche in questo caso la determinazione dell'attività enzimatica della γ -glutamyltransferasi si basa sul dosaggio della p-NA idrolizzata dal substrato sintetico per mezzo dell'enzima presente nel latte (**Paragrafo 6-3**).

A 500 μ L di soluzione substrato-tampone 4 mM in γ -GPNA (Sigma-Aldrich), 40 mM in Glygly (Sigma-Aldrich), e 0,2 M in tampone TRIS-HCl a pH = 8,5 (Sigma-Aldrich), preventivamente incubata per 2 min a 37°C, vengono aggiunti 20 μ L di latte ovino, intero o scremato. Dopo aver incubato la sospensione a 37°C per 15 min. Vengono

quindi aggiunti 500 μL di Tris base (Sigma-Aldrich) 1 M a $\text{pH} = 10,0$ per bloccare l'attività enzimatica e 2,5 mL di etanolo (Sigma-Aldrich), la soluzione viene centrifugata a 4500 *rpm* per 5 min a temperatura ambiente. 50 μL del surnatante limpido vengono quindi analizzati tramite metodo RP-HPLC con rivelazione UV-Vis. La **Tabella 6-9** dà dettaglio delle condizioni operative.

Tempo (min)	Composizione percentuale (flusso 1 mL min ⁻¹)	
	Acetonitrile (1% CH ₃ COOH)	H ₂ O (1% CH ₃ COOH)
0	10%	90%
16	42%	58%
18	100%	0%
20	100%	0%
25	10%	90%

$\lambda = 368$

Tabella 6-9: Condizioni strumentali operative per la determinazione RP-HPLC della p-nitroanilina nel latte ovino.

La fase di quantificazione del p-NA avviene per interpolazione con idonea curva di calibrazione nel range 5 – 150 μM . L'attività enzimatica viene calcolata come segue:

$$U = \frac{[pNA] \text{mmol} \cdot 0,5 \text{mL} \cdot 1000 \cdot (D)}{1000 \text{mL} \cdot 15 \text{min}} = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$$

Semplificando :

$$U = [pNA] \cdot 0,03\bar{3} \cdot (D) = \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$$

Dalla quale è possibile ricavare le unità di attività enzimatica per mL di latte:

$$U / \text{mL} = \frac{[pNA] \cdot 0,03\bar{3} \cdot (D)}{0,020 \text{mL}} = \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

Il cromatogramma acquisito (**Figura 6-4**) presenta i tempi di ritenzione del substrato e del cromoforo a 8,9 min e a 19,4 min rispettivamente. Anche in questo caso la separazione cromatografica di substrato e cromoforo appare eccellente.

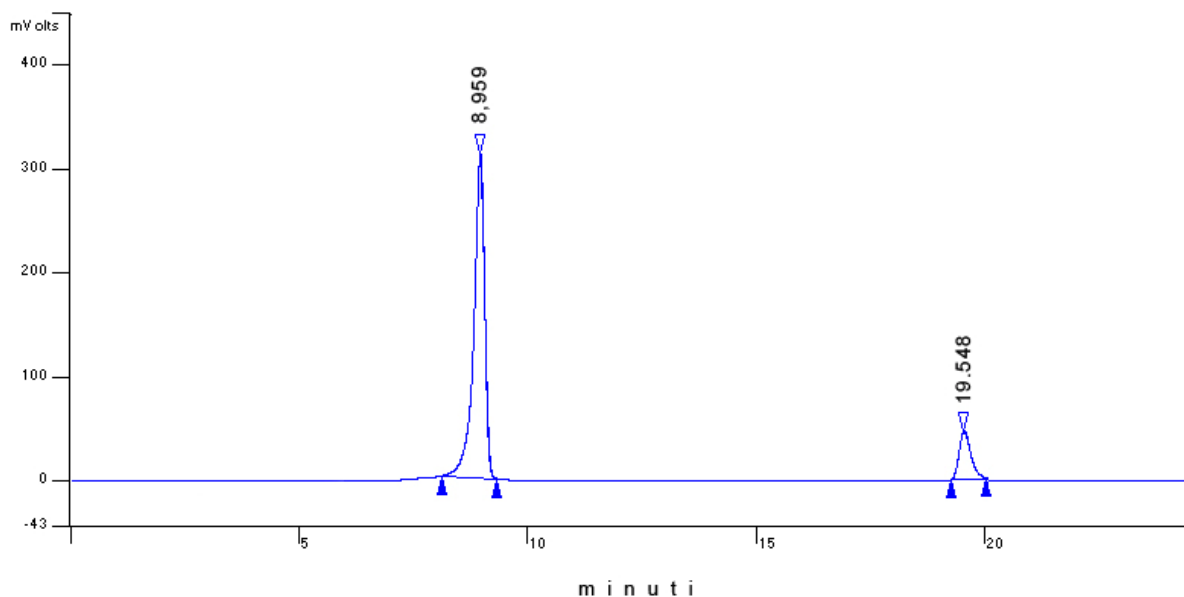


Figura 6-4: Tipico cromatogramma acquisito nella determinazione RP-HPLC della p-nitroanilina nel latte ovino.

6.8 Conclusioni

Le modifiche da noi introdotte alla fase di chiarificazione del protocollo spettrofotometrico proposto da Blel [2002] per la determinazione della γ -glutamilttransferasi nel latte vaccino hanno permesso il trasferimento di questo protocollo analitico sul latte ovino con migliorate performance analitiche. Lo stesso protocollo analitico è stato applicato, con minime variazioni (pH in fase d'incubazione) alla determinazione dell' α -L-fucosidasi ottenendo migliori risultati, in termini di sensibilità e precisione, rispetto a quelli in passato ottenuti da McKellar [2000] su latte bovino, e questo nonostante che i maggiori tenori di sostanza grassa e di materiale proteico rendessero maggiormente interferente la matrice latte ovino. Si è avuto modo di accertare che i motivi dell'interferenza analitica sono principalmente da ascrivere alla componente proteica e non sostanza grassa.

Si è inoltre messo a punto un metodo RP-HPLC per la determinazione dei due enzimi nel latte ovino traendo ispirazione dal lavoro di De Noni [2006] relativo alla determinazione dell' α -L-fucosidasi nel latte vaccino. Il metodo appare essere meno macchinoso, più sensibile e più preciso rispetto a quello spettrofotometrico, inoltre la maggiore stabilità della soluzione chiarificata ha permesso di processare tutti i campioni contemporaneamente e di automatizzarne la lettura cromatografica.

La validazione dei due protocolli permetterà di oggettivare quanto affermato in merito alle prestazioni analitiche.

7 Validazione delle metodiche analitiche

L'affidabilità dei metodi analitici è un requisito fondamentale richiesto dalle normative nazionali ed internazionali per tutte le aree d'analisi. E' quindi internazionalmente riconosciuto che i laboratori di prova e di taratura devono adottare misure per il controllo di qualità atte a certificare la propria capacità nel fornire dati di adeguata qualità. Queste misure includono:

- l'adozione di metodi validati
- l'adozione di un controllo interno di qualità
- la partecipazione a Studi Collaborativi tra diversi laboratori o a Proficiency Tests
- l'accreditamento per Standard di competenza Internazionali, normalmente UNI CEI EN ISO/IEC 17025

E' opportuno sottolineare che la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 ha, tra i suoi requisiti principali, la messa in atto di un sistema per la rintracciabilità della misura, così come la verifica di un'ampia gamma di requisiti tecnici e di management del laboratorio inclusi i punti riportati nella lista.

La validazione dei metodi è pertanto uno dei concetti cardine previsto dalla norma e rappresenta *“la conferma, mediante accertamento di evidenze obiettive, che i requisiti particolari per l'uso specifico stabilito sono soddisfatti”* [UNI CEI, 2000].

In alcuni settori specifici, principalmente in quelli che operano nell'ambito del controllo degli alimenti, l'utilizzo di metodi validati è una condizione prescrittiva di legge.

Nel caso più generale, la validazione del metodo di analisi chimica riguarda l'intera procedura analitica, ossia l'insieme delle operazioni teoriche, pratiche ed operative attraverso le quali vengono definite le esigenze del committente e le soluzioni che il chimico analitico propone per risolvere in modo soddisfacente quanto richiesto dal committente.

Punti focali nell'impostazione dello studio di validazione sono:

- La valutazione preliminare dei metodi presumibilmente adatti a risolvere il problema specifico in esame.
- La definizione quantitativa dei parametri di qualità da valutare.
- La scelta di un metodo.
- La valutazione del metodo selezionato alla luce dei valori prefissati dei parametri di qualità.
- La scelta di metodi alternativi qualora quello prescelto si dimostri non adatto.

La norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 indica, con ampi margini di scelta, quelli che dovrebbero essere i parametri di qualità presenti nel protocollo di validazione. Sono inoltre disponibili numerosi documenti riportanti sia protocolli operativi che linee guida per la predisposizione della validazione del metodo. Tra questi i più diffusi sono quelli prodotti dall'AOAC International, dall'International Conference on Harmonization e dall'EURACHEM. Nel nostro lavoro di tesi è stato seguito il protocollo sviluppato dall'EURACHEM specifico per i laboratori chimici.

I parametri di qualità indicati dal protocollo EURACHEM sono qui di seguito riportati:

- Selettività/specificità
- Limite di rivelabilità
- Limite di quantificazione
- Range dinamico/lineare
- Accuratezza
- Precisione

7.1 Limiti di rivelabilità e quantificazione

Il limite di rivelabilità viene definito come *“la più bassa quantità di analita che produce un segnale significativamente diverso dal bianco”* [ISO 11843].

In letteratura esistono vari modelli per il calcolo del limite di rivelabilità che spesso si basano sulle diverse interpretazioni che l'espressione *“significativamente diverso”* può generare [G.L. Long, J.D. Winefordner, 1983] [Currie, 1999].

Probabilmente il più utilizzato è il modello EPA [Curie, 1995], da noi utilizzato anche in questa circostanza, ed in genere preferito ove si riesca a calcolare con sufficiente

accuratezza il segnale del bianco ed ove il coefficiente angolare della retta di calibrazione non vari significativamente a basse concentrazioni di analita. Esso si basa sull'esecuzione di un elevato numero di repliche del bianco e sul calcolo della deviazione standard σ_b dei segnali ottenuti; il limite di rivelabilità viene quindi definito come segue:

$$LdR = \frac{3,3 \cdot \sigma_b}{b}$$

ove σ_b è la deviazione standard del segnale del bianco e b è la pendenza della curva di regressione (segnale/concentrazione) ottenuto col metodo dei minimi quadrati.

I campioni di enzima a concentrazione prossima al limite di rivelabilità sono stati realizzati attraverso diluizioni crescenti di latte crudo con latte inattivato termicamente. Per ogni metodica sono state effettuate 10 misurazioni del segnale del bianco. Il dato di assorbanza ottenuto viene quindi convertito un unità di attività enzimatica tramite l'impiego delle relazioni riportate nel **Capitolo 6**.

In **Tabella 7-1** sono riassunti i valori ottenuti per il latte ovino e confrontati con quelli presenti in letteratura per il latte vaccino (valori tra parentesi).

<i>L.d.R.</i>		
<i>Protocollo</i>	<i>γ-glutamyltransferasi mU mL⁻¹</i>	<i>α-L-fucosidasi U mL⁻¹</i>
Spettrofotometrico	2,84; (7,1)*	2,37; (3,23)**
RP-HPLC	1,52;	1,24; (1,5)***

Tabella 7-1: Limiti di rilevabilità ottenuti attraverso i due metodi analitici per le determinazioni enzimatiche nel latte ovino e vaccino (valori tra parentesi). * Blel 2002; **McKellar 2000; * De Noni 2006.**

Come si può notare, i valori dei detection limit ottenuti sono sempre migliori (in talune circostanze anche in maniera piuttosto significativa, vedi la determinazione spettrofotometrica dell'attività della γ -glutamyltransferasi) di quelli finora riportati in letteratura.

Il limite di quantificazione è definito come la minima concentrazione di analita quantificabile con certezza. In genere la sua stima si basa sulla scelta arbitraria di un livello di confidenza rispetto al limite di rivelabilità:

$$L.d.Q. = 3 L.d.R.$$

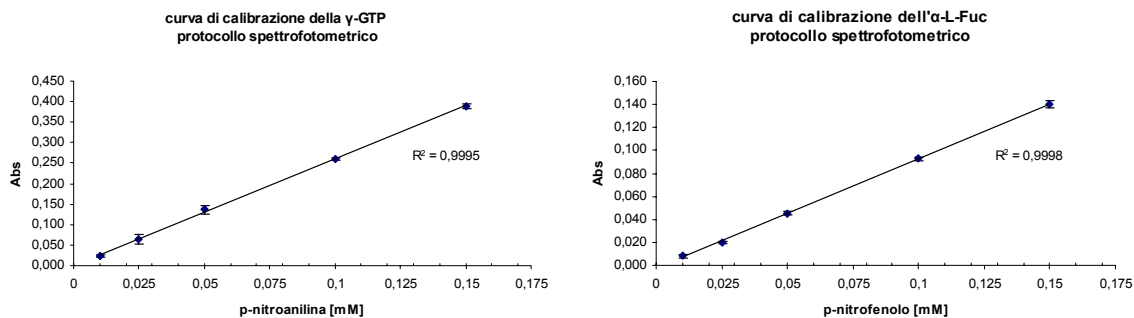
Pertanto il valori ottenuti per entrambi gli enzimi relativi ai due protocolli analitici saranno:

<i>Protocollo</i>	<i>γ-glutamyltransferasi mU mL⁻¹</i>	<i>α-L-fucosidasi U mL⁻¹</i>
Spettrofotometrico	8,52	7,11
RP-HPLC	4,56	3,72

Tabella 7-2: Limiti di quantificazione ottenuti attraverso i due protocolli analitici per le determinazioni enzimatiche nel latte ovino.

7.2 Linearità e range di applicabilità

La linearità e il range di applicabilità del metodo d'analisi sono stati valutati sulla base dei parametri di regressione ottenuti dalla curva di calibrazione costruita secondo quanto riportato per entrambi gli enzimi nei diversi protocolli analitici (**Capitolo 6**).



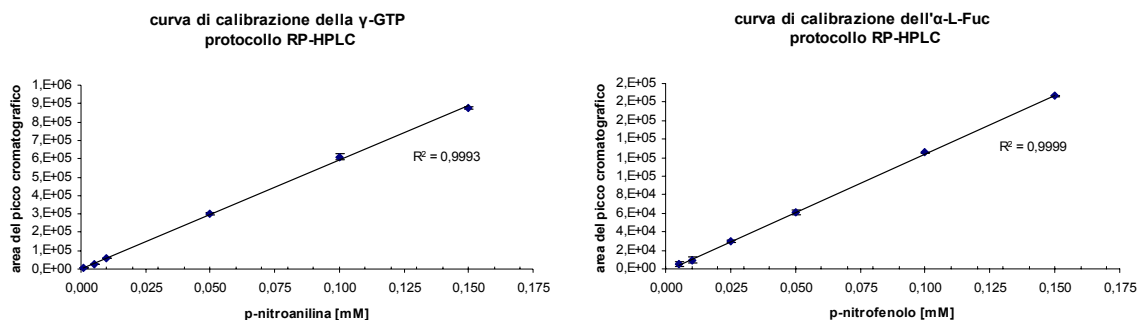


Grafico 7-1: Funzioni di calibrazione ottenute per i quattro metodi analitici.

<i>Equazione della retta di calibrazione</i>		
<i>Protocollo</i>	<i>γ-glutamyltransferasi</i>	<i>α-L-fucosidasi</i>
Spettrofotometrico	$y=(2,654\pm 0,013)x-0,002\pm 0,001$ $r^2=0,9995$	$y=(0,953\pm 0,008)x-0,002\pm 0,001$ $r^2=0,9998$
Range di linearità	$10 \mu M - 150 \mu M$	$10 \mu M - 150 \mu M$
RP-HPLC	$y=(5.917.738\pm 80.897)x-1.854\pm 6.189$ $r^2=0,9993$	$y=(1.262.584\pm 7.515)x-2.111\pm 580$ $r^2=0,9999$
Range di linearità	$1 \mu M - 150 \mu M$	$5 \mu M - 150 \mu M$

Tabella 7-3: Equazioni e coefficienti di correlazione delle funzioni di calibrazione ottenute per i quattro metodi analitici.

Il confronto, attraverso l'analisi del t di Student, tra i t calcolati relativi all'intercetta e quelli tabulati per $t_{0,025, v = n-2}$ ha permesso di verificare che, in tutti e quattro i casi, l'intercetta non è significativamente diversa da zero, dimostrando che la relazione di dipendenza tra assorbanza A e concentrazione C del cromoforo è nella forma canonica prevista dall'equazione di Lambert e Beer:

$$A = K \cdot C$$

In particolare, l'assorbanza tende a zero ove la concentrazione del cromoforo tenda anch'essa a zero.

I valori di r^2 ottenuti sono maggiori di 0,999: questo è già in sè indice di confortante correlazione lineare tra le due variabili; tuttavia la mera valutazione del coefficiente di

correlazione può a volte nascondere andamenti che si discostano comunque dalla linearità.

A riguardo, un test integrativo probante è quello che sfrutta l'analisi grafica dei residui della regressione, ove per residuo s'intende la differenza tra il valore osservato ed il valore predetto delle y dalla retta di regressione; detto test si effettua ponendo sull'asse delle ascisse i valori delle concentrazioni utilizzate per costruire la curva e sulle ordinate i residui.

Nella valutazione del grafico dei residui si deve tener conto di:

- forma
- numero di residui positivi e negativi
- distribuzione casuale del segno dei residui

In **Figura 7-1** sono mostrati i quattro possibili casi teorici.

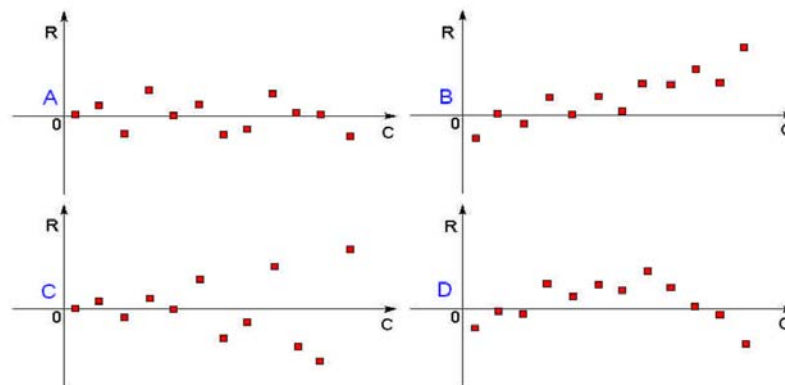


Figura 7-1

- A. correlazione lineare: distribuzione casuale attorno allo zero, errore costante (omoschedastico)
- B. pendenza errata
- C. errore distribuito in modo non costante (eteroschedastico)
- D. deviazione dalla linearità

Nei diagrammi sotto riportati mostriamo l'andamento dei residui relativi ai quattro metodi analitici da noi in fase di validazione.

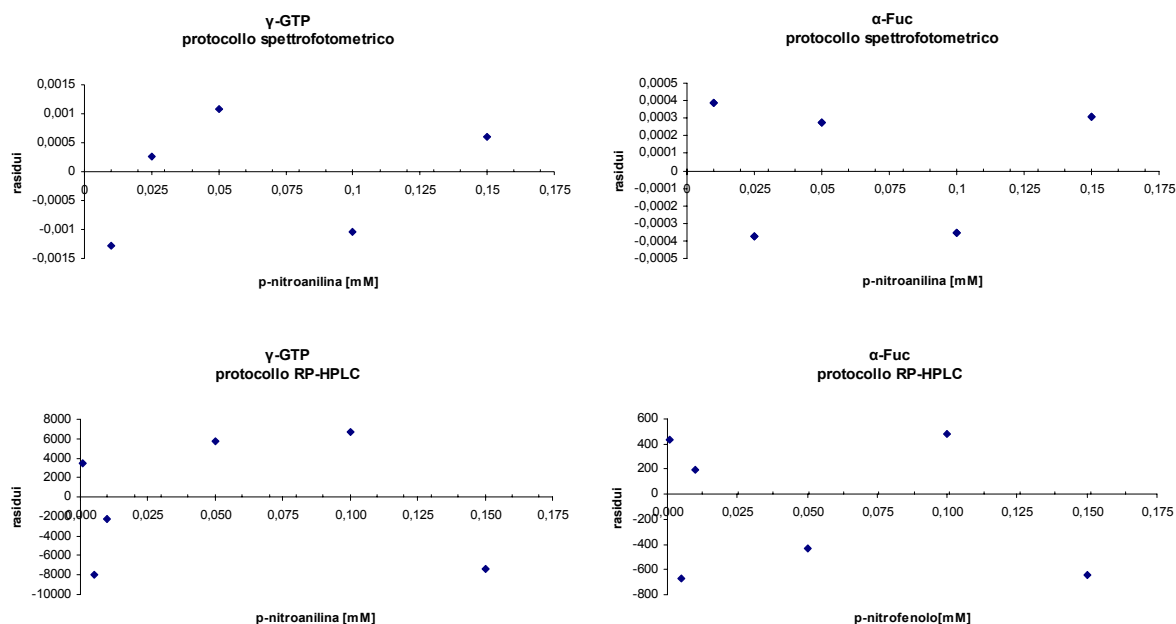


Grafico 7-2: Andamento dei residui relativi ai quattro metodi analitici

Possiamo notare che tutti gli andamenti corrispondono al caso teorico A di correlazione lineare. I grafici relativi alla determinazione dell'attività enzimatica di ambedue gli enzimi sia con il metodo spettrofotometrico che con quello RP- HPLC presentano una distribuzione dei residui randomizzata attorno allo zero con un errore pressoché costante per tutto l'intervallo di concentrazioni considerato.

7.3 Specificità

Nel nostro caso la specificità è concetto intrinsecamente insito nella metodica analitica messa a punto, in quanto l'attività enzimatica viene determinata attraverso la valutazione della concentrazione di un cromoforo rilasciato per reazione tra l'enzima presente nel latte ed un substrato sintetico opportunamente aggiunto. Abbiamo comunque verificato che la reazione che genera il cromoforo dal substrato avvenga solo ed esclusivamente ad opera dell'enzima, attraverso l'analisi ripetuta di un campione di bianco reagenti in presenza di latte enzimaticamente inattivato preparato secondo quanto riportato nei rispettivi protocolli spettrofotometrici ed RP-HPLC.

È stata quindi valutata la stabilità del bianco relativamente ad ogni enzima effettuando 6 letture di assorbanza ad intervalli di 15 min per i protocolli spettrofotometrici, e quattro corse cromatografiche ad intervalli di un'ora per i protocolli RP-HPLC.

E' stata quindi valutata la retta di regressione ai minimi quadrati ottenuta ponendo in relazione i valori di assorbanza ottenuti per ciascuna delle repliche contro il numero d'ordine di ciascuna misura replicata. Si è ritenuto che la misura analitica del bianco fosse costante all'interno di ciascun set di repliche se, nell'ambito dell'espressione della retta di regressione

$$Y = (b \pm s_b)X + (a \pm s_a)$$

$|s_a| > |a|$. Ciò implica che il valore zero possa considerarsi interno all'intervallo $b \pm s_b$ con una probabilità statistica pari al 68,3%. La valutazione dell'analisi dei residui ci ha inoltre permesso di escludere, in tutte le situazioni, la presenza di lente derive dell'assorbanza del bianco.

<i>Protocollo</i>	<i>γ-glutamyltransferasi</i> ($a \pm s_a$); ($b \pm s_b$)	<i>α-L-fucosidasi</i> ($a \pm s_a$); ($b \pm s_b$)
Spettrofotometrico	0,0037 ± 0,0068 ; 0,0011 ± 0,0017 (λ = 410 nm)	0,0003 ± 0,0012 ; 0,0028 ± 0,0032 (λ = 410 nm)
RP-HPLC	19572 ± 20618 ; 1717 ± 7528 (λ = 368 nm)	1103 ± 1183 ; 342 ± 395 (λ = 315 nm)

Tabella 7-4

7.4 Accuratezza

L'accuratezza è la misura dell'accordo tra il valore medio ottenuto da una serie numerosa di risultati e il valore di riferimento accettato. Le varie fasi del procedimento analitico possono incidere in diversa misura sull'accuratezza del metodo, determinando una sottostima o una sovrastima della concentrazione di analita e dando quindi luogo ad un errore sistematico, il **bias**.

In passato il **bias** è stato usato come sinonimo di *inaccuratezza*, oggi invece al termine *accuratezza* si dà un significato più completo: è una grandezza vettoriale le

cui componenti sono per l'appunto il **bias** e la **precisione**. In altre parole un metodo si può dire accurato se è esente da errori sistematici, che rendono il valore ottenuto sperimentalmente differente dal valore vero, e se è dotato di elevata precisione, cioè con una distribuzione molto stretta delle misure attorno al valor vero.

7.4.1 Stima della precisione

La precisione si definisce come il grado di accordo tra una serie di misure ripetute, eseguite sullo stesso campione. In prima accezione essa è rappresentata numericamente dalla *stima della deviazione standard* s . A seconda delle modalità con cui vengono acquisite le misure si può meglio parlare di precisione in termini di *ripetibilità* e *riproducibilità*.

La *ripetibilità* (r) di un metodo esprime l'accordo fra una serie di misure ottenute sullo stesso campione, da uno stesso operatore, applicando quello specifico metodo, nelle stesse condizioni sperimentali (stesso laboratorio e identica strumentazione), nell'ambito della stessa sessione di misura.

La *riproducibilità* (R) di un metodo si definisce invece come l'accordo fra una serie di misure ottenute sullo stesso campione da operatori diversi, applicando quello specifico metodo in diverse condizioni sperimentali e diverse giornate.

Queste due grandezze sono state determinate applicando il protocollo spettrofotometrico e quello RP-HPLC per la determinazione di entrambi gli enzimi allo stesso campione di latte. Le aliquote utilizzate per la stima della riproducibilità sono state conservate alla temperatura di -24°C al fine di prevenire la degradazione del latte e mantenere inalterata la stabilità degli enzimi [De Noni, 2006].

I risultati ottenuti, espressi come deviazione standard relativa ($C.V.\%$), sono riassunti nella **Tabella 7-5** e confrontati con quelli riportati in letteratura per il latte vaccino (valori tra parentesi).

Protocollo	C.V.% (n=10)			
	<i>γ</i> -glutamilttransferasi		<i>α</i> -L-fucosidasi	
	<i>r</i>	<i>R</i>	<i>r</i>	<i>R</i>
Spettrofotometrico	3,5; (3,0)*	3,8	4,3; (6,0)**	5,9
RP-HPLC	2,9	3,9	4,5; (6,0)***	5,5

Tabella 7-5: Coefficienti di variazione percentuale ottenuti attraverso i quattro metodi analitici nel latte ovino e vaccino (valori tra parentesi). * Blel 2002; **McKellar 2000; * De Noni 2006.**

Un sistema adottato per stabilire il range di accettabilità delle performance di precisione utilizza il modello matematico sviluppato dal William Horwitz [Horwitz, 1982]. Tale modello descrive l'andamento dei coefficienti di variazione percentuale ($C.V._R\%$) del parametro riproducibilità in funzione della concentrazione. Horwitz sviluppò l'equazione in maniera empirica mediante l'analisi di un'elevata serie di dati prodotti nel corso di studi collaborativi dall'organizzazione AOAC International. Il data set è costituito da 7502 records e riporta i risultati di riproducibilità di un'ampia gamma di studi collaborativi prodotti nella fase finale di validazione interlaboratorio. I dati sono stati prodotti nel periodo tra il 1915 e il 1995. I metodi studiati coprono l'intera gamma di tecniche analitiche così come i range di concentrazione esaminato. Ponendo in grafico il coefficiente di variazione ($CV\%$) in funzione della concentrazione si trova che la diminuzione della concentrazione di due ordini di grandezza produce un raddoppio del coefficiente di variazione. Horwitz sviluppò quindi un modello matematico capace di interpretare questo andamento. In particolare si può notare che tra il coefficiente di variazione percentuale di riproducibilità e la concentrazione vige la seguente relazione empirica:

$$C.V._R\% = 2^{1-0,5\text{Log}C}$$

ove C è la concentrazione espressa come frazione decimale, e il $C.V._R\%$ è il coefficiente di variazione percentuale di riproducibilità.

Dall'equazione precedente ne deriva un'altra equivalente, che mette in relazione la deviazione standard di riproducibilità con la concentrazione

$$S_R = 0,02C^{0,8495}$$

Questa, espressa in forma logaritmica, diventa

$$\log_{10} S_R = 0,8495 \cdot \log_{10} C - 1,699$$

Ponendo in grafico il logaritmo della deviazione standard di riproducibilità in funzione del logaritmo della concentrazione l'intero set di dati analizzati da Horwitz produce l'andamento riportato in **Figura 7-2**.

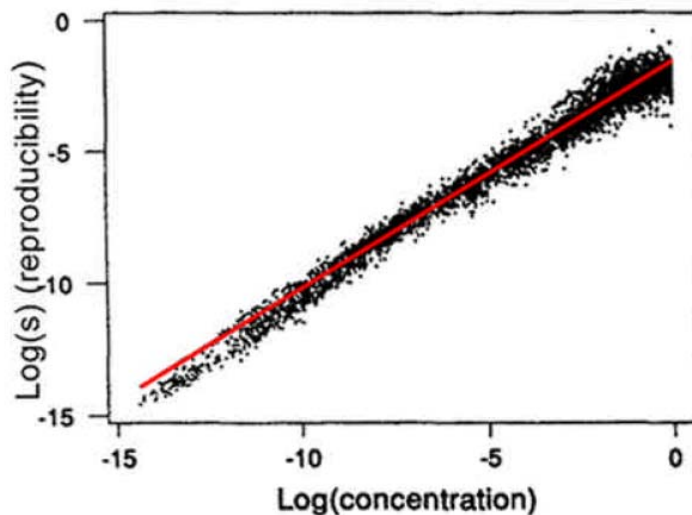


Figura 7-2: Set completo dei dati analizzati da Horwitz in grafico logaritmico; ponendo sull'asse delle ascisse il logaritmo della concentrazione, espressa come frazione di massa, e sull'asse delle ordinate il logaritmo della deviazione standard di riproducibilità i dati assumono un andamento lineare.

Dal grafico è possibile estrapolare un andamento lineare che consente di correlare le concentrazioni alle deviazioni standard di riproducibilità.

Questo andamento consente di trarre le seguenti considerazioni:

- il CV% è indipendente dalla natura dell'analita, dalla matrice e dal metodo analitico ma dipende soltanto dalla concentrazione
- la maggior parte dei dati sperimentali è compreso nell'intervallo

$$0,5 \cdot S_R < S_{sperim} < 1,5 \cdot S_R$$

e quindi

$$0,5 \cdot CV_R \% < CV_{sperim} \% < 1,5 \cdot CV_R \%$$

Equazione 7-1

Questo intervallo viene definito nella pratica di laboratorio “banda di Horwitz”.

- la precisione di ripetibilità può essere stimata 0,66 volte la precisione di riproducibilità per cui l'equazione di Horwitz relativa alla ripetibilità diventa:

$$CV_r \% = 0,66 CV_R \%$$

- durante gli 80 anni in esame la precisione non è aumentata apprezzabilmente nonostante l'evoluzione della tecnologia analitica.

Per queste considerazioni l'equazione di Horwitz è diventata un strumento utile per la valutazione delle performance di riproducibilità e ripetibilità di un metodo analitico; sulla base dell'**Equazione 7-1**, un $CV\%$ ottenuto sperimentalmente è ritenuto accettabile se inferiore al limite superiore della banda di Horwitz. A tale scopo viene utilizzato un parametro, chiamato indice HorRat, abbreviazione di **Horwitz Ratio**, uguale al rapporto tra il $CV\%$ ricavato sperimentalmente ($CV_{sperim}\%$) e il $CV\%$ calcolato mediante l'equazione di Horwitz. Il $CV_{sperim}\%$ è ritenuto accettabile quando l'indice HorRat è minore di 1,5.

Viene utilizzato L' $HorRat_R$ per valutare la riproducibilità

$$HorRat_R(H_0) = \frac{CV_{sperim} \%}{CV_R \%} < 1,5$$

Equazione 7-2

e $HorRat_r$ per valutare la ripetibilità

$$HorRat_r(H_0) = \frac{CV_{sperim} \%}{CV_r \%} < 1,5$$

Equazione 7-3

Secondo quanto riportato nelle **Equazioni 7-2 e 7-3** sono stati calcolati i $CV_R\%$ e i $CV_r\%$ ed i rispettivi indici di *HorRat* sulla base dei dati analitici raccolti durante la stima della precisione (**Tabella 7-5**) per tutti e due i protocolli analitici applicati alla determinazione di entrambi gli enzimi.

I valori ottenuti sono riassunti nella **Tabella 7-6**.

Protocollo	<i>HorRat</i>			
	<i>γ-glutamyltransferasi</i>		<i>α-L-fucosidasi</i>	
	<i>r</i>	<i>R</i>	<i>r</i>	<i>R</i>
Spettrofotometrico	0,38	0,33	0,57	0,52
RP-HPLC	0,38	0,34	0,60	0,48

Tabella 7-6: Indici di HorRat ottenuti sulla base dei dati analitici raccolti durante la stima della precisione

Poiché tutti gli indici di *HorRat* sono largamente inferiori a 1,5 possiamo affermare che i valori di precisione con cui si riescono a determinare ambedue gli enzimi con entrambi i protocolli analitici da noi messi a punto sono del tutto accettabili.

7.4.2 Stima dell'errore sistematico: il bias

Si tratta di un tipo di valutazione talvolta resa complessa dal fatto che non sempre è possibile analizzare matrici in cui l'analita è presente in concentrazioni note con accuratezza. La disponibilità di campioni certificati o di i Materiali Standard di Riferimento è infatti ristretta solo alle più comuni tipologie di matrice ed analiti. Ovviamente questo non è stato il caso nè della nostra matrice, il latte ovino, nè tantomeno dei due enzimi oggetto dei metodi analitici da noi messi a punto. Abbiamo pertanto ritenuto opportuno definire la stima del bias attraverso il confronto delle due metodiche analitiche.

Il principio è basato sull'estrema improbabilità che due tecniche indipendenti siano affette dagli stessi errori sistematici. Pertanto, riportando in un diagramma i valori dell'attività enzimatica (U) determinata nei campioni reali con entrambe le tecniche, si

possono ricavare importanti informazioni su presenza ed entità del bias dalla valutazione dei parametri di regressione lineare.

A tal proposito è stata determinata l'attività enzimatica di nove campioni distribuiti su tre livelli di concentrazione per entrambi gli enzimi.

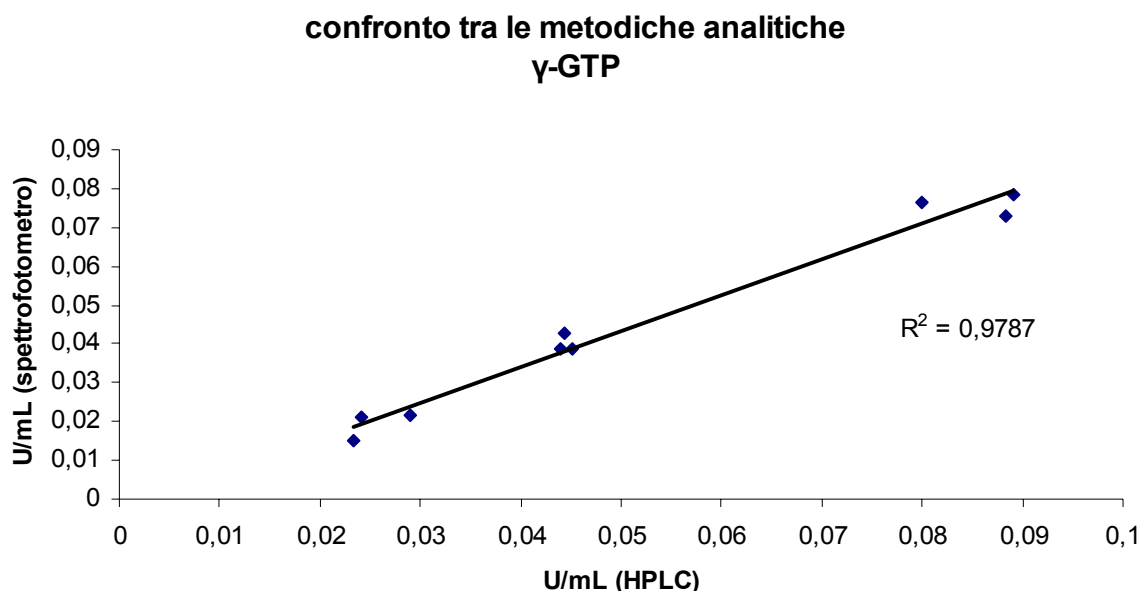


Grafico 7-3: Confronto tra le due metodiche di analisi per la determinazione della γ-glutamilttransferasi.

I valori della pendenza e dell'intercetta della funzione di correlazione ottenuta, $y=(0,9281\pm 0,052)x-(0,0031\pm 0,0030)$ vengono confrontati, attraverso il t-test, con quelli della funzione di correlazione attesa ove il bias sia nullo, ossia $y = x$.

Le valutazioni dei t sperimentali (t_{sp}) e teorici (t_c) fatta per il coefficiente angolare e per l'ordinata all'origine conducono pertanto a:

$$t_{sp} = (1-0,9281)/0,052 = 1,43 < t_{c(0,05/2,9)} = 2,262$$

$$t_{sp} = (0-0,0031)/0,0030 = 1,03 < t_{c(0,05/2,9)} = 2,262$$

Poiché in ambo le situazioni i valori del t sperimentale risultano inferiori a quelli del t tabulato si può affermare che sia pendenza che l'intercetta all'origine della funzione di correlazione ottenuta non differiscano significativamente rispettivamente da 1 e 0.

Pertanto, nell'intervallo di concentrazioni considerato, i due protocolli forniscono risultati di attività enzimatica della γ -glutamilttransferasi statisticamente coincidenti.

Ad analogo risultato si perviene per validazione incrociata dei due metodi messi a punto per la determinazione dell'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi.

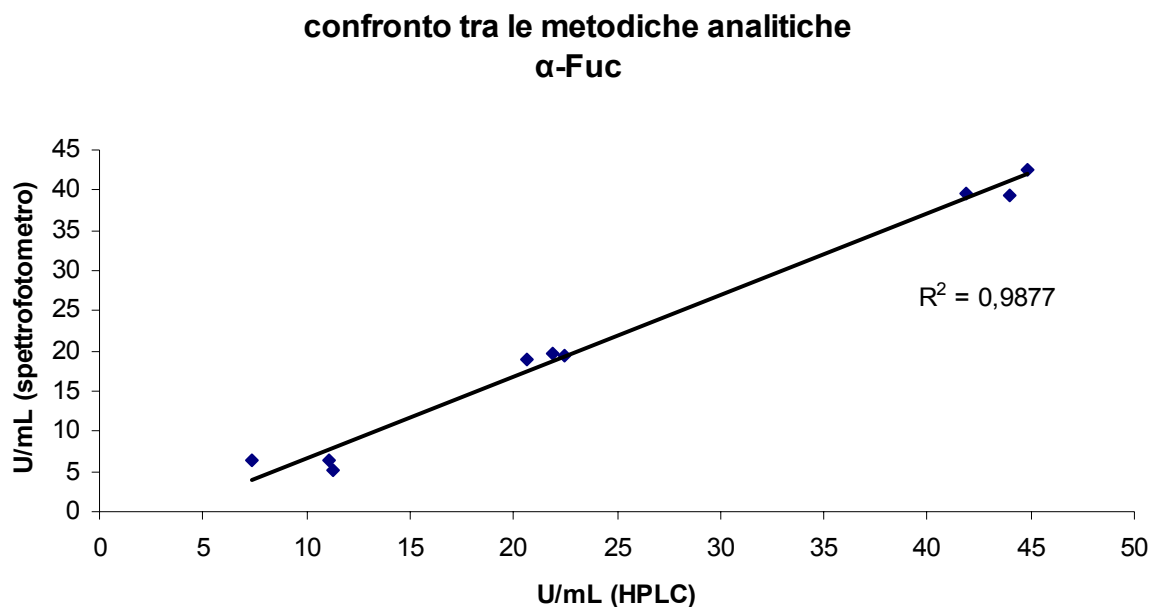


Grafico 7-4: Confronto tra le due metodiche di analisi per la determinazione dell' α -L-fucosidasi.

In questo caso la funzione di correlazione è $y=(0,9531 \pm 0,065)x-(2,640 \pm 1,927)$.

$$t_{sp} = (1-0,9531)/0,065 = 0,7 < t_{0,05/2,9} = 2,262$$

$$t_{sp} = (0-2,640)/1,927 = 1,3 < t_{0,05/2,9} = 2,262$$

7.5 Conclusioni

Attraverso un completo percorso di validazione è stato possibile valutare, mediante l'accertamento di evidenze obiettive, le prestazioni analitiche dei due protocolli messi a punto dal nostro gruppo di ricerca per determinazione dell'attività enzimatica della γ -glutamilttransferasi e dell' α -L-fucosidasi nel latte ovino.

Il confronto dei risultati ottenuti con i pochi presenti in letteratura e relativi alla loro determinazione nel latte vaccino, ha dimostrato che sebbene il latte ovino sia una matrice indiscutibilmente più complessa, i protocolli proposti in questo lavoro di tesi si sono dimostrati quasi sempre migliori, rispetto a quelli finora noti. I valori di sensibilità analitica sono sempre migliori rispetto a quelli di riferimento. Tutti i metodi hanno evidenziato un esteso e reale campo di linearità (tra 10 e 150 μ M per il metodo spettrofotometrico, tra 5 e 150 μ M per quello cromatografico). La precisione, valutata in termini di ripetibilità e di riproducibilità, si è dimostrata quasi sempre superiore ai valori riportati in letteratura. I dati di precisione si sono inoltre dimostrati accettabili attraverso la valutazione del rapporto HorRat. I metodi proposti si sono infine mostrati privi di errore sistematico.

8 Inattivazione termica della γ -glutamilttransferasi e dell' α -L-fucosidasi nel latte ovino

Una volta messi a punto e validati i protocolli analitici per la determinazione dell'attività enzimatica della γ -glutamilttransferasi e della α -L-fucosidasi nel latte ovino abbiamo proceduto allo studio della loro inattivazione in seguito ai trattamenti termici, riproducendo le condizioni tipiche dei trattamenti di termizzazione e pastorizzazione previsti nella direttiva comunitaria 92/46 CEE.

<i>Tipo di trattamento</i>	<i>Temperatura/tempo</i>
Pastorizzazione	71,7°C/15 s
Termizzazione	57-68°C/15 s
Crudo	< 40°C

Tabella 8-1: Condizioni tempo temperatura previste per i blandi trattamenti termici nella direttiva comunitaria 92/46 CEE.

8.1.1 Procedura sperimentale

I trattamenti termici subiti dal latte ovino al fine di monitorare l'inattivazione degli enzimi in studio sono stati realizzati come segue: circa 100 mL di latte intero sono stati portati, sotto agitazione, alla temperatura di 37°C per immersione in opportuno bagno termostato. Tale accorgimento è stato effettuato al fine di ridurre quanto possibile il tempo necessario al raggiungimento della temperatura di test ed omogeneizzare la fase grassa del latte. Nel frattempo, in un secondo bagno

termostato ad acqua, accuratamente termoregolato tramite un sistema di controllo digitale, accuratezza $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, sono stati introdotti dei capillari di vetro 4x5 mm (diametro interno x diametro esterno) sigillati ad un'estremità, aventi capacità di circa 1,5 mL. Una volta che il capillare è giunto all'equilibrio termico con il bagno termostatico, si introduce rapidamente 1 mL di latte. Una termocoppia inserita all'interno del capillare garantisce la misurazione in tempo reale della temperatura del sistema. Il capillare permane nel bagno termostatico per il tempo necessario al trattamento, poi viene immediatamente trasferito entro un bagno a ghiaccio per il raffreddamento.

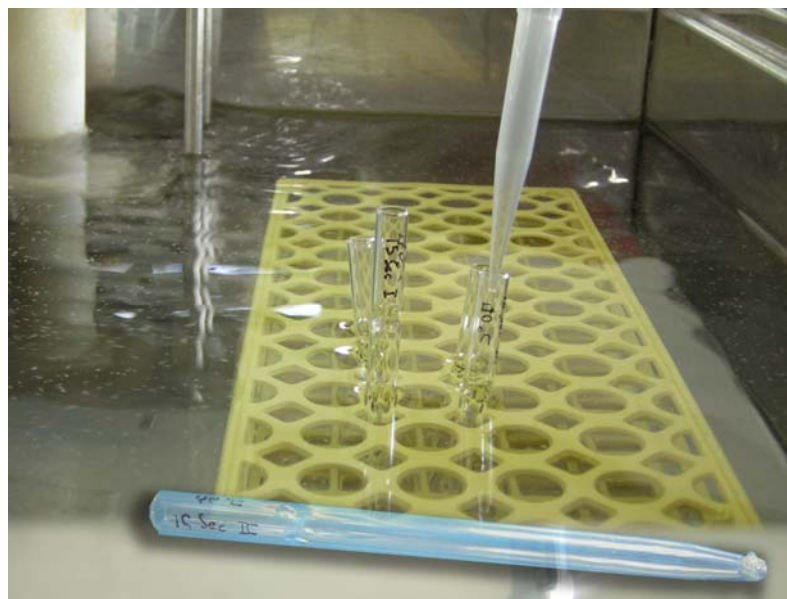


Figura 8-1: Bagno termostatico e capillari utilizzati per sottoporre il latte ai trattamenti termici.

Effettuando dei trattamenti termici a temperature comprese tra i $40,0$ e gli $80,0^{\circ}\text{C}$ si è osservato che il latte impiega tempi compresi tra i 7 e i 10 s per raggiungere la temperatura d'esercizio. Considerato il breve tempo necessario al latte per il raggiungimento dell'equilibrio termico, si è deciso di calcolare il tempo del trattamento dal momento dell'introduzione del latte all'interno del capillare.

I trattamenti termici sono stati eseguiti a 7 temperature comprese tra 40 e 80°C per nove intervalli di tempo compresi tra 0 e 1200 secondi, su campioni di latte intero proveniente da pecore di razza Sarda.

I campioni di latte trattati termicamente sono stati conservati alla temperatura di -24°C fino al momento dell'analisi, insieme ad un campione di latte prelevato dal beker termostato a 37°C sul quale non è stato eseguito alcun trattamento termico

(t_0). L'attività enzimatica è stata calcolata spettrofotometricamente ed espressa in attività enzimatica residua U_{res}

$$U_{res}\% = \frac{U_t}{U_{t_0}} \cdot 100$$

ove U_t è l'attività enzimatica del campione sottoposto per un tempo t ad una determinata temperatura e U_{t_0} è l'attività enzimatica del campione che non ha subito alcun trattamento termico.

Ogni trattamento termico e le analisi dell'attività enzimatica sono state condotte in replica ($n=4$). La riproducibilità associata ai trattamenti termici, intesa come deviazione standard relativa, è risultata uguale a 3,8% e 4,2% rispettivamente per la γ -glutamilttransferasi e l' α -L-fucosidasi.

Per entrambi gli enzimi l'attività decresce in maniera esponenziale, come mostrato dalle relative curve tempo-temperatura, indicando che l'inattivazione segue una cinetica del primo ordine [Zehetner, 1996].

8.2 α -L-fucosidasi

La figura sotto riportata evidenzia la dipendenza dell'attività enzimatica residua in funzione della durata del trattamento termico.

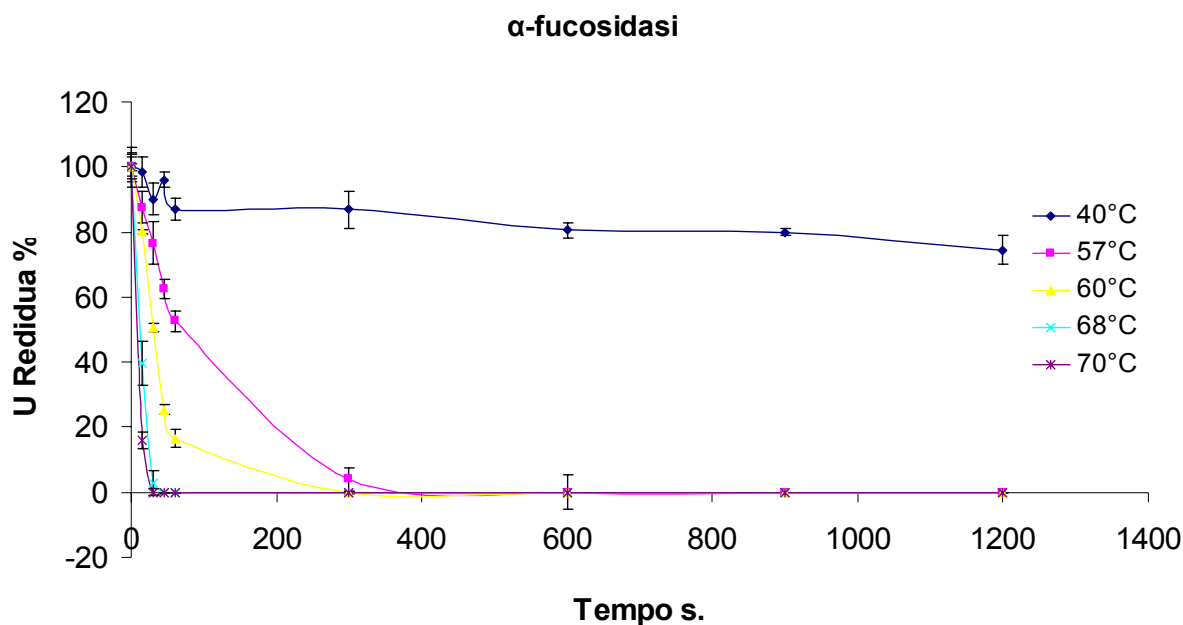


Grafico 8-1: Attività enzimatica residua dell' α -L-fucosidasi nel latte ovino in funzione della combinazione tempo/temperatura.

Come è possibile rilevare, l'inattivazione dell' α -L-fucosidasi è lieve anche per protratti trattamenti termici a 40°C, ma già a 57°C trattamenti di circa 300 secondi azzerano quasi l'attività residua. Oltre i 68°C sono sufficienti solo tempi di qualche decina di secondi (solo poco più lunghi del tempo di equilibratura termica del campione) per inattivare completamente l'enzima.

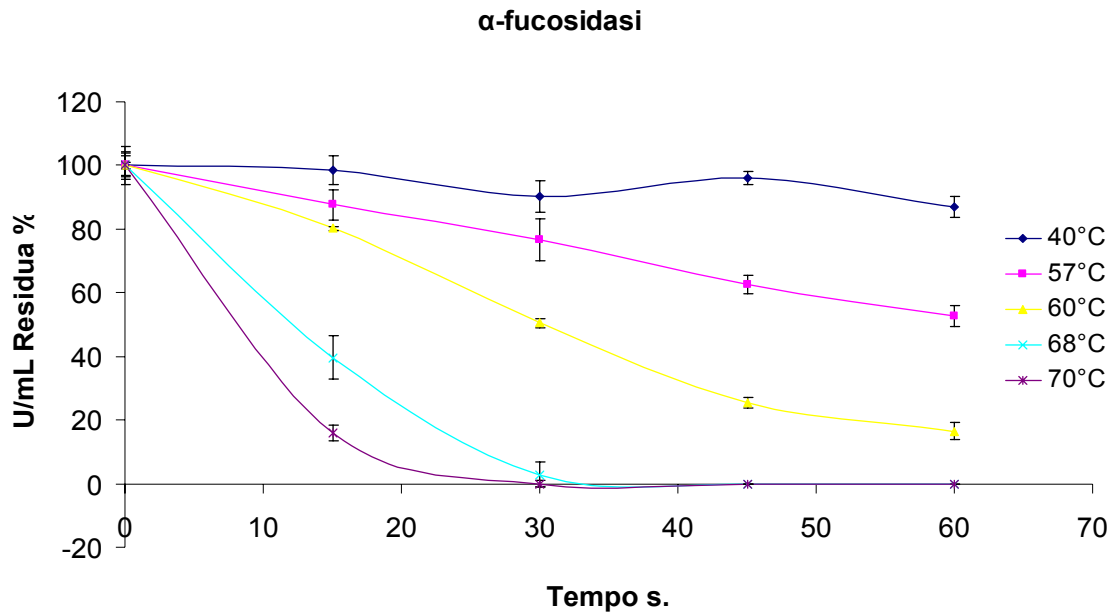


Grafico 8-2: Inattivazione termica dell' α -L-fucosidasi nell'intervallo di tempo tra 0-60 secondi.

Il grafico sotto riportato evidenzia l'attività enzimatica residua in funzione della temperatura del campione. Le curve, isocrone, mostrano inoppugnabilmente che il range termico d'inattivazione dell'enzima è compreso tra i 57 ed i 70°C. (**Grafico 8-3**).

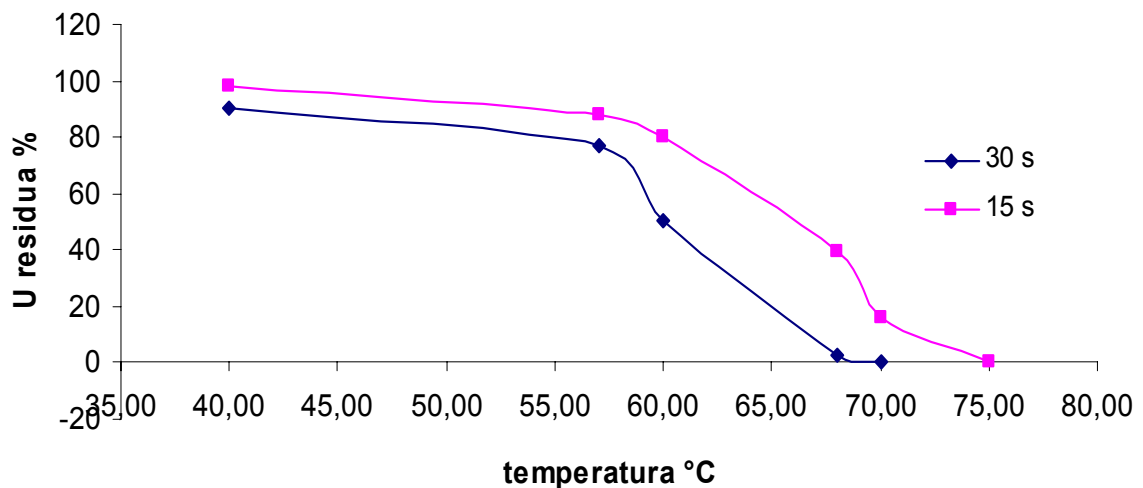


Grafico 8-3: Curve isocrone dell'attività enzimatica residua dell' α -L-fucosidasi in funzione della combinazione tempo/temperatura.

Riportando in grafico il logaritmo naturale del rapporto $(U_t)/(U_{t_0})$ rispetto al tempo, è possibile misurare, a partire dal valore del coefficiente angolare della retta di regressione, la costante cinetica di inattivazione enzimatica (**Capitolo 4**) [Marangoni, 2003]. Il **Grafico 8-4** conferma che vi è una rilevante variazione di velocità passando da 60 a 68°C.

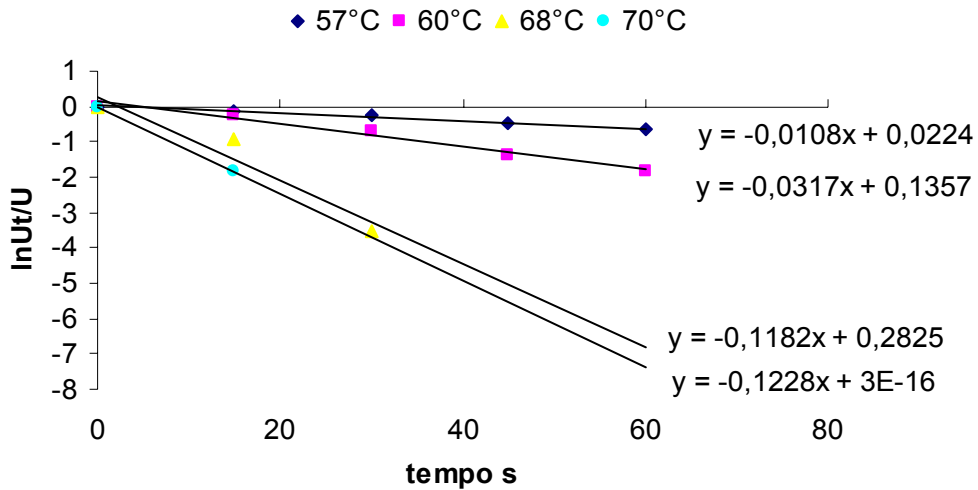


Grafico 8-4:Calcolo della costante cinetica di inattivazione enzimatica (k) dell' α -L-fucosidasi in funzione dei trattamenti termici compresi tra 57e 70°C.

Il valore di D , tempo necessario per avere una riduzione dell'attività enzimatica del 90% ad una determinata temperatura (**Capitolo 4**), è correlato, nelle reazioni che hanno una cinetica del primo ordine, alla costante cinetica secondo l'equazione:

$$D = \frac{2,303}{k}$$

Equazione 8-1

È possibile quindi ricavare questo valore a partire dalla costante cinetica di inattivazione enzimatica k dapprima calcolata. La tabella sottostante dà conto di questi valori:

<i>Temperatura °C</i>	<i>K (s⁻¹)</i>	<i>D (s)</i>
57	0,0108	213
60	0,0317	73
68	0,1182	19

Tabella 8-2: Costante cinetica di inattivazione enzimatica (*k*) e tempo di riduzione decimale (*D*) ottenuti sperimentalmente.

Appare quindi evidente che a 68°C è sufficiente un trattamento di soli 19 secondi per provocare una riduzione dell'attività enzimatica del 90%. Tali risultati si sono dimostrati in accordo con quanto riportato in letteratura relativamente al latte vaccino (Tabella 8-3).

<i>riferimento</i>	<i>60°C</i>		<i>62°C</i>		<i>70°C</i>	
	<i>tempo</i>	<i>U_{res}%</i>	<i>tempo</i>	<i>U_{res}%</i>	<i>tempo</i>	<i>U_{res}%</i>
Presente lavoro [#]	15 s	80%	n.d.	n.d.	15 s	16%
Andrews [1987] [#]	15 s	78%	*15 s	30%	15 s	28%
Zehetner [1996] ⁺	25 s	40%	25 s	7%	n.d.	n.d.
Mckellar [2000] ⁺	16 s	30%	16 s	7%	n.d.	n.d.
De Noni [2006] ⁺	15 s	27%	n.d.	n.d.	1 – 15 s	7%

[#] condizioni di laboratorio, ⁺ pastorizzatore industriale, * valore relativo a 65°C, n.d.=non determinato

Tabella 8-3: Confronto tra l'attività enzimatica residua dell'α-L-fucosidasi nel latte ovino ottenuta sperimentalmente e l'attività enzimatica residua riferita al latte vaccino.

I valori di inattivazione termica dell'α-L-fucosidasi ottenuti nel presente lavoro di tesi sono molto simili a quelli di Andrews [1987], nei quali sembra che il range di inattivazione sia un po' più alto rispetto a quello ottenuto da Zehetner [1996], Mckellar [2000] e De Noni [2006], questo potrebbe essere dovuto a differenze di tipo genetico relativamente alle razze utilizzate per il trattamento, o più probabilmente alle condizioni sperimentali, per le quali sembra che i trattamenti effettuati nei pastorizzatori industriali siano più severi rispetto alle condizioni utilizzate nelle prove condotte in laboratorio.

In conclusione, i risultati da noi ottenuti confermano che l' α -L-fucosidasi è un enzima fortemente termolabile con un range di inattivazione compreso tra le temperature di 57 e 68°C.

8.3 γ -glutamilttransferasi

La dipendenza dell'attività enzimatica residua per la γ -glutamilttransferasi in funzione della durata del trattamento termico è riportata nel diagramma sottostante.

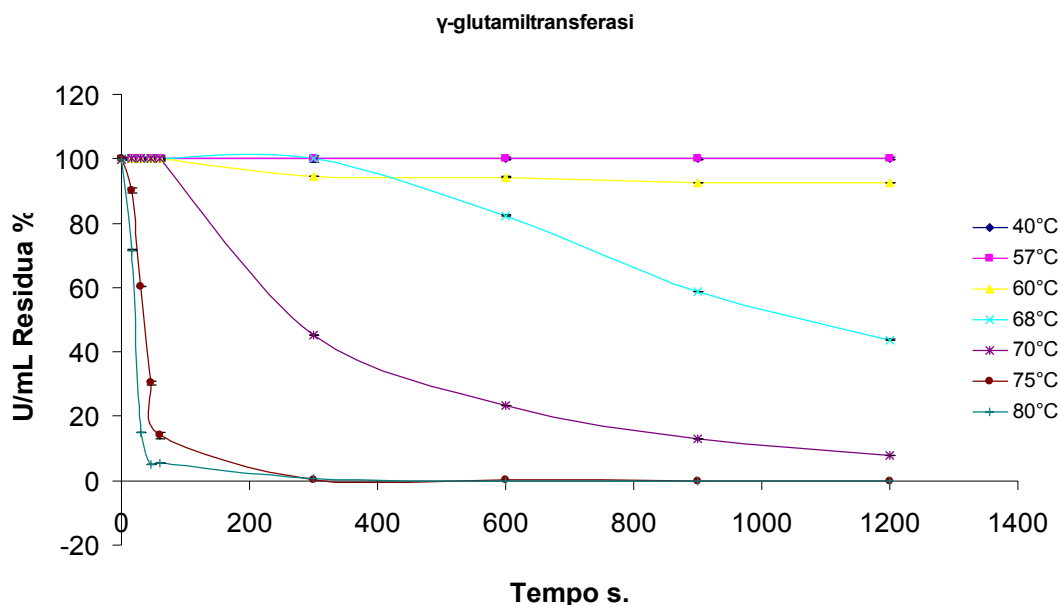


Grafico 8-5:Attività enzimatica residua della γ -glutamilttransferasi nel latte ovino in funzione della combinazione tempo/temperatura.

A differenza di quanto accaduto per l' α -L-fucosidasi, la γ -glutamilttransferasi è enzima stabile a temperature fino a 60°C e presenti una solo lieve riduzione dell'attività enzimatica a partire da 68°C. Già però a 70°C la sua attività viene dimezzata per trattamenti di 300 secondi, mentre a 75°C lo stesso grado di inattivazione è provocata da un trattamento di 35 secondi (**Grafico 8-6**).

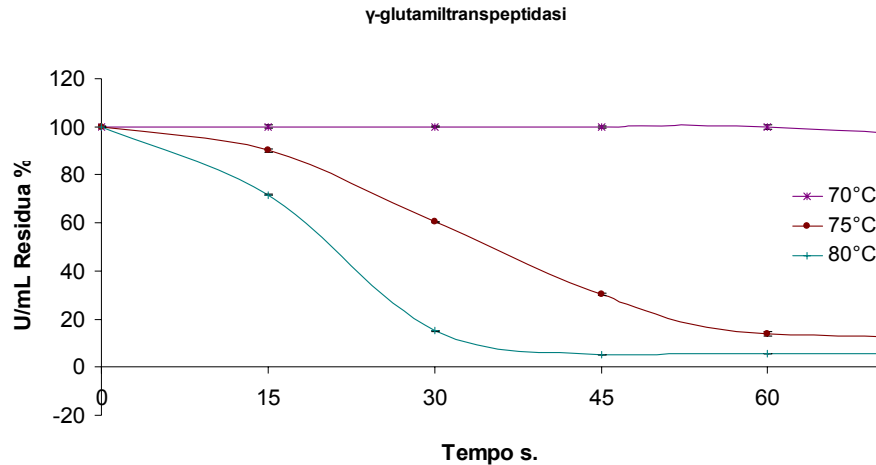


Grafico 8-6:Inattivazione termica della γ -glutamilttransferasi nell'intervallo di tempo 0-60 secondi.

Riportando il logaritmo naturale del rapporto $(U_t)/(U_{t_0})$ rispetto al tempo, otteniamo, in analogia a quanto fatto per l' α -L-fucosidasi, la costante cinetica di inattivazione (**Capitolo 4**) [Marangoni, 2003]. Nel **Grafico 8-7** è possibile osservare come questa rimanga pressoché stabile fino a 70°C per aumentare vistosamente passando a 75 e 80°C.

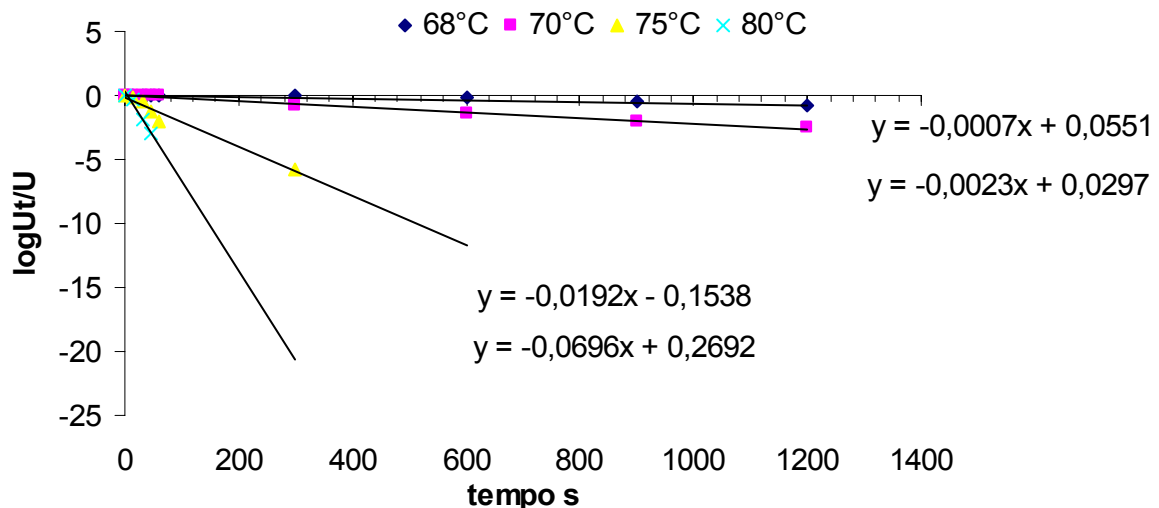


Grafico 8-7:Calcolo della costante cinetica (k) di inattivazione enzimatica della γ -glutamilttransferasi in funzione dei trattamenti termici compresi tra 68e 80°C.

In particolare, un campione sottoposto ad un trattamento termico a 80°C per tempi di 30 o 45 secondi presenta un'attività enzimatica residua rispettivamente del 15% e del 5% (**Grafico 8-8**).

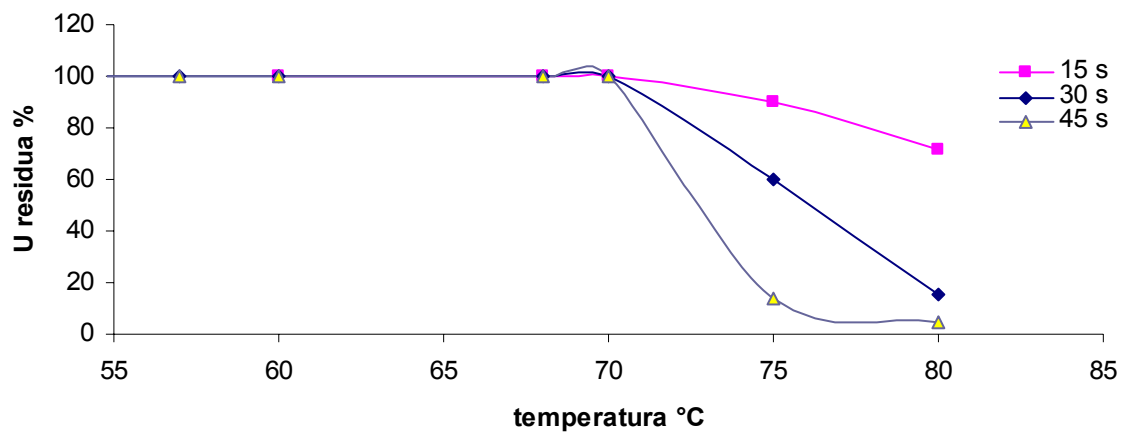


Grafico 8-8: Curve isocrone dell'attività enzimatica residua della γ -glutamilttransferasi in funzione della combinazione tempo/temperatura

Il valore di D , ovvero il tempo necessario alla riduzione del 90% dell'attività enzimatica, calcolato secondo l'**Equazione 8-1**, diminuisce di un ordine di grandezza per incrementi di temperatura di 5°C tra 70 e 80°C (**Tabella 8-4**).

Temperatura °C	$K(s^{-1})$	$D (s)$
68	0,0007	3290
70	0,0023	1001
75	0,0192	120
80	0,0696	33

Tabella 8-4: Costante cinetica di inattivazione enzimatica (k) e tempo di riduzione decimale (D) ottenuti sperimentalmente.

Il confronto con i valori presenti in letteratura (**Tabella 8-5**), dimostra come i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, relativi al latte ovino siano comunque confrontabili a quelli tipici ottenuti per il latte vaccino.

<i>Riferimento</i>	<i>Valore di D (s)</i>	
	<i>71°C</i>	<i>75°C</i>
Presente lavoro	1001	120
Mckellar [1996]	1188	298*
Andrews [1987]	240	39,6
Blel [2002]	144	20,4

* valore relativo a 74°C

Tabella 8-5: Confronto tra i tempi di riduzione decimale (*D*) ottenuti sperimentalmente per il latte ovino e quelli relativi al latte vaccino.

In conclusione, la stabilità termica di questo enzima pare essere decisamente superiore rispetto a quella dell' α -L-fucosidasi. I dati ottenuti affermano che la γ -glutamilttransferasi presenta un range termico di inattivazione compreso tra le temperature di 68 e 80°C.

8.4 Conclusioni

I dati ottenuti in riferimento all'inattivazione termica dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi confermano che il loro range di inattivazione rientra comunque nelle condizioni previste dalla direttiva 92/46 CEE per i trattamenti di termizzazione e pastorizzazione rispettivamente (**Tabella 8-6**).

<i>Tipo di trattamento</i>	<i>Temperatura/tempo</i>
Pastorizzazione	71,7°C/15 s
Termizzazione	57-68°C/15 s
Crudo	< 40°C

Tabella 8-6: Condizioni tempo temperatura previste per i blandi trattamenti termici nella direttiva comunitaria 92/46 CEE.

In realtà, l'abbattimento dei principali microrganismi, che rappresenta lo scopo dei trattamenti termici (**Capitolo 4**), avviene a temperature leggermente superiori (**Tabella 8-7**).

<i>Trattamento</i>	<i>Obiettivo</i>	<i>Tempo/temperatura</i>
Termizzazione	Distruzione degli <i>psicotrofi</i>	15–20 s; 63–65 °C
Pastorizzazione	Distruzione del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15–30 s; 75–85 °C
Pastorizzazione di alta qualità	Distruzione del <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15–30 s; 72–75 °C

Tabella 8-7: Obiettivo dei maggiori trattamenti termici applicati nell'industria lattiero-casearia [Raynal-Ljutovac et al., 2007]

Il range di temperature di inattivazione dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi da noi misurato si sovrappone abbastanza bene rispettivamente a quello di abbattimento degli psicotrofi e del *Mycobacterium tuberculosis*, per cui è possibile proporre anche nel latte ovino questi due enzimi per evidenziare eventuali processi di termizzazione e di pastorizzazione a carico della materia prima.

Dal momento che, a differenza di quello bovino, il latte ovino è quasi per nulla caratterizzato, prima di poter adottare questi metodi di controllo è necessario verificare che detti enzimi non varino in maniera drammatica la loro concentrazione in relazione ai tipici parametri di gestione zootecnica (in particolare quelli stagionali e alimentari). Tale tematica sarà oggetto del prossimo capitolo.

9 Variabilità dell'attività enzimatica della γ -glutamiltransferasi e dell' α -L-fucosidasi nel latte ovino e nel formaggio

9.1 Attività enzimatica in funzione del pH

Sebbene tutti i lavori presenti in letteratura relativi alla misura dell'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamiltransferasi nel latte vaccino facciano riferimento sempre agli stessi valori di pH (rispettivamente 5,5 e 8,5), il cambio di matrice impone quantomeno uno studio preliminare della dipendenza delle attività enzimatica in funzione dei più comuni parametri chimici di potenziale interesse nei confronti della grandezza in osservazione. A tal proposito l'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamiltransferasi è stata valutata in matrice latte ovino su soluzioni tamponate a pH compresi tra 4,0 e 7,0 per l' α -L-fucosidasi e 7,0 e 9,5 per la γ -glutamiltransferasi. I diagrammi sotto riportati evidenziano la dipendenza dell' α -L-fucosidasi (**Grafio 9-1**) e della γ -glutamiltransferasi (**Grafio 9-2**) in funzione del pH.

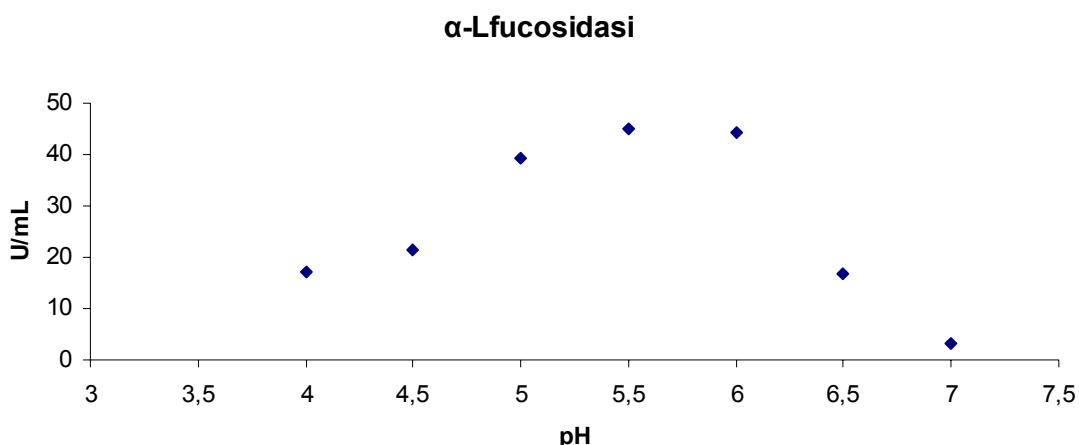


Grafico 9-1: Attività dell' α -L-fucosidasi in funzione del pH

In stretta analogia a quanto riportato in letteratura per il latte vaccino Mckellar [2000] ed umano Wiederschain [1996], anche il latte ovino mostra i maggiori valori attività enzimatica nell'intervallo di pH compreso tra 5,0 e 6,0.

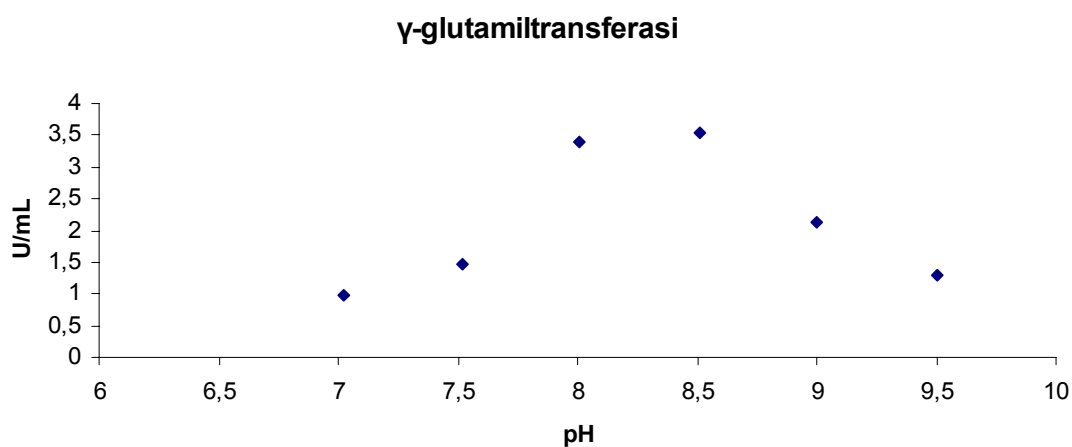


Grafico 9-2: Attività della γ -glutamilttransferasi in funzione del pH

Anche i valori ottenuti per la γ -glutamilttransferasi nel latte ovino sono in accordo con quanto riportato da Baumrucker [1979] nel latte vaccino, che evidenziava il massimo di attività enzimatica nel range di pH compreso tra 8,0 e 8,5.

9.2 Attività enzimatica nel latte scremato

Un'importante informazione riguardo la natura dei due enzimi e la loro distribuzione nei diversi costituenti del latte viene fornita da eventuali differenze di attività enzimatica tra latte intero e scremato. A questo scopo abbiamo scremato dei campioni ($n=10$) di latte ovino fresco secondo una delle più comuni tecniche utilizzate in laboratorio (separazione fisica per centrifugazione a freddo), quantificando successivamente l'attività dei due enzimi sia nel latte intero che in quello scremato (**Tabella 9-1**) e valutandone le eventuali differenze significative attraverso test t di Student.

γ -glutamilttransferasi U/mL		α -L-fucosidasi U/mL	
<i>Intero</i>	<i>Scremato</i>	<i>Intero</i>	<i>Scremato</i>
3,47 \pm 0,13	2,26 \pm 0,09	47,25 \pm 1,97	47,70 \pm 1,44

Tabella 9-1

Il confronto dei valori di attività enzimatica attraverso il test t di Student ha permesso di stabilire che esiste una significativa differenza di attività enzimatica tra latte intero e scremato solo per la γ -glutamilttransferasi. In questo caso solo il 65% dell'attività enzimatica iniziale rimane nella fase scremata del latte ovino. I dati sono in buon accordo con quanto riportato per il latte vaccino: 72% da Mckellar [1991] e 74% da Baumrucker [1979], il quale afferma che parte di questo enzima sia debolmente legato alla membrana dei globuli di grasso. Per contro, nel caso dell' α -L-fucosidasi invece non si riscontra alcuna differenza significativa tra latte intero e scremato confermando anche in questo caso i dati di Andrews [1987] ottenuti per il latte vaccino.

Variabilità dell'attività enzimatica in funzione dei parametri stagionali e alimentari

Verificato che anche nel latte ovino i due enzimi vengono inattivati nell'intervallo tempo-temperatura di nostro interesse, l'attenzione si è concentrata sulla variabilità dell'attività enzimatica in funzione dell'alimentazione e durante il periodo di lattazione, ambo parametri di fondamentale importanza per il conseguimento degli obiettivi del presente lavoro di Tesi di Dottorato.

9.2.1 Piano sperimentale

I parametri alimentari sono stati variati in funzione del tipo e dell'abbondanza di alimentazione. A tal proposito abbiamo monitorato le attività enzimatiche in latte proveniente da pecore di razza Sarda ($n=36$) dell'azienda zootecnica di AGRIS Sardegna, omogenee per età, data di parto e produzione latte (misurata nelle precedenti lattazioni). Tali pecore sono state equamente divise in 4 greggi differenti per tipo di alimentazione integrativa e per carico di pascolamento (il carico è il rapporto tra il numero di capi e la superficie di pascolamento). Durante il pascolo, costituito da un miscuglio di loglio italico e trifoglio persiano, due greggi sono stati mantenuti ad alto carico di pascolamento e due a basso carico. In particolare, due greggi, differenti per carico di pascolamento, sono stati sottoposti ad un'alimentazione integrativa di tipo biologico, a base di orzo e piselli, ed i restanti due ad un'alimentazione integrativa di tipo convenzionale, a base di mais e soia (**Tabella 9-2**).

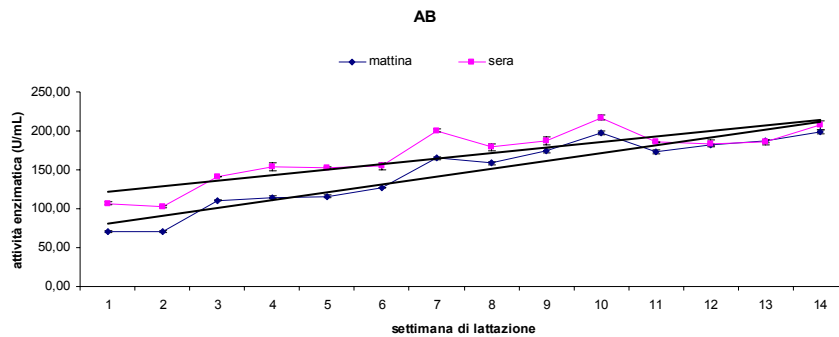
Gregge	Carico di pascolamento	Alimentazione integrativa	
AB	Alto	Biologico	orzo e piselli
BB	Basso	Biologico	orzo e piselli
AC	Alto	Convenzionale	mais e soia
BC	Basso	Convenzionale	mais e soia

Tabella 9-2: Piano sperimentale

I parametri relativi alla lattazione sono stati valutati effettuando i prelievi nelle 14 settimane di lattazione dopo lo svezzamento (30 gg). I campionamenti sono stati effettuati per ognuna delle due mungiture giornaliere sul latte di massa delle quattro greggi. Le determinazioni analitiche sono state condotte in doppio.

9.2.2 Influenza dei parametri alimentari

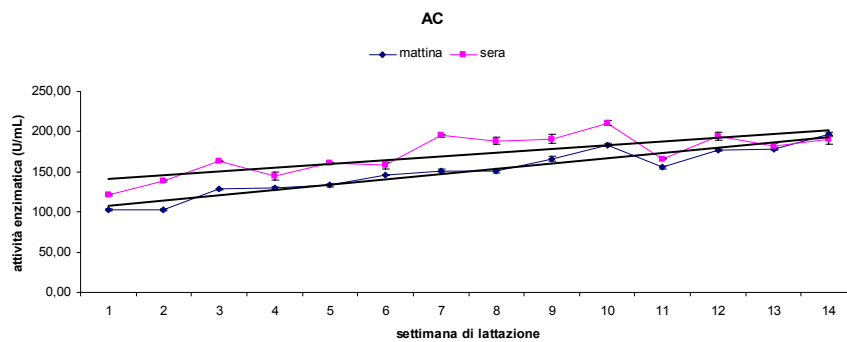
Prima di studiare l'influenza dei quattro diversi trattamenti alimentari, si è inteso valutare se esistessero differenze significative di attività enzimatiche tra le 2 mungiture giornaliere. I grafici seguenti riportano i valori di attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi, determinata nel latte di ognuno dei quattro greggi delle due mungiture giornaliere riferite alle 14 settimane di lattazione e la retta dei minimi quadrati ottenuta attraverso l'interpolazione di tali valori.



Equazione della retta

mattina $y = (10,02 \pm 1,00) x + 70,83 \pm 8,51$

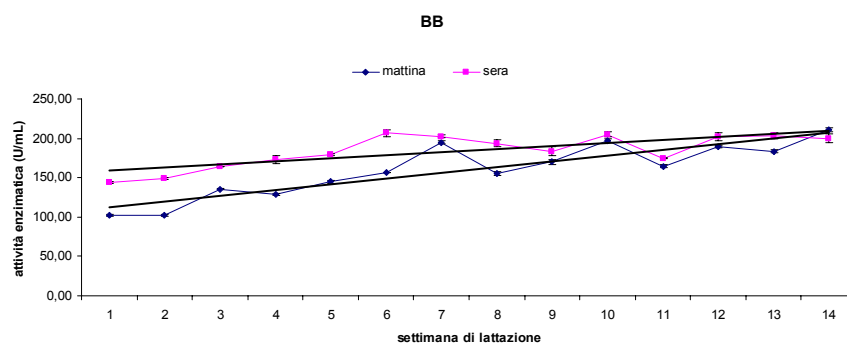
sera $y = (7,08 \pm 1,25) x + 115,32 \pm 10,56$



Equazione della retta

mattina $y = (6,55 \pm 0,60) x + 101,08 \pm 5,12$

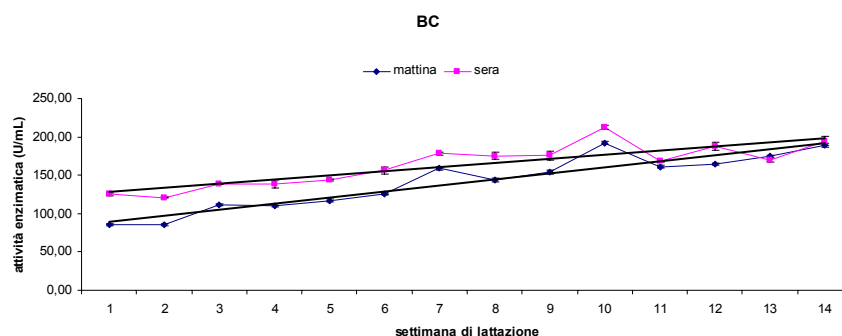
sera $y = (4,68 \pm 1,11) x + 136,66 \pm 9,50$



Equazione della retta

mattina $y = (7,27 \pm 1,08) x + 105,18 \pm 9,26$

sera $y = (3,80 \pm 0,96) x + 155,00 \pm 8,20$



Equazione della retta

mattina $y = (7,89 \pm 0,86) x + 81,72 \pm 7,33$

sera $y = (5,46 \pm 0,98) x + 122,00 \pm 8,42$

Per tutti e quattro i greggi il valore di attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi nel latte relativo alla mungitura della sera è risultato più alto rispetto a quello della mattina. Al fine di valutare se tali valori siano statisticamente differenti, mediante il test t di Student, sono stati confrontati i coefficienti angolari e l'ordinata all'origine delle rette ottenute per le due mungiture (**Tabella 9-3**).

<i>Gregge</i>	<i>coefficiente angolare</i>	<i>intercetta</i>
AB	0,55	6,95
AC	3,14	6,99
BB	5,09	8,54
BC	3,95	7,65

Tabella 9-3

Poiché i t sperimentali relativi all'intercetta sono risultati sempre maggiori di $t_{0,05/1,3} = 2,35$ è possibile ritenere che, per ogni gregge, esiste una differenza significativa tra i valori di attività enzimatica della mattina e quelli della sera. Considerando che il latte ottenuto dalle due mungiture non viene mai trasformato singolarmente ma unito in un'unica lavorazione, per ogni gregge sono stati calcolati dei valori di attività enzimatica media giornaliera attraverso la somma ponderata, relativamente alle produzioni di latte, delle due mungiture (**Grafico 9-3**).

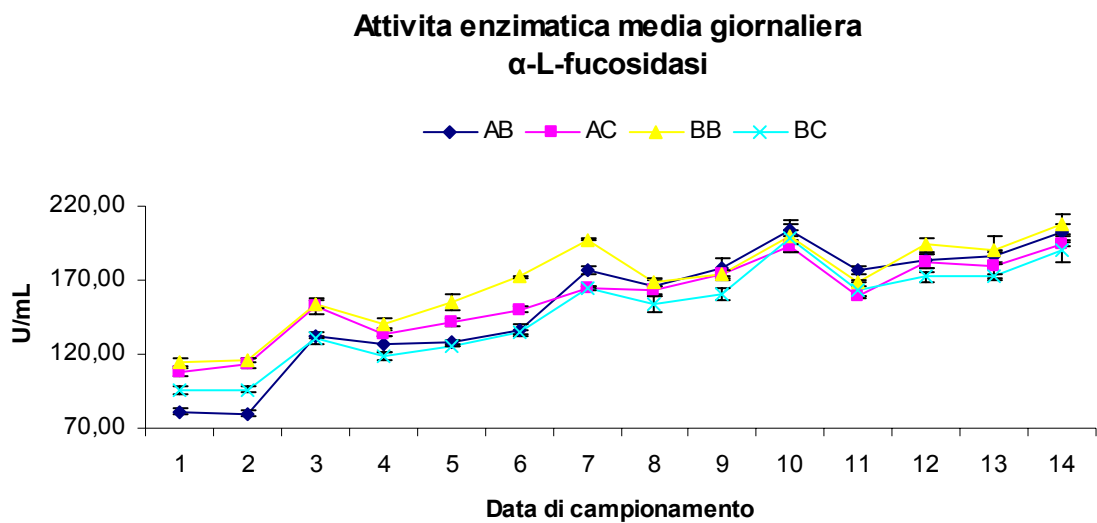


Grafico 9-3:

Il **Grafico 9-3** evidenzia come, per nessuno dei quattro greggi, si possano osservare degli andamenti significativamente differenti, possiamo pertanto ipotizzare che il carico di pascolamento e il tipo di alimentazione integrativa forniti agli ovini non influiscano significativamente sui valori di attività enzimatica dell'α-L-fucosidasi nel latte. I valori di attività enzimatica media giornaliera dei quattro greggi ottenuti durante le 14 settimane di lattazione sono stati confrontati tra loro attraverso il test t di Student per dati appaiati (**Tabella 9-4**) calcolato secondo l'equazione:

$$t_c = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{s_d^2}{n}}}$$

Equazione 9-1

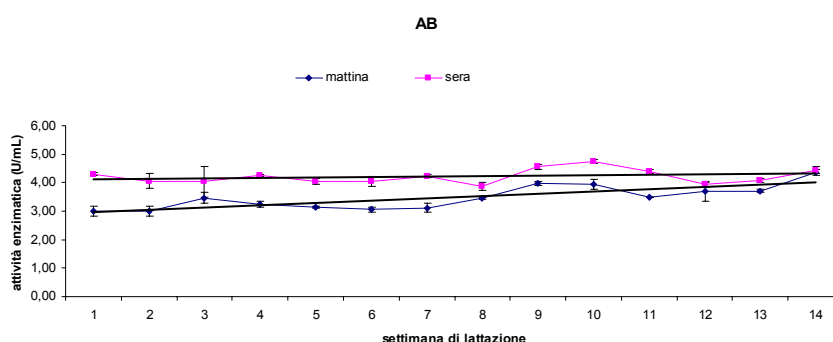
Dove \bar{d} è la media delle differenze fra le copie di dati, s_d^2 è la varianza delle differenze e n il numero di copie di dati.

Confronto	<i>t</i> calcolato
AB - AC	0,95
AB - BB	2,10
AB - BC	1,96
AC - BB	1,99
AC - BC	1,92
BB - BC	2,21

Tabella 9-4

Poiché i *t* calcolati sono risultati sempre inferiori al $t_{0,05/2,13}$ tabulato (2,16) possiamo affermare che l'attività enzimatica nel latte dei quattro greggi non sia significativamente differente e quindi il carico di pascolamento e il tipo di alimentazione integrativa forniti agli ovini non influiscano sui valori di attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi nel latte.

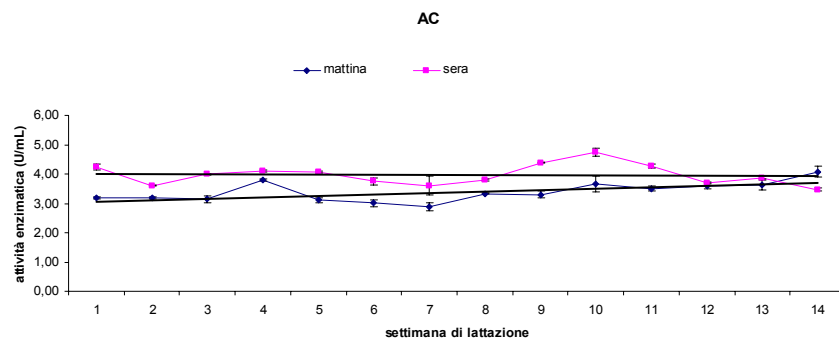
Le stesse argomentazioni sono state applicate all'attività della γ -glutamilttransferasi. I grafici seguenti riportano i valori di attività enzimatica della γ -glutamilttransferasi, determinata nel latte dei quattro greggi delle due mungiture giornaliere riferite alle 14 settimane di lattazione e la retta dei minimi quadrati ottenuta attraverso l'interpolazione di tali valori.



Equazione della retta

$$\text{mattina } y = (0,08 \pm 0,02) x + 2,87 \pm 0,15$$

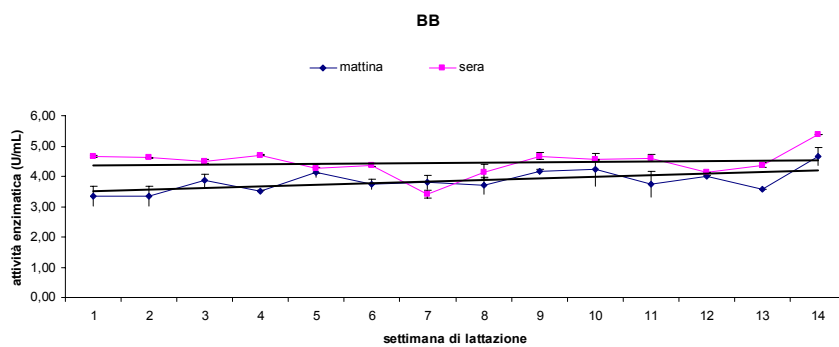
$$\text{sera } y = (0,02 \pm 0,02) x + 4,10 \pm 0,14$$



Equazione della retta

mattina $y = (0,05 \pm 0,02) x + 3,01 \pm 0,15$

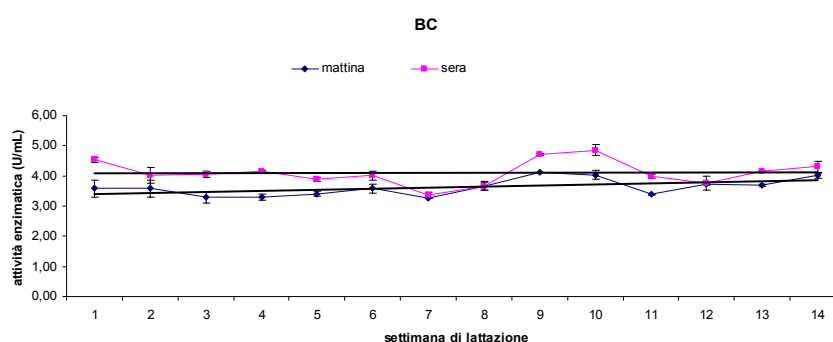
sera $y = (-0,07 \pm 0,02) x + 4,02 \pm 0,20$



Equazione della retta

mattina $y = (0,05 \pm 0,02) x + 3,44 \pm 0,17$

sera $y = (0,01 \pm 0,03) x + 4,35 \pm 0,25$



Equazione della retta

mattina $y = (0,04 \pm 0,02) x + 3,34 \pm 0,14$

sera $y = (0,01 \pm 0,02) x + 4,07 \pm 0,23$

Anche in questo caso l'attività enzimatica nel latte della sera risulta superiore a quello della mattina. Al fine di valutare se tali valori siano statisticamente differenti, mediante il test t di Student, sono stati confrontati i coefficienti angolari e l'ordinata all'origine delle rette ottenute per le mungiture di ogni gregge (**Tabella 9-5**).

Gregge	t calcolato ($\alpha = 0,05$)	
	coefficiente angolare	intercetta
AB	5,90	2,71
AC	4,41	8,57
BB	2,23	6,38
BC	2,73	5,75

Tabella 9-5

Poiché i t sperimentali sono risultati sempre maggiori di $t_{0,05/1,3} = 2,35$ possiamo affermare che anche per la γ -glutamilttransferasi esiste una differenza significativa tra i valori di attività enzimatica della mattina e quelli della sera.

Il **Grafico 9-4** riporta i valori di attività enzimatica media giornaliera calcolata attraverso la somma ponderata delle due mungiture. Nessuno dei quattro greggi sperimentali pare possedere andamenti significativamente differenti.

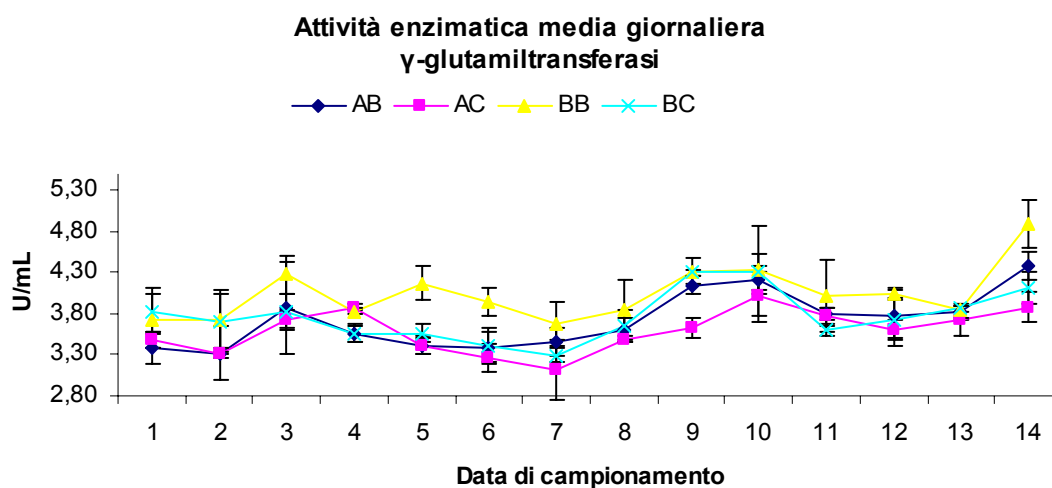


Grafico 9-4

I valori di attività enzimatica media giornaliera dei quattro greggi ottenuti durante le 14 settimane di lattazione sono stati confrontati tra loro attraverso il test t di Student per dati appaiati (**Tabella 9-6**) calcolato secondo l'**Equazione 9-1**.

Confronto	<i>t</i> calcolato
AB - AC	2,01
AB - BB	1,99
AB - BC	0,83
AC - BB	1,78
AC - BC	1,95
BB - BC	1,87

Tabella 9-6

Poiché i *t* calcolati sono risultati sempre inferiori al $t_{0,05/2,13}$ tabulato (2,16) possiamo affermare che l'attività enzimatica nel latte dei quattro greggi non sia significativamente differente e quindi il carico di pascolamento e il tipo di alimentazione integrativa forniti agli ovini non influiscano sui valori di attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi nel latte.

9.2.3 Influenza della lattazione

I valori medi di attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi durante l'arco della lattazione sono riportati, per ogni gregge sperimentale, nella **Tabella 9-7**.

	α -L-fucosidasi (U/mL)				MEDIA
	AB	AC	BB	BC	
Media	155,56	159,76	170,35	150,29	158,99
Dev. St.	37,79	24,29	26,26	29,74	30,07
C.V.%	24,29	15,20	15,41	19,78	18,91
Max	203,84	194,62	207,70	198,70	207,70
Min	81,04	108,29	114,19	96,01	81,04
Diff %	60,24	44,35	45,02	51,63	60,98

Tabella 9-7

L'attività enzimatica media dei quattro greggi, calcolata nelle 14 settimane di lattazione, è risultata essere pari a 158,99 U/mL con una variabilità, espressa dal coefficiente di variazione percentuale, uguale a 18,91%. La variabilità di attività enzimatica stagionale risulta superiore a quanto riscontrato da Zehetner [1996] per il latte vaccino di massa (3,7%), lo stesso autore riporta inoltre una variabilità stagionale associata al singolo animale pari al 21,5%. Molto verosimilmente, la differenza tra la variabilità sull'attività enzimatica del latte di massa ovino e quello vaccino può essere interpretata in termini di specifiche differenze negli aspetti di gestione zootecnica del bestiame. In particolare il latte di massa ovino è prodotto da animali che si trovano tutti nello stesso periodo di lattazione a causa della sincronizzazione dei parti, e tale aspetto fa sì che la sua composizione durante l'annata subisca la stessa variabilità cui è soggetto il contributo di ogni singolo capo. Ciò invece non avviene per il latte di massa vaccino, che è media di contributi ove ogni capo si trova in un differente stadio di lattazione; ciò si estrinseca in un effetto stabilizzante sulla variazione. Possiamo pertanto ragionevolmente supporre che la variabilità stagionale di attività enzimatica associata al latte ovino non sia, sul singolo animale, grandemente dissimile da quella del latte vaccino. De Noni [2006] riscontra

una certa dispersione dei valori di attività enzimatica nel latte vaccino, senza tuttavia osservare alcun trend specifico. Per quanto invece concerne i valori di attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi si osserva un trend distintamente crescente nel corso della lattazione. Al fine di valutare l'entità di tale trend i valori di attività giornaliera del latte dei quattro greggi sono stati sottoposti ad analisi di regressione lineare il cui andamento è di seguito riportato.

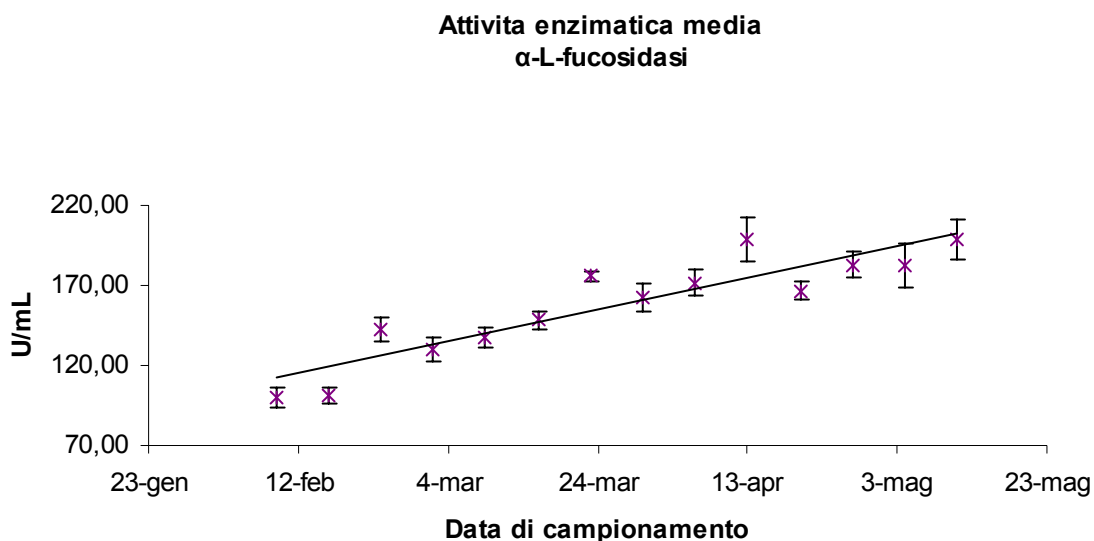


Grafico 9-5

L'equazione della retta di regressione è:

$$y = (6,94 \pm 0,90)x - 105,00 \pm 7,74 \quad (r = 0,910)$$

Il grafico evidenzia come l'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi aumenti nel corso della lattazione, passando da 99,88 U/mL a 198,74 U/mL. L'alto coefficiente di correlazione ($r = 0,910$) della retta conferma come questo trend crescente presenti un andamento lineare piuttosto regolare.

Rispetto a quella tipica del latte bovino, l'attività enzimatica media stagionale dell' α -L-fucosidasi nel latte ovino è sensibilmente più elevata rispetto a quello vaccino anche a fronte di un range non troppo dissimile. Entrambi comunque evidenziano un'attività enzimatica assai inferiore (quasi un ordine di grandezza, **Tabella 9-8**) a quella del latte umano.

Latte	Attività enzimatica U/mL			
	<i>Media</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>Riferimento</i>
Ovino	158,99	81,04	207,70	
Vaccino	88 - 117*	71*	177*	[Zehetner et al.,1996]
Umano	1055	500	2000	[Wiederschain et al.,1995]

* i valori non si riferiscono al latte di massa ma ad una singolo animale

Tabella 9-8

L'attività enzimatica della γ -glutamilttransferasi risulta invece molto meno variabile nel corso della lattazione; il coefficiente di variazione percentuale medio risulta infatti essere pari al 8,87%, non dissimile dai valori riportati da Mckellar [1991] per il latte vaccino (7%).

	γ -glutamilttransferasi (U/mL)				MEDIA
	<i>AB</i>	<i>AC</i>	<i>BB</i>	<i>BC</i>	
Media	3,78	3,61	4,11	3,81	3,83
Dev. St.	0,32	0,24	0,35	0,29	0,34
C.V.%	8,46	6,64	8,51	7,61	8,87
Max	4,39	4,01	4,89	4,30	4,89
Min	3,39	3,12	3,67	3,29	3,12
Diff %	22,90	22,22	24,94	23,50	36,30

Tabella 9-9

Anche in questo caso l'attività enzimatica giornaliera media dei quattro greggi sperimentali (**Grafico 9-6**), presenta un andamento caratterizzato da una significativa dispersione dei dati, che comunque fanno scorgere un trend stagionale leggermente ascendente che evidenzia un solo discreto coefficiente di correlazione *r*.

**Attività enzimatica media
γ-glutamilttransferasi**

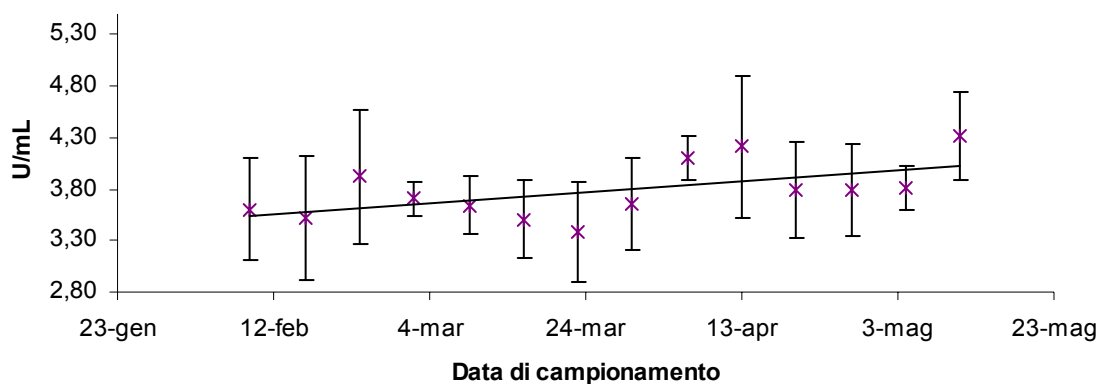


Grafico 9-6

$$y = (0,004 \pm 0,015)x + 3,50 \pm 0,133 \quad (r = 0,563)$$

Il valore medio dell'attività enzimatica stagionale risulta inferiore rispetto a quello riferiti al latte vaccino (**Tabella 9-10**), mentre il range sembra esser limitato soprattutto a livello dei valori superiori (4,89 U/ml per il latte ovino contro 9,76 U/ml per quello bovino [Zehetner et al.,1996]).

Latte	Attività enzimatica U/mL			
	<i>Media</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>Riferimento</i>
Ovino	3,83	3,12	4,89	
Vaccino	5,67 - 6,12*	3,54*	9,76*	[Zehetner et al.,1996]
Vaccino	4,30	n.d.	n.d.	[McKellar et al., 1991]

* i valori non si riferiscono al latte di massa ma ad una singolo animale

Tabella 9-10

9.2.4 Analisi multivariata

Rispetto all'approccio statistico classico, l'analisi multivariata permette di trarre, da un set preordinato di dati (nel nostro caso sperimentali) il massimo contenuto di informazione in essi presente. Ciò viene realizzato evidenziando le correlazioni tra più variabili, determinando quale, tra esse (o tra la combinazione lineare di esse) è in grado di contenere il maggior quantitativo di informazione richiesta. Tra le varie tecniche per l'esplorazione dei dati, l'analisi delle componenti principali (PCA) è una tra le più importanti. Essa permette di visualizzare gli oggetti e le variabili in maniera semplificata, riducendo la dimensionalità dei dati, al fine di individuare la presenza di classi o di particolari tendenze. In generale, le variabili che descrivono i dati sono trasformate in nuove variabili, chiamate componenti principali, che sono delle combinazioni lineari delle variabili originali tra loro ortogonali. La PCA consiste quindi in un processo di rotazione dei dati originali definiti da una matrice X di dimensione $n \times p$, effettuato in modo che il primo nuovo asse sia orientato nella direzione di massima varianza dei dati mentre il secondo, ortogonale al primo, sia nella direzione di "seconda" massima varianza, e così di seguito per tutti i p assi [Todeschini. 2003].

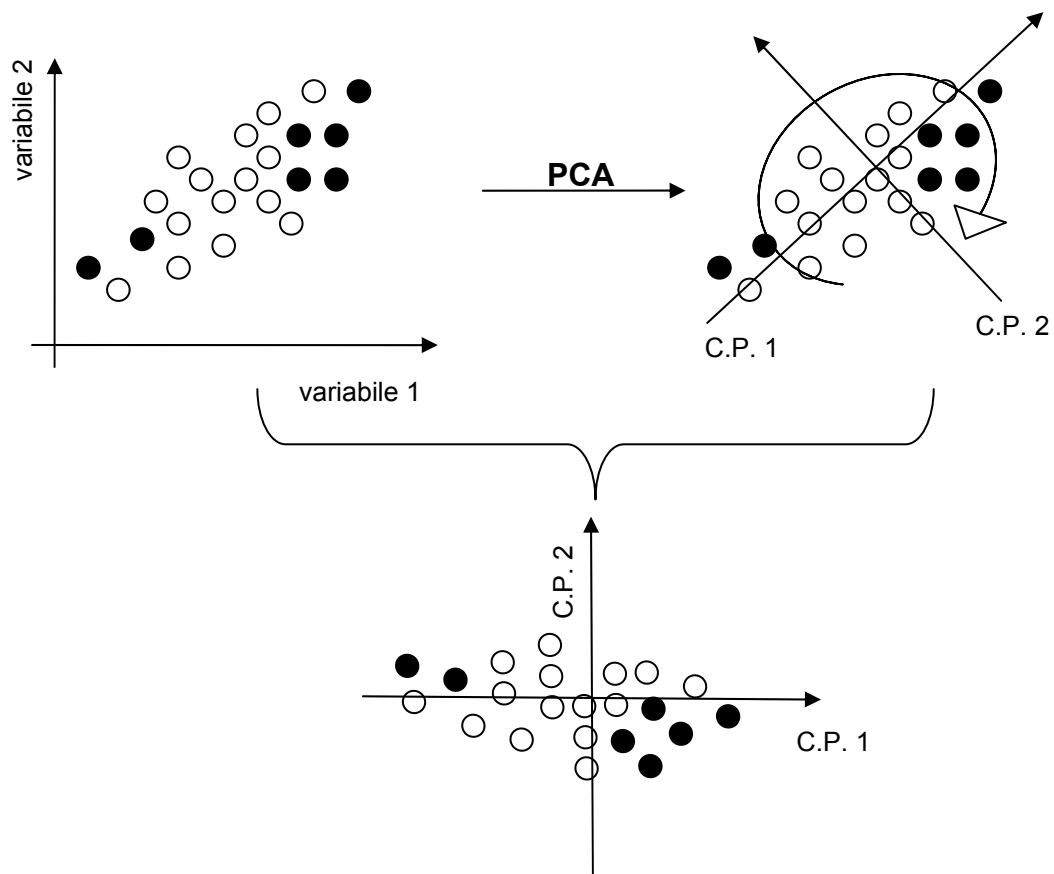


Figura 9-1: Analisi delle componenti principali applicate ad un data set in due variabili

Nella **Figura 9-1** viene mostrato un esempio in due sole variabili. Come si può osservare dalla figura, la prima componente principale (PC1) è nella direzione di massima varianza dei dati. Parte della varianza residua viene rappresentata dalla seconda componente principale (PC2), in direzione perpendicolare alla prima. Se il sistema fosse composto da p variabili avremmo p componenti principali che spiegano progressivamente quantità inferiori della varianza del nostro sistema. A tal proposito molto spesso è sufficiente studiare solo le prime due componenti principali che insieme auspicabilmente spiegano la maggior parte della varianza (informazione), attribuendo alle altre $p-2$ componenti principali la varianza residua (rumore).

Oltre alla valutazione dell'attività enzimatica sono stati determinati nel latte ovino, durante il nostro studio, anche il contenuto in grasso, proteine, lattosio, urea e cellule somatiche. Mediante l'analisi delle componenti principali si è pertanto tentato di evidenziare le correlazioni tra attività enzimatica e gli altri parametri monitorati e ad essi potenzialmente legati, cercando di esplicitarne la dipendenza in relazione all'alimentazione ed al periodo di lattazione.

Osservando come gli oggetti si distribuiscono lungo le prime due componenti principali (**Grafico 9-7**) otteniamo la conferma che alimentazione e carico non presentano un'influenza significativa sui parametri controllati (assenza di gruppi). Si può osservare invece una separazione in funzione del periodo di lattazione lungo la prima componente principale, con i campioni che si distribuiscono da sinistra verso destra in base alla data di campionamento (1-14).

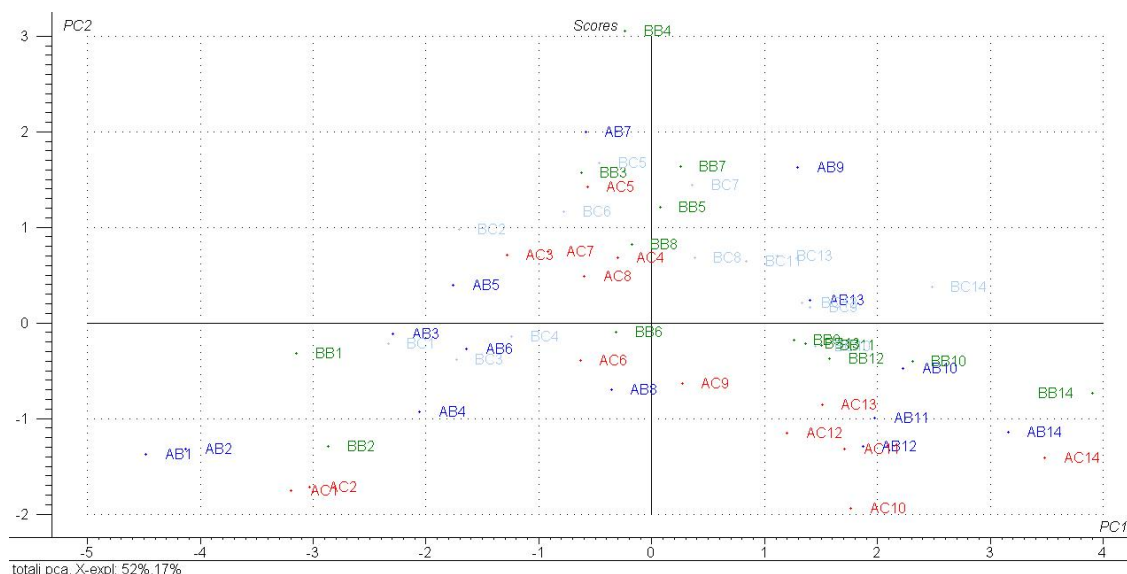


Grafico 9-7: Score Plot relativo alle prime due componenti principali (varianza totale spiegata 69%)

Per quanto riguarda le variabili, il grafico dei *loadings* (**Grafico 9-8**) mostra che entrambi i valori di attività enzimatica risultano correlati positivamente al contenuto in grasso e proteine, e negativamente rispetto al contenuto in lattosio, mentre risultano fondamentalmente indipendenti rispetto alla quantità in cellule somatiche e al contenuto in urea.

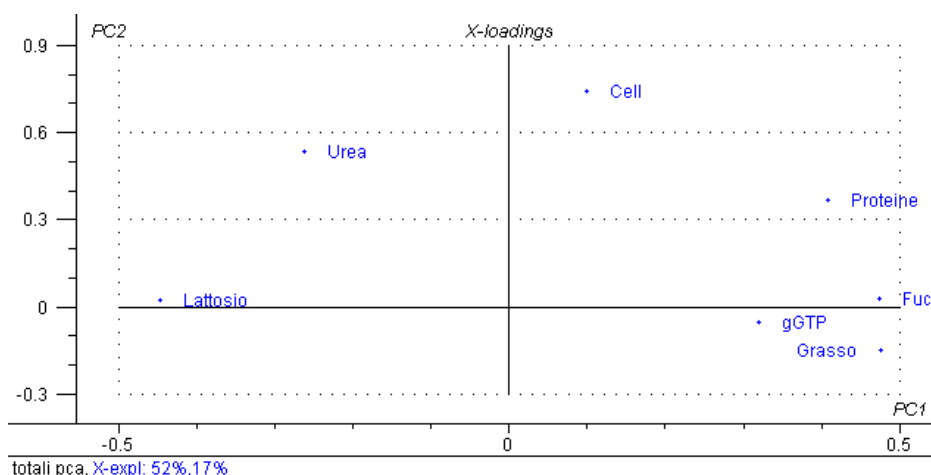


Grafico 9-8: Loadings Plot relativo alle prime due componenti principali.

Possiamo quindi affermare che lungo la prima componente principale si dispongono le variabili relative alla macrocomposizione del latte (grasso, proteine, lattosio) e quelle relative all'attività enzimatica (a-L-Fuc, g-GTP), mentre la seconda componente principale pare associabile a parametri correlati allo stato di benessere delle pecore (cellule somatiche e urea). Durante la lattazione i campioni presentano un contenuto crescente in grasso, proteine e attività enzimatica e decrescente in lattosio. Il contenuto in cellule somatiche e urea invece si innalza solo nel periodo centrale della lattazione (**Grafico 9-9**), che corrisponde a quello di maggiore produzione per gli animali.

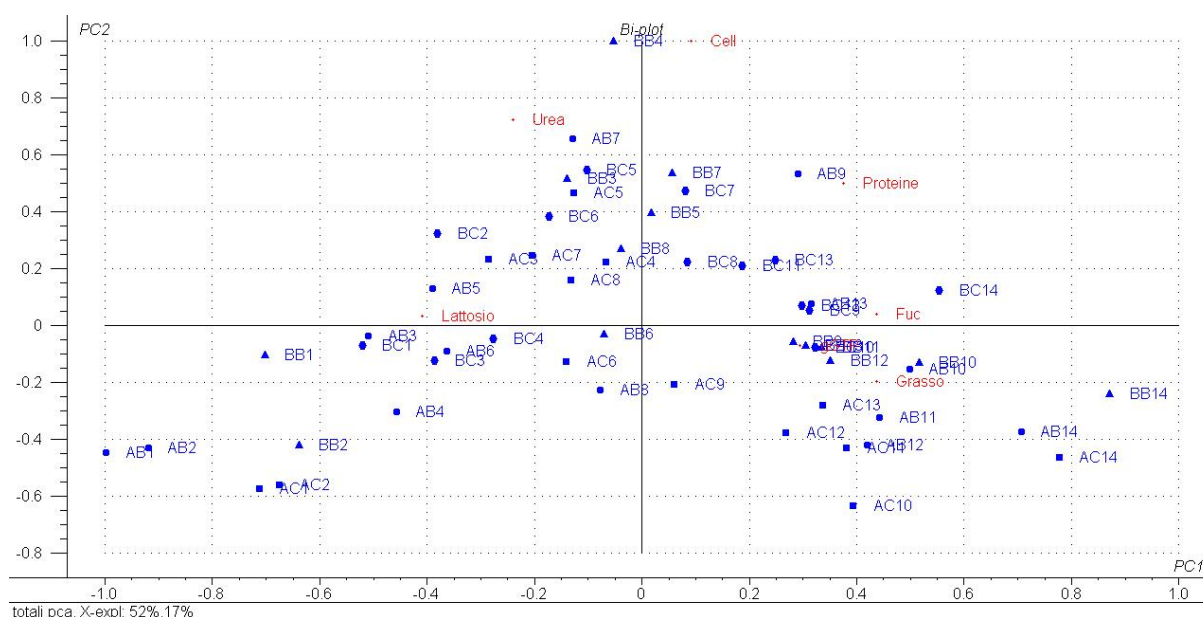


Grafico 9-9: Biplot relativo alle prime due componenti principali.

9.3 Valutazione dell'attività enzimatica in allevamenti di tipo estensivo

I metodi analitici da noi messi a punto sono anche stati testati “a spot” su alcuni allevamenti di tipo estensivo. E' stata pertanto valutata, in due diversi periodi dell'anno (febbraio e maggio), l'attività di entrambi gli enzimi nel latte di massa di tre allevamenti localizzati nel centro Sardegna (**Figura 9-2**), anch'essi costituiti da sole pecore di razza Sarda.



Figura 9-2: localizzazione geografica degli allevamenti estensivi

9.3.1 Attività enzimatica nel latte

I dati riportati in tabella rappresentano la media e la rispettiva deviazione standard dei valori di attività enzimatica ottenuti per il latte ovino di massa in tre giorni consecutivi. I campionamenti sono stati effettuati presso i tre produttori durante le stesse giornate.

	Febbraio	Maggio
<i>α-L-fucosidasi U/mL</i>		
Gavoi	44,53 \pm 9,74	72,64 \pm 9,60
Atzara	42,56 \pm 0,80	60,42 \pm 5,26
Macomer	42,08 \pm 6,08	60,22 \pm 7,48
<i>γ-glutamilttransferasi U/mL</i>		
Gavoi	2,83 \pm 0,07	2,72 \pm 0,18
Atzara	3,26 \pm 0,12	2,76 \pm 0,11
Macomer	3,46 \pm 0,11	2,51 \pm 0,17

Tabella 9-11

I valori di attività enzimatica riscontrati per l' α -L-fucosidasi presentano, relativamente al periodo di lattazione, un andamento crescente in accordo con quanto precedentemente osservato nel gregge sperimentale di AGRIS Sardegna, mentre nel caso della γ -glutamilttransferasi i valori di attività ottenuti nei due periodi di lattazione risultano piuttosto costanti. Tutti i dati ottenuti sono entro al range precedentemente delineato per gli allevamenti sperimentali di AGRIS Sardegna.

Il campionamento effettuato vuole solo avere lo scopo di testare il metodo su latte prodotto da allevamenti in condizioni non controllate, e non vuole certamente essere considerato rappresentativo dei valori di attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi nel latte ovino proveniente da pecore di razza Sarda. Per ottenere tale risultato, saranno necessari dei campionamenti più estesi e più frequenti.

9.4 Attività enzimatica nel formaggio

La possibilità di determinare l'attività enzimatica anche nei prodotti di trasformazione dell'industria casearia è fondamentale per proporre gli enzimi in oggetto quali marker per i trattamenti termici. Tuttavia non sempre infatti tale condizione è realizzabile: ad esempio, la marcata idrosolubilità che caratterizza alcuni enzimi ne provoca, durante il processo di caseificazione, il trasferimento pressoché totale nel siero. La maggior sensibilità della metodica HPLC ha permesso di compiere significativi progressi anche nella determinazione di tali enzimi in prodotti derivati quale, ad esempio, il formaggio, matrice che in precedenza si era dimostrata non facilmente analizzabile per via spettrofotometrica. A tal proposito è stata determinata l'attività enzimatica di entrambi gli enzimi in nove formaggi a 3,5 mesi di maturazione e in due formaggi a sei mesi di maturazione per i quali l'attività enzimatica nel latte d'origine era stata precedentemente accertata. I formaggi realizzati da 5 differenti produttori artigianali sono del tipo Fiore Sardo DOP, formaggio ovino tipico delle produzioni a latte crudo in Sardegna (**Capitolo 3**) (**Figura 9-3**). Questa prima indagine conoscitiva non aveva comunque lo scopo di studiare le correlazioni che intercorrono tra i formaggi provenienti da diversi produttori ma semplicemente quello di accertare la determinabilità di entrambi gli enzimi nella matrice formaggio.



Figura 9-3: Formaggio Fiore Sardo D.O.P.

I protocolli RP-HPLC per la determinazione di entrambi gli enzimi nel formaggio differiscono da quelli relativi al latte solo per la preparazione del campione. 10 g di formaggio grattugiato vengono pesati esattamente e sospesi in un volume finale di 50 mL di acqua distillata. La sospensione viene omogeneizzata per 5 min in uno stomacher (omogeneizzatore a battuta, che agisce mediante meccanismi di disgregazione e di agitazione) e quindi filtrata. Il filtrato viene quindi trattato in maniera assolutamente analoga al latte rispetto alle metodiche per tale matrice messe a punto (**Capitolo 6**).

La precisione, espressa in termini di ripetibilità, associata alla determinazione RP-HPLC degli enzimi nel formaggio è risultata di poco peggiore di quanto ottenuto nel caso del latte (**Tabella 9-12**).

<i>Matrice</i>	C.V.% (n=10)	
	<i>γ-glutamilttransferasi</i>	<i>α-L-fucosidasi</i>
Latte	2,9	4,5
Formaggio	3,5	5,1

Tabella 9-12

I valori di attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi riferiti ai formaggi a 3,5 mesi di maturazione realizzati artigianalmente da tre produttori durante tre diverse lavorazioni sono riportate nella **Tabella 9-13**.

Produttore	Lavorazioni		
	1	2	3
<i>α-L-fucosidasi (U/g_{ss})</i>			
A	25,08 ± 0,28	28,03 ± 0,91	23,71 ± 0,56
B	13,39 ± 0,65	10,08 ± 0,54	15,61 ± 1,69
C	11,74 ± 1,92	10,08 ± 0,19	19,14 ± 1,38
<i>γ-glutamilttransferasi (U/g_{ss})</i>			
A	1,23 ± 0,01	1,36 ± 0,01	1,60 ± 0,12
B	1,49 ± 0,16	1,98 ± 0,28	1,85 ± 0,01
C	1,97 ± 0,04	1,81 ± 0,16	2,10 ± 0,20

g_{ss} = grammi riferiti alla sostanza secca

Tabella 9-13

L'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi è stata determinata anche in campioni di Fiore Sardo DOP a 6 mesi di maturazione nei quali era stata precedentemente accertata l'attività enzimatica nel latte d'origine e nel formaggio a 3,5 mesi di maturazione (**Tabella 9-14**).

Produttore	Mesi di maturazione	
	3,5	6
<i>α-L-fucosidasi (U/g_{ss})</i>		
D	15,58 ± 0,84	18,07 ± 0,61
E	14,18 ± 1,69	24,96 ± 0,11
<i>γ-glutamilttransferasi (U/g_{ss})</i>		
D	2,60 ± 0,13	1,96 ± 0,18
E	1,38 ± 0,02	1,47 ± 0,10

g_{ss} = grammi riferiti alla sostanza secca

Tabella 9-14

Attraverso il protocollo RP-HPLC, messo a punto in questo lavoro di Tesi, è stato possibile determinare entrambi gli enzimi nel formaggio a 3,5 e a 6 mesi di maturazione, queste determinazioni sono risultate del tutto originali per quanto riguarda l' α -L-fucosidasi nel formaggio, mentre l'attività della γ -glutamilttransferasi era stata precedentemente determinata sulla tale matrice solo un'altra volta, per via spettrofotometrica [Humbert et al., 2002] nel Camembert, formaggio vaccino a latte crudo di produzione Francese.

9.5 Conclusioni

Lo studio della dipendenza dell'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi in funzione delle variabili chimico-fisiche, stagionali e zootecniche è stato condotto su un gruppo sperimentale ($n = 36$) di pecore di razza Sarda messo a disposizione dall'azienda AGRIS Sardegna. Sono state registrate strette analogie tra latte bovino ed ovino per quanto attiene i valori di pH ottimali per la determinazione dell'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi. La scrematura del latte ha influenza solo per l'attività enzimatica della γ -glutamilttransferasi che scende, per effetto di tal trattamento, di circa un terzo. Anche questi dati sono in buon accordo con quelli bibliografici relativi al latte bovino. E' stato evidenziato che esiste un significativo incremento dell'attività enzimatica in funzione della stagionalità (dai primi agli ultimi mesi di lattazione), forte per l' α -L-fucosidasi, meno evidente, ma presente, per la γ -glutamilttransferasi. Sono state messe in evidenza e discusse le differenze che a riguardo sono emerse nei confronti del latte di massa di origine bovina. Si sono evidenziate differenze statisticamente significative in funzione delle due diverse mungiture alle quali sono giornalmente sottoposti gli animali (mattina e sera), mentre sembrano non influire l'alimentazione integrativa e il carico di pascolamento. Lo studio ha permesso di delineare i valori medi e range tipici delle attività enzimatiche nel latte ovino nell'arco dell'annata produttiva. Un approccio multivariato all'analisi dei dati ottenuti, realizzato mediante PCA, ha permesso di evidenziare che la componente principale interpreta la macrocomposizione chimica ed enzimatica del latte (correlazione diretta degli enzimi con grasso, proteine e loro correlazione inversa con il lattosio), mentre la seconda pare associabile a parametri che monitorano lo stato di benessere del gregge. L'analisi degli oggetti permette di confermare l'influenza del periodo della lattazione, ma non quella della tipologia dell'alimentazione e del carico. E' interessante notare la non correlazione tra α -L-fucosidasi e cellule somatiche. In altre circostanze l'attività di enzimi lisozimiali (quale la α -L-fucosidasi) è apparsa strettamente correlata alla concentrazione di cellule somatiche (**Capitolo 2**), in quanto la lisi di esse provoca il rilascio nel latte di enzimi di origine cellulare. Vi è però da rimarcare che nessun dato in tal senso è presente in letteratura per l' α -L-fucosidasi.

La determinazione di entrambi gli enzimi è stata infine testata sia su latte proveniente da allevamenti estensivi che all'interno del formaggio Fiore Sardo DOP a 3,5 e a 6 mesi di maturazione. Le attività enzimatiche misurate sul latte da allevamenti estensivi non si discosta tangibilmente da quella misurata per i greggi sperimentali, mentre il successo della determinazione delle attività enzimatiche nei formaggi conferma che tale parametro è determinabile con i protocolli proposti lungo tutta la filiera produttiva, aprendo importanti prospettive per la loro applicabilità al fine di evidenziare trattamenti termici subiti dal latte prima della caseificazione.

10 Conclusioni

Le attività di ricerca che hanno caratterizzato questa Tesi di Dottorato rientrano nel più ampio contesto delle azioni di tutela a sostegno di alcune importanti produzioni tradizionali a Denominazione di Origine Protetta del comparto lattiero-caseario sardo. Per alcune di esse, a forte connotazione di tipicità e di tradizione, il disciplinare di produzione impone l'utilizzo di latte ovino crudo o termizzato; appariva pertanto desiderabile integrare il Disciplinare di Produzione con elementi conoscitivi volti all'accertamento di questo fondamentale prerequisito sulla materia prima. A differenza di quanto accade per il latte bovino, nel complesso piuttosto ben caratterizzato, molti sono gli aspetti del tutto ignoti che contraddistinguono il latte ovino. Ad esempio, la presenza e l'attività di enzimi termolabili endogeni del latte (quali ad esempio l' α -L-fucosidasi (EC 3.2.1.51) e la γ -glutamilttransferasi (EC 2.3.2.2)) è fatto noto e consolidato ormai da anni nel latte bovino. Ove presenti nella matrice latte ovino, l'inattivazione di tali enzimi, in analogia a quanto riportato per il latte vaccino, avrebbe potuto essere utilizzata come fattore discriminante di blandi trattamenti termici nella materia prima.

Il primo step del lavoro ha permesso da un canto l'identificazione degli enzimi in oggetto nella matrice latte ovino, ma dall'altro canto ha evidenziato la non idoneità delle metodiche spettrofotometriche descritte in letteratura (sviluppate per latte bovino) alla nostra matrice. E' stato quindi necessario modificarle significativamente al fine di renderle idonee a matrici con una maggior componente proteica rispetto a quella media bovina. Parallelamente si è cercato di implementare una metodica RP-HPLC più sensibile di quella spettrofotometrica da noi modificata. Sono quindi state messe a punto due metodiche analitiche (una spettrofotometrica, l'altra RP-HPLC) per la determinazione dell'attività enzimatica sia dell' α -L-fucosidasi che della γ -glutamilttransferasi. Le quattro metodiche sono state sottoposte ad un completo percorso di validazione (determinazione del limite di rivelabilità e di quantificabilità,

valutazione della linearità, della precisione e dell'assenza di bias); esse si sono rivelate in genere più sensibili e precise di quelle descritte in letteratura e caratterizzate dall'assenza di bias.

L'inattivazione dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi è stata studiata sia in funzione del pH della soluzione che nei confronti della somministrazione di calore. I dati ottenuti non si discostano in maniera particolare da quelli corrispondentemente osservati per il latte bovino. L' α -L-fucosidasi mostra un pH ottimale di azione compreso tra 5,5 e 6,0 ed un range di inattivazione termica compreso tra 57 e 68°C, mentre la γ -glutamilttransferasi mostra un pH ottimale di azione compreso tra 8,0 ed 8,5 ed un range di inattivazione termica compreso tra 68° e 80°C. I dati ottenuti confermano che il loro range di inattivazione rientra comunque nelle condizioni previste dalla direttiva 92/46 CEE rispettivamente per i trattamenti di termizzazione e pastorizzazione.

Successivamente si è provveduto a monitorare l'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi in funzione di importanti variabili zootecniche quali carico, tipologia di alimentazione e tempo. Lo studio è stato condotto monitorando quattro greggi sperimentali di pecore di razza Sarda messo a disposizione dall'azienda AGRIS Sardegna monitorate per tutto il periodo annuale di lattazione. Non sono state evidenziate dipendenze in funzione del carico e della tipologia di alimentazione, mentre sono state evidenziate delle differenze statisticamente significative ($p = 95\%$) nell'ambito della variabilità a breve termine (comparazione tra il latte prodotto nella sera e quello prodotto nella mattina successiva) ed a lungo termine (incremento dell'attività enzimatica lungo il periodo di lattazione, più pronunciato per l' α -L-fucosidasi). La scrematura del latte ha influenza solo per l'attività enzimatica della γ -glutamilttransferasi che scende, per effetto di tal trattamento, di circa un terzo. I dati ottenuti hanno permesso di poter valutare l'attività enzimatica media ed il range di variabilità di α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi nel latte ovino, che sono risultati essere rispettivamente $158,99 \pm 30,07$ e $207,7 \div 81,0$ e $3,83 \pm 0,34$ e $4,89 \div 3,12$.

Nell'ambito di una elaborazione PCA dei dati ottenuti dalle analisi condotte sui quattro greggi sperimentali durante l'intero periodo della lattazione, l'attività enzimatica dell' α -L-fucosidasi e della γ -glutamilttransferasi è risultata essere correlata, lungo la prima componente principale, al contenuto in grasso, proteine, lattosio,

mentre non è risultata essere correlata a urea e cellule somatiche, che descrivono la seconda componente principale e monitorano lo stato di salute degli animali.

Infine, i metodi analitici proposti sono stati testati “sul campo” sia su latte proveniente da alcuni allevamenti estensivi che, adattando opportunamente le metodiche, sul formaggio Fiore Sardo DOP a 3,5 e 6 mesi di maturazione. Le attività enzimatiche misurate sul latte da allevamenti estensivi non si discosta tangibilmente da quella misurata per i greggi sperimentali, mentre il successo della determinazione delle attività enzimatiche nei formaggi conferma che i parametri enzimatici da noi proposti sono determinabili lungo tutta la filiera produttiva, aprendo importanti prospettive per la loro applicabilità al fine di evidenziare trattamenti termici subiti dal latte prima della caseificazione.

11 Bibliografia

- Alais C.,(1984). Scienza del latte. *Tecniche Nuove*.
- Andrews, A.T., Anderson, M., Goodenough, P.W., (1987). A study of the heat stabilities of a number of indigenous milk enzymes. *Journal of Dairy Research*, 54, 237-246.
- Badings, H.T., Van der Pol, J.J.G., (1970). [A simple method to decrease the H₂S content and copper content of pasteurized cream and butter] (in Dutch). *Officieel Orgaan FNZ*, 62, 16-19.
- Baumrucker, C. R., Pocius, P. A., Riss, T. L. (1981) Glutathione utilization by lactating bovine mammary secretory tissue in vitro. *Biochem. J.* 198, 243–246.
- Baumrucker, R.C., (1979). γ -Glutamyl Transpeptidase of Bovine Milk Membranes: Distribution and Characterization. *Journal of Dairy Science*, 62, 253-258.
- Baumrucker, R.C., Green M. H., Blum J. W. (1994) Effects of dietary rhIGF-I in neonatal calves on the appearance of glucose, insulin, d-xylose, globulins and γ -glutamyltransferase in blood. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11, 393–403.
- Blel, M., Guingamp, M.F., Gaillard, J.L., Humbert, G. (2002). Studies on the thermal sensitivity of γ -glutamyltranspeptidase measured with a modified test procedure and compared with that of alkaline phosphatase and lactoperoxidase in milk. *Lait*, 82, 555-566.
- Burton, H. (1988). Types of UHT processing plant. In: H. Burton (Editor), Ultra-High-Temperature Processing of milk product. *Elsevier Applied Science*, London, pp. 77-129
- Challier M., Jacqueminet S., Benabdesselam O., Grimaldi A., Beaudeau J.L. (2005). High γ -glutamyltransferase (GGT) activity in human breast milk confounds interpretation of high serum GGT activity in a nursing infant with liver disease. *Clinical chemistry* 51, No. 9.
- CODEX STAN 206-1999. Codex General Standard for the Use of Dairy Terms. *Codex Alimentarius*

CODEX STAN A-6-1978, Rev. 1-1999, Amended 2006. Codex General Standard for Cheese. *Codex Alimentarius*

Corradini C., (1995). Chimica e tecnologia del latte. *Tecnihce Nuove*

Currie, L.A., (1999). Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta*, 391, 127-134.

Currie L. A., *Pure & Appl. Chem.*, 67, 1995, 1699.

Dalgleish, D.G., (1990). Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1995-1999.

De Noni, I., (2006). Study on the variabilità of fucosidase activity in bovine milk by means of HPLC. *International Dairy Journal*, 16, 9-17

De Wit, J.N., Klarenbeek, G., Hontelez-Backx, E., (1983). Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 1. Isolation and characterization. *Neth. Milk Dairy J*, 37, 37-49.

Dos Anjos, F., Machado, A., Ferro, C., Otto, F., Bogin, E., (1998). Gamma-Glutamyltransferase as a Marker for the Pasteurization of Raw Milk. *Journal of Food Protection*, 61 (8), 1057-1059.

Ersat Sardegna (2006): Progetto "Informatore della Campagna". *VII° Raport Trimestrale*. www.ersat.it

Farkye N. Y., Imafidon G. I., (1995). Thermal denaturation of indigenous milk enzymes. In Fox P.F. (Editor), *Heat-induced changes in milk, 2nd Edition*. *Int. Dairy Fed*. Special Issue n° 9501

Farkye N. Y., (2004), Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 91-98

FIL-IDF (1995). *Heat-induced changes in milk, 2nd Edition*. *Int. Dairy Fed*. Special Issue n° 9501

Fox P.F., Mcsweeney P. L. H., (1998). Dairy Chemistry and Biochemistry. *Blackie Academic & Professional*.

Hanigan, M. H. (1998) γ -Glutamyl transpeptidase, a glutathionase: Its expression and function in carcinogenesis. *Chem.-Biol. Interact.* 111–112,333–342;

Horwitz W. *Anal. Chem.* 54, 1982, 67A.

Humbert, G., Guingamp, M.F., Kouomegne, R., Linden, G., (1990). Measurement of proteolysis in milk and cheese using trinitrobenzene sulphonic acid and a new dissolving reagent. *Journal of Dairy Research*, 57, 143-148.

- Humbert, G., Guingamp, M.F., Linden, G., (1993). Determination of Sulfhydryl Groups in Milk Using Ellman's Procedure and Clarifying Reagent. *Journal of Dairy Science*, 76, 2152-2155.
- Humbert, G., Guingamp, M.F., Choukri, A., Linden, G., (1995). Method for measurement of *N*-acetyl- β -glucosaminidase activity in bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 62, 369-372.
- Humbert, G., Guingamp, M.F., Linden, G., Gaillard, J.L., (2006). The Claifying Reagent, or how to make the analysis of milk and dairy products easier. *Journal of Dairy Research*, 73, 464-471.
- Humbert, G., Guingamp, M.F., Gaillard, J.L., (2007). Improvement of the ammonia measurement using a clarifying reagent and application to evaluate heat damage in commercial milk samples. *International Dairy Journal*, 17, 902-906.
- IDF standard (1971). International Dairy Federation. 63
- ISO/DIS (1992). Provisional ISO standard 11816
- ISO 11843. "Capability of detection", (several parts), International Standards Organisation, Geneva
- Jelen P., Rattray W., (1995). Thermal denaturation of whey proteins. In Fox P.F. (Editor), *Heat-induced changes in milk, 2nd Edition*. *Int. Dairy Fed. Special Issue n° 9501*
- Johnson, S.W., Alhadeff, J.A., (1991). Mammalian α -L-Fucosidases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99B (3), 479-488.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M, (1994). *Principi di biochimica*. Bologna, I: *Zanichelli*.
- Linden, G., Paquet, D., (1981). Alkaline Phosphatase Activity in Transparent Milk and Cream. *Journal of Dairy Science* 64, 568-571.
- Linden G., Humbert G., Kouomegne R., Guingamp, M.F. (1987) *EP 0246 978 B1.*, 10 p.
- Long, L.G, Winefordner, J.D., (1983). Limif of detection. A Closer Look at the IUPAC Definition. *Analytical Chemistry* 55 (7).
- Long, J.E, van Winkle, Q & Gould, I.A. (1963). Heat-induced interaction between crude κ -casein and β -lattoglobulin. *J. Dairy Sci.* 46 1329-1339
- Lyster, R.L.J., Aschaffenburg, R., (1962). The reactivation of milk alkaline phosphatase after heat treatment. *J. Dairy Res.* 29, 21-35.
- Marangoni A. G., (2003). *Enzyme Kinetics: a modern approach*, *Wiley-Interscience*.

- Mckellar, R.C., Emmons, D.B., (1991). Gamma-Glutamyl Transpeptidase in Milk and Butter as an Indicator of Heat Treatment. *International Dairy Journal* 1, 241-251.
- Mckellar, R.C., (1996). Influence of ice-cream mix components on the thermal stability of bovine milk γ -glutamyl transpeptidase and *Listeria innocua*. *Int. Dairy J* 6 1181-1189
- McKellar, R.C., Piyasena, P., (2000). Predictive modeling of inactivation of bovine milk α -L-fucosidase in a high-temperature short-time pasteurizer. *International Dairy Journal* 10, 1-6.
- Meister A., Tate S.S. (1976) *Annu. Rev. Biochem.* 45, 559-604.
- Meister A., Anderson, M. E. (1983) *Glutathione. Annu. Rev. Biochem.* 52, 711–760.
- Mellors, A., Harwalkar, V.R., (1968). Glycosidases in bovine milk: Alpha-mannosidase and its inhibition by zwitterions. *Canadian Journal of Biochemistry*, 46, 1351-1356.
- Morita, K., Teraoka, K., Hamano, S., Oka, M. (1994) Lack of relationship between gamma-glutamyl transpeptidase and tyrosine transport in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 33, 99–105.
- Mullen, J.E.C., (1950). The acid phosphatase of cow's milk. *J. Dairy Res.* 17, 288-295.
- Murthy, G.K., Cox, S., Taylor, L., (1976). Reactivation of alkaline phosphatase in ultra-high-temperature, short-time processed liquid milk products. *J. Dairy Sci.* 59, 1699.1710.
- Nakai, S., Chi Le, A., (1970). Spectrophotometric Determination of Protein and Fat in Milk Simultaneously. *Journal of Dairy Science* 53 (3).
- O'Brien J., (1995). Heat induced changes in lactose: isomerization, degradation, maillard browning. In Fox P.F. (Editor), *Heat-induced changes in milk, 2nd Edition. Int. Dairy Fed. Special Issue* n° 9501
- Owen, A.J., Andrews, A.T., (1984). A procedure for the complete clarification of milk of various species and its suitability for use with colorimetric measurements. *Journal of Dairy Research* 51, 307-315.
- Patel, S.S, Wilbey, R.A., (1994). Thermal inactivation of γ -glutamyltranspeptidase and *Enterococcus faecium* in milk-based systems. *Journal of Dairy Research* 61, 263-270.

- Pellegrino, L., Resmini, P., Luf, W., (1995). Assessment (Indices) of heat treatment of milk. In Fox P.F. (Editor), *Heat-induced changes in milk, 2nd Edition. Int. Dairy Fed. Special Issue n° 9501*: 409-453
- Pellegrino, L., Tirelli A., Masotti F. Resini P., (1995 b). Significance of the main chemical indicators of heat load for characterizing raw, thermized, pasteurized and high temperature pasteurized milk. In Proceedings of the IDF Symposium. Austria 6-8- September 1995.
- Pirisi, A., Pinna, G., Papoff, C.M., (1999 a). Effetto della termizzazione del latte sul formaggio DOP Fiore Sardo: caratteristiche fisico-chimiche. *Scienza e tecnica lattiero-casearia 50 (5)*, .353-366.
- Pirisi, A., Pinna, G., Piredda, G., Addis, M., Di Salvo, R., (1999 b). Effetto della termizzazione del latte sul formaggio DOP Fiore Sardo: andamento della lipolisi nel corso della maturazione. *Scienza e tecnica lattiero-casearia 50 (5)*, 366-377.
- Raynal-Ljutovac, K., Park, Y.W., Gaucheron, F., Bouhallab, S., (2007). Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research 68*, 207-220.
- Resmini P., Pellegrino L., Battelli G., (1990). Accurate quantification of furosine in milk and dairy product by a direct HPLC method. *Ital. J. Food Sci. 2* 173-183.
- Scintu, M.F., Daga, E., Ledda, A., (2000). Evaluation of Spectrophotometric and Fluorometric Methods for Alkaline Phosphatase Activity Determination in Ewe's Milk. *Journal of Food Protection 63 (9)*, 1258-1261.
- Scintu, M.F., Daga, E., Ledda, A., (2001). Valutazione della Fosfatasi alcalina in latte di pecora crudo, termizzato e pastorizzato. *Scienza e tecnica lattiero-casearia 52 (3)*,217-225.
- Singh, H., Fox, P.F., (1987a). Heat stability of milk: role of β -lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar k-casein. *J. Dairy res. 54*, 509-521.
- Singh, H., Fox, P.F., (1987b). Heat stability of milk: influence and colloidal and soluble salts and protein modification on the pH-dependent dissociation of micellar k-casein. *J. Dairy res. 54*, 523-534.
- Sing H., (1995). Heat-induced changes in casein, including interactions with whey proteins. In Fox P.F. (Editor), *Heat-induced changes in milk, 2nd Edition. Int. Dairy Fed. Special Issue n° 9501*
- Smits, P., Van brouwershaven, J.H., (1980). Heat-induced association of β -lactoglobulin and casein micelles. *J. Dairy Res. 47*, 313-325.

- Sulzenbacher, G., Bignon, C., Nishimura, T., Tarling, C.A., Withers, S.G., Henrissat, B., Bourne, Y. (2004). Crystal Structure of *Thermotoga maritima* α -L-fucosidase. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (13), 13119-13128.
- Thompson, M., Ellison, L.R.S., Wood, R., (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Applied Chemistry* 74 (5), 835-855.
- Todeschini R., (2003). Introduzione alla Chemiometria. *EdiSES*.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000 – 30/11/2000 (Norma) Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.
- Walstra, P., (1983). Physical chemistry of milk fat globules. In: P.F. Fox (Editor), *Developments in Dairy Chemistry-2. Lipids*. Applied Science Publishers Ltd., pp. 119-158.
- Walstra, P., van Boekel, M. A. J. S., (1995). Effect of heat treatment on chemical and physical changes to milk fat globules. In Fox P.F. (Editor), *Heat-induced changes in milk, 2nd Edition. Int. Dairy Fed. Special Issue n° 9501*
- Wiederschain, G.Y., Newburg, D.S., (1996). Compartmentalization of Fucosyltransferase and α -L-Fucosidase in Human Milk . *Biochemical and Molecular Medicine* 58, 211-220.
- Wiederschain, G.Y., Newburg, D.S., (1995). Human milk fucosyltransferase and α -L-fucosidase activities change during the course of lactation. *Nutritional Biochemistry* 6, 582-587.
- Wolff, J. E. A., Munstermann, G., Grebenkamper, K., Erben, M. (1998) Gamma-glutamyl transpeptidase does not act as a cystine transporter in brain microvessels . *Neurochem. Res.* 23, 1175–1178.
- Zehetner, G., Bareuther, C., Henle, T., Klostermeyer, H.K., (1996). Inactivation of endogenous enzymes during heat treatment of milk. *Netherlands Milk & Dairy Journal* 50, 215-226.