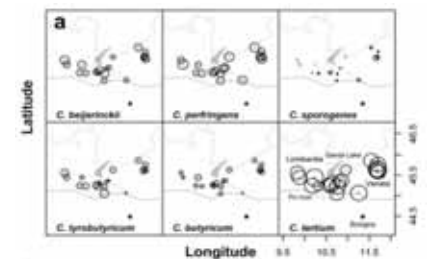
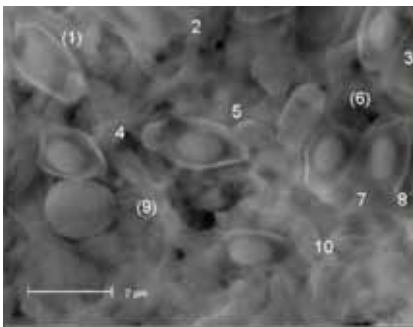


Miglioramento del formaggio Grana Padano DOP: prove di produzione senza lisozima

RAPPORTO DI RICERCA



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI MILANO



UNIVERSITÀ DEGLI
STUDI DI PARMA



Regione
Lombardia
Agricoltura

Sperimentazione condotta nell'ambito del progetto di ricerca "Miglioramento del formaggio Grana Padano DOP: prove di produzione senza lisozima (GP-Lfree)" - d.g.r. 29 dicembre 2010 N. IX/1155 e decreto n. 7656 del 11/08/2011

Responsabile scientifico: prof. Gianfranco Piva

Testi a cura di:

Gianni Colombari, Gian Antonio Zapparoli, Laura Galassi, Donatella Melani, Marco Zanazzi, Luisa Pellegrino, Monica Gatti, Francesco Masoero, Pier Sandro Cocconcelli, Maria Feligini.

Foto a cura di:

Gianni Colombari, Gian Antonio Zapparoli, Marco Zanazzi

Hanno realizzato le attività sperimentali:

ERSAF sede di Mantova

Via Carpaneta, 7 - 46030 Bigarello (Mantova) tel: 0376-459559 – Fax: 0376-459334
Referente: Gian Antonio Zapparoli gianantonio.zapparoli@ersaf.lombardia.it

Università degli Studi di Milano - DeFENS

Via Celoria, 2 - 20133 Milano tel: 02 50316668
Referente: Luisa Pellegrino luisa.pellegrino@unimi.it

Università degli Studi di Parma

Dipartimento di Genetica, Biologia dei microrganismi, Antropologia, Evoluzione

Parco delle Scienze - 43100 Parma tel: 0521 906529
Referente: Monica Gatti monica.gatti@unipr.it

Università Cattolica del Sacro Cuore – ISAN Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione

Via Emilia Parmense, 84 - 29122 Piacenza tel. 0523 599261
Referente: Francesco Masoero francesco.masoero@unicatt.it

Università Cattolica del Sacro Cuore – CRB Centro di Ricerche Biotecnologiche

Via Milano 24 26100 Cremona tel: 0523 599251
Referente: Pier Sandro Cocconcelli pier.cocconcelli@unicatt.it

Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani

Località La Quercia – 26027 Rivolta D'Adda (Cremona) tel: 0363 78883
Referente: Maria Feligini maria.feligini@istitutospallanzani.it

Per Informazioni:

Regione Lombardia - Direzione Generale Agricoltura
U.O. Sviluppo di innovazione, cooperazione e valore delle produzioni
Struttura Sviluppo e promozione delle produzioni, ricerca,
innovazione tecnologica e servizi alle imprese
Piazza Città di Lombardia n.1 - 20124 Milano
tel: +39.02.6765.2546 fax +39.02.6765.8056
e-mail: agri_ricerca@regione.lombardia.it
Referente: Elena Brugna, Giovanna Praderio
Elena_Brugna@regione.lombardia.it
giovanna.praderio@ersaf.lombardia.it



Miglioramento del formaggio Grana Padano DOP: prove di produzione senza lisozima

RAPPORTO DI RICERCA

Ottobre 2015

SOMMARIO

Capitolo 1 - I perché del progetto	pag.7
1.1 Le motivazioni tecniche	pag.7
1.1.1 Ristabilire il legame con il territorio	pag.7
1.1.2 Capitalizzare i miglioramenti qualitativi nell'insilamento-desilamento	pag.8
1.1.3 Capitalizzare l'azione "sanitizzante" introdotta con la tecnica unifeed	pag.9
1.1.4 Capitalizzare i miglioramenti igienici di stalla, cuccette e mungitura	pag.10
1.2 Le motivazioni sanitarie	pag.12
1.2.1 Le allergie alle proteine dell'uovo	pag.12
 Capitolo 2 – Obiettivi e piano di lavoro.....	pag.14
2.1 ERSAF	pag.16
2.2 UNICATT ISAN	pag.16
2.3 UNICATT CRB	pag.17
2.4 SPALLANZANI	pag.17
2.5 UNIPR.....	pag.18
2.6 UNIMI DEFENS	pag.18
 Capitolo 3 – I risultati sperimentali	pag.19
3.1 Agronomico.....	pag.19
3.2 Zootecnico – Lattiero	pag.31
3.3 Lattiero – Caseario	pag.45
3.4 I difetti del formaggio	pag.53
3.5 L'analisi sensoriale.....	pag.61
3.6 Sottoprogetto 1: Monitoraggio della moltiplicazione dei Clostridi	pag.71
3.7 Sottoprogetto 2 A: Quantificazione dei clostridi nell'intera filiera	pag.106
3.8 Sottoprogetto 2 B: Genomica dei Clostridi.....	pag.124
3.9 Sottoprogetto 3: L'autolisi dei batteri lattici con e senza lisozima	pag.131
3.10 Sottoprogetto 4: Proteolisi e rispondenza del formaggio allo standard	pag.153
 Capitolo 4 – Considerazioni e Conclusioni	pag.172
 Bibliografia	pag.179



UN RICORDO DI GIANNI COLOMBARI

In premessa delle relazioni dei partners sui risultati del progetto “GPL-free, produzione di grana senza lisozima”, desidero ricordare il collega Gianni Colombari, che ci ha lasciato improvvisamente il 21 marzo 2014, quando sembrava che l'intervento chirurgico al quale si era sottoposto fosse riuscito tempestivamente a scongiurare il maggior pericolo; purtroppo non è stato così, e la notizia della sua scomparsa ci ha colpiti ancor più duramente, quando ormai eravamo tutti convinti di rivederlo presto in ufficio, alla fine della sua convalescenza.

Per sette anni ho diretto le attività della sede ERSAF di Mantova, e la sua presenza in ufficio, sin dal mattino presto era una costante, per me che arrivavo faticosamente in treno da Milano. Il ricordo che porto sempre con me e che mi è d'esempio è stata la sua enorme passione, che lo ha portato a sviluppare una grande competenza, concentrata soprattutto sugli aspetti colturali, dalle lavorazioni del terreno alla fisiologia vegetale delle nostre colture più diffuse, che gli consentiva di impostare con grande scrupolo e precisione le prove sperimentali che si svolgevano, prima all'azienda Cerchie e poi in Carpaneta, soprattutto grazie al suo impulso.

Nella sua attività Gianni ha sempre avuto chiarissima la coscienza profonda del nostro ruolo di azienda pubblica, alla quale compete di provare in anticipo le soluzioni che consentano agli agricoltori di fare scelte mirate, evitando loro di effettuare in proprio prove dall'esito incerto per l'attività routinaria, che deve avere un riscontro economico vantaggioso. Agevolare gli agricoltori era per lui una vera missione.

Per questo l'altra sua grande passione era la divulgazione, per svolgere la quale era in contatto costante con i docenti universitari e degli Istituti Tecnici Agrari, che invitava a portare in azienda i propri studenti per illustrare loro sul campo, “sporcandosi di terra le scarpe”, ciò che in azienda era stata la nostra esperienza.

Per Gianni gestire un'azienda pubblica senza cercare di sperimentare soluzioni nuove non aveva quasi nessun significato, e questo lo poneva in disaccordo con il “momento storico” di questi ultimi anni, nei quali l'Ente Pubblico cerca di far quadrare i conti anche e soprattutto nelle proprie attività economiche gestionali.

Il progetto “LISOZIMA” deve moltissimo a Gianni Colombari, sia nella sua ideazione che nella fase realizzativa e la relazione di ERSAF, per la parte agronomica e di allevamento, ha costituito il suo canto del cigno.

Ciao Gianni e grazie, da tutti i tuoi colleghi di Mantova

Mario Marchesi

CAPITOLO 1 - I PERCHÉ DEL PROGETTO

Nell'ambito di qualsiasi processo di filiera agro-zoo-lattiero-caseario tradizionale, cioè di buone azioni a basso input tecnologico garantite dal tempo, avvengono piccoli adeguamenti tecnologici nei vari settori della filiera, i cui effetti sono, talvolta, di difficile valutazione ad ogni step evolutivo.

Nonostante la vigilanza degli organi, deputati alla conservazione della tradizione del processo-prodotto, sia particolarmente attenta affinché il sistema mantenga la sue originali e peculiari caratteristiche, questi adeguamenti trovano spesso una loro reale espressione/evidenza solo dopo qualche anno dall'introduzione nel processo reale produttivo.

Dunque, a volte, può essere utile indagare la filiera dopo successivi step innovativi agro-zoo-lattiero caseari in modo tale da ricavare "osservazioni complessive" utili al miglioramento continuo del processo-prodotto.

Negli ultimi decenni l'agricoltura e la zootecnia padana hanno visto evoluzioni a tutti i livelli: coltivazioni, tecniche di conservazione degli alimenti, strutture, stabulazioni, tecniche di somministrazione della dieta, produzione individuale di latte, modalità di mungitura, interventi igienici in pre e post mungitura, temperature di stoccaggio del latte, modalità di stoccaggio alla stalla e di trasporto, tecniche di affioramento, caseificazioni con additivi, entità di salatura delle cagliate, gestione programmata della fermentazione del siero di fine lavorazione e altre variazioni tecnologiche in caseificio.

Senza affrontare singolarmente ogni singolo aspetto agro-zoo-lattiero-caseario della filiera da grana, nel presente progetto si è voluto verificare se le più recenti innovazioni soprattutto a livello agro-zootecnico di insilamento-desilamento, di somministrazione della dieta sottoforma di unifeed e l'igiene d'allevamento e mungitura, possono tutelare la produzione di formaggio Grana Padano senza additivi.

1.1 Le motivazioni tecniche

1.1.1 Ristabilire il legame con il territorio

Il Bottazzi (1998), scriveva: " *L'introduzione del foraggio insilato ha rappresentato un fatto innovativo di straordinaria portata e ha introdotto una enorme problematica nella produzione del formaggio grana mai prima conosciuta distruggendo un vecchio legame con il territorio, anzi instaurando un forte legame negativo con lo stesso, per cui oggi voler far credere che esiste un buon legame è fantasia dilettantistica o volontà di perseguire il ridicolo*..... Oggi si usa, ad esempio in zona A (insilati), l'additivo lisozima perché il latte è troppo inquinato da spore del genere *Clostridium* si può dire che sia secondo tradizione e che sia nell'ambito degli usi leali e costanti?.... Qual è il prodotto DOP? Si può riconoscere tale un formaggio prodotto con un additivo?

Indubbiamente una analisi "cruda", ma obiettiva; maturata dopo vastissime esperienze e tra queste, quelle pubblicate dallo stesso autore (Bottazzi 1982), nelle quali affermava che con 40 spore/litro non vi era alcun pericolo di fermentazione butirrica e quindi di gonfiore tardivo e che questo basso livello di spore era raggiungibile con la bactofugazione anche quando il numero di spore nel latte di partenza era, ad esempio, di 10.000 per litro; salvo poi, due anni dopo (Bottazzi, 1984), confermare la complessità della tematica del controllo delle spore e delle fermentazioni butirriche nel Grana Padano, scrivendo: "*occorre molta cautela prima di generalizzare la scelta, anche quando le innovazioni sono interessanti e di facile applicazione*" e nella stessa nota sperimentale indicava la necessità di una doppia desporificazione (affioramento e bactofugazione) per il latte invernale con forti inquinamenti da clostridi.

Nell'introduzione dello stesso articolo scientifico l'autore si pone una domanda fondamentale, ancora attuale dopo 30 anni, che esprime sostanzialmente il "cuore" dell'articolo stesso, e alla quale il presente progetto si è riallacciato: "*Probabilmente solo un latte con buone caratteristiche microbiologiche può sostare in bacinella senza l'integrazione dell'azione dell'affioramento con quello della formalina (o del lisozima in caldaia, ndr). E' questa possibilità unicamente legata alla proibizione degli insilati?*".

Sedici anni dopo Bottazzi (2000), sembrava rispondere affermativamente a questa domanda laddove scriveva: "*..Nel corso degli ultimi decenni nel vasto comprensorio di produzione del Grana Padano si sono configurate delle aree produttive il cui prodotto è già stato o può essere riconosciuto tradizionale. E', ad esempio, da tempo riconosciuto (decreto del presidente della Repubblica 26 gennaio 1987 "Modificazione al disciplinare di*

produzione del formaggio Grana Padano” apparso sulla Gazzetta Ufficiale del 15 giugno 1987 numero 137) il Grana Padano prodotto nel territorio della provincia autonoma di Trento.

1.1.2 Capitalizzare i miglioramenti qualitativi nell’insilamento-desilamento

Con riferimento ai microrganismi anticaseari presenti in quantità eccessiva nel foraggio insilato e che trovano nel formaggio condizioni idonee di sviluppo, il Bottazzi (1998), elencava i seguenti 3 gruppi:

- Batteri sporigeni anaerobi con le specie *Clostridium tyrobutyricum* e *Clostridium butyricum*;
- Batteri propionici, rappresentati principalmente dalla specie *Propionibacterium shermanii*;
- Batteri lattici produttori di gas della specie *Lactobacillus fermentum*.

Secondo Borreani (2002), si tratta però di presenza mediata anche dall’esposizione all’aria dell’insilato, in quanto l’ossigeno penetrando all’interno della matrice insilata, stimola lo sviluppo dei microrganismi aerobi acidofili (lieviti e batteri acetici) che consumano l’acido lattico, ossia il principale responsabile dell’inibizione/rallentamento della crescita dei clostridi (Jonsson, 1989; 1991).

Le razioni con insilati, per vacche da latte, di qualità scadente, favoriscono la diffusione nell’ambiente stalla e la presenza nel latte di batteri sporigeni (Emaldi *et al.* 1977; Bertoni G., 1996; Bani *et al.* 2001; Crovetto *et al.* 1990). L’entità della diffusione è molto variabile, dipende dal tipo di insilato somministrato (G. Piva *et al.* 1971) e dal tipo di microrganismo anaerobico dominante (Colombari *et al.* 2003).

Le spore, secondo Contrepolis (1971), passano nell’apparato digerente degli animali con bassissimi livelli di replicazione, al contrario, le cellule vegetative, all’interno del rumine, si moltiplicano intensamente (Colombari G., 2005; tab. 1), “contaminando” la microflora ruminale impegnata nella fermentazione della dieta. Temperatura, potenziale ossido-riduttivo e nutrienti presenti nel rumine sono, per altro, assai prossimi alle esigenze nutritive dei clostridi stessi.

Durante il transito nel digerente le cellule vegetative, trasportate dai tessuti vegetali e dai liquidi digestivi, si moltiplicano (probabilmente nel rumine) e poi sporificano (probabilmente nell’abomaso) e questo spiega l’incremento significativo del rapporto tra il numero di spore in escreta (feci), e quello in ingesta (razione), con valori variabili da 4 a oltre 1.700 nelle diete con insilati di qualità microbiologica variabile e soprattutto somministrazione in mangiatoia, immediata, subito dopo il desilamento.

Con queste tecniche tradizionali di somministrazione degli insilati di qualità microbiologica variabile, il tasso di digeribilità della dieta ha una influenza marginale sul valore del rapporto tra spore in escreta e in ingesta.

Si è dovuti arrivare verso la metà degli anni ’90, per capire il ruolo fondamentale delle corrette operazioni di raccolta del foraggio in campo (Borreani, 1994), copertura del silo (Borreani, 2008), compressione in fase di insilamento, appesantimento (Ruppel 1995, Ciotti 1999; Borreani 2001-2002-2003), ritmo di desilamento e quindi apprezzare la potenzialità di questo sistema di conservazione anche per il latte destinato alla produzione di formaggi DOP a lunga stagionatura (Bottazzi, 1996; Colombari, 1991, 1999; 2001).

Area Grana Padano: Spore ingerite ed escrete (MPN spore/g ss) e rapporto tra Log “feci” e Log “razione”. Prove svolte con alimentazione tradizionale e unifeed.					
	Tradizionale			Unifeed	
	RF	S	F & C	D	S
Razione	170 ^A	370 ^{BC}	190 ^A	810 ^D	710 ^{CD}
Feci	97.700 ^C	4.450 ^B	800 ^A	2.150 ^{AB}	1.250 ^{AB}
Feci/razione ⁽¹⁾	2,25 ^C	1,44 ^B	1,29 ^{AB}	1,14 ^A	1,09 ^A
Prove (n)	5	10	9	7	6
RF = rotoballe fasciate con piccole lacerazioni del telo di fasciatura, consumate in estate con o senza silomais; S = silomais, unico insilato; F&C = fieno e concentrati (senza insilati); D = silomais o pastone di pannocchia con loiessa silo o medica silo (due insilati). ⁽¹⁾ Log (MPN spore/g ss feci)/Log (MPN spore/g ss razione); esempio: 2,25= 5/2,22 ossia, log 10 ⁵ /log 10 ^{2,22} . Valori con lettere diverse sulla stessa riga differiscono statisticamente tra loro per P<0,01.					

Tabella 1. Rapporto tra spore feci e spore razione in area Grana Padano con alimentazione tradizionale e unifeed



Figura 1. Prove storiche di desilamento, produzione di latte e di formaggio grana con forti avanzamenti del fronte;

Figura 2. Prove storiche con ingestione di insilato posizionato in “alto” e in “basso” nella trincea;

Figura 3. Prove con appesantimenti di ghiaia Ø 8,0 cm a 300 kg/m².

Anni '90 – Istituto Sup. Lattiero-Caseario di Mantova.

1.1.3 Capitalizzare l'azione “sanitizzante” introdotta con la tecnica unifeed

L'introduzione in Italia dell'unifeed, promossa dal Resp. Scientifico di questo progetto, verso l'inizio degli anni '80 (Piva-Masoero, 1985; Crovetto 1985), è stata incoraggiata allo scopo di migliorare l'efficienza fermentativa ruminale delle bovine da latte e di conseguenza, tutti i parametri produttivi e sanitari della mandria. Non era minimamente prevedibile, a quel tempo, che la tecnica potesse avere anche una capacità sanitizzante della razione, con riferimento alla microflora anaerobica vegetativa degli insilati.

L'unifeed infatti, per il grado di aerobiosi che subisce nel corso della miscelazione e durante la distribuzione e la sosta in mangiatoia, con le vacche che rimescolano continuamente la massa alla ricerca delle parti fini che aderiscono al pavimento della mangiatoia stessa, rappresenta una importante tecnica “filocasearia” in grado di contrastare lo sviluppo della microflora anaerobica vegetativa, eventualmente sviluppatasi negli insilati, per la quale l'ossigeno è un elemento tossico.

L'aerobiosi è maggiore negli unifeed tal quale “secchi”, non addizionati con acqua, perché l'acqua appesantisce la dieta e favorisce l'adesione tra le varie componenti della razione.

Ciò è in accordo con Jonsson (1990) che in laboratorio aveva notato un decremento di attività dei clostridi dopo soli 30 minuti di esposizione all'aria.

Proprio sulla base di queste considerazioni, pur non disponendo di carro unifeed, presso l'Istituto Sup. Latt. Caseario era iniziata, nei primi anni '90, una sperimentazione con lo scopo di verificare questa azione igienizzante. Per fare ciò è stato impiegato un comune carro miscelatore al quale erano state aggiunte, in via sperimentale, due classiche ventole impiegate per il ricambio dell'aria in porcilaia (figura 4).



Figura 4. Prove di ventilazione di una parte della dieta contenente foraggio insilato

Dunque, come talvolta accade, l'introduzione di una determinata innovazione può dimostrarsi utile anche per altri scopi. Vale ovviamente, anche il contrario.

Il miglioramento microbiologico dell'intera filiera, con l'introduzione dell'unifeed però, non è stato immediatamente notato, perché nelle aree silo andava peggiorando la qualità degli insilati come conseguenza della tecnica unifeed stessa che favoriva l'aumento: a) della dose di insilato nelle razioni, per cui le prime trincee

costruite erano diventate piccole (fig. 5); b) del numero di insilati e quindi dei fronti di taglio aperti ed esposti all'aria; c) dell'umidità degli insilati di graminacee e leguminose (Venier, 2007), talvolta ammassate in cumuli la cui forma era più subordinata al quantitativo di foraggio da raccogliere per liberare l'appezzamento, piuttosto che al ritmo di desilamento e soprattutto alla facilità di chiusura ermetica del silo (fig. 5) o alla stabilità della chiusura stessa (fig. 6).

Sebbene l'unifeed aiuti a caratterizzare aerobicamente la dieta, è necessario, comunque, garantire la qualità microbiologica dell'insilato, perché l'azione di sanitizzazione del piatto unico è indifferenziata, ossia, non è in grado di operare una pressione di selezione più forte verso i batteri anaerobi più "virulenti" nel provocare danni fermentativi nel formaggio grana (Ingham et al., 1998).

In questo senso non è possibile affidarsi alle sole azioni igienizzanti della tecnica unifeed o delle operazioni in fase di mungitura (cfr. più avanti), perché è sempre possibile il passaggio, dagli insilati al latte, di ceppi di clostridi particolarmente aggressivi nei confronti del formaggio grana (Bertoni, 1996).



Figura 5. Silomais ammassato malamente, oltre la capienza della trincea, per l'aumento dei fabbisogni della mandria

Figura 6. Rotoballa fasciata con piccole lacerazioni dei teli

1.1.4 Capitalizzare i miglioramenti igienici di stalla, cuccette e mungitura

La relazione tecnica relativa alla attuazione del programma di intervento per il miglioramento qualitativo del latte, in provincia di Mantova, di cui ai regolamenti CEE n. 2936/79-1079/81-272/82-593/83, pur rilevando che "*L'evoluzione degli allevamenti ha notevolmente migliorato lo standard di produzione ...*", mostrava una struttura zootecnica caratterizzata da mandrie di piccole dimensioni (tab. 2), mediamente attorno alle 25 vacche con stabulazione quasi esclusivamente fissa.

Nella stessa Lombardia nel 1990, quasi un decennio dopo, il numero medio di vacche da latte per allevamento di pianura, collina e montagna era pari a solo 28, salito a 46 vacche nel 2000 dopo i 3 programmi di abbandono della produzione di latte, fino alle 65 vacche del 2010 (Osservatorio del latte - ISMEA 2004; Pieri R. 2012).

Struttura degli allevamenti in provincia di Mantova nei primi anni '80.	
Vacche (n)	(%)
1-20	50
21-30	17
31-40	10
41-50	9
> 50	14

Tabella 2. Anni '80: struttura degli allevamenti in provincia di Mantova

N° caseificio provincia MN	Medie analisi anni 1980 - '81 -'82				
	Grasso (%)	Proteine (%)	Cellule (x 10 ⁻³)	CBT (x 10 ⁻³)	Spore (MPN/L)
1	3,76	3,04	482	626	243
2	3,79	3,08	510	1474	524
3	3,79	3,07	665	797	320
4	3,81	3,04	566	560	658
5	3,74	3,06	612	1234	309
6	3,82	2,91	499	545	278
7	3,69	3,00	490	728	358
8	3,80	3,05	519	722	291
9	3,79	3,11	573	666	355
10	3,81	3,05	561	623	486
Media	3,78	3,04	548	798	382

Tabella 3. Anni 1980-1981-1982. Caratteristiche chimiche (peso/volume) e microbiologiche dei latti consegnati ai caseifici coop.

N° caseificio provincia MN	Medie analisi anni 2010-'11-'12				
	Grasso (% p/v)	Proteine (% p/v)	Cellule (x 10 ⁻³)	CBT (x 10 ⁻³)	Spore (MPN/L)
1	3,85	3,40	300	19	659
2	3,96	3,38	309	46	340
3	3,94	3,46	299	31	1019
5	3,92	3,46	273	26	611
6	3,85	3,43	249	28	616
7	3,90	3,41	356	37	738
8	3,90	3,45	255	31	707
Media	3,90	3,43	291	31	670

Tabella 4. Anni 2010-2011-2012. Caratteristiche chimiche (peso/volume) e microbiologiche dei latti consegnati ai caseifici coop.

La qualità chimico-fisica e microbiologica del latte consegnato a 10 caseifici cooperativi della provincia di Mantova, negli anni 1980-'81-'82, tutti caseifici che impiegavano silomais nella dieta per vacche da latte, era nettamente carente (tab. 3) e ciò a causa di fattori energetici- proteici delle diete, di igiene degli impianti di mungitura, delle poste di stabulazione, degli animali, delle mammelle e di raffreddamento del latte munto (Caleffi, 1988). Particolarmente scadenti i parametri della carica batterica e del tenore di spore, soprattutto se si considera che i dati, sono valori medi di 3 anni.

In quel periodo, soprattutto in estate, era comune trovare latti silo con valori di 10⁶ Ufc/ml di CBT e nel corso dell'anno latti silo con valori di 8x10⁵ Cellule/ml e 1.500-2.500 spore/litro. Alcuni caseifici avevano medie annuali superiori a 1.500 spore/litro.

Le foto 8 e 9, mostrano invece correttamente, una bovina, una mammella, una lettiera ed un intervento igienico ben curati. Nella realtà, soprattutto nelle munte del mattino, ma non solo, le condizioni delle stalle negli anni '80 e non solo, erano ben altre, e queste foto, tutt'altro che rappresentative delle situazioni di stalla di quel tempo, avevano solo la funzione di indicare quali erano le ideali condizioni d'igiene degli animali, della posta, della mammella e del capezzolo.



Figura 7. Stalla a stabulazione fissa



Figura 8. Fase di igiene del capezzolo in pre-mungitura



Figura 9. Mungitura alla posta

Dopo oltre 30 anni, la struttura zootecnica nella provincia di Mantova è fortemente mutata ed il numero medio di vacche da latte per allevamento, pari a 89 capi, è aumentato mediamente di 3,6 volte (Pieri R. 2013). In Regione Lombardia, per gli allevamenti di pianura, secondo i dati del censimento 2010, questo dato sale a 108 vacche da latte.

E' ragionevole ritenere che nel 2014 il numero di vacche da latte per allevamento sia ulteriormente aumentato. Anche nel mantovano le stalle sono ormai tutte a stabulazione libera con sala di mungitura ed interventi igienici in pre e post mungitura.

Se tuttavia si confrontano i dati dei latti consegnati alle cooperative sociali 30 anni fa (tab.3), con quelli degli anni 2010-2011-2012 (tab. 4), si nota un netto miglioramento del tenore in grasso e soprattutto di proteine, di cellule e di Cbt, quest'ultima è migliorata anche con il contributo del raffreddamento del latte al stalla (Caleffi et al. 1988; Zapparoli et al. 1987, 1988).

Il dato microbiologico del tenore in spore del latte consegnato ai caseifici merita invece una spiegazione.

Il dato medio di 382 vs 670 spore MPN/L indicherebbe infatti un peggioramento netto della contaminazione sporale del latte.

In realtà, nei 30 anni trascorsi, la metodologia di analisi è variata, favorendo la germinazione delle spore; ad esempio, sono aumentati i giorni di incubazione, passati dai 4 ai 6 giorni attuali, ed il substrato attualmente impiegato è più adatto alla crescita di tutte le specie di clostridi.

Dunque sembra più ragionevole affermare che l'inquinamento da spore negli ultimi 30 anni non sia sostanzialmente migliorato o forse è solo leggermente peggiorato, ma in misura nettamente inferiore di quanto mostrano i due dati microbiologici relativi alle spore MPN/L nelle due tabelle 3-4.

Ciò potrebbe essere dovuto ad un uso di differenti tipi di insilati, anche rotoballe fasciate, e non di solo silomais come era in uso negli anni '80, e/o alla non buona qualità microbiologica delle cuccette, delle mammelle-cappezzoli ed infine dell'igiene di mungitura (Stadhousers et al. 1990).

Il tenore ancora elevato di spore nel latte è oggi fortunatamente "tamponato-coperto" nelle caseificazioni per formaggi a lunga stagionatura, dal lisozima, enzima efficace nell'inibenza dello sviluppo delle spore, anche con tenori di 1.500 spore/L (Bottazzi et al. 1993, 1996, 1999; Battistotti et al., 1984; Bertezolo et al., 1982; Carini et al. 1982, 1992; Carminati et al., 1985; Lodi, 1990; Neviani, 1992).

1.2 Le motivazioni sanitarie

1.2.1 Le allergie alle proteine dell'uovo

Il lisozima è un polipeptide che si ottiene dall'albume d'uovo e l'allergia alle uova è annoverata tra le più frequenti nella popolazione.

Il Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, il 17 luglio 2008, ha informato che in bibliografia sono descritte reazioni cliniche al lisozima contenuto nell'uovo, ma pochi sono stati i casi di reazioni allergiche conseguenti all'assunzione di formaggi contenenti lisozima in soggetti allergici alle uova (Request EFSA-Q-2004-130 del 22 febbraio 2005).

Alle proteine dell'uovo sono notoriamente attribuite proprietà allergeniche in soggetti sensibili e l'allergia alle uova è annoverata tra le più frequenti nella popolazione; sono state descritte reazioni cliniche al lisozima contenuto nell'uovo, mentre non risultano segnalazioni di allergie legate alla presenza di lisozima nel Grana Padano DOP.

L'EFSA evidenzia però, la necessità di acquisire informazioni più accurate in merito ai livelli di presenza del lisozima negli alimenti e, soprattutto, alle risposte indesiderate in gruppi di popolazioni vulnerabili attraverso l'effettuazione di studi mirati e riporta i risultati di una ricerca (Iaconelli A. et al., 2008), pubblicata sul Journal of American College of Nutrition (2008), che evidenzia: *"la quota di lisozima assorbita con il formaggio è globalmente molto bassa, sebbene sia stata significativamente più bassa nei controlli che nei pazienti allergici, nel 15% dei quali è indotto un aumento delle IgE RAST, senza reazioni cliniche"*.

Si tratta di un contributo che va approfondito, ampliando la casistica e estendendola anche ai soggetti in età pediatrica.

Infatti, nei bambini allergici, la allergia a maggior incidenza è quella alle uova che si presenta nel 31% dei casi nei bambini con allergie alimentari rispetto all'8% degli adulti, sempre con allergie alimentari.

Risultati recenti (Marseglia et al. 2013), indicano che l'assunzione di formaggio contenente lisozima, a 12 mesi di stagionatura, ha creato in 5 bambini lisozima sensibili su 21 bambini, reazioni avverse immediate e tardive come prurito, dolore addominale, vomito, nausea, dermatite, rinite, asma bronchiale, orticaria. I sintomi sono

comparsi quando il livello di IgE ha superato il valore di 7 kU/L . Con stagionatura a 24 mesi, probabilmente grazie alla maggiore proteolisi, solo 1 bambino su 21 ha mostrato una reazione avversa.

Il presente progetto, che intravede la possibilità pratica di eliminare il lisozima nella caseificazione del latte a Grana Padano DOP, apre verso:

- a) una garanzia sanitaria “assoluta” nei confronti di tutti i consumatori, anche quelli in età pediatrica sensibili alle allergie alimentari verso le proteine dell'uovo;
- b) un valore aggiunto all'immagine del prodotto;
- c) un ritorno al Grana Padano delle origini (fig. 10), senza alcuna sostanza aggiunta, mantenendo comunque una possibilità di differenziazione in termini di “biomarchiatura isotopica” tra il prodotto ottenuto con razioni a base di silomais e di porzioni di pianta del mais (granella, pastone di granella o di pannocchia), tipica pianta C₄ e il prodotto ottenuto con razioni a più elevate percentuali di piante C₃, come quelle somministrate fino alla fine degli anni '60 o quelle attualmente somministrate nella produzione del Grana Padano trentino e del Parmigiano Reggiano.



Figura 10. Estensione del Ducato di Milano al tempo di G. Galeazzo Visconti (1397).

Figura 11. Ducato di Milano alla fine del XVIII secolo

Le due figure 10 e 11 rappresentano i territori del Ducato di Milano tra la fine del 1300 al tempo di Galeazzo Visconti (fig. 10), e la fine del periodo Asburgico con la cessione del Ducato di Milano e gran parte della repubblica di Venezia a Napoleone Buonaparte. In questi 4 secoli il Ducato è passato agli Sforza e ai francesi (1450-1535); agli spagnoli (1535-1706) e agli austriaci (1706-1797).

Le due figure oltre ad indicare una evoluzione geopolitica di queste aree, indicano pure una evoluzione storica dei 2 formaggi grana più famosi al mondo, evoluzione che è iniziata per convenzione, per entrambi, nel 1135, anno di fondazione dell'abbazia di Chiaravalle con protagonisti i monaci Cistercensi.

CAPITOLO 2 – OBIETTIVI E PIANO DEL LAVORO

Le fasi e le azioni di ricerca del progetto GP Lfree sono le seguenti:

1 Fase agronomica di filiera: individuazione dei foraggi da insilare, valutazione chimico-fisica ante-insilamento, insilamento in trincee adeguate al ritmo di desilamento, chiusura ermetica e appesantimento delle masse insilate (Gruppo di lavoro: ERSAF).

- I. Programmazione dei lavori di sfalcio-preappassimento-raccolta dei foraggi da insilare;
- II. Campionamenti dopo trinciatura del foraggio con relative determinazioni analitiche e dopo eventuale appassimento, prima all'insilamento;
- III. Apertura della trincea dopo almeno 3-4 mesi di conservazione; somministrazione dell'insilato posizionato nella parte iniziale della trincea ai bovini all'ingrasso e/o al bestiame di allevamento;
- IV. Campionamenti e analisi chimico-fisiche e microbiologiche della massa insilata nell'area rappresentativa del prodotto sperimentale impiegato in prova;

2 Fase zootecnica di filiera: somministrazione delle razioni unifeed con insilati, valutazione dell'igiene di stalla, degli animali e di mungitura; campionamenti di feci per la determinazione dell'inquinamento fecale (Gruppo di lavoro: ERSAF, UNICATT-CRB, UNICATT-ISAN).

- I. Campionamento di insilato e di razioni unifeed e determinazioni chimico-microbiologiche;
- II. Valutazione, tramite punteggio a vista su scheda, del grado di pulizia: a) di animali; b) di cuccette; c) di mammella-capezzolo; d) di stalla-corsia di alimentazione;
- III. Campionamento fecale su bovine ad alta-media e bassa produzione di latte per la determinazione del numero di spore e di eterolattici; i campioni saranno preparati prelevando dal retto di n. 3 + 3 bovine ad alta e a bassa produzione di latte;
- IV. Campionamento del latte alla stalla per le determinazioni chimico-fisiche e microbiologiche di routine; le particolari condizioni operative sperimentali richiederanno una conta delle spore/litro a livelli molto bassi fino a valori ≤ 18 .

3 Fase di studio della moltiplicazione dei clostridi: effetto del livello e tipologia di amido e della quota di acido lattico apportato dalla dieta sulla moltiplicazione nel digerente (rumine/intestino) di spore di Clostridium (Gruppo di lavoro: UNICATT-ISAN e UNICATT-CRB).

Il sottoprogetto 1 prevede i seguenti step:

- I. Preparazione animali fistolati per prelievo liquido ruminale da utilizzare negli step successivi;
- II. Prelievi e preparazione; fase ruminale; fase abomasale/intestinale;
- III. Studio in vitro delle fermentazioni ruminali sulle cinetiche di crescita e sopravvivenza di *C. tyrobutyricum*;
- IV. Invio dei campioni prelevati all'Istituto di Microbiologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore per la verifica del contenuto in spore.

4 Fase casearia di filiera: valutazioni delle operazioni di: sosta per l'affioramento e relative operazioni di attivazione, campionamenti di latte, crema, siero innesto, siero cotto e valutazioni microbiologiche analitiche innovative, osservazione dei difetti fermentativi e analisi gas cromatografiche del formaggio (Gruppo di lavoro: ERSAF, SPALLANZANI, UNICATT-CRB, UNIPR, UNIMI-DISTAM).

- I. Azione sperimentale di attivazione enzimatica delle agglutinine per migliorare l'affioramento del grasso; campionamenti di crema e latte di caldaia per stabilire il grado di desporificazione del latte in relazione al rapporto grasso/caseina in caldaia e campionamenti anche di siero e cagliata per gli studi relativi ai sottoprogetti;
- II. Caseificazione e utilizzo di siero-innesto "potenziato" nell'attività fermentativa, per ottenere una rapida acidificazione della cagliata già nelle prime 8 ore;
- III. Rx-scopia di ogni forma a 4/5 – 9 e 16 mesi dalla caseificazione con attribuzione di un punteggio che esprima l'entità del difetto fermentativo e la qualità generale della forma di Grano Padano per tener conto anche di altri difetti non strettamente fermentativi (danni alla crosta, smorbi, correzioni); l'attribuzione del punteggio segue una metodologia ERSAF già adottata in precedenti sperimentazioni;
- IV. Analisi gas-cromatografica su un numero rappresentativo di forme Grano Padano, se oltre al difetto butir-

rico atteso, emergono altri tipi di difetti fermentativi gasogeni, ad esempio quello eterolattico, il numero di forme indagate sarà superiore.

5 Fase genomica Clostridi: per poter identificare le specie direttamente implicate nelle fermentazioni anomale è fondamentale conoscere se il difetto è causato da un'unica specie o da diversi clostridi presenti (Gruppo di lavoro: ERSAF, SPALLANZANI, UNICATT-CRB).

Il sottoprogetto 2 Scheda A prevede la quantificazione mediante PCR in tempo reale di cellule e spore di *C. tyrobutyricum* presenti nell'intera filiera di produzione del formaggio Grana Padano sia sul fronte agro-zoo-tecnico che su quello caseario e sullo studio in vitro delle fermentazioni ruminali sulle cinetiche di crescita e sopravvivenza di *C. tyrobutyricum* secondo i seguenti step:

- I. Campionamento;
- II. Estrazione DNA batterico totale dai campioni di alimenti, contenuto ruminale, feci, latte, cagliata e formaggio;
- III. PCR Real time con cinetica TaqMan;
- IV. Studio in vitro delle fermentazioni ruminali sulle cinetiche di crescita e sopravvivenza di *C. tyrobutyricum*.

Mentre le attività del sottoprogetto 2 Scheda B sono le seguenti:

- I. Pianificazione del campionamento di latte e formaggio;
- II. Applicazione di un protocollo analitico per l'estrazione del DNA microbico;
- III. Applicazione di un protocollo di ITS-PCR;
- IV. Sviluppo ed applicazione della tecnica ARISA.

6 Fase genomica Lattici: valutazione della microflora lattica nelle differenti matrici e quantificazione dell'autolisi dei batteri lattici in caseificazione e maturazione del formaggio prodotto con e senza lisozima. (Gruppo di lavoro: UNIPR).

In riferimento al Sottoprogetto 3 le attività nell'ambito della valutazione della microflora lattica presente durante differenti momenti di produzione sono state le seguenti:

- I. Conte microbiche e isolamenti;
- II. Estrazione DNA e amplificazione mediante LH-PCR;
- III. LH-PCR cellule lisate;
- IV. Determinazione attività endopeptidasica.

7 Fase chimico-fisica e sensoriale: studi sulle forme azotate, anche di proteolisi; test triangolare sul formaggio a 9 mesi e analisi sensoriale sullo stagionato a 16 mesi (Gruppo di lavoro: UNIMI-DeFENS; ERSAF)

Il sottoprogetto 4 prevede i seguenti step:

- I. Valutazione delle forme azotate (caseine, sieroproteine, peptidi specifici, amminoacidi liberi) presenti nel latte in caldaia, nel siero di fine lavorazione e nel corrispondente sieroinnesto derivanti dalla produzione di Grana Padano in 6 caseificazioni condotte con lisozima e 6 caseificazioni condotte senza lisozima sulla base dei 3 moduli progettuali indicati da ERSAF (silomais standard, silomais "innovativo", fieno-silo loiessa);
- II. Studio della proteolisi (cagliata a 48 ore, formaggio fuori sale, formaggio a 4-5 mesi, formaggio a 9 mesi), nel corso della maturazione nei differenti campioni di Grana Padano effettuate con o senza lisozima;
- III. Valutazione dei dati ed elaborazione statistica;
- IV. Verifica della rispondenza dei formaggi sperimentali ottenuti allo standard qualitativo del Grana Padano DOP.

Relativamente alla fase sensoriale, svolta da ERSAF, è stata prevista una doppia indagine:

- a. una "precoce" a 9 mesi con test triangolare per offrire nei tempi minimi una prima indicazione sulla variabilità sensoriale del formaggio prodotto senza lisozima (colore, sapore, aroma ...);
- b. una a maturazione di 16 mesi con la metodologia di routine del laboratorio e con una numerosità del campione che potrà subire variazioni in diminuzione o in aumento in relazione a quanto acquisito con il test triangolare a 9 mesi.

2.1 ERSAF

Nel periodo sperimentale sono stati prodotti 3 insilati: a) silomais standard; b) loiessa fieno-silo; c) silomais innovativo ad elevato tenore di sostanza secca; rispettivamente denominati anche: (a) 1° modulo; (b) 2° modulo; (c) 3° modulo.

Dopo un insilamento ben assistito, una chiusura ermetica della trincea con impiego di materiale plastico anche sulle pareti ed un appesantimento con circa 150-200 kg/m² di ghiaia Ø80 mm, è stato attuato un desilamento che prevedeva l'asportazione di circa 40-50 cm di insilato posizionato in alto nella massa e corrispondente a quello che un tempo veniva chiamato "cappello" perché caratterizzato da insilato marcescente e ammuffito.

Ancora oggi dopo i miglioramenti acquisiti in fase di insilamento, questo insilato è caratterizzato da una microflora di tipo anticaseario, ma assolutamente compatibile, dal punto di vista sanitario, con la dieta degli animali d'allevamento.

In tre periodi diversi: estate 2012; autunno 2012 e inverno 2013, dopo un adattamento del bestiame da latte di 2-3 settimane per ciascun insilato, il latte della munta della sera conservato in tank a 10 °C, mescolato con quello del mattino e portato tutto a 10 °C, è stato trasportato, prima della munta del pomeriggio seguente, in caseificio e posto nell'affioratore. Il mattino successivo, il latte scremato è stato lavorato a Grana Padano con e senza additivo (lisozima), alternando, settimanalmente, un rapporto grasso/caseina in caldaia "alto" e basso". Complessivamente il piano di lavoro ha prodotto 278 forme di Grana Padano suddivise nei 3 moduli ed in 4 tesi per ciascun modulo: L0-G/C basso; L1-G/C basso; L0-G/C alto; L1-G/C alto (L0= senza lisozima; L1= con lisozima; G/C basso = basso rapporto grasso-caseina in caldaia; G/C alto = alto rapporto grasso-caseina in caldaia).

Nel dettaglio la produzione è stata la seguente:

- a) 78 forme nel 1° modulo in 6 settimane di sperimentazione con caseificazione di 1.000 litri di latte/d e forme di grana codificate con le sigle da PA41 a PA118;
- b) 100 forme nel 2° modulo, in 4 settimane di lavorazione con caseificazioni di 2.000 litri di latte/d e forme di grana codificate con le sigle da PA155 a PA 255;
- c) 100 forme nel 3° modulo, in 4 settimane di lavorazione con caseificazioni di 2.000 litri di latte/d e forme di grana codificate con le sigle da PB23 a PB122.

Nel corso della stagionatura le forme di ognuno dei 3 moduli sono state valutate più volte con la tecnica RX. A 9 mesi di maturazione le forme di Grana Padano sono state tagliate per il test triangolare di analisi sensoriale, per l'analisi genomica dei clostridi, dei batteri lattici e per valutare l'andamento maturativo della cagliata.

A 16 mesi di stagionatura il Grana Padano è stato campionato per la determinazione del profilo sensoriale. Altri campioni di formaggio sono stati forniti ai partner per ricercare eventuali conferme di andamenti riscontrati nei primi 9 mesi di stagionatura.

2.2 UNICATT - ISAN

All'interno del progetto l'unità operativa UNICATT-ISAN ha verificato *in vitro* l'effetto del livello e tipologia di amido e della quota di acido lattico apportato dalla dieta sui parametri fermentativi e sulla moltiplicazione nel digerente (rumine/intestino) di spore di *Clostridium tyrobutyricum*.

Il progetto prevedeva 3 periodi sperimentali caratterizzati per la presenza di diverse forme di insilato in razioni per vacche da latte: insilato di mais tradizionale (Periodo 1, silomais tradizionale), insilato di loietto (Periodo 2, insilato di loietto) e insilato di mais ottenuto con mais raccolto in fase avanzata di maturazione e quindi ad un più alto contenuto di sostanza secca (Periodo 3, silomais innovativo). Nell'ambito del progetto, UNICATT-ISAN ha quindi ricevuto campioni di Unifeed e materie prime utilizzate nella preparazione delle razioni somministrate agli animali nei 3 periodi sperimentali. I campioni ricevuti sono stati caratterizzati per il contenuto di umidità, proteine gregge (PG), proteine solubili (sol.PG), amido, fibra neutro detersa (NDF), fibra acido detersa (ADF), lignina (ADL) e ceneri. Sono inoltre stati determinati i contenuti di acidi grassi volatili (AGV) per via gascromatografica, acido lattico ed etanolo sui campioni di insilato.

- Trial 1: verifica *in vitro* dell'eventuale moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum*, inoculato in quantità nota, come conseguenza di fattori predisponenti la loro moltiplicazione e presenti nel liquido

- ruminale prelevato da animali muniti di fistola.
- Trial 2: effetto di diversi livelli di amido e acido lattico sulla moltiplicazione *in vitro* di *Clostridium tyrobutyricum* eventualmente presente in liquido ruminale.
 - Trial 3: modellizzazione *in vitro* degli effetti di 3 livelli di amido e acido lattico sulle dinamiche fermentative ruminali e sulla Total Tract al fine di misurare un possibile effetto di queste sulla moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum*.
 - Trial 4: monitorare la presenza di *Clostridium tyrobutyricum* in campioni di liquido ruminale prelevati in momenti diversi in un ampio arco temporale.
 - Trial 5: modellizzazione *in vitro* degli effetti di 3 livelli di acido lattico sulle dinamiche fermentative ruminali e sulla Total Tract in diete con base foraggera del periodo sperimentale (1, 2, 3) e con diverse fonti di amido al fine di misurare un possibile effetto di queste sulla moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum*.
 - Trial 6: effetto di diversi livelli di acido lattico sulla cinetica di moltiplicazione *in vitro* (Total Tract) di *Clostridium tyrobutyricum* a dose iniziale nota in liquido ruminale di vacca in asciutta o in lattazione in diete con base foraggera del periodo sperimentale (1, 2, 3) e con mais come fonte di amido.

2.3 UNICATT – CRB

L'obiettivo dell'attività sperimentale è stato duplice:

- a) quantificazione mediante PCR in tempo reale di cellule e spore di *C. tyrobutyricum* presenti nell'intera filiera agro-zootecnica di produzione del formaggio Grana Padano (foraggi, insilati, diete somministrate alle vacche da latte nei 3 moduli sperimentali), e in ambito caseario (latte, cagliata, formaggio);
- b) studio *in vitro* delle fermentazioni ruminali sulle cinetiche di crescita sopravvivenza di *C. tyrobutyricum* (ricerca condotta collaborazione con UNICATT-ISAN).

Sono state applicate tecniche molecolari coltivazione-indipendente basate sullo studio del DNA.

Da matrici del tipo: silomais, loiessa fieno silo, feci, latte, latte di caldaia scremato per affioramento, cagliata formaggio è stata effettuata un'estrazione di DNA batterico totale sul quale si è proceduto con una amplificazione mediante tecnica di PCR Real-time quantitativa con cinetica Taqman. Questa metodica prevede il disegno di primers specifici per l'identificazione di *C. tyrobutyricum* e di una sonda marcata fluorofori interna al frammento amplificato che ne ha permesso la successiva quantizzazione per mezzo di una curva standard di riferimento costruita in base dieci di una sospensione di cellule e spore precedentemente contate su piastra. Al momento non esistono protocolli sperimentali per la quantizzazione mediante PCR Real time dei clostridi butirrici.

Lo studio *in vitro* delle fermentazioni ruminali è stato effettuato inoculando spore di *C. tyrobutyricum* in modelli di ruminale e intestino così come descritto da UNICATT-ISAN. L'analisi delle cinetiche di crescita e di sopravvivenza delle spore e cellule vegetative è avvenuta mediante determinazione quantitativa con tecniche di PCR Real time.

2.4 ISILS

La ricerca si è proposta di dare una risposta alle seguenti domande:

- a) quali sono le specie di clostridi che, ad un certo momento del processo di maturazione del Grana Padano, passano dalla forma quiescente di spora a quella vegetativa inducendo la formazione di difetti nel Grana Padano?
- b) il difetto è causato da un'unica specie o da specie diverse in forma associativa?
- c) esiste un difetto dell'area geografica di produzione del latte sulla distribuzione dei *Clostridium* spp. Implicati nella formazione di difetti?

La risposta a queste domande è stata ricercata mediante l'impiego di strumenti innovativi ed approcci analitici high-throughput, con applicazione di metodi coltura-indipendenti (ITS-PCR, ARISA) per l'identificazione e la caratterizzazione delle cellule di *Clostridium* spp. effettivamente implicate nella formazione dei difetti nel formaggio Grana Padano.

La linea di ricerca di ISILS, i campioni e la tempistica dei prelievi è stata strettamente interconnessa con le fasi

del piano sperimentale di Unicatt-Crb ed Ersaf.

2.5 UNIPR – Dipartimento di Genetica, Biologia dei microrganismi, Antropologia, Evoluzione

Gli obiettivi del sottoprogetto sono stati i seguenti:

- a) valutare la microflora lattica presente nelle caseificazioni con e senza lisozima, effettuate da Ersaf, con latte proveniente dai 3 moduli sperimentali (silomais standard, fieno silo di loiessa e silomais innovativo ad elevato tenore di sostanza secca);
- b) studiare qualitativamente e semi-quantitativamente la microflora lattica dominante nei differenti campioni di latte e di cagliate con e senza lisozima;
- c) quantificare l'autolisi dei batteri lattici durante il processo di caseificazione e stagionatura del Grana Padano prodotto con o senza lisozima.

La prima parte dello studio ha previsto conte microbiologiche in piastra rivolte ad individuare la microflora lattica termofila e mesofila presente nei diversi campioni lattiero caseari.

Le conte microbiologiche in piastra hanno impiegato terreni commerciali (MRS) e terreni di nuova formulazione a base di latte, siero, formaggio. I terreni semisintetici possono sottostimare la popolazione microbica presente in un alimento e non evidenziare frazioni di popolazione minoritarie che svolgono tuttavia un ruolo tecnologico all'interno del prodotto.

La seconda parte dello studio ha visto l'applicazione di una tecnica molecolare, coltivazione-indipendente, basata sullo studio del DNA: Length heterogeneity PCR (LH-PCR). La metodica sfrutta il polimorfismo del gene (16S rRNA) e consente di rilevare ed identificare, a livello di genere e specie i diversi microrganismi. Uno dei principali vantaggi di questo metodo è quello di individuare le popolazioni vitali, ma non coltivabili presenti nelle matrici.

L'ultima parte del progetto vuole quantificare l'autolisi attraverso il DNA rilasciato dalle cellule lisate nei diversi campioni. Il recupero del DNA delle cellule lisate, per separazione dalle cellule intere, è stato effettuato per filtrazione alla quale è seguito l'estrazione del DNA. Sugli stessi campioni è stato valutato un altro marker di autolisi ovvero il contenuto in endopeptidasi citoplasmatiche rilasciate dopo lisi cellulare.

2.6 UNIMI-DeFENS

L'attività svolta ha perseguito 3 obiettivi principali:

- a) valutare l'effetto dell'utilizzo o meno del lisozima sulla disponibilità di forme azotate semplici (piccoli peptidi, aminoacidi) nel latte di caldaia, nel siero dolce e nel siero innesto, e sull'efficienza di utilizzo di dette forme azotate da parte della microflora presente;
- b) valutare l'effetto dell'utilizzo o meno del lisozima in caseificazione sull'andamento della proteolisi durante la maturazione del formaggio, come conseguenza di possibili fenomeni di selezione o lisi della microflora determinati dalla presenza del lisozima. Sono stati prelevati per questa valutazione i seguenti campioni: cagliata a 48 ore, formaggio fuori sale e formaggio a 9 mesi;
- c) verificare la rispondenza del formaggio stagionato, anche quando ottenuto senza lisozima, allo standard del Grana Padano DOP.

Sono state previste nel corso dell'attività di progetto comprendente i 3 moduli, complessivamente 12 caseificazioni di Grana Padano, 6 con lisozima e 6 senza lisozima.

Tutti i campioni sono stati sottoposti alla determinazione delle varie frazioni proteiche, peptidiche e aminoacidiche (mediante HPLC, UPLC, elettroforesi capillare, amino analyzer). E' stata posta attenzione anche alla formazione di frazioni azotate specifiche in relazione alla presenza o meno di lisozima e, eventualmente, del diverso tipo di alimentazione.

CAPITOLO 3 - IL RISULTATO

3.1 Agronomico

3.1.1 Modulo 1° – Il Silomais Standard (S-STD) –

All'inizio della 2° decade di maggio 2012 è iniziato l'adattamento degli animali al silomais standard.

Le vacche da latte in realtà, stavano già consumando il silomais standard, perché la vecchia trincea, larga 11,5 m, era stata aperta alcuni mesi prima e consumata per circa metà della sua capienza.

Purtroppo i ritardi accumulati nella costruzione delle 2 nuove trincee, larghe 8,5 m ciascuna, hanno imposto una variazione di programma ossia, l'apertura nella stessa vecchia trincea di un secondo fronte di taglio, posteriore alla trincea stessa e ciò per lasciare spazio, all'interno della stessa, all'incombente raccolta della loiessa appassita che sarebbe stata ammassata dopo pochi giorni ed il cui insilato sarebbe stato utilizzato nell'autunno successivo nella prova del 2° modulo sperimentale a base di loiessa fieno silo.

L'andamento termo-pluviometrico nel corso della prova è riportato nella figura 12.

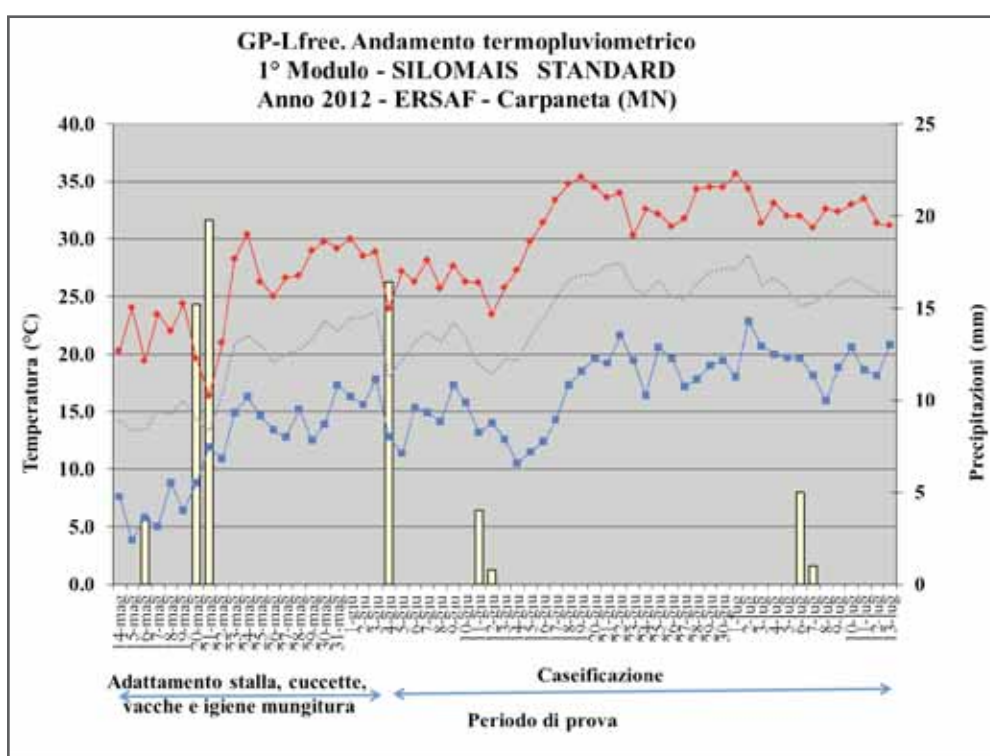


Figura 12. S-STD, andamento termo-pluviometrico nel periodo di adattamento e di prova

L'apertura di questo nuovo fronte di taglio in prossimità dell'inizio dell'adattamento degli animali da latte ha leggermente condizionato microbiologicamente la successiva parte iniziale della prova.

La figura 13, evidenzia queste operazioni iniziali di pulizia del fronte deteriorato, operazioni che per quanto ben fatte lasciano sempre residui di insilato instabile, microbiologicamente definibile: "anticaseario", che ingerito dalle bovine ne inquina i ruminanti e l'intero apparato digerente. La vecchia trincea, oltre ad essere estremamente larga per il numero delle vacche in lattazione (circa 55), provenienti prevalentemente dalla stalla a stabulazione fissa dell'ex Az. Le Cerchie, manifestava anche evidenti fessurazioni (fig. 14), tra gli elementi prefabbricati in calcestruzzo. Alle infiltrazioni d'aria, tra le fessurazioni, si è sopperito, come per altro si fa anche nelle nuove trincee per proteggerle dall'azione corrosiva degli acidi organici, stendendo un telo di plastica anche sui fianchi della trincea, telo che però non è giunto sino a terra per ripiegarsi sul pavimento orizzontale per altri 50-70 cm, ma si è fermato a circa 60 cm da terra.

Il desilamento, come da progetto, è stato fatto asportando l'appesantimento di ghiaia (150-200 kg/m³) ogni 4-6 giorni.



Figura 13. S-STD, pulizia del fronte di taglio all'apertura del silo

Figura 14. S-STD, protezione con telo sulla parete fessurata del silo

Figura 15. S-STD, asportazione dell'appesantimento ogni 3 giorni circa

La desilatrice è avanzata nella trincea circa 50 cm/d per una larghezza di 170-180 cm/d in modo tale da lasciare 40-50 cm di silomais sui due fianchi.

Il silomais depositato sui fianchi, soprattutto quello posizionato sui fianchi in alto ed il silomais corrispondente a quello che un tempo veniva chiamato “cappello”, ossia il silomais posizionato in alto sugli ultimi 40 cm circa (fig. 18) della massa, sono stati somministrati al bestiame d'allevamento.

La massa insilata sottostante per circa 200 cm di altezza e 10,5 m di larghezza è stata invece somministrata al bestiame da latte (fig. 16-17)



Figura 16. S-STD, porzione di silomais, al netto del “cappello”, somministrata alle vacche da latte

Figura 17. S-STD, cappello e fianchi, sebbene di qualità, sono stati somministrati, per precauzione, alla rimonta

Figura 18. S-STD, sui fianchi alti per circa 50 x 50 cm il silomais ammuffito, se presente, è stato scartato

In qualche area del fianco alto della trincea, dove il silomais non era stato ben compresso e soprattutto dove l'appesantimento con ghiaia risultava inferiore allo standard, si sono sviluppate delle muffe e ciò in conseguenza della infiltrazione di aria dal fronte di taglio tra il fianco della parete e la massa insilata.

Questo “carburante” ha favorito prima lo sviluppo dei lieviti aerobi che hanno consumato l'acido lattico e l'azoto solubile come base energetica e fonte plastica per il loro sviluppo, provocando innalzamento del pH e favorendo lo sviluppo dei batteri prima e delle muffe dopo.

In realtà questi processi non si susseguono con questa tempistica, ma si alternano continuamente e interagiscono tra loro. In questi sviluppi microbici aerobi/anaerobi non sono estranei i clostridi, soprattutto quando, dopo un forte sviluppo batterico aerobico con conseguente riscaldamento della massa, nel substrato viene a mancare l'ossigeno e quindi si creano quelle condizioni di temperatura, umidità, elevato pH e assenza di ossigeno che sono ideali per la germinazione delle spore e la moltiplicazione dei clostridi.

Nel corso del desilamento è stato osservato, soprattutto dopo una precipitazione, che aveva bagnato il fronte di taglio, un processo di ammuffimento di alcune piccole masse di silomais posizionato in alto, contro la parete del silos, questa degradazione aerobica in estate è favorita dalle elevate temperature, dalla bassa densità della

massa e, in questa prova, dal non elevato ritmo di rinnovo del fronte di taglio (6 giorni).

La figura 19, che riporta i rilievi di temperatura del silomais, evidenzia dal centro della trincea verso i fianchi, soprattutto sulle 2 linee di rilievi fatti nella posizione alta della massa insilata e corrispondenti ai primi 20 e 40 cm circa di insilato, un andamento crescente della temperatura che indica un aumento della variabilità di moltiplicazione microbiologica passando dal centro verso il fianco della trincea.

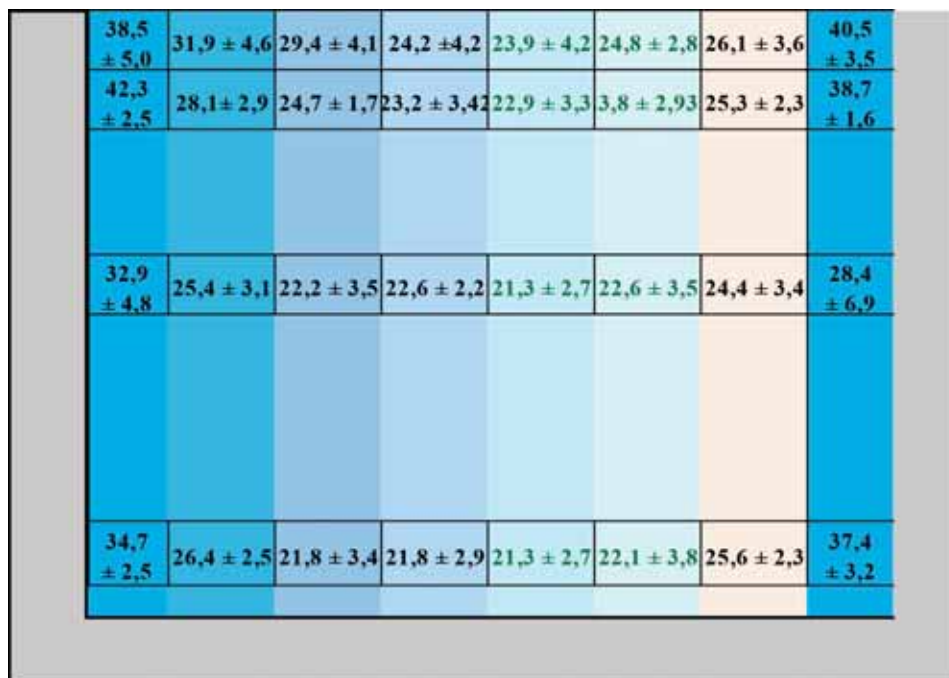


Figura 19. S-STD rilievi di temperatura del fronte di taglio su 32 posizioni, a 5cm circa di profondità

I rilievi di temperatura effettuati invece al centro della trincea, pur mostrando lo stesso andamento, hanno incrementi inferiori passando dal centro ai fianchi della massa; ovviamente questi incrementi di temperatura nella linea centrale della massa, sono da intendere come un ordinario aumento di temperatura conseguente all'aumento delle temperature esterne ambientali; al contrario, i dati rilevati in alto a 20 e 40 cm mostrano un aumento di temperatura, dal centro verso i fianchi, più accentuato a causa del deterioramento aerobico che si è aggiunto all'andamento termico riscontrato al centro della massa.

Da notare che il silomais posizionato negli angoli bassi della trincea, dove mancava il rivestimento plastico sui fianchi della trincea, ha mostrato temperature molto simili a quelli del cappello (37,4 – 34,7 °C) e ciò nonostante l'elevata densità della massa. Anche in questi punti basali il deterioramento ha seguito un andamento simile a quello che si verifica nelle masse in alto, con l'aggravante che questo silomais spesso è inumidito e desacidificato non solo dai lieviti, ma anche dalle precipitazioni autunno-invernali che scorrono tra il materiale plastico e la parete in calcestruzzo. Queste azioni favoriscono la fermentazione secondaria da parte dei clostridi con produzione di acido butirrico.

Temperatura del silomais all'interno della massa: rilievi effettuati su fronte rinnovato da 24 h per una profondità di 48 cm.				
Zona trincea	Profondità nella massa (cm)			
	5	25	50	70
Centro- sinistra	22,6	21,8	21,5	21,3
Centro- destra	22,3	21,7	21,1	20,9
Media	22,5	21,8	21,3	21,1

Tabella 5. S-STD, temperatura dell'insilato a varie profondità all'interno della massa

I rilievi di temperatura a varie profondità al centro della massa (tab. 5), mostrano invece stabilità perché la temperatura tende a decrescere passando dalla superficie del fronte di taglio rinnovato alla profondità di 70 cm. Il silomais somministrato alle vacche e campionato in fase di desilamento all'uscita dal nastro di carico del carro unifeed, era di buona qualità chimico-fisica con il 36,1% ss, pH 3,8, N-NH₃ (% NT) e assenza di acido butirrico (tab. 6).

Principali caratteristiche chimico-fisiche degli alimenti e del mix aziendale				
Determinazioni	Silomais	Medica fieno	Loiessa fieno	Mix aziendale
Sostanza secca (%)	36,1 ± 0,3	88,2 ± 1,7	88,7 ± 0,3	89,1 ± 0,3
Proteine gr. (% ss)	7,1 ± 0,7	18,4 ± 0,6	9,8 ± 1,8	19,7 ± 1,2
NDF (")	44,9 ± 0,9	48,4 ± 2,2	55,8 ± 0,8	17,9 ± 1,0
ADF (")	26,5 ± 2,0	---	---	---
ADL (")	3,3 ± 0,9	---	---	---
N-sol (% NT)	60,5 ± 2,8	29,3 ± 2,1	34,8 ± 0,6	---
Amido (% ss)	27,8 ± 1,6	---	---	38,9 ± 0,9
Ceneri (")	3,7 ± 0,1	9,3 ± 0,7	9,2 ± 0,5	6,5 ± 0,6
N-NH ₃ (% NT)	8,9 ± 0,1	---	---	---
pH	3,8 ± 0,0	---	---	---
Ac. lattico (g/kg ss)	54 ± 1	---	---	---
Ac. acetico (")	26 ± 5	---	---	---
Ac. butirrico (")	0 ± 0	---	---	---

Tabella 6. S-STD, caratteristiche chimico-fisiche degli alimenti impiegati

3.1.2 Modulo 2° – Loiessa Fieno-Silo (L-FS)

Nella 2° decade di ottobre 2012 è stata aperta la vecchia trincea di “*loiessa fieno-silo*” larga 11,5 m.

Il fieno silo è apparso in buona conservazione, profumato e con il classico colore marrone chiaro-arancione. L'insilato collocato sui fianchi della trincea, nonostante le attenzioni in fase di insilamento e chiusura della massa, è apparso marcescente; la parte sinistra più marcescente di quella destra e ciò a conferma del fatto che il management non è stato uguale in queste due zone. Complessivamente sono stati scartati circa 200-300 kg di prodotto visivamente alterato nel colore e nell'odore.

Per precauzione e per non inquinare i ruminanti delle vacche con insilato di qualità microbiologica dubbia, soprattutto con riferimento all'insilato posizionato attorno ai due fianchi della massa, sono stati asportati con il carro unifeed, circa 5 - 6 t di fieno silo tal quale, a vista, in buono stato di conservazione.

L'insilato è stato posto in ranghina "arieggiata" per evitare il degradamento aerobico e consumato dal bestiame d'allevamento nell'arco di 10 giorni circa, ovviamente in razioni bilanciate con abbondanza di loiessa fieno silo, per altro molto ben ingerita.



Figura 20. L-FS, come si presentava la massa insilata all'apertura della trincea

Figura 21. L-FS, trincea in fase di pieno consumo

Figura 22. L-FS, protezione del fronte di taglio dalle precipitazioni

L'adattamento delle vacche da latte è durato due settimane perché si usciva da un periodo nel quale la dieta non conteneva insilati.

Il gruppo in lattazione, dalle precedenti 55 vacche è salito a circa 80, grazie agli acquisti di nuovo bestiame da latte.

L'avanzamento del fronte di taglio è passato dagli iniziali 25-30 cm/d con massa alta solo 100 cm circa, ai 12-15 cm/d quando la massa si è innalzata a 180-200 cm/d.

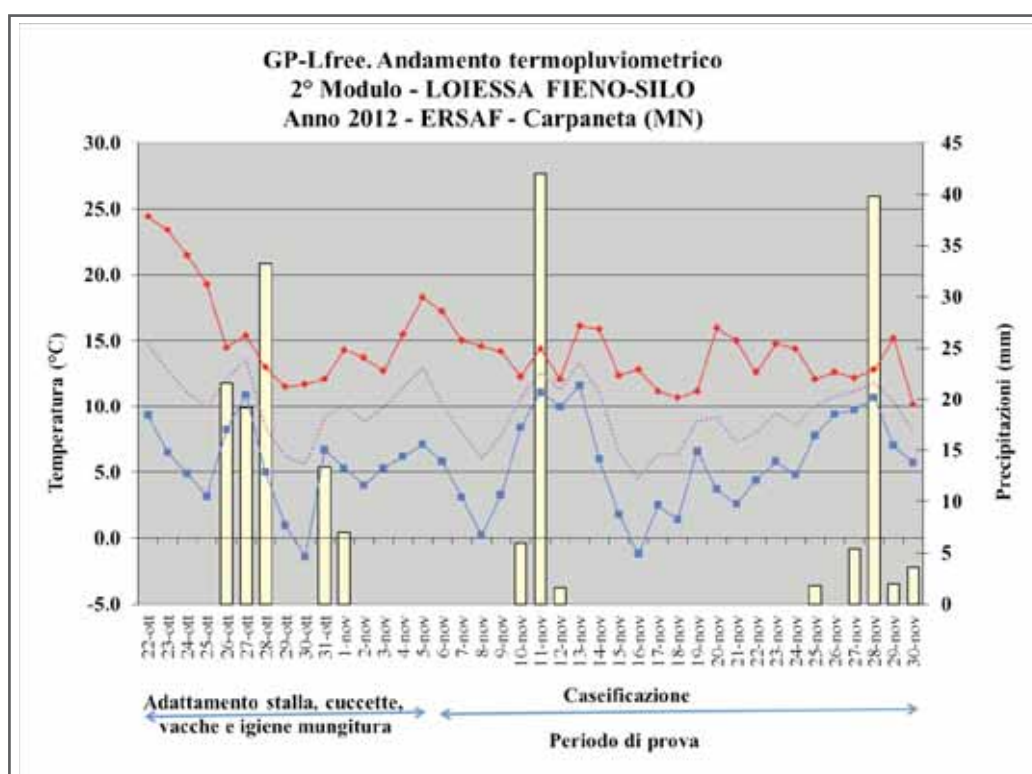


Figura 23. L-FS, andamento termopluviometrico nel periodo di adattamento e prova

Essendo la loiessa fieno silo un foraggio dotato di fibra, per non scendere eccessivamente con la produzione di latte è stata fissata una dose giornaliera t.q., nella dieta, di 14 kg/capo che comportava un desilamento di circa 1,1 t di fieno silo di loiessa al giorno al quale si è aggiunto il desilamento per il bestiame d'allevamento che non ha superato le 0,25 – 0,30 t/d.



Figura 24. L-FS, desilamento con carro aunifeed semovente da trincea larga 11,5 m

Figura 25. L-FS, rilievi della temperatura della massa a varie profondità e posizioni

Figura 26. L-FS, asportazione manuale di parte del cappello per una profondità di soli 20 cm circa

L'arrivo del carro unifeed semovente (fig. 24), in quanto la vecchia desilatrice semovente non sarebbe riuscita a prelevare il fieno silo dalla trincea, ha reso un po' più problematica la metodologia sperimentale di desilamento che prevedeva l'asportazione di circa 40 cm di insilato posizionato in alto per il bestiame d'allevamento e la quota sottostante per le vacche da latte e ciò perché la fresa, avvolta dalle protezioni, non era in grado di lavorare su profondità maggiori dei 20 cm circa.

Non si può escludere, tuttavia, una certa difficoltà operativa dell'addetto con il carro unifeed semovente, unita ad un suo più spiccato desiderio di svolgere manualmente questa asportazione corrispondente a quello che un tempo era considerato il "cappello".

L'operazione manuale (fig. 22), non è stata però eseguita con la stessa scrupolosità e correttezza rispetto a quanto fatto nel silomais standard del 1° modulo che unitamente agli insilati pastoni di spiga e granella rappresentano le masse di più facile insilamento-desilamento.

14,9 ± 6,1	17,6 ± 5,4	16,7 ± 2,5	18,8 ± 2,5	16,3 ± 2,8	15,3 ± 3,0	15,5 ± 4,2	14,7 ± 4,6
18,1 ± 6,5	16,3 ± 4,7	15,7 ± 2,7	19,6 ± 4,5	16,1 ± 2,8	15,3 ± 3,4	16,5 ± 3,1	14,7 ± 4,9
26,0 ± 8,1	20,0 ± 2,3	21,9 ± 3,0	19,6 ± 1,7	18,4 ± 1,7	19,9 ± 2,7	21,4 ± 8,6	17,5 ± 5,7
20,9 ± 5,7	19,5 ± 3,0	19,6 ± 1,6	18,1 ± 1,6	18,4 ± 2,5	18,5 ± 2,1	17,7 ± 3,0	15,7 ± 3,7

Figura 27. L-FS, rilievi di temperatura del fronte di taglio su 32 posizioni, a 5cm circa di profondità

In figura 27, sono riportate le temperature medie del fieno silo di loiessa rilevate su 32 posizioni del fronte di taglio. Le temperature rilevate in alto risentono ovviamente degli abbassamenti notturni delle temperature che come valori minimi sono arrivati anche sotto gli 0,0 °C (fig. 23).

Le elevate deviazioni standard dei dati medi di temperatura, oltre ad essere imputabili al basso tenore in acqua

del fieno silo (63% ss) e quindi alla bassa capacità termica della matrice insilata, sembrano indicare, in alcune zone, un inizio di deterioramento aerobico conseguente ad un eccessivo appassimento del foraggio.

Mediamente, verso il centro della trincea, dove il transito dei carri e delle trattrici è più frequente, si trovano valori medi di temperatura leggermente più bassi, ma soprattutto deviazioni standard inferiori.

Non era atteso, ad esempio una temperatura di $21,4 \pm 8,6$ in una posizione laterale a metà altezza della trincea, ma osservazioni particolari e puntiformi hanno permesso di evidenziare che in quel punto il foraggio non aveva sicuramente il 63% ss, ma, a vista, poteva avere anche 10 punti di sostanza secca in più con una densità molto bassa.

Così pure sulla stessa linea mediana, ma all'estrema sinistra della figura 23 non era atteso un valore di $26,0 \pm 8,1$ pur essendo il fieno silo collocato contro la parete in calcestruzzo.

In realtà era stato programmato l'insilamento di un prodotto al 50% ss, ma il leggero ritardo del contoterzista, le andane non particolarmente grandi e la giornata soleggiata con tenue ventosità hanno ostacolato la raccolta tempestiva della foraggera appassita.

Confermano queste osservazioni i dati di tabella 6 che mostrano un innalzamento di temperatura dell'insilato passando dal fronte di taglio con $21,9^\circ\text{C}$ alla temperatura di oltre 30°C già a 50 cm di profondità della massa. Ovviamente, tale differenza di temperatura non è completamente da attribuire al deterioramento aerobico perché la massa che ha superato la piena estate si è pure riscaldata sotto l'azione del sole e parte del calore accumulato è stato ceduto, in fase di desilamento, soprattutto in corrispondenza del fronte di taglio.

Complessivamente però, questa esperienza e le esperienze passate, indicano che quando si insila in trincea del fieno silo di graminacee è utile sfalciare il foraggio alla botticella e insilare al 50% ss. Se si programmano masse con insilati a strati, esempio loiessa e silomais, con loiessa fieno silo sotto e silomais sopra allora si può pensare di raggiungere anche il 55-58% ss perché la loiessa è caricata con oltre $1,0\text{ t/m}^2$ anziché i $150\text{-}200\text{ kg/m}^2$ degli appesantimenti con ghiaia.

Temperatura della loiessa fieno-silo a varie profondità della massa: rilievi effettuati su fronte rinnovato da 0 e 24 h. Medie di 3 ripetizioni x 4 epoche di rilievi.					
Zona trincea	Profondità nella massa (cm)				
	5	10	50	70	100
Centro-laterale	$21,9 \pm 3,0$	$26,1 \pm 5,8$	$31,3 \pm 5,1$	$32,1 \pm 3,1$	$31,8 \pm 2,1$
Valori (n)	12	12	12	12	12



Tabella 7. L-FS, temperatura del fieno silo a varie profondità all'interno della massa

Figura 28. L-FS, lunghezza di trinciatura del fieno silo di loiessa

In tabella 8 sono riportate le caratteristiche chimico-fisiche del fieno silo di loiessa caratterizzato da un basso tenore di N-NH_3 (% NT), da un pH elevato, da basso tenore di acido lattico, ma con qualche traccia di ac. butirrico.

Caratteristiche chimico-fisiche degli alimenti e del mix aziendale			
Determinazioni	Loiessa	Medica	Mix
Sostanza secca (%)	63 ± 2	86 ± 1	88 ± 1
Proteine gr. (% ss)	11,4 ± 0,4	19,2 ± 1,4	20,9 ± 0,7
NDF (")	60 ± 1	42 ± 4	14 ± 1
ADF (")	37 ± 2	34 ± 4	---
ADL (")	5,4 ± 0,9	7,2 ± 1,1	---
N-sol (% NT)	52 ± 6	36 ± 3	---
Zuccheri tot. (% ss gluc. senza inv.)	1,9 ± 0,2	---	---
Amido (% ss)	---	---	46 ± 0
Ceneri (")	10,5 ± 0,8	10,2 ± 1,3	5,8 ± 0,4
N-NH ₃ (% NT)	4,7 ± 1,0	---	---
pH	5,5 ± 0,2	---	---
Ac. lattico (g/kg ss)	15,0 ± 2,0	---	---
Ac. acetico (g/kg ss)	6,3 ± 0,5	---	---
Ac. butirrico (g/kg ss)	0,1 ± 0,2	---	---
Valori (n)	4	4	4

Tabella 8. L-FS, caratteristiche chimico-fisiche degli alimenti impiegati nel 2° modulo

3.1.3 Modulo 3° – Il Silomais Innovativo (S-INN) –



Figura 29. S-INN, fase di trinciatura dell'ibrido Arma

Figura 30. S-INN, piante tagliate ad altezza di circa 45 cm dal suolo

Figura 31. S-INN, stay green elevato nonostante l'elevato tenore di sostanza secca all'insilamento

Alla data del 31 marzo 2012 è stato seminato l'ibrido di mais "Arma" della ditta Syngenta.

La coltura è stata regolarmente irrigata nonostante l'annata particolarmente siccitosa e critica per la contaminazione da AFB1.

L'insilamento nella nuova trincea larga 8,5m, è stato effettuato alla data del 23 agosto 2012, tagliando la pianta ad una altezza da terra di circa 45cm e raccogliendo una biomassa con una percentuale di sostanza secca mediamente del 45,8 (fig. 29-30-31) .



Figura 32. S-INN, stay green del trinciato integrale all'insilamento

Figura 33. S-INN, colore bruno dell'insilato Arma al desilamento

Figura 34. S-INN, appesantimento con circa 200 kg/m² di ghiaia, Ø80 mm

Il materiale di classe 700 ha mostrato uno straordinario stay green (fig. 32) che però non si è rivisto al desilamento (fig. 33) e ciò nonostante la massa insilata sia stata ben curata in fase di insilamento e appesantita dopo la chiusura con circa 200 kg/m² di ghiaia Ø 80 mm (fig.34).

Produzione (t/ha ss) di mais trinciato integrale (MTI) tagliato a 45 cm di altezza dal suolo e del residuo basale con foglie, lungo circa 24 cm, rimasto straordinariamente in campo.	
Variabili	
Produzione (t/ha ss)	
MTI con h taglio 45 cm ^(a)	24,6
Stocco basale e foglie (24 cm) ^(b)	1,5 ± 0,1
MTI con h taglio 18-20 cm ^(c)	26,1
Produzione (t/ha)	
Stocco basale e foglie (24 cm) ^(b)	6,5 ± 0,4
Sostanza Secca (%)	
MTI con h taglio 45 cm	45,8 ± 2,9
Residui di stocchi e foglie (24 cm)	22,7 ± 1,0
MTI con h taglio 18-20 cm	44,5
^(a) Produzione rilevata su parcellone di circa 1.000 m ² ;	
^(b) Produzione rilevata in doppio su 20+20 m ² ; ^(c) = ^(a) + ^(b)	

Determinazioni chimico-fisiche sul mais trinciato integrale (MTI) tagliato a 45 cm di altezza dal suolo e sul residuo basale con foglie, lungo circa 24 cm, rimasto		
Analisi		
MTI (h taglio 45 cm)		
Pg	(% ss)	6,9 ± 0,3
NDF	(")	42,8 ± 1,8
ADF	(")	22,4 ± 1,7
Amido	(")	35,9 ± 1,2
Ceneri	(")	3,5 ± 0,2
Stocco basale e foglie (24 cm)		
Pg	(% ss)	5,6 ± 0,8
NDF	(")	71,6 ± 1,1
ADF	(")	49,3 ± 0,5
Ceneri	(")	3,7 ± 0,4

Tabella 9. S-INN, produzione di mais trinciato integrale e dello stocco basale rimasto in campo

Tabella 10. S-INN, determinazioni chimico-fisiche sul mais trinciato integrale e sullo stocco basale

La produzione in campo è stata elevata sia con il taglio alto a 45 cm (24,6 t/ha ss), che con il taglio ordinario a circa 21 cm da terra (26,1 t/ha ss; tab. 9).

Con il taglio alto, rispetto a quello ordinario, sono state lasciate in campo 1,5 t/ha ss al 22,7% ss e le determinazioni chimiche su questa matrice indicano un tenore medio di proteine grezze del 5,6% ss e del 71,6% di fibra neutro detersa (tab. 10); una qualità estremamente scarsa, umida e legnosa che in trincea ostacola la compressione della massa, soprattutto quella posizionata in alto nella trincea che non gode della compressione della massa sovrastante.

La raccolta alla maturazione cerosa avanzata ed il taglio alto hanno favorito la concentrazione di amido nella massa (35,9% ss; tab. 9) e contenuto il tenore di NDF su livelli del 42,8% ss.

La trincea è stata aperta nella 3° decade di gennaio e l'adattamento, iniziato alla fine di gennaio 2013, è durato 2 settimane.

La prova di stalla e di caseificio sono proseguite per altre 4 settimane.

Piovosità, neve e gelo non sono mancati nel corso dell'adattamento e della prova, come si può notare dalle figura 35.

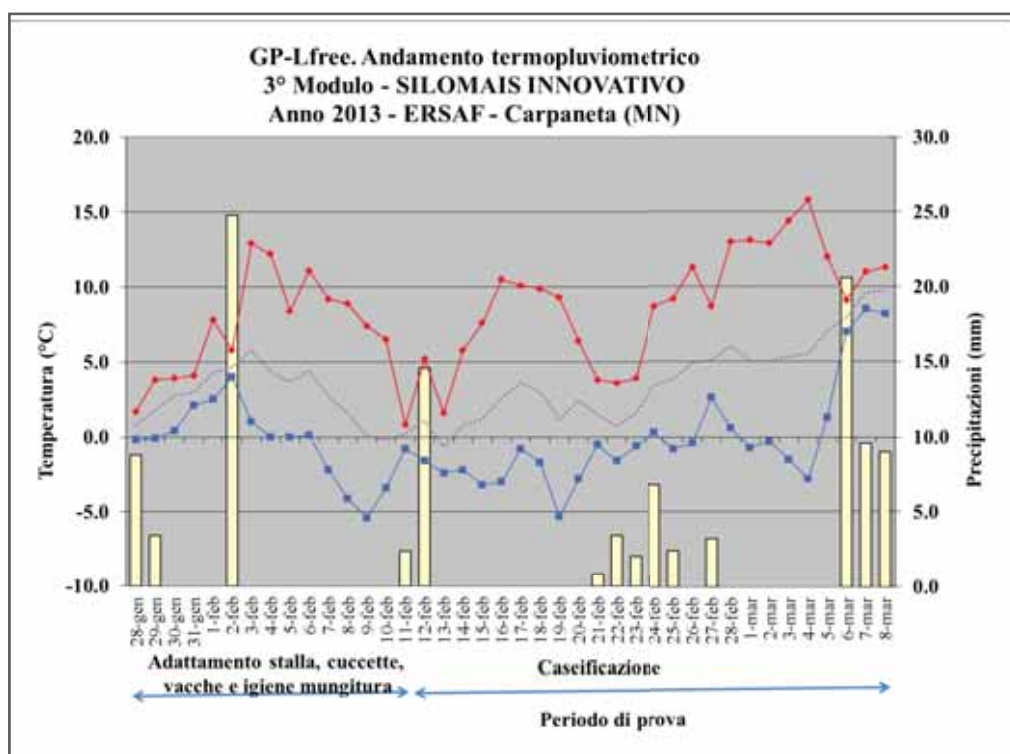


Figura 35. S-INN, andamento termopluviometrico nel periodo di adattamento e di prova

All'apertura, a vista, il silomais si è presentato in ottime condizioni (fig. 36), senza particolari aree ammuffite o marcescenti. Prima della somministrazione alle vacche, le parti leggermente deteriorate sono state scartate e per i primi 3-4 giorni il silomais è stato somministrato solo agli animali d'allevamento.

Nel corso del desilamento sono stati prelevati campioni di silomais innovativo per stimarne la densità (fig. 38).



Figura 36. S-INN, come si presentava la massa insilata all'apertura della trincea

Figura 37. S-INN, protezione del fronte di taglio durante una nevicata

Figura 38. S-INN, valutazione della densità della massa insilata

Le caratteristiche chimico-fisiche dell'insilato e delle altre matrici inserite nella dieta, sono riportate in tabella 10. Si confermano sostanzialmente i dati analitici ricavati dal mais trinciato integrale con un calo di sostanza secca e di fibra neutro detersa conseguente al processo di insilamento.

Il pH è sembrato leggermente alto in relazione all'umidità del prodotto e la dotazione di acido lattico non particolarmente elevata (38g/kg s.s.), sebbene attesa per l'elevata percentuale di sostanza secca all'insilamento, al contrario, l'acido acetico (23,2g/kg s.s.) era ben rappresentato, e sono state rilevate tracce di acido iso-butyrico che non sono mai espressione di qualità eccellente del prodotto.

Silomais Innovativo. Caratteristiche chimico-fisiche degli alimenti e del mix aziendale					
Determinazioni	Silomais Innovativo	Medica Fieno	Fieno di loiessa	Paglia di frumento	Mix Aziendale
Sostanza secca (%)	43,2 ± 1,1	84,1 ± 3,6	86,0 ± 1,9	87,5 ± 1,7	88,2 ± 1,1
Proteine gr. (% ss)	7,7 ± 0,2	16,9 ± 1,7	8,8 ± 0,7	4,5 ± 0,7	24,0 ± 1,4
NDF (")	41,2 ± 0,6	48,0 ± 1,2	58,0 ± 3,7	79,0 ± 1,5	14,4 ± 0,8
ADF (")	24,8 ± 0,6	40,9 ± 0,8	35,0 ± 2,1	49,7 ± 0,6	---
ADL (")	3,2 ± 0,1	8,8 ± 0,7	4,9 ± 0,4	8,2 ± 0,5	---
N-sol (% NT)	50,0 ± 1,9	38,3 ± 5,6	30,4 ± 3,0	38,6 ± 2,5	---
N-NH ₃ (% NT)	9,1 1,8	---	---	---	---
Ceneri (")	3,6 ± 0,1	8,0 ± 0,7	7,5 ± 0,8	7,0 ± 0,3	6,7 ± 0,2
Amido (% ss)	35,2 ± 0,4	---	---	---	39,5 ± 0,9
pH	4,2 ± 0,0	---	---	---	---
Ac. Lattico (g/kg ss)	38,0 ± 5,7	---	---	---	---
Ac. Acetico (g/kg ss)	23,2 ± 5,1	---	---	---	---
Ac. Iso-butyrico (g/kg ss)	1,2 ± 0,1	---	---	---	---
Ac. Butirico (g/kg ss)	--	---	---	---	---
Valori (n)	4	4	4	4	4

Tabella 11. S-INN, caratteristiche chimico-fisiche del silomais innovativo, dei foraggi e del mix aziendale

Le altre caratteristiche chimico-fisiche del fieno di medica, di loiessa, della paglia di frumento e del mix aziendale sono riportate sempre in tabella 11.

I rilievi di temperatura in trincea da 8,5m di larghezza, ad una profondità di 10cm, non evidenziano particolari variabilità.

5,8 ± 2,0	6,5 ± 1,6	5,7 ± 1,7	7,1 ± 1,3	7,0 ± 1,4	7,3 ± 1,6	5,7 ± 1,3	5,5 ± 1,5
6,0 ± 1,7	7,1 ± 1,8	7,3 ± 1,9	7,8 ± 2,4	8,9 ± 1,9	7,6 ± 2,2	6,0 ± 1,3	5,8 ± 1,1
6,3 ± 1,4	8,4 ± 2,1	9,9 ± 3,9	8,8 ± 3,7	11,8 ± 2,6	12,4 ± 2,7	7,8 ± 1,1	6,5 ± 0,9
6,7 ± 1,8	9,7 ± 2,3	11,8 ± 3,7	10,8 ± 2,0	13,5 ± 2,5	11,9 ± 3,3	9,3 ± 0,9	7,5 ± 1,1

Figura 39. S-INN, rilievi di temperatura del fronte di taglio su 32 posizioni

In generale, considerato l'andamento climatico particolarmente rigido, la temperatura della massa si è mantenuta leggermente più alta nella parte centro-basale e, per contro, sui livelli minimi vicino alle 2 pareti e nella posizione alta della massa. La deviazione standard dalla temperatura media si è mantenuta nella norma.

Se invece di considerare le temperature sulle varie posizioni del fronte di taglio ad una profondità di circa 10 cm, si misura la temperatura verso il centro della massa fino a 100 cm di profondità, allora i dati sembrano indicare un leggero deterioramento (tab.11).

Infatti, mentre l'insilato posizionato nella zona alta-centrale e laterale-centrale, era esposto indirettamente al freddo invernale, perché riparato solo dalla ghiaia o dalla parete in calcestruzzo, quello posizionato nella parte centrale, oltre ad avere almeno 100-110 cm di insilato sovrastante, aveva anche 300 cm circa di insilato sui due fianchi e dunque l'andamento crescente della temperatura da 11,9 a 17,9 °C in meno di 100 cm verso il centro della massa, interroga su una possibile degradazione aerobica lenta, in parte "coperta" dalla naturale più elevata temperatura dell'insilato trinciato in un periodo estremamente caldo (tab. 12).

Silomais Innovativo. Temperatura a varie profondità e posizioni del fronte di taglio. Rilievi effettuati su fronte rinnovato da 0 - 24 h.				
Zona trincea	Profondità nella massa insilata (cm)			
	10	50	70	100
Centrale	11,9 ± 1,7	15,7 ± 3,6	17,2 ± 3,6	17,9 ± 2,8
Alta-centrale ^(a)	10,3 ± 1,3	11,2 ± 1,8	11,7 ± 1,3	12,0 ± 1,1
Laterale-centrale ^(b)	9,8 ± 1,8	9,8 ± 1,3	9,8 ± 1,0	9,6 ± 1,1
Valori (n)	4	4	4	4
^(a) Rilievi nella parte alta-centrale della massa a circa 40 cm dalla ghiaia di appesantimento; ^(b) Rilievi a 60-70 cm dalla parete della trincea				

Tabella 12. S-INN, temperatura dell'insilato a varie profondità all'interno della massa

La densità del silomais innovativo è passata da 567 kg/m³ nella posizione alta a 40-50cm dalla sommità della massa compressa con ghiaia a circa 200 kg/m², ai 729 kg/m³ nella posizione basale a 40-50cm dalla pavimentazione in calcestruzzo (tab. 13).

Silomais Innovativo. Sostanza secca (%), densità della massa (kg/m ³ e kg ss/m ³). Massa alta 240 cm.			
Zona	Variabili fisiche		
	ss (%)	Kg/m ³	Kg ss/m ³
Alta ^(a)	45,0 ± 2,0	567 ± 28	256 ± 23
Media ^(b)	45,4 ± 1,0	640 ± 52	290 ± 17
Bassa ^(c)	40,4 ± 4,0	729 ± 88	292 ± 5
Valori (n)	3	3	3
^(a) Rilievi a 40-50 cm dalla superficie della massa; ^(b) parte centrale; ^(c) rilievi a circa 40-50 cm dal pavimento in c.a..			

Tabella 13. S-INN, sostanza secca e densità della massa

Tradizionalmente si è portati a pensare che il deterioramento aerobico o le fermentazioni secondarie, due processi degenerativi che si alternano ripetutamente nelle aree instabili, interessino le parti alte meno compresse delle masse insilate e/o le parti collocate sui fianchi delle trincee, soprattutto se non ben protetti da materiale plastico.

Poca attenzione si presta invece all'insilato posizionato sulla base della massa insilata, a contatto con la platea in calcestruzzo, perché lo si ritiene di elevata qualità conseguente al fatto che è l'insilato più compresso e anaerobico in assoluto.

I dati di tabella 14 indicano invece che l'insilato basale a contatto con la pavimentazione, può subire forte degradazione da rifermentazione secondaria conseguente alle precipitazioni autunno-primaverili che si infiltrano tra il telo di copertura e la parete della trincea e inumidiscono l'insilato.

Silomais Innovativo. Insilato raccolto negli ultimi 10 cm basali a contatto con la platea di calcestruzzo	
Analisi	Media ± d.s.
Chimico-fisiche	
ss (%)	35,7 ± 1,1
Proteine gr. (% ss)	9,1 ± 0,5
pH	4,5 ± 0,1
NH ₃ (% NT)	11,5 ± 0,1
Acidi di fermentazione	
Lattico (g/kg ss)	54,0 ± 6,5
Acetico (")	35,5 ± 2,4
Propionico (")	1,0 ± 0,3
Iso-butyrico (")	2,5 ± 0,6
N-butyrico (")	0,9 ± 1,5

Tabella 14. Caratteristiche chimico-fisiche e fermentative del silomais basale a contatto con la pavimentazione

Nella prova in esame, questo insilato basale, ha mostrato un tenore di sostanza secca percentuale di soli 35,7 punti; mentre la massa generale sovrastante aveva il 43,2 % ss.

Lo stesso tenore di protidi grezzi, sostanzialmente elevato, sembra indicare una percolazione di azoto solubile verso la pavimentazione dopo che l'insilato basale ha assorbito l'acqua piovana che è scivolata dal fianco della trincea alla platea in calcestruzzo.

Lo stesso pH, risalito da valori di 4,2 a valori di 4,5 indica una instabilità dell'insilato, confermata anche dalla presenza di acidi butirrici conseguenti allo sviluppo dei clostridi.

3.2 Zoo-lattiero

3.2.1 Modulo 1° – Il Silomais Standard (S-STD)

Dopo l'apertura e la pulizia del fronte posteriore della vecchia trincea le bovine da latte, per 3 settimane, sono state adattate alla dieta che conteneva 18,0 kg di silomais, 7,0 kg di medica fieno, 1,0 di fieno di loiessa, 13,1 kg di miscela aziendale contenente: mais orzo, soia integrale e farina d'estrazione, polpe e Sali minerali e vitamine e 5 litri d'acqua (tab. 13).

A volontà le bovine avevano bicarbonato di sodio e di calcio contenuti in vari pozzetti di cemento dislocati all'interno della stalla.

Composizione dell'unifeed	
Alimenti	Kg/d
Silomais Standard	18,0
Medica fieno	7,0
Loiessa fieno	1,0
Mix aziendale	
Mais farina	4,2
Orzo farina	2,2
Soia integrale cruda	2,0
Soia farina estrazione	2,2
Bietola polpe pellet	2,2
Sali min., vitam., lieviti	0,3
Acqua	5,0
Totale	44,1
Bicarbonato e cloruro di sodio consumati rispettivamente a 200 e 100 g/d erano a volontà	

Tabella 15. S-STD, materie prime impiegate nella dieta unifeed

L'igiene della stalla era garantita dal passaggio, 3 volte al giorno, della "ruspetta" nelle due corsie di alimentazione e di riposo.

All'entrata in sala di mungitura (fig. 40), molte bovine avevano ancora sui capezzoli residui secchi del prodotto applicato, a fine mungitura, per la protezione fisico-chimica dello sfintere dopo la mungitura; l'asportazione di questo prodotto, nella mungitura successiva, è avvenuta con un prodotto a base di schiuma acida contenente acido lattico, emollienti e sostanze schiumogene (fig. 41) a questa operazione è seguita l'asportazione dei residui e l'asciugatura dei capezzoli con n. 2 strappi di cellulosa per ogni bovina (fig. 42).



Figura 40. S-STD, bovina con mammella e capezzoli puliti, ma con residui di protezione fisico-chimica sullo sfintere

Figura 41. S-STD, la soluzione con ac. lattico per facilitare l'asportazione della protezione fisica viscosa-oleosa

Figura 42. S-STD, asportazione della schiuma acida con doppio fazzoletto secco di cellulosa

L'igiene degli animali non può limitarsi però ai soli interventi in sala di mungitura perché queste azioni devono durare poco tempo per non prolungare eccessivamente le ore di mungitura e di funzionamento dei motori elettrici.

Sono infatti altrettanto importanti, altre operazioni quali ad esempio quelle della bruciatura della peluria che taluni animali, seppure produttivi, sviluppano sulla mammella (fig. 44) e soprattutto il rifacimento accurato delle cuccette che in queste prove sono state riordinate tutti i giorni e due volte al giorno in concomitanza con la raccolta degli animali per la mungitura.



Figura 43. S-STD, fase di mungitura

Figura 44. S-STD, per migliorare l'igiene della mammella, i peli di alcune bovine (2-3%), sono stati bruciati

Figura 45. S-STD, prodotti pre-dipping e post-dipping impiegati in sala di mungitura



Figura 46. S-STD, protezione dello sfintere del capezzolo, con matrice viscosa-oleosa addizionata con iodio

Figura 47. S-STD, rifacimento quotidiano, due volte al giorno, delle cuccette

Figura 48. S-STD, le bovine apprezzano le lettiere pulite e ben curate

L'efficacia degli interventi igienici sulla stalla, sugli animali e sulle cuccette, è stato valutato sulle bovine da latte in entrata in sala di mungitura assegnando, a vista, un punteggio da 1 a 4 in base all'imbrattamento del coxale-arti posteriori oppure, della mammella-capezzolo (1= igiene ottima di tutte le parti osservate). La tabella 16, relativa a queste osservazioni (3 munte del mattino e 3 munte della sera), indica che mediamente in questa prova il 52% delle bovine sono entrate in sala di mungitura igienicamente ben curate, mentre il 39% avevano tracce di feci sui capezzoli-mammella; mentre il 9% era decisamente insufficiente.

Valutazione a vista in sala di mungitura, del grado di igiene del capezzolo-mammella e del coxale-arti posteriori. Valori espressi in percentuale di n. 4 classi: 1= bovina visivamente ben pulita, asciutta, senza traccia di feci umide o secche; 4= bovina con elevata quantità di feci secche e/o umide o bagnata da urine sulle parti direttamente o non direttamente interessate dall'intervento igienico in pre-mungitura. Valori medi di n. 6 munte, mattina e sera, nelle n. 6 settimane di prova.						
Classi di frequenza	Munta della Sera		Munta del Mattino		Media	
	Capezzoli-mammella	Coxale e arti posteriori	Capezzoli-mammella	Coxale e arti posteriori	Capezzoli-mammella	Coxale e arti posteriori
1	47	61	59	71	52	66
2	45	33	33	24	39	29
3	5	4	6	3	6	4
4	3	2	3	2	3	2
Totale	100	100	100	100	100	100

Tabella 16. S-STD, valutazione, in sala di mungitura, del grado d'igiene del capezzolo e del coxale-arti posteriori

La qualità microbiologica della dieta, relativa soprattutto al tenore di spore, ma non solo, ha evidenziato valori MPN/g pari 642 per l'unifeed, valori questi ultimi del tutto assimilabili alle diete unifeed somministrate nel passato.

Il silomais ha avuto una dotazione di spore e di lieviti molto bassa (117 MPN spore/litro e 1.051 ufc/g di lieviti); tali valori appaiono molto buoni, soprattutto se si considera che il prelievo è stato fatto da tutta la massa caricata nel carro unifeed.

Il risultato conferma indirettamente il fatto che la quasi totalità dei microrganismi che caratterizzano un silomais la si trova soprattutto, ma ovviamente non esclusivamente, negli strati alti se non ben compressi o ben sigillati.

Si consideri che mediamente si accettano insilati con valori medi dell'ordine di 105 ufc/g di lieviti.

Principali caratteristiche microbiologiche di unifeed, silomais, fieno di medica, fieno di loiessa e mix aziendale.	
Alimenti	Media $\pm$ d.s.
Unifeed	
Spore (MPN/g)	642 $\pm$ 834
Lieviti (ufc/g)	4.250 $\pm$ 2.318
Muffe (ufc/g)	123.500 $\pm$ 102.047
Silomais	
Spore (MPN/g)	117 $\pm$ 134
Lieviti (ufc/g)	1.051 $\pm$ 1.800
Muffe (ufc/g)	7.700 $\pm$ 11.192
Fieno medica	
Spore (MPN/g)	416 $\pm$ 546
Fieno loiessa	
Spore (MPN/g)	295 $\pm$ 363
Mix aziendale	
Spore (MPN/g)	150 $\pm$ 75
Valori (n)	6

Caratteristiche chimico-fisiche dell'unifeed		
Determinazioni		Media $\pm$ d.s.
Sostanza secca	(%)	57,9 $\pm$ 1,8
Pg	(% ss)	16,2 $\pm$ 0,5
NDF	(")	34,6 $\pm$ 2,7
ADF	(")	21,7 $\pm$ 2,5
ADL	(")	3,7 $\pm$ 0,5
N-sol	(% NT)	44,0 $\pm$ 2,2
Amido	(% ss)	24,7 $\pm$ 2,4
Ceneri	(")	7,1 $\pm$ 0,3

Tabella 17. S-STD, Caratteristiche microbiologiche di unifeed, silomais, mix aziendale, fieno di medica e di loiessa

Tabella 18. S-STD, caratteristiche chimico-fisiche dell'unifeed

La composizione chimica dell'unifeed somministrata alle vacche in lattazione e riportata nella tabella 15, riflette lo standard medio delle diete della pianura lombarda per produzioni medie giornaliere di latte attorno ai 28 litri/capo d-1, quale era la produzione della mandria di 55 capi da latte nella fase avanzata di passaggio dalla stalla a stabulazione fissa a quella libera.

Durante la fase di caseificazione del latte, è stata stimata la potenzialità di inquinamento sporale fecale del latte prelevando, dalla mandria in produzione, 2 volte alla settimana, 3 + 3 campioni di feci.

Ogni campione conteneva due bovine: una ad alta ed una a bassa produzione di latte.

La tabella 17, relativa a questi prelievi, indica con estrema chiarezza quanto importante sia la cura dei processi di insilamento-desilamento se si desidera avere inquinamenti sporali fecali dell'ordine di 104 sulla sostanza secca.

Pur con l'applicazione di corrette e regolari metodologie di conservazione e utilizzazione, per altro migliorabili in presenza di trincee con larghezze più adeguate al numero di capi da alimentare, la tabella 19 indica una elevata variabilità sporale fecale, ad esempio, alla 1° e alla 6° settimana le spore/g ss sono state rispettivamente pari a 9.929 $\pm$ 10.449 e 9.427 $\pm$ 14.537, mentre alla 5° e alla 4° settimana sono calate di un logaritmo, attestandosi rispettivamente a 544 $\pm$ 289 e a 1.031 $\pm$ 635 spore (MPN/g ss).

I termini: "corrette e regolari metodologie di desilamento" sono d'obbligo perché in questi processi micro-

biologici una azione di desilamento scorretta o, più raramente, una variabilità interna dell'insilato non conosciuta, sono in grado di interferire negativamente sulla qualità microbiologica del latte anche per 5-8 giorni perché portano ad un inquinamento microbiologico anticaseario dei ruminanti degli animali in lattazione).

Sostanza secca delle feci (%) e numero di spore e di eterofermentanti (MPN/g ; MPN/g ss). Media $\pm$ d.s. di n° 6 campioni/ settimana, prelevati due volte/settimana; ciascun campione conteneva feci di due bovine in lattazione.							
Variabili	Settimane di prova						Media $\pm$ d.s.
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	
Feci							
ss (%)	13,8 $\pm$ 0,0	13,9 $\pm$ 0,5	13,5 $\pm$ 0,7	14,1 $\pm$ 0,9	14,1 $\pm$ 1,1	13,2 $\pm$ 0,7	13,8 $\pm$ 0,8
Spore							
MPN/g	1.367 $\pm$ 1.439	366 $\pm$ 250	428 $\pm$ 543	143 $\pm$ 86	77 $\pm$ 42	1.251 $\pm$ 1.881	605 $\pm$ 1.060
MPN/g ss	9.929 $\pm$ 10.449	2.635 $\pm$ 1.832	3.305 $\pm$ 4.358	1.031 $\pm$ 635	544 $\pm$ 289	9.427 $\pm$ 14.537	4.479 $\pm$ 7.991
Eterofermentanti							
MPN/g (/10 ³)	11 $\pm$ 18	9 $\pm$ 18	56 $\pm$ 59	11 $\pm$ 17	3 $\pm$ 6	24 $\pm$ 43	19 $\pm$ 35
MPN/g ss (/10 ³)	76 $\pm$ 127	62 $\pm$ 129	430 $\pm$ 458	78 $\pm$ 115	20 $\pm$ 38	191 $\pm$ 353	143 $\pm$ 272
Valori (n)	6	6	6	6	6	6	36

Tabella 19. S-STD, spore ed eterofermentanti nelle feci

Si consideri anche il fatto che all'aumentare del numero delle spore contenute nelle feci è ragionevole ritenere che aumenti anche la probabilità di presenza di clostridi particolarmente attivi nella fermentazione del lattato all'interno delle cagliate da grana e la elevata deviazione standard dei dati della 1° e 6° settimana di tabella 19, per certi aspetti anche attesa in questi dati microbiologici, sembra nascondere anche questa eventualità.

Gli eterofermentanti nelle feci, in questa prova, sono risultati costantemente bassi e mediamente collocati attorno a 143 MPN/g ss. Si consideri che alla fine degli anni '90 gli allevamenti di vacche in area Grana Padano avevano tenori di eterofermentanti nelle feci dell'ordine di 102 – 105 MPN/g ss.

Principali caratteristiche microbiologiche del latte	
Variabili	Media $\pm$ d.s.
Latte	
Cbs (ufc/ml)/10 ³	42 $\pm$ 37
Coliformi (ufc/ml)	1.241 $\pm$ 2.115
Spore ¹ (MPN/L)	24 $\pm$ 7
Spore (n camp. < 30 MPN/L)	5
Lattici (ufc/ml)	607 $\pm$ 488
Valori (n)	22
⁽¹⁾ Valori inferiori a 30 Spore (MPN/L) sono stati ridotti di 1/3 e considerati pari a 20 (MPN/L) .	

Tabella 20. S.STD, caratteristiche microbiologiche del latte

Caratteristiche chimico-fisiche del latte	
Variabili	Media $\pm$ d.s.
Latte	
Grasso (%)	3,73 $\pm$ 0,09
Proteine (%)	3,34 $\pm$ 0,03
Lattosio (%)	4,89 $\pm$ 0,03
Res. secco (%)	12,7 $\pm$ 0,1
Cellule (/1000)	344 $\pm$ 86
LDG - r	20 $\pm$ 2
LDG - K ₂₀	8 $\pm$ 1
LDG - A ₃₀	19 $\pm$ 6
Valori (n)	43

Tabella 21. S-STD, caratteristiche chimico-fisiche del latte

Il latte delle 2 munte, sera e mattina, campionato alla stalla aveva un tenore di sole 24 $\pm$ 7 spore MPN/L. Se però si confronta quest'ultimo dato con il dato d'analisi, tendenzialmente elevato, sui coliformi, e sapen-

do che questa determinazione è particolarmente correlata con l'inquinamento fecale del latte, si può ragionevolmente supporre che con livelli inferiori di coliformi il tenore di spore del latte sarebbe stato ulteriormente ridotto.

Le caratteristiche chimico-fisiche del latte riportate in tabella 21, rientrano tutte nell'ordinaria variabilità analitica per questa matrice.

3.2.2 Modulo 2° - Loiessa Fieno Silo (L-FS) –

Gli animali hanno ingerito, per le n. 4 settimane di prova, una dieta composta da 14,0 kg di loiessa fieno silo; 3,0 kg di medica; e 13,4 kg di miscela aziendale composta da mais, orzo, soia integrale e farina di estrazione, sali minerali, vitamine e lieviti come riportato in tabella 22.

In stalla erano presenti alcuni pozzetti in cemento contenenti cloruro e bicarbonato di sodio. Gli animali, orientativamente, ne hanno consumato circa 200 g/d.

Composizione unifeed	
Ingredienti	Kg/d
Loiessa fieno-silo	14,0
Medica fieno	3,0
Mix aziendale	13,4
Mais farina	5,6
Orzo farina	3,0
Soia integrale cruda	2,0
Soia farina estrazione	2,2
Sali min. + Vit. + Lieviti	0,6
Acqua	0,0
Tot.	30,4

Caratteristiche microbiologiche di unifeed, fieno silo di loiessa, fieno di medica e mix aziendale.	
Alimenti	Media ± d.s.
Unifeed ^(a)	
Spore (MPN/g)	374 ± 250
Lieviti (ufc/g x10 ⁻³)	1.765 ± 2.944
Muffe (ufc/g x10 ⁻³)	95 ± 87
Loiessa fieno-silo ^(b)	
Spore (MPN/g)	653 ± 899
Lieviti (ufc/g x10 ⁻³)	4.275 ± 5.878
Muffe (ufc/g x10 ⁻³)	214 ± 153
Fieno medica	
Spore (MPN/g)	349 ± 263
Mix aziendale	
Spore (MPN/g)	311 ± 289
Valori (n)	8
^(a) Campioni prelevati nel corso della distribuzione in mangiatoia; ^(b) Campioni prelevati sul carro unifeed semovente in fase di caricamento.	

Tabella 22. L-FS, composizione della dieta unifeed

Tabella 23. L-FS, caratteristiche microbiologiche di unifeed, fieno silo di loiessa, fieno di medica e mix aziendale



Figura 49. L-FS, fase di desilamento per le vacche da latte con pre-asportazione di soli 20 cm circa di cappello

Figura 50. L-FS, distribuzione in mangiatoia dell'unifeed

Figura 51. L-FS, grado di trinciatura dei foraggi all'interno dell'unifeed

Le caratteristiche microbiologiche della dieta sono riportate in tabella 23.

I rilievi termici sulla massa insilata trovano conferma nella determinazione del contenuto in lieviti della loiessa fieno silo che ha raggiunto valori medi molto elevati e pari a quasi $4,3 \pm 5,9 \times 10^6$ ufc/g.

Valori medi e deviazioni standard così alti sono in parte da imputare alla non corretta asportazione dell'insilato posizionato nei primi 40 cm; insilato caratterizzato da bassissima densità e quindi da facile penetrazione dell'aria.

All'apparenza tuttavia, questo prodotto posizionato nella parte alta della massa, non era assolutamente marcescente anzi, con il riscaldamento conseguente alla degradazione aerobica il fieno silo di loiessa aveva un aspetto molto prossimo al fieno umido.

Loiessa fieno-silo. Variabili fisiche della massa insilata di altezza complessiva pari a 2,4 m e appesantita con $150-200 \text{ kg/m}^2$ di ghiaia.		
Variabili	Zona prelievo (m da terra)	
	Bassa (0,5 m)	Alta (2,0 m)
Sostanza secca (%)	65 ± 1	70 ± 1
Compressione (kg/m^2)	650	175
Densità (kg/m^3)	250 ± 15	110 ± 19
Densità (kg ss/m^3)	163 ± 8	81 ± 13
Temperatura (°C)		
Profondità 10 cm	$21,3 \pm 3,3$	$21,8 \pm 3,6$
Profondità 30 cm	$29,5 \pm 0,5$	$31,4 \pm 6,1$
Profondità 60 cm	$34,2 \pm 0,8$	$42,9 \pm 2,7$
Valori (n)	3	3

Caratteristiche chimico-fisiche dell'unifeed con loiessa fieno-silo.		
Determinazioni		Media $\pm$ d.s.
Sostanza secca (%)		$77,3 \pm 0,9$
Proteine gr. (% ss)		$16,5 \pm 0,3$
NDF (")		37 ± 2
ADF (")		23 ± 1
ADL (")		$3,1 \pm 0,2$
N-sol (% NT)		37 ± 4
Amido (% ss)		20 ± 0
Ceneri (% ss)		$8,8 \pm 0,5$
Valori (n)		4

Tabella 24. L-FS, densità e temperatura del fieno silo di loiessa a varie altezze e profondità

Tabella 25. L-FS, caratteristiche chimico-fisiche dell'unifeed

Gran parte della massa però, soprattutto la parte medio alta, non era stabile perché i campioni prelevati dal nastro del carro unifeed avevano tenori di lieviti dell'ordine di 10^3 altri di 10^4 e altri ancora di 10^7 .

Lo stesso valore riscontrato nella determinazione delle spore 653 ± 899 e le tracce di acido butirrico, sembrano indicare una fermentazione secondaria butirrica anche su questa matrice fieno-silo.

Anche l'unifeed di conseguenza ha visto salire il numero di lieviti a valori di quasi $1,8 \pm 2,9 \times 10^6$ ufc/g.

Il tenore in spore della dieta invece, con 374 spore MPN/g, si è mantenuto su valori medi.

Anche in questa prova la miscela aziendale (311 spore MPN/g), composta da semi di cereali e prodotti, sottoprodotti di lavorazione industriale, mostra inquinamenti non attesi per queste matrici che non hanno contatti con il terreno, come ad esempio i foraggi, ed i cui semi vengono raccolti secchi o prontamente essiccati.

Con riferimento agli interventi igienici di stalla, l'introduzione contemporanea, sebbene scaglionata dai parti, di nuovi animali acquistati per aumentare il gruppo di vacche in lattazione e caseificare 2.000 litri di latte/d ha comportato qualche difficoltà iniziale di adattamento alla posta.



Figura 52. L-FS, bovina scivolata in corsia di alimentazione perché cavalcata da vacca in calore

Figura 53. L-FS, manza abituata alla lettiera permanente, non ancora educata alla cuccetta

Figura 54. L-FS, l'igiene d'allevamento non si può limitare alla sola pulizia del capezzolo in sala di mungitura

Talvolta sono sufficienti pochi animali sporchi per vanificare gli sforzi igienici. Nella prova, 2 manze acquistate, avevano preso inizialmente l'abitudine di coricarsi nelle corsie (fig. 53) e se a queste si aggiungono le vacche in calore che cavalcano o si lasciano cavalcare e talvolta scivolano e cadono, imbrattandosi mammelle e pancia (fig. 52), oltre agli ordinari animali che si coricano in cuccetta dove poco prima un animale di passaggio nella corsia, girandosi, vi ha defecato sopra, allora l'igiene degli animali viene in parte ridotta. Questo perché in sala di mungitura i tempi di lavoro sono sempre stretti, magari per la presenza nel gruppo di mungitura di un animale trattato con antibiotico il cui latte deve essere munto a parte, nel secchio, e così, forse, si tende a "sacrificare" l'intervento igienico, per seguire il più importante fatto sanitario.



Figura 55. L-FS, ogni settimana la lettiera è stata "caricata" con segatura

Figura 56. L-FS, il taglio dei peli della coda evita che gli animali, coricati alla posta, si imbrattino con feci e urine

Figura 57. L-FS, il nastro deve mantenere pulite le corsie di transito degli animali, da feci e urine

Per comprendere la situazione generale nella quale si è operato, oltre a seguire l'allevamento, a vista, è stata fatta, come nel modulo precedente, una valutazione igienica degli animali entrati in sala di mungitura. I risultati riportati in tabella 24 indicano che, nonostante l'entrata massiccia di nuovi animali, le condizioni igieniche non sono peggiorate, anzi nelle 6 munte valutate (3 munte del mattino e 3 della sera), nessun animale è apparso igienicamente molto scarso.

Loiessa fieno-silo. Valutazioni a vista (%) sul grado di igiene del capezzolo-mammella e del coxale-arti posteriori. Numero 4 classi (1= bovina con mammella e capezzoli visivamente ben puliti, asciutti, senza traccia di feci umide o secche; 4= bovina con elevata quantità di feci secche e/o umide o bagnata da urine sulle parti direttamente interessate dall'intervento igienico in pre-mungitura. Valori medi di n. 6 mungiture.						
Classi di frequenza	Munta della Sera		Munta del Mattino		Media	
	Capezzoli-mammella	Coxale e arti posteriori	Capezzoli-mammella	Coxale e arti posteriori	Capezzoli-mammella	Coxale e arti posteriori
1	70	78	68	78	69	78
2	25	17	24	19	24	18
3	5	3	8	3	6	3
4	0	1	0	0	0	1
Totale	100	100	100	100	100	100

Tabella 26. L-FS, valutazione in sala di mungitura, del grado d'igiene del capezzolo e del coxale-arti posteriori

Il numero di volte al giorno che il nastro transita nelle corsie è un fatto di primaria importanza per l'igiene degli animali, ovviamente questa operazione se fatta durante la cura delle cuccette non richiede manodopera aggiuntiva, ma se è fatta al di fuori di questo spazio è necessario la presenza, sebbene non continua, di personale per evitare che animali pigri o azzoppati non riescano ad alzarsi al passaggio della "ruspetta" oppure, al mattino presto non vi sia in corsia un vitello nato nella notte "senza preavviso".

La qualità microbiologica della razione, valutata a livello fecale ha mostrato (tab. 27), un inquinamento sporale fecale non particolarmente elevato e pari a 2857 spore MPN/g ss, ma con una deviazione standard di 3211 che sta ad indicare una estrema variabilità degli inquinamenti sporali fecali.

Al contrario delle spore, il numero di eterofermentanti è salito su valori eccezionalmente alti, ossia $10,0 \pm 10,6 \times 10^6$ ufc/g ss, con un andamento crescente passando dalla 1° alla 4° settimana (tab. 27).

Loiessa fieno-silo. Sostanza secca delle feci (%) e numero di spore e di eterofermentanti (MPN/g ; MPN/g ss). Media $\pm$ d.s. di n° 6 campioni/settimana prelevati in due giorni differenti; ciascun campione conteneva feci di due bovine in lattazione.					
Variabili	Settimane di prova				Media $\pm$ d.s.
	1° settimana	2° settimana	3° settimana	4° settimana	
Feci					
ss (%)	14,2 $\pm$ 0,5	14,7 $\pm$ 0,6	14,0 $\pm$ 1,3	15,6 $\pm$ 0,7	14,7 $\pm$ 1,0
Spore					
MPN/g	618 $\pm$ 697	439 $\pm$ 532	263 $\pm$ 198	357 $\pm$ 310	419 $\pm$ 463
MPN/g ss	4.362 $\pm$ 4.934	3.002 $\pm$ 3.651	1.832 $\pm$ 1.332	2.233 $\pm$ 1.876	2.857 $\pm$ 3.211
Eterofermentanti					
MPN/g ($/10^6$)	0,22 $\pm$ 0,05	1,48 $\pm$ 1,10	2,01 $\pm$ 2,04	2,31 $\pm$ 1,89	1,50 $\pm$ 1,61
MPN/g ss ($/10^6$)	1,6 $\pm$ 0,4	9,9 $\pm$ 7,3	14,1 $\pm$ 14,2	14,5 $\pm$ 11,6	10,0 $\pm$ 10,6
Valori (n)	12	12	12	12	48

Tabella 27. L-FS, spore ed eterofermentanti nelle feci

La microbiologia del latte della sera miscelato con quello del mattino (tab. 28), indicano valori estremamente contenuti di Cbs, con soli 9.000 ufc/ml; Coliformi con 55 ufc/ml; e di spore con circa il 90% dei latti con valori inferiori a 20 MPN spore/litro.

Caratteristiche microbiologiche del latte	
Variabili	Media ± d.s.
Latte	
Cbs (ufc/ml)/10 ³	9 ± 7
Coliformi (ufc/ml)	55 ± 52
Spore ¹ (MPN/L)	16 ± 12
Spore (n camp.< 20 MPN/L)	15
Lattici (ufc/ml)	172 ± 67
Valori (n)	17
⁽¹⁾ Valori inferiori a 20 MPN/L sono stati ridotti di 1/3 e considerati pari a 13 (MPN/L) .	

Tabella 28. L-FS, caratteristiche microbiologiche del latte

Caratteristiche chimico fisiche del latte.		
Variabili		Media ± d.s..
Latte		
Grasso	(%)	4,01 ± 0,08
Proteine	(%)	3,39 ± 0,03
Lattosio	(%)	4,89 ± 0,02
Res. secco	(%)	13,0 ± 0,1
Cellule	(/10 ³)	246 ± 54
LDG - r	(mm)	21 ± 1
LDG - K ₂₀	(mm)	8 ± 1
LDG - A ₃₀	(mm)	18 ± 3
Valori	(n)	17

Tabella 29. L-FS, caratteristiche chimico-fisiche del latte

Le caratteristiche chimico-fisiche dello stesso latte, i cui valori sono riportati in tabella 29, indicano, per contro, tenori elevati in principi nutritivi e buona qualità sanitaria.

Mediamente le percentuali di grasso, proteine ed il numero di cellule sono risultati pari rispettivamente a 4,01 - 3,39 e 246.000.

3.2.3 Modulo 3° - Il Silomais Innovativo (S-INN) –

Le vacche da latte hanno ingerito mediamente 20 kg/d di silomais innovativo unitamente a foraggi di medica, loiessa e miscela aziendale come riportato in tabella 30.

L'unifeed, senza aggiunta di acqua, aveva il 64% ss, il 15,4% ss di protidi grezzi, il 33,3% ss di NDF ed il 28,7% ss di amido (tab. 32).

L'avanzamento medio del fronte di taglio è stato pari a circa 14-15 cm al giorno.

Silomais Innovativo. Composizione dell'unifeed	
Alimenti	Kg/d
Silomais Innovativo	20,0
Medica fieno	5,0
Loiessa fieno	0,5
Paglia frumento	1,0
Soia far. estrazione	2,3
Mix aziendale	7,7
Mais farina	4,0
Orzo farina	2,0
Soia integr. cruda	1,4
Sali min., vit., lieviti	0,3
Acqua	--
Totale	36,5
Bicarbonato e cloruro di sodio a volontà, nei pozzetti.	

Silomais Innovativo. Caratteristiche microbiologiche di unifeed, silomais, fieno di medica e di loiessa, paglia di frumento e mix aziendale. Media $\pm$ d.s..	
Alimenti	Media $\pm$ d.s.
Unifeed ^(a)	
Spore (MPN/g)	1.603 $\pm$ 1.077
Lieviti (ufc/g $\times 10^{-3}$)	253 $\pm$ 388
Muffe (ufc/g $\times 10^{-3}$)	117 $\pm$ 146
Silomais Innovativo ^(b)	
Spore (MPN/g)	357 $\pm$ 294
Lieviti (ufc/g $\times 10^{-3}$)	5,7 $\pm$ 7,8
Muffe (ufc/g $\times 10^{-3}$)	4,7 $\pm$ 6,7
Fieno medica	
Spore (MPN/g)	302 $\pm$ 253
Fieno loiessa	
Spore (MPN/g)	534 $\pm$ 463
Paglia frumento	
Spore (MPN/g)	183 $\pm$ 309
Mix aziendale	
Spore (MPN/g)	468 $\pm$ 351
Valori (n)	8
^(a) Campioni prelevati nel corso della distribuzione in mangiatoia ed inoculati entro le 0,5-1,5 h; ^(b) Campioni prelevati in fase di caricamento del carro unifeed.	

Tabella 30. S-INN, composizione della dieta unifeed

Tabella 31. S-INN, caratteristiche microbiologiche della razione

Le caratteristiche microbiologiche degli alimenti impiegati nella dieta (tab. 31), mostrano valori di spore (MPN/g) tendenzialmente elevati per l'unifeed (1.603), per il fieno di loiessa (534) e per il mix aziendale (468). Quest'ultimo dato microbiologico inatteso per granaglie che non hanno contatti con il terreno, sembra indicare una scarsa igiene dei silos aziendali, ma anche dei silos dei fornitori grossisti.



Figura 58. S-INN, per evitare inquinamenti di spore della mangiatoia, curare anche le aree di transito del carro

Figura 59. S-INN, corsia di alimentazione igienicamente ben curata, dopo il passaggio della ruspetta

Figura 60. S-INN, defecazione sulla posta da parte di bovine in transito nella corsia di alimentazione

In azienda, un fornitore, dopo aver scaricato il mangime nel silos, non ha chiuso correttamente il coperchio perché quest'ultimo, anziché "abbracciare" completamente la bocca di entrata del silos si è solo appoggiato sul bordo rialzato della bocca stessa e con una giornata di vento e pioggia si è addirittura staccato dal silo stesso.

L'umidità di condensa o peggio l'entrata diretta di acqua piovana sono un innesco ideale per la degradazione aerobica anche micotossica e anaerobica clostridica.

In tabella 32 sono riportate le caratteristiche chimico-fisiche dell'unifeed ingerito dalle vacche con il 64% ss, il 15,4% di protidi grezzi, il 33,3% di NDF ed il 28,7% di amido.

Silomais Innovativo. Caratteristiche chimico-fisiche dell'unifeed	
Determinazioni	Media $\pm$ d.s.
Sostanza secca (%)	64,0 $\pm$ 1,3
pH	5,7 $\pm$ 0,2
Proteine gr. (% ss)	15,4 $\pm$ 0,6
NDF (")	33,3 $\pm$ 1,1
ADF (")	20,3 $\pm$ 0,3
ADL (")	4,2 $\pm$ 0,5
N-sol (% NT)	38,2 $\pm$ 6,2
Amido (% ss)	28,7 $\pm$ 1,1
Ceneri (% ss)	6,3 $\pm$ 0,1
Valori (n)	4

Tabella 32. S-INN, caratteristiche chimico-fisiche dell' unifeed



Figura 61. S-INN, fase di desilamento

Figura 62. S-INN, grado di trinciatura dei foraggi affienati inseriti nell'unifeed

Figura 63. S-INN, nessuna traccia di feci sui fazzoletti di cellulosa impiegati nell'igiene di mammelle e capezzoli

L'igiene di stalla, delle cuccette e degli animali in questo 3° modulo sperimentale è stata ben condotta.

Le valutazioni sullo stato igienico della mammella-capezzoli e del coxale-arti posteriori, effettuate in entrata in sala di mungitura e riportate in tabella 33, indicano mediamente un 99% di vacche con mammelle e capezzoli visivamente ben puliti o puliti, asciutti e con assenza di tracce evidenti di feci o urine.

Le figure 64-65-66 evidenziano lo stato igienico delle mammelle e dei capezzoli delle bovine valutate con l'83% delle bovine munte che avevano un punteggio pari a "1".



Figure 64-65-66. S-INN, bovine entrate in sala di mungitura con mammelle pulite

Le figure 67-68-69, mostrano invece le stesse mammelle e capezzoli dopo l'intervento igienico in pre mungitura con schiuma acida e doppio fazzoletto di cellulosa a perdere.



Figure 67-68-69. S-INN, le stesse bovine dopo intervento igienico

Praticamente solo 1 bovina sulle 80 vacche in lattazione è stata valutata con un punteggio insufficiente. La valutazione igienica riferita a coxale e arti posteriori è risultata migliore con il 89 % delle vacche a punteggio massimo.

L'inquinamento sporale fecale si è mantenuto su livelli standard di 5.344 ± 7.466 spore/g ss, ma con variabilità molto forti che nella 2° settimana di caseificazione hanno raggiunto le 13.352 ± 11.252 spore/ g ss, mentre nella 4° e ultima settimana si sono abbassate di un logaritmo (1.016 ± 731).

Silomais Innovativo. Valutazioni a vista (%) sul grado di igiene del capezzolo-mammella e del coxale-arti posteriori. Numero 4 classi (1= bovina con mammella e capezzoli visivamente ben puliti, asciutti, senza traccia di feci umide o secche, sebbene con possibili e limitati residui di segatura; 4= bovina con elevata quantità di feci secche e/o umide o bagnata da urine sulle parti direttamente interessate dall'intervento igienico in pre-mungitura). Valori medi di n. 6 mungiture.						
Classi di frequenza	Munta della Sera		Munta del Mattino		Media	
	Capezzoli-mammella	Coxale e arti posteriori	Capezzoli-mammella	Coxale e arti posteriori	Capezzoli-mammella	Coxale e arti posteriori
1	79	89	87	89	83	89
2	20	10	12	10	16	10
3	1	1	1	1	1	1
4	---	---	---	---	---	---
Totale	100	100	100	100	100	100

Tabella 33. S-INN, valutazione, in sala di mungitura, del grado d'igiene del capezzolo e del coxale-arti posteriori

Silomais Innovativo. Sostanza secca delle feci (%), numero di spore e di eterofermentanti nelle feci (MPN/g ; MPN/g ss). Media $\pm$ d.s. di n° 6 camponi/settimana prelevati in due giorni differenti. Ciascun campione conteneva feci di due bovine in lattazione.					
Variabili	1° settimana	2° settimana	3° settimana	4° settimana	Media $\pm$ d.s.
Feci					
ss (%)	14 $\pm$ 0	14 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	14 $\pm$ 0	14 $\pm$ 1
Spore					
MPN/g	283 $\pm$ 173	1.782 $\pm$ 1.481	708 $\pm$ 548	139 $\pm$ 100	728 $\pm$ 991
MPN/g ss	2.071 $\pm$ 1.257	13.352 $\pm$ 11.252	4.935 $\pm$ 3.898	1.016 $\pm$ 731	5.344 $\pm$ 7.466
Eterofermentanti					
MPN/g (/10 ⁶)	0,5 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 2,1	3,0 $\pm$ 2,5	1,9 $\pm$ 1,6	1,8 $\pm$ 1,9
MPN/g ss (/10 ⁶)	4,0 $\pm$ 3,5	12,5 $\pm$ 16,4	20,9 $\pm$ 17,1	13,8 $\pm$ 11,3	12,8 $\pm$ 13,8
Valori (n)	6	6	6	6	24

Tabella 34. S-INN, spore ed eterofermentanti nelle feci

Al contrario, gli eterofermentanti, dalla 2° alla 4° settimana hanno mostrato valori da 12,5 a 20,9 a 13,8 x 106 ufc/g ss; solo nella 1° settimana di caseificazione il numero si è mantenuto sui 4 x 106 ufc/gss, valori comunque elevati.

Non erano mai stati contati, nelle feci valori così elevati di eterofermentanti, da quando la determinazione è stata introdotta nelle prove di filiera agro-zoo-casearie,. I maggiori valori, osservati negli anni '90, erano dell'ordine di 104.

Silomais innovativo: caratteristiche microbiologiche del latte		Silomais Innovativo: caratteristiche chimico fisiche del latte.	
Variabili	Media $\pm$ d.s.	Variabili	Media $\pm$ d.s..
Latte		Latte	
Cbs (ufc/ml)/10 ³	22 $\pm$ 26	Grasso (%)	3,9 $\pm$ 0,1
Coliformi (ufc/ml)	147 $\pm$ 265	Proteine (%)	3,4 $\pm$ 0,1
Spore ¹ (MPN/L)	17 $\pm$ 9	Lattosio (%)	4,9 $\pm$ 0,0
Spore (n. camp.< 20 MPN/L)	12	Res. secco (%)	13,0 $\pm$ 0,1
Lattici (ufc/ml)	333 $\pm$ 390	Cellule (/10 ³)	276 $\pm$ 49
Valori (n)	18	LDG - r (mm)	19 $\pm$ 1
⁽¹⁾ Valori inferiori a 20 Spore (MPN/L) sono stati ridotti di 1/3 e considerati pari a 13 (MPN/L) .		LDG - K ₂₀ (mm)	8 $\pm$ 1
		LDG - A ₃₀ (mm)	22 $\pm$ 2
		Valori (n)	18

Tabella 35. S-INN, caratteristiche microbiologiche del latte

Tabella 36. S-INN, caratteristiche chimiche del latte

Le caratteristiche qualitative microbiologiche del latte indicano valori molto bassi per Cbs (22 ufc/ml), Coliformi (147 ufc/ml), spore (12 campioni su 18 con valori < 20 MPN spore/L).

La composizione chimico-fisica (tab. 36) indica tenori del 3,9% di grasso, 3,4% di proteine, 276.000 cellule, valori questi che indicano una matrice secreta di ottima qualità chimico-fisica e sanitaria.

3.3 Lattiero-caseario

3.3.1 Modulo 1° – Il Silomais Standard (S-STD)

Il latte della munta della sera e del mattino a 8-10 °C è stato trasportato con camion cisterna nell'affioratore del caseificio ERSAL al pomeriggio, verso le ore 15,30.

Il mattino successivo, alle 9,00 circa, prima il latte scremato, denominato latte di caldaia, e poi la crema d'affioramento sono stati convogliati rispettivamente in 2 caldaie da 500 kg ciascuna e nel serbatoio frigo della crema.

In tabella 37 sono riportate le caratteristiche microbiologiche di queste due matrici.

La tabella 38, con latte di caldaia a G/C alto, ossia con poca crema affiorata, mostra una leggera minore capacità di debatterizzazione sia per Cbs (24 vs 7 ufc/ml), sia per i coliformi (493 vs 171).

Silomais standard: principali caratteristiche microbiologiche del latte di caldaia dopo affioramento e della crema			
Variabili	G/C		Media ± d.s.
	Alto	Basso	
Latte caldaia			
Cbs (ufc/ml)/10 ³	24 ± 15	7 ± 8	15 ± 15
Coliformi (ufc/ml)	493 ± 244	171 ± 246	318 ± 290
Spore ¹ (MPN/L)	20 ± 0	22 ± 5	21 ± 4
n camp.< 30 MPN/L	10	10	20
Crema			
Cbs (ufc/ml)/10 ⁶	3,0 ± 3,5	0,9 ± 0,8	1,8 ± 2,6
Coliformi (ufc/ml)/10 ³	58 ± 102	44 ± 42	50 ± 73
Spore ¹ (MPN/L)	132 ± 103	86 ± 90	107 ± 97
n camp.< 30 MPN/L	0	5	5
Valori (n)	10	12	22

(1) Valori inferiori a 30 Spore (MPN/L) sono stati ridotti di 1/3 e considerati pari a 20 (MPN/L) .

Silomais standard: caratteristiche chimico-fisiche del latte di caldaia, dopo affioramento naturale e della crema		
Variabili	RAPPORTO G/C	
	Alto	Basso
Latte caldaia		
pH	6,76 ± 0,01	6,75 ± 0,02
Acidità (°SH/2)	3,27 ± 0,07	3,32 ± 0,10
Grasso (%)	2,70 ± 0,06	2,18 ± 0,09
Pg x 0,76 (%)	2,52 ± 0,03	2,52 ± 0,05
Lattosio (%)	4,88 ± 0,03	4,86 ± 0,09
Rapp. G/C	1,07 ± 0,03	0,86 ± 0,03
Res. Secco (%)	11,6 ± 0,06	11,1 ± 0,22
LDG - r (mm)	24 ± 3	23 ± 2
LDG - K ₂₀ (mm)	9 ± 0,5	---
LDG - A ₃₀ (mm)	11 ± 7	12 ± 4
Valori (n)	19	24

Tabella 37 S-STD, caratteristiche microbiologiche del latte di caldaia e della crema di affioramento

Tabella 38. S-STD, caratteristiche chimico-fisiche del latte di caldaia e della crema d'affioramento

Ovviamente, con questi latti paucimicrobici la differenza appare sostanzialmente trascurabile, al contrario di quanto accadeva negli anni '80, inizio anni '90.

Al contrario, la crema affiorata nella tesi ad alto G/C, essendo più concentrata in grasso, diluita con meno latticello, ha evidenziato una tendenziale maggiore presenza di Cbs, Coliformi, Spore e un minore numero di campioni con spore < 30 MPN/L.

Il tenore in spore del latte di caldaia per le tesi a G/C alto e basso, rispettivamente pari a 20 e 22 è invece solo un dato stimato, perché circa il 90% dei campioni avevano valori < 30 spore MPN/L e a questi è stato convenzionalmente stabilito di assegnare un valore pari a 20 spore MPN/L (tab. 37).

Le caratteristiche chimiche dei latti di caldaia a diverso G/C sono riportate in tabella 38.

Il latte caseificato con rapporto G/C alto aveva mediamente il 2,70% di Grasso con il 2,52% di Caseina calcolata; mentre la tesi con rapporto G/C basso aveva solo il 2,18% di grasso con lo stesso tenore di caseina calcolata. Il rapporto G/C nelle due tesi è stato pari rispettivamente a 1,07 e 0,86.

Silomais standard. Caratteristiche chimico-fisiche del siero di fine lavorazione e della crema d'affioramento.			
Variabili	G/C		Media $\pm$ d.s.
	Alto	Basso	
Siero fine lavorazione			
pH	$6,28 \pm 0,01$	$6,27 \pm 0,11$	$6,27 \pm 0,01$
Acidità ($^{\circ}\text{SH}/2$)	$2,91 \pm 0,11$	$3,02 \pm 0,04$	$2,97 \pm 0,10$
Grasso (%)	$0,59 \pm 0,07$	$0,51 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,06$
Proteine (%)	$0,96 \pm 0,02$	$0,96 \pm 0,03$	$0,96 \pm 0,02$
Lattosio (%)	$4,85 \pm 0,04$	$4,81 \pm 0,10$	$4,83 \pm 0,08$
Residuo secco (%)	$7,14 \pm 0,08$	$7,03 \pm 0,12$	$7,08 \pm 0,12$
Valori (n)	19	24	43

Silomias standard: caratteristiche chimiche del siero innesto e della cagliata all'estrazione			
Variabili	LISOZIMA		Media $\pm$ d.s.
	Senza	Con	
Siero innesto			
Acidità ($^{\circ}\text{SH}/2$)	$28,5 \pm 1,6$	$28,6 \pm 1,7$	$28,6 \pm 1,6$
pH	$3,38 \pm 0,04$	$3,38 \pm 0,05$	$3,38 \pm 0,04$
Cagliata estrazione			
pH	$5,93 \pm 0,04$	$5,96 \pm 0,04$	$5,94 \pm 0,04$
Valori (n)	22	21	43

Tabella 39. S-STD, caratteristiche chimico-fisiche del siero di fine lavorazione

Tabella 40. S-STD, pH, acidità del siero innesto e pH della cagliata all'estrazione

Le caratteristiche chimico fisiche del siero cotto di fine lavorazione, riportate in tabella 39, non evidenziano particolari differenze sul tenore in grasso, proteine e residuo secco tra le due tesi ad alto e basso G/C. La caseificazione senza lisozima non ha sostanzialmente migliorato la fermentazione del siero cotto di fine lavorazione: infatti, in accordo con la bibliografia, i 18 ppm di lisozima aggiunti al latte di caldaia non hanno interferito con l'acidità ed il pH del siero innesto e della cagliata all'estrazione (tab. 40).



Figura 70. S-STD, le 2 caldaie da 500 litri ciascuna, impiegate nel solo 1° modulo per le 6 settimane di prova

Figura 71. S-STD, le 2 cagliate in fascera d'acciaio

Figura 72. S-STD, forme in salamoia

In questo primo modulo, giornalmente, sono stati lavorati 490 e 487kg di latte e con l'affioramento sono stati ottenuti 32 e 24kg di crema, rispettivamente per le tesi a G/C basso e alto. Il peso della forma per la tesi a G/C basso è stato inferiore e pari a 37,0 Kg rispetto ai 40,8kg del latte caseificato con G/C alto, corrispondente ad una resa percentuale a 24 ore rispettivamente pari a 8,08 e 8,81 (tab. 41).

Silomais standard: quantità (kg) di latte caseificato, peso delle cagliate e resa in formaggio a 24 h			
Variabili	G/C		Media ± d.s.
	Basso	Alto	
Latte (kg)	490 ± 6	487 ± 2	489 ± 5
Latte caldaia (kg)	458 ± 5	463 ± 2	460 ± 5
Crema affioramento (kg)	32 ± 3	24 ± 2	28 ± 4
Peso forma 24 h (kg)	37,0 ± 0,8	40,8 ± 0,6	38,7 ± 2,0
Resa 24 h (%)	8,08 ± 0,23	8,81 ± 0,12	8,4 ± 0,4
Valori (n)	24	19	43

Silomais standard: parametri tecnologici di caseificazione del latte	
Variabili	Media ± d.s.
Temperatura (°C)	
Latte inizio affioramento	8 ± 0
Ambiente inizio affioramento	16 ± 1
Latte fine affioramento	12 ± 0
Ambiente fine affioramento	16 ± 0
Siero innesto	20 ± 1
Coagulazione latte	34,4 ± 0,1
Cottura cagliata	53,8 ± 0,1
Cagliata all'estrazione	53,7 ± 0,1
Tempi (min)	
Riscaldamento del latte	5 ± 0
Coagulazione	8,1 ± 0,2
Rassodamento	1,0 ± 0,2
Spinatura	4 ± 0
Lavorazione	17,2 ± 0,6
Giacenza cagliata sotto siero	62 ± 4
Giacenza cagliata appesa nel telo	10 ± 0
Caglio	
Titolo (1:IMCU)	1150 ± 0
g-ml/100 kg latte	3,4 ± 0,1
Aggiunto in caldaia (g)	15,6 ± 0,3
Valori (n)	43

Tabella 41. S-STD, peso della crema, della cagliata e resa in formaggio a 24 ore

Tabella 42. S-STD, parametri tecnologici di caseificazione

Il latte posto ad affiorare a 8 °C, in un ambiente di 16 °C, è stato spillato come latte di caldaia, il mattino seguente a 12 °C.

Nelle caldaie della tesi L1 si è aggiunto lisozima nella dose di 1.8 grammi %

La coagulazione avvenuta a 34,4 °C è durata circa 8 minuti e di seguito si sono succedute le fasi di rassodamento, durate circa 1,0 min., e la spinatura durata 4 min..

Alla cottura della cagliata, fatta a 53,8 °C, è seguita la giacenza sotto siero sul fondo della caldaia per 62 min.. La massa caseosa, che all'estrazione aveva ancora una temperatura di 53,7 °C, è rimasta in sospensione sopra la caldaia per altri 10 min. circa al fine di regolarne lo sgrondo.

3.3.2 Modulo 2° - Loiessa Fieno-Silo (L-FS)

Il latte trasportato in caseificio (fig. 72), e posto nell'affiatore (fig. 73), il mattino successivo è stato spillato da una parte, come latte di caldaia e dall'altra come crema d'affioramento naturale.

Confrontando i dati microbiologici si deduce che la sosta per l'affioramento, durante il pomeriggio e la notte, ha determinato un incremento di carica batterica corrispondente a circa 6-7 replicazioni.

Il processo di affioramento ha concentrato nella crema una carica batterica pari a quelle di nuova replicazione e così il latte di caldaia ha mostrato un numero di Cbs pari al latte di partenza (9 x 10³ ufc/ml), ma la crema si è arricchita di 11,1 x 10⁶ ufc/ml di Cbs (tab. 43).



Figura 73. L-FS, serbatoi di raffreddamento e stoccaggio del latte alla stalla.

Figura 74. L-FS, camion dotato di cisterna per il trasporto del latte al caseificio

Figura 75. L-FS, affioratore del latte in secondo piano; bacinella classica in primo piano

Andamenti replicativi meno accentuati, sono stati calcolati per i coliformi che hanno evidenziato nel corso dell'affioramento un numero di replicazioni pari a 5 circa.

Per le spore invece, come atteso, non è stato rilevato alcun aumento del numero più probabile.

Loiessa fieno silo: caratteristiche microbiologiche del latte di caldaia dopo affioramento e della crema.			
Variabili	G/C		Media ± d.s.
	Alto	Basso	
Latte caldaia			
Cbs (ufc/ml)/10 ³	13 ± 6	3 ± 1	9 ± 7
Coliformi (ufc/ml)	55 ± 60	48 ± 39	52 ± 50
Spore ¹ (MPN/L)	14 ± 2	14 ± 2	14 ± 2
n camp.< 20 MPN/L)	8	7	15
Crema			
Cbs (ufc/ml)/10 ⁶	6,3 ± 9,2	16,6 ± 11,5	11,1 ± 11,3
Coliformi (ufc/ml)/10 ³	39 ± 38	61 ± 30	49 ± 35
Spore ¹ (MPN/L)	60 ± 31	50 ± 27	55 ± 29
(n camp.< 20 MPN/L)	0	0	0
Valori (n)	9	8	17
(1)Valori inferiori a 20 Spore (MPN/L) sono stati ridotti di 1/3 e considerati pari a 13 (MPN/L)			

Loiessa fieno silo: caratteristiche chimico fisiche del latte di caldaia e della crema			
Variabili	G/C		Media ± d.s..
	Alto	Basso	
Latte di caldaia			
pH	6,76 ± 0,02	6,75 ± 0,02	6,75 ± 0,02
Acidità (SH/2)	3,36 ± 0,05	3,35 ± 0,05	3,35 ± 0,05
Grasso (%)	2,68 ± 0,13	2,45 ± 0,07	2,57 ± 0,16
Pg x0,76 (%)	2,53 ± 0,02	2,56 ± 0,01	2,54 ± 0,02
Lattosio (%)	4,90 ± 0,02	4,90 ± 0,02	4,90 ± 0,02
Rapp. G/C	1,06 ± 0,05	0,96 ± 0,02	1,01 ± 0,07
Res. secco (%)	11,7 ± 0,1	11,5 ± 0,1	11,6 ± 0,1
LDG - r	23,4 ± 0,9	23,6 ± 0,5	23,5 ± 0,7
LDG - K ₂₀	---	---	---
LDG - A ₃₀	12,4 ± 1,9	12,5 ± 2,2	12,4 ± 2,0
Crema			
Grasso (Schulz; %)	25,9 ± 1,2	19,7 ± 1,7	23,0 ± 3,5
Valori (n)	9	8	17

Tabella 43. L-FS, caratteristiche microbiologiche del latte di caldaia e della crema di affioramento

Tabella 44. L-FS, caratteristiche chimico-fisiche del latte di caldaia e della crema d'affioramento

Anche in questo modulo le tesi con G/C alto hanno evidenziato una leggera maggiore dotazione microbiologica rispetto al latte di caldaia con G/C basso.

Le forme prodotte con G/C alto avevano una percentuale di grasso in caldaia pari al 2,68%; mentre quelle prodotte con G/C basso avevano il 2,45%; entrambe le tesi avevano un tenore di caseina prossimo al 2,54%.

La crema proveniente dalla tesi con latte di caldaia a G/C alto ha evidenziato un maggiore tenore di grasso (25,9%), rispetto alla crema ottenuta dalla tesi con G/C basso più dotata di latticello (19,7%).

Le figure 74-75-76 mostrano le caldaie da 1.000 litri ciascuna impiegate in questa prova e le 4 forme prodotte in continuo per 4 settimane, con la relativo codice di d'identificazione.



Figura 76. L-FS, le 2 caldaie da 1.000 litri ciascuna impiegate nel 2° modulo

Figura 77. L-FS, le 4 cagliate prodotte giornalmente nelle 4 settimane di prova

Figura 78. L-FS, codici identificativi delle forme prodotte nel 2° modulo

Le determinazioni sul siero cotto di fine lavorazione non mostrano differenze tra i 2 rapporti G/C, così come l'andamento del pH dei sieri innesti e delle cagliate all'estrazione nelle forme prodotte con e senza lisozima.

Loiessa fieno silo: caratteristiche chimico-fisiche del siero cotto di fine lavorazione			
Variabili	G/C		Media ± d.s..
	Alto	Basso	
Siero cotto			
pH	6,27 ± 0,02	6,27 ± 0,01	6,27 ± 0,02
Acidità (°SH/2)	2,94 ± 0,04	2,96 ± 0,06	2,95 ± 0,05
Grasso (%)	0,63 ± 0,03	0,61 ± 0,03	0,62 ± 0,03
Proteine (%)	0,97 ± 0,01	0,98 ± 0,02	0,97 ± 0,02
Lattosio (%)	4,88 ± 0,03	4,87 ± 0,02	4,88 ± 0,03
Res. secco (%)	7,2 ± 0,0	7,2 ± 0,0	7,2 ± 0,0
Valori (n)	18	16	34

Loiessa fieno silo: pH e acidità del siero innesto e pH della cagliata all'estrazione			
Variabili	LISOZIMA		Media ± d.s.
	Senza	Con	
Siero innesto			
pH	3,38 ± 0,04	3,39 ± 0,03	3,38 ± 0,04
Acidità (°SH/2)	31,5 ± 1,5	30,9 ± 0,8	31,2 ± 1,2
Cagliata estrazione			
pH	5,93 ± 0,03	5,92 ± 0,04	5,93 ± 0,04
Valori (n)	17	17	34

Tabella 45. L-FS, caratteristiche chimico-fisiche del siero di fine lavorazione

Tabella 46. L-FS, pH, acidità del siero innesto e pH della cagliata all'estrazione

Loiessa fieno silo: quantità (kg) di latte, crema, peso della cagliata e resa in formaggio a 24 h			
Variabili	G/C		Media ± d.s.
	Alto	Basso	
Latte (kg)	955 ± 30	976 ± 53	965 ± 43
Latte caldaia (kg)	900 ± 29	890 ± 51	896 ± 40
Crema affior. (kg)	55 ± 4	86 ± 12	69 ± 18
Peso forma 24 h (kg)	77,9 ± 3,0	74,4 ± 2,1	76,3 ± 3,2
Resa 24 h (%)	8,7 ± 0,2	8,3 ± 0,1	8,5 ± 0,2
Valori (n)	18	16	34

Tabella 47. L-FS, peso della crema, della cagliata e resa in formaggio a 24 ore

Tabella 48. L-FS, parametri tecnologici di caseificazione

Loiessa fieno silo: parametri tecnologici di caseificazione del latte	
Variabili	Media ± d.s.
Temperatura (°C)	
Latte inizio affioramento	10 ± 0
Ambiente inizio affior.	20 ± 1
Latte fine affioramento	12 ± 0
Ambiente fine affior.	19 ± 1
Siero innesto	17 ± 1
Coagulazione latte	34,4 ± 0,0
Cottura cagliata	53,5 ± 0,1
Cagliata all'estrazione	53,4 ± 0,1
Tempi (min)	
Riscaldamento del latte	5 ± 0
Coagulazione	8 ± 0
Rassodamento	0,9 ± 0,2
Spinatura	4,0 ± 0
Lavorazione	17,3 ± 0,6
Cagliata sotto siero	63 ± 4
Cagliata appesa nel telo	10 ± 0
Caglio	
Titolo (1:IMCU)	1150 ± 0
g-ml/100 kg latte	3,2 ± 0,1
Aggiunto in caldaia (g)	29 ± 1
Valori (n)	34

3.3.3 Modulo 3° - Il Silomais Innovativo (S-INN)

Il latte posto nell'affioratore, è stato spillato il mattino successivo. Le caratteristiche del latte magro e della crema sono riportate in tabella 49.

Confrontando da una parte la Cbt del latte di caldaia e quella della crema, rispetto alla Cbt del latte di partenza, i dati indicano che in questo periodo freddo la sosta per l'affioramento, durante il pomeriggio e la notte, ha determinato un incremento di carica batterica di circa 5 volte, corrispondente a circa 2-3 replicazioni.

In questa prova, al contrario di quella del 2° modulo, il processo di affioramento ha concentrato nella crema un numero di cariche batteriche superiore a quelle originatesi dalla moltiplicazione durante la fase di affioramento e questo a causa di temperature del latte e dell'ambiente leggermente inferiori a fine affioramento rispetto al 2° modulo, e così il latte di caldaia ha mostrato un numero di Cbs inferiore al latte di partenza (6×10^3 vs 22×10^3 ufc/ml), ma la crema si è caricata di $1,3 \times 10^6$ ufc/ml di Cbs (tab. 49).

Silomais innovativo: caratteristiche microbiologiche del latte di caldaia dopo affioramento e della crema.			
Variabili	G/C		Media ± d.s.
	Alto	Basso	
Latte caldaia			
Cbs (ufc/ml)/10 ³	6 ± 6	6 ± 7	6 ± 6
Coliformi (ufc/ml)	67 ± 77	17 ± 14	45 ± 63
Spore ¹ (MPN/L)	14 ± 2	14 ± 2	14 ± 2
n camp.<20 MPN/L	9	7	16
Crema			
Cbs (ufc/ml)/10 ⁶	1,9 ± 0,9	0,5 ± 0,3	1,3 ± 1,0
Coliformi (ufc/ml)/10 ³	53 ± 123	5 ± 4	32 ± 93
Spore ¹ (MPN/L)	84 ± 43	44 ± 44	66 ± 47
n camp.<20 MPN/L	1	4	5
Valori (n)	10	8	18
(1)Valori inferiori a 20 Spore (MPN/L) sono stati ridotti di 1/3 e considerati pari a 13 (MPN/L) .			

Tabella 49 S-INN, caratteristiche microbiologiche del latte di caldaia e della crema d'affioramento

Tabella 50. S-INN, caratteristiche chimico-fisiche del latte di caldaia dopo affioramento e della crema

Silomais Innovativo: caratteristiche chimico-fisiche del latte di caldaia dopo affioramento e della crema.			
Variabili	G/C		Media ± d.s..
	Alto	Basso	
Latte di caldaia			
pH	6,83 ± 0,01	6,83 ± 0,01	6,83 ± 0,01
Acidità (°SH/2)	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1
Grasso (%)	2,80 ± 0,11	2,40 ± 0,06	2,62 ± 0,22
Pg x 0,76 (%)	2,59 ± 0,03	2,53 ± 0,06	2,57 ± 0,05
Lattosio (%)	4,96 ± 0,02	4,99 ± 0,04	4,97 ± 0,04
Rapp. G/C	1,08 ± 0,04	0,95 ± 0,03	1,02 ± 0,08
Res. secco (%)	11,9 ± 0,1	11,5 ± 0,1	11,7 ± 0,2
LDG - r (mm)	22,1 ± 1,1	21,8 ± 0,7	21,9 ± 1,0
LDG - K ₂₀ (mm)	---	---	---
LDG - A ₃₀ (mm)	15,5 ± 3,2	16,4 ± 1,6	15,9 ± 2,6
Crema			
Grasso (Schulz; %)	23,7 ± 1,1	20,2 ± 1,0	22,1 ± 2,0
pH	6,80 ± 0,06	6,79 ± 0,04	6,79 ± 0,06
Acidità (°SH/2)	2,5 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2
Valori (n)	10	8	18

Coliformi e spore non si sono sostanzialmente replicati. Come atteso, la crema derivata da latti di caldaia con G/C Alto ha evidenziato Cbs, Coliformi e Spore maggiori rispetto alla corrispondente crema con G/C basso e le determinazioni hanno evidenziato valori rispettivamente a 1,9 vs 0,5 x10⁶ ufc/ml; 53 vs 5 x 10³; e 84 vs 44 MPN/L (tab. 49).

Questo risultato è correlato alla concentrazione di grasso della crema che è risultato pari al 23,7% nel G/C alto e al 20,2% nel G/C basso (tab. 50).



Figura 79. S-INN, cagliata unica ottenuta da 1000 litri di latte circa

Figura 80. S-INN, dopo il taglio con coltello, inizia la divisione della unica grande cagliata di 76-84 kg, in 2 cagliate

Figura 81. S-INN, fase di completamento della divisione in 2 cagliate del peso di 38-42 kg ciascuna

Mediamente in caldaia la tesi a G/C alto ha evidenziato rapporti G/C pari a 1,08 con un tenore di grasso in caldaia del 2,80%; mentre la tesi a G/C Basso ha mantenuto il rapporto G/C su valori di 0,95 con percentuali di grasso in caldaia del 2,40% (tab. 50).



Figura 82. S-INN, fase finale della separazione della cagliata unica in 2 cagliate standard

Figura 83. S-INN, contenitori predisposti, ad inizio prova, per le 4 settimane di prelievi

Figura 84. S-INN, macchina spazzolatrice delle forme in stagionatura

Il siero cotto di fine lavorazione non evidenzia particolari differenze chimico-fisiche tra le 2 tesi a diverso G/C (tab. 51); così pure il pH dei 2 sieri innesti e delle 2 cagliate all'estrazione con e senza lisozima (tab. 52).

Silomais Innovativo: caratteristiche chimico-fisiche del siero cotto di fine lavorazione			
Variabili	G/C		Media ± d.s..
	Alto	Basso	
Siero cotto			
pH	6,14 ± 0,02	6,11 ± 0,03	6,12 ± 0,03
Acidità (°SH/2)	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1
Grasso (%)	0,71 ± 0,03	0,64 ± 0,04	0,68 ± 0,05
Proteine (%)	0,98 ± 0,01	0,96 ± 0,04	0,97 ± 0,03
Lattosio (%)	4,94 ± 0,03	4,98 ± 0,03	4,96 ± 0,03
Res. secco (%)	7,38 ± 0,06	7,33 ± 0,09	7,36 ± 0,07
Valori (n)	20	16	36

Silomais Innovativo: pH e acidità del siero innesto e pH della cagliata all'estrazione.			
Variabili	LISOZIMA		Media ± d.s..
	Senza	Con	
Siero innesto			
pH	3,43 ± 0,05	3,44 ± 0,05	3,43 ± 0,05
Acidità (°SH/2)	29,2 ± 0,9	29,2 ± 1,3	29,2 ± 1,1
Cagliata all'estrazione			
pH	5,80 ± 0,03	5,83 ± 0,03	5,81 ± 0,03
Valori (n)	16	20	36

Tabella 51. S-INN, caratteristiche microbiologiche del siero cotto di fine lavorazione

Tabella 52. S-INN, pH, acidità del siero innesto e pH della cagliata all'estrazione

Con riferimento ai quantitativi di latte caseificato e alle rese in cagliata fresca, la tabella 53 indica che la tesi a G/C alto ha mediamente interessato 986 kg di latte e che da questi sono derivati 929 kg come latte di caldaia magro a rapporto G/C 1,08 e 56,9 kg di crema con il 23,7% di grasso.

La caseificazione a Grana Padano di questi 929 kg di latte, secondo i tempi, le temperature ed il caglio di cui alla tabella 54, ha generato mediamente forme del peso di 82,0 kg dopo 24 h dalla produzione, con una resa del 8,8% .

L'altra tesi a G/C basso ha invece interessato mediamente 1006 kg di latte suddivisi dopo l'affioramento in 916 kg di latte di caldaia magro e 89,6 kg di crema di affioramento con il 20,2% di grasso. La caseificazione dei 916 kg di latte ha prodotto cagliate dal peso di 75,4 kg dopo 24 dalla coagulazione, con una resa del 8,2%.

Silomais Innovativo: quantità (kg) di latte, crema, peso della cagliata e resa in formaggio a 24 h			
Variabili	G/C		Media ± d.s.
	Alto	Basso	
Latte (kg)	986 ± 15	1006 ± 10	995 ± 16
Latte caldaia (kg)	929 ± 16	916 ± 11	923 ± 15
Crema affioramento (kg)	56,9 ± 2,7	89,6 ± 4,5	71,4 ± 16,9
Peso forma 24 h (kg)	82,0 ± 2	75,4 ± 1,9	79,1 ± 3,8
Resa 24 h (%)	8,8 ± 0,2	8,2 ± 0,2	8,6 ± 0,3
Valori (n)	18	16	36

Tabella 53. S-INN, peso della crema, della cagliata e resa in formaggio a 24 ore

Tab. 1. Silomais Innovativo: tempi, temperature e parametri tecnologici di caseificazione del latte.					
Variabili	Media ± d.s.	Variabili	Media ± d.s.	Variabili	Media ± d.s.
Temperatura (°C)		Tempi (min)		Caglio	
Latte inizio affior.	9,78 ± 0,15	Riscaldamento del latte	5 ± 0	Titolo (1:IMCU)	1150 ± 0
Ambiente inizio affior.	20 ± 1,29	Coagulazione	8,12 ± 0,4	g-ml/100 kg latte	3,1 ± 0,2
Latte fine affior.	11,5 ± 0,25	Rassodamento	0,95 ± 0,2	Aggiunto in caldaia (g)	29 ± 1,6
Ambiente fine affior.	18,5 ± 0,62	Spinatura	4 ± 0		
Siero innesto	15 ± 0,8	Lavorazione	17,3 ± 0,6		
Coagulazione latte	34,4 ± 0,07	Cagliata sotto siero	60,6 ± 1,6		
Cottura cagliata	53,4 ± 0,1	Cagliata appesa nel telo	10 ± 0		
Cagliata all'estrazione	53,4 ± 0,11				

Tabella 54. S-INN, parametri tecnologici di caseificazione

La tecnologia di caseificazione di cui alla tabella 54, non è sostanzialmente variata nei 3 moduli di sperimentazione, il lisozima aggiunto nel latte di caldaia per la tesi L1 è sempre stato 1.8 grammi %.

3.4 I difetti del formaggio

3.4.1 Modulo 1° - Il Silomais Standard (S-STD)

L'andamento della maturazione del formaggio Grana Padano controllato agli RX, in questo primo modulo sperimentale è stato particolarmente seguito, soprattutto nei primi 8-10 mesi di stagionatura.

Complessivamente sono state effettuate 76 caseificazioni, di queste, 65 sono state elaborate e considerate ai fini nel presente progetto.

Di queste 65 forme, 43 sono state regolarmente prodotte nei giorni feriali e le relative matrici campionate e valutate.

Sono state pure inserite tra le forme sperimentali in quanto considerate caseificazioni di "supporto", le n. 10 caseificazioni effettuate di sabato (PA49-PA50-PA63-PA64-PA77-PA78-PA91-PA92-PA105-PA106), senza prelievo di campioni, in coincidenza con l'inversione del rapporto G/C e quindi con siero innesto proveniente da siero di fine lavorazione con diverso G/C.

Infine, sono state considerate e assimilate alle ordinarie caseificazioni di prova, anche le n. 12 caseificazioni effettuate nelle giornate festive, senza prelievo di campioni (PA51-PA52-PA65-PA101-PA102-PA66-PA79-PA80-PA93-PA94-PA107-PA108).

Sono state invece escluse dalla valutazione ai fini del presente progetto, ovviamente, le prime n. 4 caseificazioni (PA41-PA42-PA83-PA84), prodotte con siero innesto di provenienza esterna, contenente lisozima e altre n. 9 forme (PA59-PA60-PA61-PA62-PA70-PA71-PA72-PA73-PA74), prodotte con 0,15-0,30% di additivo (un supporto alimentare per i batteri lattici) non ammesso dal Consorzio del Grana Padano durante 2 brevi periodi nei quali il siero innesto aveva difficoltà ad acidificare.

La prima valutazione RX è stata fatta dopo quasi 2 mesi dalla produzione e rispetto alle 65 forme prodotte, solo 4 forme di cui 2 forme L0 (senza lisozima) e 2 L1 (con lisozima), avevano mostrato un 5-10% di area corticale della forma interessata da micro occhiatura (di 2-4 mm).

La seconda valutazione RX, fatta dopo 4 mesi di stagionatura evidenziava, sempre sulle 65 forme complessive, 7 forme L0 con difetti di micro occhiatura e n. 3 forme con occhi di 10-12 mm; mentre 4 forme con lisozima (L1) avevano solo una micro occhiatura che ha interessato un'area pari fino al 30% della forma.

Silomais standard. Formaggio scelto commerciale (%) a 6,5 - 7,5 mesi di stagionatura, ossia formaggio che agli RX non presentava alcuna fermentazione gasogena, oppure presentava lievissimi difetti di cui ai punti (a), (b), (c), (d), presenti però singolarmente all'interno della forma.								
Variabili	Lisozima		G/C		L0	L1	L0	L1
	L0 (senza)	L1 (con)	Basso	Alto	G/C Basso	G/C Basso	G/C Alto	G/C Alto
Formaggio scelto commerciale (%)	88	97	92	93	89	94	93	100
Difetti riscontrati all'interno della forma (%)								
Nessuna fermentazione gasogena	64	85	78	69	72	83	52	86
Micro-occhiatura (≤ 2 mm)								
^(a) Zona limitata, spesso periferica	18	6	8	17	11	6	27	7
Zona diffusa (≤ 50 %)		3	3			6		
Zona molto diffusa (≥ 50 %)								
Occhiatura (n. 1 $\leq$ n. 3 occhi)								
^(b) 2-5 mm		3		3				7
6-20 mm	6		3	3	6		7	
21-35 mm								
Occhiatura più diffusa ($\geq$ n. 3 occhi)								
2-5 mm								
6-20 mm	6		3	3	6		7	
21-35 mm								
Tagli e strappi								
^(c) Uno o pochissimi piccoli tagli	6		3	3	6		7	
^(d) Alcuni piccoli tagli e strappi		3	3			6		
Tagli e strappi diffusi								
Forme osservate (n)	33	32	36	29	18	18	15	14
Valutazione espressa su 65 forme, ossia: a) n. 43 forme compionate regolarmente; b) n. 12 forme prodotte di domenica e nel giorno del santo patrono, senza prelievo dei campioni, ma forme assimilabili alle ordinarie forme di prova; c) n. 10 forme prodotte di sabato nel giorno della inversione del rapporto G/C con uso di siero innesto con diverso rapp. G/C. Non sono state considerate le prime n. 4 forme prodotte con siero esterno contenente lisozima e le n. 9 forme prodotte con additivo non ammesso dal Consorzio del GP.								

Tabella 55. Valutazione RX delle forme di Grana Padano dopo 7 mesi circa di stagionatura

La terza valutazione RX, riportata in tabella 55, fatta dopo 6,5-7,5 mesi di stagionatura, evidenzia in dettaglio il tipo di difetto riscontrato.

Così ad esempio, sulle 33 forme prodotte senza lisozima, a fronte di un 64% di forme senza alcun difetto fermentativo visibile agli RX, è stato riscontrato anche un 18% di forme con una limitata zona periferica con micro occhiatura e un 6% di forme con uno o pochissimi piccoli tagli per un totale pari a 88% di forme che potrebbero essere ragionevolmente considerate forme scelte dal punto di vista commerciale.

Rimangono escluse dal gruppo delle forme scelto commerciale, secondo questa classifica, un 6% di forme con meno di 3 occhi di dimensioni fino a 20 mm che per altro non comprometterebbero gravemente la qualità dell'intera forma di Grana Padano ed un altro 6% di forme, con difetto più grave, aventi più di 3 occhi fermentativi di dimensioni fino a 20 mm.

Tra le forme prodotte senza lisozima, la tesi a G/C basso, ha espresso la più alta percentuale di forme senza difetti fermentativi, 72 vs 52% con G/C alto.

Le 32 forme invece prodotte con 18 ppm di lisozima (L1), hanno mostrato un 84% di formaggio senza alcuna fermentazione gasogena agli RX, un 6% ed un 3% di forme rispettivamente con micro occhiatura limitata e periferica fino al 50% di formaggio interessato; un 3% di forme con fino a 3 occhi di dimensioni di 2-5 mm ed un altro 3% con alcuni piccoli tagli e strappi.

La valutazione definitiva a 16-17 mesi, dopo circa 10 mesi rispetto alla valutazione di tabella 55, mostra un lieve peggioramento del difetto fermentativo quasi esclusivamente riscontrato nella tesi L0 (Tab.56).

Dal 64% di forme senza difetto fermentativo a 6,5-7,5 mesi di maturazione si è passati al 55% di forme senza alcun difetto RX, dopo 16-17 mesi di stagionatura.

Dal confronto tra tab. 55 e tab. 56 si nota che per le forme senza lisozima i difetti si sono spostati verso i tagli e gli strappi.

Per certi aspetti anche le forme prodotte con lisozima hanno mostrato questa stessa tendenza verso tagli e strappi del sottocrosta.

I tecnici caseari ERSAF spiegano una parte di questi difetti come conseguenza di una non corretta regolazione del nuovo sistema di ventilazione del magazzino del formaggio, che tenderebbe ad asciugare eccessivamente la crosta e favorire quindi il distacco dal sottocrosta.

Silomais standard. Formaggio scelto commerciale (%) dopo 16-17 mesi di stagionatura, ossia formaggio che agli RX non presentava alcuna fermentazione gasogena, oppure presentava lievissimi difetti di cui ai punti (a), (b), (c), (d) presenti però singolarmente all'interno della forma. Non sono stati considerati i difetti di crosta, per altro, sostanzialmente assenti.								
Variabili	Lisozima		G/C		L0	L1	L0	L1
	L0 (senza)	L1 (con)	Basso	Alto	G/C Basso	G/C Basso	G/C Alto	G/C Alto
Formaggio scelto commerciale (%)	79	94	86	86	83	89	73	100
Forme senza difetto								
Nessuna fermentazione gasogena	55	78	72	59	67	78	40	79
Micro-occhiatura (≤ 2 mm)								
(a) Zona limitata, spesso periferica	12	6	6	14	6	6	20	7
Zona diffusa (≤ 50 %)		3	3			6		
Zona molto diffusa (≥ 50 %)								
Occhiatura (n. 1 $\leq$ n. 3 occhi)								
(b) 2-5 mm		3		3				7
6-20 mm	3							
21-35 mm								
Occhiatura più diffusa ($\geq$ n. 3 occhi)								
2-5 mm								
6-20 mm	6		6		11			
21-35 mm	3			3			7	
Tagli e strappi								
(c) Uno o pochissimi piccoli tagli	3			3			7	
(d) Alcuni piccoli tagli e strappi preval. sottopiatto	9	6	8	7	11	6	7	7
Tagli e strappi diffusi prevalent. nel sottopiatto	9	3	6	10	6	6	20	
Forme osservate (n)	33	32	36	29	18	18	15	14
Valutazione espressa sulle stesse 65 forme di cui alla tabella precedente								

Tabella 56. S-INN, Valutazione RX delle forme di Grana Padano dopo 16-17 mesi di stagionatura

Pur con queste ed altre valutazioni che saranno approfondite nella discussione, la percentuale di formaggio Grana Padano scelto commerciale prodotto senza lisozima secondo i criteri di tabella 56 è stata del 79% di cui 83% con G/C basso e 73% con G/C alto. Il formaggio scelto commerciale prodotto con lisozima è risultato pari al 94% con valori del 89% con G/C basso e 100% con G/C alto.



Figura 85. S-STD, forma PA 45, dopo 4 mesi di stagionatura, senza lisozima con gravi difetti fermentativi,

Figura 86. S-STD, stessa forma PA 45 dopo 16 mesi di stagionatura senza lisozima, con G/C alto.

Figura 87. S-STD, forma PA 46, prodotta con lo stesso latte della forma PA 45, ma con 18 ppm di lisozima

La figura 83 mostra una foto scattata in fase d'analisi RX sulla forma PA 45 a 4 mesi di stagionatura e prodotta nei primi giorni di caseificazione. La figura di fianco riporta la stessa forma tagliata a maturazione di 16 mesi per l'analisi genomica e l'individuazione dei microrganismi responsabili del danno fermentativo.

Tutte le altre forme, PA 99 - PA 100; PA 107 - PA 108; PA 47 - PA 48; PA 111 - PA 112 prodotte rispettivamente senza lisozima (forme dispari) e con lisozima (forme pari) pur essendo le peggiori forme per difetto fermentativo, con il taglio al centro si sono presentate come nelle figure qui sotto riportate.

Ovviamente, operando sezioni successive spesse circa 2 cm, con filo d'acciaio, sarebbe stato possibile intercettare quei 2-3 difetti d'occhiatura di 6-20 mm che oggettivamente sarebbero di difficile classificazione commerciale.



Figura 88. S-STD, forma PA 99 senza lisozima e rapp. G/C alto, sostanzialmente senza difetti fermentativi butirrici

Figura 89. S-STD, forma PA 100 prodotta con lo stesso latte della forma PA 99, ma con 18 ppm di lisozima

Figura 90. S-STD, forma PA 107 senza lisozima e con rapp. G/C basso, con leggerissimi difetti fermentativi

Figura 91. S-STD, forma PA 108 prodotta con lo stesso latte della forma PA 107, ma con 18 ppm di lisozima



Figura 92. S-STD, forma PA 47 senza lisozima, con rapp. G/C alto, con lievissimi strappi centro-laterali

Figura 93. S-STD, forma PA 48 prodotta con lo stesso latte della forma PA 47, ma con 18 ppm di lisozima

Figura 94. S-STD, forma PA 111 senza lisozima, con rapp. G/C basso, senza difetti fermentativi

Figura 95. S-STD, forma PA 112 prodotta con lo stesso latte della forma PA 111, ma con 18 ppm di lisozima

3.3.2 Modulo 2° - Loiessa Fieno-Silo

In questo secondo modulo sono state prodotte 100 forme di grana Padano con e senza lisozima, ad alto e basso G/C. Le sole forme che non sono state considerate in questo progetto sono state le prime 4 forme prodotte con siero esterno contenente lisozima.

Loiessa Fieno-silo. Formaggio scelto commerciale (%) a 8-9 mesi di stagionatura, ossia formaggio che agli RX non presentava alcuna fermentazione gasogena, oppure presentava un lievissimo difetto di cui ai punti (a), (b), (c), (d) presente però singolarmente all'interno della forma.								
Variabili	Lisozima		G/C		L0	L1	L0	L1
	L0 (senza)	L1 (con)	Basso	Alto	G/C Basso	G/C Basso	G/C Alto	G/C Alto
Formaggio scelto commerciale (%)	83	96	84	94	77	91	88	100
Difetti riscontrati all'interno della forma (%)								
Nessuna fermentazione gasogena	75	88	80	83	68	91	81	85
Micro-occhiatura (≤ 2 mm)								
^(a) Zona limitata, spesso periferica		2		2				4
Zona diffusa (≤ 50 %)								
Zona molto diffusa (≥ 50 %)								
Occhiatura (n. 1 $\leq$ n. 3 occhi)								
^(b) 2-5 mm	4		2	2	5		4	
6-20 mm	6		5	2	9		4	
21-35 mm	4		5		9			
Occhiatura più diffusa ($\geq$ n. 3 occhi)								
2-5 mm	2	4	5	2		9	4	
6-20 mm								
21-35 mm								
Tagli e strappi								
^(c) Uno o pochissimi piccoli tagli	2	2	2	2	5			4
^(d) Alcuni piccoli tagli e strappi	2	4		6			4	8
Tagli e strappi diffusi	4		2	2	5		4	
Totale forme (n)	48	48	44	52	22	22	26	26
Valutazione espressa su 96 forme, ossia: a) n. 72 forme prodotte e compionate regolarmente lungo la filiera; b) n. 12 forme prodotte di domenica (senza prelievo dei campioni), forme comunque assimilabili alle ordinarie forme di prova; c) n. 12 forme prodotte di sabato nel giorno della inversione del rapporto G/C con impiego di siero non concorde con la tesi. Sono state escluse le prime n. 4 forme prodotte all'inizio della prova con siero esterno contenente lisozima. Tutte le forme sono state prodotte secondo il regolamento del Consorzio del Formaggio Grana Padano (nessun impiego di additivi non ammessi)								

Tabella 57. L-FS, Valutazione RX delle forme di Grana Padano dopo 8-9 mesi circa di stagionatura

Le 96 forme valutate avevano la seguente provenienza: a) n. 72 forme prodotte nei giorni feriali sono state campionate regolarmente; b) n. 12 forme prodotte di domenica (senza prelievo dei campioni), sono state considerate forme comunque assimilabili alle ordinarie forme di prova; c) n. 12 forme prodotte di sabato nel giorno della inversione del rapporto G/C (il siero innesto proveniva da siero con diverso rapp. G/C). Nessuna forma è stata prodotta con additivi non ammessi dal Consorzio del Formaggio Grana Padano.

La 1° valutazione effettuata dopo 2-3 mesi di stagionatura, sulla metà delle forme gemelle, per evidenziare a fine stagionatura eventuali differenze di sviluppo dei clostridi rispetto alle forme non trattate agli RX, ha evidenziato n. 5 forme con difetti fermentativi, di cui n. 4 prodotte con lisozima e caratterizzate da aree di micro-occhiatura variabili dal 10 fino al 50% della forma con occhi di 2-3 mm; e n. 1 forma prodotta senza lisozima con occhiatura diffusa e piccoli tagli.

La 2° valutazione a 8-9 mesi di stagionatura è riportata in dettaglio in tabella 57.

Mediamente a questo stadio di maturazione il formaggio prodotto senza lisozima ha raggiunto il 83 % di scelto commerciale con un 75% di forme senza alcuna fermentazione anomala.

Questo iniziale risultato positivo, è però accompagnato dal fatto che ben il 16% delle 48 forme, ossia 7-8 forme ha evidenziato occhiatura di dimensioni pari a 2-5 mm, ma anche di 21-35 mm.

Sebbene questa occhiatura non sia assolutamente paragonabile a quelle degli anni '80 e successivi, sorge qualche dubbio che la qualità microbiologica della loiessa fieno-silo non sia stata quella ordinaria.

Nonostante il foraggio appassito sia stato ammassato a bassa A_w , e per certi aspetti, eccessivamente bassa per le probabili esigenze di sviluppo dei batteri lattici, il deterioramento aerobico "puntiforme" che si è sviluppato ragionevolmente in trincea, potrebbe aver creato le condizioni ideali per la germinazione delle spore e la moltiplicazione-sporificazione dei clostridi.

Anche quel 10% di tagli e strappi, potrebbero avere avuto origine da questa componente, unitamente al fatto, già ricordato, che il sistema di condizionamento del magazzino appariva eccessivamente "ventilato".

Loiessa Fieno-silo. Forme a 8-9 mesi di stagionatura (%) stimate scelte dal punto di vista commerciale (scelto, zero, uno), ossia, forme senza difetti fermentativi o con limitata micro-occhiatura soprattutto periferica o con max 3 occhi ? 5 mm o con pochissimi tagli o alcuni piccoli tagli e strappi. Confronti tra: a) totale delle forme prodotte; b) sole forme prodotte con il latte munto da lun pom a ven matt., ossia nella settimana lavorativa "centrale"; c) sole forme prodotte con il latte munto nel fine settimana da ven. pom a lun. matt., quando per turno di riposo il personale scendeva da 3 a 2 unità.								
Formaggio scelto commerciale	Lisozima		G/C		L0	L1	L0	L1
	L0	L1	Basso	Alto	G/C Basso	G/C Basso	G/C Alto	G/C Alto
Totale caseificazioni	83	96	84	94	77	91	88	100
Caseificazioni di mer., gio., ven., sab.	93	100	94	100	88	100	100	100
Caseificazioni di dom., lun., mar.	67	100	75	88	50	100	83	100
Valutazione espressa sulle stesse 96 forme della tabella precedente								

Tabella 58. L-FS, Valutazione RX delle forme in funzione del riposo settimanale degli addetti

Con riferimento invece al ruolo del turno di riposo settimanale sulla qualità degli interventi igienici generali: stalla, cuccette, mungitura, la tabella 58 sembra indicare che, nei giorni del fine settimana, con personale in riposo settimanale (da 3 unità si passava a 2), le operazioni igieniche probabilmente erano più "sbrigative", ad esempio la ruspetta passava una volta in meno, forse il rifacimento delle cuccette non era curato o non era rifatto 2 volte al giorno, come nei giorni feriali.

Se infatti si distinguono le caseificazioni fatte con latte munto in presenza di personale di stalla al completo, rispetto ai giorni con personale ridotto, la percentuale di formaggio scelto commerciale prodotto senza lisozima cala rispettivamente dal 93 al 67% ed in particolare per il G/C basso dal 88 al 50% e per G/C alto dal 100 al 83% (tab. 58).

3.3.3 Modulo 3° - Il Silomais Innovativo

La valutazione dei difetti fermentativi è stata fatta su 96 forme gemelle, di cui:

- a) n. 72 forme prodotte e campionate regolarmente nei giorni feriali;
- b) n. 12 forme prodotte di domenica, senza prelievo dei campioni, ma forme assimilabili alle ordinarie forme di prova;
- c) n. 12 forme uguali a quelle prodotte di domenica, ma con impiego di siero innesto proveniente da tesi con diverso rapporto G/C.

Non sono state considerate le n. 4 forme prodotte ad inizio prova, con siero innesto esterno, contenente lisozima. Nessuna forma è stata prodotta con additivo vietato dal Consorzio del Grana Padano.

La prima valutazione RX effettuata dopo 3-4 mesi di stagionatura, ha subito evidenziato dei problemi fermentativi sulle 96 forme di Grana Padano prodotte nelle 4 settimane di caseificazione (48 forme senza lisozima e 48 forme con lisozima).

Mediamente il formaggio scelto commerciale era già sceso dopo pochi mesi di stagionatura al 73 e 77% rispettivamente per caseificazioni senza (L0) e con (L1) lisozima.

Nella tesi senza lisozima, le forme senza difetti fermentativi non hanno superato il 40%; mentre nella tesi con lisozima sono risultate addirittura inferiori e pari al 35%.

Le altre forme senza lisozima, ma con difetti, hanno evidenziato un 35% circa di forme con problemi di micro-occhiatura che arrivava a superare anche il 50% della forma in alcuni casi; un altro 25% circa aveva difetti di occhiatura prevalentemente di 2-5 mm ed un 5% circa presentava uno o alcuni piccoli tagli e strappi.

Invece nella tesi con lisozima, le altre forme con difetto fermentativo erano per il 45% forme con micro-occhiatura, soprattutto localizzata, quasi mai diffusa su oltre la metà della forma; altre forme pari a circa il 15% aveva danni da occhiatura fino a 2-5 mm ed infine un 5% circa presentava alcuni tagli e strappi.

Silomais Innovativo. Formaggio scelto commerciale (%) dopo 6-7 mesi di stagionatura, ossia formaggio che agli Rx non presentava alcuna fermentazione gasogena visibile, oppure presentava un lievissimo difetto di cui ai punti (a), (b), (c), (d) presente all'interno della forma molto spesso singolarmente, ma non esclusivamente. Non sono state considerate le forme con difetto di crosta								
Variabili	Lisozima		G/C		L0 G/C Basso	L1 G/C Basso	L0 G/C Alto	L1 G/C Alto
	L0 (sen- na)	L1 (con)	Basso	Alto				
Formaggio scelto commerciale (%)	63	79	70	71	60	80	64	79
Difetti riscontrati all'interno della forma (%)								
Nessuna fermentazione gasogena	19	29	15	30		30	32	29
Micro-occhiatura (≤ 2 mm)								
^(a) Zona limitata, spesso periferica	21	31	33	21	25	40	18	25
Zona diffusa (≤ 50 %)	6	4	5	5	5	5	7	4
Zona molto diffusa (≥ 50 %)	4			4			7	
Occhiatura (n. 1 $\leq$ n. 3 occhi)								
^(b) 2-5 mm	4	4	5	4	10			7
6-20 mm	8		8	2	15		4	
21-35 mm								
Occhiatura più diffusa ($\geq$ n. 3 occhi)								
2-5 mm	8	17	10	14	5	15	11	18
6-20 mm	2		3		5			
21-35 mm								
Tagli e strappi								
^(c) Uno o pochissimi piccoli tagli	2	2		4			4	4
^(d) Alcuni piccoli tagli e strappi	17	13	18	13	25	10	21	14
Tagli e strappi diffusi	8		5	4	10		7	
Totale forme osservate (n)	48	48	40	56	20	20	28	28
Valutazione espressa su 96 forme, ossia: a) n. 72 forme compionate regolarmente; b) n. 12 forme prodotte di domenica (senza prelievo dei campioni), forme comunque assimilabili alle ordinarie forme di prova; c) n. 12 forme prodotte di sabato nel giorno della inversione del rapporto G/C (il siero innesto proveniva da siero con diverso rapp. G/C). Sono state escluse le n. 4 forme prodotte all'inizio della prova con siero esterno contenente lisozima. Nessuna forma è stata prodotta con additivi non ammessi dal Consorzio del Formaggio Grana Padano.								

Tabella 59. S-INN, valutazioni RX del formaggio Grana Padano dopo 6-7 mesi di stagionatura

Nel secondo controllo RX effettuato a 6-7 mesi di stagionatura, i cui risultati sono riportati in tabella 59, si evidenzia un peggioramento della situazione generale, con classifica di formaggio scelto commerciale al 63% senza lisozima (L0) e 79% con lisozima (L1).

Le forme senza lisozima e senza difetti fermentativi sono scese al 19%; mentre quelle con lisozima e senza difetti fermentativi si sono attestate sul 29%, valori questi piuttosto scarsi in ambito commerciale.

Le forme senza lisozima con difetti avevano un 31% di micro-occhiatura prevalente su limitata zona; un 23% soprattutto di occhiatura limitata a zone e di 2-5 mm, con qualche forma con occhiatura fino a 10 mm e leggermente più diffusa e infine un 27% di forme con alcuni piccoli tagli e strappi, in qualche caso anche diffusi. Le forme con lisozima con difetti invece, presentavano micro-occhiatura e occhiatura molto prossima alle forme senza lisozima, ma una minore percentuale di difetti di tagli e strappi.

E da evidenziare che in questo modulo, indipendentemente dalla presenza o meno del lisozima, si sono registrati un 40% circa di gravi difetti di crosta (sia piatto che scalzo) mai riscontrati prima; si ipotizza che questo tipo di latte abbia significativamente ridotto la capacità di spurgo delle cagliate.

Nella tabella 60 che segue, si nota una interessante correlazione tra la media del numero di batteri lattici etero fermentanti misurati nelle feci dei rispettivi tre moduli e il riscontro fermentativo (difetto) nelle forme prodotte.

Batteri lattici eterofermentanti nelle feci MPN/grammo			
Tesi	S-STD	L-FS	S-INN
Periodo	05-06-12	6-11-12	11-02-13
	13-07-12	30-11-12	08-03-13
Sett. 1	10.500	220.000	541.000
Sett. 2	8.770	1.476.667	2.531.667
Sett. 3	385.837	3.073.333	4.835.000
Sett. 4	11.383	2.315.000	8.821.667
Sett. 5	3.006	-----	-----
Sett. 6	23.867	-----	-----
MEDIA	73.894	1.771.250	4.182.333

% forme con difetto fermentativo da etero fermentanti			
LO	5,1	8,0	44,0
L1	7,7	12,0	56,0

Tabella 60. Correlazione tra etero fermentanti nelle feci e difetto fermentativo.

3.5 L'analisi sensoriale

3.5.1 Modulo 1° – Il Silomais Standard (S-STD)

Dopo 9 mesi di stagionatura sono state tagliate le prime 4 forme L0-G/C1; L0-G/C2; L1-G/C2; L1-G/C2, senza difetti, per il test triangolare.

Il metodo triangolare (ISO 4120:2004) è un procedimento che consente di determinare se non si percepisce una differenza tra i due formaggi prodotti con o senza lisozima.

Sono stati presentati ai giudici una terna di bastoncini di grana informandoli che uno dei tre era diverso e chiedendo loro di identificarlo.

Il numero dei giudici è stato scelto in base al livello di sensibilità desiderato per la prova. Quando si vuole dimostrare una similitudine, per un certo livello di sensibilità del metodo, si raddoppia il numero di giudici, rispetto all'obiettivo di dimostrare una differenza.

Sulle forme di grana sono state eseguite le seguenti operazioni:

- segnato il centro della forma con un coltello per incidere la crosta;
- posta la dima del grana al centro della forma;
- segnati i quattro parallelepipedi a base quadrata, con lato di 8-10cm (fig. 97);
- tagliati con macchina sezionatrice (fig. 98).

Da ciascun mezzo parallelepipedo, sono stati tagliati con la macchina sezionatrice dei bastoncini di circa 1,5cm di lato di base e di 8cm d'altezza, ponendo di nuovo la dima sulla faccia quadrata del mezzo parallelepipedo. I campioni sono stati preparati fuori dal campo visivo dei giudici e tutti nello stesso modo: stesso sistema di preparazione, stessi contenitori (scatole di plastica salva aroma), stesse quantità di prodotto (un bastoncino), stessa temperatura di servizio (16°C).

I contenitori dei campioni in esame sono stati contrassegnati da un codice numerico di tre cifre scelte a caso. Ogni giudice ha ricevuto una terna di contenitori, di cui due contenevano il campione X o Y e la terza il campione Y o X. Ciascun giudice ha ricevuto una delle sei possibili sequenze di presentazione: YXX, XYX, XXY, XYY, YXY e YYX, che sono state ripetute lo stesso numero di volte e assegnate ai giudici in modo casuale.



Figura 96. S-STD, in alto PA 75 e PA 53 senza lisozima; in basso PA 76 e PA 54 con lisozima, per il test triangolare

Figura 97. S-STD, forma “disegnata” pronta per il taglio con il filo per ottenere 4 parallelepipedi impiegati nel test

Figura 98. S-STD, forme esposte all’aria per valutare eventuali differenze di stabilità all’ossigeno

Per l’analisi dei dati, è stato calcolato il numero di risposte di individuazione del campione diverso nella terna e queste sono state confrontate con il prospetto, contenuto nel metodo triangolare (ISO 4120:2004), da utilizzare per determinare una similitudine. Se il numero di risposte fosse stato minore o uguale al numero riportato nel prospetto si poteva concludere che non esisteva una differenza significativa tra i campioni.

Questo numero corrisponde a 24 per un numero di giudici addestrati di 53.



Figura 99. S-STD, forma PA 67 ad alto G/C senza lisozima, a 17 mesi di stagionatura, per il profilo sensoriale

Figura 100. S-STD, forma PA 68, prodotta con lo stesso latte della PA 67, stessa stagionatura, ma con lisozima

Figura 101. S-STD, forma per profilo sensoriale PA 87 a basso G/C, senza lisozima, con oltre 16 mesi di stagionatura

Figura 102. S-STD, forma PA 88, prodotta con lo stesso latte della PA 87, ma con lisozima

Il risultato del test triangolare per PA53 e P54 (basso G/C) non ha evidenziato differenza significativa tra i campioni di formaggio senza lisozima e con lisozima a 9 mesi di stagionatura.

Il risultato per PA75 e P76 (alto G/C), invece, ha evidenziato una differenza significativa tra i campioni di formaggio senza lisozima e con lisozima a 9 mesi di stagionatura.



Figura 103. S-STD, fase di taglio della forma con il filo per fornire campioni spicchio di formaggio ai partner

Figura 104. S-STD, Campioni sottovuoto di forme a 9 mesi con e senza lisozima ad alto e basso G/C per i partner

Figura 105. S-STD, Campioni spicchio sottovuoto di forme a 17 mesi per i partner

Il giorno 11 novembre 2013, altre n. 4 forme di Grana Padano sperimentale, rappresentativo delle 4 tesi, senza difetti fermentativi, con oltre 16 mesi di stagionatura, sono state preparate per l'analisi sensoriale secondo la procedura utilizzata per la realizzazione del profilo sensoriale.

In ogni seduta di analisi sensoriale sono stati esaminati i quattro campioni di Grana Padano, valutati mediante la scheda messa a punto nello studio del profilo sensoriale e composta di quindici descrittori: odore di silomais, odore di panna, odore di crosta, dolce, salato, piccante, durezza, deformabilità, elasticità, friabilità, adesività, solubilità, aroma di silomais, aroma di panna, aroma di crosta (ISO 13299:2003 Analisi sensoriale – Metodologia – Guida generale per la definizione del profilo sensoriale).

La valutazione di ciascun campione è stata ripetuta tre volte, in giorni diversi, per un totale di tre sedute. L'analisi dei dati ha permesso di evidenziare che otto descrittori sensoriali, contenuti nella scheda di profilo sensoriale di Grana Padano, sono stati utili per differenziare le forme sperimentali esaminate (Fig. 106).

Si osserva una prima separazione tra i campioni rispetto al rapporto grasso/caseina e una seconda rispetto alla presenza/assenza di lisozima.

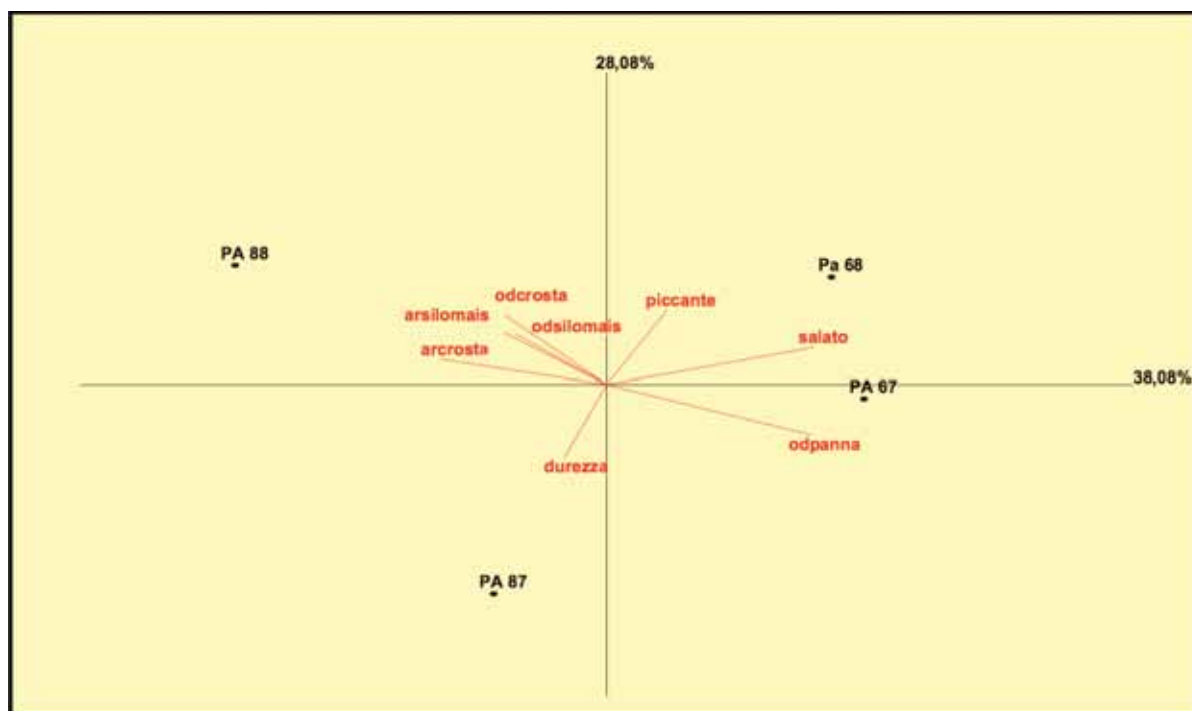


Figura 106. S-STD, posizionamento delle forme in direzione dei descrittori significativi ($p < 0,05$ – $p < 0,001$)

I descrittori che agiscono, nel primo caso, sono odore panna, salato, aroma crosta, odore/aroma silo mais; nel secondo caso, piccante, durezza e odore crosta.

Si tratta di lievi differenze come si rileva dall'entità della minima differenza significativa: 0,2-0,4 punti di intensità dei descrittori significativi.

In altro modo si può ragionevolmente affermare che le forme con G/C alto e con lisozima sono apparse con più odore di panna e piccanti; mentre quelle con G/C alto e senza lisozima sono apparse ai giudici con più odore di panna e dure.

Le forme con G/C basso e con lisozima sono risultate con aroma di crosta, aroma e odore di silomais e piccanti; mentre quelle con G/C basso e senza lisozima hanno evidenziato gli stessi aromi e odori, ma con una consistenza maggiore.

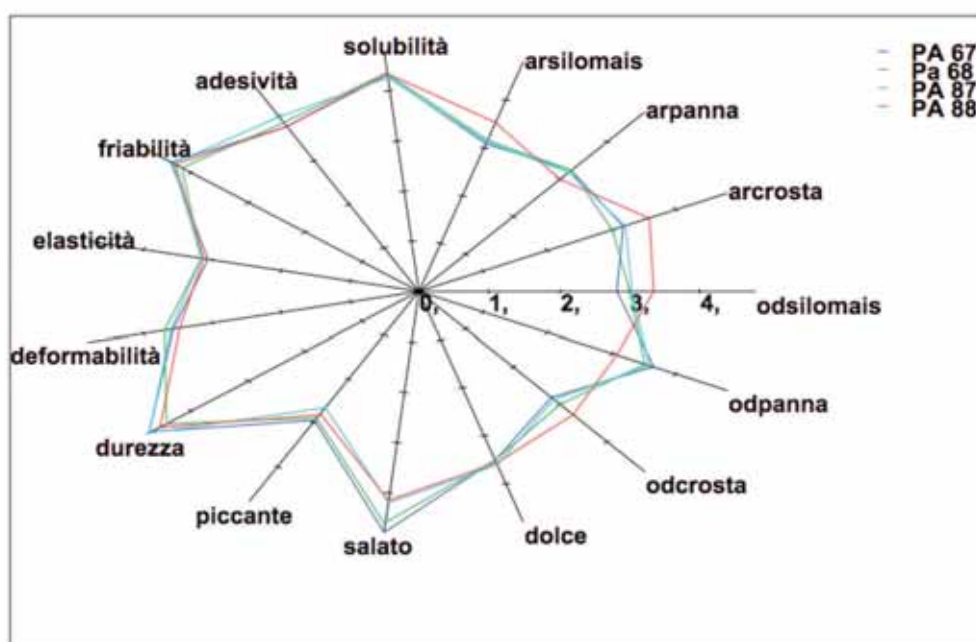


Figura 107. S-STD, profilo sensoriale delle 4 forme con oltre 16 mesi di stagionatura

3.4.2 Modulo 2° - Loiessa Fieno-Silo

Analogamente a quanto descritto nel punto 3.4.1., dopo circa 9 mesi di stagionatura è stato attuato il 2° step del test triangolare e altre 4 forme di Grana Padano: L0-G/C1; L0-G/C2; L1-G/C2; L1-G/C2, senza difetti, prodotte con loiessa fieno silo, sono state tagliate (fig. 101-102-103-104).



Figura 108. L-FS, forma PA 159 senza lisozima a basso G/C, a 9,5 mesi di stagionatura tagliata per il test

Figura 109. L-FS, forma PA 162 con lisozima a basso G/C, prodotta con lo stesso latte della forma PA 159

Figura 110. L-FS, forma PA 183 senza lisozima ad alto G/C, a 9,5 mesi di stagionatura tagliata per il test

Figura 111. L-FS, forma PA 184 con lisozima ad alto G/C, prodotta con lo stesso latte della forma PA 183

Il formaggio per il test è stato preparato fuori dal campo visivo dei giudici e tutti i campioni sono stati trattati allo stesso modo: stesso sistema di preparazione, stessi contenitori (scatole di plastica salvaroma), stesse quantità di prodotto (un bastoncino), stessa temperatura di servizio (16°C).

Nella figura 112 si evidenziano i campioni di formaggio a 9 mesi forniti ai partner; mentre le figure 113-114-115 sono relative ad alcuni momenti operativi di preparazione dei bastoncini di formaggio da sottoporre ai giudici.



Figura 112. L-FS, campioni spicchio di forme a 9 mesi consegnate ai partner

Figura 113. L-FS, parallelepipedi di formaggio a base quadrata con lato 8-10 cm

Figura 114. L-FS, da mezzo parallelepipedo si preparano dei bastoncini di lato 1,5 cm e altezza pari a 8 cm

Figura 115. L-FS, bastoncini di formaggio a 9 mesi di stagionatura da impiegare nel test triangolare

I contenitori dei campioni in esame sono contrassegnati da un codice numerico di tre cifre scelte a caso.

Ogni giudice riceve una terna di contenitori, di cui due contengono il campione X o Y e la terza il campione Y o X. Ciascun giudice riceve una delle sei possibili sequenze di presentazione: YXX, XYX, XXY, XYY, YXY e YYX, che sono ripetute lo stesso numero di volte e assegnate ai giudici in modo casuale.

Il risultato offerto dai giudici per la forma 159, ossia forma senza lisozima e con G/C basso vs la forma 162, ossia forma con lisozima e con G/C basso è stato che non esiste una differenza significativa tra i campioni a 9 mesi di stagionatura.

Al contrario per 183, ossia forma senza lisozima, ma con G/C alto vs 184, ossia forma con lisozima e con G/C alto è stato che esiste una differenza significativa tra i campioni a 9 mesi di stagionatura.

Il giorno 5 marzo 2014, altre n. 4 forme di Grana Padano sperimentale, rappresentativo delle 4 tesi, senza difetti fermentativi, con oltre 16 mesi di stagionatura, sono state preparate per l'analisi sensoriale secondo la procedura utilizzata per la realizzazione del profilo sensoriale, descritta per il primo modulo.

L'analisi dei dati ha permesso di evidenziare che cinque descrittori sensoriali, contenuti nella scheda di profilo sensoriale di Grana Padano, sono stati utili per differenziare le forme sperimentali esaminate (Fig.116).

Si osserva che i campioni si separano rispetto al rapporto grasso/caseina e non rispetto alla presenza/assenza di lisozima. I descrittori che agiscono sono dolce, durezza, friabilità, adesività e aroma di panna.

Si tratta di lievi differenze come si rileva dall'entità della minima differenza significativa: 0,3-0,4 punti di intensità dei descrittori significativi.

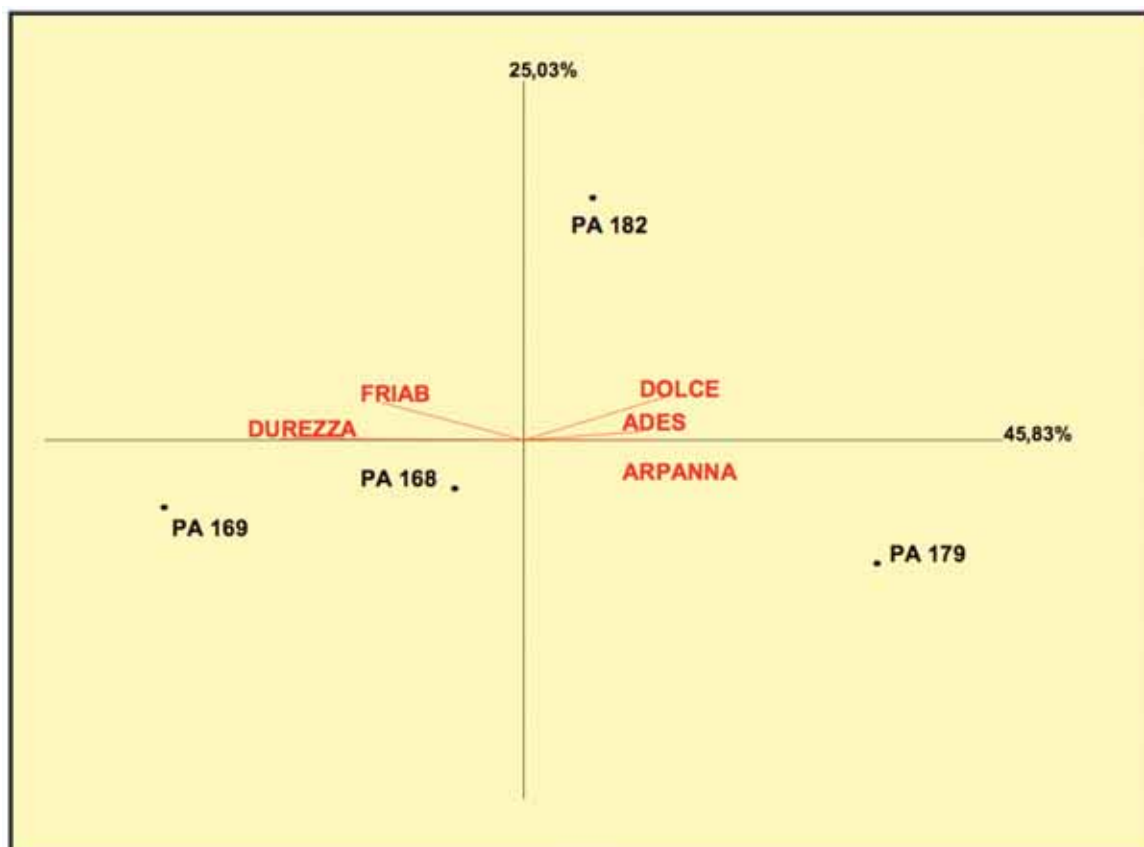


Figura 116. L-FS , posizionamento delle forme in direzione dei descrittori significativi ($p < 0,05$ – $p < 0,001$)

3.4.3 Modulo 3° - Il silomais innovativo

Il test triangolare per il terzo modulo ha dato i seguenti risultati.

Il risultato offerto dai giudici per la forma 93, ossia forma senza lisozima e con G/C basso vs la forma 94, ossia forma con lisozima e con G/C basso è stato che esiste una differenza significativa tra i campioni a 9 mesi di stagionatura.

Al contrario per 61, ossia forma senza lisozima, ma con G/C alto vs 62, ossia forma con lisozima e con G/C alto è stato che non esiste una differenza significativa tra i campioni a 9 mesi di stagionatura.

Il giorno 9 giugno 2014, altre n. 4 forme di Grana Padano sperimentale, rappresentativo delle 4 tesi, senza difetti fermentativi, con oltre 16 mesi di stagionatura, sono state preparate per l'analisi sensoriale secondo la procedura utilizzata per la realizzazione del profilo sensoriale, descritta per il primo modulo.

L'analisi dei dati ha permesso di evidenziare che sette descrittori sensoriali, contenuti nella scheda di profilo sensoriale di Grana Padano, sono stati utili per differenziare le forme sperimentali esaminate (Fig.117).

Si osserva che i campioni si separano rispetto al rapporto grasso/caseina e non rispetto alla presenza/assenza di lisozima. I descrittori che agiscono sono odore panna, salato, durezza, solubilità, aroma di silo mais, aroma di panna e aroma di crosta.

Si tratta di lievi differenze come si rileva dall'entità della minima differenza significativa: 0,2-0,3 punti di intensità dei descrittori significativi.

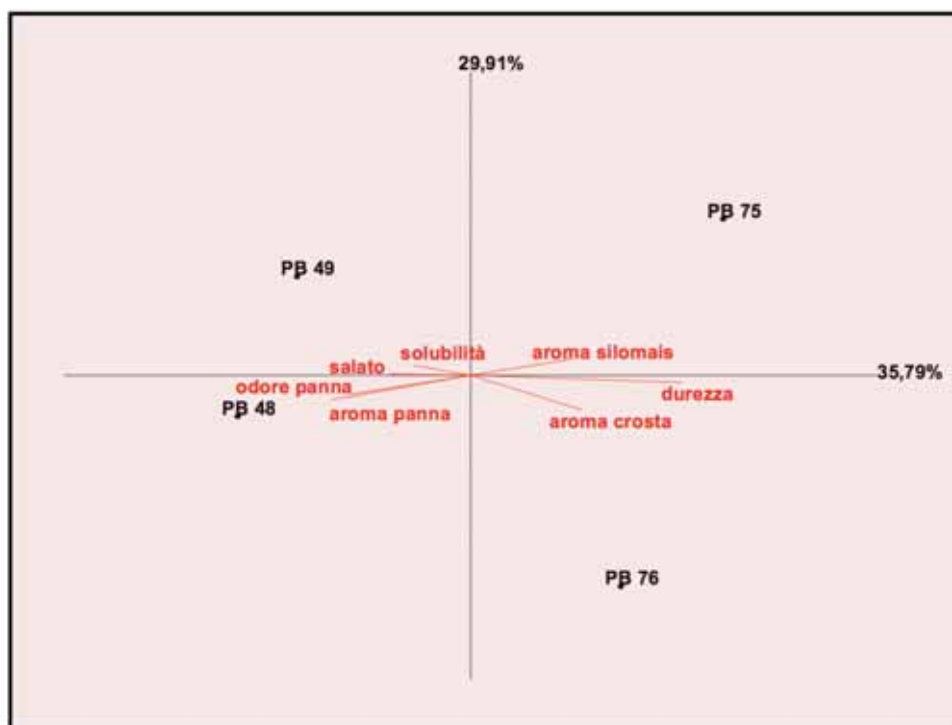


Figura 117. S-INN, posizionamento delle forme in direzione dei descrittori significativi ($p < 0,05$ – $p < 0,001$)

Conclusioni per le parti agronomiche, zootecniche, lattiero-casearie (U.O.ERSAF)

Produrre formaggio Grana Padano senza lisozima potrebbe all'apparenza sembrare impresa facile, valutando che il Parmigiano-Reggiano lo fa da sempre: basterebbe ricondurre l'alimentazione delle vacche da latte a modelli simili a quelli del PR-RE.

La sfida, ovviamente, è stata quella di produrre senza additivi mantenendo quella che è la base della razione delle vacche che producono latte per Grana Padano, cioè l'insilato di mais ceroso o di loiessa fieno-silo. La sperimentazione svolta presso ERSAF di Mantova ha dimostrato che è possibile farlo, ottenendo risultati caseari molto positivi, anche sul piano prettamente commerciale.

La buona riuscita della sperimentazione non è da imputare a singoli fattori, o a particolari espedienti confinati nell'ambito della ricerca ma, ad una serie di attenzioni e ottimizzazioni poste su tutta la filiera *agro-zoo-casearia* della produzione; tali pratiche possono essere applicabili in contesti produttivi (non tutti per ora) dell'area del Grana Padano.

Il ruolo agronomico

Con i recenti miglioramenti attuati nel processo di insilamento-desilamento, di cui al punto 1.1.2, si è rafforzata la convinzione che la massa insilata sia sostanzialmente un cumulo di foraggio omogeneo in tutte le sue parti. Questo convincimento deriva da una visione limitata e di esclusiva valenza chimico-fisica della qualità di un insilato, con una sottovalutazione del ruolo della componente microbiologica fermentativa-conservativa, definita anche "filocasearia", sul latte non pastorizzato destinato a formaggi a lunga stagionatura.

Un punto critico, in tutti gli insilati, è rappresentato da quello strato alto di foraggio che un tempo era definito "cappello".

Il cappello era caratterizzato da uno strato marcescente per i primi 10-20 cm superficiali che veniva scartato e da un secondo strato sottostante "caldo" per altri 40-50 cm, a forte deterioramento aerobico/anaerobico che veniva somministrato indifferente alle vacche da latte e al bestiame d'allevamento.

Con i miglioramenti acquisiti nel management dell'insilamento-desilamento, questa porzione d'insilato ha perso la sua azione negativa di tipo sanitario, mantenendo però un elevato rischio microbiologico anticaseario. Ancora oggi infatti, questa parte alta dell'insilato, sebbene compressa con 150-200 kg/m² con asportazione regolare degli appesantimenti ogni 2-3 giorni, rappresenta uno strato d'insilato ad elevato rischio microbiologico di tipo clostridico o eterofermentativo.

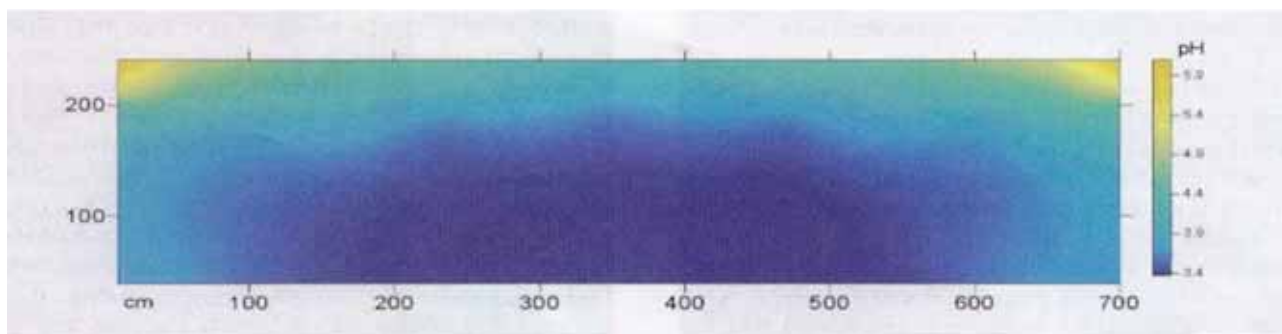
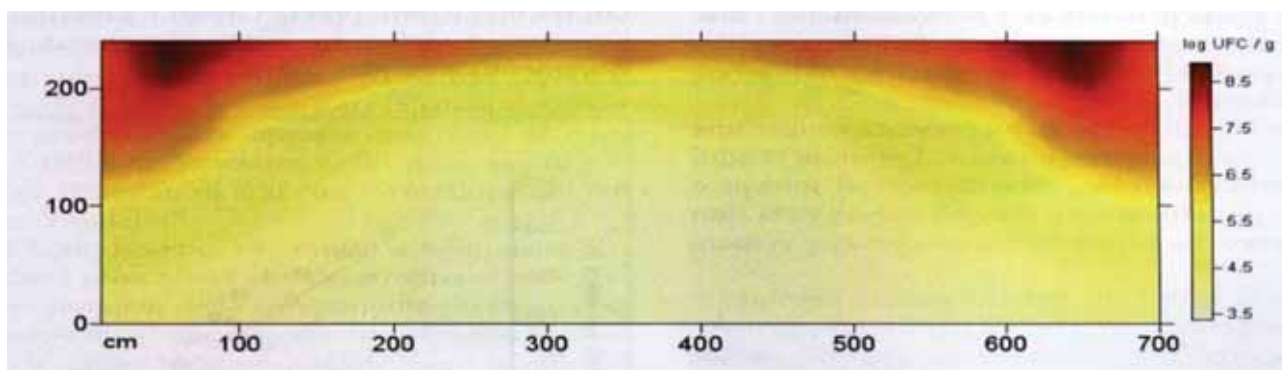


Figura 118. Cariche di lieviti (log ufc/g), sul fronte del silo, nei primi 20 cm (G. Borreani)

Figura 119. pH sul fronte del silo (G. Borreani)

Unitamente a questa zona che può interessare ancora oggi gli ultimi 40-50 cm d'insilato alto, sono da temere le porzioni alte vicino alle pareti in calcestruzzo, anche se le pareti stesse sono ricoperte di materiale plastico fino a terra e ciò perché sui fianchi la compressione è sempre difficile, il numero di passaggi della trattrice è sempre molto scarso, rispetto al centro della trincea dove, per altro, transitano in retromarcia anche gli stessi carri per lo scarico. Sui fianchi inoltre, quasi sempre si verificano piccole o grandi lacerazioni del telo durante il carico e sui fianchi alti d'estate si riscontrano le più forti escursioni termiche con l'insilato che alternativamente si "dilata" aspirando ossigeno, generando deterioramento aerobico, innalzando la temperatura per poi passare ad una degradazione anaerobica che favorisce lo sviluppo dei clostridi, per poi riprendere una successiva dilatazione con aspirazione di ossigeno.

Il tutto si riassume in una forte degradazione dell'insilato posizionato sul fianco alto (fig. 117), con una carica microbiologica anticasearia che da sola è in grado di caratterizzare l'intera dieta unifeed.

Il ruolo zootecnico

Per quanto riguarda gli aspetti di prevenzione dell'inquinamento sporale, sono state applicate le "buone norme di stalla" che prevedono la cura e il rifacimento periodico delle cuccette al fine di mantenere in buon stato igienico le mammelle, l'asportazione frequente delle deiezioni dalla corsie con il passaggio programmato delle ruspette, l'applicazione dei presidi sanitari in pre e post mungitura (dipping) e la pulizia accurata dei capezzoli al fine di ridurre la sequenza di inquinamento feci-mammella-latte.

Il ruolo caseario

In caseificio non sono state applicate particolari tecnologie, se non l'ottimizzazione delle fasi di trasformazione e la cura per ottenere un siero-innesto efficiente; quest'ultimo deve permettere una rapida acidificazione della pasta nelle prime 24-48 ore, intesa come abbassamento del pH, condizione strategica al fine di rendere il substrato non idoneo a sviluppi precoci di microrganismi gasogeni e deve attivare il lisozima. Le esperienze condotte in ERSAF negli anni hanno evidenziato che la maggior attività acidificante del siero-innesto in cagliata si raggiunge con valori di acidità (espressa in °SH/50ml) prossime, ma non superiori, a 28-29°SH. Altro parametro che concorre indirettamente alla buona acidificazione della pasta è rappresentato dalla massima temperatura di cottura della cagliata, il riferimento impiegato nelle prove è stato di 53.5-53.7 °C.

Anche le dimensioni delle forme possono rappresentare un fattore di ottimizzazione dell'acidificazione: a questo scopo sono state prodotte forme che mediamente pesavano 38-39 Kg a 24 ore, quindi non molto grandi, al fine di favorire una più rapida dispersione termica del calore nelle prime ore e velocizzare il processo di trasformazione del glucosio e galattosio in acido lattico.

Peso forme a 24 ore - Kg						
TESI	S-STD		L-FS		S-INN	
	X	ds	X	ds	X	ds
L0	38,7	2,13	38,1	2,40	39,4	2,55
L0 alto G/C	40,7	0,79	39,1	2,06	40,9	1,81
L0 Basso G/C	36,9	0,98	37,4	2,21	37,5	1,97
L1	38,4	2,03	38,0	2,39	39,6	2,75
L0 alto G/C	40,4	0,76	39,0	1,91	41,0	2,16
L0 Basso G/C	36,8	1,07	36,8	2,41	37,7	2,23

Figura 120.

Come nella premessa sperimentale, sono stati valutati due differenti livelli di rapporto tra grasso e caseina, ritenendo che un rapporto più basso potesse migliorare la debatterizzazione del latte per effetto del maggiore affioramento del grasso; dal punto di vista numerico questo si è in parte verificato, ma non sull'effettiva qualità del formaggio prodotto, anzi i rapporti più elevati hanno evidenziato minori effetti fermentativi, come riportato nel grafico che segue.

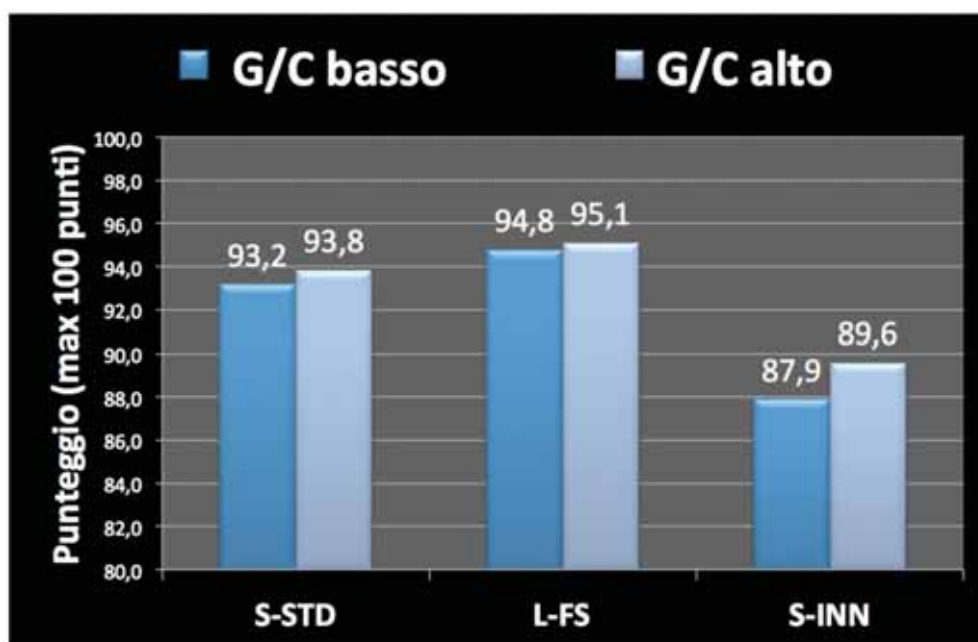


Figura 121.

Un'ulteriore considerazione riguarda le modalità di separazione spontanea del grasso, in particolare con l'impiego di affioratori programmabili del tipo di quello in dotazione a ERSAF: le varie fasi di prelievo del latte magro (tre nel nostro caso), sono state alternate a fasi di sosta, al fine di ottimizzare la separazione del grasso e ottenere una migliore concentrazione della crema. E' stata posta la massima attenzione alle fasi finali di "spillatura" per evitare che anche la minima quantità di crema passasse nel latte magro. Queste attenzioni, ovviamente, sono state maggiori per la tesi a più alto rapporto grasso/caseina in cui la percentuale di grasso target è stata raggiunta ottimizzando i parametri del programma di affioramento e senza aggiungere crema: per questo fine, di grande aiuto è stato il preciso sensore del grasso (con lettura istantanea tramite IR) installato sulla linea di scarico del latte magro.

Nei due grafici sono riassunti i risultati caseari ottenuti nelle prove.

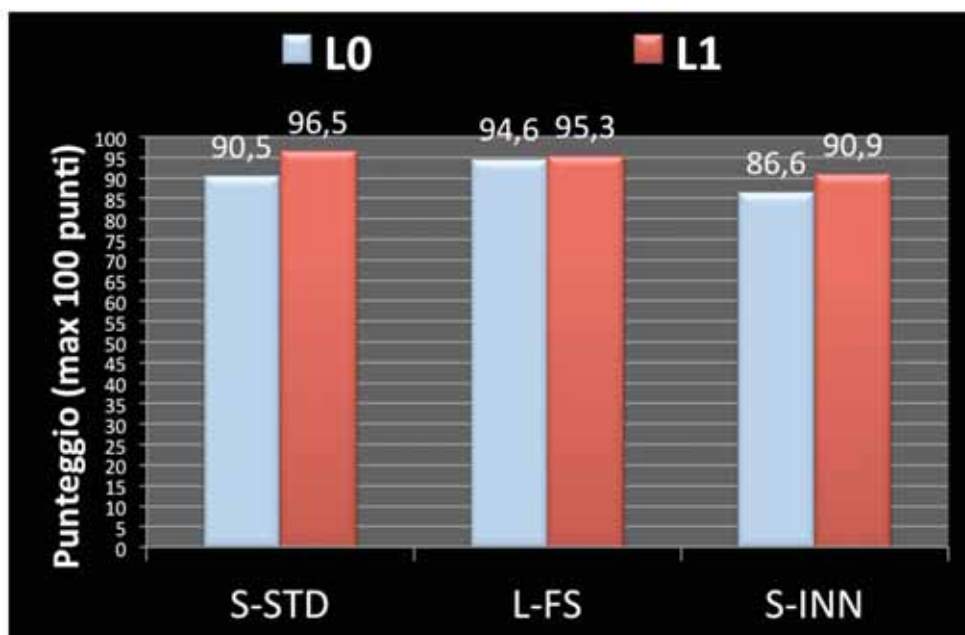


Figura 122.

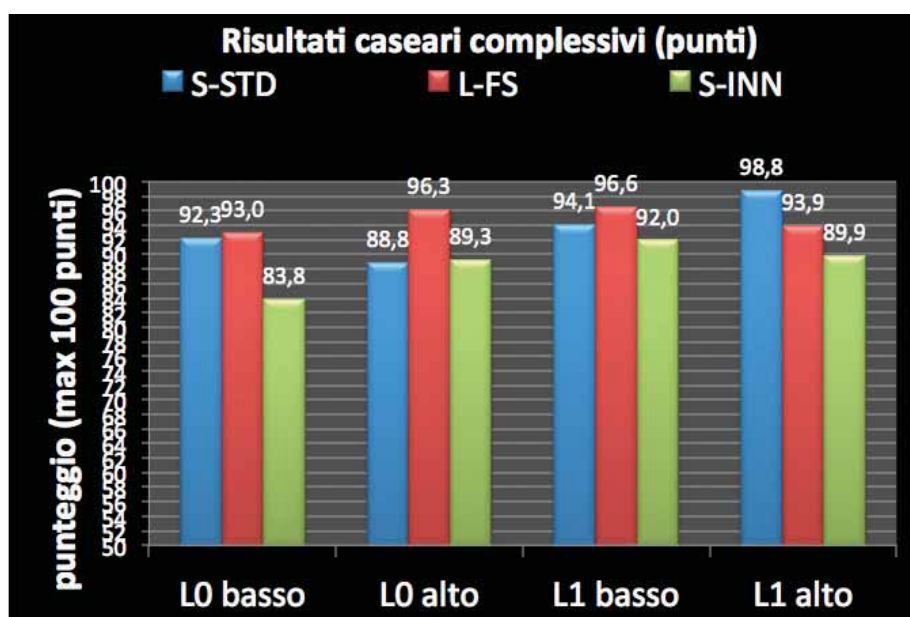


Figura 123.

I vari livelli di intervento finalizzati al raggiungimento dell'obiettivo di produrre Grana Padano senza lisozima sono schematizzati nello schema che segue.

LIVELLO AGRONOMICO

- Utilizzo preferenziale di insilato di mais al giusto stadio di maturazione
 - Corrette e regolari metodiche di insilamento e desilamento
 - Desilamento dopo almeno 90 giorni
 - Fronte di taglio preferibilmente stretto
 - Eliminazione dei primi 40 cm di insilato “alto” e dei 30-40 cm sui fianchi della trincea

LIVELLO ZOOTECNICO

- Tipologia e gestione della lettiera
 - “Ossigenazione” dell'*unifeed*
- Ottimizzazione delle tecniche per l'igiene di allevamento e mungitura
- Controllo igienico degli impianti di raccolta e stoccaggio del latte

LIVELLO CASEARIO

- Ottimizzazione delle tecniche di affioramento
- Ottimizzazione delle caratteristiche del siero-innesto
- Ottimizzazione delle tecniche di trasformazione casearia

ERSAF Ente regionale per i servizi all'agricoltura e alle foreste



3.6 Sottoprogetto 1 – Monitoraggio della moltiplicazione dei Clostridi

U.O. Università Cattolica del Sacro Cuore

Istituto di Scienze degli Alimenti e della Nutrizione ISAN

Responsabile Prof. Francesco Masoero

Introduzione

La presenza di spore di alcune specie di clostridi (*Cl. tyrobutyricum*; *Cl. sporogenes*; *Cl. butyricum*) nel latte può indurre la comparsa di difetti fermentativi a seguito della germinazione delle stesse che, in particolari condizioni, portano a gonfiore tardivo delle forme.

La presenza di clostridi nella razione viene messa in relazione all'utilizzo di insilati con effetti differenziati in relazione alla forma vegetativa o di spora.

Se da un lato sembra che le spore passino inalterate il tratto digerente degli animali con ridotti livelli di replicazione (Contrepolis 1971), dall'altro la forma vegetativa, può moltiplicarsi a livello del digerente.

Inoltre, particolari condizioni di alimentazione caratterizzate da livelli elevati di amido favoriscono un aumento dell'escrezione fecale di spore.

Il *Cl. tyrobutyricum* sembra in grado di moltiplicarsi utilizzando acidi organici tra cui anche l'acido lattico (Ying Zhu e Shang-Tian Yang, 2004) presente negli insilati di mais di buona qualità.

Per questo, la presenza di alti contenuti di amido, associati ad apporti elevati di acido lattico nella dieta per vacche da latte potrebbero rappresentare la base per un potenziale aumento delle spore nel digerente. Ad esempio, una vacca in lattazione con un'ingestione di sostanza secca pari a 23 kg/giorno ingerisce mediamente circa 5500-6000 grammi di amido e, ipotizzando un'ingestione di 25 kg/giorno di silomais, una quantità di acido lattico pari a circa 500 g/giorno.

Pertanto, la conoscenza delle possibili interazioni tra livello e fonte di amido e possibile apporto di acido lattico (da insilato di mais nelle condizioni normali di formulazioni di razioni per vacche da latte) potrebbe fornire indicazioni utili al fine di migliorare le condizioni di razionamento in funzione di ottenere latte di qualità per la produzione di Grana Padano senza l'utilizzo di lisozima.

1. Obiettivi del sottoprogetto 1 - Monitoraggio della moltiplicazione dei Clostridi

Risultati attesi del progetto

La conoscenza delle possibili interazioni tra livello e fonte di amido e possibile apporto di acido lattico (da insilato di mais nelle condizioni normali di formulazioni di razioni per vacche da latte) potrebbe fornire indicazioni utili al fine di migliorare le condizioni di razionamento in funzione di ottenere latte di qualità per la produzione di Grana Padano DOP senza l'utilizzo di lisozima.

Indicatori di risultato

Valutazione rapida e specifica di cellule e spore di *Clostridium tyrobutyricum* nell'intera filiera di produzione del formaggio Grana Padano DOP e identificazione delle principali fonti di contaminazione. Comprensione delle cinetiche di crescita e di sopravvivenza delle spore e cellule vegetative in modelli di rumine e intestino di bovine da latte.

All'interno del progetto l'unità operativa UNICATT-ISAN ha verificato *in vitro* l'effetto del livello e tipologia di amido e della quota di acido lattico apportato dalla dieta sui parametri fermentativi e sulla moltiplicazione nel digerente (rumine/intestino) di spore di *Clostridium tyrobutyricum*. In particolare UNICATT-ISAN ha effettuato:

- Trial 1: verifica *in vitro* dell'eventuale moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum*, inoculato in quantità nota, come conseguenza di fattori predisponenti la loro moltiplicazione e presenti nel liquido ruminale prelevato da animali muniti di fistola.
- Trial 2: effetto di diversi livelli di amido e acido lattico sulla moltiplicazione *in vitro* di *Clostridium tyrobutyricum* eventualmente presente in liquido ruminale.
- Trial 3: modellizzazione *in vitro* degli effetti di 3 livelli di amido e acido lattico sulle dinamiche fermentative ruminali e sulla Total Tract al fine di misurare un possibile effetto di queste sulla moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum*.
- Trial 4: monitorare la presenza di *Clostridium tyrobutyricum* in campioni di liquido ruminale prelevati in momenti diversi in un ampio arco temporale.
- Trial 5: modellizzazione *in vitro* degli effetti di 3 livelli di acido lattico sulle dinamiche fermentative ruminali e sulla Total Tract in diete con base foraggera del periodo sperimentale (1, 2, 3) e con diverse fonti di amido al fine di misurare un possibile effetto di queste sulla moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum*.
- Trial 6: effetto di diversi livelli di acido lattico sulla cinetica di moltiplicazione *in vitro* (Total Tract) di *Clostridium tyrobutyricum* a dose iniziale nota in liquido ruminale di vacca in asciutta o in lattazione in diete con base foraggera del periodo sperimentale (1, 2, 3) e con mais come fonte di amido.

2. Attività di ricerca

Il progetto prevedeva 3 periodi sperimentali caratterizzati per la presenza di diverse forme di insilato in razioni per vacche da latte: insilato di mais tradizionale (Periodo 1, silomais tradizionale), insilato di loietto (Periodo 2, insilato di loietto) e insilato di mais ottenuto con mais raccolto in fase avanzata di maturazione e quindi ad un più alto contenuto di sostanza secca (Periodo 3, silomais innovativo).

Nell'ambito del progetto, UNICATT-ISAN ha quindi ricevuto campioni di Unifeed e materie prime utilizzate nella preparazione delle razioni somministrate agli animali nei 3 periodi sperimentali. I campioni ricevuti sono stati caratterizzati per il contenuto di umidità, proteine gregge (PG), proteine solubili (sol.PG), amido, fibra neutro detersa (NDF), fibra acido detersa (ADF), lignina (ADL) e ceneri. Sono inoltre stati determinati i contenuti di acidi grassi volatili (AGV) per via gascromatografica, acido lattico ed etanolo sui campioni di insilato.

La composizione chimica (Tabella 1) evidenzia un contenuto in nutrienti nei range per le particolari tipologie cui appartengono. Le razioni così formulate risultano differenti particolarmente per il livello di amido nel periodo 2, tuttavia dovuto agli alimenti utilizzati che non hanno permesso livelli finali di amido nell'unifeed analoghi ai periodi 1 e 3. Anche le analisi degli AGV degli insilati (Tabella 2) possono essere considerate tipiche per questa tipologia di alimento. Tuttavia, il contenuto di acido acetico è stato tendenzialmente più alto e quello di acido lattico tendenzialmente più basso rispetto ai normali valori riscontrati nei silomais (5-6%). Decisamente più basso l'apporto di acido lattico per l'insilato di loietto.

Nell'ambito delle attività di progetto previste, UNICATT-ISAN si proponeva di effettuare prove *in vitro* di fermentazione con inoculo ruminale prelevato da animali dotati di fistola ruminale ed alimentati con silomais, utilizzando diversi livelli di amido e di acido lattico. Lo scopo era di verificare *in vitro* con inoculo ruminale l'effetto di diversi livelli di amido e acido lattico sullo sviluppo di Clostridi, nel caso specifico *Clostridium tyrobutyricum*.

La conoscenza delle possibili interazioni tra livello di amido e possibile apporto di acido lattico (da insilato di mais nelle condizioni normali di formulazioni di razioni per vacche da latte) potrebbe:

- fornire indicazioni utili al fine di migliorare le condizioni di razionamento in funzione di ottenere latte di qualità per la produzione di Grana Padano DOP senza l'utilizzo di lisozima
- fornire indicazioni circa le cinetiche di crescita e di sopravvivenza delle spore e cellule vegetative in modelli di ruminale e intestino di bovine da latte.

L'attività prevista si è concretizzata in quattro prove sperimentali di seguito denominate Trial 1, Trial 2, Trial 3 e Trial 4. Per ogni prova sono riportati brevemente l'obiettivo, i materiali e metodi seguiti e i risultati ottenuti.

Trial 1

Obiettivo di questa prova, di natura preliminare, è stato quello di verificare *in vitro* l'eventuale moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum*, inoculato in quantità nota, come conseguenza di fattori predisponenti la loro moltiplicazione e presenti nel liquido ruminale prelevato da animali muniti di fistola.

Per mantenere distinta la quantità di Clostridi incubati da quelli eventualmente presenti nel liquido ruminale utilizzato, sono stati utilizzati tubi di dialisi contenenti circa 1×10^7 spore. L'utilizzo di tubi di dialisi permette il flusso di molecole eventualmente presenti nel liquido ruminale verso il comparto in cui si trovano le spore di *Clostridium tyrobutyricum*, impedendo al contempo il passaggio delle stesse nel liquido ruminale. I tubi di dialisi sigillati contenenti una quantità nota di Clostridi e forniti dal Partner UNICATT-CRB, sono stati incubati *in vitro* con liquido ruminale e per tempi diversi: 0, 4, 8, 24, 48 ore.

Al termine di ogni periodo d'incubazione i tubi di dialisi sono stati estratti, lavati in acqua corrente e immediatamente congelati per poi essere trasferiti al Partner UNICATT-CRB per la conta di *Clostridium tyrobutyricum*.

Trial 2

Obiettivo di questa prova è stato quello di monitorare l'effetto di diversi livelli di amido e acido lattico sulla moltiplicazione *in vitro* di *Clostridium tyrobutyricum* eventualmente presente in liquido ruminale.

Come substrato per la fermentazione *in vitro* è stato utilizzato l'unifeed somministrato agli animali nel periodo sperimentale 1 (silomais), con aggiunte di amido puro o substrati fibrosi per raggiungere estremi in termini di contenuti di amido e miscele di acido lattico e acido acetico. Questo per simulare l'aumento del livello di presenza di acido lattico dovuto ad un aumento dell'impiego di silomais nella formulazione della razione per vacche da latte. La base di partenza della razione è stata quella utilizzata nel periodo sperimentale considerato (Periodo 1) ed il livello intermedio di amido considerato è quello osservato dalle analisi chimiche sui campioni di unifeed ricevuti per il Periodo 1.

Brevemente, i campioni di unifeed ricevuti sono stati essiccati fino a peso costante in stufa a 65°C, quindi macinati con griglia da 1 mm. Il substrato così ottenuto è stato utilizzato per la preparazione dei trattamenti:

- Livelli di amido pari a 15%, 25%, 35% sulla SS
- Livelli di acido lattico pari a 0, 2,5 e 7,5% sulla SS

Per aumentare il contenuto di amido del substrato si è utilizzato amido di mais puro (Mais NA), viceversa per ottenere un livello di amido nel substrato inferiore a quello misurato nell'unifeed si sono utilizzate buccette di soia ed urea per ottenere substrati isoproteici. In dettaglio i 3 substrati aventi diversi contenuti di amido sono stati così ottenuti:

- Livello di amido Basso (15% SS) = 60% unifeed ERSAF + 39% buccette di soia + 1% urea
- Livello di amido Intermedio (25% SS) = 100% unifeed ERSAF
- Livello di amido Alto (35% SS) = 85% unifeed ERSAF + 14% Mais NA + 1% urea

I substrati così ottenuti sono stati incubati in liquido ruminale per la misura della produzione di gas in base alla metodica di Menke e Steingass (1988). Circa 220 mg di substrato sono stati pesati in siringhe graduate da 100 ml, quindi addizionati di 30 ml di liquido ruminale diluito (rapporto 1:1 tampone-rumine). Il liquido ruminale è stato prelevato da 2 vacche donatrici dotate di fistola ruminale (circa 600 ml di liquido ruminale per ogni animale).

1 ml di soluzione acquosa (acido lattico:acido acetico in rapporto 3:1 v/v) è stata aggiunta ai substrati al fine di ottenere livelli crescenti di acido lattico (0, 2,5 e 7,5% SS) e riconducibili ad un impiego crescente di silo-mais nella dieta base (livello inferiore di acido lattico). Le soluzioni acquose utilizzate per il livello intermedio (2,5% SS) ed il livello più elevato (7,5% SS) di acido lattico sono state così preparate:

- Soluzione livello intermedio (2,5% SS): 100 µl lattico + 33 µl di acetico in 20 ml di H₂O
- Soluzione livello elevato (7,5% SS): 600 µl lattico + 200 µl di acetico in 40 ml di H₂O

Al livello 0 di acido lattico veniva aggiunto 1 ml di acqua. L'aggiunta delle soluzioni acquose corrispondeva ad un dosaggio di 0, 5, 15 mg/siringa di acido lattico, rispettivamente per livelli di acido lattico pari a 0, 2,5 e 7,5% SS.

Le siringhe sono state quindi posizionate verticalmente in un bagnetto termostato a 39°C. Tre siringhe senza substrato ma con liquido ruminale sono state previste come bianco. Tutte le operazioni di preparazione delle siringhe con impiego di liquido ruminale sono state condotte in flusso continuo di anidride carbonica per mantenere l'anaerobiosi. Per tutte le siringhe incubate è stato misurato la produzione di gas da 1 a 48 ore per stimare il grado di fermentescibilità del substrato utilizzato come indicatore *in vitro* dell'attività microbica ruminale.

Trial 3

Obiettivo di questa prova è stato la modellizzazione *in vitro* degli effetti di 3 livelli di amido e acido lattico sulle dinamiche fermentative ruminali e sulla Total Tract al fine di misurare un possibile effetto di queste sulla moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum*.

La prova ha utilizzato gli stessi substrati preparati e utilizzati nel trial 2. La prova si è così articolata:

- Step ruminale (48 ore)
- Step gastrico (6 ore)
- Step intestinale (48 ore)
- Raccolta campioni per monitoraggio moltiplicazione *Clostridium tyrobutyricum* (UNICATT-CRB)

Step ruminale (48 ore)

Circa 220 mg di substrato sono stati pesati in boccettini di vetro (125 ml), quindi addizionati di 30 ml di liquido ruminale diluito (rapporto 1:1 tampone-rumine). Il liquido ruminale è stato prelevato da 2 vacche donatrici dotate di fistola ruminale (circa 600 ml di liquido ruminale per ogni animale). 1 ml di soluzione acquosa (acido lattico:acido acetico in rapporto 3:1 v/v) è stata aggiunta ai substrati al fine di ottenere livelli crescenti di acido lattico (0, 2,5 e 7,5% SS). Al livello 0 di acido lattico veniva aggiunto 1 ml di acqua. L'aggiunta delle soluzioni acquose corrispondeva a un dosaggio di 0, 5, 15 mg/siringa di acido lattico, rispettivamente per livelli di acido lattico pari a 0, 2,5 e 7,5% SS.

I boccettini sono stati quindi sigillati e mantenuti in un bagnetto termostato a 39°C. Sei boccettini senza substrato ma con liquido ruminale sono stati previsti come bianco (3 per step ruminale e 3 per step Total Tract). Tutte le operazioni di preparazione dei boccettini con impiego di liquido ruminale sono state condotte in flusso continuo di anidride carbonica per mantenere l'anaerobiosi. Per tutti i boccettini incubati è stato misurato la produzione di gas da 1 a 48 ore per stimare il grado di fermentescibilità del substrato utilizzato come indicatore

in vitro dell'attività microbica ruminale.

Al termine dello step ruminale (48 ore) metà dei boccettini sono stati sacrificati. Parte del contenuto (5 ml) è stato prelevato per la determinazione del contenuto in acidi grassi volatili (AGV) mentre la rimanente parte è stata congelata ed inviata al Partner UNICATT-CRB per la determinazione del contenuto in *Clostridium tyrobutyricum*. La moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum* viene calcolata in base al contenuto iniziale di *Clostridium tyrobutyricum* del liquido ruminale utilizzato (tempo 0).

Step gastrico (6 ore)

I boccettini non sacrificati al termine dello step ruminale sono stati sottoposti allo step gastrico. Brevemente, i boccettini sono stati aperti, si è aggiunto 5 ml HCl 3M per acidificare l'ambiente di lavoro (pH 2) seguito dall'aggiunta di 50 mg di pepsina (2ml di una soluzione con concentrazione pari a 25mg/ml).

Step intestinale (48 ore)

Al termine dello step gastrico si è proceduto all'innalzamento del valore di pH a 7 mediante l'aggiunta di bicarbonato di sodio (0,3 g/boccettino) seguiti dall'aggiunta di pancreatina (1 ml/boccettino di soluzione acquosa composta da 0,8 g di pancreatina + 2,8 g di Sali biliari + 40 ml di acqua). Al termine dello step intestinale i campioni sono stati raccolti e congelati per poi essere inviati al Partner UNICATT-CRB per la determinazione del contenuto in *Clostridium tyrobutyricum*.

Trial 4

Obiettivo della prova è stato quello di monitorare la presenza di *Clostridium tyrobutyricum* in campioni di liquido ruminale prelevati in momenti diversi in un ampio arco temporale.

Sono stati prelevati campioni di liquido ruminale da 3 animali in tempi diversi (3). I campioni di liquido ruminale sono stati filtrati ed immediatamente congelati per il successivo monitoraggio per la presenza di *Clostridium tyrobutyricum*. La conta di *Clostridium tyrobutyricum* verrà effettuata dal Partner UNICATT-CRB.

Trial 5

Obiettivo di questa prova è stato la modellizzazione *in vitro* degli effetti di 3 livelli di acido lattico sulle dinamiche fermentative ruminali e sulla Total Tract in diete con base foraggera del periodo sperimentale (1, 2, 3) e con diverse fonti di amido al fine di misurare un possibile effetto di queste sulla moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum*.

La prova ha utilizzato la stessa metodica utilizzata nel Trial 3 e brevemente così articolata:

- *Step ruminale (48 ore)*
 - o Raccolta campioni per monitoraggio moltiplicazione *Clostridium tyrobutyricum* nello step ruminale (UNICATT-CRB)
- *Step gastrico (6 ore)*
- *Step intestinale (48 ore)*
- Raccolta campioni per monitoraggio moltiplicazione *Clostridium tyrobutyricum* nello step intestinale (UNICATT-CRB)

Per ogni periodo sperimentale è stata ricostruita la razione in laboratorio utilizzando la base foraggera del periodo sperimentale in esame e come fonte di amido mais o orzo, sia come farina che come fiocco. In tabella 3 viene riportata la composizione chimica delle fonti di amido utilizzate. Le razioni ricostruite sono state formulate sulla base dei parametri analitici degli unifeed ricevuti per ogni periodo sperimentale (Tabella 4). Le razioni sono state quindi valutate con 3 livelli di acido lattico aggiunto (0, 5, 15 mg/campione) ove per campione si intende l'unità sperimentale (boccettino in fermentazione). In totale vi erano 12 diete sperimentali per periodo con approccio fattoriale in cui i fattori erano fonte di amido (4 livelli) e acido lattico (3 livelli). Le fermentazioni sono state ripetute in due giorni diversi (run).

Per tutti i boccettini è stata misurata la produzione di gas da 1 a 48 ore per stimare il grado di fermentescibilità del substrato utilizzato come indicatore *in vitro* dell'attività microbica ruminale.

Al termine dello step ruminale (48 ore) 3 boccettini per fonte di amido (1 per ogni livello di acido lattico) sono stati sacrificati. Parte del contenuto (5 ml) è stato prelevato per la determinazione del contenuto in AGV mentre

la rimanente parte è stata congelata ed inviata al Partner UNICATT-CRB per la determinazione del contenuto in *Clostridium tyrobutyricum*. La moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum* viene calcolata in base al contenuto iniziale di *Clostridium tyrobutyricum* del liquido ruminale utilizzato (tempo 0).

La rimanenza dei bocconcini ha proseguito con lo step gastrico seguito dallo step intestinale. I campioni raccolti al termine dello step intestinale sono stati congelati per poi essere inviati al partner UNICATT-CRB per la determinazione del contenuto in *Clostridium tyrobutyricum*.

Trial 6

Obiettivo della prova è stato quello di monitorare l'effetto di diversi livelli di acido lattico sulla cinetica di moltiplicazione *in vitro* (Total Tract) di *Clostridium tyrobutyricum* a dose iniziale nota in liquido ruminale di vacca in asciutta o in lattazione in diete con base foraggera del periodo sperimentale (1, 2, 3) e con mais come fonte di amido.

La metodica seguita è stata quella utilizzata nel trial 5 (Step ruminale, step gastrico, step intestinale) con alcune modifiche. In particolare, durante lo step ruminale sono state prelevate in condizioni di anaerobiosi aliquote di 2ml per la determinazione del contenuto di *Clostridium tyrobutyricum* a 8, 24 e 48 ore di incubazione. Ulteriori campioni sono stati prelevati alla fine dello step intestinale. I campioni raccolti sono stati immediatamente congelati a -20°C ed inviati al Partner UNICATT-CRB per la successiva determinazione del contenuto in *Clostridium tyrobutyricum*.

3. Risultati

Trial 1

La prova aveva come obiettivo la verifica *in vitro* dell'eventuale moltiplicazione di *Clostridium tyrobutyricum*. I risultati delle analisi dei campioni ottenuti sono riportati nella relazione finale del Partner UNICATT-CRB.

Trial 2

Nella tabella 5 vengono riportati i parametri di cinetica di fermentazione ruminale per i substrati testati. Dai risultati si evidenzia come il contenuto in amido della dieta e l'inclusione di silomais (inteso come rapporto acetico:lattico) possano influenzare la fermentescibilità della razione *in vitro*. Gli andamenti lineari e quadratici dei due fattori di studio sono stati analizzati e commentati con i rispettivi grafici (Figure 1, 2, 3).

In particolare la produzione finale di gas è stata influenzata con andamento quadratico dalla concentrazione di amido delle diete (Figura 1). Questo è probabilmente dovuto ad una alta produzione di gas registrata nella dieta a bassa inclusione di amido (dieta 15% amido) che conteneva un'alta concentrazione di fibra fermentescibile da buccette di soia, inserite per diluire la dieta originale al fine di abbassare il livello di amido al 15%.

La velocità di produzione di gas è stata più alta nelle diete a medio e alto contenuto in amido, rispetto alle diete con basso contenuto di amido, confermando che le diete mostravano una diversa fermentescibilità (Figura 2). In questo caso, l'aggiunta di acido lattico ha influenzato, in modo lineare crescente, la velocità con cui i microorganismi ruminali hanno fermentato la sostanza organica. Questo suggerisce una discreta capacità di utilizzazione dell'acido lattico da parte dei microorganismi ruminali.

Risultati simili a quelli riportati in precedenza per il kd sono stati osservati per il T_{1/2}, confermando ancora una volta che le dinamiche di fermentescibilità ruminale delle diete formulate con gli alimenti forniti da ERSAF sono state diverse e potrebbero influenzare la moltiplicazione dei clostridi nel rumine (Figura 3).

Trial 3

Nella tabella 6 vengono riportati i parametri di cinetica di fermentazione ruminale per i substrati testati *in vitro* in unità sperimentali su cui si è poi eseguito lo step enzimatico per la simulazione della digestione intestinale. I risultati confermano quanto osservato nel trial 2 in merito all'effetto dell'amido della dieta e l'inclusione di silomais (inteso come rapporto acetico:lattico) sulla fermentescibilità (volume finale di gas prodotto) della razione *in vitro*.

L'effetto del livello di amido si osserva anche sull'incremento di MMol di AGV prodotte/g di SO fermentata e sui rapporti molari (Tabella 7)

I risultati analitici inerenti alla presenza di *Clostridium tyrobutyricum* nei campioni prelevati alla fine dello step

intestinale sono riportati nella relazione finale del Partner UNICATT-CRB.

Trial 4

La prova aveva come obiettivo il monitorare della presenza di *Clostridium tyrobutyricum* in campioni di liquido ruminale prelevati in momenti diversi in un ampio arco temporale. I risultati delle analisi dei campioni ottenuti sono riportati nella relazione finale del Partner UNICATT-CRB.

Trial 5

Mediamente, la produzione di gas *in vitro* a 8 e 48 ore è risultata maggiore per le diete con silomais tradizionale (Periodo 1). Le diete con silomais innovativo (Periodo 3) hanno manifestato una fermentescibilità inferiore alle 8 ore, anche rispetto alle diete con insilato di loietto (Periodo 2), per poi posizionarsi in una zona intermedia alle 48 ore.

Per tutti i periodi analizzati e per le diete considerate non si è osservato un'interazione tra fonte di amido ed acido lattico. Questo ci permette di stimare gli effetti principali per i fattori considerati che, avendo più di 2 livelli, possono essere diversi.

Le figure 4 e 5 riportano i risultati ottenuti nelle fermentazioni aventi come substrato la base foraggera del periodo 1. Per quanto riguarda la fonte di amido, a 8 ore è il mais come farina che produce meno gas, mentre le altre fonti di amido si comportano in modo analogo e producono più gas (Figura 4). Le fonti di amido tendono a separarsi ulteriormente analizzando la produzione di gas a 48 ore (Figura 5) dove il mais come previsto produce più gas. Come effetto principale, quindi mediato sui diversi livelli di acido lattico, il mais produce più del mais fiocco il quale produce meno dell'orzo fiocco. In tutti si osserva un effetto di incremento di gas prodotto riconducibile alla presenza di acido lattico, lasciando presupporre un ruolo dell'acido lattico come fonte energetica iniziale per i microrganismi.

La produzione totale di AGV è influenzata dall'aggiunta di acido lattico con un'interazione con la fonte di amido (Tabella 9). Tuttavia, l'acido butirrico e l'acido propionico aumentano all'aumentare del livello di acido lattico, indipendentemente dalla fonte di amido, mentre l'acido acetico non cambia e questo determina una variazione nei rapporti. Inoltre, la presenza di acido lattico determina un aumento della produzione degli acidi iso-butyrico, iso-valerianico, valerianico e butirrico (Figure 12, 13).

Le figure 6 e 7 riportano i risultati ottenuti nelle fermentazioni aventi come substrato la base foraggera del periodo 2 con la presenza di insilato di loietto, caratterizzata per un più basso livello di amido. In queste condizioni si assiste ad una produzione finale di gas inferiore (-11%) rispetto alle diete con silomais (Periodo 1). La ridotta fermentescibilità è ancora più accentuata ad 8 ore con una riduzione del 25% in gas prodotto. Questo può essere dovuto al minor contenuto di amido della razione il che potrebbe anche giustificare le medesime produzioni di gas osservate per le diete contenenti mais, orzo ed orzo fiocco come fonte di amido. I valori di Kd osservati sono coerenti con l'andamento della produzione di gas così come gli effetti principali dei fattori sul Kd.

In sostanza la base foraggera con insilato di loietto (Periodo 2) unita alle fonti di amido utilizzate risultano diverse dalle diete con silomais nella base foraggera (Periodo 1) e l'effetto della presenza di acido lattico tende ad uniformare le fonti di amido in termini di produzione di gas, eccetto per il mais fiocco.

L'andamento degli acidi grassi osservati nelle fermentazioni con il substrato del periodo 2 è risultato alquanto differente da quanto osservato nel periodo 1. In queste condizioni le concentrazioni di acido propionico e butirrico non sono influenzate dal livello di acido lattico, ma si comportano in modo differenziato per le diverse fonti di amido (Tabella 11). Si osserva una diminuzione, visibile anche per l'acido acetico, al livello intermedio di acido lattico per gli amidi non trattati termicamente. Questo risulta visibile anche graficamente e tende a persistere al livello elevato di acido lattico aggiunto (Figure 14, 15). Quanto osservato per gli amidi crudi non si verifica per gli amidi cotti, ove l'aggiunta di acido lattico determina un aumento del livello degli acidi volatili principali.

Dal punto di vista del substrato fermentativo, questo periodo si differenzia dal precedente per la fonte di amido nel substrato. Nel periodo 1 c'era anche l'apporto del silomais. Inoltre, la diversa fonte di amido potrebbe variare il rapporto amilosio amilopectina nel substrato. L'acido lattico potrebbe inoltre avere un effetto di linearizzazione delle catene di amilopectina, rendendole quindi meno disponibili ai batteri per un determinato periodo. Questo, inoltre potrebbe giustificare una minor produzione di gas, anche se tuttavia dal punto di vista molare la produzione totale di gas osservata nel periodo 2 sembra analoga a quanto misurato nel periodo 1 con presenza di

silomais. In ultima analisi, la diversa base foraggera con presenza di insilato di loietto produce diversi rapporti molari rispetto al periodo 1.

Le figure 8 e 9 riportano i risultati ottenuti nelle fermentazioni aventi come substrato la base foraggera del periodo 3 in cui si aveva la presenza di insilato di mais innovativo. Rispetto ai periodi precedenti, le diete formulate con questa base foraggera si caratterizzano per una bassa produzione di gas ad 8 ore e con il mais come fonte di amido al livello inferiore. La produzione di gas a 48 ore si colloca ad un livello intermedio tra quanto ottenuto con diete aventi come base foraggera la presenza di insilato di loietto (produzione inferiore) oppure silomais standard (produzione superiore). Viene comunque rispettato l'ordine osservato nei periodi precedenti per quanto riguarda la fonte di amido utilizzata. Come si vede dai valori di Kd, le curve di queste fermentazioni sono caratterizzate da una pendenza minore, indice di un'attività fermentativa meno intensa.

La presenza di insilato innovativo nella razione si è caratterizzata per una sostanziale inerzia dal punto di vista dei principali acidi grassi prodotti a seguito dell'aggiunta di acido lattico in diete con diverse fonti di amido. Si osserva inoltre una differenza nei rapporti principalmente riconducibile all'effetto della fonte di amido e di acido lattico (Tabella 13; Figure 16, 17).

In sintesi, le razioni ricostruite per i tre periodi sperimentali si sono differenziate dal punto di vista fermentativo, così come le fonti di amido utilizzate hanno creato situazioni di differenze (sempre significative) tra di loro. Le figure 10 e 11 evidenziano quanto è stato osservato più o meno in tutte le fermentazioni, ossia una tendenza ad una riduzione della fase di Lag iniziale e del $T^{1/2}$ in presenza di acido lattico.

Trial 6

La prova aveva come obiettivo la valutazione dell'effetto di diversi livelli di acido lattico sulla cinetica di moltiplicazione *in vitro* (Total Tract) di *Clostridium tyrobutyricum* a dose iniziale nota in liquido ruminale di vacca in asciutta o in lattazione in diete con base foraggera del periodo sperimentale (1, 2, 3) e con mais come fonte di amido. I risultati delle analisi dei campioni ottenuti sono riportati nella relazione finale del Partner UNICATT-CRB.

4. Conclusioni

Considerando il potenziale di fermentescibilità delle razioni testate, le diete nelle quali il silomais tradizionale rappresentava la base foraggera principale hanno ottenuto una maggiore e più rapida produzione di gas, seguite dalle diete con silomais innovativo e dalle diete con insilato di loietto.

La presenza di acido lattico ha determinato un aumento della produzione di gas prodotto quando associato alla presenza di un substrato fermentescibile quale è l'amido, indipendentemente dalla fonte di amido (mais vs. orzo) utilizzato.

L'intensità di risposta ai fattori considerati è risultata diversa per le basi foraggere dei tre periodi e, dal punto di vista degli acidi grassi prodotti, la dieta con silomais innovativo sembra essere meno suscettibile a variazioni legate a diverse fonti di amido e livelli di acido lattico, rendendo l'ambiente ruminale e il suo microbiota meno suscettibile a drastiche variazioni di pH.

Tabella 1 - Composizione chimica (% SS) degli alimenti e dell'unifeed utilizzati nei 3 periodi sperimentali

Ingredienti	SS g/100g	PG g/100 g SS	P. solubili g/100 g SS	Amido g/100 g SS	NDF g/100 g SS	ADF g/100 g SS	Ceneri g/100 g SS
Periodo 1 (Silomais tradizionale)							
Insilato di mais	31,8	7,44	3,52	29,34	45,73	25,19	3,17
Erba medica, fieno	90,1	18,91	3,73		47,84	35,44	11,94
Loietto, fieno	90,4	11,76	2,97		52,88	29,22	9,14
Mix aziendale	89,6	20,4	1,75	34,46	26,75	7,64	8,59
Unifeed	54,6	16,38	3,78	25,06	34,23	19,79	6,78
Periodo 2 (insilato di loietto)							
Insilato di loietto	58,4	11,59	5,6		62,09	39,51	11,14
Erba medica, fieno	89,1	19,32	3,28		42,96	32,08	13,74
Mix aziendale	89,6	21,83	3,84	41,13	10,6	3,69	5,93
Unifeed	75,5	16,84	2,56	20,57	39,73	20,60	9,00
Periodo 3 (Silomais innovativo)							
Insilato di mais	43,0	7,54	3,58	35,43	39,66	22,41	3,47
Erba medica, fieno	88,0	18,79	5,54		47,05	35,35	9,91
Loietto, fieno	89,6	10,30	3,13		63,39	38,43	8,47
Paglia	90,2	5,54	2,96		78,25	50,36	7,43
Mix aziendale	89,2	24,67	5,44	36,43	12,74	6,50	6,94
Unifeed	62,5	16,52	3,31	27,72	35,23	20,26	6,51

Tabella 2 - Sostanza secca, acidi grassi volatili, acido lattico ed etanolo in campioni di insilati utilizzati nei tre periodi sperimentali

Campione	SS, %	Acido acetico, g/100g SS	Acido propionico, g/100 g SS	Acido butirrico, g/100 g SS	Acido valerianico, g/100 SS	Acidi ramificati ¹ , g/100 g SS	Acido lattico, g/100g SS	Etanolo, g/100g SS
Periodo 1 (Silomais tradizionale)								
05/05/12	30,6	2,54	0,08	0,02	n.d.	0,01	4,70	0,12
13/06/12	31	2,79	0,03	0,02	n.d.	0,04	4,10	0,11
20/06/12	32,4	2,21	0,01	0,04	n.d.	0,06	3,58	0,06
27/06/12	31,5	2,63	0,01	0,04	n.d.	0,07	4,03	0,11
02/07/12	33,1	2,53	0,01	0,04	n.d.	0,07	3,87	0,10
12/07/12	32,5	2,44	0,02	0,06	n.d.	0,10	4,06	0,12
Media	31,9	2,52	0,03	0,04	n.d.	0,06	4,06	0,10
Periodo 2 (Insilato di loietto)								
6-8/11/12	63,5	1,22	n.d.	0,32	n.d.	n.d.	0,41	0,08
13-14/11/12	57,2	1,47	n.d.	0,02	n.d.	0,01	0,01	0,07
19-20/11/12	63,4	0,92	n.d.	0,02	n.d.	n.d.	1,04	0,05
26-27/11/12	60,7	1,02	0,01	0,02	n.d.	n.d.	0,98	0,05
Media	61,2	1,16		0,10	n.d.		0,61	0,06
Periodo 3 (Silomais innovativo)								
11-13/02/13	43,6	3,32	0,02	n.d.	n.d.	0,01	4,60	n.d.
18-20/02/13	43,3	2,03	0,01	n.d.	n.d.	0,01	4,43	n.d.
25-27/02/13	41,9	2,17	0,01	n.d.	n.d.	0,01	3,11	n.d.
04-06/03/13	43,2	2,27	0,01	n.d.	n.d.	0,01	4,48	n.d.
Media	43,0	2,45	0,01			0,01	4,16	

¹Acido isobutirrico + acido isovalerianico; n.d. = non determinato

Tabella 3 – Composizione chimica delle fonti di amido utilizzate

	PG,% SS	Lipidi grezzi, % SS	NDF,% SS	Ceneri,% SS	Ami- do,% SS	Glucosio, % SS	ESAC, g/100g amido
Mais	7,5	3,4	9,5	1,3	67,3	1,3	18,9
Mais, fiocco	9,4	1,5	7,9	0,7	80,3	1,4	69,3
Orzo	11,7	1,5	12,1	2,3	55,1	1,9	28,6
Orzo, fiocco	9,2	2,2	10,5	2,0	62,3	3,3	86,4

Tabella 4 - Ingredienti delle razioni ricostruite per periodo sperimentale e utilizzate nelle fermentazioni in vitro

	Periodo 1 (insilato di mais)		Periodo 2 (insilato di loietto)		Periodo 3 (insilato di mais innovati- vo)	
Fonte di amido	Mais	Orzo	Mais	Orzo	Mais	Orzo
Ingrediente	Valore, % sulla sostanza secca					
Insilato di mais	25,9	27,3			38,2	39,8
Insilato di loietto			35,4	37,4		
Fieno di medica	22,1	22,1	11,6	12,2	19,5	20,4
Fieno di loietto	8,6	11,2				
Paglia					4	4,2
Soia, farina di estrazione	6,5	5	8,4	4,1	9,4	8,6
Soia integrale	5,2	4	7,8	9,1	6,4	5,8
Mais farina	29,6		34,2		19,8	
Orzo farina		28,3		34,6		18,5
Mepron	0,1	0,1				
Lievito	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Minerali e vitamine	1,7	1,7	2,1	2,2	2,2	2,3

Tabella 5 – Effetto del livello di amido (A: 15, 25 e 35% SS) ed acido lattico aggiunto (AL: 0, 5 and 15 mg/campione) sui parametri di fermentazione in vitro (siringhe)

	Livello di amido (% SS)												Resid- ual	Effetto del modello (P <)			
	15				25				35								
	0	5	15		0	5	15		0	5	15						
Acido lattico aggiunto	0	5	15		0	5	15		0	5	15		A	AL	A x A	AL x AL	A x AL
Vf, ml gas/g SO	326,8	331,1	341,8		284,6	297,4	291,1		309,2	318,5	312,7	270	<0,05	0,22	<0,05	0,47	0,38
Kd, ore ⁻¹	0,062	0,061	0,067		0,095	0,090	0,101		0,091	0,109	0,095	0,0001	<0,05	0,21	<0,05	0,43	0,51
Lag, ore	0	0,2	0,1		0,3	0,1	0,2		0,4	0,6	0,2	0,0317	0,89	0,17	0,20	0,48	0,22
T½, ore	11,2	11,2	10,3		7,0	7,6	6,7		7,2	5,8	7,1	0,3741	<0,05	0,14	<0,05	0,64	0,12

Tabella 6 – Effetto del livello di amido (A: 15, 25 e 35% SS) ed acido lattico aggiunto (AL: 0, 5 and 15 mg/campione) sui parametri di fermentazione in vitro (bocceffini)

	Livello di amido (% SS)												Residual	Effetto del modello (P <)				
	15				25				35					A	AL	A x A	AL x AL	A x AL
	0	5	15		0	5	15		0	5	15							
Acido lattico aggiunto	0																	
Vf, ml gas/g SO	362,6	328,6	346,3		298,6	298,1	300,7		312,3	318,9	317,0			<0,05	0,13	<0,05	0,20	0,42
Kd, ore ⁻¹	0,048	0,049	0,053		0,055	0,058	0,073		0,065	0,070	0,082			0,23	0,57	0,64	0,51	<0,10
Lag, ore	0,1	0	0		0	0	0		0	0	0			0,28	<0,05	0,52	0,11	<0,10
T½, ore	14,5	14,2	13,1		12,6	11,9	9,5		10,7	9,9	8,5			<0,05	0,72	0,23	0,73	0,58

Tabella 7 – Effetto del livello di acido lattico (AL: 0, 5, 15 mg/campione) sul contenuto di acidi grassi volatili (AGV: MMol/g di SO) e rapporti in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 1 e con diversi livelli di amido (A: 15, 25, 35)

	Livello di Amido (A)										Residual	P	
	15					35							
	Livello di acido lattico (L)												
	0	5	15	0	5	15	0	5	15		A	L	A x L
Acetico	29,19	29,23	33,67	37,46	30,93	35,04	26,64	30,59	25,74	28,247	0,04	0,88	0,34
Propionico	6,33	6,64	7,56	8,24	6,90	7,79	5,74	6,57	5,95	1,077	0,02	0,69	0,31
Butirrico	3,49	3,62	4,22	4,82	4,12	4,62	3,83	4,23	4,06	0,265	0,02	0,42	0,28
Valerianico	0,405	0,413	0,456	0,508	0,446	0,465	0,389	0,410	0,383	0,002	<0,01	0,84	0,32
Iso-butyrrico	0,297	0,295	0,337	0,364	0,316	0,331	0,294	0,311	0,272	0,001	0,03	0,76	0,12
Iso-valerianico	0,549	0,544	0,581	0,638	0,579	0,581	0,529	0,547	0,508	0,002	0,02	0,74	0,40
Totali	40,26	40,73	46,83	52,03	43,29	48,82	37,42	42,67	36,91	48,433	0,04	0,84	0,33
C ₂ /C ₃	4,61	4,36	4,44	4,55	4,45	4,50	4,63	4,65	4,32	0,020	0,65	0,05	0,12
(C ₂ +C ₄)/C3	5,16	4,91	5,00	5,13	5,05	5,09	5,30	5,29	5,00	0,018	0,04	0,05	0,13

Media Marginale ed effetto principale per fattore

Livello di amido

Acido acetico – A 15: 30,70; A 25: 34,48; A 35: 27,66; A 35 vs A 25: -6,82 (0,01);

Acido propionico – A 15: 6,84; A 25: 7,64; A 35: 6,09; A 35 vs A 25: -1,55 (<0,01);

Acido butirrico – A 15: 3,77; A 25: 4,52; A 35: 4,04; A 35 vs A 25: -0,48 (<0,06); A 25 vs A 15: 0,75 (<0,01);

Acido valerianico – A 15: 0,424; A 25: 0,473; A 35: 0,394; A 35 vs A 25: -0,079 (<0,01); A 25 vs A 15: 0,049 (0,04);

Acido iso-butirrico – A 15: 0,309; A 25: 0,337; A 35: 0,292; A 35 vs A 25: -0,045 (<0,01); A 25 vs A 15: 0,027 (0,08);

Acido iso-valerianico – A 15: 0,558; A 25: 0,599; A 35: 0,528; A 35 vs A 25: -0,071 (<0,01); A 25 vs A 15: 0,041 (0,09);

Totali – A 15: 42,61; A 25: 48,05; A 35: 39; A 35 vs A 25: -9,05 (0,01);

$(C_2+C_4)/C_3$ – A 15: 5,02; A 25: 5,09; A 35: 5,20; A 35 vs A 15: 0,18 (0,01)

Acido lattico

C_2/C_3 – AL 0: 4,60; AL 5: 4,49; AL 15: 4,42; AL 15 vs 0: -0,18 (0,02)

$(C_2+C_4)/C_3$ - AL 0: 5,20; AL 5: 5,09; AL 15: 5,03; AL 15 vs 0: -0,17 (0,02); AL 5 vs 0: -0,11 (0,09)

Tabella 8 – Effetto del livello di acido lattico (AL: 0, 5, 15 mg/campione) sul volume finale di gas prodotto (Vf, Ml/g di SO), tasso di produzione di gas (Kd, ore⁻¹), inerzia di fermentazione (Lag, ore) e tempo per raggiungere la metà del volume finale di gas prodotto (T½, ore) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 1 e con diverse fonti di amido (FA)

	Fonte di amido (FA)															Residual	P							
	Mais (M)					Mais fiocco (MF)					Orzo (O)									Orzo fiocco (OF)				
	0		5		15	0		5		15	0		5		15					0		5		15
Vf	289,9	303,9	314,3	290,1	294,5	300	295,4	305,8	305,5	292,4	301	311	88,524	0,05	< 0,01	0,42								
Kd	0,078	0,076	0,085	0,097	0,095	0,102	0,089	0,087	0,099	0,087	0,089	0,096	0,00003	< 0,01	< 0,01	0,75								
Lag	0,15	0,14	0,07	0,25	0,18	0,07	0	0	0	0,04	0,02	0	0,007	< 0,01	< 0,01	0,21								
T½	8,81	9,01	8,19	6,99	7,18	6,80	7,85	8	7,07	8	7,85	7,23	0,240	< 0,01	< 0,01	0,66								

Media marginale ed effetto principale per fattore

Fonte di Amido

Vf - M: 302,7; MF: 294,9; O: 302,3; OF: 301,4; MF vs. OF: -6,59 (0,04); M vs. MF: 7,8 (0,02)

kd - M: 0,08; MF: 0,098; O: 0,092; OF: 0,091; M vs. O: -0,012 (<0,01); MF vs. OF: 0,007 (<0,01); M vs. MF: -0,018 (<0,01)

Lag - M: 0,12; MF: 0,17; O: 0; OF: 0,02; M vs. O: 0,12 (<0,01); MF vs. OF: 0,14 (<0,01)

T½ - M: 8,67; MF: 6,99; O: 7,64; OF: 7,69; M vs. O: 1,03 (<0,01); MF vs. OF: -0,70 (<0,01)

Acido Lattico

Vf - AL 0: 291,9; AL 5: 301,3; AL 15: 307,7; AL 15 vs. 0: 15,8 (<0,01); AL 15 vs. 5: 6,40 (0,02); AL 5 vs. 0: 9,4 (<0,01)

kd - AL 0: 0,088; AL 5: 0,087; AL 15: 0,095; AL 15 vs. 0: 0,008 (<0,01); AL 15 vs. 5: 0,009 (<0,01)

Lag - AL 0: 0,11; AL 5: 0,09; AL 15: 0,03; AL 15 vs. 0: -0,08 (<0,01); AL 15 vs. 5: -0,05 (0,03)

T½ - AL 0: 7,91; AL 5: 8,01; AL 15: 7,32; AL 15 vs. 0: -0,59 (<0,01); AL 15 vs. 5: -0,69 (<0,01)

Tabella 9 – Effetto del livello di acido lattico (AL: 0, 5, 15 mg/campione) sul contenuto di acidi grassi volatili (AGV: MMol/g di SO) e rapporti in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 1 e con diverse fonti di amido (FA)

AGV	Fonte di amido (FA)												Residual			P		
	Mais (M)			Mais fioccato (MF)			Orzo (O)			Orzo fioccato (OF)								
	0	5	15	0	5	15	0	5	15	0	5	15	FA	AL	FA x AL			
	15,46	15,65	16,11	15,84	15,82	16,42	15,46	16,72	16,04	16,52	15,79	15,81	0,124	0,37	0,32	0,03		
Propionico	3,93	4,02	4,23	4,06	4,09	4,33	3,73	4,07	4,08	4,09	3,94	4,09	0,006	<0,01	<0,01	0,03		
Butirrico	2,64	2,78	2,94	2,70	2,75	2,92	2,55	2,79	2,83	2,72	2,76	2,85	0,003	0,16	<0,01	0,13		
Valerianico	0,311	0,314	0,324	0,322	0,323	0,328	0,311	0,33	0,331	0,34	0,328	0,327	0,00008	0,07	0,35	0,21		
Iso-butyrrico	0,258	0,257	0,258	0,259	0,264	0,259	0,247	0,263	0,241	0,262	0,256	0,248	0,00002	0,02	0,01	0,04		
Iso-valerianico	0,459	0,467	0,469	0,469	0,47	0,465	0,441	0,464	0,438	0,455	0,452	0,442	0,00003	<0,01	0,07	0,18		
Totali	23,06	23,48	24,33	23,65	23,72	24,73	22,74	24,63	23,96	24,39	23,53	23,77	0,177	0,42	0,02	<0,01		
C ₂ /C ₃	3,94	3,90	3,81	3,90	3,87	3,79	4,14	4,11	3,93	4,04	4	3,87	0,005	<0,01	<0,01	0,90		
(C ₂ +C ₄)/C3	4,61	4,59	4,51	4,56	4,54	4,46	4,83	4,80	4,62	4,70	4,70	4,56	0,007	<0,01	0,02	0,95		

Media Marginale ed effetto principale per fattore

Fonte di amido

Acido iso-valerianico - M:0,47; MF: 0,48; O: 0,45; OF: 0,45; M vs O: 0,018 (<0,01); MF vs OF: 0,018 (<0,01);
C₂/C₃ - M: 3,88; MF: 3,85; O: 4,06; OF: 3,97; M vs O: -0,18 (<0,01); MF vs OF: -0,12 (0,01); O vs OF: 0,09 (0,05)

(C₂+C₄)/C₃ - M: 4,57; MF: 4,52; O: 4,75; OF: 4,66; M vs O -0,18 (<0,01); MF vs OF: -0,14 (0,02)

Acido lattico

Acido butirrico - AL 0: 2,65; AL 5: 2,77; AL 15: 2,88; AL 5 vs 0: 0,12 (<0,01); AL 15 vs 0: 0,23 (<0,01); AL 15 vs 5: 0,11 (<0,01)

Acido iso-valerianico - AL 0: 0,46; AL 5: 0,46; AL 15: 0,45; AL 15 vs 5: -0,01 (0,03)

C₂/C₃ - AL 0: 4; AL 5: 3,97; AL 15: 3,85; AL 15 vs 0: -0,16 (<0,01); AL 15 vs 5: -0,12 (<0,01)

(C₂+C₄)/C₃ - AL 0: 4,68; AL 5: 4,66; AL 15: 4,54; AL 15 vs 0: -0,14 (<0,01); AL 15 vs 5: -0,12 (0,02)

Effetto semplice AL 15 vs 0

Acido acetico - M+MF: 0,62 (0,03); Acido propionico - M: 0,30 (<0,01); MF: 0,27 (<0,01); O: 0,35 (<0,01);

Acido butirrico - M+MF: 0,26 (<0,01); M: 0,31 (<0,01); MF: 0,22 (<0,01); O+OF: 0,20 (<0,01); O: 0,28 (<0,01); OF: 0,13 (0,04); Acido iso-butyrico - OF: -0,01 (0,01); Totali - M+MF: 1,17 (<0,01); M: 1,27 (0,01); MF: 1,08 (0,03); O: 1,22 (0,01)

Effetto semplice AL 15 vs 5

Acido acetico - M+MF: 0,53 (0,05); Acido propionico - M: 0,21 (0,02); MF: 0,24 (0,01); Acido butirrico - M+MF: 0,16 (<0,01); M: 0,16 (0,01); MF: 0,16 (0,01);

Acido iso-butyrico - O: -0,02 (<0,01); Totali -M+MF: 0,92 (0,01); MF: 1 (0,04)

Effetto semplice AL 5 vs 0

Acido acetico - O: 1,26 (<0,01); Acido propionico - O: 0,33 (<0,01); Acido butirrico - M+MF: 0,10 (0,02); M: 0,15 (0,02); O+OF: 0,14 (<0,01); O: 0,24 (<0,01);

Acido iso-butyrico - O: 0,02 (<0,01); Totali - O: 1,89 (<0,01)

Tabella 10 – Effetto del livello di acido lattico (AL: 0, 5, 15 mg/campione) sul volume finale di gas prodotto (Vf, ML/g di SO), tasso di produzione di gas (Kd, ore⁻¹), inerzia di fermentazione (Lag, ore) e tempo per raggiungere la metà del volume finale di gas prodotto (T½, ore) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 2 e con diverse fonti di amido (FA)

	Fonte di amido (FA)												Residual	P		
	Mais (M)			Mais fiocco (MF)			Orzo (O)			Orzo fiocco (OF)				FA	AL	FA x AL
	0	5	15	0	5	15	0	5	15	0	5	15				
Vf	257,7	272,2	280	250	256,3	267,6	258,2	270	280	265,1	261,1	279,4	130	<0,01	<0,01	0,59
Kd	0,066	0,065	0,069	0,078	0,076	0,083	0,064	0,067	0,074	0,066	0,073	0,076	0,00002	<0,01	<0,01	0,07
Lag	0,55	0,41	0,25	0,42	0,26	0,18	0,01	0	0	0,19	0,11	0,02	0,007	<0,01	<0,01	<0,01
T½	9,99	10,32	9,90	8,46	9,02	8,24	10,91	10,45	9,38	10,38	9,51	9,22	0,378	<0,01	<0,01	0,02

Media marginale ed effetto principale per fattore

Fonte di Amido

Vf - M: 270; MF: 258; O: 269,4; OF: 268,5; MF vs OF: -10,6 (<0,01); M vs MF: 12 (<0,01)

kd - M: 0,067; MF: 0,079; O: 0,068; OF: 0,072; MF vs OF: 0,007 (<0,01); M vs. MF: -0,012 (<0,01); O vs OF: -0,004 (0,02)

Acido Lattico

Vf - AL 0: 257,8; AL 5: 264,9; AL 15: 276,7; AL 15 vs 0: 19 (<0,01); AL 15 vs 5: 11,8 (0,02); AL 5 vs 0: 7,1 (0,03)

kd - AL 0: 0,069; AL 5: 0,07; AL 15: 0,076; AL 15 vs 0: 0,007 (<0,01); AL 15 vs 5: 0,005 (<0,01)

Effetto semplice lattico 15 vs 0

T½ - O: -1,53 (<0,01); OF: -1,16 (<0,01)

Lag - M: -0,31 (<0,01); MF: -0,24 (<0,01); OF: -0,18 (<0,01)

Effetto semplice lattico 15 vs 5

T½ - MF: -0,77 (0,03); O: -1,06 (<0,01)

Lag - M: -0,16 (<0,01)

Effetto semplice lattico 5 vs 0

T½ - OF: -0,87 (0,02)

Lag - M: -0,14 (<0,01); MF: -0,16 (<0,01)

Tabella 11 – Effetto del livello di acido lattico (AL: 0, 5, 15 mg/campione) sul contenuto di acidi grassi volatili (AGV: MMol/g di SO) e rapporti in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 2 e con diverse fonti di amido (FA)

AGV	Fonte di amido (FA)												Residual	P		
	Mais (M)			Mais fioccato (MF)			Orzo (O)			Orzo fioccato (OF)				FA	LA	FA x LA
	0	5	15	0	5	15	0	5	15	0	5	15				
Acetico	20,84	17,98	16,80	17,80	19,01	15,36	30,29	18,18	20,56	17,71	24,02	19,33	6,854	0,02	0,05	0,02
Propionico	4,71	4,1	4,14	4,21	4,3	3,85	6,1	4,03	4,66	4,11	5,05	4,55	0,212	0,05	0,12	0,02
Butirico	2,89	2,57	2,68	2,59	2,63	2,52	3,56	2,60	2,93	2,62	3,04	2,97	0,049	0,02	0,22	0,03
Valerianico	0,354	0,320	0,314	0,325	0,321	0,299	0,437	0,332	0,352	0,343	0,382	0,368	0,0005	<0,01	0,03	0,02
Iso-butyrico	0,295	0,259	0,248	0,264	0,254	0,234	0,338	0,266	0,269	0,276	0,287	0,278	0,0002	<0,01	<0,01	0,04
Iso-valerianico	0,505	0,447	0,438	0,464	0,446	0,416	0,547	0,449	0,448	0,456	0,476	0,477	0,0006	0,11	<0,01	0,05
Totali	29,60	25,68	24,62	25,65	26,96	22,68	41,27	25,86	29,22	25,52	33,26	27,97	11,203	0,02	0,07	0,02
C ₂ /C ₃	4,40	4,39	4,05	4,23	4,41	3,99	4,96	4,52	4,40	4,31	4,75	4,25	0,013	<0,01	<0,01	<0,01
(C ₂ +C ₄)/C ₃	5,02	5,02	4,70	4,85	5,02	4,65	5,54	5,16	5,03	4,94	5,35	4,90	0,011	<0,01	<0,01	<0,01

Effetto semplice LA 15 vs 0

Acido acetico - O: -9,72 (<0,01);

Acido propionico - O: -1,44 (<0,01); MF: 0,27 (<0,01); O: 0,35 (<0,01);

Acido iso-butirrico - M: -0,046 (<0,01); O: -0,069 (<0,01);

Acido butirrico - O: -0,63 (0,02)

Acido iso-valerianico - M+MF: -0,057 (<0,01); M: -0,067 (0,02); O+OF: -0,042 (0,03); O: -0,104 (<0,01)

Acido valerianico: O: -0,085 (<0,01)

C_2/C_3 - M: -0,35 (0,01); O: -0,56 (<0,01)

$(C_2+C_4)/C_3$ - M: -0,32 (0,01); O: -0,51 (<0,01)

Totali - O: -12,05 (<0,01)

Effetto semplice LA 15 vs 5

C_2/C_3 - M: -0,33 (0,01); MF: -0,42 (<0,01); OF: -0,5 (<0,01)

$(C_2+C_4)/C_3$ - M: -0,31 (0,01); MF: -0,37 (<0,01); OF: -0,45 (<0,01)

Effetto semplice LA 5 vs 0

Acido acetico - O: -12,10 (<0,01); OF: 6,31 (0,03)

Acido propionico - O: -2,07 (<0,01);

Acido iso-butirrico - M: -0,035 (0,04); O: -0,072 (<0,01)

Acido butirrico - O: -0,95 (<0,01);

Acido iso-valerianico - M+MF: -0,038 (0,05); M: -0,057 (0,04); O+OF: -0,04 (0,04); O: -0,1 (<0,01)

Acido valerianico: O: -0,105 (<0,01)

C_2/C_3 - O: -0,44 (<0,01); OF: 0,44 (<0,01)

$(C_2+C_4)/C_3$ - O: -0,38 (<0,01); OF: 0,41 (<0,01)

Totali - O: -15,41 (<0,01); OF: 7,73 (0,04)

Tabella 12 – Effetto del livello di acido lattico (AL: 0, 5, 15 mg/campione) sul volume finale di gas prodotto (Vf, MI/g di SO), tasso di produzione di gas (Kd, ore⁻¹), inerzia di fermentazione (Lag, ore) e tempo per raggiungere la metà del volume finale di gas prodotto (T½, ore) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 3 e con diverse fonti di amido (FA)

	Fonte di amido (FA)												Residual	P		
	Mais (M)			Mais fiocco (MF)			Orzo (O)			Orzo fiocco (OF)						
	0	5	15	0	5	15	0	5	15	0	5	15		FA	AL	FA x AL
Vf	266,7	281,3	293,6	257,3	268,6	285,4	280,8	282,8	296,2	273,3	287,2	292,7	76,499	<0,01	<0,01	0,31
Kd	0,055	0,056	0,058	0,060	0,061	0,063	0,059	0,060	0,062	0,060	0,059	0,064	0,00001	< 0,01	<0,01	0,91
Lag	1,44	1,27	0,98	1,36	1,28	0,87	1,10	0,92	0,63	1,13	0,94	0,68	0,011	<0,01	<0,01	0,70
T½	11,29	11,17	10,97	10,14	10,14	10,09	10,57	10,66	10,55	10,46	10,86	10,15	0,413	<0,01	0,35	0,88

Media marginale ed effetto principale per fattore

Fonte di Amido

Vf - M: 280,5; MF: 270,5; O: 286,6; OF: 284,4; M vs, O: -6,1 (0,04); MF vs OF: -13,9 (<0,01); M vs MF: 10,1 (<0,01)

T½ - M: 11,14; MF: 10,12; O: 10,59; OF: 10,49; M vs O: 0,55 (0,01); M vs MF: 1,02 (<0,01)

kd - M: 0,056; MF: 0,062; O: 0,061; OF: 0,061; M vs O: -0,004 (<0,01); M vs MF: -0,005 (<0,01)

Lag - M: 1,23; MF: 1,17; O: 0,88; OF: 0,92; M vs O: 0,35 (<0,01); MF vs OF: 0,26 (<0,01)

Acido Lattico

Vf - AL 0: 269,5; AL 5: 280; AL 15: 292; AL 15 vs 0: 22,5 (<0,01); AL 15 vs 5: 12 (<0,01); AL 5 vs 0: 10,5 (<0,01)

T½ - AL 0: 10,61; AL 5: 10,71; AL 15: 10,44;

kd - AL 0: 0,059; AL 5: 0,059; AL 15: 0,062; AL 15 vs 0: 0,003 (<0,01); AL 15 vs 5: 0,003 (<0,01)

Lag - AL 0: 1,26; AL 5: 1,11; AL 15: 0,79; AL 15 vs 0: -0,46 (<0,01); AL15 vs 5: -0,31 (<0,01); AL 5 vs 0: -0,15 (<0,01)

Tabella 13 – Effetto del livello di acido lattico (AL: 0, 5, 15 mg/campione) sul contenuto di acidi grassi volatili (AGV: MMol/g di SO) e rapporti in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 3 e con diverse fonti di amido (FA)

AGV	Fonte di amido (FA)															Resi- dual	P		
	Mais (M)			Mais fioccato (MF)			Orzo (O)			Orzo fioccato (OF)									
	0	5	15	0	5	15	0	5	15	0	5	15	FA	AL	FA x AL				
Acetico	15,02	14,39	14,67	14,7	15,06	18,19	24,87	16,31	18,98	13,73	13,29	13,89	0,11	0,56	0,72				
Propionico	3,70	3,61	3,76	3,70	3,84	4,50	5,53	3,95	4,53	3,47	3,39	3,60	0,15	0,58	0,76				
Butirrico	2,71	2,66	2,77	2,62	2,74	3,14	3,48	2,74	3,13	2,52	2,48	2,65	0,18	0,45	0,74				
Valerianico	0,268	0,256	0,259	0,268	0,266	0,289	0,320	0,271	0,289	0,259	0,254	0,254	0,24	0,58	0,90				
Iso-butyrrico	0,213	0,203	0,206	0,209	0,209	0,227	0,247	0,208	0,217	0,203	0,195	0,190	0,26	0,52	0,84				
Iso-valerianico	0,372	0,358	0,356	0,366	0,365	0,383	0,406	0,362	0,373	0,354	0,346	0,330	0,39	0,63	0,94				
Totali	22,28	21,47	22,02	21,85	22,48	26,72	34,85	23,84	27,52	20,53	19,95	20,91	0,12	0,57	0,73				
C ₂ /C ₃	4,06	3,99	3,90	3,97	3,92	4,03	4,38	4,12	4,18	3,95	3,92	3,85	<0,01	0,10	0,39				
(C ₂ +C ₄)/C ₃	4,79	4,72	4,64	4,68	4,63	4,73	5,04	4,81	4,87	4,68	4,65	4,59	<0,01	0,06	0,23				

Media marginale ed effetto principale per fattore

Fonte di Amido

C_2/C_3 - M: 3,98; MF: 3,98; O: 4,23; OF: 3,91; M vs O: -0,25 (<0,01); O vs OF: 0,32 (<0,01)

$(C_2+C_4)/C_3$ - M: 4,72; MF: 4,78; O: 4,91; OF: 4,64; M vs O: -0,19 (<0,01); O vs OF: 0,27 (<0,01)

Acido Lattico

$(C_2+C_4)/C_3$ - AL 0: 4,80; AL 5: 4,71; AL 15: 4,71; AL 15 vs 0: -0,09 (0,04); AL 5 vs 0: -0,09 (0,03)

Figura 1 – Effetto del livello di amido (15, 25 e 35% SS) ed acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul volume finale di gas (Vf, ml/g sostanza organica)

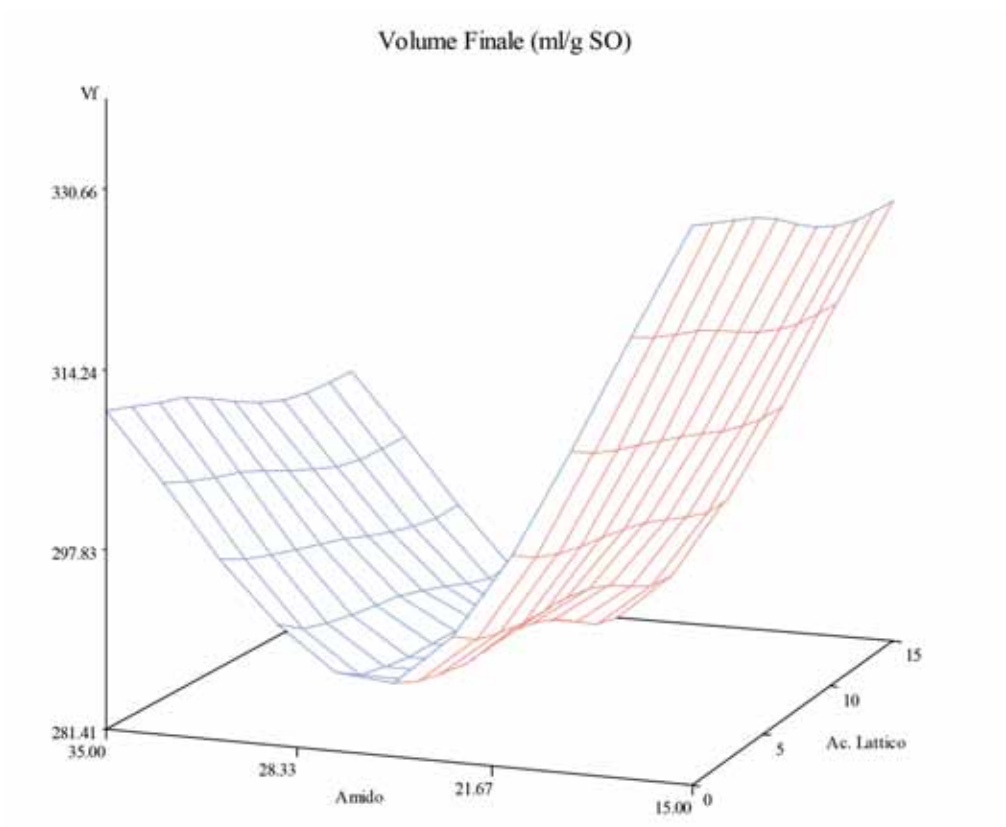


Figura 2 - Effetto del livello di amido (15, 25 e 35% SS) ed acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul tasso di produzione di gas (k, h⁻¹)

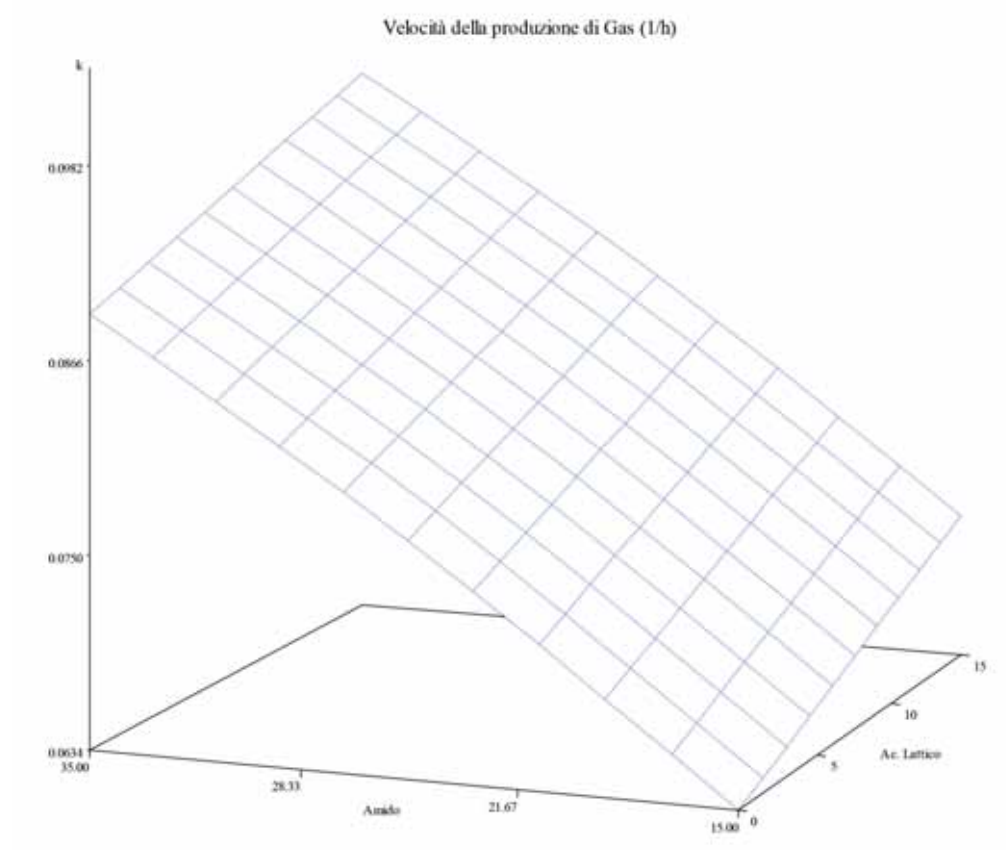


Figura 3 – Effetto del livello di amido (15, 25 e 35% SS) ed acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul T½ di produzione di gas (T½, h)

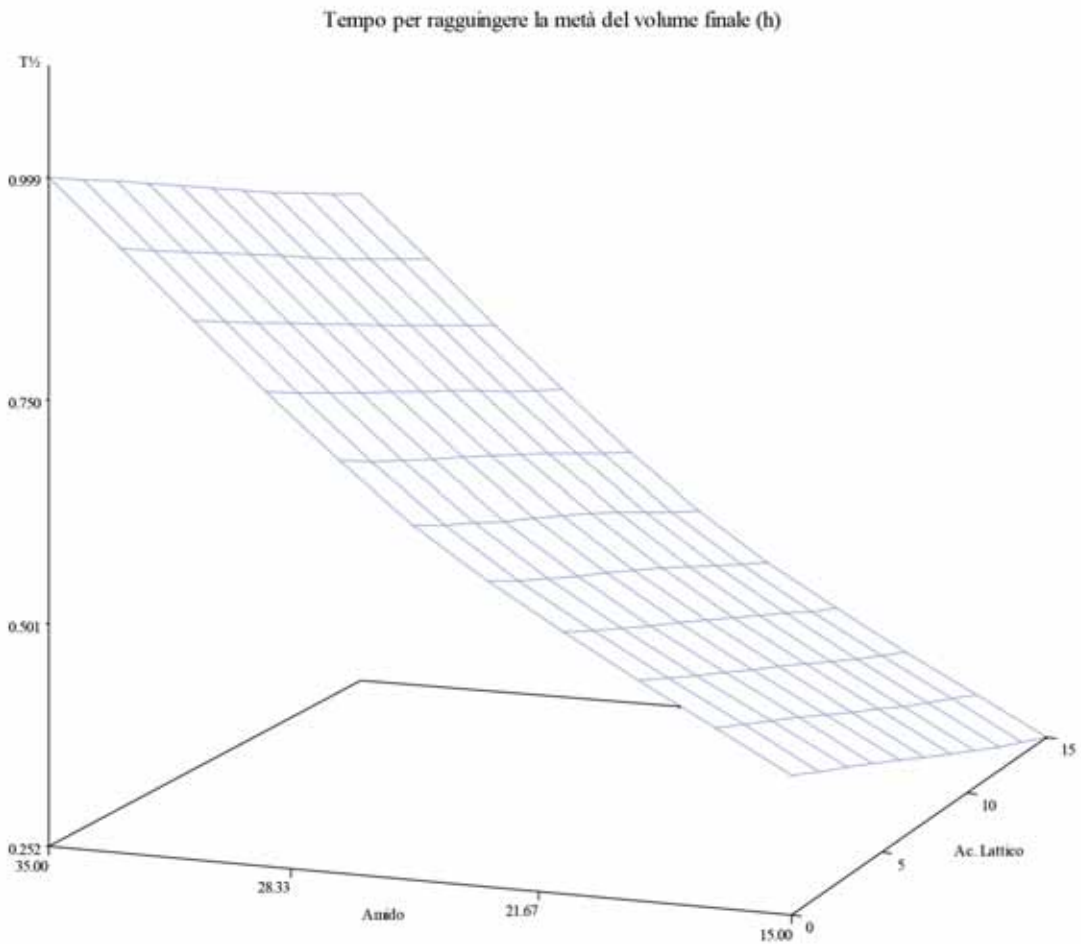
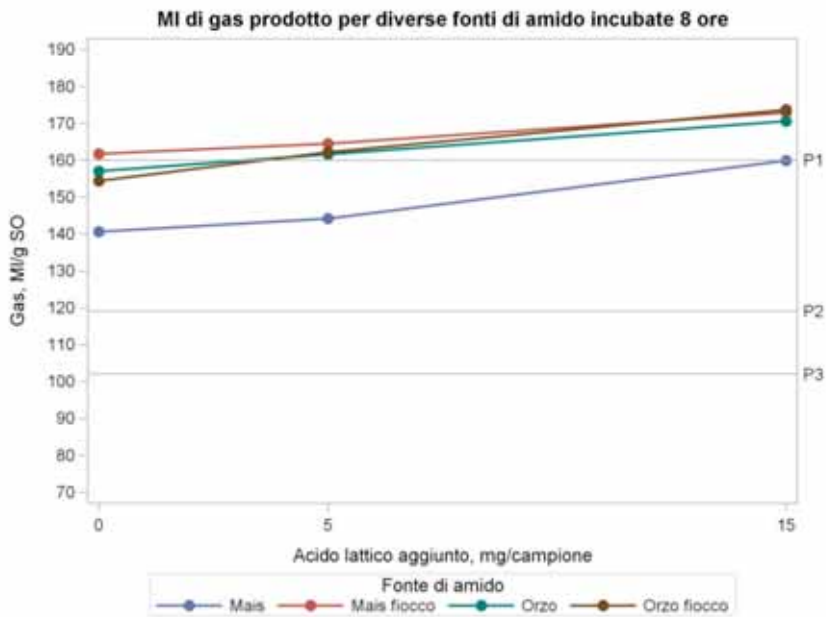
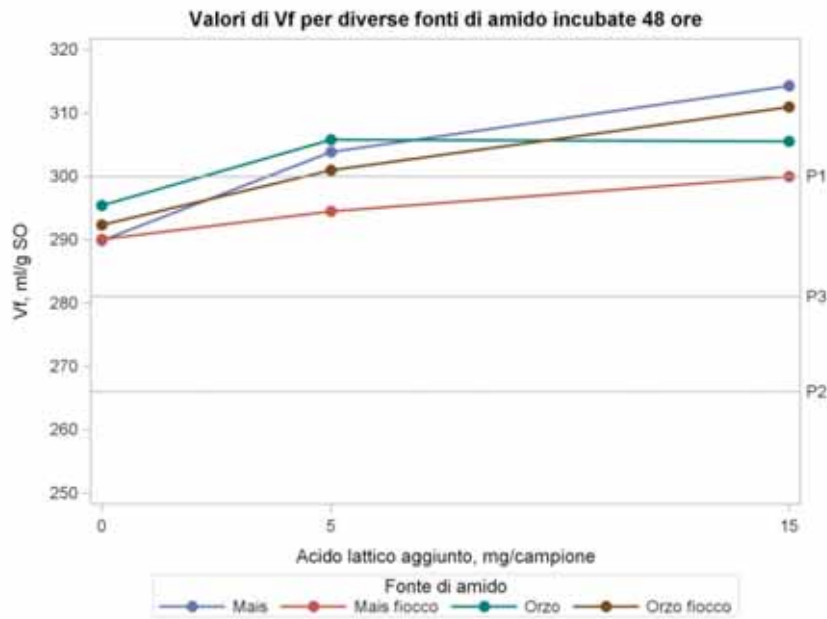


Figura 4 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul volume di gas prodotto a 8 ore (MI/g SO) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 1 e con diverse fonti di amido.



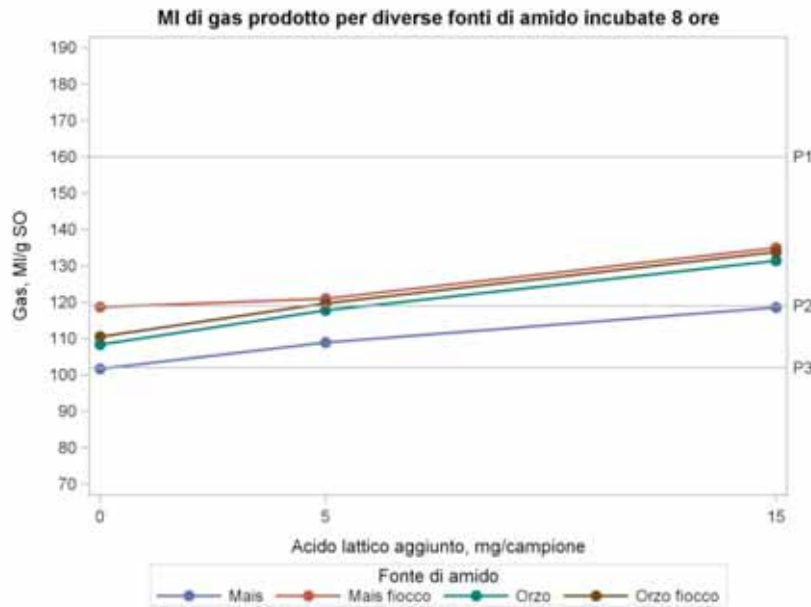
P1, P2, P3 Livello medio di gas prodotto considerando tutte le tesi per il periodo 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3)

Figura 5 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul volume finale (Vf) di gas prodotto a 48 ore (Ml/g SO) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 1 e con diverse fonti di amido.



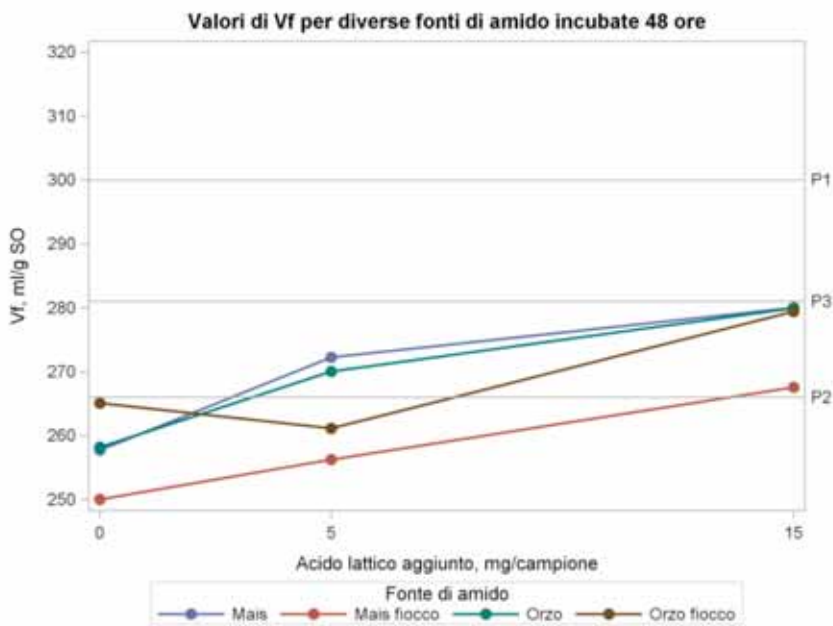
P1, P2, P3 Livello medio di gas prodotto considerando tutte le tesi per il periodo 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3)

Figura 6 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul volume di gas prodotto a 8 ore (Ml/g SO) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 2 e con diverse fonti di amido.



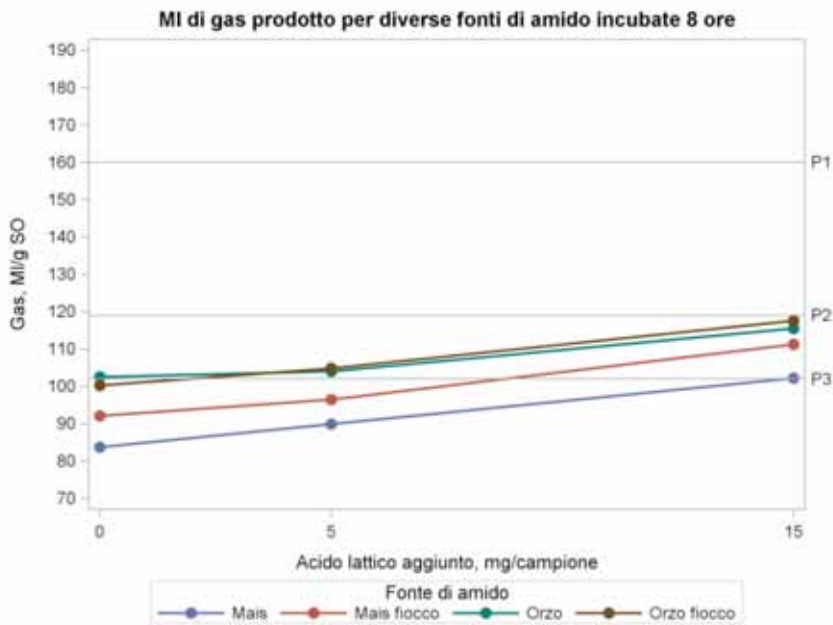
P1, P2, P3 Livello medio di gas prodotto considerando tutte le tesi per il periodo 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3)

Figura 7 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul volume finale (Vf) di gas prodotto (Ml/g SO) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 2 e con diverse fonti di amido.



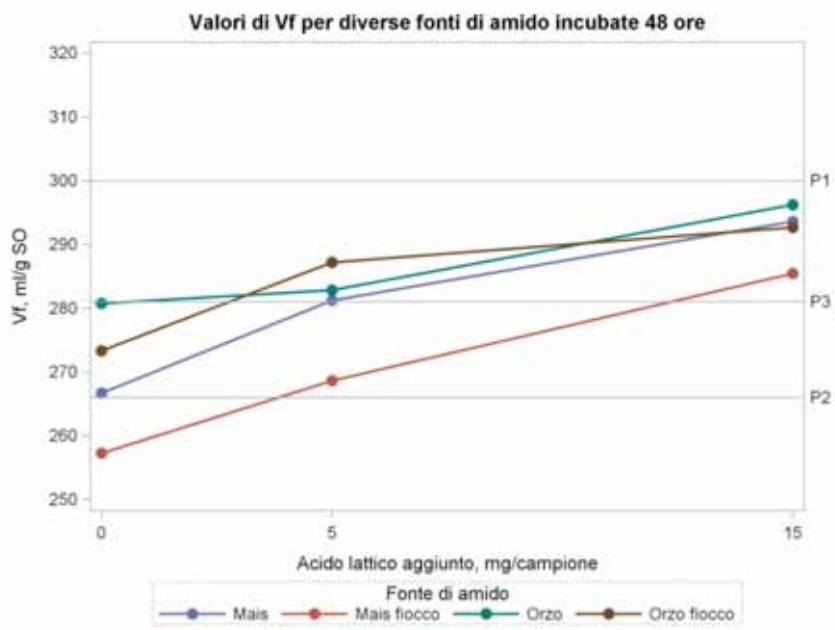
P1, P2, P3Livello medio di gas prodotto considerando tutte le tesi per il periodo 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3)

Figura 8 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul volume di gas prodotto a 8 ore (Ml/g SO) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 3 e con diverse fonti di amido.



P1, P2, P3Livello medio di gas prodotto considerando tutte le tesi per il periodo 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3)

Figura 9 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul volume finale (Vf) di gas prodotto (Ml/g SO) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 3 e con diverse fonti di amido.



P1, P2, P3 Livello medio di gas prodotto considerando tutte le tesi per il periodo 1 (P1), 2 (P2) e 3 (P3)

Figura 10 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sull' inerzia di fermentazione (Lag, ore) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 3 e con diverse fonti di amido

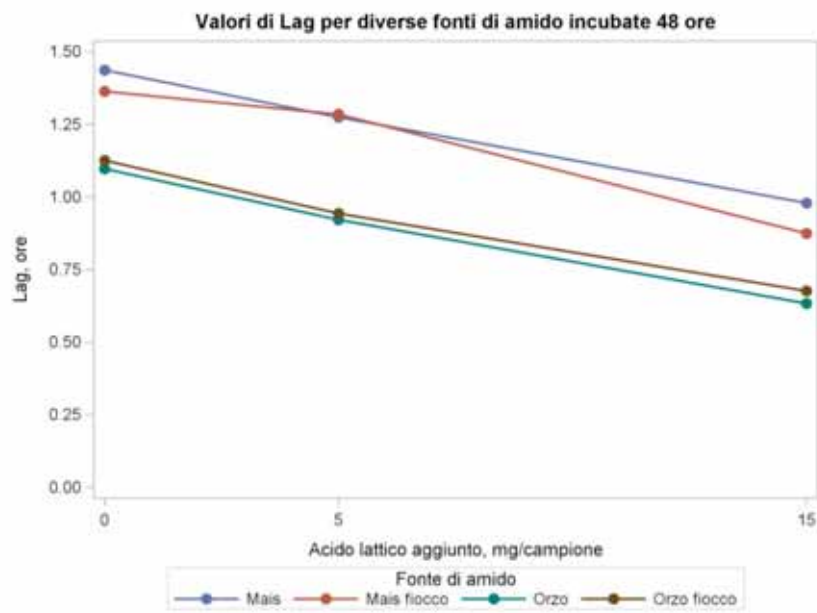


Figura 11 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul tempo per raggiungere la metà del volume finale di gas prodotto ($T_{1/2}$) in campioni incubati in vitro con base foraggera del Periodo 3 e con diverse fonti di amido

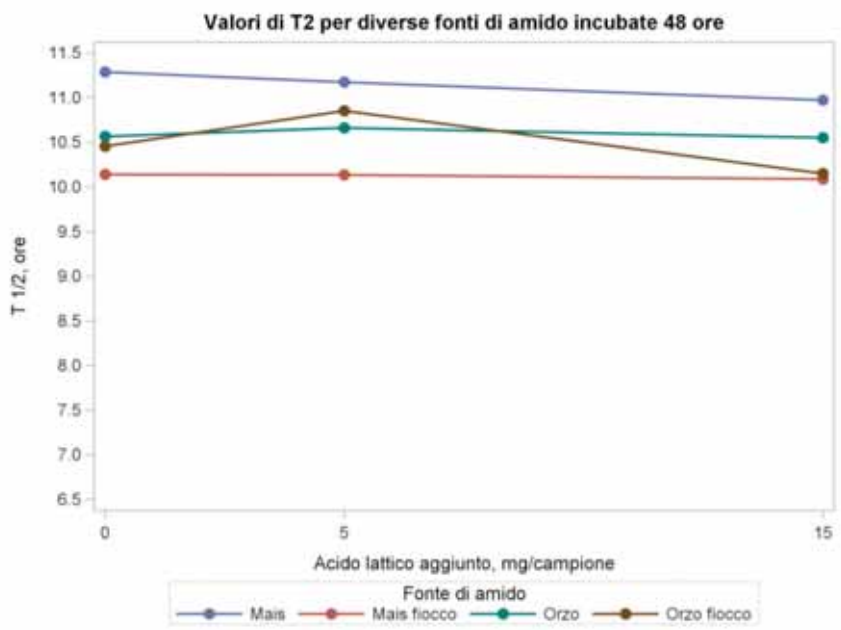


Figura 12 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul contenuto di isoacidiacidi (isobutirrico + isovalerianico) in campioni incubati in vitro per 48 ore con base foraggera del Periodo 1 e con diverse fonti di amido

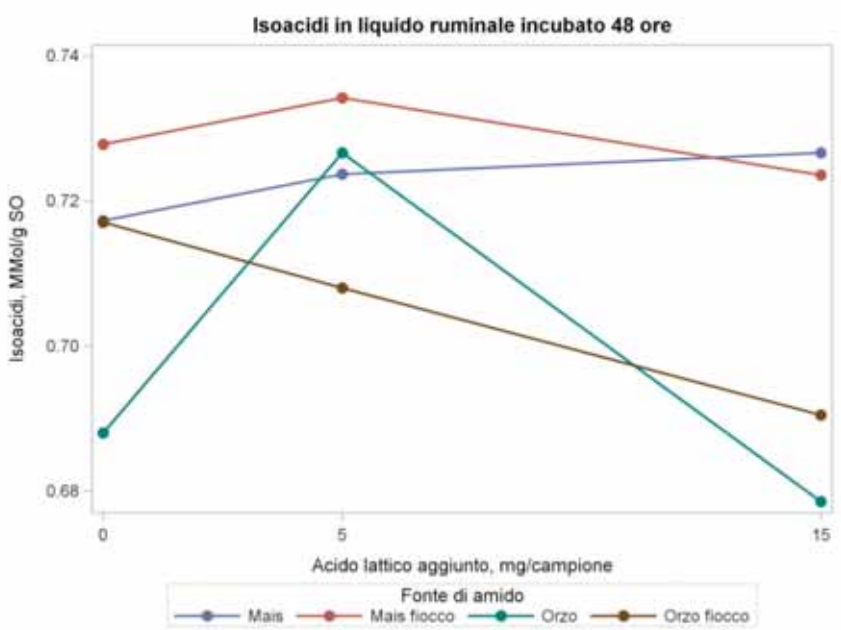


Figura 13 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul contenuto di isoacidiacidi, acido valerianico e butirrico in campioni incubati in vitro per 48 ore con base foraggera del Periodo 1 e con diverse fonti di amido

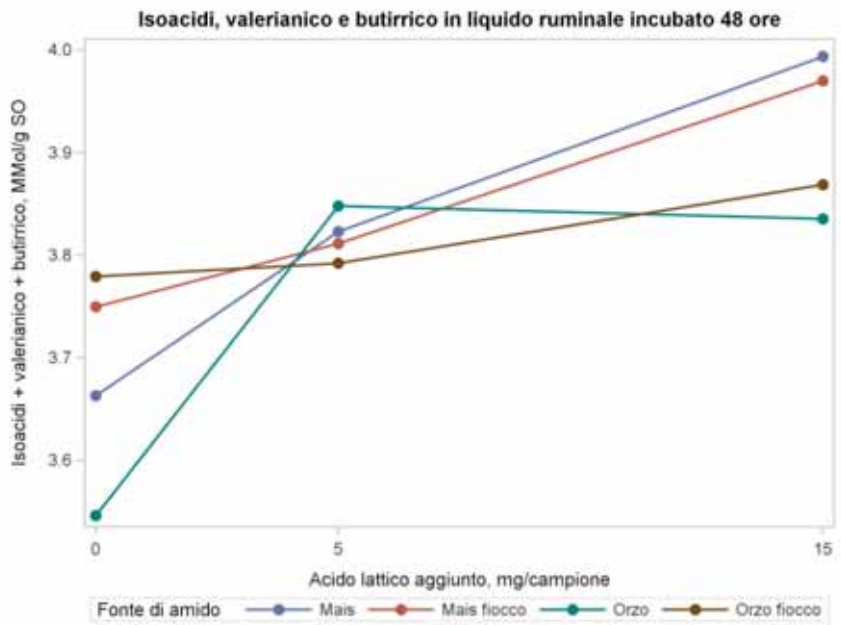


Figura 14 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul contenuto di isoacidiacidi (isobutirrico + isovalerianico) in campioni incubati in vitro per 48 ore con base foraggera del Periodo 2 e con diverse fonti di amido

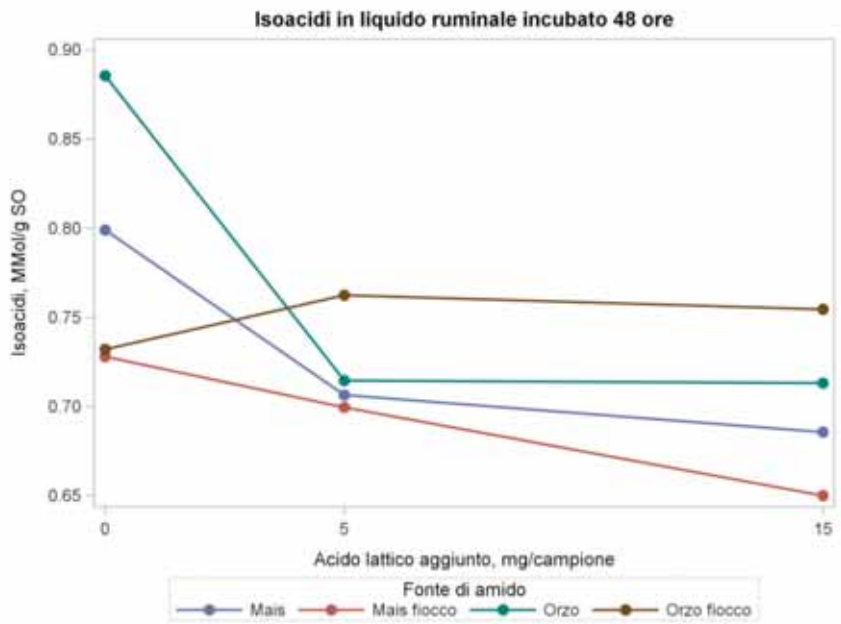


Figura 15 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul contenuto di isoacidiacidi, acido valerianico e butirrico in campioni incubati in vitro per 48 ore con base foraggera del Periodo 2 e con diverse fonti di amido

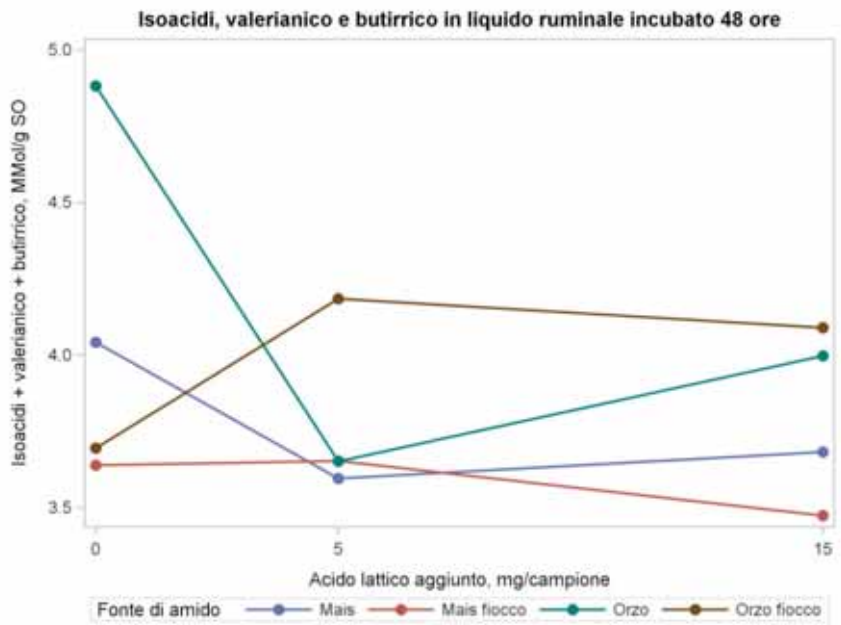


Figura 16 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul contenuto di isoacidiacidi (isobutirrico + isovalerianico) in campioni incubati in vitro per 48 ore con base foraggera del Periodo 3 e con diverse fonti di amido

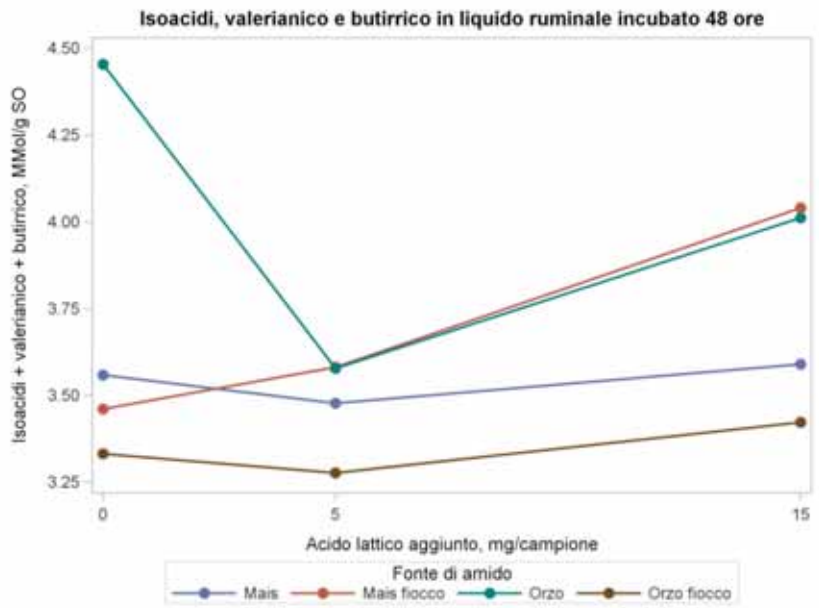
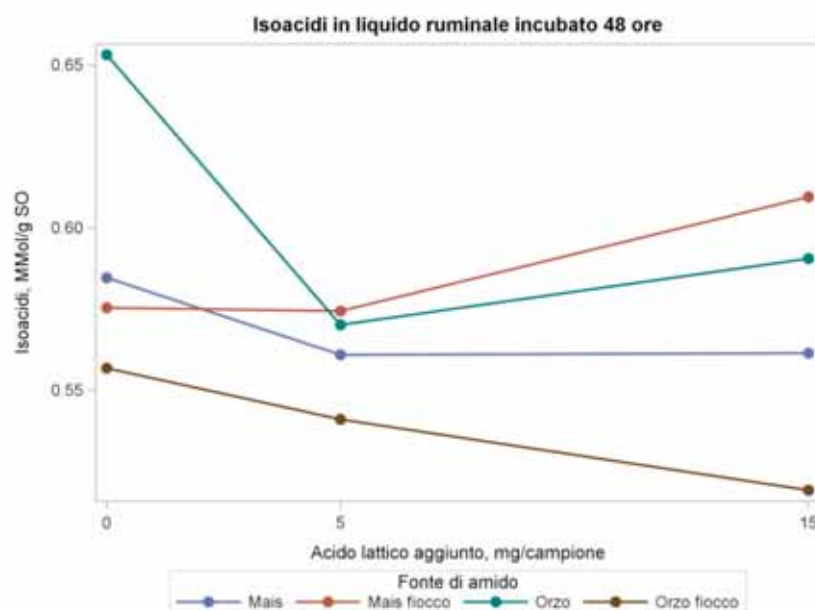


Figura 17 - Effetto del livello di acido lattico (0, 5, 15 mg/campione) sul contenuto di isoacidiacidi, acido valerianico e butirrico in campioni incubati in vitro per 48 ore con base foraggera del Periodo 3 e con diverse fonti di amido



3.7 Sottoprogetto 2 – Genomica Clostridi scheda A
 U.O. UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE
 Istituto di Microbiologia - Centro Ricerche Biotecnologiche (CRB)
 Responsabile Prof. Pier Sandro Cocconcelli
 Ricercatori Dott.ssa Daniela Bassi, Dott.ssa Roberta Esposito

1. Obiettivi del sottoprogetto 2 – Genomica Clostridi scheda A

Le attività di ricerca condotte mediante tecniche molecolari coltivazione-indipendenti sono state mirate al raggiungimento dei seguenti obiettivi:

- Quantificazione mediante PCR in tempo reale di cellule e spore di *C. tyrobutyricum*** presenti nell'intera filiera di produzione del formaggio Grana Padano sia sul fronte agro-zootecnico (sulla base del piano sperimentale indicato da ERSAF: produzione di tre differenti desilamenti per l'alimentazione bovina) che su quello caseario;
- Studio in vitro delle fermentazioni ruminali sulle cinetiche di crescita e sopravvivenza di *C. tyrobutyricum*** (questa fase della ricerca è stata condotta in stretta collaborazione con l'Istituto di Scienze e degli alimenti e della nutrizione, ISAN, Università Cattolica).

I risultati ottenuti al termine del progetto sono mirati:

- Alla comprensione, mediante analisi qualitativa e quantitativa (PCR real-time) della diffusione del numero di cellule e spore di *C. tyrobutyricum*, uno dei principali agenti responsabile del gonfiore, in tutto l'arco della filiera di produzione del formaggio Grana Padano (in campioni di silomais, fieno silo, feci, latte di massa, latte in caldaia, formaggio) nelle diverse condizioni sperimentali previste da ERSAF;
- Alla valutazione del ruolo delle fermentazioni ruminali in funzione della dieta, della crescita e sopravvivenza delle spore di *C. tyrobutyricum* e loro numero.

Con i seguenti indicatori di risultato:

- valutazione mediante una metodica molecolare rapida e specifica del numero di cellule e spore di *C. tyrobutyricum* nell'intera filiera di produzione del formaggio Grana Padano e identificazione delle principali fonti di contaminazione e di come l'alimentazione animale può influenzarne la diffusione;
- comprensione delle cinetiche di crescita e di sopravvivenza delle spore e cellule vegetative in modelli di

- ruminale e intestino di bovini da latte;
- identificazione di parametri chiave per la valutazione della qualità del latte impiegato nella produzione del formaggio Grana Padano;
- sensibilità, riproducibilità e robustezza statistica dei protocolli analitici.

2. Attività di ricerca – Obiettivo a)

Messa a punto e applicazione di una metodica molecolare per la quantificazione dell'incidenza di *C. tyrobutyricum* nella filiera di produzione del formaggio Grana Padano a diverse condizioni di insilamento degli alimenti

Nel corso di questa fase della ricerca si è sviluppata la messa a punto di una metodica di quantificazione mediante PCR real-time di cellule e spore di *C. tyrobutyricum* presenti nell'intera filiera di produzione del formaggio Grana Padano sia sul fronte agro zootecnico che su quello caseario.

Campionamento

Sono stati eseguiti campionamenti sui prelievi effettuati da ERSAF, come previsto nel piano sperimentale del progetto. In particolare, la sperimentazione è stata effettuata prevedendo tre diversi desilamenti (detti moduli) per l'alimentazione bovina:

- I) silomais standard;
- II) loiessa fieno-silo;
- III) silomais innovativo.

I campionamenti sono stati effettuati per 3 settimane di prova (21 gg) sulle diverse matrici della filiera:

- ambito agro-zootecnico (stalla ERSAF): campioni di unifeed, silomais, fieno loiessa, fieno medica, mix aziendali, feci;
- caseificazione: campioni di latte, cagliate (basso rapporto G/C, con (L1) e senza lisozima (L0)) e formaggi a 9 e 16 mesi di stagionatura.

Tutti i campioni sono stati processati in doppio.

Estrazione DNA batterico totale dai campioni di alimenti zootecnici, contenuto ruminale, feci, latte, cagliata e formaggio.

La procedura di estrazione del DNA è stata ottimizzata per ottenere il DNA totale sia da cellule che da spore di *Clostridium*, tramite un trattamento meccanico (FastPrep® Instrument) a cui viene abbinato un processo enzimatico che consente la lisi sia delle cellule che delle spore presenti. Modalità differenti sono state applicate nella prima fase dell'estrazione in funzione delle differenti matrici di partenza (alimenti, feci, latte, cagliata, formaggio).

PCR Real time con cinetica TaqMan

È stata ottimizzata la metodica di PCR in tempo reale impiegando, primers complementari al gene strutturale *pta* (fosfotransacetilasi), per la determinazione quantitativa di *C. tyrobutyricum* come descritto da Bassi et al¹. Le curve standard sono state costruite utilizzando diluizioni decimali in serie di DNA estratto da una miscela di coltura cellulare, cresciuta 24 h, e di spore dei ceppi di *C. tyrobutyricum* DSMZ2637 e UC7086. Ogni standard è stato caricato in triplicato e la reazione di real-time PCR è stata ripetuta tre volte per verificare la ripetibilità del metodo. In Tab. 1 sono riportati, per entrambi i ceppi testati, i valori del rapporto segnali positivi/reazioni totali, media e deviazione standard dei valori dei cicli soglia (Ct), valori di quantificazione calcolati con qPCR e con la formula del genoma equivalente (GE).

¹. Daniela Bassi, Cecilia Fontana, Sonia Zucchelli, Simona Gazzola, Pier Sandro Cocconcelli. *TaqMan real time-quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for Clostridium tyrobutyricum quantification in animal feed, faeces, milk and cheese. International Dairy Journal* 33 (2013) 75-82.

DSMZ 2637		^a Signal ratio	^b C. tyrobutyricum GE/ml	Mean Ct ± SD	Log genoma target ml ⁻¹ with pta gene	^c R%	
$R^2 = 1$ $y = -3.224 \pm 40.39$							
	9/9		3.7x10 ⁶	19.25 ± 0.032	6.55		100.27
	9/9		3.7x10 ⁵	23.12 ± 0.094	5.38		103.49
	9/9		3.7x10 ⁴	26.58 ± 0.007	4.32		105.74
	9/9		3.7x10 ³	28.86 ± 0.011	3.63		98.29
	9/9		370	31.92 ± 0.015	2.46		104.39
	6/9		37	35.15 ± 0.065	1.71		91.70
UC7086		^a Signal ratio	^b C. tyrobutyricum GE/ml	Mean Ct ± SD	Log genoma target ml ⁻¹ with pta gene	^c R%	
$R^2 = 1$ $y = -3.511 \pm 40.59$							
	9/9		1.4x10 ⁶	19.02 ± 0.03	6.14		92.60
	9/9		1.4x10 ⁵	22.54 ± 0.06	5.14		91.29
	9/9		1.4x10 ⁴	25.94 ± 0.03	4.17		90.06
	9/9		1.4x10 ³	29.68 ± 0.22	3.11		85.67
	9/9		140	32.99 ± 0.06	2.16		100.93
	9/9		14	34.72 ± 0.09	1.14		100.00

Tabella 1 analisi dei due ceppi di *C. tyrobutyricum* DSMZ2637 e UC7086

La metodica di qPCR con cinetica TaqMan è stata impiegata in tutti i campioni della filiera nei rispettivi tre moduli predisposti nel progetto, al fine di valutare il grado di contaminazione da *C. tyrobutyricum* nelle diverse fasi di produzione del formaggio Grana Padano sia relativamente alla parte zootecnica che a quella casearia.

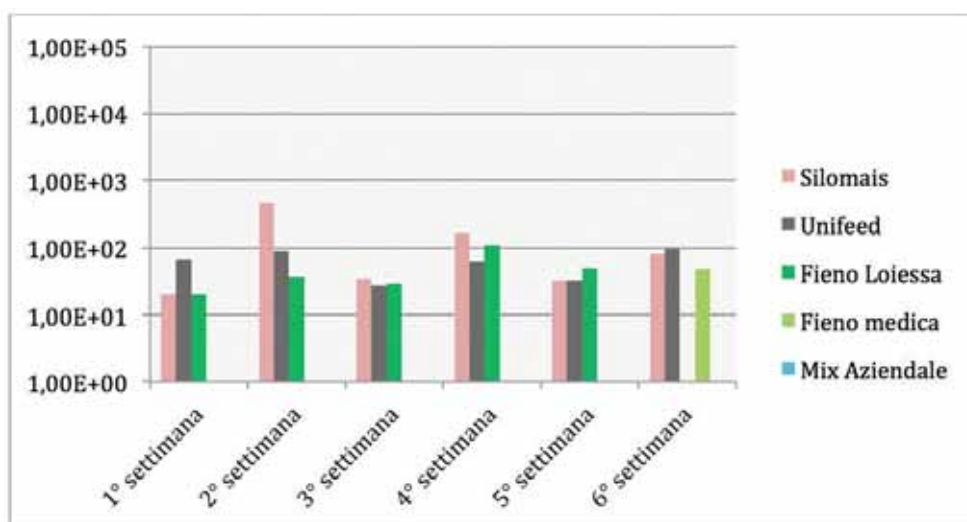
3. Risultati – Obiettivo a)

Risultati ottenuti per singolo modulo di alimentazione bovina

Primo modulo: alimentazione a silomais standard

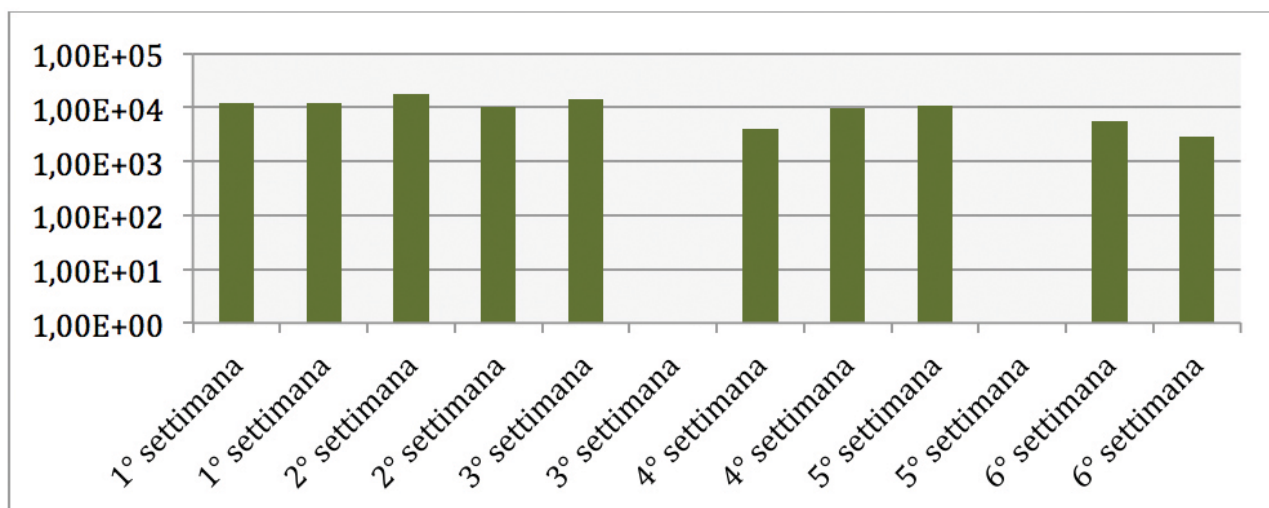
ALIMENTI ZOOTECNICI

Quantizzazione di cellule e spore di *C. tyrobutyricum* in alimenti zootecnici rilevati nelle sei settimane di campionamento. I dati sono espressi in unità formanti colonia su grammo o millilitro (UFC/g-ml) di sostanza analizzata ed espressi in scala logaritmica.



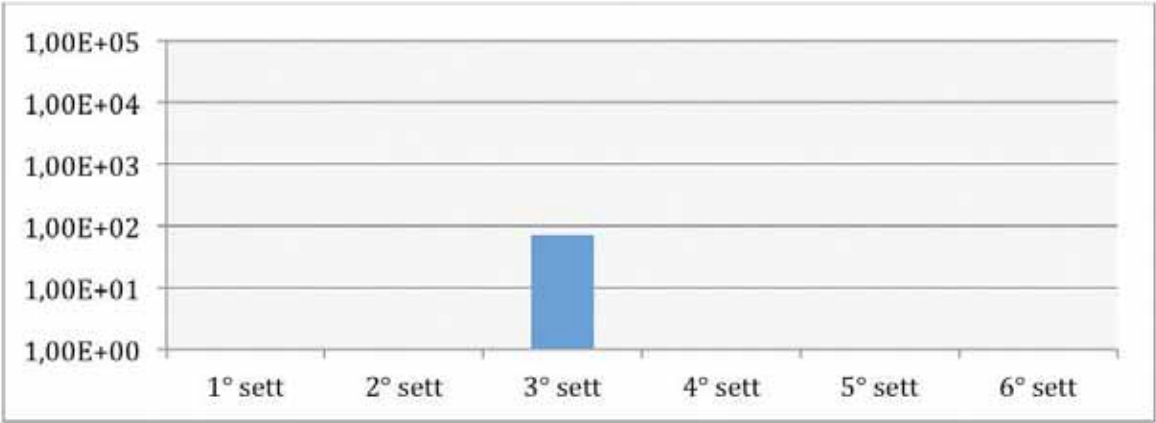
Gli alimenti analizzati nel I modulo sperimentale presentano valori di *C. tyrobutyricum* attorno a 10^2 UFC/g con numeri leggermente superiori in campioni di silomais.

FECI BOVINE

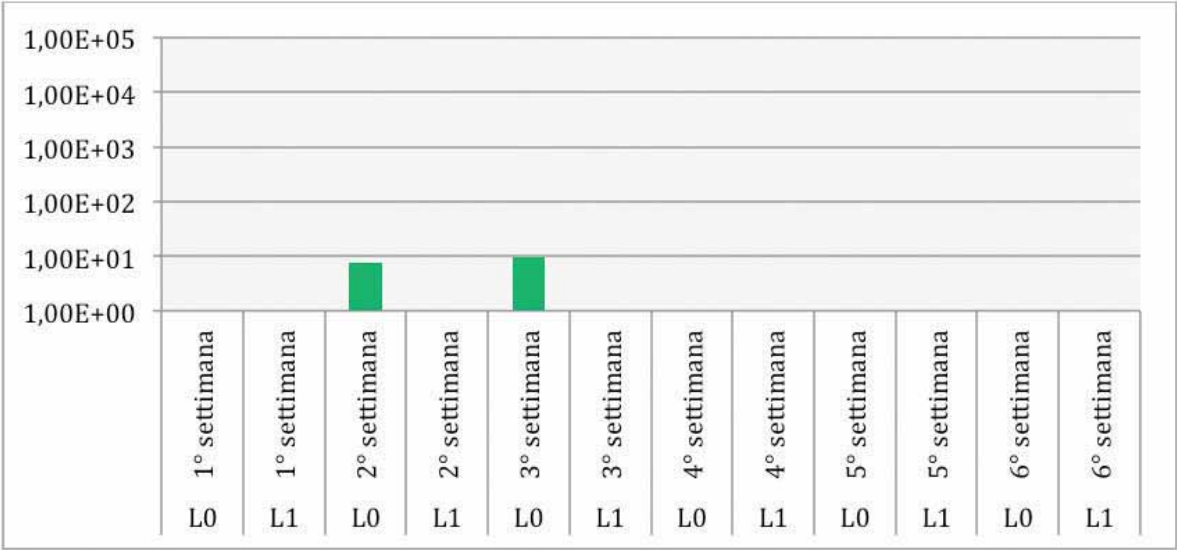


Il latte prodotto da animali alimentati a silomais standard, la cagliata durante la caseificazione e i formaggi sperimentali a 9 e 16 mesi di stagionatura sono stati analizzati per la presenza di cellule e spore di *C. tyrobutyricum*.

LATTE DI MASSA

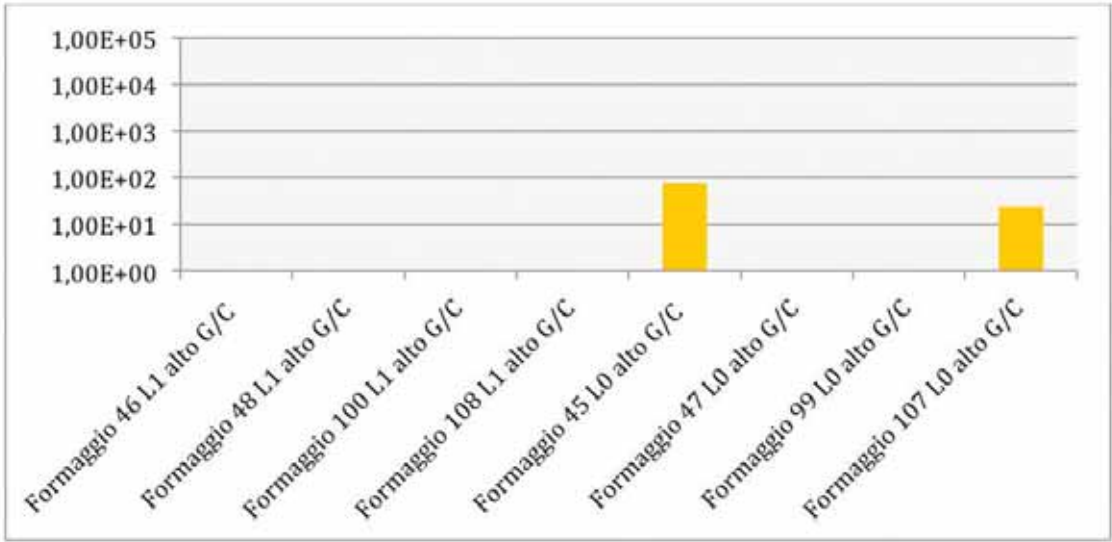


CAGLIATE



FORMAGGI A 9 E 16 MESI DI STAGIONATURA

4 campioni di formaggio a 9 mesi di stagionatura sono risultati negativi alla presenza di *C. tyrobutyricum*. Nei formaggi a 16 mesi basse positività sono state trovate nei campioni senza lisozima.



I formaggi prodotti a partire da latte proveniente da bovine alimentate a silomais standard sono risultati essere per lo più privi di evidenti difetti di gonfiore. Le quattro forme prodotte con lisozima, non presentano positività a *C. tyrobutyricum* e appaiono scelte ad un'osservazione visiva e alla precedente battitura.

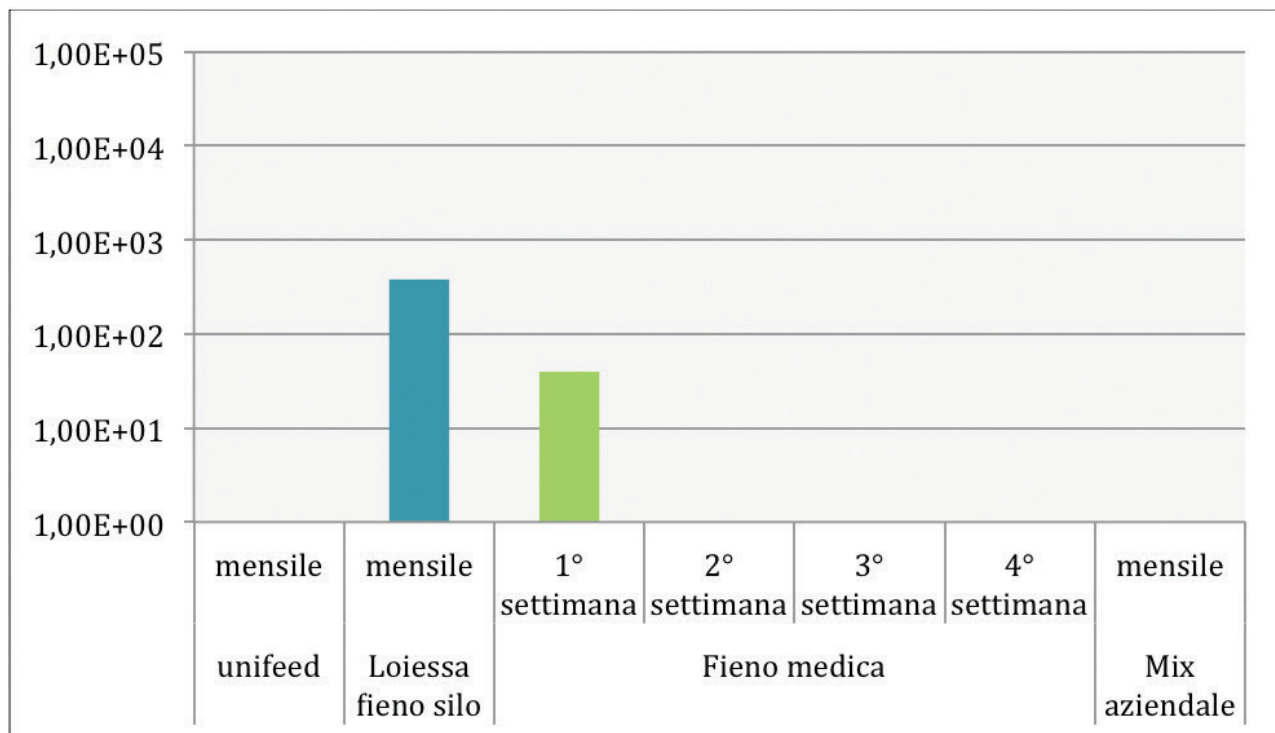


Le forme prodotte senza aggiunta di lisozima sono apparse scelte all'osservazione, mentre al taglio hanno presentato piccole fessurazioni nella pasta centrale dove è stato effettuato il prelievo per la determinazione di *C. tyrobutyricum*. In due campioni sono stati rilevati valori di *C. tyrobutyricum* pari rispettivamente a 7.87×10^1 (forma 45 L0) e 2.38×10^1 (forma 107 L0).

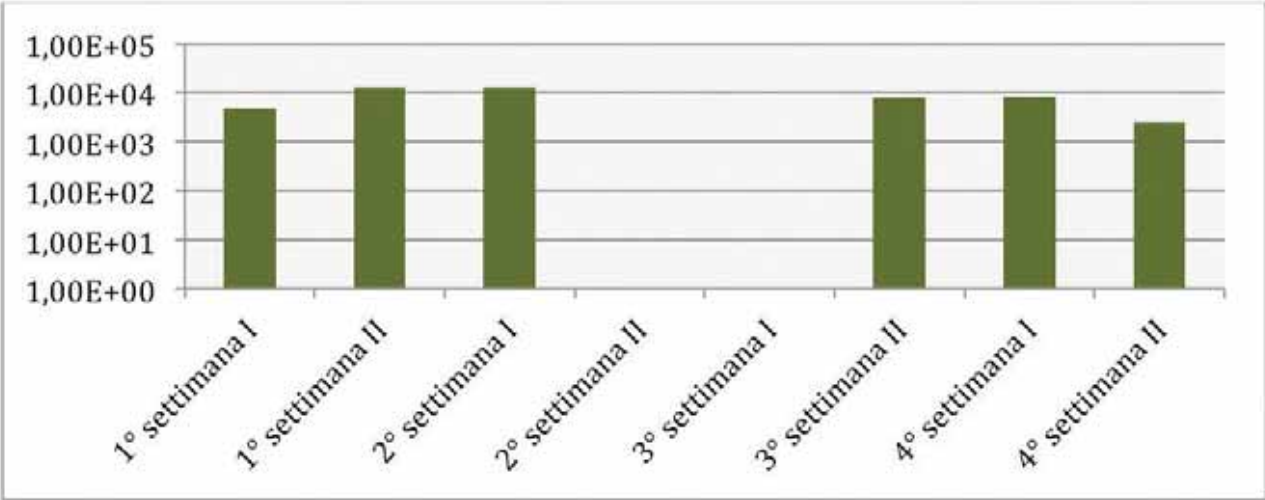


Secondo modulo: alimentazione a fieno loiessa

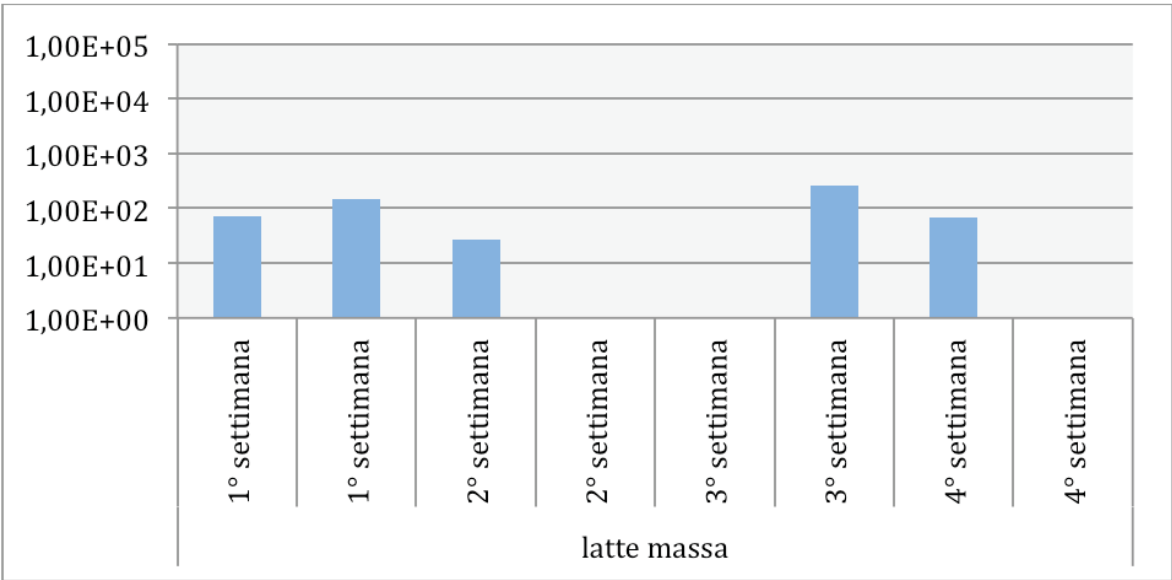
ALIMENTI ZOOTECNICI



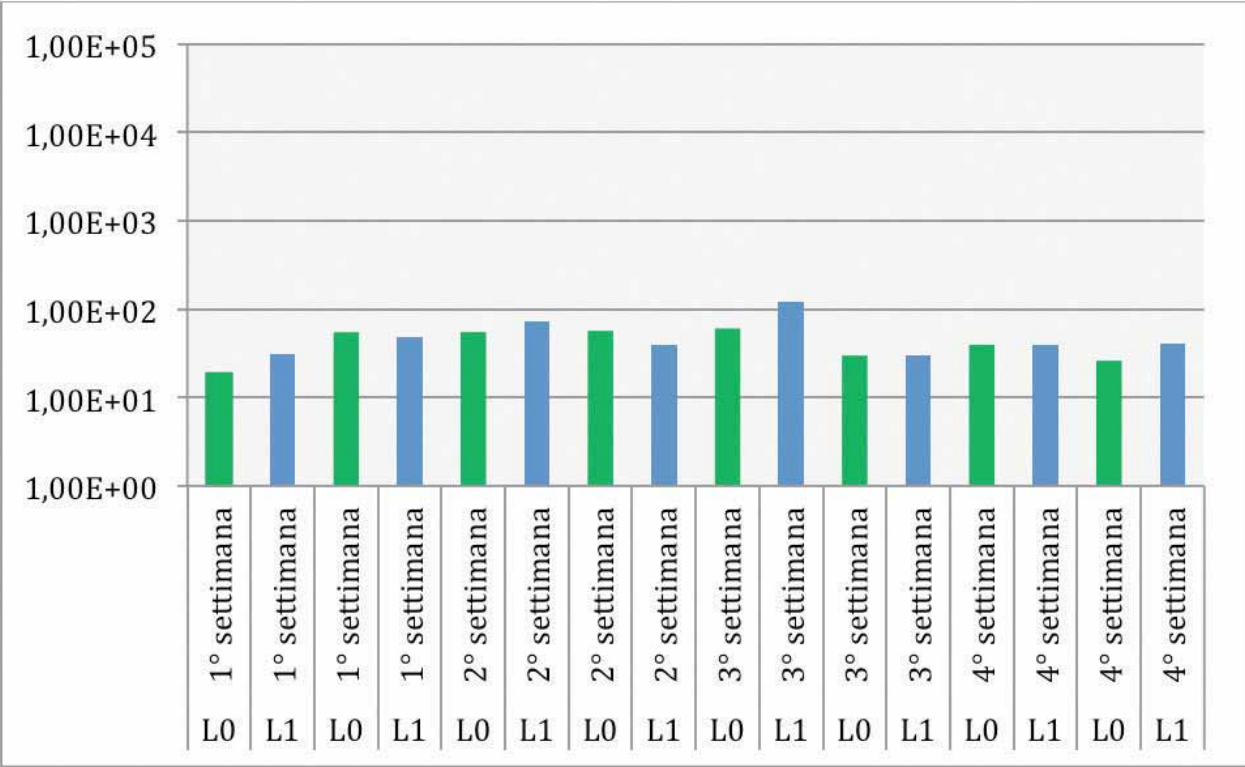
FECI BOVINE



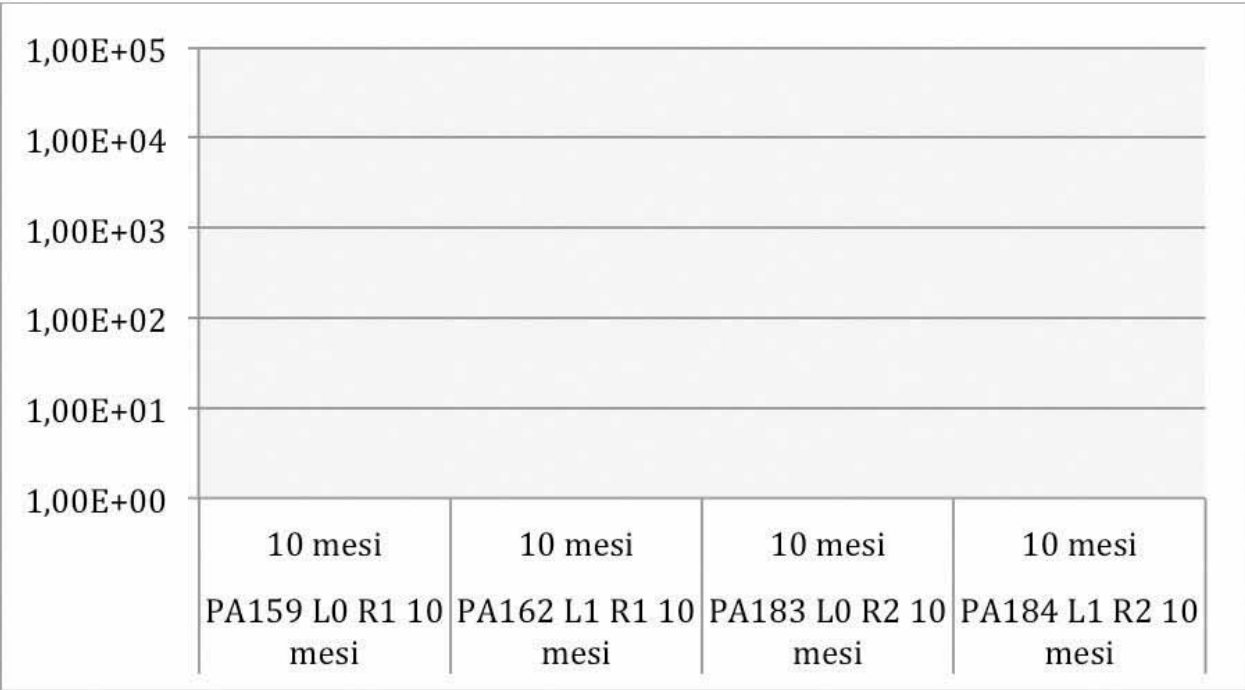
LATTE



CAGLIATE



FORMAGGIA 10 E 16 MESI DI STAGIONATURA

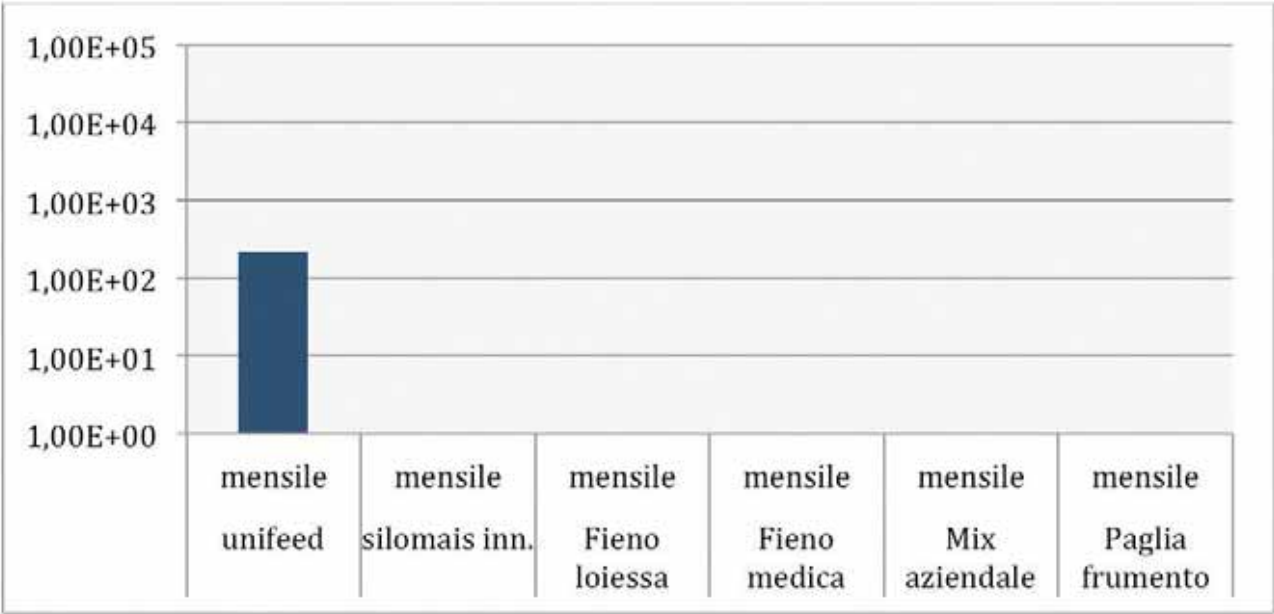


I formaggi prodotti nel secondo modulo con fieno silo loiessa sono risultati negativi alla presenza di *C. tyrobutyricum* e totalmente esenti da difetti di gonfiore.

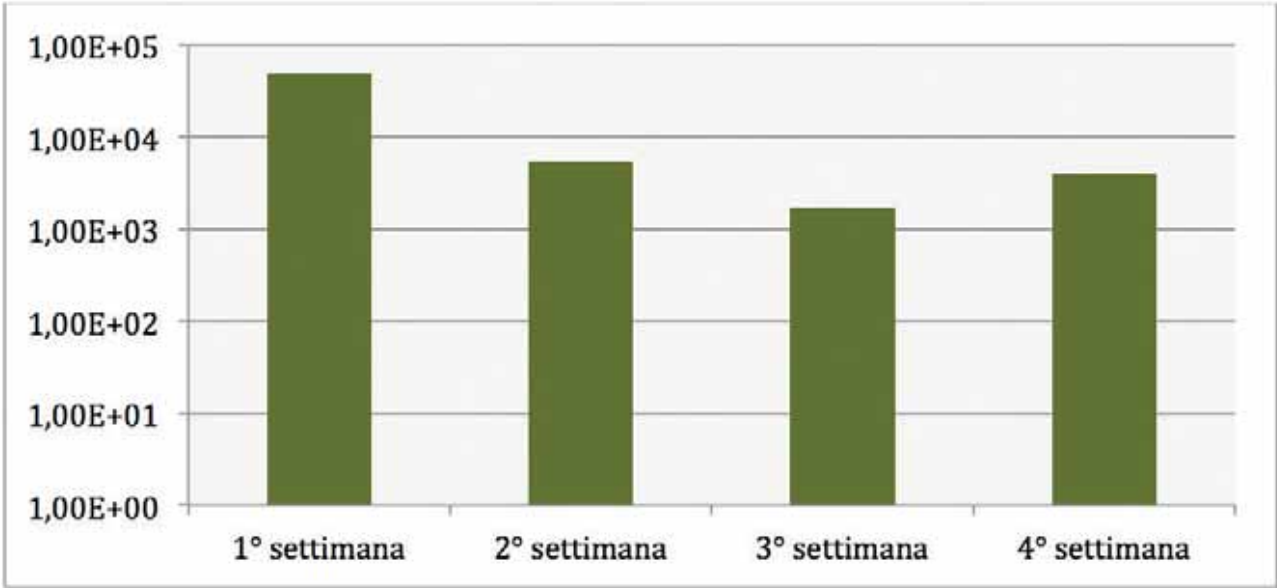


Terzo modulo: alimentazione a silomais innovativo

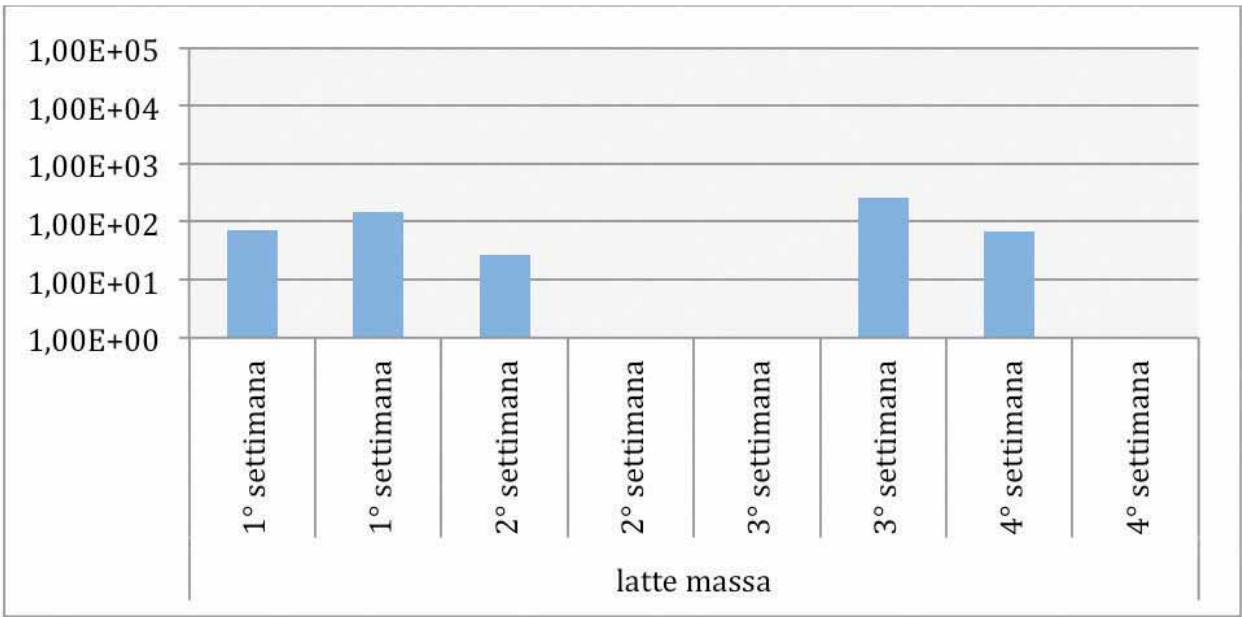
ALIMENTI ZOOTECNICI



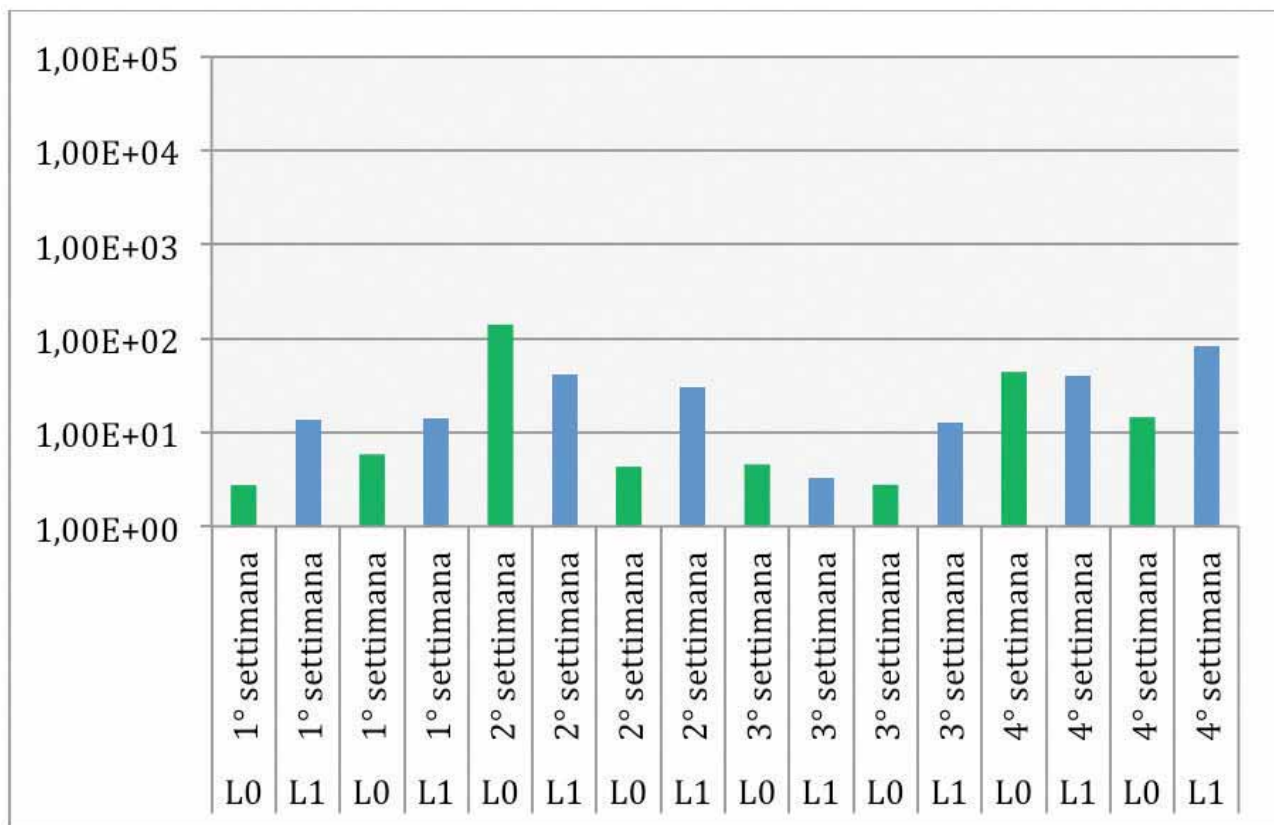
FECI BOVINE



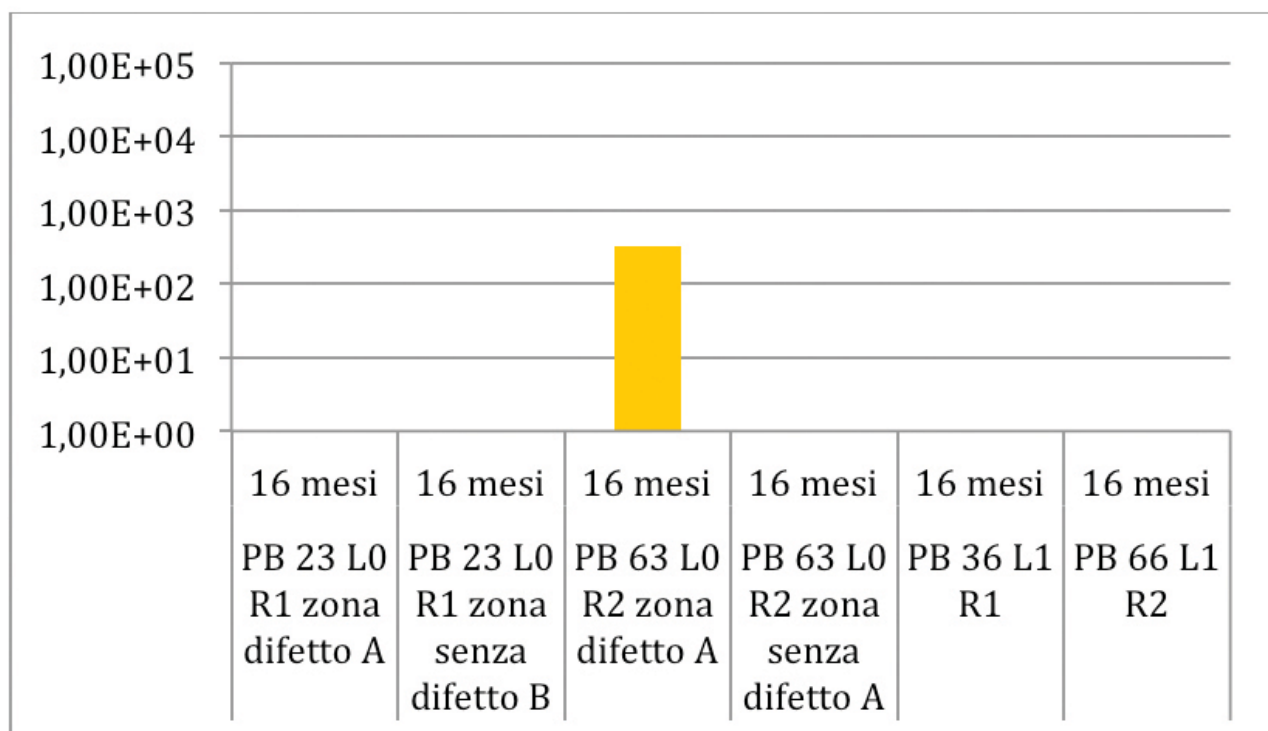
LATTE



CAGLIATE



FORMAGGIO A 9 E 16 MESI DI STAGIONATURA



I formaggi prodotti nel terzo modulo con silomais innovativo hanno dato una sola positività su un totale di quattro forme analizzate; valori di 3.18×10^2 UFC/g sono stati trovati nella zona del difetto anche se la forma non presentava difetti apparenti.

PRESENZA MEDIA DI *C. TYROBUTYRICUM* PER MATRICE ANALIZZATA

I valori sono espressi considerando il valore medio sulla serie di prelievi settimanali per un totale di 6 settimane

	Alimenti (6 settimane)								
MODULO	Silomais	Unifeed	Loiessa	Medica	Mix	Feci	Latte	Cagliata	Formaggio
SILO-MAIS STANDARD	1.33×10^2	6.24×10^1	4.06×10^1	7.89	NEG	8.18×10^3	1.19×10^1	1.43	2 / 8 forme con difetto (L0) 1.28×10^1
FIENO LOIESSA		NEG	3.79×10^2	9.90	NEG	6.05×10^3	7.09×10^1	4.76×10^1	NEG
SILO-MAIS INNOV	NEG	2.18×10^2	NEG	NEG	NEG	1.50×10^4	1.52×10^2	2.85×10^1	1/4 forme con difetto (L0) 5.30×10^1

4. Conclusioni – Obiettivo a)

I dati ottenuti riguardanti la distribuzione di *C. tyrobutyricum* hanno permesso di delineare il grado di contaminazione di questo microorganismo responsabile di gonfiore in tutta la filiera di produzione del formaggio Grana Padano utilizzando diversi regimi alimentari per le bovine ed effettuando particolare attenzione alle tecniche di insilamento e all'igiene di stalla. I livelli di *C. tyrobutyricum* osservati, mediante tecniche molecolari coltivazione-indipendenti, hanno permesso di trarre le seguenti valutazioni:

In tutti e 3 i moduli sperimentali (silomais standard, fieno silo loiessa, silomais innovativo):

- Gli alimenti zootecnici presentano *C. tyrobutyricum* con valori tra 10^2 - 10^3 UFC/g (valori di poco maggiori negli insilati e presenza anche in fieno medica e fieno loiessa);
- Indipendentemente dalla presenza o meno di *C. tyrobutyricum* negli alimenti somministrati, le feci bovine presentano mediamente valori di *C. tyrobutyricum* pari a 10^4 UFC/g;
- La presenza di *C. tyrobutyricum* nei campioni di latte e successivamente nelle cagliate si mantiene su livelli di 10^2 UFC/ml-g; solo nel I modulo il latte è risultato quasi totalmente negativo (questo potrebbe essere indice di una maggiore igiene di stalla);
- I formaggi stagionati a 16 mesi sono risultati privi di evidenti difetti di gonfiore e soltanto in due casi sono risultati positivi alla presenza di *C. tyrobutyricum* con valori massimi di 3.18×10^2 UFC/g; nel II modulo con fieno-loiessa nessun formaggio è risultato positivo alla presenza di *C. tyrobutyricum*;

In generale:

- La contaminazione degli alimenti da parte di *C. tyrobutyricum* può avvenire a diversi livelli; l'insilato è sicuramente il più a rischio ma se si rispettano buone pratiche nell'igiene della trincea è possibile ridurre la contaminazione da parte di spore di clostridi;
- *C. tyrobutyricum* è stato ritrovato frequentemente nelle feci con valori vicini a 10^3 - 10^4 UFC/g, indipendentemente dall'alimentazione delle bovine e dalla loro positività al microorganismo; questo fa supporre che le bovine alimentate a insilati siano reservoir e contribuiscano alla concentrazione di spore di *C. tyrobutyricum* (o alla loro germinazione);

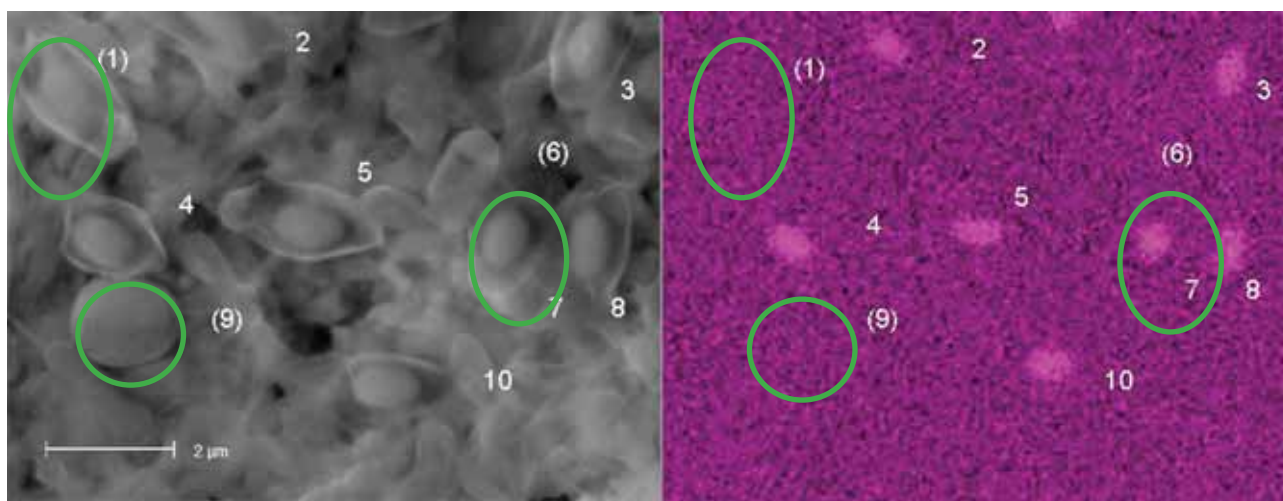
- La presenza o meno del lisozima non induce variazioni nel numero di *C. tyrobutyricum* tra latte e cagliate; questo dato va però correlato ai campioni di formaggio nelle diverse fasi di stagionatura (presenza/assenza del difetto; andamento della caseificazione che induce o meno la germinazione delle spore); gli unici formaggi ad avere avuto basse contaminazioni di *C. tyrobutyricum* sono stati quelli senza l'aggiunta di lisozima sia nel I che nel II modulo.

5. Attività di ricerca – Obiettivo b)

Studio in vitro delle fermentazioni ruminali sulle cinetiche di crescita e sopravvivenza di *C. tyrobutyricum*

Nel corso di questa fase si sono studiate le cinetiche di crescita e sopravvivenza di *C. tyrobutyricum* in liquido ruminale, in collaborazione con ISAN UCSC. La prima fase è stata la messa punto di un modello per consentire lo studio rispettivamente di una coltura pura di cellule di *C. tyrobutyricum* e di spore in un ambiente fortemente ricco di microrganismi come il liquido ruminale. Questo modello consente nel contempo si esporre le cellule o le spore alle condizioni ambientali e nutritive del rumine e di mantenere la purezza microbiologica della coltura.

Lo stesso modello consente di recuperare le cellule e di osservare tramite tecniche colturali, di microscopia ottica ed elettronica (SEM EDAX) e tecniche di PCR real time di studiare le cinetiche di crescita, germinazione e sporulazione di *C. tyrobutyricum*



EDAX microscopia elettronica a scansione per la determinazione della prima fase di innesco della germinazione; le spore contrassegnate dai numeri 1, 5, e 9 evidenziano la mancanza dello spot corrispondente alla presenza di calcio.

I PROVA

- Determinazione della germinazione di spore di *C. tyrobutyricum* in liquido ruminale
- tubi da dialisi (25mm, 12,000-14,000) + spore di *C. tyrobutyricum* (conta 2×10^5 UFC/ml)
- 2 litri di liquido ruminale, filtrato per eliminare particolato + unifeed ERSAF
- tubi da dialisi immersi nel liquido ruminale e prelevati a diversi tempi: 30 minuti, 4h, 8h, 16h, 24h, 48h

Questa prima prova ha permesso solo di effettuare delle analisi microscopiche mediante SEM e microanalisi X-ray per valutare l'eventuale innesco del processo di germinazione.

II PROVA

Determinazione della germinazione di spore di *C. tyrobutyricum* in liquido ruminale utilizzando supporti galleggianti con membrane da dialisi (300 kDa).

- Cellule *C. tyrobutyricum* (4×10^6 UFC/ml)
- Spore *C. tyrobutyricum* (2×10^5 UFC/ml)
- 2 ml di liquido ruminale, filtrato per eliminare particolato e addizionato di acido lattico (= condizione alimentazione ad insilati)

Supporti da dialisi immersi nel liquido ruminale, in anaerobiosi e prelevati a 5h, 24h, 48h
Conte in RCM lattato con e senza pastorizzazione.

Le CELLULE a:

- 5h (5×10^6 UFC/ml)
- 24h (4×10^6 UFC/ml)
- 48h (2×10^6 UFC/ml)

mantengono la medesima conta del t0 (5×10^6 UFC/ml)

Da questi primi dati sembra che le cellule sopravvivano ma non si moltiplichino.

Le SPORE a:

- 5h (4×10^5 UFC/ml), pastorizzato (7×10^5 UFC/ml)
- 24h (2×10^5 UFC/ml), pastorizzato (5×10^5 UFC/ml)
- 48h (4×10^5 UFC/ml), pastorizzato (2×10^5 UFC/ml)

mantengono sia nel pastorizzato che nel non-pastorizzato la conta del Tempo 0 (7×10^5 UFC/ml).

In questo caso sembra che le spore non inizino a germinare ma rimangano in una fase di dormienza. E' necessario in ogni caso, effettuare ulteriori prove con livelli diversi di acido lattico o diversi substrati di fermentazione.

A questo proposito si è deciso di modificare il disegno sperimentale della prova, effettuando delle prove di fermentazione in vitro con liquido ruminale da vacche in asciutta e da vacche in lattazione per valutare in questi la possibile germinazione di *C. tyrobutyricum* mediante enumerazione di cellule e spore con metodica qPCR.

MONITORAGGIO FERMENTAZIONI RUMINALI DI VACCHE IN ASCIUTTA

Enumerazione *C. tyrobutyricum*

Dati preliminari:

Substrato Ac.Lattico		Step ruminale				Step Intestinale
		T0	8 ore	24 ore	48 ore	
Periodo 1	0	1.26E+05	7.56E+04	6.86E+04	6.84E+04	6.84E+04
Periodo 1	15	1.26E+05	5.26E+04	6.37E+04	4.25E+04	5.06E+03
Periodo 2	0	1.22E+04	8.84E+04	9.60E+04	7.82E+04	7.70E+03
Periodo 2	15	1.22E+04	1.06E+05	6.08E+04	6.14E+04	4.03E+03
Periodo 3	0	1.31E+05	8.69E+04	9.80E+04	8.18E+04	2.35E+03
Periodo 3	15	1.31E+05	8.24E+04	8.42E+04	8.30E+04	2.02E+03

Grafico Periodo 1 (Silomais standard con e senza aggiunta di Ac. Lattico)

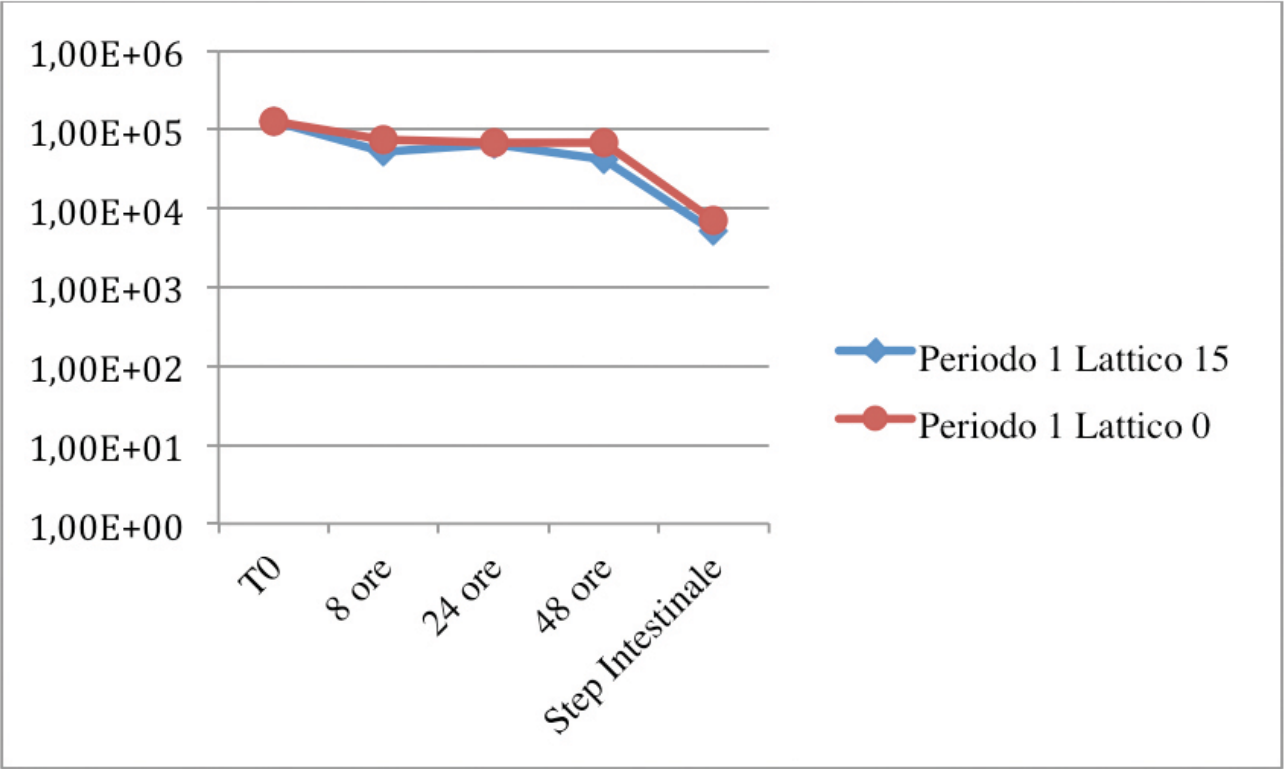


Grafico Periodo 2 (Fieno Loiessa con e senza aggiunta di Ac. Lattico)

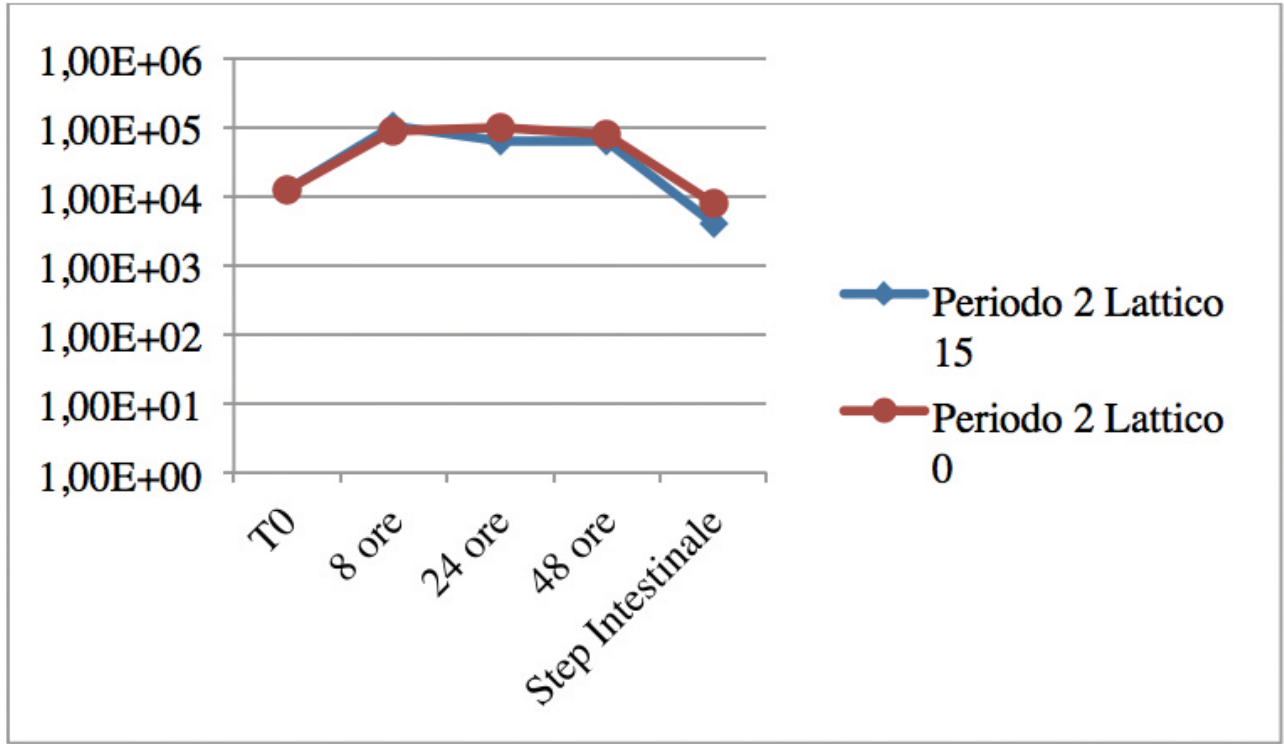
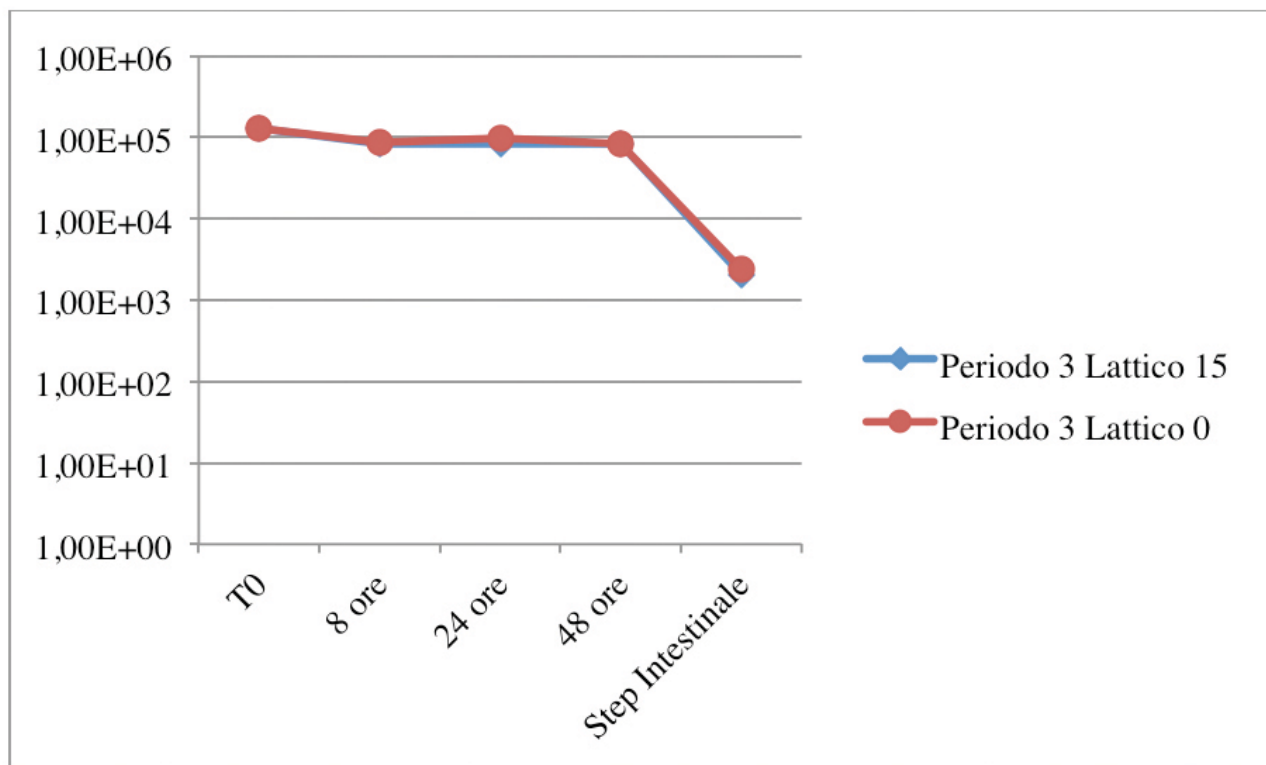


Grafico Periodo 3 (Silomais innovativo con e senza aggiunta di Ac. Lattico)



MONITORAGGIO FERMENTAZIONI RUMINALI DI VACCHE IN LATTAZIONE

Enumerazione *C. tyrobutyricum*

Dati preliminari:

Substrato Ac.Lattico		Step ruminale				Step Intestinale
		T0	8 ore	24 ore	48 ore	
Periodo 1	0	3.81E+04	3.93E+04	4.26E+04	6.48E+04	5.76E+04
Periodo 1	15	3.81E+04	3.28E+04	4.97E+04	4.56E+04	9.00E+03
Periodo 2	0	2.21E+04	3.84E+04	6.75E+04	8.00E+04	5.15E+04
Periodo 2	15	2.21E+04	4.57E+04	6.03E+04	3.16E+04	2.23E+04
Periodo 3	0	4.71E+04	5.81E+04	6.21E+04	4.62E+04	2.53E+04
Periodo 3	15	4.71E+04	5.55E+04	5.09E+04	3.88E+04	1.39E+04

Grafico Periodo 1 (Silomais standard con e senza aggiunta di Ac. Lattico)

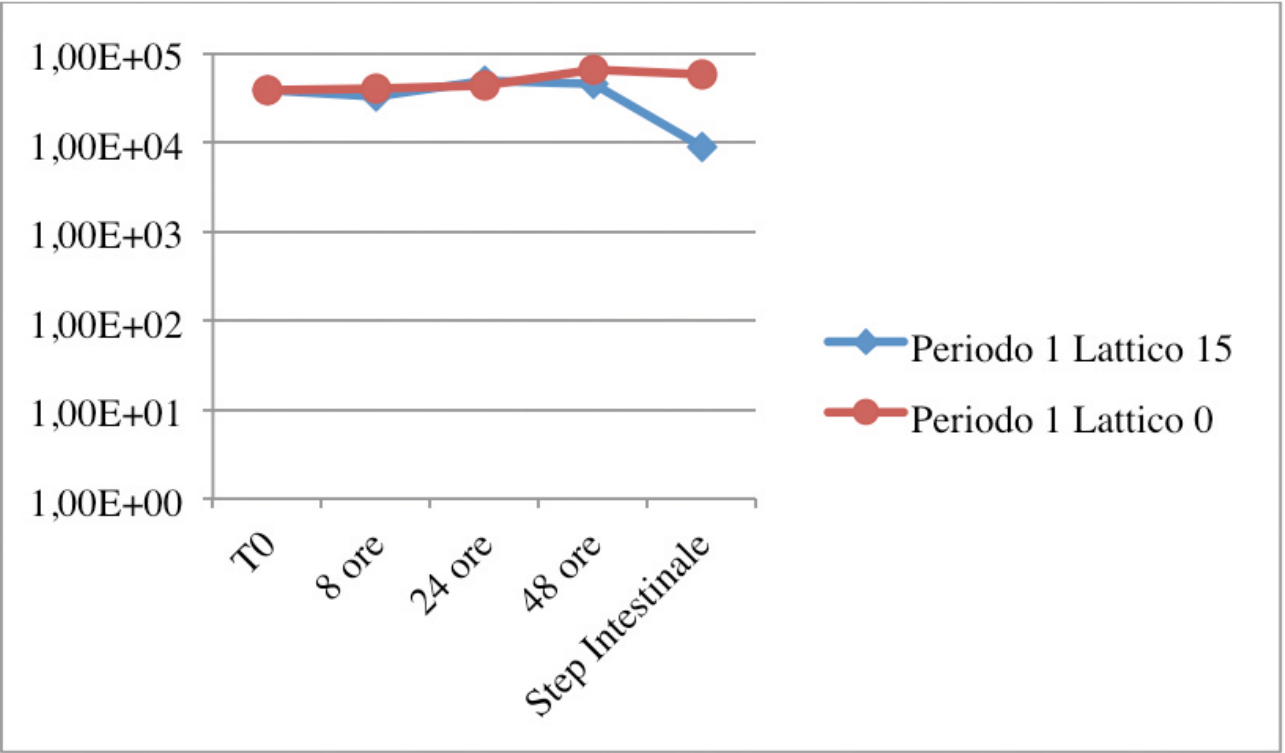


Grafico Periodo 2 (Fieno Loiessa con e senza aggiunta di Ac. Lattico)

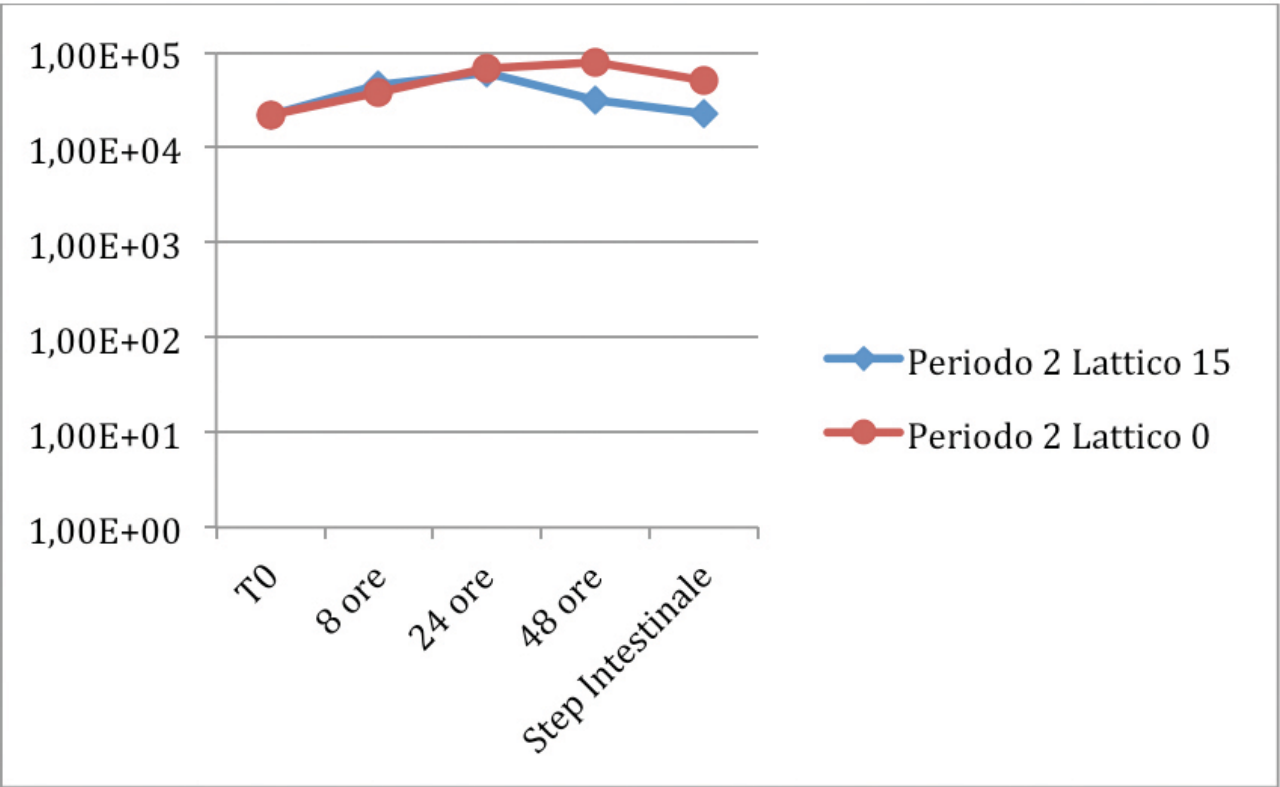
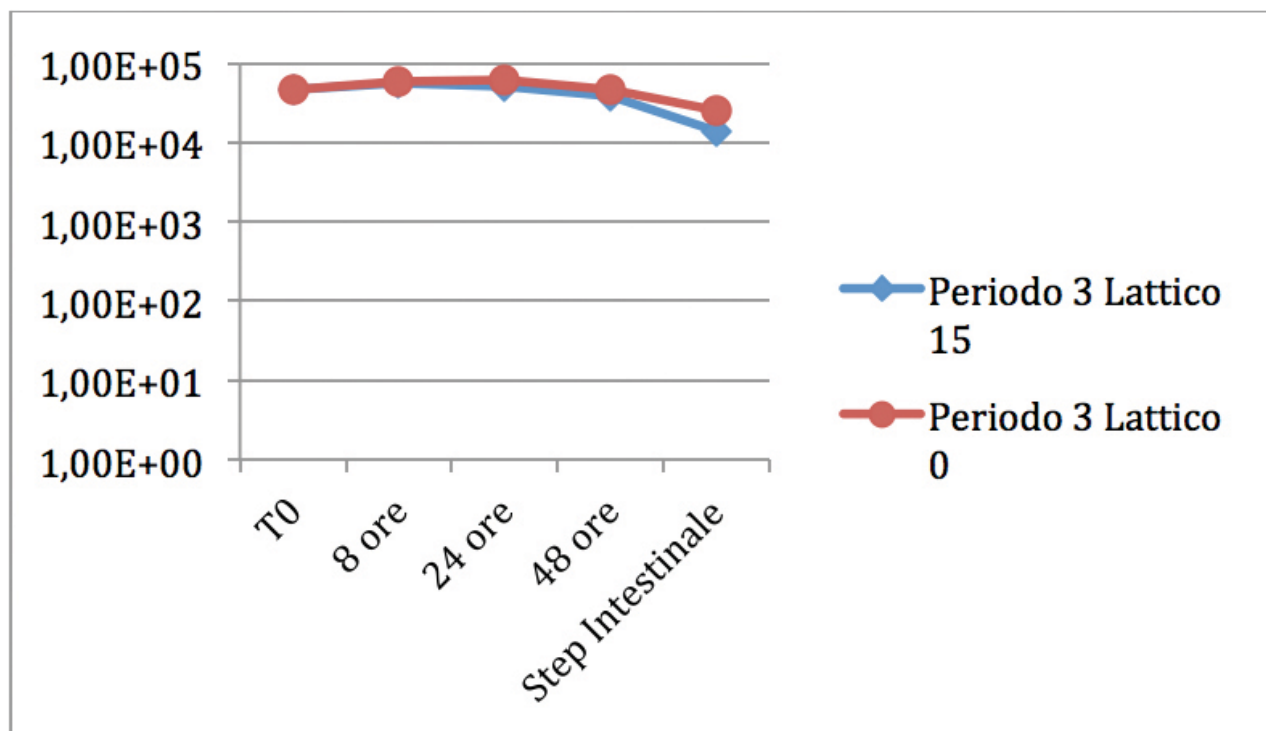


Grafico Periodo 3 (Silomais innovativo con e senza aggiunta di Ac. Lattico)



6. Conclusioni – Obiettivo b)

Dai primi dati ottenuti si osserva sempre, sia nelle prove fatte con liquido ruminale di vacche in asciutta sia con liquido ruminale di vacche in lattazione, una diminuzione del numero di spore di *C. tyrobutyricum* nello step intestinale, segno di un'ipotetica germinazione senza sopravvivenza e moltiplicazione delle forme vegetative. Risulta difficile trarre conclusioni certe su questi dati preliminari che necessitano di ulteriori prove a supporto di queste prime osservazioni.

Di certo, il rumine costituisce un reservoir per le spore di *C. tyrobutyricum* che non sembrano subire modificazioni di numero durante le 48 ore di transito, sia in presenza che in assenza di acido lattico.

3.8 Sottoprogetto 2 – Genomica Clostridi scheda B

U.O. Istituto Sperimentale Italiano “Lazzaro Spallanzani” (ISILS)

Responsabile D.ssa Maria Feligini

Ricercatori D.ssa Simona Panelli, D.ssa Eva Brambati

1. Obiettivi del sottoprogetto 2 - Genomica Clostridi scheda B

Ricerca dei clostridi che, ad un certo momento del processo di maturazione del Grana, passano dalla forma quiescente di spora a quella vegetativa inducendo la formazione di difetti nel Grana Padano; capire se il difetto è causato da un'unica specie o da specie diverse in forma associativa; valutare se esiste un effetto dell'area geografica di produzione del latte sulla distribuzione dei *Clostridium* spp. implicati nella formazione di difetti.

L'obiettivo del Sottoprogetto 2 Genomica Clostridi B si proponeva di individuare un pannello ristretto di marcatori molecolari specie-specifici per il riconoscimento nel latte e nel Grana Padano delle specie di *Clostridium* spp. maggiormente implicabili nel difetto ed associabili alle fermentazioni anomale. Il sistema diagnostico sviluppato per l'identificazione di tali marcatori è in grado di identificare simultaneamente la presenza di sei specie: *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. tertium* e *C. perfringens*. La sensibilità della tecnica è elevata e la riproducibilità è garantita dall'automazione strumentale. Tale sistema, oltre che l'identificazione di specie, ha permesso di valutare l'esistenza dell'effetto dell'area geografica sulla struttura

della comunità di clostridi e l'impatto delle variazioni stagionali sull'abbondanza di tali specie nel latte e nel formaggio.

2. Attività di ricerca

Le attività sperimentali sono state organizzate in due fasi successive:

Fase 1) Valutazione del contenuto di *C. tyrobutyricum* mediante Real-time PCR

Questa fase è stata realizzata in collaborazione con ERSAF, che ha fornito i campioni di insilati, fieni, feci, latte, cagliate (Moduli sperimentali 1, 2 e 3), e CRB-UNICATT che ha fornito le condizioni per l'estrazione del DNA ed il protocollo di Real-time PCR. I campioni sono stati congelati e mantenuti a -20°C. Per il latte le quantità necessarie per le analisi sono state 30 ml /campione (in doppio), per il formaggio la quantità è stata quella corrispondente ad un carotaggio.

Le attività sperimentali svolte da ISILS durante questa fase sono state:

- Estrazione DNA (in doppio) da insilati, fieni, feci, latte e cagliate.
- Messa a punto della curva di calibrazione per l'analisi quantitativa in Real-time PCR. La curva di calibrazione è stata creata utilizzando una preparazione di DNA genomico di *C. tyrobutyricum* fornita dal partner CRB-UNICATT. E' stata usata una soluzione stock contenente $7,8 \times 10^8$ equivalenti genomici/ml (1 equivalente genomico corrisponde alla quantità di DNA contenuto in una cellula microbica). Da tale stock sono state approntate 6 diluizioni seriali 1:10 che hanno costituito la curva di calibrazione per l'analisi quantitativa in Real-time PCR. Ogni punto di diluizione è stato caricato in triplo su ciascuna piastra da 96 pozzetti ed amplificato nelle stesse condizioni dei campioni di DNA (Figura 1).
- Amplificazione del DNA mediante 7900 HT ABI PRISM (Life Technologies).
In totale, sono state allestite 10 piastre, per un totale di 678 reazioni di cui: 111 allestite con DNA estratto da feci, 216 con DNA estratto da insilati, 108 con DNA isolato da fieni, 99 con DNA estratto da latte e 144 con DNA isolato da cagliate.
- Trasferimento dei risultati di Real-time PCR al partner CRB-UNICATT per elaborazione dati.

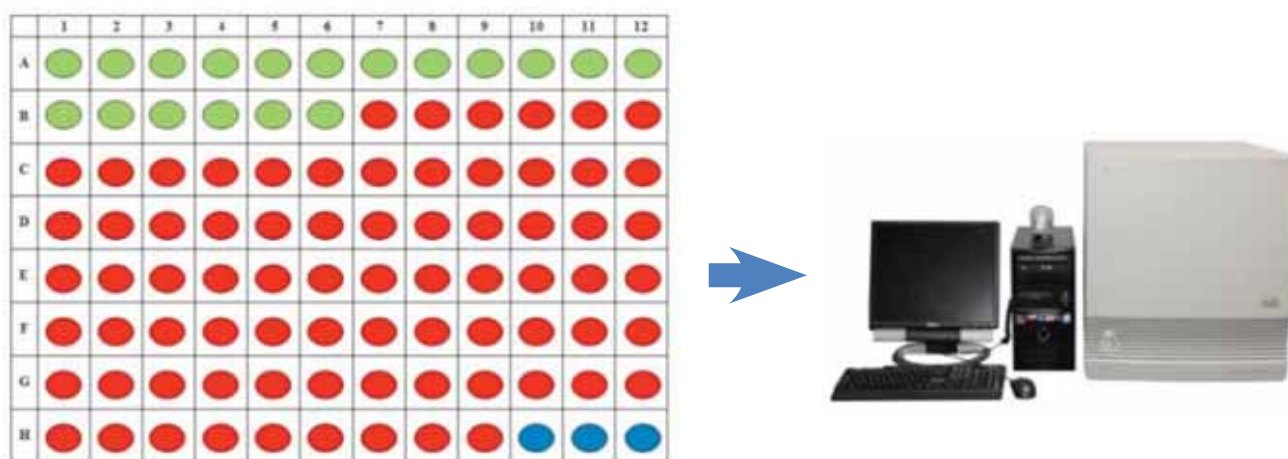


Figura 1. Piastra pronta per l'analisi in Real-time PCR. I pozzetti verdi contengono i sei punti della curva di calibrazione e quelli rossi i campioni di DNA, tutti caricati in triplicato. L'analisi di una piastra permette la quantificazione di soli 12 campioni per volta poiché ciascuno di essi deve essere caricato con due diverse diluizioni. I pozzetti blu costituiscono il controllo negativo, cioè un'amplificazione effettuata in assenza di DNA stampo, per verificare l'assenza di contaminazioni che pregiudicherebbero l'analisi.

Fase 2) Valutazione dell'effetto dell'area geografica di produzione del latte e formaggio sul contenuto di *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. tertium* e *C. perfringens* mediante Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)

Questa attività è stata sviluppata da ISILS in collaborazione con Il Consorzio di Tutela del Grana che ha fornito

i campioni di latte di caldaia e rispettive cagliate provenienti da diversi caseifici e con ERSAF che ha fornito i campioni sperimentali di latte ((Modulo sperimentale 1). L'indagine territoriale è stata fatta per valutare l'esistenza di differenze significative nel contenuto in clostridi fra distretti produttivi aderenti allo stesso disciplinare. Il campionamento è stato organizzato stagionalmente nei mesi di agosto, novembre, febbraio e maggio, in 20 caseifici che producono Grana Padano DOP dislocati in Lombardia e Veneto. Tutti i campioni, prelevati in doppio, sono stati conservati congelati a -20°C in tubi sterili e DNA-free.

Le attività sperimentali della Fase 2 sono state:

- Estrazione del DNA (in doppio) da 80 campioni di latte di caldaia e 80 cagliate mediante metodo chimico fenolo/cloroformio per un totale di 320 estrazioni.
- Disegno di nuovi primer per la rilevazione simultanea di *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. tertium* e *C. Perfringens* durante l'analisi ARISA.
- Ottimizzazione delle condizioni di amplificazione del DNA batterico mediante PCR.
- Valutazione della specificità dei primer mediante l'uso di ceppi commerciali e sequenziamento.
- Ottimizzazione dell'analisi di separazione elettroforetica dei prodotti di PCR mediante ABI PRISM 3130XL Capillary Genetic Analyzer (Life Technologies) (Figura 3).
- Creazione del pannello di marcatori genetici che consentono l'identificazione simultanea di più specie (Figura 4).
- Analisi statistica dei dati relativi alla distribuzione e abbondanza delle specie nei lattini e cagliate provenienti dai caseifici diversi. I profili ottenuti con l'ARISA sono stati analizzati mediante il software GeneMapper (Applied Biosystems) tenendo in considerazione il numero e l'area assoluta dei picchi caratterizzanti ciascuna specie; gli output ottenuti sono stati processati utilizzando il linguaggio di programmazione R (<http://cran.r-project.org/>).

3. Risultati della fase 2

• Caratterizzazione molecolare mediante tecnica ARISA

La tecnica ARISA, per discriminare le specie/ceppi batterici, utilizza le differenze di sequenza nucleotidica dello spaziatore intergenico ITS (Internal Transcribed Spacer) localizzato tra i geni 16S e 23S (Figura 2).

Infatti, al contrario dei geni ribosomiali (16S, 23S) che sono regioni con sequenze altamente conservate, l'ITS sembra essere la regione che si evolve più rapidamente presentando notevoli differenze fra specie/ceppi, per questo motivo è utilizzata come strumento di indagine della variabilità genetica microbica.

Negli ultimi anni l'ARISA è stata una tecnica molecolare applicata con successo per lo studio di comunità batteriche e fungine complesse. Nel nostro caso la tecnica non prevede l'utilizzo di primer universali ma si basa sull'uso di primer specie-specifici, che consentono l'identificazione simultanea e la stima del contenuto di sei clostridi: *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. tertium* e *C. perfringens*.

I prodotti di amplificazione del DNA microbico ottenuti mediante l'uso di questi primer sono stati analizzati con un sistema di elettroforesi capillare automatizzato (Figura 3) dotato di una maggiore capacità risolutiva rispetto ai metodi convenzionalmente impiegati (es. celle elettroforetiche).

In pratica il sistema produce elettroferogrammi che contengono solo i picchi ascrivibili alle specie oggetto dell'indagine (Figura 4).

Le analisi hanno dimostrato la robustezza della tecnica nel produrre profili ripetibili per il numero di picchi e per l'intensità di fluorescenza (RFU, Relative Fluorescence Unit). RFU è il parametro che stima l'abbondanza della specie nella matrice analizzata.

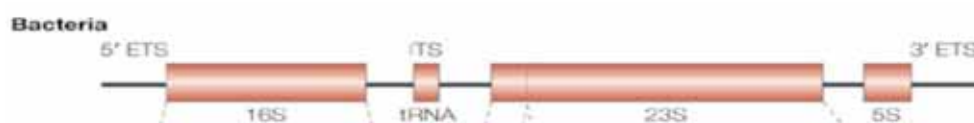


Figura 2. La figura mostra la posizione dell'ITS (Internal Transcribed Spacer), la regione non codificante ed estremamente variabile del DNA ribosomiale batterico che si trova fra i geni 16S e 23S.

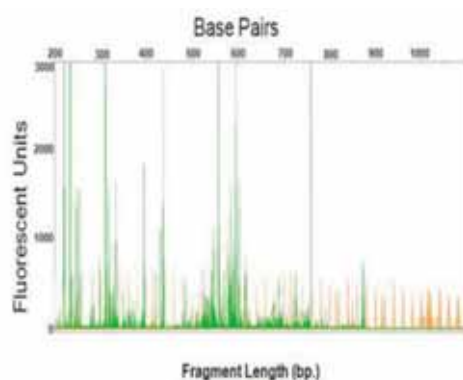
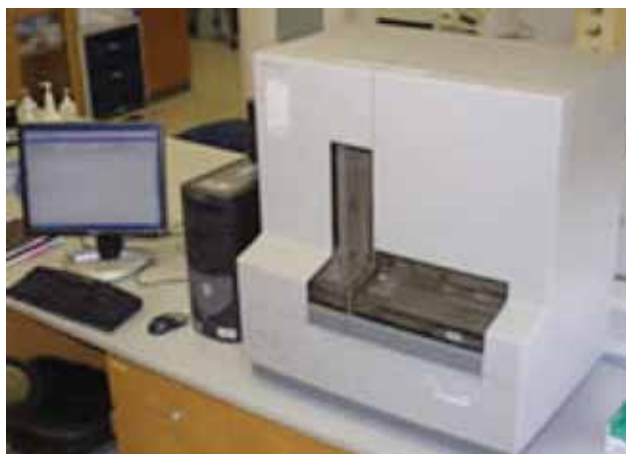


Figura 3. Sequenziatore ABI PRISM 3130XL Capillary Genetic Analyzer con il quale è stata fatta la separazione elettroforetica dei prodotti di amplificazione del DNA.

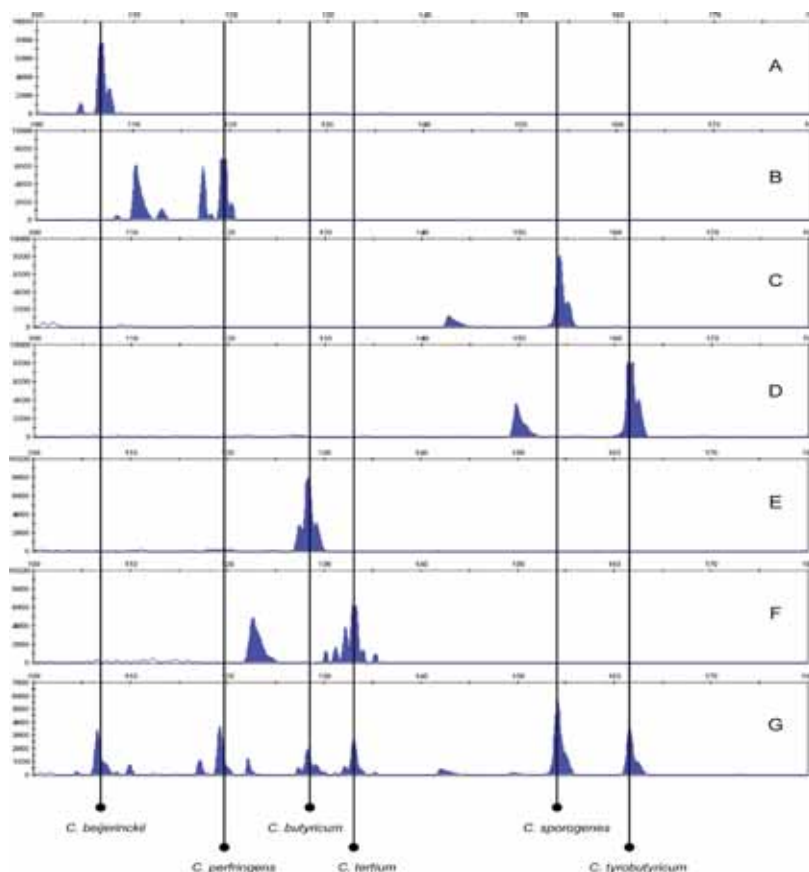


Figura 4. Profili ARISA specie-specifici caratterizzanti ciascuna delle specie indagate. A: *C. beijerinckii*; B: *C. perfringens*; C: *C. butyricum*; D: *C. tertium*; E: *C. sporogenes*; F: *C. tyrobutyricum*.

Per ciascuna specie è stato identificato un pannello di marcatori specifici.

- **Valutazione della presenza e relativa abbondanza dei clostridi durante un anno di osservazione**

C. beijerinckii e *C. tertium* sono stati ritrovati in tutti i latti provenienti dai 20 caseifici (Tabella 1) ed hanno mostrato i valori quantitativi più alti, rispettivamente $9,76 \pm 0,12$ RFU e $10,59 \pm 0,15$ RFU. *C. perfringens* è stato trovato nel 97,7% dei latti con un'abbondanza di $8,81 \pm 0,18$ RFU. Infine *C. sporogenes* è risultata la specie più rara, ritrovata nel 77,2% dei latti, e quella meno abbondante ($6,14 \pm 0,46$ RFU).

L'analisi ARISA sulle cagliate ha evidenziato la presenza di *C. beijerinckii*, *C. tertium* e *C. perfringens* in tutti i

campioni e con i valori più alti ($9,41 \pm 0,12$, $11,63 \pm 0,09$ e $9,62 \pm 0,09$, rispettivamente) mentre *C. Sporogenes*, come nel latte, è stata la specie più rara e meno abbondante, identificata nel 86,1% dei campioni con un valore di $6,78 \pm 0,23$ RFU.

Tabella 1. Diffusione e abbondanza relativa delle sei specie nei latti e nelle rispettive cagliate durante un anno di osservazione.

Specie	Diffusione (%)	Abbondanza (RFU) ^a media $\pm$ SE ^b	Variazione annua (RFU)
Latte			
<i>C. tyrobutyricum</i>	89.9%	7.92 ± 0.24	5.73 – 9.63
<i>C. butyricum</i>	91.1%	7.69 ± 0.25	5.94 – 9.41
<i>C. sporogenes</i>	77.2%	6.14 ± 0.46	3.07 – 8.72
<i>C. beijerinckii</i>	100%	9.76 ± 0.12	8.79 – 10.98
<i>C. tertium</i>	100%	10.59 ± 0.15	9.10 – 11.88
<i>C. perfringens</i>	98.7%	8.81 ± 0.18	6.71 – 10.23
Cagliata			
<i>C. tyrobutyricum</i>	96.2%	8.94 ± 0.21	6.94 – 10.11
<i>C. butyricum</i>	97.5%	8.61 ± 0.15	6.23 – 9.41
<i>C. sporogenes</i>	86.1%	6.78 ± 0.23	5.16 – 9.23
<i>C. beijerinckii</i>	100%	9.41 ± 0.12	8.28 – 10.28
<i>C. tertium</i>	100%	11.63 ± 0.09	10.66 – 12.17
<i>C. perfringens</i>	100%	9.62 ± 0.09	9.25 – 10.58

^a Relative Fluorescence units, espressa come logaritmo naturale.

^b Standard Error

• Effetto della stagione sul contenuto di clostridi

La composizione della comunità batterica oggetto di studio ha rivelato effetti sensibili e altamente significativi stagione-dipendenti. La struttura di tutta la comunità cambia durante le stagioni in un modello ciclico piuttosto simile nel latte (Figura 5) e nella cagliata. Sono stati riconosciuti tre raggruppamenti principali:

- Il primo, associato alla stagione invernale, è correlato a *C. sporogenes* per il latte e a *C. butyricum* per le cagliate
 - Il secondo, corrispondente alla primavera, è rigorosamente correlato a *C. tyrobutyricum* sia per latte che per cagliate
 - Il terzo, associato al periodo estate-autunno, è correlato a *C. Beijerinckii* sia per latte che per cagliate
- Per contro, le altre specie non hanno mostrato un modello di variazione stagionale del tutto congruente tra latte e cagliate. La distribuzione delle specie durante tutto l'anno suggerisce che il difetto non può essere il risultato dell'attività metabolica di una singola specie, ma dipende da una azione sinergica di batteri sporeformi trasferiti principalmente da latte.

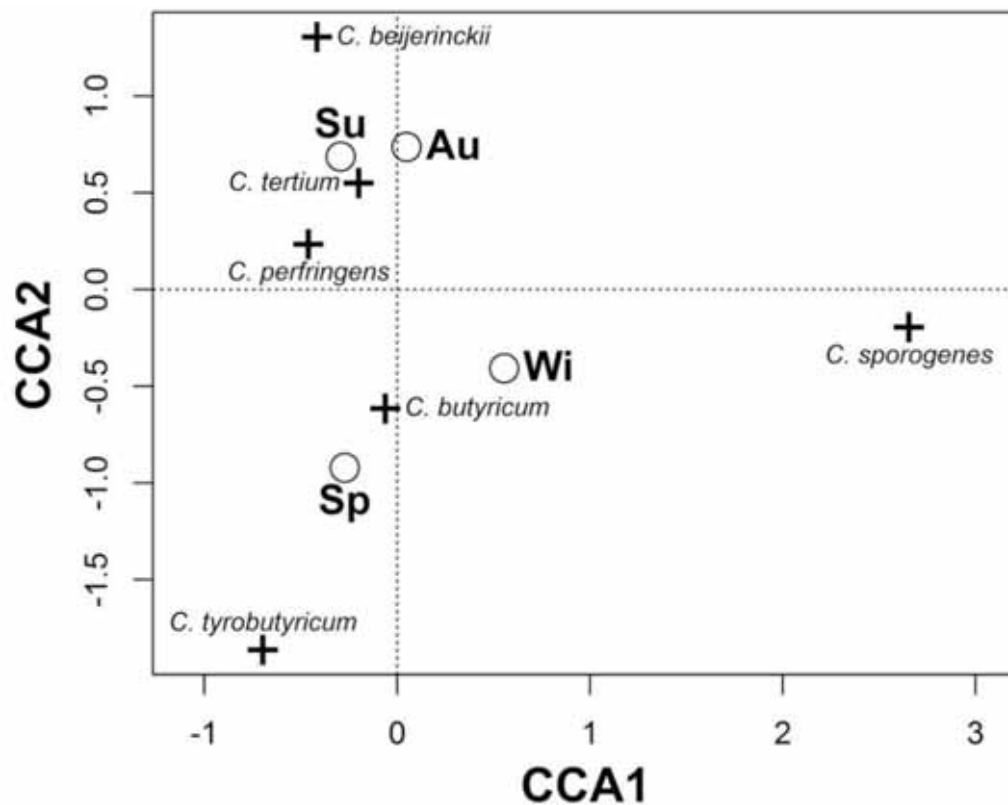


Figura 5. Abbondanza relativa dei clostridi nel latte durante le stagioni. Il disegno sperimentale ha considerato due fattori: la stagione con quattro livelli (Sp: primavera, Su: estate, Au: autunno, Wi: inverno), le latterie (20 livelli) e due covariate corrispondenti alle coordinate spaziali (latitudine e longitudine) dei caseifici stessi. L'analisi CCA (Canonical Correspondence Analysis) fatta sui dati ARISA, ha consentito di tracciare per ogni singola specie le ordinate lungo gli assi canonici seguendo le variazioni stagionali e le posizioni geografiche dei caseifici. Le croci (+) indicano le specie mentre i cerchi (O) le stagioni.

- **Distribuzione geografica dei clostridi nei latti e cagliate**

Per quanto riguarda la distribuzione territoriale delle specie, nei latti è stato osservato che *C. tyrobutyricum* e *C. butyricum* risultano più frequentemente associati ai caseifici dislocati nella parte occidentale dell'area di campionamento (Figura 6a), mentre *C. beijerinckii* e *C. sporogenes* sono risultati abbondanti, anche se in modo meno marcato, nella parte orientale. *C. perfringens* e *C. tertium* non hanno evidenziato nessuna particolare ripartizione territoriale.

Per quanto riguarda le cagliate, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. sporogenes* hanno presentato un trend spaziale coerente con i dati ottenuti per il latte, mentre *C. beijerinckii* è risultato il più abbondante a ovest rispetto a quanto osservato nel latte, anche se con un modello meno marcato (Figura 7a).

Una variabilità spaziale significativa nella composizione della comunità di clostridi è stata rilevata solo nelle cagliate ed ha coinvolto le specie per le quali si è evidenziato uno spiccato effetto stagione. In particolare, *C. tyrobutyricum* è stato trovato dominante e il più abbondante nei caseifici situati ad ovest, mentre *C. beijerinckii* segue una tendenza opposta, essendo abbondante nei caseifici situati ad est. Nel complesso, questi risultati rappresentano un interessante scenario nel quale *C. beijerinckii* e *C. tyrobutyricum* si escludono a vicenda.

Dato che il latte non ha presentato una variabilità spaziale significativa come le cagliate, questo fatto ci induce a pensare che le variazioni possono essere dovute a fattori di gestione allevamento/caseificio.

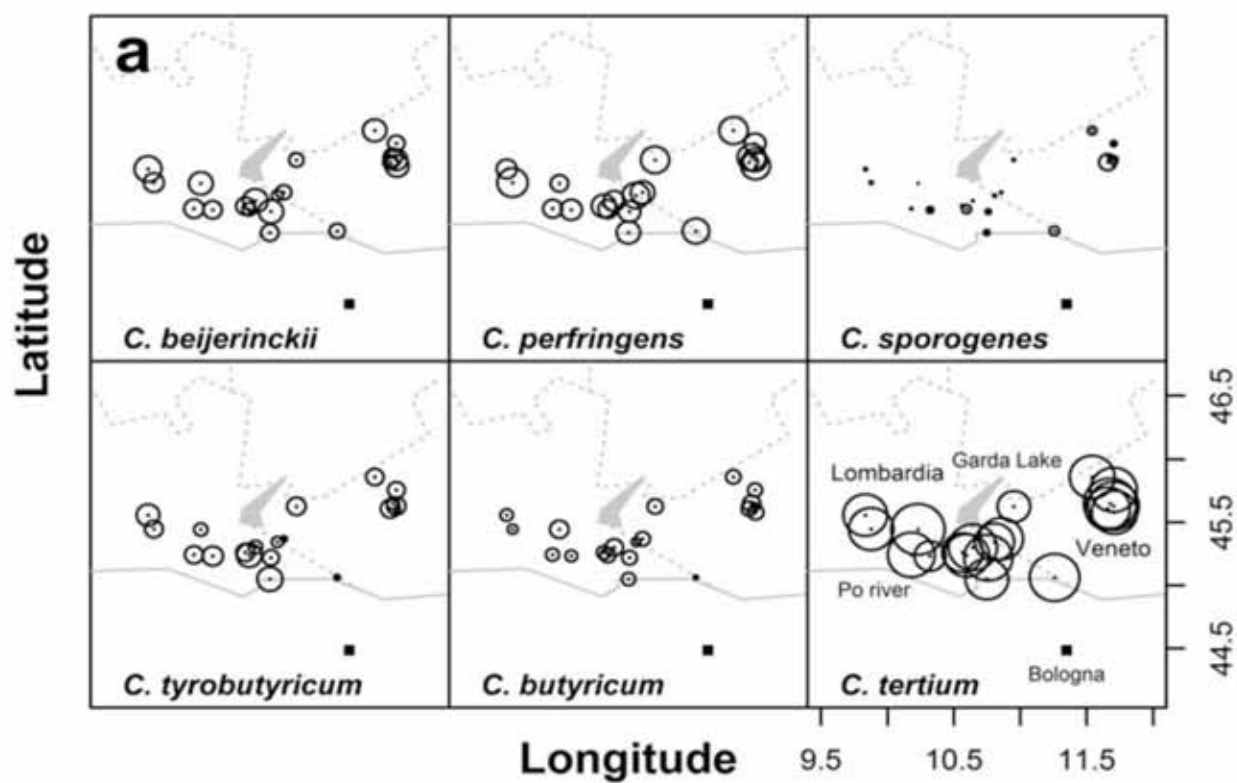


Figura 6a. Distribuzione territoriale dei clostridi nei lattici.

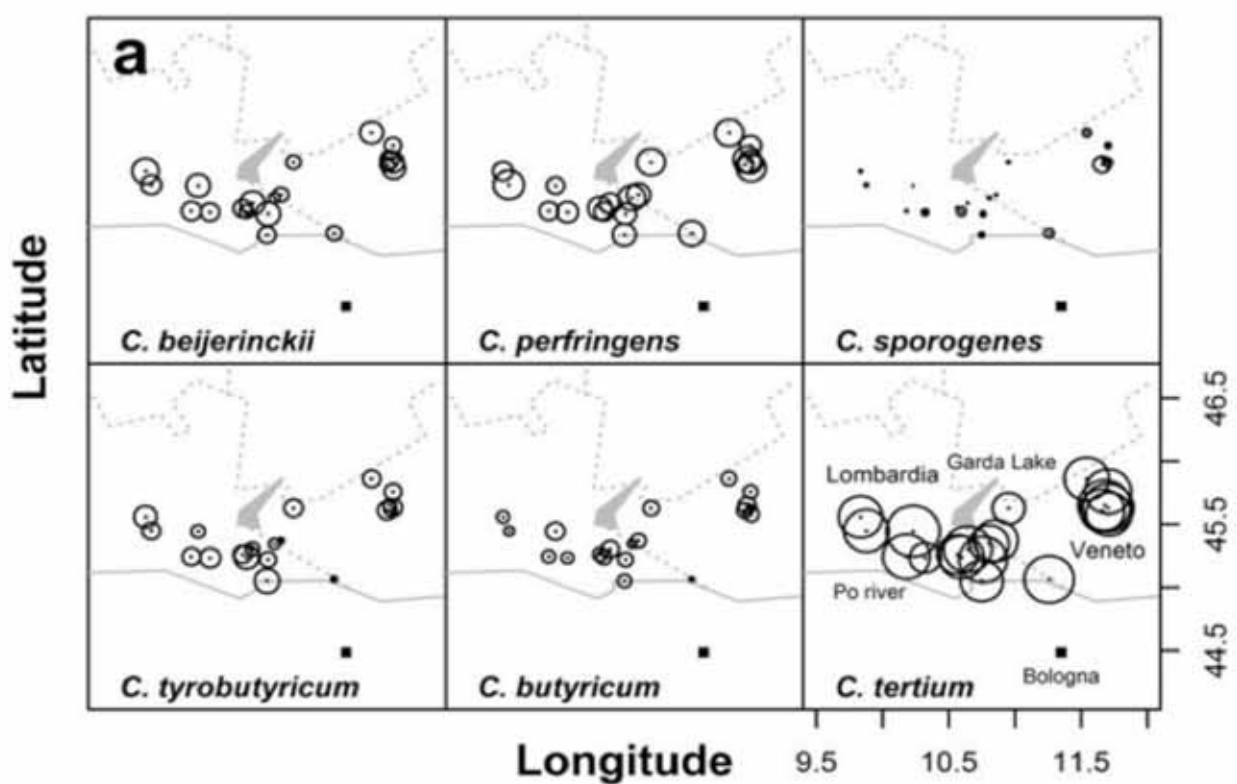


Figura 7a. Distribuzione territoriale dei clostridi nelle cagliate.

- **Analisi dei lattii sperimentali ERSAF mediante tecnica ARISA**

La tecnica ARISA è stata impiegata per analizzare 10 campioni di latte prodotti da ERSAF durante il primo anno di progetto (Modulo1). I profili ottenuti hanno mostrato una quantità molto bassa di *C. perfringens* e *C. tertium*, e solo tracce di *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. beijerinckii*. Questo dimostra che l'applicazione di tecniche di "best practises" lungo tutta la filiera (qualità degli insilati, igiene della lettiera, igiene della mammella durante la mungitura) sono fattori chiave fortemente correlati alla qualità microbiologica del latte e quindi al suo rendimento caseario.

4. Conclusioni

- La tecnica ARISA si è rivelata un potente strumento diagnostico per l'identificazione simultanea di sei clostridi potenzialmente implicati nel difetto del formaggio e rappresenta un sistema analitico preferenziale in quanto determina anche le variazioni in abbondanza dei microrganismi ricercati. L'analisi permette di monitorare in tempo reale l'azione di fattori esterni (ambientali o dipendenti da azioni umane) che possono far variare la struttura delle popolazioni microbiche nel latte, danneggiando la sua qualità casearia.
- I risultati relativi alla distribuzione delle specie durante l'arco di un anno suggeriscono che il difetto non può essere imputato all'attività metabolica di una singola specie, ma dipende dall'azione sinergica di più batteri sporeformi.
- La stagione induce cambiamenti significativi sulla struttura della comunità di clostridi presenti nel latte.
- Una ripartizione territoriale (variabilità spaziale) significativa fra clostridi è stata trovata solo nelle cagliate ed ha coinvolto quelle specie per le quali si è evidenziato anche uno spiccato effetto stagione. *C. tyrobutyricum* è stato trovato dominante nei caseifici situati ad ovest, mentre *C. beijerinckii* è stato trovato il più abbondante nei caseifici situati ad est dell'area di campionamento. Si tratta di uno scenario nel quale *C. beijerinckii* e *C. tyrobutyricum* si escludono a vicenda. Dato che i lattii non hanno presentato una variabilità spaziale significativa mentre le cagliate sì, questo ci induce a supporre che le variazioni siano strettamente correlate al processo di caseificazione.
- Il confronto con i risultati ottenuti analizzando i lattii sperimentali prodotti da ERSAF suggerisce che l'applicazione di procedure di "best practises" lungo tutta la filiera (qualità degli insilati, igiene della lettiera, igiene della mammella durante la mungitura) sono fattori chiave fortemente correlati alla qualità microbiologica del latte.

3.9 Sottoprogetto 3 – Genomica batteri lattici

U.O. Università degli Studi di Parma

Dipartimento di Scienze degli Alimenti

Responsabile Prof. Monica Gatti

1. Obiettivi del sottoprogetto 3 - Genomica batteri lattici

Fase 1

Valutazione della microflora lattica presente durante differenti momenti della produzione di Grana Padano in 6 caseificazioni condotte con lisozima e 6 caseificazioni condotte senza lisozima sulla base dei 3 moduli progettuali indicati da ERSAF (silomais standard, silomais "innovativo", fieno-silo loiessa).

Fase 2

Studio qualitativo e semiquantitativo della microflora lattica dominante nei differenti campioni durante le caseificazioni di Grana Padano effettuate con o senza lisozima.

Fase 3

Quantificazione dell'autolisi dei batteri lattici durante il processo di caseificazione e stagionatura del Grana Padano prodotto con o senza lisozima.

2. Attività di ricerca

Fase 1 e Fase 2

Valutazione della microflora lattica presente durante differenti momenti della produzione di Grana Padano in 6 caseificazioni condotte con lisozima e 6 caseificazioni condotte senza lisozima sulla base dei 3 moduli progettuali indicati da ERSAF (silomais standard, silomais “innovativo”, fieno-silo loiessa).

Attività 1: pianificazione del campionamento

Il campionamento è stato condotto in accordo con il piano sperimentale proposto da ERSAF ed in collaborazione con il Consorzio per la Tutela del Formaggio Grana Padano. Sono state previste 12 caseificazioni da analizzare a differenti tempi, seguendo il seguente schema:

- 3 test di caseificazione senza lisozima (L0) da ripetere in doppio con latte proveniente dai 3 moduli progettuali (silomais standard, silomais “innovativo”, fieno-silo loiessa);
- 3 test di caseificazione con lisozima (L1), da ripetere in doppio con latte proveniente dai 3 moduli progettuali (silomais standard, silomais “innovativo”, fieno-silo loiessa).

Nel piano di campionamento è prevista l'analisi dei seguenti campioni: latte, siero cotto, siero innesto, cagliata 48 ore, formaggio a 9 mesi. E' stato considerato per analisi future anche il campione di formaggio a 16 mesi. Per il 2° e terzo modulo progettuale, l'unità di Parma ha previsto anche l'analisi del formaggio al termine della salatura.

Anche per tale campione (così come per il siero cotto, il sieroinnesto e la cagliata acida di 48 ore) si è volontariamente accresciuto il numero dei campioni.

I campioni, eccetto che per la fase 1, potranno essere congelati e mantenuti a -20°C. I campioni di formaggio sono invece raccolti, messi sottovuoto e conservati a temperatura di refrigerazione fino al momento dell'analisi.

Attività 2: valutazione quali quantitativa mediante conta in piastra e analisi dei frammenti DNA per la valutazione della composizione in specie lattiche

Durante il terzo anno è stata completata la conta microbica in piastra dei 56 campioni di formaggio fuorisale, formaggio 9 mesi e 16 mesi per tutte le variabili dei tre moduli del progetto. E' stata valutata la composizione in specie di tutti i 210 campioni di latte, sierocotto, sieroinnesto, cagliata 48 ore, formaggio fuori sale, formaggio di 9 mesi e formaggio di 16 mesi.

La conta in piastra è stata condotta in i) terreno a base di formaggio (Cheese Agar-CA), CA 30°C per la ricerca di batteri lattici che hanno la potenzialità di svilupparsi in formaggio, ii) in MRS a 30°C per la ricerca di lattobacilli mesofili di norma stimati con il terreno più comune e in Yeast Extract Dextrose Chloramphenicol Agar (YEDC) a 25°C per la ricerca dei lieviti.

Attività 3: isolamenti

Dalle piastre di conta sono stati effettuati molti isolamenti prelevando colonie con morfologia differente. Dopo le fasi di purificazione della colonia ogni ceppo isolato è stato conservato a -80°C in presenza di glicerolo. L'identificazione è stata condotta per 60 ceppi.

Fase 3

Quantificazione dell'autolisi dei batteri lattici

La quantificazione dell'autolisi è stata condotta per 56 campioni di formaggio fuorisale, formaggio 9 mesi e 16 mesi per tutte le variabili dei tre moduli del progetto.

3. Risultati

Attività 2: valutazione quali quantitativa mediante conta in piastra e analisi dei frammenti DNA per la valutazione della composizione in specie lattiche

Valutazione della microflora lattica presente durante differenti momenti della produzione di Grana Padano in 6 caseificazioni condotte con lisozima e 6 caseificazioni condotte senza lisozima sulla base dei 3 moduli progettuali.

tuali indicati da ERSAF (silomais standard, silomais “innovativo”, fieno-silo loiessa). Durante questa fase, a completamento dell’attività del secondo anno, è stata caratterizzata la popolazione lattica dei campioni di latte, sierocotto, sieroinnesto e cagliata di 48 ore le cui conte erano state oggetto degli anni precedenti.

Latte

I campioni di latte sono evidentemente stati prelevati dalla caldaia in seguito all’inoculo del sieroinnesto, infatti oltre alle specie lattiche tipiche del latte crudo, in essi sono state rilevate anche le specie tipiche del sieroinnesto (*L. helveticus* e *L. delbrueckii*) e in alcuni casi anche *S. thermophilus*.

Nel latte corrispondente alla prima alimentazione, oltre alla popolazione aggiunta del sieroinnesto, sono stati evidenziati picchi non riconducibili a specie definite nel data base di riferimento e rappresentati con “Altri” nella figura 1.

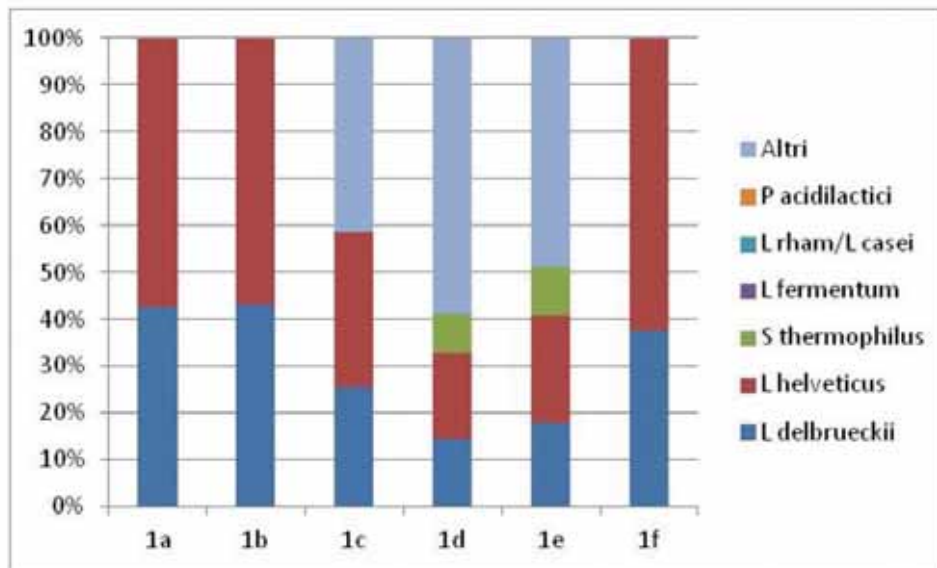


Figura 1. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di latte relativi al primo modulo (tradizionale). Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l’area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come “Altri”.

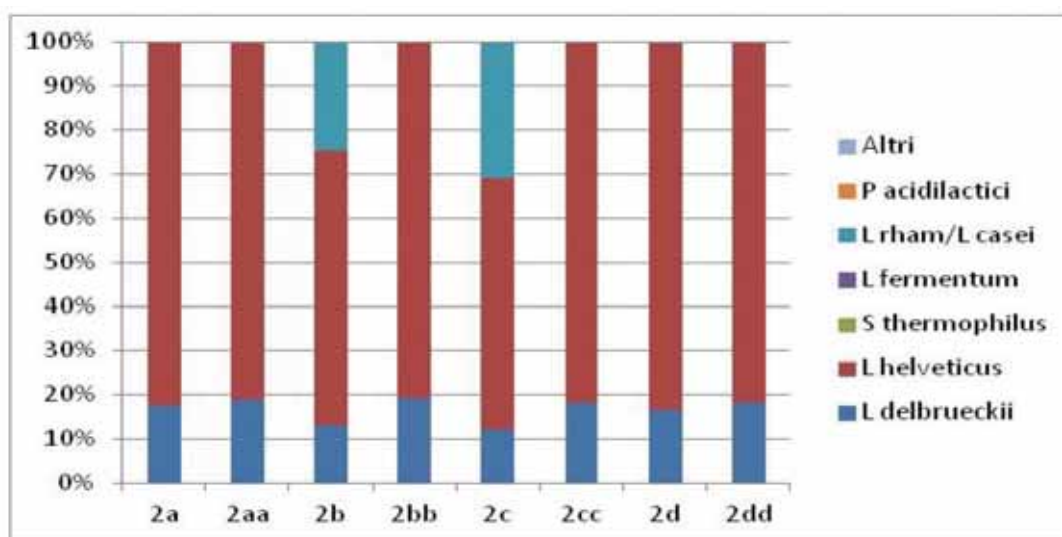


Figura 2. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di latte relativi al secondo modulo (tradizionale). Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l’area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come “Altri”.

Anche per il latte del secondo modulo deve essere suggerita la stessa considerazione, evidenziano in questo caso la presenza in due campioni (b e c) anche della specie *L. rhamnosus* (Figura 2) tipicamente considerata non starter del Grana Padano e fortemente implicata nella fase di maturazione del formaggi.

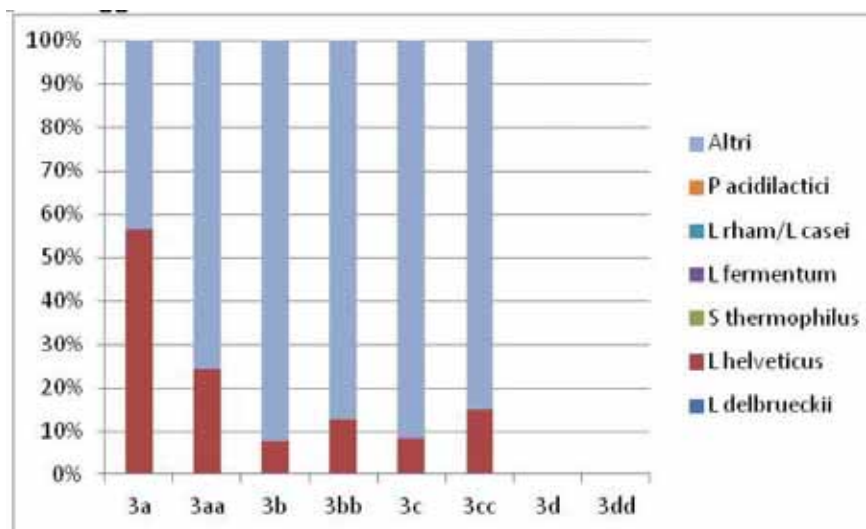


Figura 3. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di latte relativi al terzo modulo (tradizionale). Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

Diversa appare la composizione in specie del latte del terzo modulo. Molti picchi, non definiti e raggruppati sotto la definizione "Altri", evidenziano una composizione più eterogenea ma non definibile dal metodo utilizzato (Figura 3). I campioni 3d e 3dd per ragioni tecniche non sono stati determinati.

Sieroinnesti

L'analisi delle specie lattiche dei sieroinnesti ha confermato la presenza delle due specie lattiche lattobacillare che compongono il sieroinnesto naturale per la produzione di Grana Padano: *L. helveticus* e *L. delbrueckii* ragionevolmente subps. *lactis* (Figure 4, 5 e 6). La presenza delle due specie è risultata di circa 50:50 e in qualche raro caso, solo per il secondo e terzo modulo, accompagnata da una minore percentuale di *S. thermophilus*.

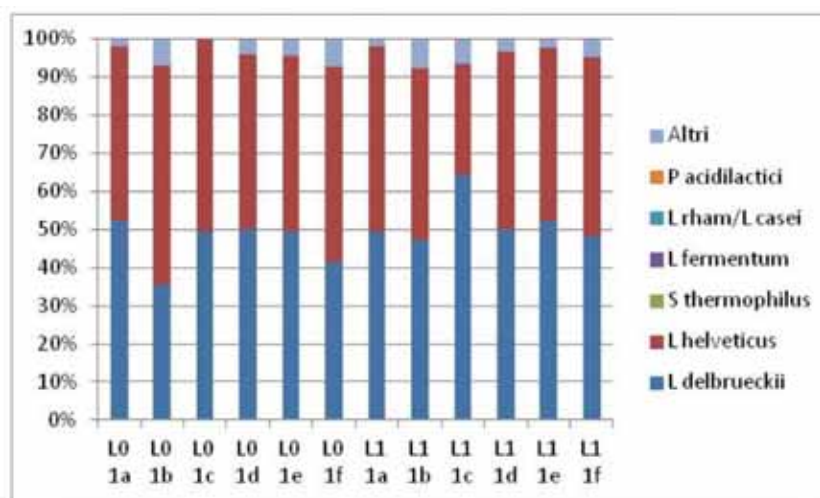


Figura 4. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di sieroinnesto relativi al primo modulo (tradizionale). Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

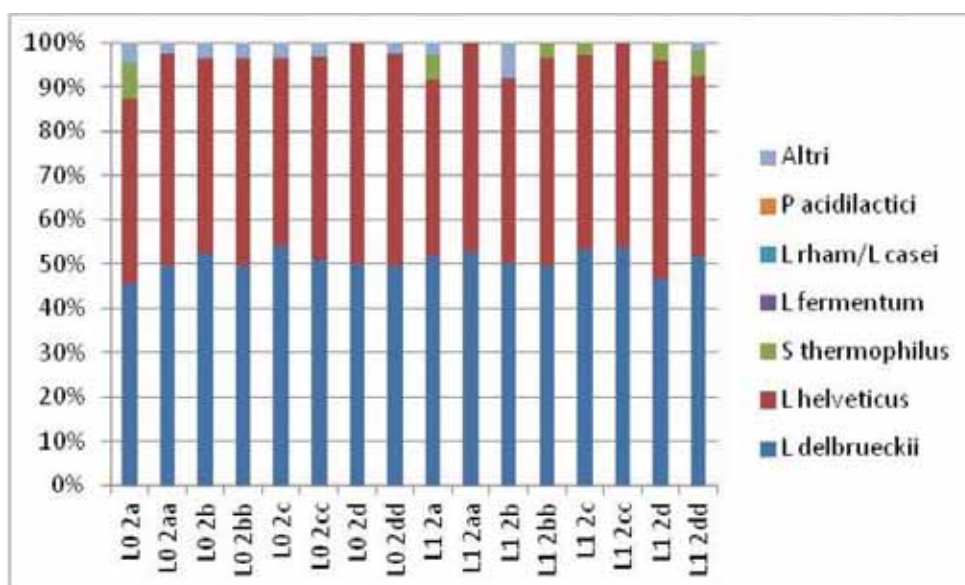


Figura 5. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di sieroinnesto relativi al secondo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come “Altri”.

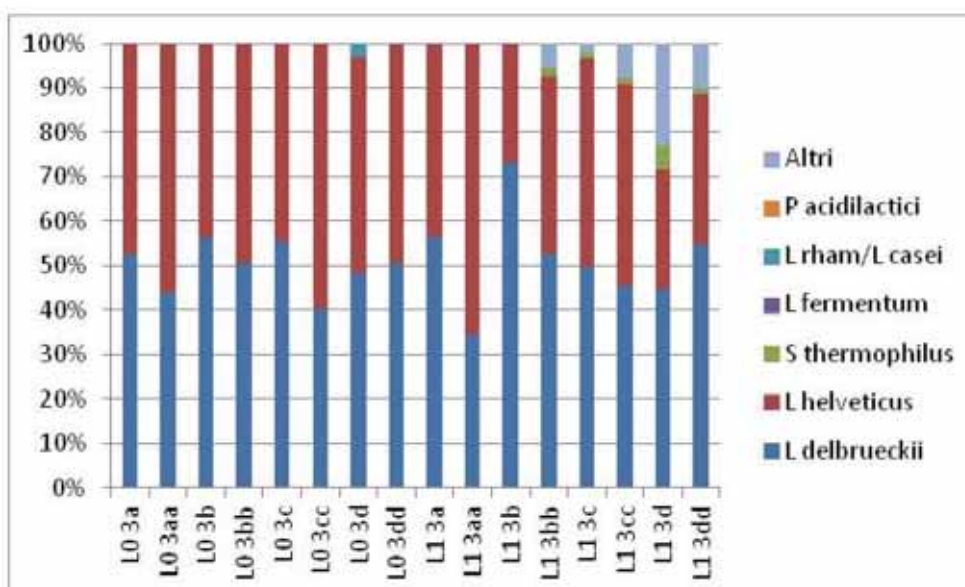


Figura 6. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di sieroinnesto relativi al terzo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come “Altri”.

In generale si potrebbe definire che i sieroinnesti relativi al terzo modulo (figura 6) possono essere considerati compositivamente i più variabili rispetto ai sieroinnesto degli altri due moduli.

Siero cotto

I campioni di siero cotto sono stati prelevati al termine della lavorazione e sono la base di partenza per la produzione dei rispettivi sieroinnesti. La composizione in batteri lattici dei sieroinnesti deriva perciò dallo sviluppo di quelli presenti nei sieri di lavorazione (che hanno subito la cottura e perciò definiti comunemente “siero cotto”).

I campioni di siero cotto del primo modulo (Figura 7) evidenziano una composizione favorevole alla specie *L. helveticus*. Dai dati precedentemente commentati si può dedurre che tale sbilanciamento è stato riequilibrato dopo incubazione per la produzione dei rispettivi sieroinnesti (Figura 4).

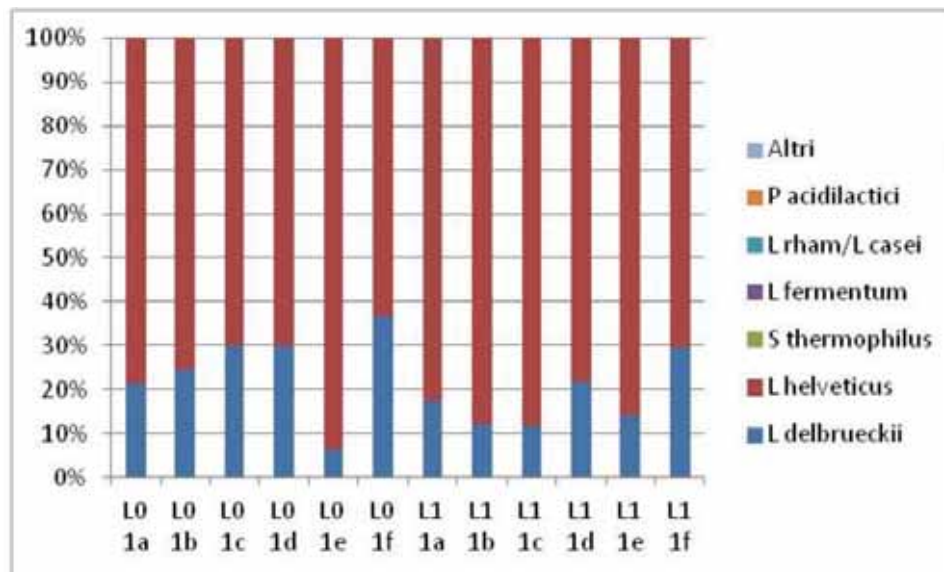


Figura 7. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di siero cotto relativi al primo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

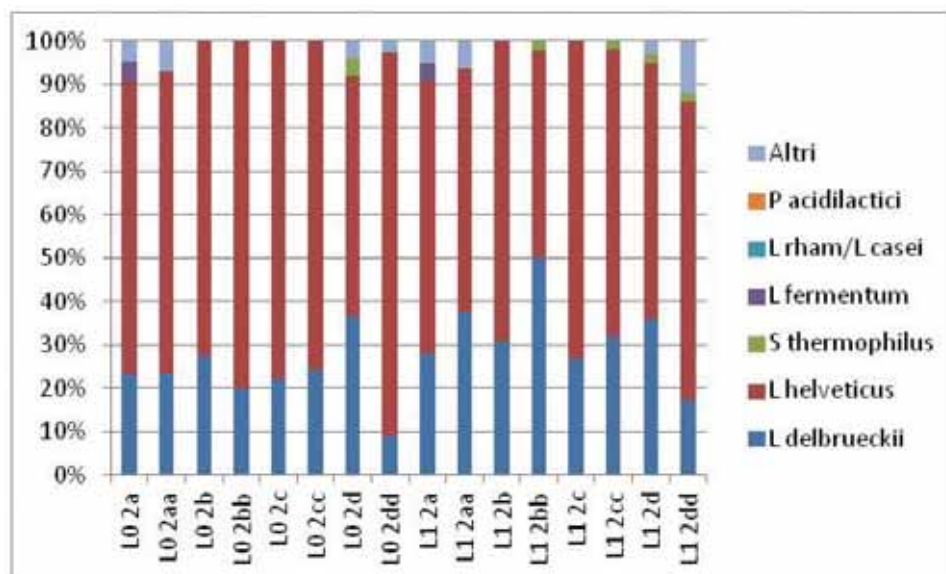


Figura 8. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di siero cotto relativi al secondo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

La situazione è simile, ma meno pronunciata, per i siero cotto del modulo secondo (Figura 8). Diversa rispetto ai primi due moduli e più simili alla composizione dei corrispondenti sieroinnesti (Figura 6) è risultata la percentuale di composizione in specie dei siero cotto del modulo terzo (Figura 9).

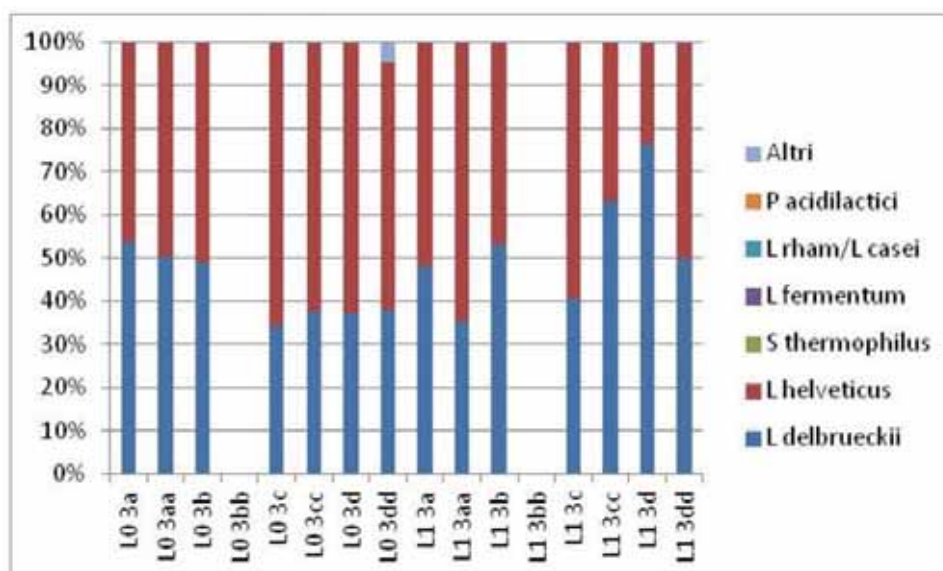


Figura 9. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di siero cotto relativi al terzo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

Cagliata 48 ore

Così come il sieroinnesto è da considerarsi l'evoluzione del sierocotto, la cagliata acidificata dopo 48 ore di stufatura è da considerarsi l'evoluzione dello sviluppo dei batteri del sieroinnesto nella nuova matrice. Infatti dai dati rilevati, mediante la tecnica che serve ad individuare la percentuale delle specie lattiche presenti nel campione, si può osservare la presenza delle specie che compongono il sieroinnesto che si sono correttamente sviluppate consumando il lattosio e acidificando la cagliata.

Nel campione relativo al primo modulo si osserva la presenza di *L. helveticus*, *L. delbrueckii* e anche di *L. fermentum* (Figura 10).

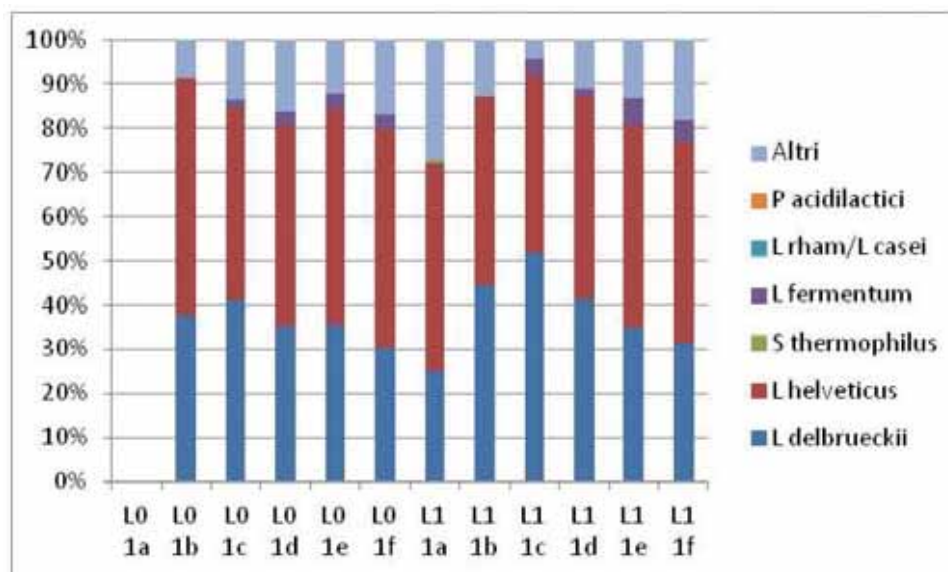


Figura 10 . Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di cagliata acidificata di 48 ore relativi al primo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

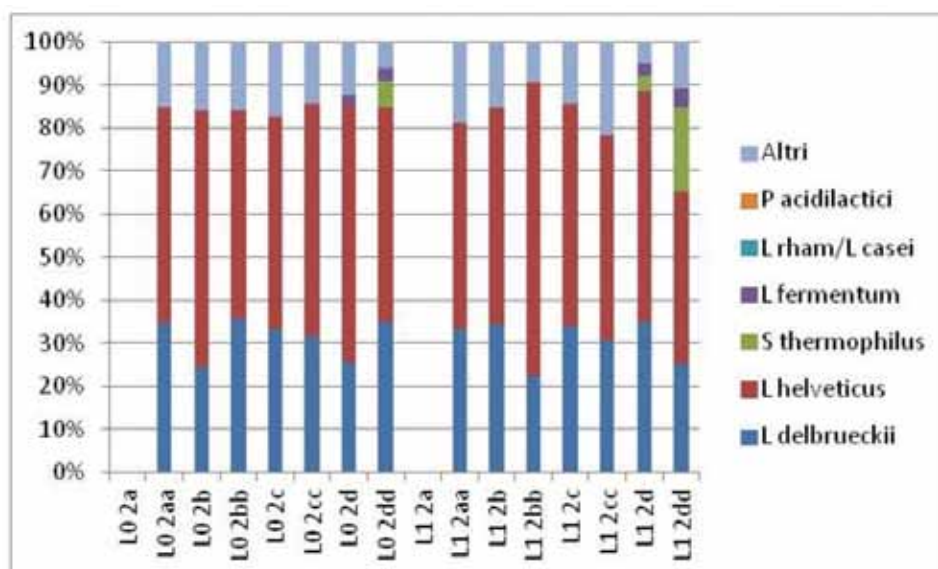


Figura 11. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di cagliata acidificata di 48 ore relativi al secondo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

Nei campioni di cagliata del modulo due (Figura 11) si rileva anche lo sviluppo di *S. thermophilus* già presente nel rispettivo sieroinnesto (Figura 5). I campioni 2a con e senza lisozima non sono stati determinati per ragioni tecniche. La presenza di Lisozima non sembra evidenziare differenze rilevabili.

I campioni di cagliata del terzo modulo si contraddistinguono da quelli dei moduli precedenti per una maggiore eterogeneità di composizione in specie (Figura 12). Di rilievo la presenza di *S. thermophilus* e anche di *L. fermentum*. La presenza di questa ultima specie eterofermentante, potrebbe essere causa di difetti legati al gonfiore precoce.

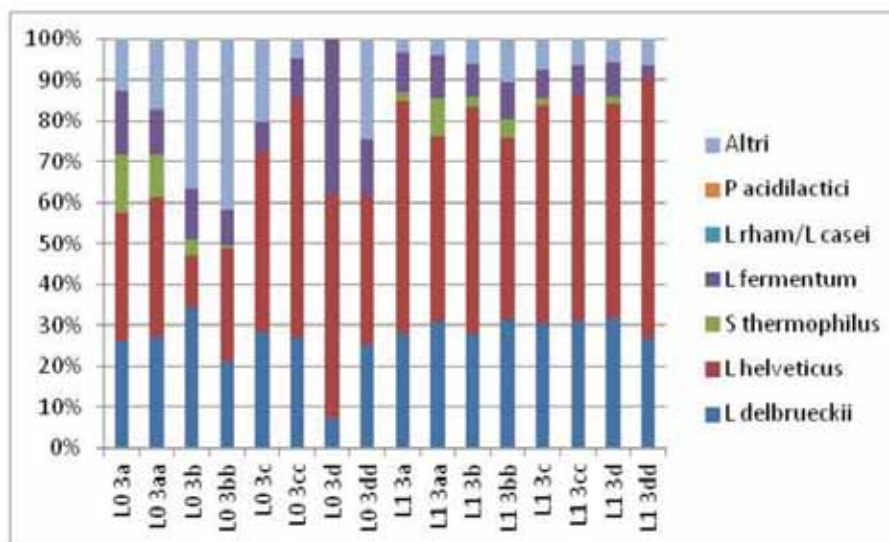


Figura 12. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di cagliata acidificata di 48 ore relativi al terzo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

Formaggio fuorisale

L'analisi di questi a campioni è stata individuata con il fine di caratterizzare la microflora lattica al termine della salatura prima della stagionatura. Questo aspetto è stato preso in considerazione a progetto iniziato, in base ai risultati ottenuti e perciò applicato al secondo e al terzo modulo della sperimentazione.

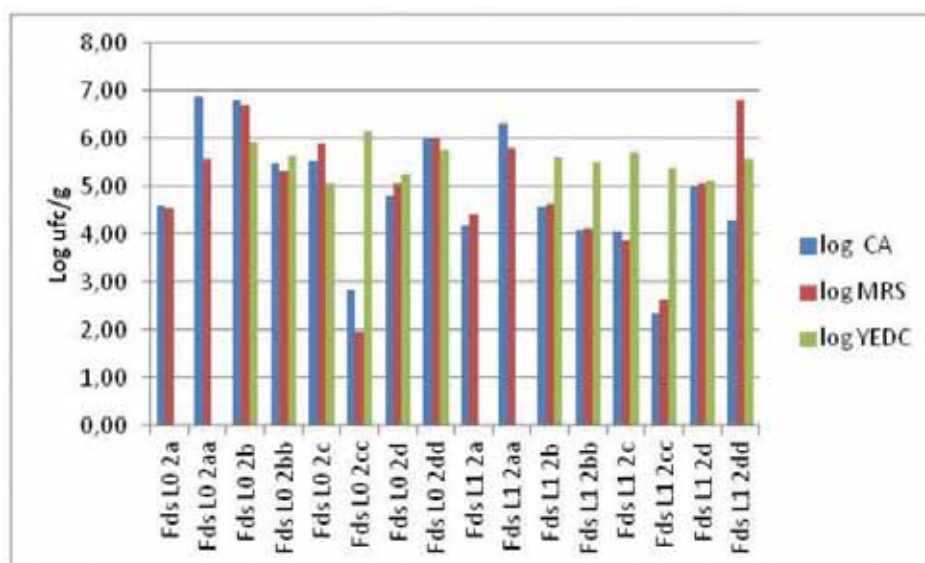


Figura 13. Conte microbiche relative ai campioni del formaggio fuori sale del secondo modulo (fieno silo di Loiessa). L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima. Neni campioni 2a, 2aa (L0 e L1) i lieviti non sono stati determinati.

Estremamente variabile è risultata la conta dei batteri lattici, lattobacilli in MRS e batteri con potenzialità di svilupparsi in formaggio Grana Padano durante la stagionatura, nelle diverse lavorazioni indipendentemente dalla presenza o no di lisozima. La carica minima è stata rilevata nei campioni 2cc (con e senza lisozima), evidenziando come per questa lavorazione il Lisozima non abbia avuto un effetto discriminante. La carica massima è stata rilevata nel campione 2b in assenza di Lisozima. Interessante evidenziare che nella lavorazione gemella 2b (L1) in presenza di Lisozima la carica lattica lattobacillare è notevolmente ridotta. In questa lavorazione il Lisozima potrebbe aver avuto un ruolo nel ridurre tale carica batterica. Di rilievo in tutti i campioni, indipendentemente dalla presenza di Lisozima, la presenza di lieviti.

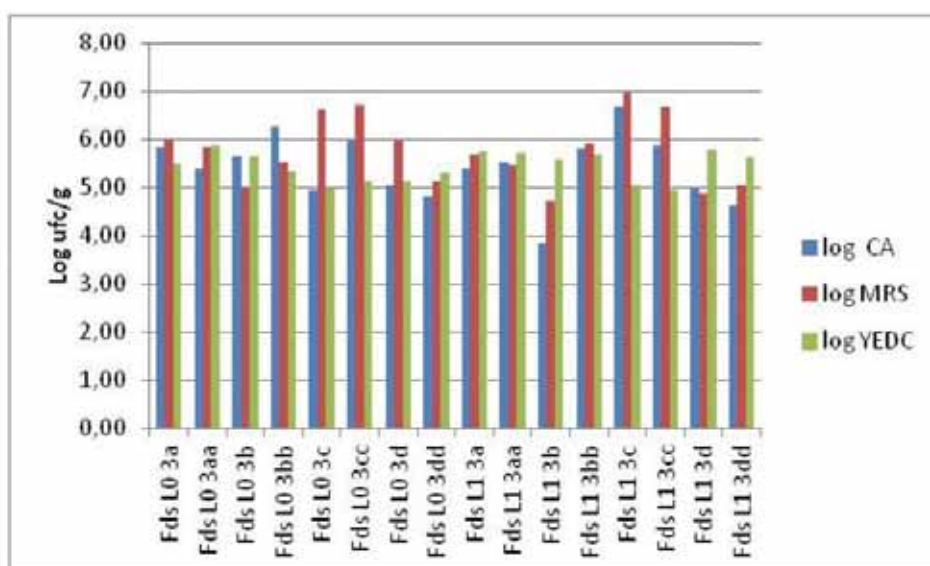


Figura 14. Conte microbiche relative ai campioni del formaggio fuori sale del terzo modulo (silomais innovativo). L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

Diversamente dal modulo 2 (fieno silo di Loiessa) nei campioni di formaggio fuorisale ottenuti con la terza alimentazione (silomais innovativo) conta dei batteri lattici, lattobacilli in MRS e batteri con potenzialità di svilupparsi in formaggio Grana Padano durante la stagionatura è risultata meno variabile e mediamente più alta. La presenza di Lisozima non sembra aver condizionato numericamente la popolazione lattica lattobacillare anche se il campione con la carica inferiore (il 3b) deriva da una lavorazione con il Lisozima (Figura 16). La composizione in specie di questi campioni è stata valutata per tutti i campioni (Figura 15). E' risultata variabile sottolineando come la diversa caseificazione influisce più della presenza o non dell'enzima.

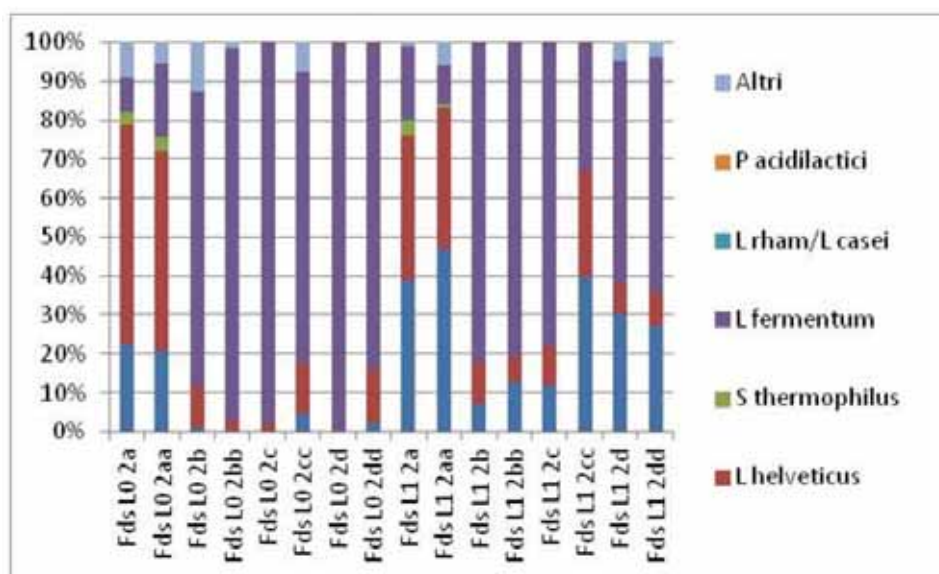


Figura 15. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni fuorisale relativi al modulo 2 (fieno silo di Loiessa). Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

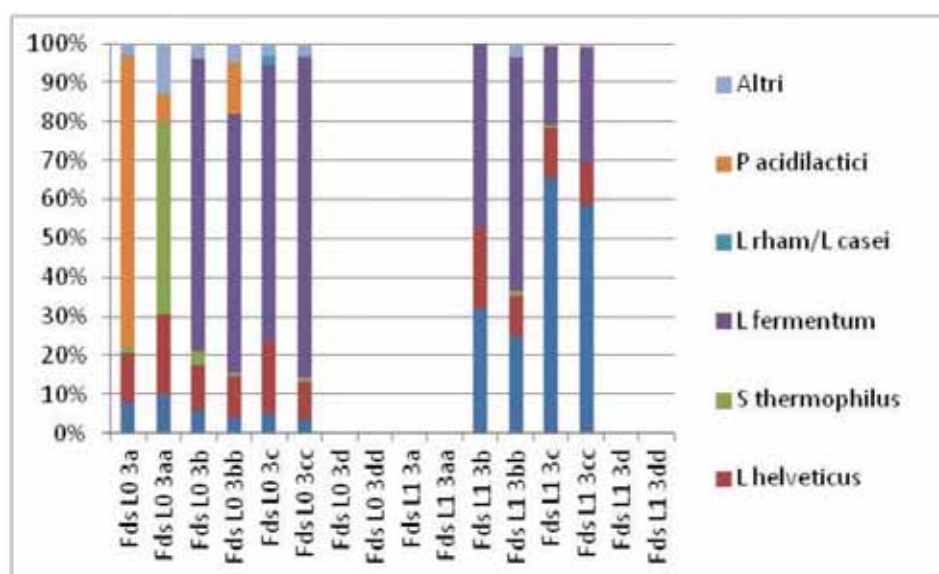


Figura 16. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni fuorisale relativi al modulo 2 (silo innovativo). Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

I campioni relativi al terzo modulo di alimentazione evidenziano la presenza rilevante della specie *L. fermentum* eterofermentante quando il lisozima è assente (Figura 16). In presenza di Lisozima le specie del gruppo

casei (*L. rhamnosus* e/o *L. casei*) positive per la maturazione del formaggio, sono aumentate in percentuale (Figura 16).

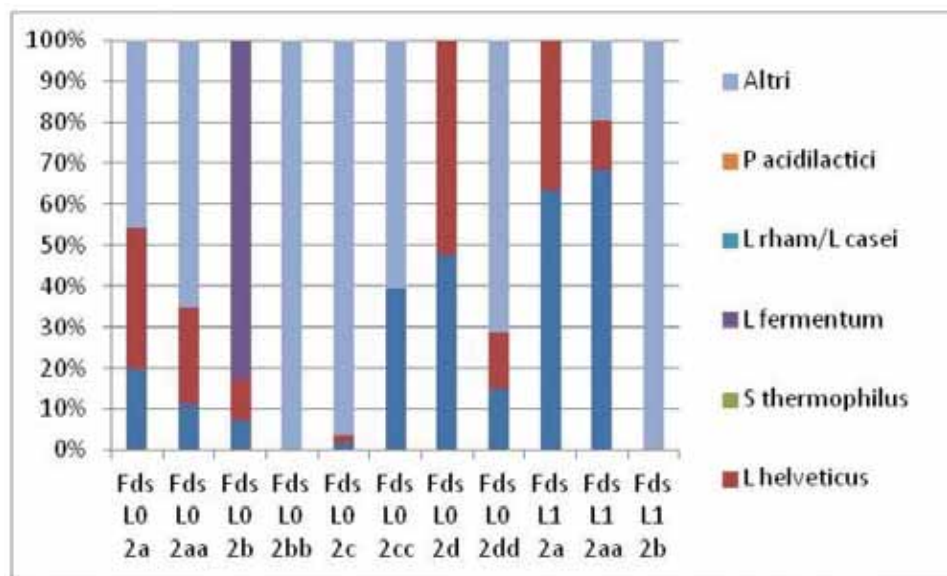


Figura 17. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie lisate rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni filtrati sterilmente di formaggio fuori sale relativi al secondo modulo.

La tecnica applicata ai campioni filtrati sterilmente evidenzia la percentuale delle specie che sono andate incontro a lisi cellulare. Si osserva la lisi sia della specie starter (*L. helveticus*) che non starter (gli altri colori sulla barra). La specie *L. fermentum*, presente in forma vitale (figura 15) si è anche lisata (Figura 18).

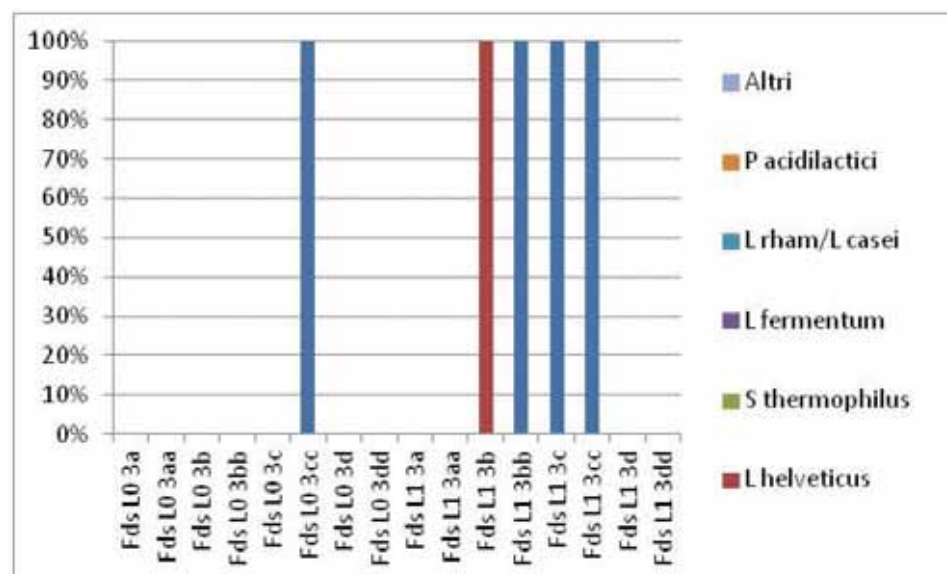


Figura 18. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie lisate rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni filtrati sterilmente di formaggio fuori sale relativi al terzo modulo.

L'interpretazione dei dati per il terzo modulo è un po' più complessa ma si può osservare che la specie *L. helveticus* è la principale lisata nel campione 3b con Lisozima (figura 18).

Formaggio 9 mesi

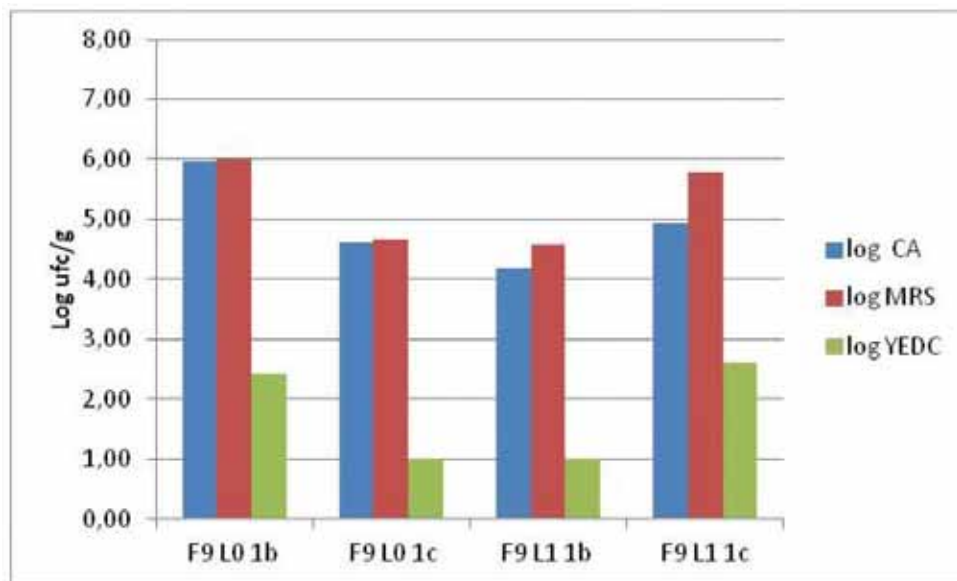


Figura 19. Conte microbiche relative ai campioni del formaggio di nove mesi del primo modulo (tradizionale). L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

La carica microbica rilevata nei campioni di formaggio di 9 mesi ottenuti da alimentazione tradizionale è risultata variabile in funzione della lavorazione non sembra condizionata dalla presenza di lisozima (figura 19) che invece sembrerebbe condizionare le specie microbiche presenti. In assenza di lisozima solo la specie *P. acidilactici* è comune nei due campioni mentre, in presenza di lisozima, la composizione è risultata più uniforme. Diversamente da quanto osservato per i campioni di formaggio fuori sale, caratteristica sembra essere la presenza della specie *L. fermentum* (Figura 20).

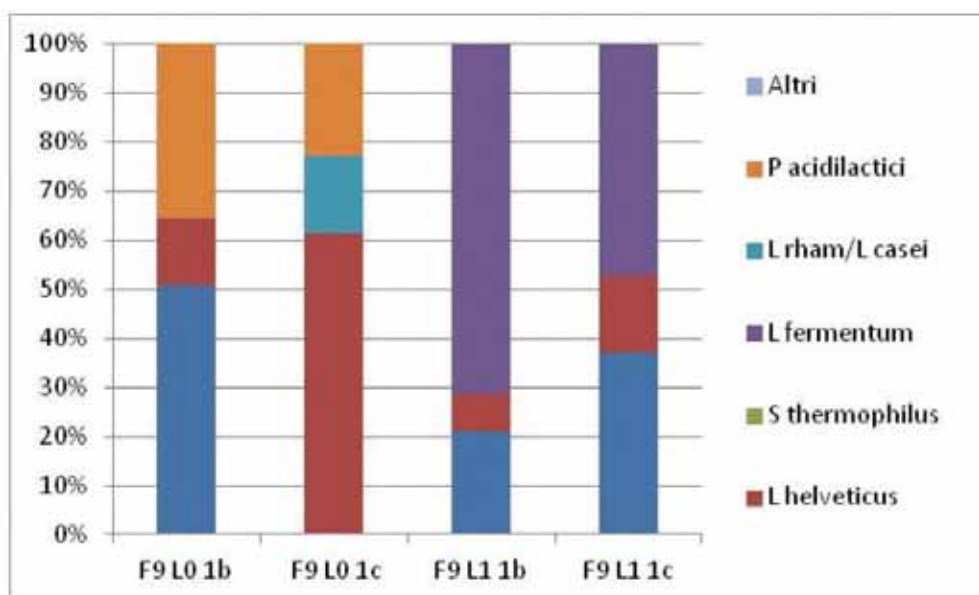


Figura 20. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di nove mesi relativi al primo modulo (tradizionale). Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

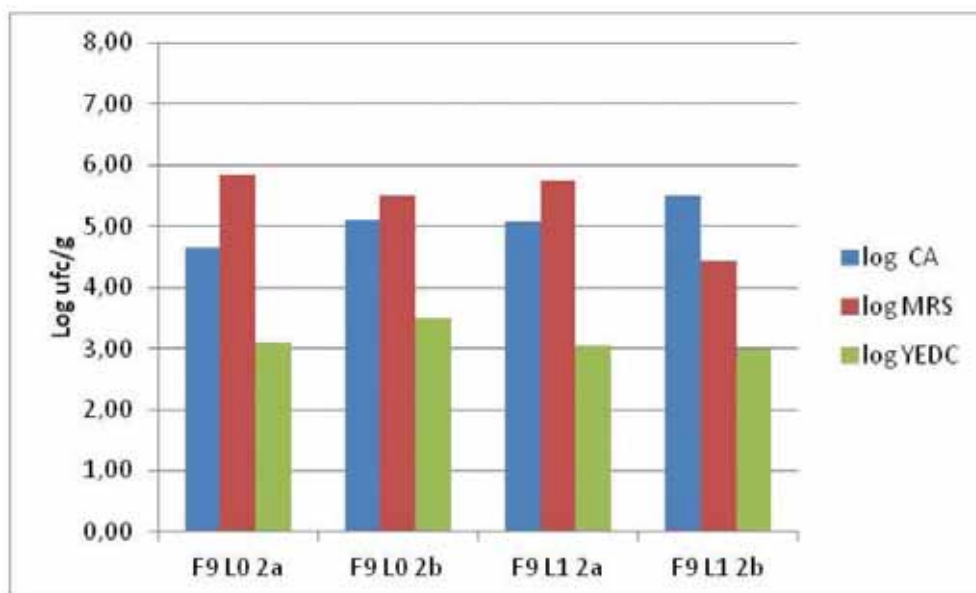


Figura 21. Conte microbiche relative ai campioni del formaggio di nove mesi del secondo modulo (silo mais Loiessa). L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

Molto simili sono risultate le cariche microbiche del formaggio di nove mesi ottenuto sia con che senza Lisozima relativi alla seconda alimentazione. Rispetto al primo modulo costantemente rilevati i lieviti nella quantità di circa 1000 per grammo (Figura 21).

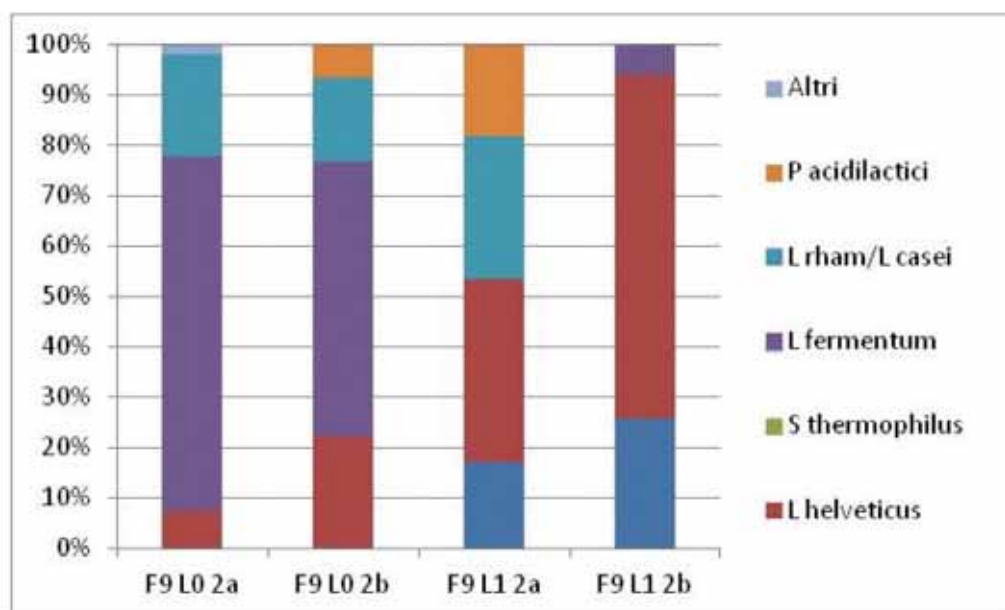


Figura 22. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di nove mesi relativi al secondo modulo (silo mais Loiessa). Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

Anche per questo modulo viene evidenziato l'effetto del Lisozima sulla percentuale delle specie lattiche presenti che sono risultate diverse in funzione della presenza dell'enzima. Differentemente dal primo modulo, la presenza della specie *L. fermentum* è stata rilevata nei campioni prodotti in assenza di Lisozima (Figura 22).

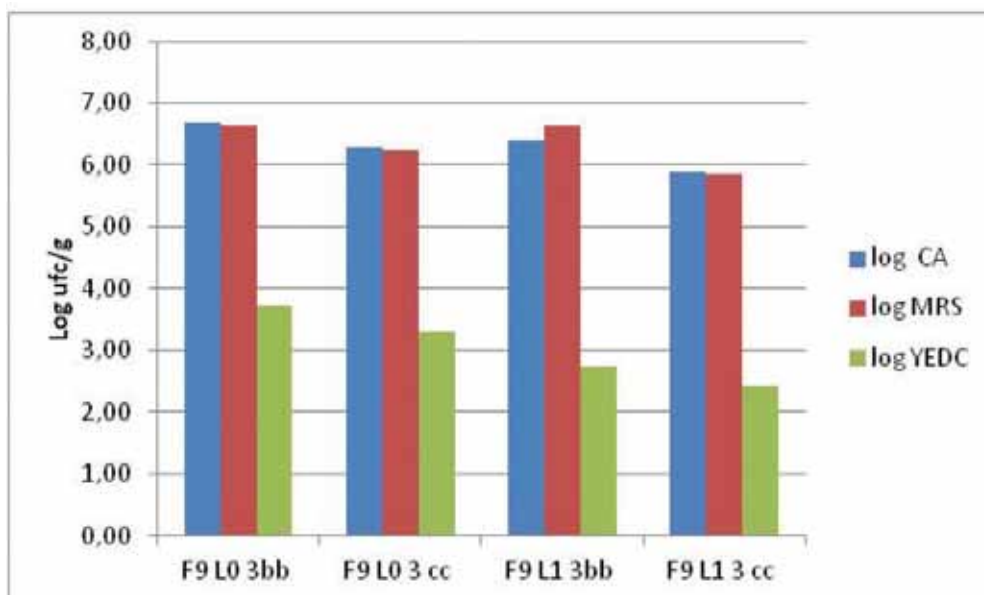


Figura 23. Conte microbiche relative ai campioni del formaggio di nove mesi del terzo modulo (innovativo). L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

Come per il secondo modulo, le cariche microbiche ottenute per i formaggi di nove mesi prodotti con e senza Lisozima relative all'alimentazione innovativa, sono molto simili (Figura 23). Anche la percentuale delle specie presenti, differentemente dal secondo modulo, non sembra essere condizionata dal Lisozima (Figura 24).

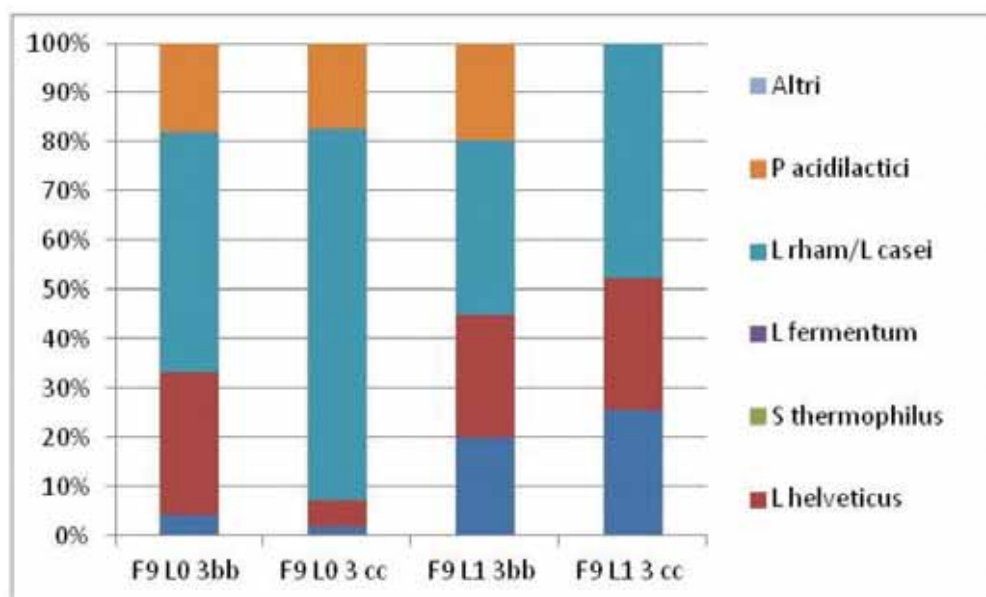


Figura 24. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di nove mesi relativi al secondo modulo (innovativo). Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

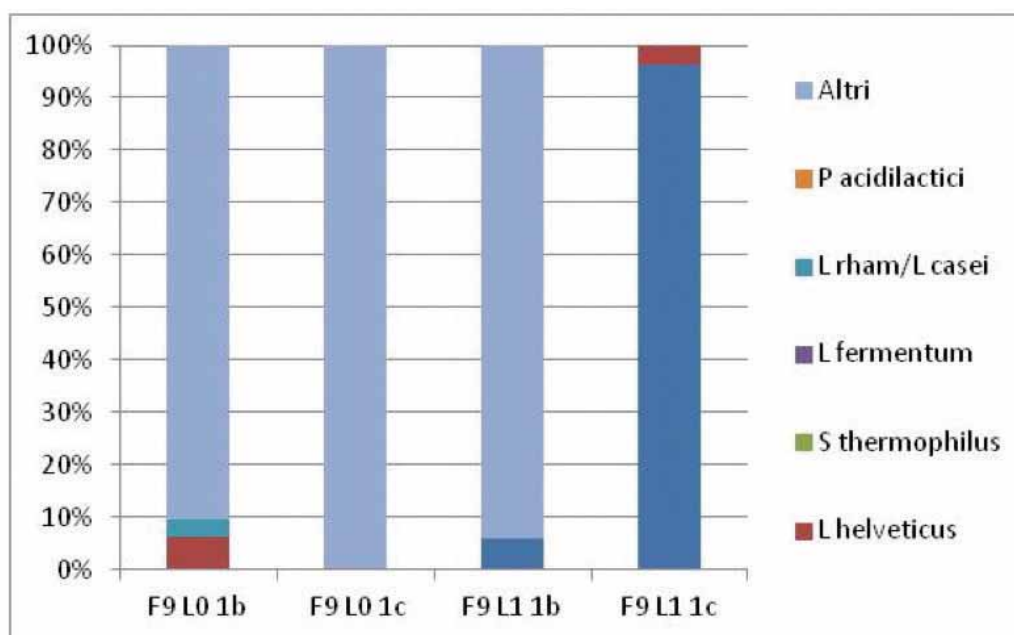


Figura 25. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie lisate rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni filtrati sterilmente di nove mesi relativi al primo modulo.

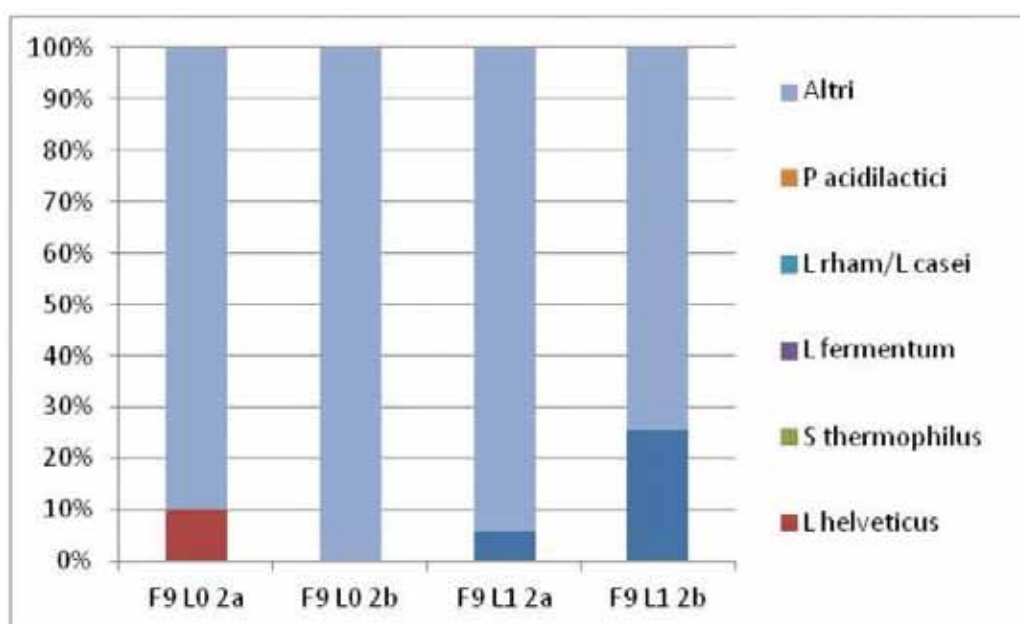


Figura 26 Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie lisate rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni filtrati sterilmente di nove mesi relativi al secondo modulo.

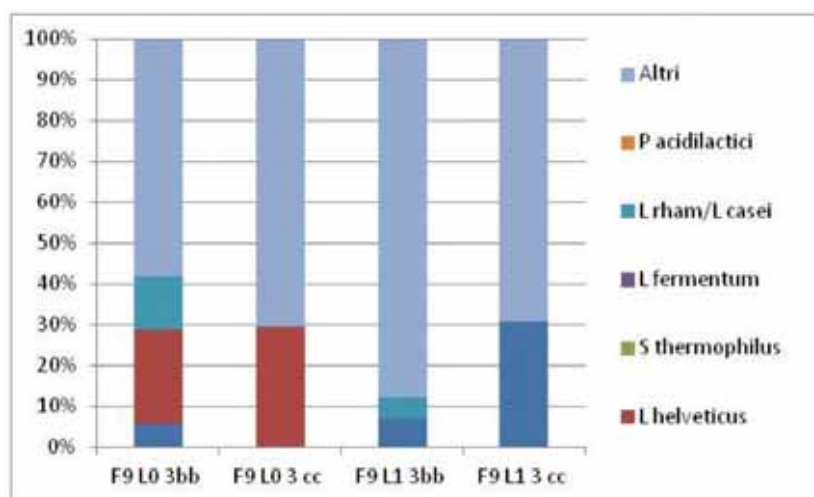


Figura 27. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie lisate rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni filtrati sterilmente di nove mesi relativi al terzo modulo.

Nelle tre figure 25, 26 e 27 sono messe in evidenza le specie che nel formaggio di 9 mesi di stagionatura sono lisate. Cioè quelle il cui DNA è libero nel formaggio in seguito alla lisi cellulare. Si può osservare che questa tecnica applicata a questi campioni evidenzia come ci siano molti picchi di difficile interpretazione (rappresentati nella barra “Altri”). I picchi riconoscibili permettono di osservare come anche la lisi cellulare delle diverse specie sia estremamente variabile e non sembra essere correlabile né all'alimentazione né alla presenza o non del lisozima.

Formaggio 16 mesi

L'analisi del formaggio a 16 mesi di stagionatura non era stata prevista dal progetto. Tuttavia, vista la forte variabilità osservata fino a 9 mesi, si è deciso di analizzare volontariamente anche questa serie di campioni. In generale, come ci si aspettava, è stata rilevata una riduzione della carica microbica per tutti i campioni dovuta al tempo di stagionatura di quasi un anno e mezzo. Nello specifico la carica è variata non tanto in funzione della presenza o dell'assenza del lisozima ma piuttosto in funzione del tipo di alimentazione.

Confermando quanto osservato a dopo nove mesi di stagionatura, la prima tipologia di alimentazione ha determinato una carica microbica del formaggio di 16 mesi molto variabile in funzione della lavorazione. Le 4 lavorazioni (1c e 1d sia L0 che L1) evidenziano cariche diverse tra di loro e anche tra il terreno MRS e CA (Figura 26). Questo dato suggerisce che la popolazione lattica presente nel formaggio è di diverso tipo. Sempre presenti i lieviti anche se diminuiti di circa un ordine di grandezza rispetto al tempo precedente.

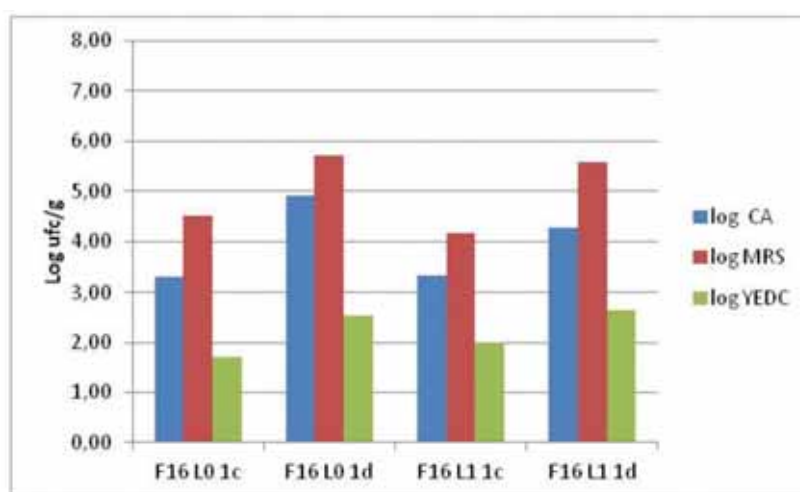


Figura 28. Conte microbiche relative ai campioni del formaggio di 16 mesi del primo modulo. L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

Simili tra di loro, così come evidenziato dai campioni a 9 mesi, le cariche relative al secondo e al terzo modulo (Figure 28 e 29). Confrontabili le conte tra lattobacilli in MRS e batteri con potenzialità di svilupparsi in formaggio Grana Padano durante la stagionatura sottolineando come probabilmente sia la stessa popolazione a crescere nei due terreni.

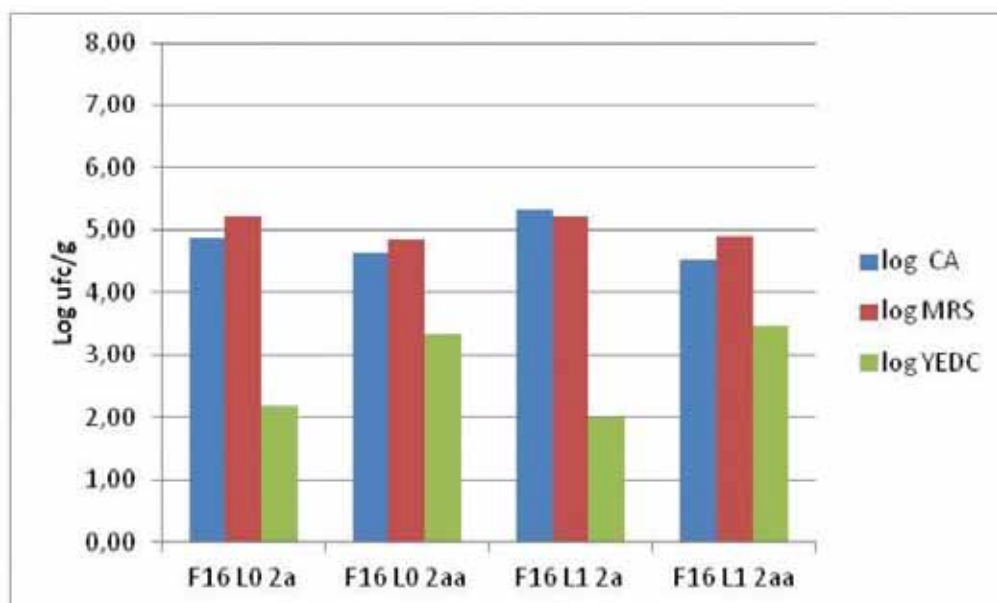


Figura 29. Conte microbiche relative ai campioni del formaggio di sedici mesi del secondo modulo.

L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

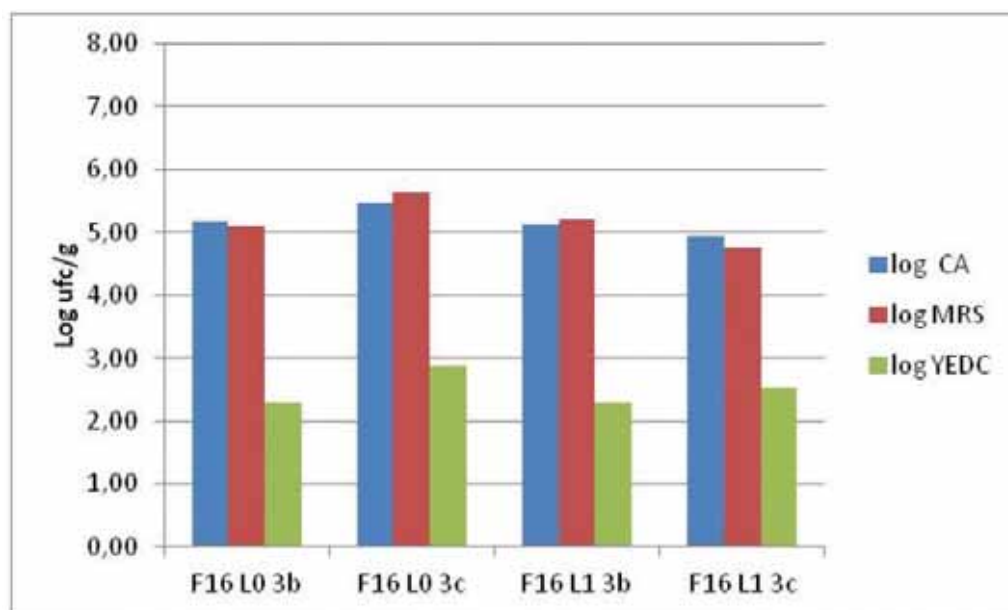


Figura 30. Conte microbiche relative ai campioni del formaggio di sedici mesi del terzo modulo.

L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

Anche per questi moduli, indipendentemente dalla presenza del lisozima, ancora presenti, nell'ordine di grandezza di centinaia per grammo, i lieviti.

Per quanto riguarda la composizione in specie valutata per le cellule intere (Figure 31, 32 e 33) e per le cellule lisate (Figure 34, 35 e 36) si conferma quanto osservato per il formaggio stagionato 9 mesi. La variabilità di composizione è evidente ma la differenze osservate tra i formaggi prodotti con e senza lisozima sono inferiori alle differenze rilevate tra i formaggi prodotti nelle diverse lavorazioni.

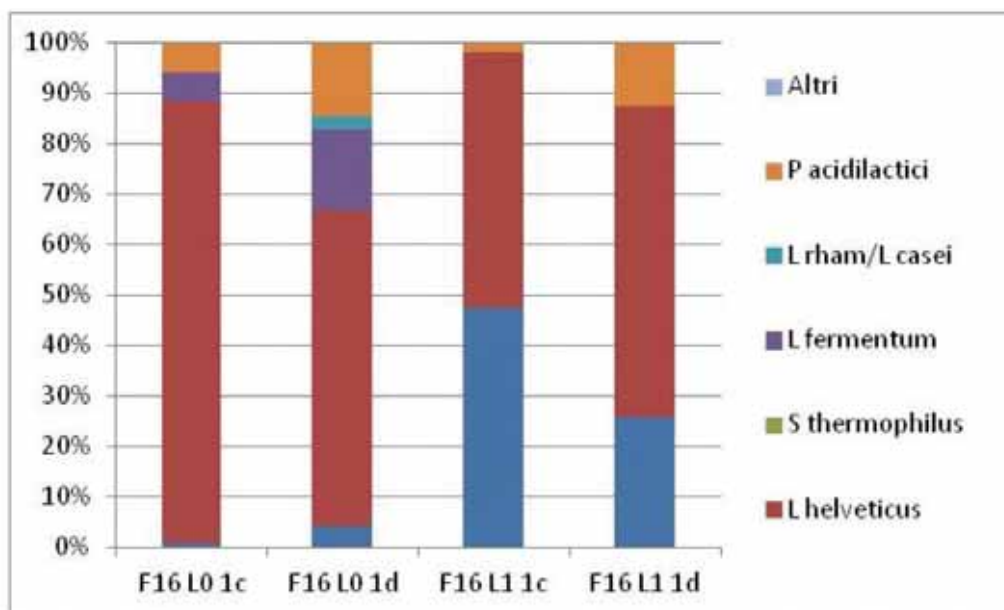


Figura 31. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di 16 mesi relativi al primo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

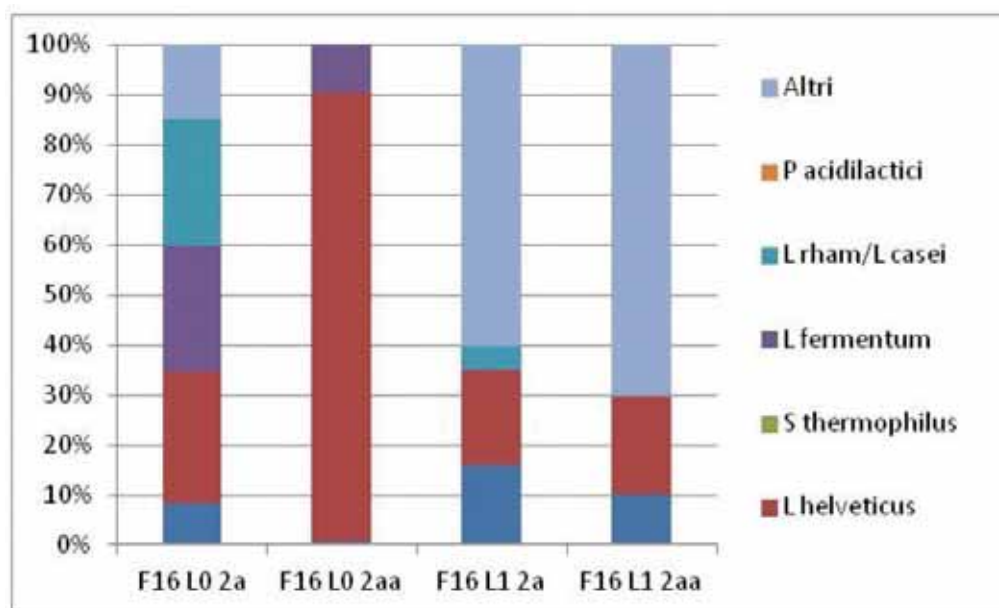


Figura 32. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di 16 mesi relativi al secondo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

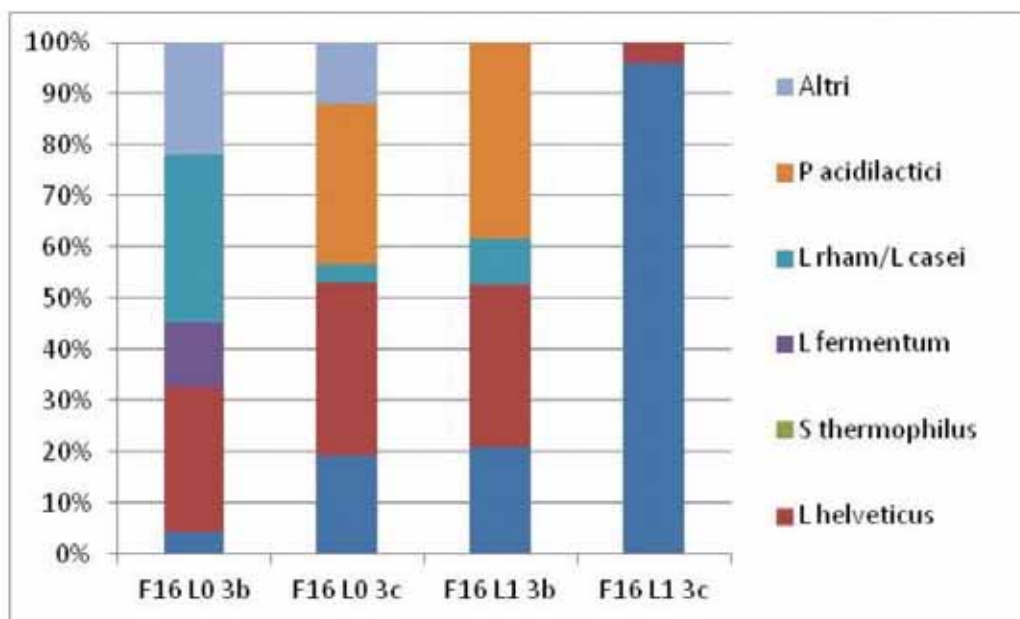


Figura 33. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni di 16 mesi relativi al terzo modulo. Le specie riconosciute sono indicate con colori diversi, l'area dei picchi (uno o più) che non sono riconosciuti nel data base di riferimento (Lazzi et al 2004, Neviani et al 2013, Gatti et al 2014) è rappresentata come totale e definita come "Altri".

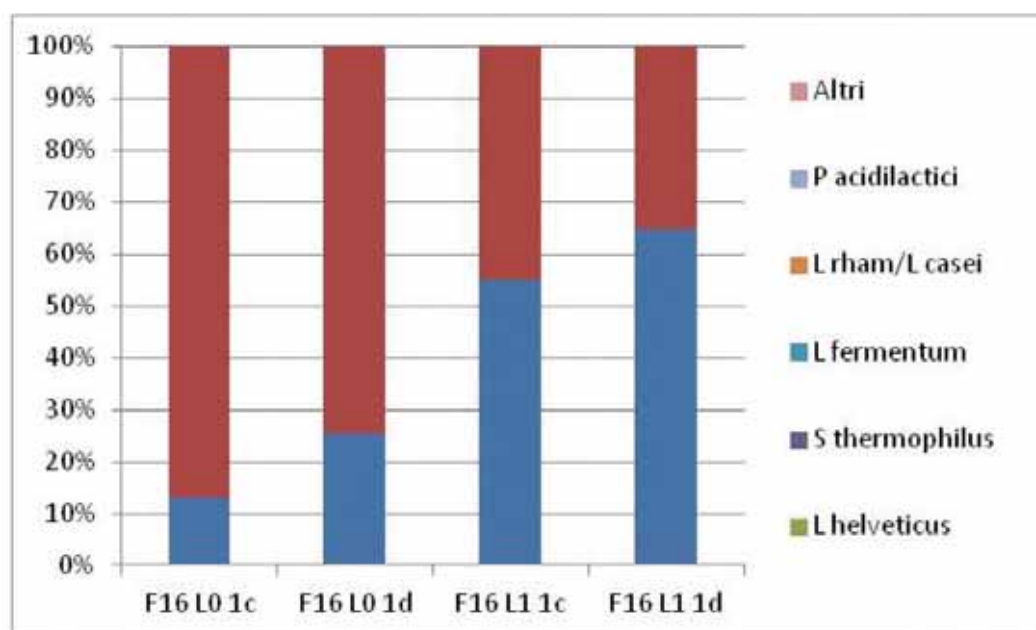


Figura 34. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie lisate rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni filtrati sterilmente di 16 mesi relativi al primo modulo.

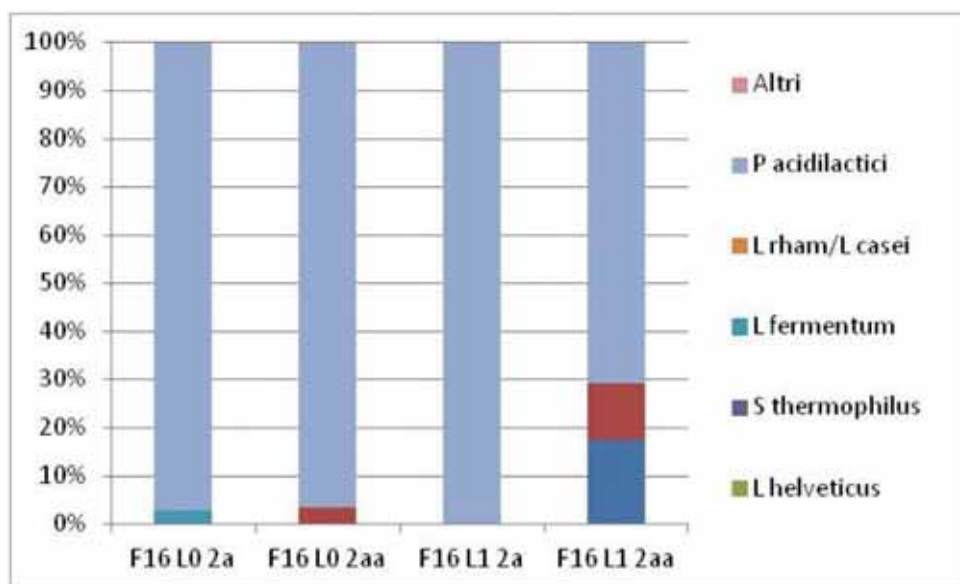


Figura 34. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie lisate rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni filtrati sterilmente di 16 mesi relativi al secondo modulo

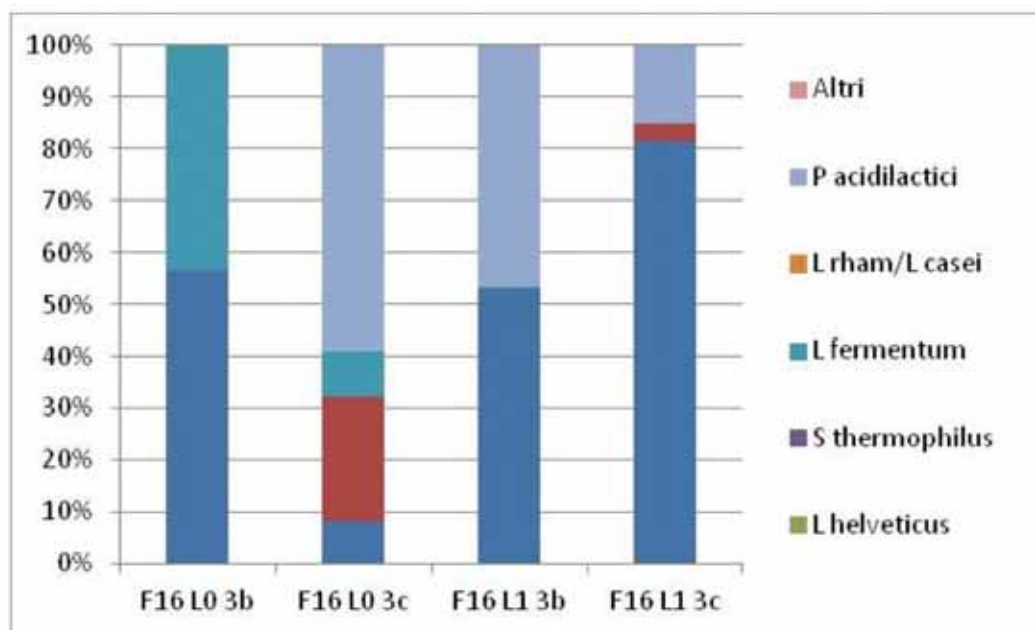


Figura 35. Rappresentazione grafica delle diverse percentuali di specie lisate rilevate mediante analisi dei frammenti di DNA con la tecnica LH-PCR dei campioni filtrati sterilmente di 16 mesi relativi al terzo modulo

Attività 3: Isolamenti

Dalle piastre di conta dei diversi campioni di latte, siero cotto, sieroinnesto, cagliata e formaggi a tre tempi di stagionatura, sono state isolate numerose colonie.

Come previsto dal progetto, si è proceduto alla purificazione e identificazione di 60 isolati che sono risultati appartenere alle specie:

Lactobacillus helveticus (15 ceppi)

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* (5)

Lactobacillus casei (20 ceppi)

Lactobacillus rhamnosus (20 ceppi)

I ceppi, in MRS a -80°C con aggiunta di glicerolo, sono conservati nei congelatori del laboratorio di Microbiologia degli Alimenti del Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università degli Studi di Parma.

Fase 3

Quantificazione dell'autolisi dei batteri lattici

La quantificazione dell'autolisi è stata effettuata mediante la misurazione dell'attività enzimatica peptidasica di origine intracellulare dei batteri lattici con il fine di stimare il grado di autolisi complessivo all'interno di ogni campione. Infatti l'utilizzo del substrato sintetico β -naftilato (Leu β Na) permette di quantificare l'attività dell'enzima in grado di idrolizzarlo. Poichè il campione viene filtrato sterilmente prima dell'analisi, tale stima è riferita agli enzimi che non sono compartimentati nella cellula microbica (trattenuta dal filtro sterilizzante) ma liberati nel formaggio in seguito alla lisi.

Dato il suo significato, questo tipo di analisi è stata effettuata sui campioni di formaggio: fuori sale (modulo due e tre), 9 e 16 mesi di stagionatura per i tre moduli.

I dati ottenuti evidenziano che già al momento dell'estrazione dalla salina, l'attività enzimatica intracellulare è già attiva e sottolinea come sia già cominciata l'autolisi cellulare dei batteri lattici. In generale si può osservare che l'autolisi non si differenzia in funzione della presenza del lisozima ma piuttosto in funzione della lavorazione (Figure 36 e 37). Il tipo di alimentazione sembrerebbe invece condizionare il grado di autolisi che mediamente è risultata maggiore per i formaggio fuori sale del terzo modulo (Figura 37) rispetto a quelli del secondo (Figura 36).

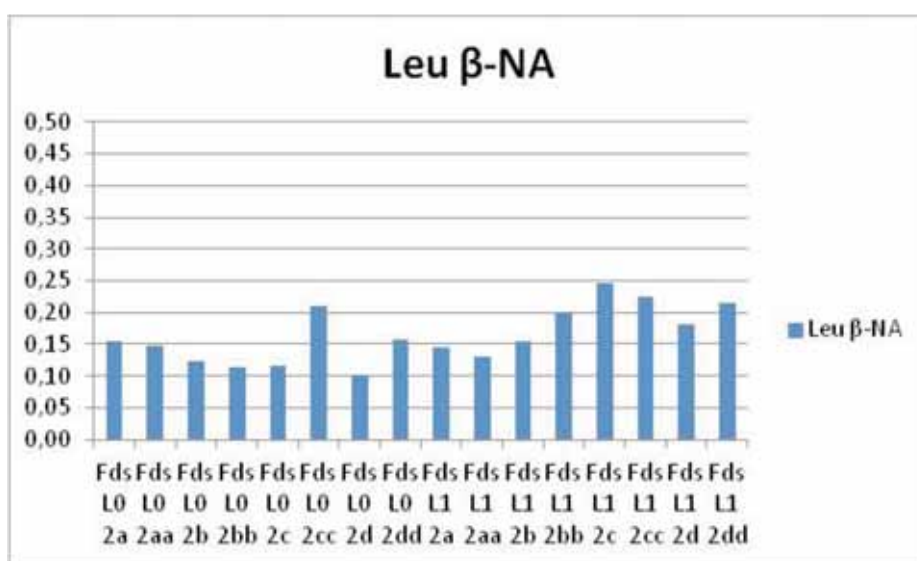


Figura 36. Valore Assorbanza a 280nm relativi ai campioni del formaggio fuori sale del secondo modulo di alimentazione. L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

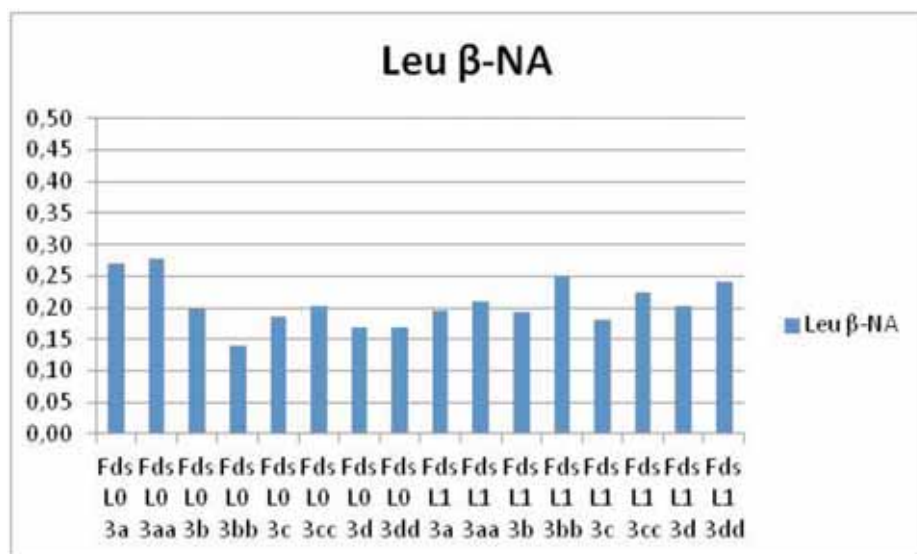


Figura 37. Valore Assorbanza a 280nm relativi ai campioni del formaggio fuori sale del terzo modulo di alimentazione. L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

Dopo 9 mesi di maturazione il grado di autolisi, come prevedibile è quasi duplicato (Figura 38). Dopo questo tempo di stagionatura, la variabilità dell'autolisi risulta ascrivibile alla lavorazione e non al lisozima presente. La differenza di autolisi tra due alimentazioni evidenziata nel formaggio fuorisale non è più rilevata a questo tempo di stagionatura.

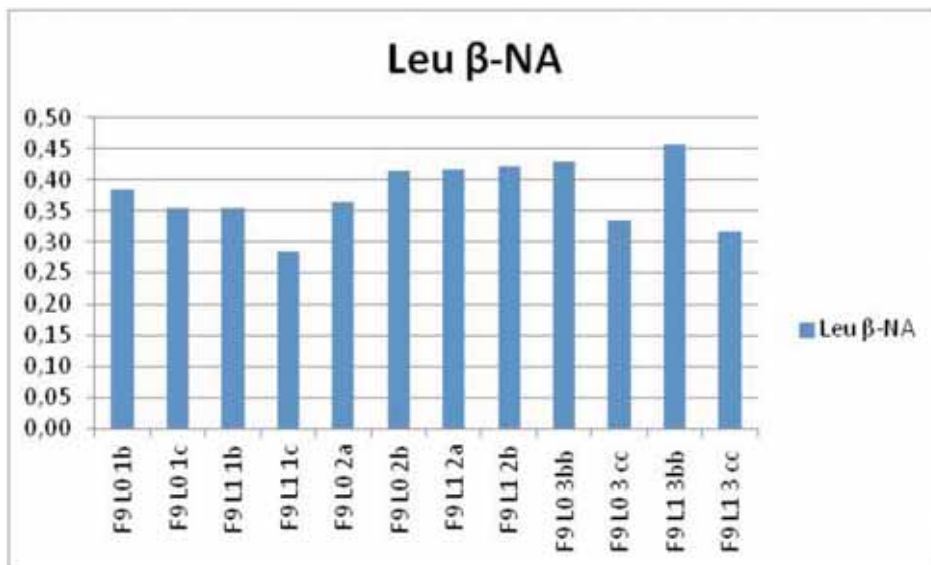


Figura 38. Valore Assorbanza a 280nm relativi ai campioni del formaggio di 9 mesi dei tre moduli di alimentazione. Il primo modulo è indicato con il numero 1, il secondo con il numero 2 e il terzo con il numero 3. L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

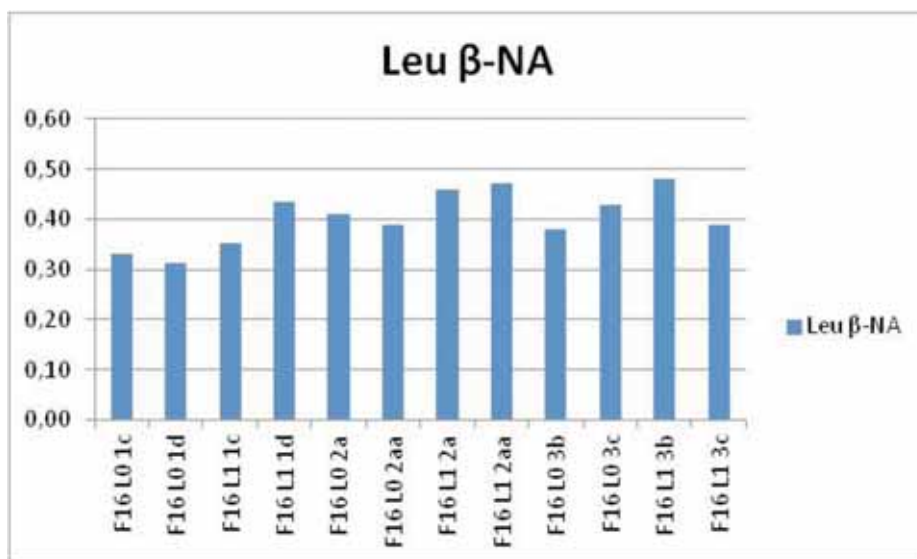


Figura 39. Valore Assorbanza a 280nm relativi ai campioni del formaggio di 16 mesi dei tre moduli di alimentazione. Il primo modulo è indicato con il numero 1, il secondo con il numero 2 e il terzo con il numero 3. L0 indica le lavorazioni senza Lisozima, L1 indica le lavorazioni con Lisozima

Il grado di autolisi nei campioni di formaggio dopo 16 mesi di stagionatura è risultato confrontabile (mediamente poco più elevato) (Figura 39) rispetto a quello osservato a 9 mesi (Figura 38).

4. Conclusioni

Lo scopo che l'Unità dell'Università di Parma aveva in questo progetto di ricerca era valutare se la microflora lattica dominante caratteristica delle caseificazioni di Grana Padano prodotto con il Lisozima fosse uguale o diversa, numericamente, qualitativamente e per capacità autolitica, rispetto a quella del Grana Padano prodotto senza Lisozima.

La sperimentazione, complessa e articolata su più livelli, e con diversi approcci sperimentali, ha permesso di evidenziare, tra i 252 diversi campioni analizzati mediante un approccio olistico, molte differenze. Tuttavia le differenze emerse non sono risultate imputabili solamente alla presenza o all'assenza del Lisozima.

La popolazione lattica è risultata variabile già a partire dal latte, dal siero cotto e dal sieroinnesto, in funzione delle diverse produzioni. Le differenze sono state messe in luce soprattutto dall'analisi condotta attraverso l'analisi dei frammenti di DNA per evidenziare la percentuale di composizione in specie.

L'evoluzione di tale microbiota naturale e variabile, durante la produzione (campioni di cagliata acidificata di 48 ore) e la stagionatura (campioni di formaggio fuori sale, formaggio 9 mesi e 16 mesi) è stata condizionata non solo dai parametri sperimentali previsti dal progetto (alimentazione delle bovine e presenza o assenza di lisozima) ma anche dalla naturale biodiversità microbica. La variabilità nei valori di conta, di specie e di autolisi ritrovata nei formaggi è fortemente condizionata dalla biodiversità tipica di ogni produzione.

L'assenza di una standardizzazione microbica, peculiarità dei formaggi prodotti con il latte crudo e sieroinnesto naturale come il Grana Padano, determina una variabilità microbiologica elevata anche durante la stagionatura. In conclusione, in base ai risultati ottenuti, si può affermare che le differenze che sono state rilevate tra lavorazioni parallele condotte con e senza lisozima sono risultate inferiori, o comunque confrontabili, a quelle naturalmente rilevabili tra diverse lavorazioni

3.10 Sottoprogetto 4 – Valutazione chimico-fisica

U.O. Università degli Studi di Milano

Dipartimento di Scienze per gli alimenti, la nutrizione e l'ambiente DeFENS (Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences)

Responsabile Prof. Luisa Pellegrino

1. *Obiettivi del sottoprogetto 4 - Valutazione chimico-fisica*

La sperimentazione, condotta presso l'azienda di Carpaneta, si è articolata in 3 moduli progettuali che si differenziano per il tipo di alimentazione base somministrata alle bovine (silomais standard, fieno-silo loiessa e silomais "innovativo" rispettivamente). I campioni analizzati derivano dalla caseificazione del latte ottenuto nei 3 diversi periodi. Le caseificazioni sono state condotte in parallelo, con e senza aggiunta di lisozima al latte, e utilizzando, a settimane alterne, latte in caldaia portato ad un diverso rapporto grasso/caseina (in particolare è stato considerato un rapporto basso, pari a 0.85-0.90, o alto, pari a 1.05-1.10).

Come riportato nella descrizione generale del progetto, l'attività assegnata a questa U.O. mirava al raggiungimento di tre principali obiettivi:

- 1- valutare l'effetto dell'utilizzo o meno del lisozima in caseificazione sulla disponibilità di forme azotate semplici (peptoni, piccoli peptidi, amminoacidi liberi) nel latte di massa, nel siero dolce e nel sieroinnesto, e sull'efficienza di utilizzo di dette forme azotate da parte della microflora presente;
- 2- valutare l'effetto dell'utilizzo o meno del lisozima in caseificazione sull'andamento della proteolisi durante la maturazione del formaggio, come conseguenza di possibili fenomeni di selezione o di una diversa velocità di lisi cellulare della microflora determinati dalla presenza dell'additivo;
- 3- verificare la rispondenza del formaggio stagionato, anche quando ottenuto senza lisozima, allo standard del formaggio Grana Padano DOP.

2. Attività di ricerca

La campionatura complessiva considerata nel Progetto, descritta in Tabella 1, comprende: 22 campioni di latte, 52 campioni di siero, 52 campioni di sieroinnesto e 24 campioni di formaggio.

Tabella 1 – Descrizione dei campioni analizzati

I MODULO (silomais standard)							
SETTIMANA	RAPP. G/C	CAMPIONE	DATA PRELIEVO	CAMPIONE	DATA PRELIEVO	CAMPIONE	DATA PRELIEVO
1°	ALTO	LATTE intero	5/6/12	SIERO LO SIERO L1	5/6/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	6/6/12
2°	BASSO	LATTE intero	12/6/12	SIERO LO SIERO L1	12/6/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	13/6/12
3°	ALTO	LATTE intero	19/6/12	SIERO LO SIERO L1	19/6/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	20/6/12
4°	BASSO	LATTE intero	26/6/12	SIERO LO SIERO L1	26/6/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	27/6/12
5°	ALTO	LATTE intero	3/7/12	SIERO LO SIERO L1	3/7/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	4/7/12
6°	BASSO	LATTE intero	10/7/12	SIERO LO SIERO L1	10/7/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	11/7/12
II MODULO (fieno-silo lolessa)							
SETTIMANA	RAPP. G/C	CAMPIONE	DATA PRELIEVO	CAMPIONE	DATA PRELIEVO	CAMPIONE	DATA PRELIEVO
1°	BASSO	LATTE intero	6/11/12	SIERO LO SIERO L1	6/11/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	7/11/12
		LATTE intero	7/11/12	SIERO LO SIERO L1	7/11/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	8/11/12
2°	ALTO	LATTE intero	12/11/12	SIERO LO SIERO L1	12/11/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	13/11/12
		LATTE intero	13/11/12	SIERO LO SIERO L1	13/11/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	14/11/12
3°	BASSO	LATTE intero	19/11/12	SIERO LO SIERO L1	19/11/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	20/11/12
		LATTE intero	20/11/12	SIERO LO SIERO L1	20/11/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	21/11/12
4°	ALTO	LATTE intero	26/11/12	SIERO LO SIERO L1	26/11/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	27/11/12
		LATTE intero	27/11/12	SIERO LO SIERO L1	27/11/12	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	28/11/12
III MODULO (silomais innovativo)							
SETTIMANA	RAPP. G/C	CAMPIONE	DATA PRELIEVO	CAMPIONE	DATA PRELIEVO	CAMPIONE	DATA PRELIEVO
1°	BASSO	LATTE intero	12/2/13	SIERO LO SIERO L1	12/2/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	13/2/13
		LATTE intero	13/2/13	SIERO LO SIERO L1	13/2/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	14/2/13
		-	-	SIERO LO SIERO L1	14/2/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	15/2/13
2°	ALTO	LATTE intero	18/2/13	SIERO LO SIERO L1	18/2/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	19/2/13
		LATTE intero	19/2/13	SIERO LO SIERO L1	19/2/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	20/2/13
		-	-	SIERO LO SIERO L1	20/2/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	21/2/13
3°	BASSO	LATTE intero	25/2/13	SIERO LO SIERO L1	25/2/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	26/2/13
		LATTE intero	26/2/13	SIERO LO SIERO L1	26/2/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	27/2/13
		-	-	SIERO LO SIERO L1	27/2/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	28/2/13
4°	ALTO	LATTE intero	4/3/13	SIERO LO SIERO L1	4/3/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	5/3/13
		LATTE intero	5/3/13	SIERO LO SIERO L1	5/3/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	6/2/13
		-	-	SIERO LO SIERO L1	6/2/13	SIEROINNESTO LO SIEROINNESTO L1	7/3/13

Tabella 1 (segue)

MODULO	RAPPORTO G/C	CAMPIONE	DATA PROD.	DATA TAGLIO	SIGLA
I silomais standard	BASSO	FORMAGGIO 9 MESI L0	11/06/2012	09/04/2013	PA53
		FORMAGGIO 9 MESI L1	11/06/2012	09/04/2013	PA54
	ALTO	FORMAGGIO 9 MESI L0	22/06/2012	09/04/2013	PA75
		FORMAGGIO 9 MESI L1	22/06/2012	09/04/2013	PA76
	BASSO	FORMAGGIO 16 MESI L0	xx/06/2012	11/11/2013	PA87
		FORMAGGIO 16 MESI L1	xx/06/2012	11/11/2013	PA88
	ALTO	FORMAGGIO 16 MESI L0	xx/06/2012	11/11/2013	PA67
		FORMAGGIO 16 MESI L1	xx/06/2012	11/11/2013	PA68
II fieno-silo loiessa	BASSO	FORMAGGIO 9 MESI L0	07/11/2012	26/08/2013	PA159
		FORMAGGIO 9 MESI L1	07/11/2012	26/08/2013	PA162
	ALTO	FORMAGGIO 9 MESI L0	13/11/2012	26/08/2013	PA183
		FORMAGGIO 9 MESI L1	13/11/2012	26/08/2013	PA184
	BASSO	FORMAGGIO 16 MESI L0	09/11/2012	05/03/2014	PA169
		FORMAGGIO 16 MESI L1	09/11/2012	05/03/2014	PA168
	ALTO	FORMAGGIO 16 MESI L0	12/11/2012	05/03/2014	PA179
		FORMAGGIO 16 MESI L1	12/11/2012	05/03/2014	PA182
III silomais innovativo	BASSO	FORMAGGIO 9 MESI L0	xx/02/2013	11/11/2013	PA93
		FORMAGGIO 9 MESI L1	xx/02/2013	11/11/2013	PA94
	ALTO	FORMAGGIO 9 MESI L0	xx/02/2013	11/11/2013	PA61
		FORMAGGIO 9 MESI L1	xx/02/2013	11/11/2013	PA62
	BASSO	FORMAGGIO 16 MESI L0	25/02/2013	09/06/2014	PA75
		FORMAGGIO 16 MESI L1	25/02/2013	09/06/2014	PA76
	ALTO	FORMAGGIO 16 MESI L0	18/02/2013	09/06/2014	PA49
		FORMAGGIO 16 MESI L1	18/02/2013	09/06/2014	PA48

Per ogni lavorazione considerata sono stati prelevati, a cura di ERSAF:

- latte intero (100 mL)
- siero a fine lavorazione (100 mL)
- sieroinnesto (100 mL)

Inoltre, per ogni tesi considerata, è stata tagliata e campionata una forma di:

- formaggio a 8-10 mesi stagionatura (fetta rappresentativa della forma)
- formaggio a 16 mesi stagionatura (fetta rappresentativa della forma)

I campioni sono stati immediatamente congelati e mantenuti a -20 °C durante il trasporto al laboratorio e fino al momento delle analisi.

Sui campioni sono state effettuate le determinazioni di seguito descritte.

Campioni di latte, siero, sieroinnesto. E' stato determinato il profilo delle forme azotate solubili (a-lattoalbumina, b-lattoglobulina, proteoso-peptoni, piccoli peptidi) mediante analisi RP-HPLC con rilevamento in UV a 205 nm. Il sistema cromatografico comprende sistema Alliance Waters, rivelatore a serie di diodi Mod. 996 Waters, colonna PLRP-S (250 x 4.6 mm, 300Å pore size, 5 µm particle size) (Varian Medical System, Milano), sistema di elaborazione dati Empower™ (Waters). Le condizioni cromatografiche sono quelle descritte nello Standard ISO 13875 con una modifica del gradiente di eluizione che consente di quantificare con maggiore accuratezza i piccoli peptidi e i proteoso-peptoni (De Noni et al., 2007). Per la preparazione, il campione (circa 20 mL di latte, siero o sieroinnesto) è stato aggiustato a pH 4.6 con HCl o NaOH 1N, centrifugato (2.000g per 15 min) e filtrato su membrana 0.22 µm. Il volume di iniezione è di 10 µL. I cromatogrammi tipici ottenuti per latte, siero e sieroinnesto sono riportati in Figura 1 a titolo di esempio.

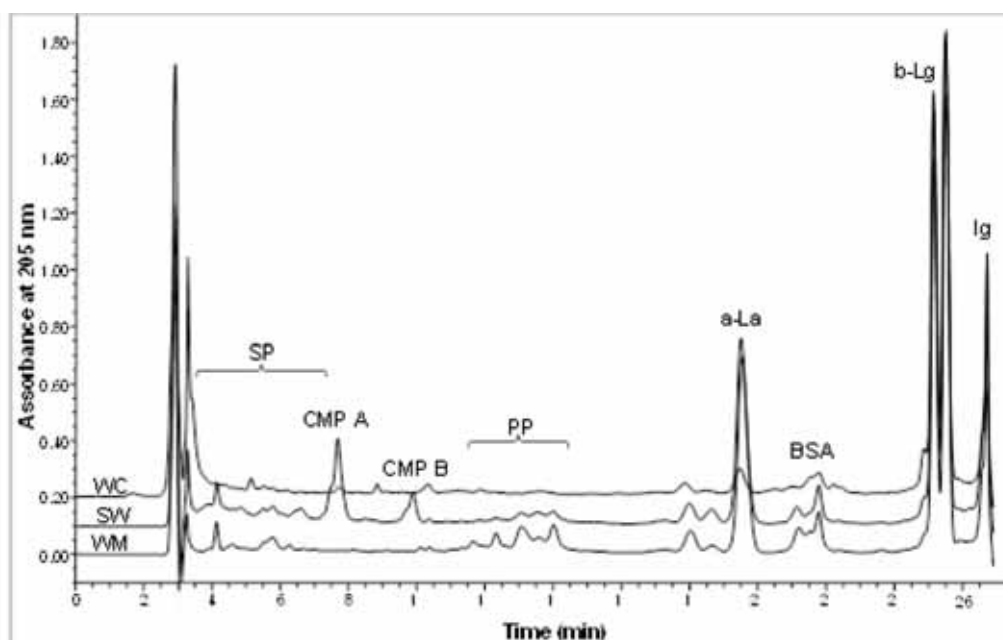


Figura 1. Separazione in HPLC delle frazioni azotate solubili di latte (WM), siero cotto (SW) e sieroinnesto (WC). A-La: a-latto-albumina, b-Lg: b-lattoglobulina; BSA: albumina del siero di sangue; Ig: immunoglobuline; PP: proteoso-peptoni; SP: piccoli peptidi; CMP: caseino-macropeptide.

Per la determinazione del profilo degli amminoacidi liberi è stato utilizzato un analizzatore a scambio ionico Biochrom 30plus (Biochrom Ltd, Cambridge, UK) adottando le condizioni suggerite dal costruttore. Il rilevamento avviene dopo derivatizzazione post-colonna con ninidrina. La preparazione dei campioni, nel caso di latte, siero e sieroinnesto, prevede la diluizione del stesso siero isoelettrico con tampone litio citrato a pH 2,2 fino ad opportuna concentrazione. Il profilo degli amminoacidi liberi di un campione di latte è riportato a titolo di esempio in Figura 2.

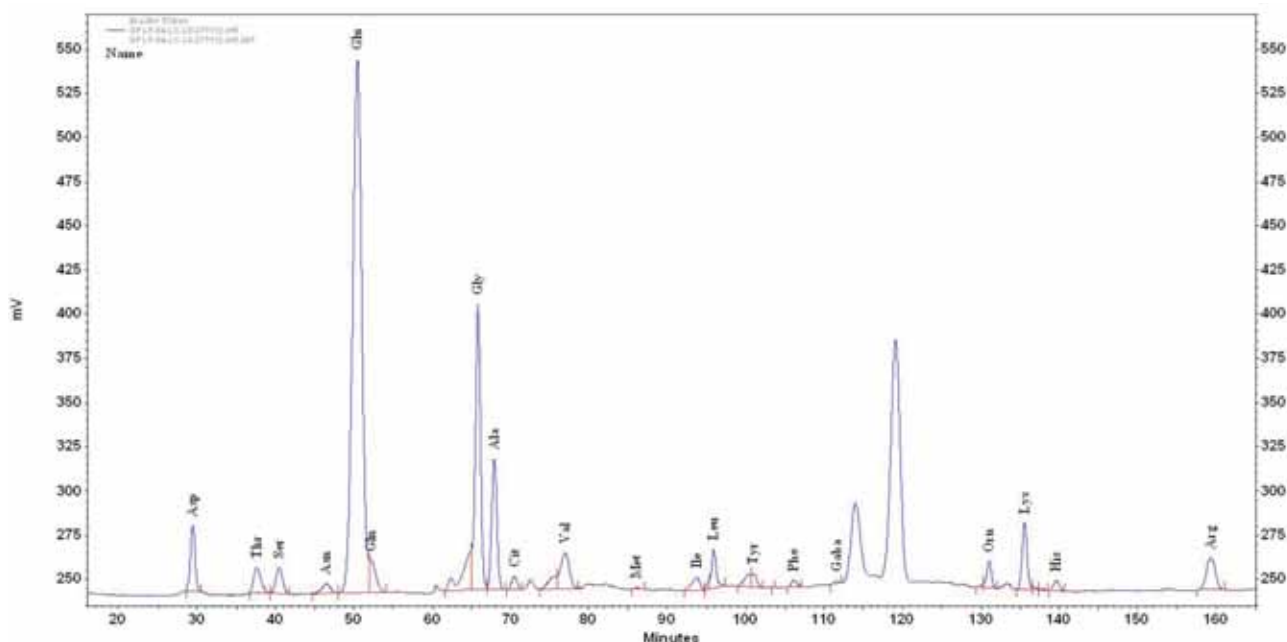


Figura 2. Separazione degli amminoacidi liberi di latte vaccino mediante analizzatore a scambio ionico

Tutte le determinazioni sono state condotte in doppio e i dati presentati sono i valori medi delle due ripetizioni espressi in mg/L.

Campioni di formaggio. Presso il caseificio di Carpaneta, le forme sono state tagliate a metà, a cura di ERSAF, al raggiungimento della stagionatura prevista e le mezze forme sono state fotografate prima dell'ulteriore taglio. Presso il laboratorio DeFENS è stata effettuata la determinazione del profilo degli amminoacidi liberi su fette rappresentative dell'intera forma. Dopo rimozione di 0.5 cm di crosta, la fetta è stata macinata finemente. Su 1.5 g di grattugiato è stata effettuata l'estrazione degli amminoacidi liberi (AAL), secondo quanto descritto da Resmini et al. (1985), e su 350 mg è stato determinato il contenuto di proteine secondo lo Standard ISO 8968-1. Le condizioni cromatografiche sono le stesse descritte per i campioni liquidi. I dati sono espressi in g/100 g proteine e in g/100 g di AAL. Il profilo degli AAL è stato valutato nel modello chemometrico definito per il Grana Padano DOP secondo quanto descritto nella discussione dei risultati.

Su tutti i campioni di formaggio è stata inoltre effettuata la valutazione della degradazione delle varie frazioni caseiniche (proteolisi primaria) mediante elettroforesi capillare (CZE). La preparazione del campione prevede la solubilizzazione del formaggio in tampone di urea-DTT (cheese buffer) e la separazione su capillare nelle condizioni descritte da Cattaneo et al. (2008). Allo scopo è stato utilizzato un sistema MDQ Beckman e la separazione tipica ottenuta per un formaggio di 9 mesi è riportata a titolo di esempio in Figura 3. Attraverso la stessa determinazione è stata calcolata la stagionatura dei diversi formaggi secondo quanto proposto da Masotti et al. (2010) per il Grana Padano DOP e più oltre illustrato.

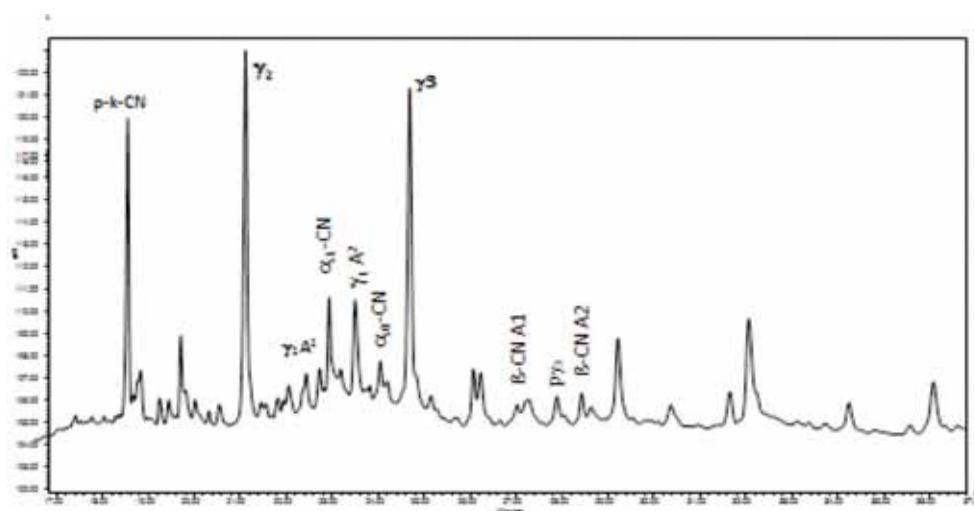


Figura 3. Separazione mediante elettroforesi capillare delle frazioni caseiniche e dei loro principali prodotti di degradazione di un formaggio Grana Padano a 9 mesi di stagionatura.

3. Risultati

3.1 Effetto del lisozima sulla disponibilità di forme azotate semplici (peptoni, piccoli peptidi, amminoacidi) nel latte, siero cotto e sieroinnesto.

La frazione azotata solubile del latte comprende sia molecole proteiche native, quali a-lattoalbumina (a-LA) e b-lattoglobulina (b-LG), sia molecole di minor peso molecolare, quali peptoni e peptidi, fino agli AAL. Alcune di queste frazioni derivano dalla continua attività di proteasi presenti nel latte, la più importante delle quali è la plasmina. Durante la conservazione del latte crudo, la plasmina (derivante dal precursore plasminogeno, a sua volta attivato da un complesso sistema di regolazione) degrada progressivamente la b-caseina portando alla formazione di proteoso-peptoni (PP). Inoltre tutte le frazioni azotate a basso peso molecolare, inclusi i PP, vengono facilmente utilizzate dai microrganismi presenti nel latte crudo o, in caseificazione, da quelli aggiunti attraverso un innesto. La valutazione di queste frazioni consente quindi di comprendere se, relativamente alla disponibilità di forme azotate semplici, le condizioni che si verificano in lavorazione possono essere critiche o, viceversa, favorevoli allo sviluppo di determinate specie microbiche. Uno studio recente da noi condotto e in corso di pubblicazione (Pellegrino et al., 2014), ha consentito di valutare con accuratezza come il contenuto delle varie frazioni azotate del latte si modifichi nel corso della lavorazione a Grana Padano a seguito sia delle

condizioni tecnologiche che dell'attività della microflora presente. I dati riportati in questo studio, condotto su una campionatura ampiamente rappresentativa, sono stati presi come riferimento per la valutazione dei risultati del progetto.

Per quanto sopra esposto, si è inizialmente valutata la composizione del latte in queste componenti solubili. I valori ottenuti per i campioni di latte del Mod. 1 sono riportati in Figura 4 a titolo di esempio.

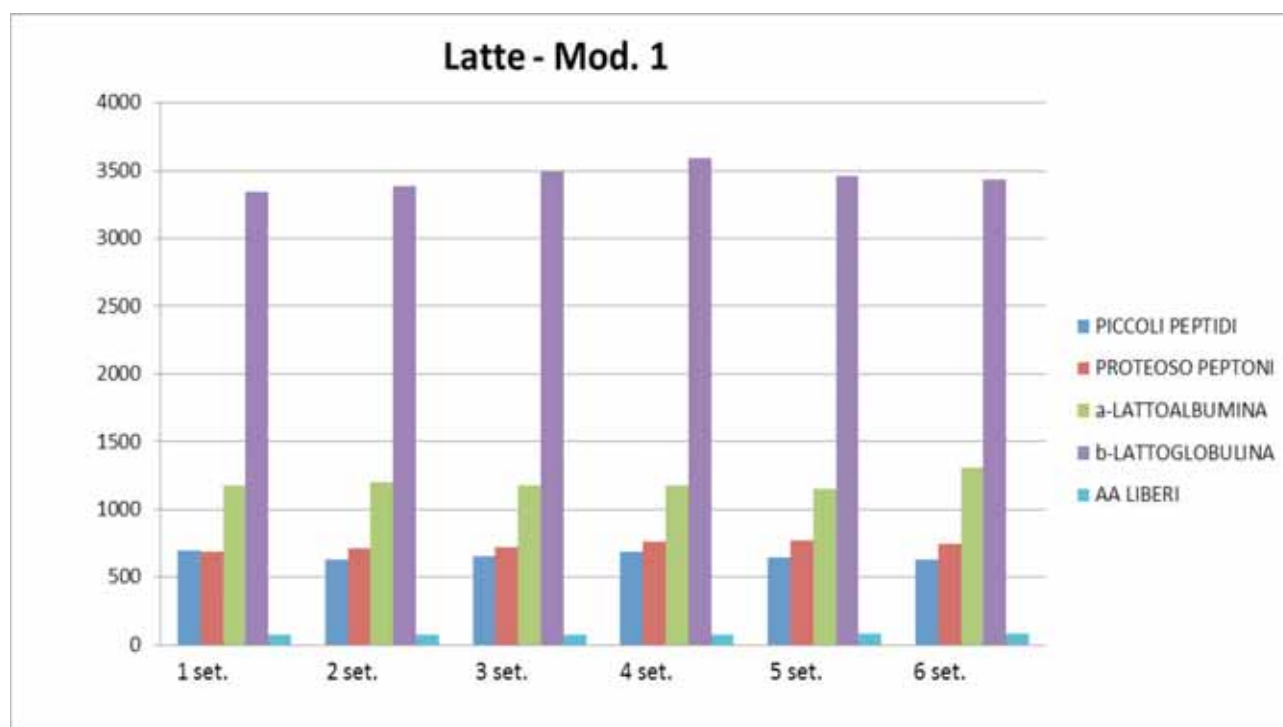


Figura 4 . Contenuto delle principali frazioni azotate solubili del latte. Valori medi in mg/L.

Per i latti di tutti i moduli, i contenuti di α-LA sono risultati confrontabili con quelli della letteratura, ma con alcune oscillazioni imputabili alla variabilità stagionale. Non si può escludere anche un effetto della diversa composizione della razione sebbene non vi siano riscontri nella letteratura in questo senso. In particolare, mentre i valori di α-LA riscontrati nei latti del Mod. 1 (1155-1312 mg/L) sono analoghi a quelli da noi riscontrati nell'ambito del Consorzio del Grana Padano (Figura 5a), quelli dei latti del Mod. 2 (960-1097 mg/L) e del Mod. 3 (964-1051 mg/L) risultano al limite inferiore del range di valori da noi riportato o poco al di sotto dello stesso (Figure 5b e 5c). I latti dei Mod. 2 (fieno silo - loiessa) e 3 (silomais innovativo) sono di novembre e febbraio rispettivamente, mentre quelli del Mod. 1 (silomais standard) sono di giugno. Pertanto, poiché la campionatura di riferimento è stata ottenuta con latti di stalle a prevalente utilizzo di silomais e include la variabilità stagionale, i latti del Mod. 1 vengono correttamente riconosciuti come "normali", mentre per i Mod. 2 e 3 potrebbe esservi una relazione con la diversa alimentazione. I contenuti di β-LG sono nella norma per tutti i latti. Compatibili con i range di valori da noi precedentemente riscontrati, ma sempre nella parte alta del range, sono risultati anche i contenuti medi di PP, di piccoli peptidi (SP) e di AAL dei latti dei tre moduli. Va tuttavia evidenziato, come eccezione, il contenuto elevato di PP dei Mod. 1 e 2, dovuto a valori che sono quasi sempre superiori a 700 mg/L. Tale situazione, indice di attività plasminica più intensa che negli altri latti, risulta tuttavia difficilmente attribuibile con certezza alla diversa razione. Trattandosi di latte crudo la plasmina è particolarmente attiva anche nel latte refrigerato. Come si nota dalla Figura 5, i livelli di PP trovati in questi latti sono maggiormente compatibili con quelli attesi per il latte in caldaia

Figura 5. Valutazione dei valori ottenuti nel presente progetto per il contenuto medio delle principali frazioni azotate solubili di latte, siero cotto e sieroinnesto rispetto ai valori riportati per la filiera di produzione del formaggio Grana Padano DOP. (A) Modulo 1; (B) Modulo 2; (C) Modulo 3.

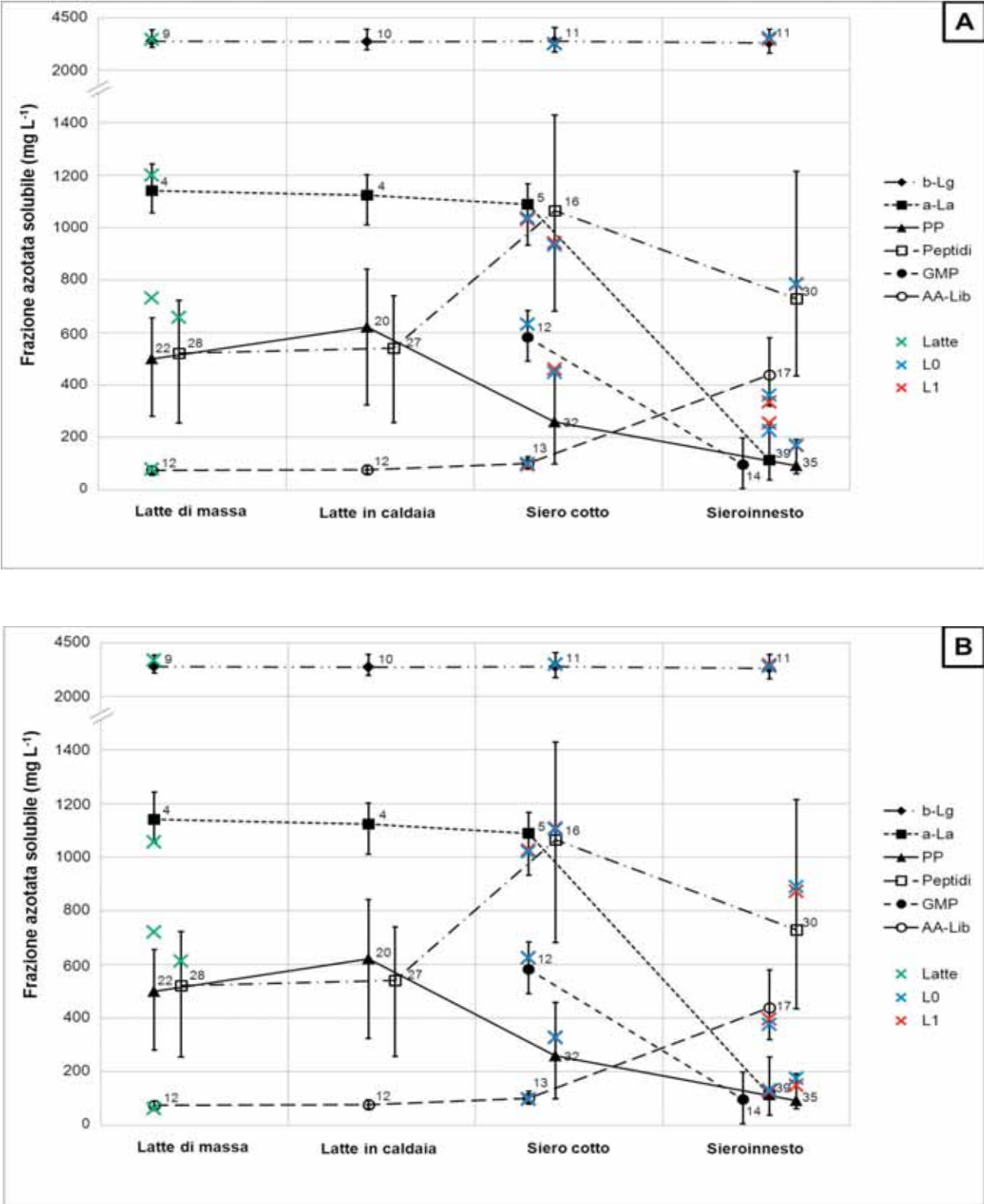
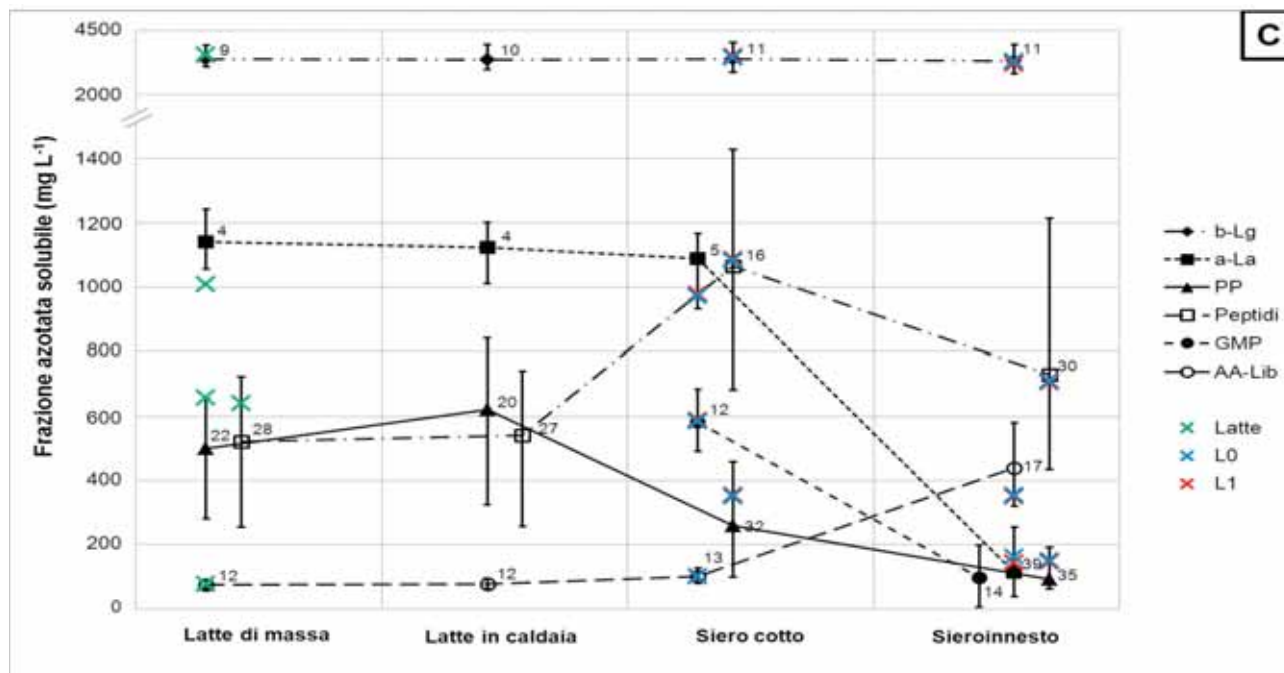


Figura 5 (segue)



Al termine della caseificazione, la cagliata viene estratta dalla caldaia e posta ad acidificare in fascera, La cagliata in questo progetto non viene analizzata per la eccessiva variabilità che presenta il suo contenuto di componenti solubili per piccole differenze nel momento del prelievo, essendo questa la fase accompagnata dal più importante spurgo di siero. Sono stati al contrario analizzati i corrispondenti campioni di siero cotto, prelevati dalle caldaie subito dopo la cagliata. Nel siero cotto, il contenuto di b-LG rimane invariato rispetto a quello del latte, mentre quello di a-LA evidenzia una leggera flessione, già rilevata nella precedente indagine (Pellegrino et al., 2014). Le variazioni più importanti si rilevano a carico dei PP, che diminuiscono, e per i piccoli peptidi che al contrario aumentano sensibilmente. Inoltre compare la presenza di GMP, rilasciato a seguito dell'azione del caglio sulla k-caseina. Il contenuto di GMP per tutti e tre i moduli è pari a quello già da noi rilevato e dell'ordine di 600 mg/L (Figura 5 a-c).

In Figura 6 viene riportato il dettaglio dei valori di piccoli peptidi e PP nei singoli campioni di siero cotto dei tre moduli. Appare evidente come, per entrambe queste frazioni, il contenuto sia molto più stabile nel siero cotto del Mod. 1 e come sia difficile apprezzare differenze tra le caseificazioni con lisozima (L1) e quelle senza (L0). Nei campioni del Mod. 2 questa situazione si realizza solo nell'ultima settimana e per il Mod. 3 nella terza. In questi due moduli si evidenziano numerosi casi in cui il contenuto di peptidi è sensibilmente diverso tra le prove con e senza lisozima e la stessa differenza si rileva a carico del contenuto di PP. Tuttavia tali differenze sono di segno opposto e non consentono di individuare un ruolo univoco per il lisozima. A conferma di ciò, i valori medi di PP e peptidi per le due diverse condizioni di lavorazione (L1 e L0) risultano sovrapposti in tutti e tre i moduli (Figura 5 a-c).

Le modifiche più profonde a carico della frazione azotata solubile avvengono nel siero durante la fermentazione a sieroinnesto. La repentina crescita batterica avviene, oltre che a spese del lattosio e alcuni micronutrienti, utilizzando le fonti azotate solubili disponibili, a cominciare da quelle a più basso peso molecolare. Queste variazioni, che riguardano principalmente la degradazione di a-LA, proteoso-peptoni, GMP e piccoli peptidi e l'aumento di AAL, vengono bene evidenziate in Figura 5.

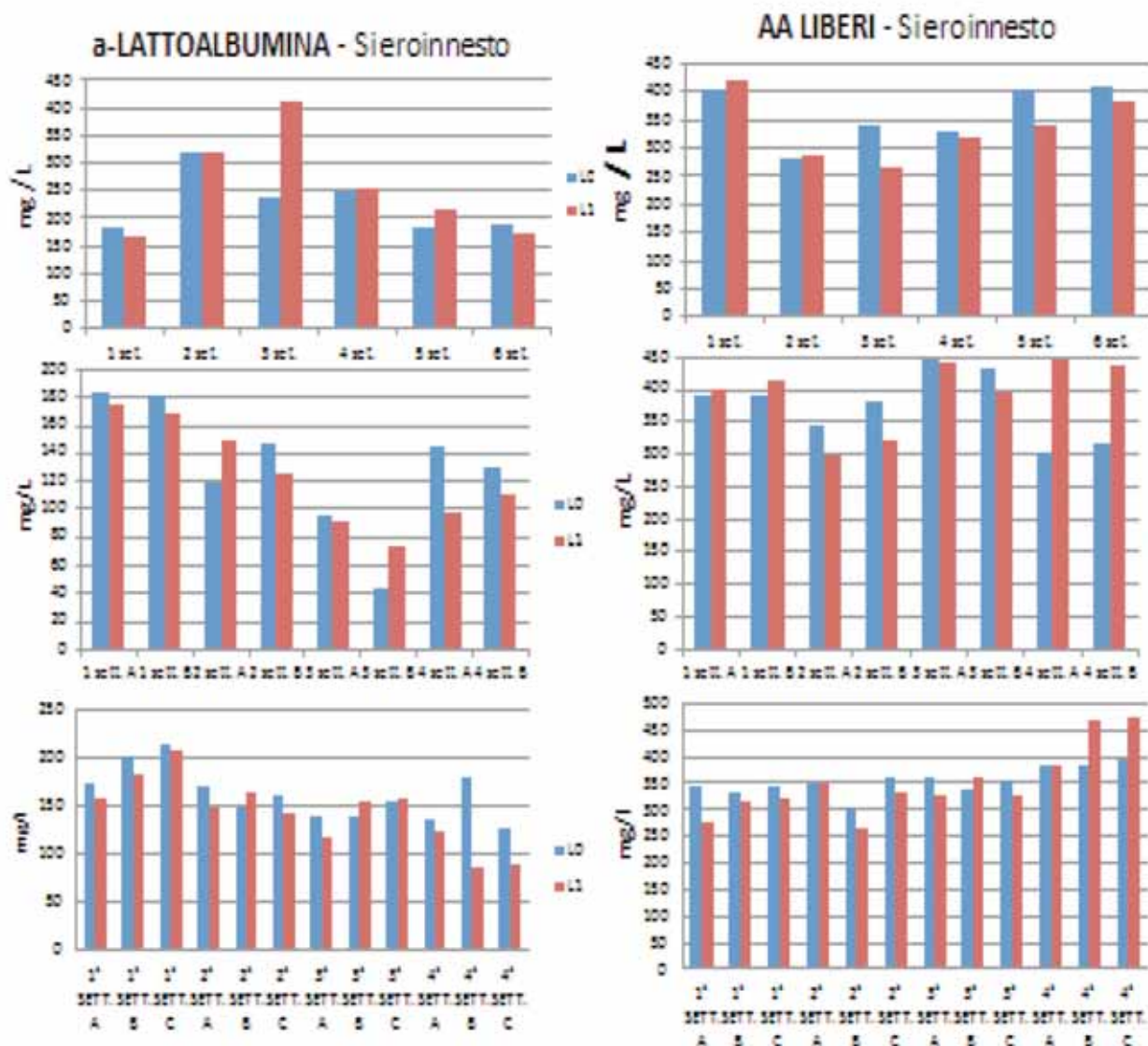


Figura 7. Contenuto di a-Lattoalbumina e di amminoacidi liberi nei campioni di sieroinnesto dei 3 moduli sperimentali (dall'alto al basso, i Moduli 1,2 e 3)

I dati ottenuti per il sieroinnesto dimostrano una elevata variabilità per quanto riguarda il contenuto di composti azotati solubili, quindi di più facile utilizzo da parte della microflora.

Il contenuto totale di AAL risulta generalmente basso, rispetto a quanto da noi rilevato in precedenza. In particolare in diversi casi sono stati rilevati contenuti totali ben inferiori a 300 mg/L, considerato un limite inferiore per il sieroinnesto da Grana Padano. Questa variabilità potrebbe essere dovuta ad uno squilibrio della microflora presente (lattica, in particolare) conseguente alla continua alternanza di condizioni diverse resa necessaria dalla sperimentazione. Probabilmente altre variabili non controllate interferiscono nella valutazione dei risultati. Per ottenere una valutazione oggettiva, tutti i dati dei singoli campioni sono stati sottoposti ad analisi statistica da parte della UO – Unicatt PC e i risultati ottenuti sono illustrati più avanti.

3.2 Andamento della maturazione proteolitica del formaggio

La stagionatura dei formaggi a pasta cotta è fortemente caratterizzata dalla progressiva degradazione della caseina ad opera di proteasi di diversa origine. La proteolisi viene convenzionalmente distinta in primaria - o degradazione iniziale delle frazioni caseiniche, principalmente determinata dalla plasmina e dagli enzimi del caglio - e secondaria – degradazione più profonda determinata principalmente da enzimi di origine microbica. Un precedente lavoro (Masotti et al., 2010) ha dimostrato come, valutando la formazione di un peptide deri-

vante dalla β -caseina, in opportuno rapporto con la frazione di origine, è possibile stimare l'età dei formaggi Grana Padano e Parmigiano-Reggiano con l'accuratezza di ± 1 mese. L'accumulo di AAL è comunque in relazione all'avanzamento della maturazione ma, oltre i 12 mesi tende a stabilizzarsi perché intervengono anche fenomeni di degradazione, sempre ad opera di enzimi. La valutazione del contenuto dei singoli AAL si è dimostrata utile invece per riconoscere il formaggio Grana Padano DOP da prodotti simili o da formaggio difettato (Resmini et al., 1993) perché la liberazione preferenziale di specifici amminoacidi e/o la loro degradazione è determinata con particolari tempistiche e meccanismi legati alla microflora presente.

Nella tabella di seguito (Tabella 2) sono riportati, per tutte le 24 forme analizzate, il contenuto totale in AAL e la stagionatura calcolata come sopra indicato. Nelle forme del Mod. 1 il contenuto in AAL aumenta passando da 10 a 18 mesi, mentre nelle forme degli altri moduli rimane pressoché invariato. Il fatto che queste forme abbiano circa due mesi di più (18 mesi anziché 16) non pare determinante, mentre potrebbe esserlo il fatto che la produzione sia di giugno, quindi la forma affronta la prima fase di stagionatura in un periodo più caldo, comporta in genere un'accelerazione della proteolisi. Altro aspetto degno di rilievo è che il contenuto di AAL è sempre leggermente più basso (1-2 unità percentuali) nelle prove con rapporto G/C alto. Occorre tuttavia ricordare che queste forme pesavano circa 40 kg a 24h e 36 kg al taglio, contro un peso di 37 kg a 24h e 33 kg al taglio per le forme con G/C basso. Sicuramente il diverso peso delle forme ha effetto sulla velocità di maturazione che ha un andamento centripeto. La stagionatura calcolata è invece coincidente, con l'errore atteso di ± 1 mese, con quella "anagrafica", indipendentemente dal contenuto di AAL. Nessuna relazione pare esservi con la presenza o meno di lisozima ma anche questi parametri sono stati considerati nella elaborazione statistica.

Tabella 2. Contenuto totale in AA liberi e stagionatura per le 24 forme analizzate

I MODULO – SILOMAIS STANDARD (giugno 2012)			
CAMPIONE	TESI	AA LIBERI (% proteine)	STAGIONATURA CALCOLATA (mesi)
FORME TAGLIA- TE A 10 MESI	L0 – G/C BASSO (PA53)	20,70	11
	L1 – G/C BASSO (PA54)	20,22	11
	L0 – G/C ALTO (PA75)	19,36	11
	L1 – G/C ALTO (PA76)	19,97	10
FORME TAGLIA- TE A 18 MESI	L0 – G/C BASSO (PA87)	25,71	17
	L1 – G/C BASSO (PA88)	26,76	17
	L0 – G/C ALTO (PA67)	24,37	18
	L1 – G/C ALTO (PA68)	21,79	17
II MODULO – FIENO-SILO LOIESSA (novembre 2012)			
CAMPIONE	TESI	AA LIBERI (% proteine)	STAGIONATURA CALCOLATA (mesi)
FORME TAGLIA- TE A 10 MESI	L0 – G/C BASSO (PA159)	21,18	11
	L1 – G/C BASSO (PA162)	22,41	11
	L0 – G/C ALTO (PA183)	19,89	10
	L1 – G/C ALTO (PA184)	18,20	11

FORME TAGLIA- TE A 16 MESI	L0 – G/C BASSO (PA169)	21,75	17
	L1 – G/C BASSO (PA168)	21,15	17
	L0 – G/C ALTO (PA179)	21,23	17
	L1 – G/C ALTO (PA182)	21,17	15

III MODULO – SILOMAIS INNOVATIVO (febbraio 2013)			
CAMPIONE	TESI	AA LIBERI (% proteine)	STAGIONATURA CALCOLATA (mesi)
FORME TAGLIA- TE A 9 MESI	L0 – G/C BASSO (PA93)	20,55	10
	L1 – G/C BASSO (PA94)	20,32	10
	L0 – G/C ALTO (PA61)	19,11	10
	L1 – G/C ALTO (PA62)	19,94	10
FORME TAGLIA- TE A 16 MESI	L0 – G/C BASSO (PA75)	20,43	15
	L1 – G/C BASSO (PA76)	20,00	14
	L0 – G/C ALTO (PA49)	21,75	16
	L1 – G/C ALTO (PA48)	20,70	16

3.3 Rispondenza del formaggio stagionato allo standard del Grana Padano DOP.

Il profilo degli AAL è stato valutato nel modello del Grana Padano DOP. Le condizioni fissate dal Consorzio, in accordo con il MiPAAF, prevedono tra l'altro, che quattro AAL sui 21 considerati, possano superare una distanza dal rispettivo valore medio di $\pm 2d.s.$, e di questi uno solo si può discostare dal valore medio di $\pm 3d.s.$. I dati presentati in Figura 8 indicano che tutte le forme, indipendentemente dal Modulo di provenienza, dalla presenza o meno di lisozima e dal rapporto G/C, rispettano i requisiti stabiliti dal Consorzio del Grana Padano, pur rilevandosi alcuni dati anomali. La maggior frequenza di valori anomali si riscontra nelle forme a 9-10 mesi, evidenziando una stagionatura minima appena raggiunta, mentre nelle forme di 16-18 mesi il profilo degli AAL è molto più regolare. Il contenuto elevato di glutammina è caratteristico di forme giovani. Il contenuto elevato di valina, rispetto a quello medio del Grana Padano, che si riscontra in quasi tutte le forme potrebbe essere caratteristico dell'azienda. Tre forme su quattro dei Mod. 2 e 3 presentano, a 9 mesi di stagionatura, contenuti elevati di arginina e bassi di ornitina. Poiché questi due amminoacidi sono legati nel metabolismo di alcune specie batteriche, questi dati andranno valutati con quelli microbiologici delle altre UO. In conclusione è possibile affermare che dai dati ottenuti non si evidenziano differenze o anomalie attribuibili alla presenza o meno di lisozima nel latte caseificato. Pur considerando importante la quantità di lavoro sperimentale, tecnico e analitico svolto, occorre ricordare che sono state analizzate solo due forme per tesi e di età diversa.

Figura 8. Valutazione delle forme prodotte nel progetto e tagliate a diversa stagionatura. Modello basato sul profilo degli amminoacidi liberi del formaggio rispetto a quello medio tipico del Grana Padano DOP.

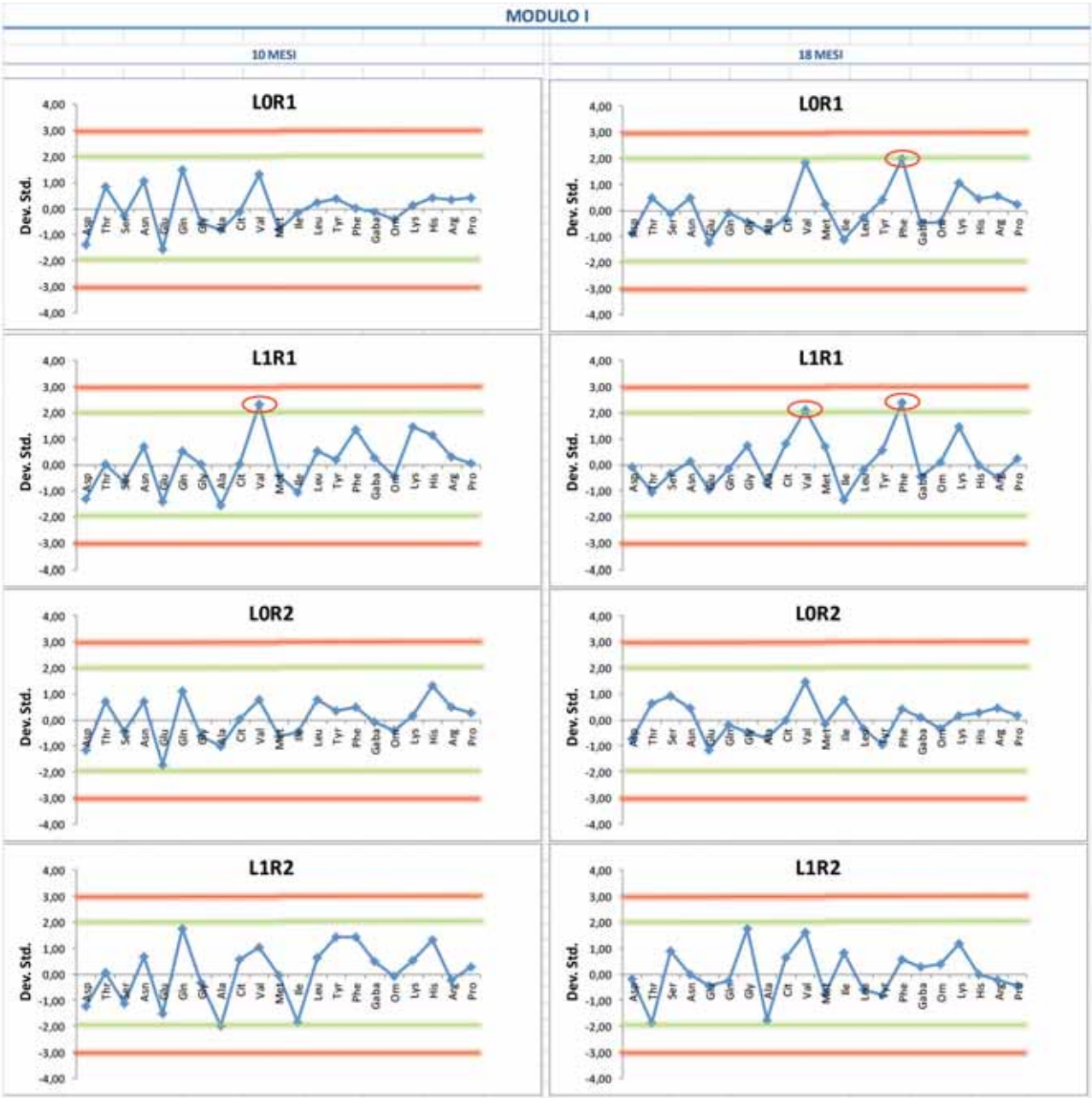


Figura 8 (segue)

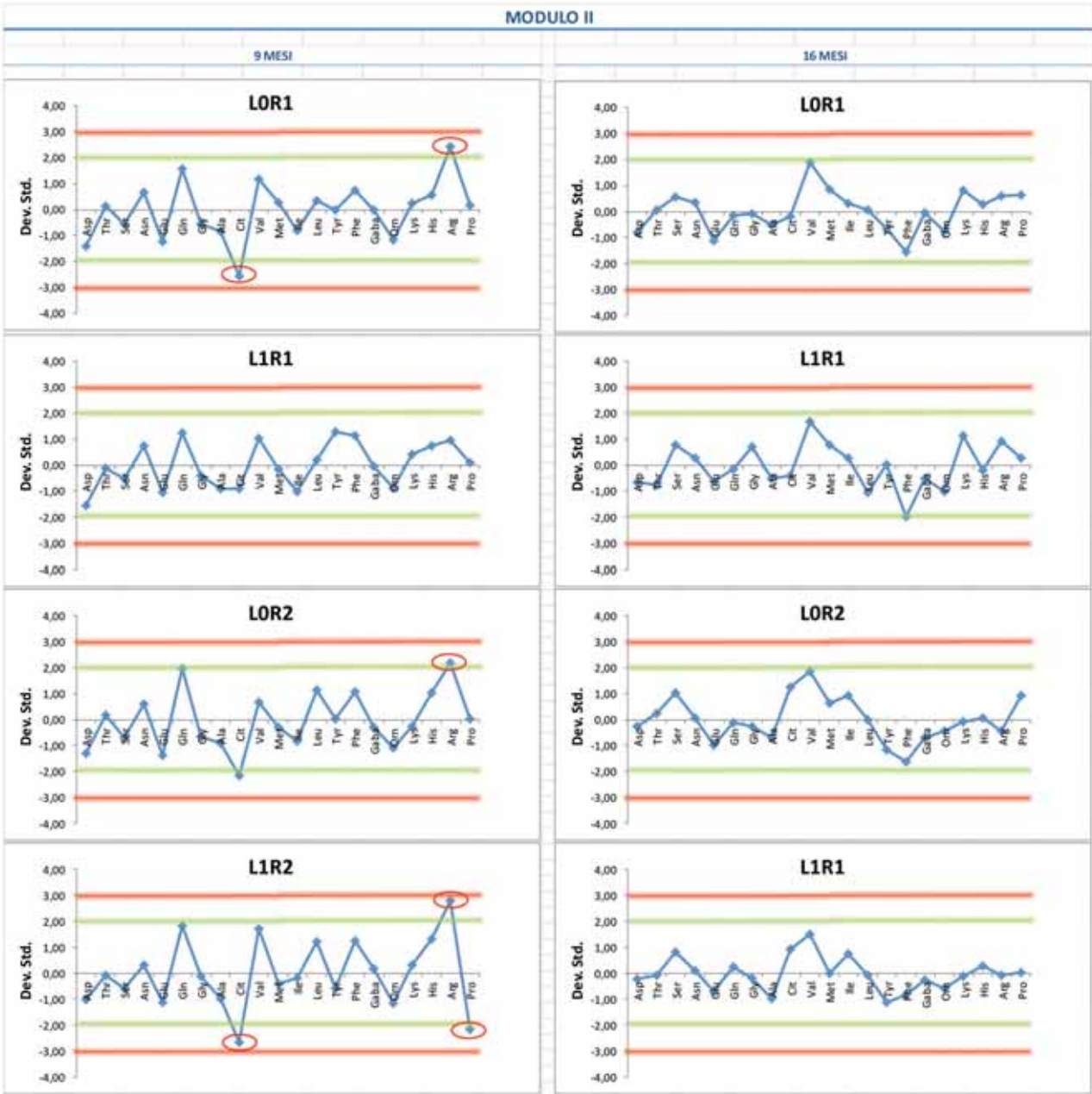
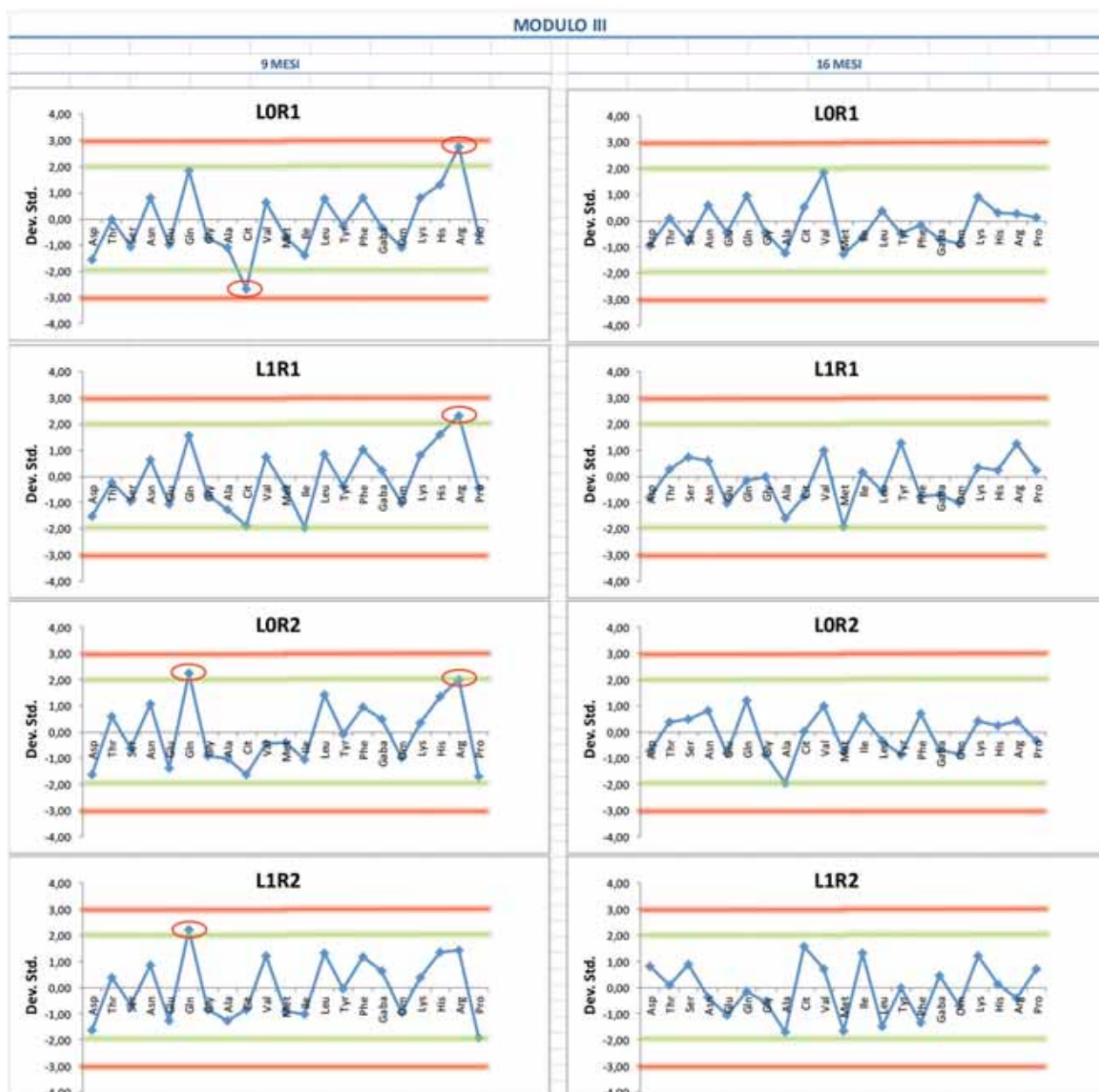


Figura 8 (segue)



A completamento dell'attività analitica, tutti i dati ottenuti sono stati inviati all'UO UNICATT-ISAN (Dott. M. Moschini e Dr A. Gallo) che li ha valutati mediante disegno completamente randomizzato con analisi fattoriale 3x2x2 e con un livello di significatività $P < 0.05$. I risultati sono sintetizzati nella tabella seguente (*Tabella 3*) dove, per brevità, sono riportate solo le variabili che hanno dato almeno un caso di significatività, indicato da una "x". La tabella riporta rispettivamente la significatività: (A) delle frazioni azotate e dei singoli AAL rispetto alle medie; (B) degli AAL in valore percentuale relativo rispetto alle medie (solo per i formaggi); (C) delle frazioni azotate e degli AAL rispetto alla differenza tra i criteri; (D) degli AAL in valore percentuale relativo rispetto alla differenza tra i criteri.

Tabella 3

		a-La	pp	Peptidi	AA-Lib	Asp	Glu	Gln	Gly	Ala	Cit	Leu	Tyr	phe	Gaba	Orn	Lys	His
Siero cotto	Modulo		X			X		X			X	X			X	X		
	Lisozima														X			
	Rapporto																	
	Modulo + Lisozima								n.d.				n.d.				n.d.	
	Modulo + Rapporto		X															
	Lisozima + Rapporto		X															
Sierinnesto	Modulo	X	X	X			X				X	X			X	X		
	Lisozima														X			
	Rapporto																	
	Modulo + Lisozima								n.d.				n.d.				n.d.	
	Modulo + Rapporto		X		X	X					X				X	X		
	Lisozima + Rapporto																	
Formaggio 9 mesi	Modulo	n.d.																
	Lisozima																	
	Rapporto																	
	Modulo + Lisozima																	
	Modulo + Rapporto																	
	Lisozima + Rapporto																	
Formaggio 16 mesi	Modulo	n.d.					X		X				X	X		X	X	
	Lisozima								X				X					
	Rapporto								X				X					
	Modulo + Lisozima								X				X			X		
	Modulo + Rapporto								X				X					
	Lisozima + Rapporto								X				X					
									X				X					

A

		Asp	Thr	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ala	Cit	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Gaba	Orn
Formaggio 9 mesi	Modulo	X				X			X									X
	Lisozima	X				X			X							X		
	Rapporto	X				X								X				
	Modulo + Lisozima	X							X							X		
	Modulo + Rapporto	X																
	Lisozima + Rapporto																	
Formaggio 16 mesi	Modulo						X						X					X
	Lisozima						X											X
	Rapporto												X		X			X
	Modulo + Lisozima						X						X					X
	Modulo + Rapporto												X					
	Lisozima + Rapporto																	

B

		a-La	pp	Peptidi	AA-Lib	Asp	Thr	Ser	Glu	Gln	Gly	Cit	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Gaba	Orn	Lys	Arg
Siero cotto	Mod 1		X	X		X				X		X				X			X			
	Mod 2		X	X																		
	Mod 1		X	X		X				X		X							X	X		
	Mod 3																					
	Mod 2		X			X										X				X		
	Mod 3																					
	L0									X									X			
	L1																					
	alto																					
	basso																					
	L0 alto		X				n.d.				n.d.		n.d.				n.d.				n.d.	
	L0 basso																					
	L0 alto									X												
	L1 alto																					
	L0 alto																		X			
	L1 basso																					
	L0 basso																					
	L1 alto																					
	L0 alto																		X			
	L1 alto																					
	L1 basso																					
siero innesto	Mod 1	X		X					X			X				X			X			
	Mod 2																					
	Mod 1	X	X	X					X										X	X		
	Mod 3																					
	Mod 2		X	X	X				X			X				X			X	X		
	Mod 3																					
	L0																		X			
	L1																					
	alto																					
	basso																					
	L0 alto						n.d.				n.d.		n.d.				n.d.				n.d.	
	L0 basso																					
	L0 alto																		X			
	L1 alto																					
	L0 alto																					
	L1 basso																					
	L0 basso																		X			
	L1 alto																					
	L0 alto																		X			
	L1 alto																					
	L1 basso																					
Formaggio 9 mesi	Mod 1																			X	X	
	Mod 2																					
	Mod 1																			X	X	
	Mod 3																					
	Mod 2																					
	Mod 3																					
	L0																					
	L1																					
	alto																					
	basso																					
	L0 alto		n.d.				n.d.															
	L0 basso																					
	L0 alto																					
	L1 alto																					
	L0 alto																					
	L1 basso																					
	L0 basso																					
	L1 alto																					
	L0 alto																					
	L1 alto																					
	L1 basso																					
Formaggio 16 mesi	Mod 1				X				X		X					X	X		X	X		
	Mod 2																					
	Mod 1				X				X	X	X		X	X	X	X	X		X	X		
	Mod 3																					
	Mod 2										X						X					
	Mod 3																					
	L0										X						X					
	L1																					
	alto																					
	basso																					
	L0 alto		n.d.				n.d.				X						X					
	L0 basso																					
	L0 alto										X											
	L1 alto																					
	L0 alto										X						X					
	L1 basso																					
	L0 basso																					
	L1 alto																X		X			
	L0 alto										X											
	L1 alto																					
	L1 basso										X											

C

		Asp	Thr	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ala	Cit	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Gaba	Orn
Formaggio 9 mesi	Mod 1																	
	Mod 2		X			X			X	X								X
	Mod 1		X			X								X				X
	Mod 3																	
	Mod 2								X									
	Mod 3																	
	L0		X			X			X							X		
	L1																	
	alto		X			X								X				
	basso																	
	L0 alto					X								X		X		
	L0 basso																	
	L0 alto		X			X			X							X		
	L1 alto																	
	L0 alto		X			X			X							X		
	L1 basso																	
	L0 basso		X						X							X		
	L1 alto																	
	L0 alto		X						X							X		
	L1 alto																	
	L1 basso		X															
Formaggio 16 mesi	Mod 1												X			X		X
	Mod 2																	
	Mod 1						X				X	X	X					X
	Mod 3																	
	Mod 2						X				X	X						X
	Mod 3																	
	L0						X											X
	L1																	
	alto												X		X			X
	basso																	
	L0 alto												X					
	L0 basso																	
	L0 alto																	X
	L1 alto																	
	L0 alto												X		X			
	L1 basso																	
	L0 basso												X					X
	L1 alto																	
	L0 alto																	
	L1 alto												X		X			X
	L1 basso																	

D

4. Conclusioni

Sebbene questa analisi possa essere ulteriormente affinata, emerge già come le differenze significative riguardino soprattutto i tre moduli, sia livello di siero cotto che di sieroinnesto e di formaggio. Tali differenze nel caso di siero e sieroinnesto sono dovute al contenuto di a-LA, piccoli peptidi e PP, oltre ad alcuni AAL (leucina, citrullina, ornitina). Nei formaggi a 16 mesi la differenza tra Mod. 1 e Mod. 3 appare dovuta a quasi tutti gli AAL, se espressi come contenuto sulle proteine, mentre solo alcuni risultano differenziali se espressi in percentuale relativa. La presenza di lisozima nel siero e nel sieroinnesto determina differenze significative solo sul contenuto di acido γ -amminobutirrico (GABA), mentre sui formaggi vi sono alcuni altri amminoacidi che ne risentono, amminoacidi che sono diversi a 9 e a 16 mesi. In nessun caso comunque i profili degli AAL delle forme analizzate ne hanno determinato l'esclusione dal modello del Grana Padano DOP.

5. Bibliografia

- Cattaneo, S., Hogenboom, J.A., Masotti, F., Rosi, V., Pellegrino, L., Resmini, P., (2008). Grated Grana Padano cheese: new hints on how to control quality and recognize imitations. *Dairy Science and Technology*, 88, 595-605.
- De Noni, I., Pellegrino, L., Cattaneo, S., & Resmini, P. (2007). HPLC of proteose peptones for evaluating ageing of packaged pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 17, 12-19.
- Masotti, F., Hogenboom, J.A., Rosi, V., De Noni, I., Pellegrino, L., (2010). Proteolysis indices related to che-

ese ripening and typicalness in PDO Grana Padano cheese. *International Dairy Journal*, 20, 352-359.

- Pellegrino, L., Rosi, V., D’Incecco, P., Stroppa, A., Hogenboom J. A. (2015). Changes in the soluble Nitrogen fraction of milk throughout PDO Grana Padano cheese-making. *International Dairy Journal*, (in corso di stampa).

- Resmini, P., Pellegrino, L., Pazzaglia, C., Hogenboom, J.A., (1985). Gli amminoacidi liberi per il controllo di qualità del formaggio Parmigiano-Reggiano e in particolare del prodotto grattugiato. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 36, 557-592.

- Resmini, P., Hogenboom, J.A., Pazzaglia, P., Pellegrino, L., (1993). Gli amminoacidi liberi per la caratterizzazione analitica del formaggio Grana Padano. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 44, 7-19.

CAPITOLO 4 – CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

A cura del Prof. Gianfranco Piva

Il ruolo svolto dal formaggio Grana Padano, dal punto di vista economico, ambientale e sociale, è indiscusso. La produzione di forme marchiate nel 2014 ha superato il numero di quattro milioni ed ottocentomila. I 140 caseifici produttori hanno ritirato oltre 3 milioni di tonnellate di latte, di queste, oltre 2,5 milioni sono state utilizzate direttamente nella produzione del Grana Padano, il resto è stato destinato per altre produzioni. Per questo formaggio viene impiegato circa il 50% del latte destinato alle DOP italiane ed il latte destinato alle DOP è circa il 50% del latte totale prodotto nel nostro paese; il rimanente 50% si suddivide in parti quasi uguali fra produzioni di formaggi non DOP ed altri usi, prevalentemente alimentari. Le aziende zootecniche coinvolte nella produzione del latte destinate a Grana Padano sono state lo scorso anno 4493. Oltre ai 140 caseifici produttori vi sono 155 impianti di stagionatura e 182 strutture di confezionamento. Il valore alla produzione è di 1.427 Mld di €, che al consumo diventano 2.434 Mld di €; l'export vale il 35% della produzione marchiata. La zona di produzione si estende su un territorio di 35 province, distribuite in 5 regioni: Lombardia, Veneto, Piemonte, Trentino e l'Emiliana (zona di Piacenza). Il rilievo sociale della produzione è documentato dal fatto che gli addetti, coinvolti direttamente, si stima siano oltre 25.000, ai quali vanno aggiunte altre 15.000 persone nell'indotto indiretto. La vitalità del settore è documentata dal fatto che, in un momento congiunturale quale quello attuale, la filiera produttiva ha dimostrato una sostanziale tenuta, ed ha avuto un andamento in controtendenza rispetto al resto dell'economia.

Il sistema produttivo, che coinvolge una parte rilevante del territorio della pianura padana, ha plasmato lo sviluppo agronomico, basato prevalentemente sulla produzione del mais da foraggio destinato all'insilamento. L'utilizzo degli insilati, soprattutto del silo-mais, previsto dal disciplinare di produzione del Grana Padano, comporta indubbi vantaggi economici, ma può porre problemi durante la lunga stagionatura del formaggio, fino a 24 mesi ed oltre. L'utilizzo degli insilati, specie se di non ottima qualità, diventa fattore di rischio per la contaminazione del latte da microrganismi indesiderabili e per effetti negativi sulle prerogative di non buona caseificabilità del latte.

Il disciplinare di produzione, attualmente in vigore (riferimento Reg (UE). 584/2011), precisa il territorio interessato alla DOP, le caratteristiche dell'alimentazione delle bovine, le procedure di caseificazione, basate sull'impiego di latte crudo, le modalità di stagionatura (periodo minimo 9 mesi) e commercializzazione del formaggio. Il Disciplinare di produzione (MiPAAF Provvedimento 23 GIUGNO 2011) è il risultato della raccolta delle procedure tradizionalmente impiegate per questa produzione ed è il frutto consolidato da 50 anni di utilizzo, in pratica dalla costituzione del Consorzio di tutela del Grana Padano.

Gli elementi di criticità conseguenti all'impiego del silo mais si concretizzano con la possibile insorgenza di un'alterazione di origine microbica, durante la stagionatura, per una fermentazione di tipo gasogeno, che si verifica, quando le condizioni fisico-chimiche della pasta diventano ottimali per lo sviluppo dei microrganismi produttori di gas, i clostridi. Si tratta di un'alterazione definita genericamente "gonfiore tardivo". I clostridi responsabili sono dei clostridi butirrici suddivisibili in due sottogruppi fisiologici: i saccarolitici (*Cl. tyrobutyricum* e *Cl. butyricum*) e i proteolitici (*Cl. sporogenes* e *Cl. bifermentans*). I primi sono responsabili di un'alterazione della struttura della pasta causata dalla produzione di gas, associata ad aromi sgradevoli legati alla produzione di butirrato; i secondi idrolizzano le proteine fino ad amminoacidi, che poi deaminati e decarbossilati, soggetti a processi di ossidazione e riduzione, danno origine a metaboliti responsabili, nei casi più gravi, odori nauseabondi.

L'utilizzo del silo mais è irrinunciabile nella produzione del Grana Padano, per motivi economici, di tradizione e sancisce indiscutibilmente lo stretto legame con il territorio che deve caratterizzare una DOP, come è sancito dalla legislazione comunitaria: Reg. (CE) N. 510/2006, Reg. (CE) N. 1898/2006, Reg. (EU) 1151/12, ed in via più recente dai Reg. Delegato (UE) 664/2014, Reg Delegato (UE) 665/2014, Reg Esecutivo(UE) 668/2014.

Dall'inizio degli anni 80', dopo vari tentativi sviluppatasi nei decenni precedenti, per contenere il problema del gonfiore, a partire dall'introduzione dell'utilizzo del sieroinnesto alla fine del milleottocento, una efficace azione di contrasto al "gonfiore tardivo" è stata ottenuta con l'utilizzo del lisozima ottenuto da albume di uovo di gallina, che è stato inserito nel disciplinare di produzione. "È ammesso l'uso di lisozima, tranne che per il

Trentingrana, fino ad un massimo di 2,5 g per 100 chilogrammi di latte”.(MiPAAF Art. 5 - Provvedimento 23 giugno 2011).

Alle proteine dell'uovo sono notoriamente attribuite proprietà allergiche in soggetti sensibili. L'allergia alle uova è annoverata tra le più frequenti nella popolazione.

La normativa comunitaria, Dir 2007/68/CE della Commissione del 27 novembre 2007, annovera le uova e i suoi derivati tra gli allergeni la cui presenza deve essere riportata sulle tichette alimentari dei prodotti.

La presenza di lisozima residuo nel formaggio al termine della caseificazione può essere fonte problemi per soggetti sensibili a questa molecola, specie in età pediatrica.

Il Progetto GPL Free

Il progetto di ricerca **“Miglioramento continuo del processo e del prodotto Grana Padano: produzione di grana senza lisozima (GPL-Free)”** si è posto come obiettivo primario la produzione di formaggio Grana Padano DOP, con l'impiego di insilati, senza aggiunta di additivi - lisozima.

Il progetto ha tre scopi fondamentali:

- a) una garanzia sanitaria “assoluta” nei confronti di tutti i consumatori, anche quelli in età pediatrica, sensibili alle allergie alimentari verso le proteine dell'uovo;
- b) un valore aggiunto all'immagine del prodotto che non dovrà più dichiarare in etichettatura la presenza di lisozima;
- c) un ritorno al Grana Padano delle origini, prodotto con il solo utilizzo di latte, caglio e sale, senza alcuna altra sostanza aggiunta.

La sperimentazione si è protratta per tre anni ed ha comportato la messa a punto, nell'azienda agricola di Carpaneta di ERSAF e nell'annesso caseificio, di una serie di operazioni che hanno teso ad ostacolare la contaminazione/sviluppo dei clostridi nella filiera agro-zoo-lattiero-casearia e la ottimizzare delle condizioni di caseificabilità del latte. Nel corso della sperimentazione sono stati approfonditi i ruoli di ciascuna fase produttiva nella contaminazione/sviluppo o decontaminazione microbica, in particolare dei *Clostridi*, al fine di consentire la produzione del formaggio senza l'impiego di lisozima.

Sono state messe a confronto tre tipologie di insilati definiti: ***silo mais standard; loiessa fieno-silo; silomais innovativo ad elevato tenore in sostanza secca***. Per ciascuna tipologia di insilati utilizzati nell'alimentazione sono state poste a confronto la caseificazione effettuata con o senza lisozima ed a basso (0,85-0,95) od alto (1,05 – 1,10) rapporto grasso caseina.

I “*Quaderni della ricerca*” predisposti a cura di Gianni Colombari, Gian Antonio Zapparoli, Laura Galassi, Donatella Melani, Marco Zanazzi, Luisa Pellegrino, Monica Gatti, Francesco Masoero, Pier Sandro Cocconcelli, Maria Feligini, descrivono in modo dettagliato con tabelle, grafici e ricca documentazione fotografica, le varie fasi della sperimentazione effettuata presso l'azienda Agraria Carpaneta ed il Caseificio sperimentale annesso all'azienda stessa.

I rapporti delle singole unità operative documentano gli approfondimenti scientifici di ricerca o specificate in modo dettagliato anche le attività svolte dalla singole unità di ricerca che hanno sviluppato temi specifici:

Sotto progetto 1 - Responsabile Scientifico Prof. Francesco Masoero (Unicatt-ISAN).. *Obiettivo* Monitoraggio della moltiplicazione di Clostridi nel ruminale e gli effetti sull'andamento dell'ambiente ruminale, *in vitro*, delle diverse tipologie di insilato e delle differenti razioni alimentari (Ricerca svolta in collaborazione con l'Istituto di Microbiologia dell'Università Cattolica);

Sotto progetto 2 - A - Responsabile Scientifico - Prof. Pier Sandro Cocconcelli (UNICATT Microbiologia) “*Genomica Clostridi – Obiettivi* - Quantificazione mediante PCR in tempo reale di cellule e spore di *C. tyrobutyricum* presenti nell'intera filiera di produzione del formaggio Grana Padano e studio *in vitro* delle fermen-

tazioni ruminali sulle cinetiche di crescita e sopravvivenza di *C. tyrobutyricum* (questa fase della ricerca è stata condotta in stretta collaborazione con ISAN, Università Cattolica).

Sotto progetto 2 - B - Responsabile Scientifico - Dr. Maria Feglini (ISILS) - Genomica Clostridi – – Obiettivi - Individuare un pannello ristretto di marcatori molecolari specie-specifici per il riconoscimento nel latte e nel Grana Padano delle specie di *Clostridium* spp. maggiormente implicabili nel difetto ed associabili alle fermentazioni anomale. Il sistema diagnostico sviluppato per l'identificazione di tali marcatori è in grado di identificare simultaneamente la presenza di sei specie: *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. tertium* e *C. perfringens*. La sensibilità della tecnica è elevata e la riproducibilità è garantita dall'automazione strumentale=

Sotto progetto 3 - Responsabile Scientifico – Prof. Monica Gatti (UNI-Pr) “Genomica batteri lattici” obiettivi - Valutazione della microflora lattica presente durante differenti momenti della produzione di Grana Padano in 6 caseificazioni condotte con lisozima e 6 caseificazioni condotte senza lisozima sulla base dei 3 moduli progettuali indicati da ERSAF (silomais standard, silomais “innovativo”, fieno-silo loiessa); Studio qualitativo e semi quantitativo della microflora lattica dominante nei differenti campioni durante le caseificazioni di Grana Padano effettuate con o senza lisozima. Quantificazione dell'autolisi dei batteri lattici durante il processo di caseificazione e stagionatura del Grana Padano prodotto con o senza lisozima.

Sotto progetto 4 - Responsabile scientifico - Prof. Luisa Pellegrino (UNIMI-DeFENS) – Obiettivi - Valutare l'effetto dell'utilizzo o meno del lisozima in caseificazione sulla disponibilità di forme azotate semplici nel latte di massa, nel siero dolce e nel sieroinnesto, e sull'efficienza di utilizzo di dette forme azotate da parte della microflora presente; valutare l'effetto dell'utilizzo o meno del lisozima in caseificazione sull'andamento della proteolisi durante la maturazione del formaggio, come conseguenza di possibili fenomeni di selezione o di una diversa velocità di lisi cellulare della microflora determinati dalla presenza dell'additivo; viene verificata la rispondenza del formaggio stagionato, allo standard del formaggio Grana Padano DOP sia ottenuto con lisozima, sia ottenuto senza lisozima.

Senza entrare nei dettagli delle singole ricerche, ci limitiamo a riportare i fattori di criticità evidenziati e caratterizzati nel corso della sperimentazione effettuata presso l'azienda Carpaneta, per le implicazioni applicative che ne possono derivare:

1) Preparazione degli insilati

Il disciplinare per la produzione del Grana Padano DOP prevede fra gli alimenti compatibili gli insilati.

Le razioni delle vacche da latte basate sull'impiego di insilati favoriscono la diffusione delle spore di alcune specie di clostridi (*Cl. tyrobutyricum*; *Cl. sporogenes*; *Cl. butyricum*) nell'ambiente stalla e la loro presenza nel latte. La presenza di clostridi (soprattutto *Cl. tyrobutyricum*) nel latte e nel formaggio nella fase di maturazione è la causa di difetti gravi che portano al “gonfiore tardivo” che deprezza, fino a rendere non utilizzabili, le forme. Nell'insilato alcune specie di Clostridi trovano le condizioni ottimali per moltiplicarsi.

La moltiplicazione può avvenire nella fase iniziale di acidificazione, durante la conservazione, quando l'insilato è ancora sigillato, o durante la fase di consumo, con insilato esposto all'aria.

Lo sviluppo dei clostridi è generalmente legato ad una lenta e insufficiente acidificazione del foraggio riconducibile ad un basso tenore in sostanza secca (eccessiva acquosità) e/o ad un insufficiente contenuto di zuccheri fermentescibili, il tutto aggravato da un insufficiente compattamento ed isolamento del silo dall'aria.

Oltre all'aumento della contaminazione da clostridi, un insilato non ben realizzato, va incontro ad un processo respiratorio/fermentativo anomalo, evidenziato da un aumento di temperatura che determina consumo anche importante - per riscaldamento - di sostanza organica. Si tratta di un problema spesso sottovalutato ma che può arrivare a portare ad una perdita del 15-20% di sostanza secca introdotta nel silo. Ne deriva una riduzione della disponibilità di foraggio aziendale che deve essere compensato dall'allevatore con maggior consumo di mangimi. All'aumento della contaminazione da clostridi, alla perdita di sostanza secca, va aggiunto che nel corso dei processi anomali si formano tossine di vario tipo che possono avere effetti indesiderati sullo stato

sanitario degli animali e sulla qualità anche casearia del latte.

Fare un buon insilato richiede maggiore attenzione da parte dell'agricoltore e degli operatori, ha un costo leggermente superiore rispetto alla realizzazione di un cattivo insilato, ma il ritorno dell'investimento è stimabile di 3 – 5 volte, dipende dalle condizioni di lavoro e dalla stalla.

La sperimentazione ha fornito indicazioni che se correttamente applicate, consentono di migliorare la qualità degli insilati. Le indicazioni emerse devono essere applicate, a partire dalle prime fasi della filiera produttiva, quelle di “tipo agronomico”.

Il problema è equivalente per l'insilato di mais e per gli insilati di erba pre appassiti con tenore di sostanza secca elevati. Del problema si è occupata anche EFSA in una recente pubblicazione (ottobre 2014) “Scientific Opinion on the safety and efficacy of formic acid when used as a technological additive for all animal species EFSA Journal 2014;12(10):3827 - published:2 October 2014” che segue altre, sui possibili trattamenti per migliorare la conservazione degli insilati.

1) Utilizzazione dell'insilato

Se la preparazione dell'insilato condiziona la moltiplicazione delle spore nella fase di insilamento, la diffusione delle spore nell'ambiente, la contaminazione del latte si verifica nella fase di desilamento, nella fase di preparazione degli unifeed e di distribuzione nelle stalle. Molta attenzione viene data alla necessità di eliminazione delle parti potenzialmente a rischio di contaminazione (zone periferiche, cappello e parti laterali), ma forse non viene adeguatamente considerata l'importanza della prevenzione a partire dalla programmazione delle dimensioni del silo, che deve essere commisurato alla dinamica del consumo giornaliero nelle diverse stagioni.

2) Aspetti igienici di gestione della stalla

La diffusione delle spore nell'ambiente della stalla non è solo legata alla contaminazione ambientale derivante dall'insilato ma un ruolo importante deriva dalla gestione, soprattutto dalla della lettiera, che deve rispondere a procedure specifiche e ben definite che ad un tempo assicurino benessere agli animali e condizioni igieniche e che migliorino lo stato di pulizia della mammella.

3) Igiene della mungitura

La fase della mungitura è momento critico per il controllo dello stato sanitario della mammella, per il rischio di trasferimento nel latte della contaminazione microbica e per la verifica delle caratteristiche del latte: alterazioni macroscopiche di origine patologica, carica leucocitaria, ecc.

Attenzione in questa fase va posta alle tecniche di pulizia della mammella, o meglio dei capezzoli, alla tipologia di detergenti utilizzati, ed alle modalità operative in modo da evitare residui indesiderabili di detergenti/disinfettanti nel latte.

5) Utilizzo caseario del latte di animali sottoposti a trattamenti farmacologici

Controllo delle prerogative casearie del latte ai fini del destino alla caseificazione o meno del latte. Particolare attenzione va posta alle vacche che, per motivi terapeutici, sono state sottoposte a trattamenti farmacologici. Devono essere rispettati i tempi di sospensione previsti, e riportati sul “bugiardino” del farmaco, non solo, ma è consigliabile un allungamento di qualche giorno del tempo di sospensione rispetto a quanto prescritto. Per assicurare l'assenza di interferenze indesiderate sulla microflora pro casearia il Consorzio del Grana Padano DOP a diffuso una circolare il 3 dicembre 2013 che si esprime in questi termini: *Si raccomanda quindi che il latte destinato alla caseificazione a Grana Padano DOP oltre a non provenire da vacche che abbiano subito trattamenti con sostanze farmacologicamente attive senza il rispetto dei previsti tempi di sospensione, sia sottoposto ad un ulteriore periodo prudenziale di sospensione, anche nel caso di farmaci a lento rilascio, di alcuni giorni. Anche per i farmaci, cosiddetti “a tempo zero”, si consiglia pure di non consegnare il latte per alcuni giorni dopo il trattamento. Inoltre, necessita particolare attenzione il valore del numero delle entero-*

batteriacee presenti nel latte. Il progressivo abbassarsi della Carica Batterica Totale, in presenza di sostanze ad attività inibente selettiva, in alcune circostanze può favorire lo sviluppo di enterobatteriacee o comunque batteri anticaseari con conseguente effetto negativo sulla qualità del formaggio.

8) Corretta gestione degli impianti di raccolta e stoccaggio del latte in stalla

Rispetto delle norme indicate dai produttori degli impianti per l'esecuzione delle corrette procedure di pulizia e deterzione degli impianti. Attenzione alla scelta di detergenti/disinfettanti idonei, rigoroso rispetto delle temperature di conservazione del latte alla stalla. Controllo della esatta funzionalità dei termometri.

9) Aspetti caseari

Gestire correttamente la fase di separazione spontanea del grasso; operare in modo da ottenere un siero-innesto efficiente che permetta una rapida acidificazione della pasta nelle prime 24-48 ore; rispetto corretto della temperatura di cottura della cagliata (il riferimento impiegato nelle prove è stato di 53.5-53.7 °C) .

Anche le dimensioni delle forme possono rappresentare un fattore di ottimizzazione dell'acidificazione. Nel corso della sperimentazione sono state prodotte forme con peso medio di 38-39 Kg a 24 ore, apprezzabilmente inferiori a quello delle forme normalmente oggi caseificate. Questo fatto favorisce una più rapida dispersione termica del calore nelle prime ore e può velocizzare il processo di trasformazione degli zuccheri in acido lattico

Considerazioni sui risultati della sperimentazione

Senza analizzare nel dettaglio i risultati scientifici descritti nei “Quaderni della ricerca” si può prendere atto che le condizioni sperimentali adottate hanno consentito di produrre Grana Padano, secondo quanto previsto dal disciplinare, anche senza l'impiego di lisozima. In particolare come risulta dai risultati presentati al 4° Congresso lattiero-caseario AITEL–Padova, 12 settembre 2014 (G. Colombari, G.A. Zapparoli, M. Zanazzi, A. Stroppa). La valutazione delle forme è stata effettuata in base ad una classifica delle difettosità basata su una graduatoria che va da 60 a 100 (nessun difetto).

La valutazione dei risultati di caseificazione è stata fatta con la tecnica RX per la stima del difetto fermentativo ed ha portato ai seguenti risultati:

- 4) **Silomais standard** le differenze di punteggio fra tesi con lisozima (96,7) e la tesi senza lisozima (94) sono molto modeste, ancora più modeste le differenze nel caso del confronto basso (93,2) ed alto (93,8) rapporto grasso/caseina . Alla valutazione sensoriale delle forme con oltre 16 mesi di stagionatura, si rilevano solo lievi differenze come si risulta dall'entità della minima differenza significativa: 0,2-0,4 punti di intensità dei descrittori significativi;
- 5) **Loiessa fieno silos** le differenze di punteggio fra tesi con lisozima (97,1) e la tesi senza lisozima (94,8) sono molto modeste, ancora più modeste le differenze nel caso del confronto basso (94,8) ed alto (95,1) rapporto grasso caseina. Alla valutazione sensoriale delle forme con oltre 16 i campioni queste si separano rispetto al rapporto grasso/caseina e non rispetto alla presenza/assenza di lisozima. Si tratta di lievi differenze, come si rileva dall'entità della minima differenza significativa: 0,3-0,4 punti di intensità dei descrittori significativi;
- 6) **Silomais innovativo** le differenze di punteggio fra tesi con lisozima (90,9) e la tesi senza lisozima (86,7) sono, anche in questo caso, molto modeste, ancora più modeste le differenze nel caso del confronto basso (87,9) ed alto (89,6) rapporto grasso/caseina. Complessivamente la tesi **silomais innovativo** porta a classificazioni inferiori a quelle delle altre due tesi, indipendentemente dalla presenza o meno di lisozima. Alla valutazione sensoriale delle forme oltre i 16 mesi di stagionatura i campioni si separano rispetto al rapporto grasso/caseina e non rispetto alla presenza/assenza di lisozima.
Si tratta di lievi differenze, come si rileva dall'entità della minima differenza significativa,: 0,2-0,3 punti di intensità dei descrittori significativi.

L'esame della complessiva verifica della rispondenza del formaggio stagionato, anche quando ottenuto senza lisozima, allo standard del formaggio Grana Padano DOP, ha portato alla conclusione che in nessun caso i profili degli AAL (aminoacidi liberi) delle forme analizzate ne hanno determinato l'esclusione dal modello del Grana Padano DOP.

Si tratta indubbiamente di risultati di notevole interesse frutto della sinergie fra le varie unità di ricerca e della conduzione scientificamente corretta della sperimentazione. Si ricorda che complessivamente sono state prodotte e controllate 278 forme suddivise nelle varie tesi

I risultati ottenuti in **condizioni sperimentali** per le tesi *Silomais standard* e *Loiessa fieno silo* evidenziano la possibilità di operare senza lisozima. Nell'ambito delle condizioni sperimentali adottate va ricordato la scelta della produzione di forme più piccole di quelle normalmente realizzate nelle condizioni di campo, soprattutto in questi ultimi anni, può aver influito sul risultato ottenuto.

Sarebbe opportuno che i risultati venissero confermati in sperimentazioni condotte in condizioni di pieno campo, operando con aziende scelte *ad hoc* e con caseificazioni in caseifici convenzionali, ovviamente con la supervisione di ERSAF e delle altre strutture scientifiche già coinvolte. In questo modo, sarebbe possibile verificare la trasferibilità dei risultati e dare indicazioni applicative concrete.

Elemento importante è che i risultati e le indicazioni emerse dalla sperimentazione abbiano la più ampia diffusione possibile, a livello dei caseifici ed anche a livello delle aziende agrarie. Tutti gli operatori della filiera devono prendere coscienza che l'applicazione di alcuni accorgimenti, anche relativamente semplici, consentono di migliorare decisamente la qualità della produzione del formaggio ed arrivare a produrre senza lisozima. La sperimentazione ha dimostrato che un ruolo primario nel raggiungere l'obiettivo della eliminazione del lisozima è rappresentato dalla corretta preparazione degli insilati. Si tratta di un aspetto che va correttamente pubblicizzato anche perché, con un insilato di qualità, si ha un risparmio di perdita di sostanza secca da fermentazione anomala fino al quindici per cento, corrispondente fino a mezzo chilo di mangime al giorno; si ha inoltre un miglioramento complessivo dello stato sanitario della mandria.

Va inoltre rilevato che si va orientando verso un sistema agro-zootecnico di *precisione* che partendo dalla fase agronomica e coinvolge tutta la filiera e si conclude con il caseificio. La realizzazione di una fase di alimentazione con un sistema di "*precision feeding*" che gestisca in automatico la composizione della razione è dimostrato che può portare ad un apprezzabile riduzione del costo di produzione del litro di latte da 1,7 a 3 cent € per kg di latte. (ricerca Filigrana 2015)

Gli strumenti per gestire i vari processi della filiera passano attraverso il caseificio che deve essere il veicolo della diffusione dell'informazione, il gestore della corretta applicazione delle indicazioni, il promotore delle evoluzioni tecnologiche, pur nel rispetto della tradizione come indicata dal Disciplinare.

Si ribadisce che l'obiettivo è ad un tempo di migliorare la qualità (*maggior soddisfazione dei consumatori*), aumento della redditività (*riduzione delle percentuali di fallanze, maggiore redditività aziende agricole e per caseificio*), garanzia del più alto livello possibile di sicurezza del formaggio per tutte le fasce di consumatori.

Ringraziamenti

Un doveroso e sincero ringraziamento a tutti i colleghi che hanno partecipato alla sperimentazione, una menzione particolare va fatta all'operato del dr. Gianni Colombari, che ha profuso tanto impegno e passione nella realizzazione di GPL-free, fin dalla prime fasi di progettazione, ma che non ha potuto vedere conclusa la Sua opera.

Essenziale è stata la fattiva collaborazione del servizio Tecnico del Grana Padano nel corso di tutto il periodo sperimentale.

Prof Gianfranco Piva

Piacenza, 12.05.2015

BIBLIOGRAFIA E AUTORI

- Bani P., Calamari L., Bettinelli E., Bertoni G.. *Composizione della razione e contenuto in spore di clostridi nelle feci di bovine in lattazione*. Sci. Tecn. Latt.-Cas., (2001), 52, 369-389.
- Battistotti B., Bottazzi V., Scolari G., Chiusa P.. *Effetto dell'aldeide e del lisozima sulla fermentazione butirrica e propionica del formaggio grana*. Sc. Tecn. Latt. Cas. (1984) 35, 193.
- Bertezolo C., Pallotta U., *Impiego del lisozima nella produzione del "Grana"*. Tesi di laurea, pubblicata a cura della CHR. Hansen Italian (1982).
- Bertoni G.. *Ambiente, alimentazione e qualità del latte*. L'Informatore Agrario, (1996), Supplemento al n. 21, 5-41.
- Borreani G., Bisaglia C., Tabacco E.. *Effects of innovative and conventional wrapping systems on fermentation of lucerne silage*. Proc. XXX CIOSTA-CIGR V Congress, 22-24 sett. 2003, Torino, 1,429-433.
- Borreani G., Delmastro R., Ciotti A. (1994) - *Inquinamento di terra e clostridico dell'insilato di erba medica appassita*. Rapporto interno n. 94.1, Ima-Cnr, Torino.
- Borreani G., Tabacco E., 2008. *Low permeability to oxygen of a new barrier film prevents outgrowth of butyric acid bacteria in farm corn silage*. Journal of Dairy Science, 91, 4272-4281.
- Borreani G., Tabacco E., Colombari G.. *Influenza del deterioramento aerobico degli insilati sulla*
- Borreani G., Tabacco E.. *Soluzioni per difendere gli insilati dall'aria*. Professione Allevatore (2001), 18, (10), 19-26.
- Bottazzi V., Battistotti B., Corradini C.. *Problemi di attualità e sviluppo tecnologico nella produzione del formaggio grana*, (1984), 35 (4), 321-337.
- Bottazzi V., Bodini F., Battistotti B., Corradini C., Lauritano M.. *Rimozione centrifuga dei clostridi dal latte e produzione di formaggio grana*, (1982), 33, 2, 123-165.
- Bottazzi V.. *Grana Padano: correggere le affermazioni tecniche non attuali*. L'informatore Agrario (1998), 9, 70-72.
- Bottazzi V.. *Grana Padano: tradizione o innovazione?*. L'informatore Agrario (1998), 40, 27-29.
- Bottazzi V.. *Lo stretto rapporto tra foraggio insilato e formaggio grana*. L'Informatore Agrario (1996), 39, 34-36.
- Bottazzi V.. *Necessario aggiornare i disciplinari di produzione del Grana Padano*. L'informatore Agrario (2000), 21, 53-56.
- Bottazzi V. Battistotti B.. *Lisozima e formaggio grana: combinazione di complessi aspetti*. Latte (1999), 24, 58-61.
- Bottazzi V., Battistotti B., Ribecchi A., Bertuzzi S.. *Germinazione delle spore di Clostridium ed azione del lisozima in formaggio grana*. Latte (1996), 21, (11), 80.
- Bottazzi V., Battistotti B., Cappa F., Rebecchi A., Bertuzzi S., Brambilla E. - *Germinazione delle spore di Clostridium ed azione del lisozima in formaggio grana*. Scienza e Tecnica Lattiero- Casearia, (1993), 44 (2): 79-96.
- Caleffi A., Mazzali E., G.A. Zapparoli, *Il freddo dalla stalla al caseificio per la produzione di Grana Padano*. L'Informatore Agrario (1988), 35, 27-31.
- Carini S., Salvadori del Prato O., *Il Grana, una rapida revisione bibliografica*. Tipografia La Moderna (1992) - Lodi -
- Carini S., Roberta L., *Inibizione della germinazione delle spore dei clostridi mediante lisozima*. Ind. Latte, (1982), 18, 35,.
- Carminati D., Neviani E., Mucchetti G.; *Azione del lisozima sulle forme vegetative di Cl. tyrobutyricum*. Latte (1985), 10, 194,
- Ciotti A., Borreani G., Tabacco E.. *Deterioramento aerobico del silomais*. Professione Allevatore (1999), 16, (12), 36-37.
- Colombari G. A. Allegretti, D.Melani, B. Bettoni, M. Pecorari. *Sviluppo di spore di clostridi nel terreno negli alimenti zootecnici, nelle feci e nel latte di allevamenti a diverso livello evolutivo in area Parmigiano-Reggiano*. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia (2005), 56 (5), 309-344.
- Colombari G., Borreani G., and Crovetto G. M.. *Comparison of lucerne silage and ventilated hay in maize silage-based rations for dairy cows for the production of milk destined for grana cheese*. Grass and Forage

Science, 1999, 54, 184-194.

Colombari G., Borreani G., and Crovetto G. M.. *Effect of Ensiling Alfalfa at Low and High Dry Matter on Production of Milk Used to Make Grana Cheese*. J. Dairy Sci. 2001, 84, 2494-2502.

Colombari G., Fantuzzi U.. *Insilato, spore di clostridi nelle feci e nel latte e qualità del formaggio Grana: nuove significative esperienze*. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia (1991), 5, 344-359.

Colombari G.. *Migliorano le qualità casearie delle razioni con insilati*. L'Informatore Agrario (1999), 39, 35-41.

Colombari G., F. Manzerra., D. Melani, G.A. Zapparoli, E. Neviani. *Fermentazioni anomale nel latte quando la dieta è a base di silomais*. L'Informatore Agrario (2003), 39, 41-44.

Contrepois M., Gouet P., and Sauvant D.. *Comportement des spores de bacteries anaerobies fermentant le lactate dans le tractus digestif du ruminant. II Evolution du nombre de spores de C. Tyrobutyricum introduites au niveau du rumen au cours du transit digestif chez le ruminant*. Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys, (1971), 11, 139-154.

Crovetto G.M. Rapetti L. Sandrucci A., Succi G., Lodi R.. *Indagine preliminare sul contenuto in spore di clostridi butirrici presenti nell'alimento, nel liquido ruminale, nelle feci e nel latte della bovina*. Atti del XXV Simposio Internazionale di Zootecnia, (1990), 25, 129-137.

Crovetto G.M. *Razioni unifeed per vacche da latte*, (1985) Professione allevatore, 11,

Emaldi G.C., Toppino P., Bossi M.G., Carini S., Lodi R., Vezzosi A., Nizzola I., Alberini B.. *La presenza di sporigeni anaerobi nei foraggi e nelle feci di bovine da latte*. L'Industria del latte (1977), 1, 47-81.

Fremont S, Kanny G, Nicolas JP, Moneret-Vautrin DA *Prevalence of lysozyme sensitization in an egg-allergic population*. Allergy, (1997), 52(2), 224-228.

Gouet, P., and M. Contrepois. *Comportement des spores de bacteries anaerobies fermentant le lactate dans le tractus digestif du ruminant. I. Variations avec le regime de la concentration en spores dans le rumen et les feces. (Behaviour of the lactatefermenting spores of the anaerobic bacteria in the ruminant digestive tract. I. Variations of the concentration of spores according to diets)*. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys, (1971), 11, 129-138.

Iaconelli A., Fiorentini L., Bruschi S., Rossi F., Mingrone G., Piva G.. *Absence of Allergenic Reaction to Egg White Lysozyme Additive in Grana Padano Cheese* - Journal of American College of Nutrition (2008), 27 (2), 326-331.

Ingham SC, Hassler JR, Tsai YW, Ingham BH. *Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing Clostridium spp. isolated from milk*. Int J Food Microbiol. 1998 Sep 8;43(3):173-83.

Jonsson A. (1990). *Enumeration and Confirmation of Clostridium tyrobutyricum in Silage Using Neutral Red, D-cycloserine and Lactate Dehydrogenase Activity*. J.Dairy Sci., 73: 719-725.

Jonsson, A.. *The role of yeasts and clostridia in silage deterioration*. Ph.D. Diss. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden (1989).

Jonsson, A.. *Growth of Clostridium tyrobutyricum during fermentation and aerobic deterioration of grass silage*. J. Food Agric. Sci. (1991), 54:557-568.

Lodi R.. *The use of lisozyme to control butyric acid fermentation*. Bulletin of the IDF 251 (1990), 51-55.

Marseglia A., Castellazzi A.M., Valsecchi C., Licari A., Piva G., Rossi F., Fiorentini L., Marseglia G.L.. *Outcome of oral provocation test in egg-sensitive children receiving semi-fat hard cheese Grana Padano PDO (protected designation of origin) containing, or not, lysozyme*. Eur J Nutr. (2013), 52(3):877-83.

Neviani E.. *Il lisozima in caseificazione* - review. Ind. Latte, (1992), 28 (1), 23.

Osservatorio Latte – ISMEA – *Il mercato del latte* – Rapporto 2004.

Pieri R., Pretolani R.. *Il sistema agro-alimentare della Lombardia*. Rapporto 2012.

Pieri R.. *Il Mercato del latte, rapporto 2009*. Osservatorio sul mercato dei prodotti zootecnici. Ed. FrancoAngeli (2010).

Piva G., Maroardi A., Bertoni G., Santi E., Postiglioni L.. *Risultati applicativi di un quadriennio di esperienze sulla influenza dell'alimentazione delle bovine nella produzione di formaggio grana: aspetti zootecnici*. Annali della Facoltà di Agraria dell'Università Cattolica del S. Cuore. Anno XI (1971) – Fasc. I-III, 559-600. *qualità dei prodotti caseari*. L'Informatore Agrario (2002), 58, (11), 57-61.

Piva G., Masoero F.. *Alimentazione a piatto unico - Unifeed*. Atti Soc. It. Buiatria (1985), XVII, 129-150.

Ruppel K.A., Pitt R.E., Chase L.E., and Galton D.M.. *Bunker Silo Management and Its Relationship to Forage*

Preservation on Dairy Farms. J. dairy Sci. (1995), 78:141-153.

Stadhousers, J., and S. F. Spoelstra.. *Prevention of the contamination of raw milk by making a good silage*. Bull. Int. Dairy Fed. (1990), 251:24-31.

Stadhousers, J., and K. Jørgensen. *Prevention of the contamination of raw milk by a hygienic milk production*. Bull. Int. Dairy Fed. (1990), 251:32-36.

Venier R.. *Fieno-silo, sfida alla fienagione*. L'informatore Zootecnico, (2007), 3, 68-69.

Zapparoli G.A., Melani D., Fantuzzi U., Annibaldi S., "Esperienze di pre-raffreddamento del latte nella produzione di formaggio grana padano con latte raffreddato e stoccato alla stalla". Il Latte, novembre 1988.

Zapparoli G.A., Bertezolo C., Alberini B., Caleffi A., Annibaldi S., "Esperienze di produzione di formaggio grana con latte di due mungiture raffreddato alla stalla". Il Latte, marzo 1987.

Zapparoli G.A., Neviani E., "Corretta acidificazione nel formaggio grana". Il Latte, settembre 2005

Bibliografia di riferimento

AA.VV.. Atti del simposio: Il lisozima nella caseificazione, suo impiego in Italia e all'estero. Ed. ILC, Lodi, 1985.

Axelsson L., Salmminen S., Von Wright A., Ouwenhand A., Lactic acid bacteria: classification and physiology, Marcel Dekker Inc, 1993, pp. 1-64.

Battistotti B.. L'aldeide formica come mezzo di controllo del gonfiore nei formaggi. Sc. Tecn. Latt. Cas. (1984), 35, 427.

Battistotti B., Bosi F., Bottazzi V.. Effetti dell'aldeide formica su spore di clostridium. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, (1981), 32, (6), 363-373.

Berra B.. Lisozima, il punto di vista del biochimico. Latte (1999) 24, 78-81.

Bertezolo C., Zapparoli G.A., Melani D., Bianchi P.G., Annibaldi S.. "Studio comparativo di alcuni parametri tecnici del latte raffreddato o trattato con formalina in rapporto con i risultati della caseificazione a grana". Il Latte, novembre 1989.

Bonizzi I, Buffoni JN, Feligini M, Enne G. Investigating the relationship between raw milk bacterial composition, as described by intergenic transcribed spacer-PCR fingerprinting, and pasture altitude. J Appl Microbiol. 2009 Oct;107(4):1319-29.

Bosi F., Vescovo M., Bottazzi V., Scolari G.L., Battistotti B., Brambilla E.. Batteri lattici per la produzione di formaggio grana. II Parte: integrazione di siero-fermento naturale con colture pure di bacilli lattici termofili. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia (1991), 42 (3), 171-179.

Bottazzi V., Battistotti B., Corradini C.. Problemi di attualità e sviluppo tecnologico nella produzione del formaggio grana (1984), 35 (4), 321-337.

Bottazzi V., Corradini G., Piva G., Del forno G.. Effetto dell'aldeide formica su microflora, maturazione e valore nutritivo del formaggio Grana. Sc. Tecn. Latt. Cas. (1966), 17, 17.

Bottazzi V., Corradini C.. Possibilità e prospettive nel controllo delle fermentazioni gasogene dei formaggi Grana Padano e Provolone. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia (1987), 38, 117-145.

Bottazzi V., Scolari G.L., Cappa F., Battistotti B., Bosi F., Brambilla E.. Batteri lattici per la produzione di formaggio grana, III Parte: velocità di acidificazione e comparsa di gonfiore. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, (1992), 43 (2): 71-93.

Carini S., Mucchetti G., Neviani E.; Lysozyme: activity against Clostridia and use in cheese production. A review. M.A.N., 3, 299 (1985).

Carini S., Neviani E., Mucchetti G.; Lysozym bei der Kaseherstellung: Erfahrungen in Italien. Atti Convegno „Lysozym in der Kaseherstellung“ Weihenstephan, Technische Universität München, 17/1/1986 . Deutsche Molkerei Zeitung (dmz), (1986), (12), 331,.

Carminati D., Mucchetti G., Neviani E., Emaldi G.C.; La germinazione di Clostridium tyrobutyricum in presenza di lisozima. Latte (1984), 9, 897.

Cocolin L., Innocente N., Biasutti M., Comi G. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. Int J Food Microbiol. 2004 Jan 1;90(1):83-91.

Colombari G., Fantuzzi U.. Anaerobi gasogeni nella razione e nelle feci delle bovine da latte. Il latte (1993), 1110-1112.

- Colombari G.. La qualità del latte ed il raffreddamento. *L'industria del latte* (1993), 2, 37-45.
- Colombari G. A. Alleghetti, D.Melani, B. Bettoni, M. Pecorari. Sviluppo di spore di clostridi nel terreno negli alimenti zootecnici, nelle feci e nel latte di allevamenti a diverso livello evolutivo in area Parmigiano-Reggiano. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* (2005), 56 (5), 309-344.
- Colombari G., G.A. Zapparoli, D.Melani, T. Vulcano, M. Zanazzi, M. Pecorari. Difetti fermentativi nel formaggio parmigiano reggiano prodotto con latte di aziende agricole a diverso livello tecnologico e manageriale. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia* (2006), 57 (6), 571-598..
- Correra C. Grana Padano: le innovazioni tecnologiche ammissibili secondo la circolare del ministro. *Latte*, (1998), 23, 38-41.
- Correra C. Impiego del lisozima nella produzione di Grana Padano: problemi di liceità. *Latte* (1999), 24, 50-54.
- De Wuyt L., Leroy F.. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Application. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* (2007), 13, 194-199.
- De Medici D, Anniballi F, Wyatt GM, Lindström M, Messelhäusser U, Aldus CF, Delibato E, Korkeala H, Peck MW, Fenicia L. Multiplex PCR for detection of botulinum neurotoxin-producing clostridia in clinical, food, and environmental samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Oct;75(20):6457-61.
- Fach P, Micheau P, Mazuet C, Perelle S, Popoff M. Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum*. *J Appl Microbiol.* 2009 Aug;107(2):465-73.
- FIL-IDF. Whey. Proceedings of the second International Whey Conference, held in Chicago, USA, 27-29 October 1997.
- Giannino ML, Aliprandi M, Feligini M, Vanoni L, Brasca M, Fracchetti F. A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk. *J Microbiol Methods.* 2009 Aug;78(2):181-8.
- Giannino ML, Marzotto M, Dellaglio F, Feligini M. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int J Food Microbiol.* 2009 Apr 15;130(3):188-95.
- Grant KA, Kenyon S, Nwafor I, Plowman J, Ohai C, Halford-Maw R, Peck MW, McLauchlin J. The identification and characterization of *Clostridium perfringens* by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. *Foodborne Pathog Dis.* 2008 Oct;5(5):629-39.
- Herman LM, De Block JH, Waes GM. A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Dec;61(12):4141-6.
- Iaconelli A., Fiorentini L., Bruschi S., Rossi F., Mingrone G., Piva G.. Absence of Allergenic Reaction to Egg White Lysozyme Additive in Grana Padano Cheese - *Journal of American College of Nutrition* (2008), 27 (2), 326-331.
- Janvilisri T, Scaria J, Gleed R, Fubini S, Bonkosky MM, Gröhn YT, Chang YF. Development of a microarray for identification of pathogenic *Clostridium* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 Feb;66(2):140-7.
- Klijn N, Nieuwenhof FF, Hoolwerf JD, van der Waals CB, Weerkamp AH. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Aug;61(8):2919-24.
- Konings W., The cell membrane and the struggle for life of lactic acid bacteria, *Antonie Van Leeuwenhoek* 82 (2002) 3-27.
- Le Bourhis AG, Saunier K, Doré J, Carlier JP, Chamba JF, Popoff MR, Tholozan JL. Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jan;71(1):29-38.
- Le Bourhis AG, Doré J, Carlier JP, Chamba JF, Popoff MR, Tholozan JL. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *Int J Food Microbiol.* 2007 Jan 25;113(2):154-63.
- Lodi R., Carini S., Inquinamento del latte da clostridi ed inibizione del loro sviluppo mediante uso di lisozima, *Ann. Micr.* (1980), 30, 103,.
- Losi G., Castagnetti G.B., Chiavari C., Grazia L., Morini D.. Prove di caseificazione a formaggio grana con latte addizionato di lisozima. *Ind. Del Latte* (1983), 19 (2), 17,.
- Losi G., Chiavari C., Alcuni aspetti dell'uso del lisozima nella produzione di formaggio Grana. *Sc. Tecn. Latt.*

Cas. (1984), 35, 427,.

Lycken L, Borch E Characterization of *Clostridium* spp. isolated from spoiled processed cheese products. J Food Prot. 2006 Aug;69(8):1887-91.

Mucchetti G., Neviani E., Carini S.; Activity of lysozyme and formaldehyde against *Clostridium tyrobutyricum*: block of the germination process and vegetative cell lysis. - Simposio Internacional "Los aditivos en la industria agroalimentaria" Madrid 15-17/10/1986, edita Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, pag.381 . Riportato anche in Annali Istituto Sperimentale Lattiero Caseario 1986-1987.

Neviani E., Mucchetti G., Carini S.; The lysozyme in cheesemaking: Italian experiences. - Simposio Internacional " Los aditivos en la industria agroalimentaria", Madrid 15-17/10/1986, edita Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion, pag. 385. Riportato anche in Annali Istituto Sperimentale Lattiero Caseario 1986-1987.

Ottogalli G., Galli A., Laria L., Camaschella P. Azione del cloridrato di lisozima (Afilact) sui batteri lattici di sieri-innesti da grana. Ind. del Latte (1983), 19 (3), 43,.

Östling C.E., Lindgren S.E. - Bacteria in manure and NPK-fertilized silage crops. Journal Science Food Agric., (1991), 55, 579-588.

Poolman B., Transporters and their roles in LAB cell physiology, Antonie Van Leeuwenhoek 82 (2002) 147-164.

Popa R, Mashall MJ, Nguyen H, Tebo BM, Brauer S. Limitations and benefits of ARISA intra-genomic diversity fingerprinting. J Microbiol Methods. 2009 Aug;78(2):111-8.

Regione Lombardia" – Quaderno della ricerca n. 86 – Giugno 2008 – "Caratterizzazione sensoriale delle produzioni a denominazione di origine.

Regione Lombardia - Quaderno della ricerca n. 70 – Luglio 2007 – "Miglioramento della qualità del formaggio Grana Padano nel rispetto della tradizione" .

Resmini P. Saracchi S., De Bernardi G., Volontario G.. L'aldeide formica nel formaggio Grana Padano. Ind. del Latte (1980), 16, (3-4), 45,.

Rossi F, Dellaglio F. Quality of silages from Italian farms as attested by number and identity of microbial indicators. J Appl Microbiol. 2007 Nov;103(5):1707-15.

Shin GW, Cho YS, Hwang HS, Park JH, Jung GY. A two-step quantitative pathogen detection system based on capillary electrophoresis. Anal Biochem. 2008 Dec 1;383(1):31-7.

Titgemeyer F., Hillen W., Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution, Antonie Van Leeuwenhoek 82 (2002) 59-71.

Van Soest, P.J. Use of detergent in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fibre and lignin. J. Asso. Anal. Chem. (1963), 46, 829–835.

Vecchia P., Stefanini L., Calamari L.. Qualità del latte e caseificazione del Grana Padano. L'Informatore Agrario, (2001), 8, 93-96.

Wang RF, Cao WW, Franklin W, Campbell W, Cerniglia CE. A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. Mol Cell Probes. 1994 Apr;8(2):131-7.

Zapparoli G.A., "Raggi X per i formaggi". Il Latte, gennaio 1997.

Zapparoli G.A., Alberini B., Fantuzzi U., Fagnoni P., Annibaldi S., "Riflessi di alcuni parametri microbiologici del latte sulla qualità di formaggio grana". Il Latte, settembre 1987.

Zapparoli G.A., Dugoni F.. "Quadro analitico di acidi grassi volatili, pH ed umidità in formaggio grana scelto da 1 a 20 mesi di stagionatura". Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia N°3 Giugno1997.

Zapparoli G.A., Fagnoni P., Melani D., Bertazzolo C., Annibaldi S., "Osservazioni sul contenimento della flora microbica del latte in fase di produzione". Il Latte, gennaio 1988.

Zapparoli G.A., Alberini B., Mora R., Nanni M., Guidetti R., Pellegrino L.. Esperienza di caseificazione a formaggio Parmigiano-Reggiano con latte di due mungiture raffreddato e stoccato alla stalla. Latte (1988), 7, 594.

Zapparoli G.A., Neviani E.. "Corretta acidificazione nel formaggio grana". Il Latte, settembre 2005.

RINGRAZIAMENTI

Per ERSAF

Allegretti Anselmo, Bellini Marco, Bettoni Barbara, Bertazzoni Barbara, Bertezzolo Carla, Bianchi Pier Giorgio, Bonatti Valeria, Bondi Alberto, Cancellieri Giacomo, Crestale Daniele, Coffani Gabriele, Costa Donato, Frattola Guido, Marchesi Mario, Negri Francesco, Ossola Francesca, Pezzetti Regina, Preus Paolo e tutto il personale di campagna e di stalla di Carpaneta.

