



## Ricerca finanziata dalla Regione Piemonte

### Studio sull'attività della fosfatasi alcalina nei formaggi DOP piemontesi a latte crudo - Fosfadop

#### Partecipanti:

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – Torino  
Assopiemonte DOP e IGP

#### Il progetto

Una frazione importante delle aziende piemontesi produttrici di latte, circa il 30%, si colloca nelle aree di montagna, prevalentemente collegate a produzioni casearie tipiche. Il settore lattiero caseario rappresenta oltre il 10% del valore della produzione agricola regionale.

Oggi, a fronte di una sempre più spinta standardizzazione dei processi e dei prodotti, è forte da parte dei Consorzi di Tutela, la volontà di valorizzare gli alimenti tradizionali o tipici, spesso prodotti a partire da latte crudo ed è in aumento da parte del consumatore la riscoperta e l'apprezzamento di tali produzioni.

Sebbene il momento economico non felice, non permetta il pieno successo di prodotti di nicchia, in generale i formaggi a latte crudo godono di una buona popolarità, per l'idea di genuino che trasmettono al consumatore e per le spiccate caratteristiche organolettiche. Tuttavia, poiché il consumatore è ben consapevole che le frodi commerciali nel settore alimentare sono piuttosto frequenti, quando acquista un formaggio a latte crudo desidera garanzie che il prodotto risponda a quanto dichiarato in etichetta.

La Fosfatasi Alcalina (ALP) è un enzima normalmente presente nel latte crudo, che viene inattivato qualora il latte subisca un trattamento termico. Tale parametro è utilizzato quale criterio di processo, per verificare cioè l'efficacia dei trattamenti termici applicati al latte, da destinare alla vendita o alla caseificazione.

Se, da un lato, il parametro ALP viene proposto come criterio per valutare l'avvenuta pastorizzazione per il latte alimentare, per il latte utilizzato per la caseificazione o direttamente nel formaggio in commercio, dall'altra vi è la possibilità di utilizzare il medesimo parametro come indicatore dell'utilizzo di latte crudo. In quest'ottica quindi, il parametro ALP potrà rispondere alle esigenze di riscontro normativo in materia di igiene alimentare da parte dell'Autorità Competente; inoltre esso sarà la risposta alla richiesta pressante di Associazioni di Consumatori e di Consorzi di tutela di prodotti a marchio circa il rispetto di disciplinari di produzione, anche per ripagare la fiducia che i consumatori ripongono in prodotti lattiero-caseari a latte crudo e in chi li difende, valorizza e protegge.

In bibliografia, molti studi evidenziano come vi sia un'alta variabilità nell'attività residua della fosfatasi alcalina in base alle diverse tipologie di formaggio. I fattori che sembrano maggiormente influenzare tale parametro sono la temperatura di cottura della cagliata e le dimensioni della forma di formaggio. Inoltre, anche la distribuzione all'interno della forma sembra essere influenzata dalle caratteristiche del processo produttivo. In particolare, la possibilità di avere valori di riferimento per ogni singolo formaggio, permetterebbe di verificare la corrispondenza con quanto riportato in etichetta o sul disciplinare, ovvero l'utilizzo esclusivo di latte crudo.

## Raccolta campioni ed esecuzione delle analisi

### Piano di campionamento

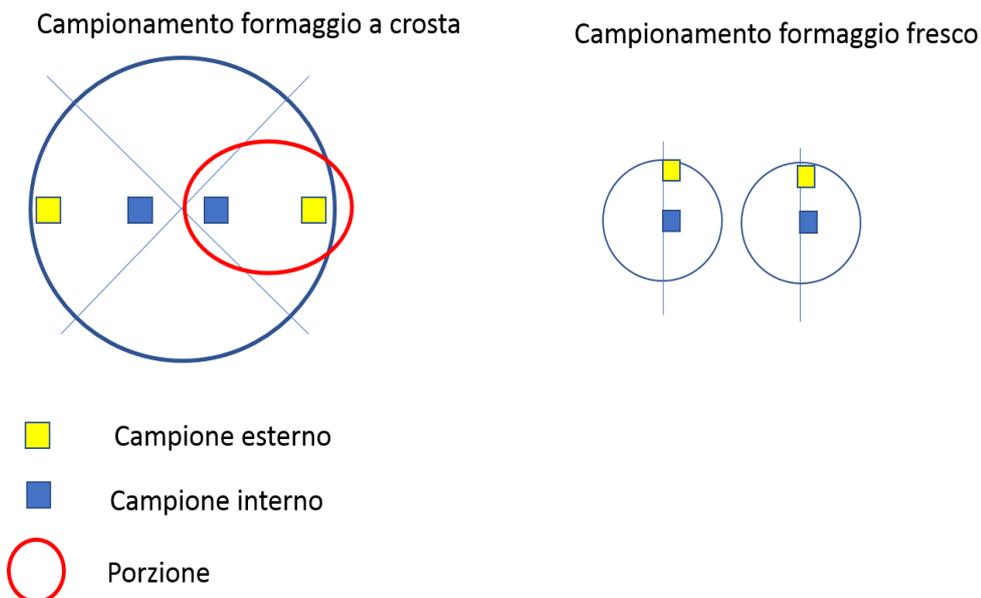
Al fine di stabilire un intervallo di riferimento per i valori di attività della Fosfatasi alcalina (ALP) in formaggi a latte crudo, è stata definita la dimensione campionaria necessaria per ottenere risultati rappresentativi per la tipologia produttiva esaminata. Inoltre, data l'alta variabilità dei valori di ALP riscontrati in letteratura sul latte crudo e sui formaggi derivati, il disegno dello studio ha previsto campionamenti stratificati sulla base dei fattori che ne possono condizionare i valori (tipologia di formaggio, produttore, stagionalità, punto di prelievo all'interno della forma).

All'interno della stessa tipologia di formaggio è stata considerata la variabilità del prodotto dovuta alla stagionalità. Poiché i valori di fosfatasi variano anche all'interno della stessa forma in base alla distanza dalla crosta (Egger et al., 2015), sono stati effettuati campionamenti in 2 diversi punti (sotto la crosta e al cuore del prodotto). Il numero dei campioni è stato quindi stratificato in base alle diverse tipologie di formaggio oggetto dello studio (N=6, Castelmagno DOP, Raschera DOP stagionato 60 gg, Bra Duro o Bra Duro d'alpeggio DOP, Toma piemontese DOP, Murazzano DOP e Robiola di Roccaverano DOP). All'interno della stessa tipologia di formaggio è stata considerata la variabilità del prodotto dovuta alla stagionalità (9 forme nell'arco dell'anno).

Il campione, prelevato a partire dall'intera forma per tutte le tipologie di formaggi, ad eccezione del Murazzano DOP e Robiola di Roccaverano, era costituito da 2 porzioni (o fette) di pasta compresa tra la crosta dello scalzo e quella dei due piatti, del peso di 250 g circa ciascuna. Da ogni porzione sono stati prelevati 2 campioni in 2 diversi punti (sotto la crosta e al cuore del prodotto). Per il Murazzano DOP sono state utilizzate 2 formaggette del peso di 400 gr circa dello stesso lotto di produzione; per la Robiola di Roccaverano sono state utilizzate 2 formaggette del peso di 250 gr circa dello stesso lotto di produzione (Figura 1).

Le analisi effettuate in totale sono state 644.

*Figura 1. Schema di campionamento*





Il piano di campionamento prevedeva di prelevare formaggi il più vicino possibile nel tempo rispetto allo svincolo previsto dal disciplinare di produzione. Tuttavia, in alcuni casi non è stato possibile rispettare tale regola, a causa di esigenze gestionali e commerciali dei caseifici.

I caseifici hanno fornito i formaggi con confezionamento sottovuoto al fine di mantenere al meglio le caratteristiche del prodotto. Il trasporto è avvenuto alla temperatura di 4°C e la consegna al laboratorio è stata eseguita entro le 24 ore dal prelievo.

I formaggi in attesa di essere analizzati sono stati conservati alla temperatura di 4° C e le analisi sono state svolte nei tempi immediatamente successivi rispetto alla data di consegna.

### Esecuzione delle analisi

I campioni sono stati analizzati mediante metodo fluorimetrico secondo quanto riportato dalla norma internazionale (ISO 11816-2:2016).

### Cessione gratuita dei campioni

Le porzioni di campione non utilizzate per le analisi sono state donate al Banco Alimentare del Piemonte Onlus, secondo quanto previsto dalla Legge n.166 del 19/08/2016 per la donazione e distribuzione di prodotti alimentari e farmaceutici a fini di solidarietà e per la limitazione degli sprechi.

### Elaborazione dei risultati analitici

Tramite l'Utilizzo del software STATA15.1 (StataCorp, College Station, TX, USA) sono stati calcolati intervalli di riferimento per i valori di ALP di ciascuna tipologia produttiva. Per la stima degli intervalli sono state seguite le indicazioni del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Una volta verificata la non-adattabilità dei dati ad una distribuzione di tipo gaussiano, sono stati applicati test di ipotesi non-parametrici (test di Mann-Whitney/ Kruskal-Wallis per dati non appaiati e Wilcoxon matched-pairs signed-ranks test per dati appaiati) per la valutazione di differenze tra campioni prelevati in stagioni, posizioni e da tipologie produttive diverse.



Le numerosità campionarie sono riassunte in Tabella 1.

*Tab. 1: Numero e tipologie di formaggio analizzati*

Formaggio	Numero Campioni
BRA	108
CASTELMAGNO	108
MURAZZANO	108
RASCHERA	104
ROCCAVERANO	108
TOMA	108
Total	644

I risultati che seguono sono relativi a 636 campionamenti su 644 che hanno dato esiti validi ai fini della descrizione della distribuzione della variabile ALP all'interno dei diversi prodotti. Otto campioni non sono stati considerati nell'analisi perché non presentavano valori di ALP riconducibili a quelli propri della tipologia produttiva esaminata. I valori riscontrati per questi campioni infatti erano inferiori al limite di rilevazione del metodo (10 mU/Kg).

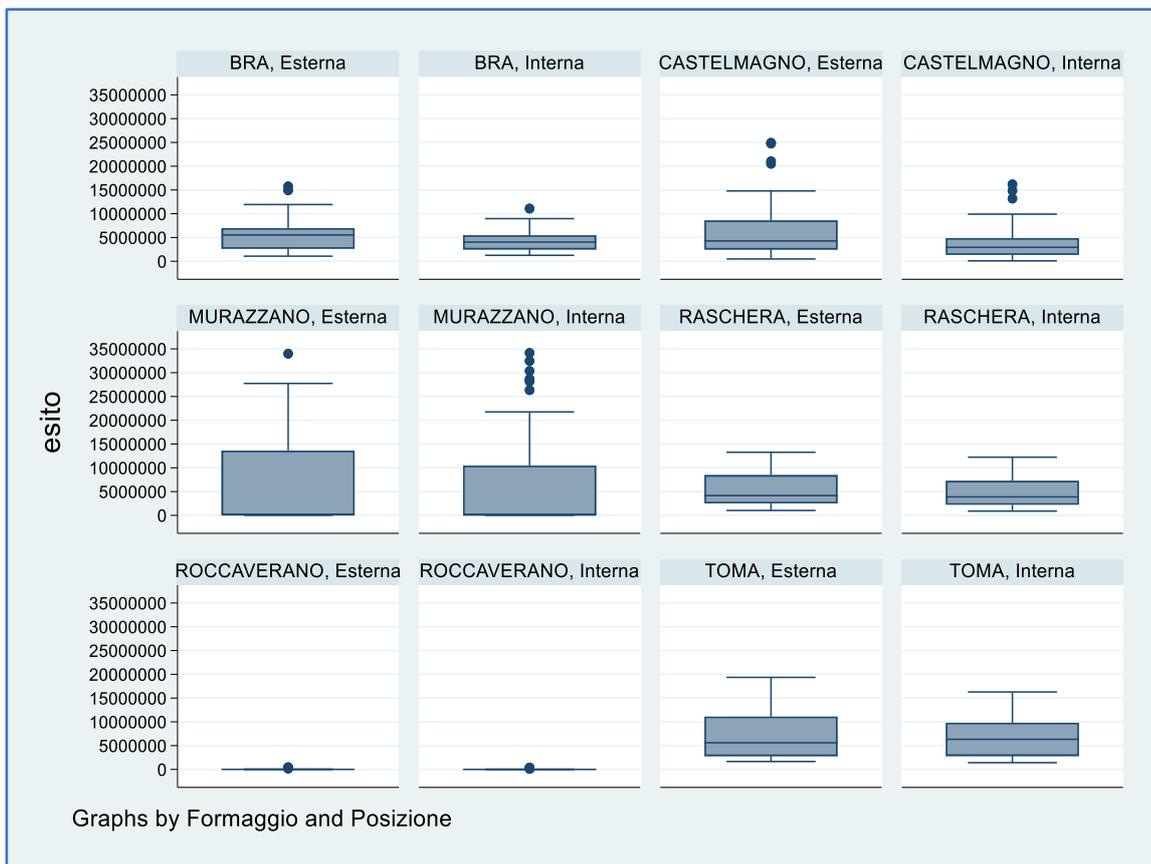
Di seguito vengono descritti i risultati analitici elaborati sulla base delle singole variabili considerate: punto di prelievo, tipologia di formaggio, caseificio e stagionatura.

## Punto Di Prelievo

Il confronto tra i valori dei prelievi effettuati vicino alla crosta (esterni) e prelievi nella porzione centrale (interni) ha permesso di osservare una differenza statisticamente significativa ( $p=0.049$ ).

Il confronto tra i valori di ALP per i prelievi interni ed esterni effettuati per ciascuna tipologia di formaggio, ha messo in evidenza una differenza statisticamente significativa per i formaggi Castelmagno e Roccaverano (Fig. 2). Il presente studio risulta quindi essere in accordo un lavoro presente in letteratura relativamente ai formaggi freschi, a quelli a pasta semidura, e a quelli a pasta dura (Egger et al. 2015).

*Fig. 2. Confronto dei valori per campioni prelevati all'interno e all'esterno di ciascuna forma.*



## Tipologia di formaggio

Sono stati fatti confronti a coppie tra i differenti formaggi analizzati e anche un confronto complessivo considerando tutte le tipologie di formaggio insieme.

Nel complesso la concentrazione di ALP appare molto differente tra i formaggi ( $p=0.0001$ ).

La differenza di ALP in questo confronto fra coppie di formaggi (tab.2), appare sempre significativa tranne che in tre abbinamenti: Bra – Castelmagno, Bra – Raschera e Castelmagno – Raschera.

## Caseificio

Alcuni caseifici producono più di una tipologia di formaggio (tabella 2).

*Tab. 2: Tipologie di formaggio analizzate per ciascun caseificio*

<b>CASEIFICIO</b>	<b>TIPOLOGIA FORMAGGIO</b>
1	MURAZZANO
2	MURAZZANO
3	MURAZZANO
4	ROCCAVERANO
5	ROCCAVERANO
6	ROCCAVERANO
7	BRA CASTELMAGNO RASCHERA TOMA
8	BRA CASTELMAGNO RASCHERA TOMA
9	CASTELMAGNO
10	BRA RASCHERA TOMA
11	MURAZZANO
12	TOMA
13	BRA

## Stagionatura

Sono stati analizzati 208 campioni di formaggio fresco (Murazzano e Roccaverano) e 428 di formaggio stagionato (Toma, Bra, Castelmagno, Raschera).

Considerando tutti i valori, senza scindere i campioni in base a porzione interna ed esterna, tipologia di formaggio, stagione di produzione o caseificio produttore, ma suddividendoli soltanto in una macro-categoria in base alla stagionatura, è evidente la differenza tra le due mediane di ALP tra

formaggio “fresco” e “stagionato” (Tab.3). Questo dato può confermare che la variabile “stagionatura” influenza il valore di fosfatasi alcalina in accordo con quanto riportato in bibliografia (Egger et al., 2015).

*Tab. 3: Parametri descrittivi dei valori di fosfatasi per i formaggi freschi e stagionati*

STAGIONATURA	NUMERO CAMPIONI	MEDIA	SD	MEDIANA
FRESCO	208	3.551.200	7.489.767	34.025
STAGIONATO	428	5.481.250	4.021.337	4.355.000

Di seguito vengono descritti i risultati analitici elaborati sulla base di un confronto per dati appaiati.

Il tempo di stagionatura è risultato molto variabile all’interno della stessa tipologia di formaggio in quanto il campionamento non è avvenuto sempre con forme appena svincolate, non sempre disponibili in caseificio. L’analisi della relazione tra il tempo di stagionatura e i valori di fosfatasi alcalina non ha messo in evidenza una relazione di tipo lineare né per i formaggi freschi né per quelli stagionati.

### Stagione di prelievo- Tipologia di Formaggio

I prelievi sono stati effettuati in stagioni diverse nell’arco dell’anno (Inverno, Primavera, Estate, Autunno) (Tab. 4 e 5). I valori di ALP risultano significativamente differenti quando si confrontano campioni prelevati in stagioni diverse (P= 0.0001).

*Tab. 4: Descrizione dei valori di ALP dei formaggi freschi per stagione di prelievo*

<b>FORMAGGI FRESCHI</b>						
STAGIONE	NUMERO CAMPIONI	MEDIA	SD	MEDIANA	MIN	MAX
INVERNO (22 dicembre-20 marzo)	12	272.404	98.210	250.875	152900	471.400
PRIMAVERA (21 marzo - 21 giugno)	60	57.793	37.333	54.275	2.750	198.500
ESTATE (22 giugno-22 settembre)	52	6.799.152	9.693.716	11.200	3.100	33.995.000
AUTUNNO (23 settembre-21 dicembre)	84	4.504.254	8.016.053	8.925	1.550	34.155.000

Tab. 5: Descrizione dei valori di ALP dei formaggi stagionati per stagione di prelievo

<b>FORMAGGI STAGIONATI</b>						
<b>STAGIONE</b>	<b>NUMERO CAMPIONI</b>	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	<b>MEDIANA</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>
INVERNO (22 dicembre-20 marzo)	200	6162825	4738606	4855000	455000	24915000
PRIMAVERA (21 marzo - 21 giugno)	8	10688125	2057984	10965000	7605000	13270000
ESTATE (22 giugno-22 settembre)	72	3458889	1836423	3012500	470000	9280000
AUTUNNO (23 settembre-21 dicembre)	148	5262601	3253689	4680000	95000	16295000

#### Analisi per ogni singola tipologia di formaggio

Confrontando i caseifici, all' interno di ogni tipologia di formaggio risulta esserci una differenza significativa tra le produzioni tranne che nella Robiola di Roccaverano. Infatti, ogni produzione all'interno della stessa categoria di formaggio proviene da diverso caseificio e presenta quindi materia prima differente. Inoltre, sono da considerarsi le differenti stagionature e stagionalità di produzione dei campioni.

Si può ipotizzare che i valori di ALP della Robiola di Roccaverano, data la breve stagionatura, non siano particolarmente condizionati dalla variabilità degli altri fattori (caseificio, stagione) e che quindi questo giustifichi l'omogeneità dei risultati analitici.

#### Intervalli di riferimento

Sono stati calcolati gli intervalli di riferimento dei valori di fosfatasi alcalina per il totale dei campioni analizzati, separatamente per formaggi freschi e stagionati e per tipologia di formaggio. È stato utilizzato un metodo non parametrico per calcolare il 2.5° ed il 97.5° percentile della distribuzione dei valori ottenuti.

1. INTERVALLI DI RIFERIMENTO DELLA FOSFATASI NEL TOTALE DEI CAMPIONI ANALIZZATI

Il dato appare poco significativo in quanto non considera le variabili che possono condizionare i dati.

*Tab.6*

<b>TIPOLOGIA FORMAGGIO</b>	<b>DI</b>	<b>LIMITE INFERIORE</b>	<b>LIMITE SUPERIORE</b>
TOTALE DEI CAMPIONI		3.970	19.784.750

2. INTERVALLI DI RIFERIMENTO DELLA FOSFATASI NELLE SINGOLE TIPOLOGIE DI FORMAGGIO

Relativamente al calcolo di possibili intervalli di riferimento della fosfatasi alcalina nelle singole tipologie di formaggio, si osservano i limiti superiori ed inferiori come indicato in Tabella 7. Nonostante sia un formaggio a pasta molle, il Murazzano presenta come valore massimo del range un valore di ALP superiore a quello degli stagionati. Dato l'elevato tenore in grasso del latte di ovino, e del legame tra fosfatasi alcalina e il grasso presente nel latte crudo, si può ipotizzare che questo limite superiore elevato possa essere influenzato dalla matrice latte ovino.

*Tab.7*

<b>TIPOLOGIA FORMAGGIO</b>	<b>DI</b>	<b>LIMITE INFERIORE</b>	<b>LIMITE SUPERIORE</b>
BRA		1.223.875	12.753.625
CASTELMAGNO		124.500	22.050.750
MURAZZANO		5.021	32.896.625
RASCHERA		893.125	12.318.750
ROCCAVERANO		1.753	364.793
TOMA		1.644.000	16.023.125

### 3. INTERVALLI DI RIFERIMENTO DELLA FOSFATASI NEI FORMAGGI FRESCHI E STAGIONATI

*Tab.8*

<b>TIPOLOGIA FORMAGGIO</b>	<b>DI</b>	<b>LIMITE INFERIORE</b>	<b>LIMITE SUPERIORE</b>
FRESCO		2.361	28.548.125
STAGIONATO		786.250	15.624.500

La tabella 9 mostra gli intervalli di riferimento che si sono ottenuti escludendo dall'elaborazione dei risultati dei formaggi freschi un caseificio di Robiola di Murazzano, che presentava valori di ALP nettamente superiori alla media.

*Tab.9*

<b>TIPOLOGIA FORMAGGIO</b>	<b>DI</b>	<b>LIMITE INFERIORE</b>	<b>LIMITE SUPERIORE</b>
FRESCO		2.282	15.190.875
STAGIONATO		786.250	15.624.500

#### 4. INTERVALLI DI RIFERIMENTO DELLA FOSFATASI NEI FORMAGGI IN BASE ALLE TIPOLOGIE DI STAGIONATURA

La classificazione dei formaggi in base alla tipologia di stagionatura, e la conseguente tipologia della pasta, permette di stabilire tre range nei quali far ricadere i valori di fosfatasi alcalina nei formaggi (Tab.10). L' intervallo è espresso per un livello di confidenza del 95%.

Ai fini di un utilizzo in routine per la valutazione della ALP nei formaggi, si propongono quindi i seguenti intervalli di riferimento

*Tab.10*

<b>TIPO STAGIONATURA</b>	<b>TIPOLOGIA FORMAGGIO</b>	<b>DI</b>	<b>LIMITE INFERIORE</b>	<b>LIMITE SUPERIORE</b>
PASTA MOLLE	Roccamare DOP Murazzano DOP		2.361	28.548.125
SEMIDURA	Raschera DOP Toma DOP		498.375	15.916.500
DURA	Castelmagno DOP Bra Duro DOP		1.223.875	12.753.625

I risultati ottenuti possono essere quindi utilizzati per la costruzione di piani di controllo ufficiale, per il contrasto alle frodi e al mascheramento di condizioni igieniche di lavorazione non ottimali. Inoltre, questo lavoro offre indicazioni e punti di riflessione utili per i caseifici, che possono così valutare quanto presente nei disciplinari ed intervenire al fine di migliorare le loro produzioni.