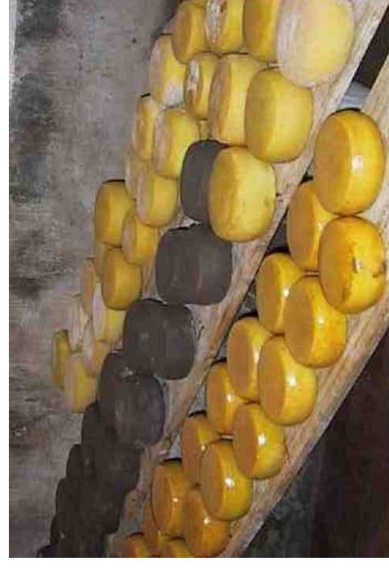


# **Limite di conformità della fosfatasi alcalina nel latte ovino e caprino: risultati preliminari della Ricerca Corrente LT06/16**

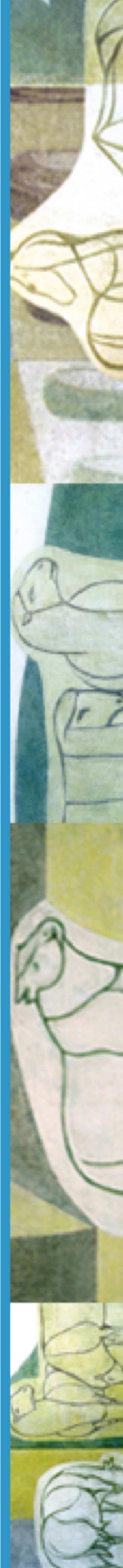


11 ottobre 2018 IZSLT- Roma



La **pastorizzazione** è ottenuta mediante un trattamento comportante:

- una temperatura elevata durante un breve periodo:  
almeno 72°C per 15 secondi;
- una temperatura moderata durante un lungo periodo  
almeno 63°C per 30 minuti;
- ogni altra combinazione tempo-temperatura che permetta di ottenere un effetto equivalente, di modo che i prodotti diano, se del caso, una **reazione negativa al test di fosfatasi alcalina** immediatamente dopo aver subito tale trattamento



## DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA FOSFATASI ALCALINA

Per la determinazione dell'attività della fosfatasi alcalina è applicata come metodo di riferimento la norma ISO 11816-1

L'attività di fosfatasi alcalina è espressa in milliunità di attività enzimatica per litro (mU/l). Un'unità di attività della fosfatasi alcalina corrisponde alla quantità di enzima fosfatasi alcalina che catalizza la trasformazione di 1 micromole di substrato al minuto.



# DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA FOSFATASI ALCALINA

Il risultato del test della fosfatasi alcalina è considerato negativo se l'attività misurata nel latte vaccino non è superiore a 350 mU/l.

L'impiego di metodi analitici alternativi è accettabile qualora i metodi siano convalidati in base al metodo di riferimento di cui al punto 1, conformemente ai protocolli approvati a livello internazionale.»





# METODO DI RIFERIMENTO: norma ISO 11816-1

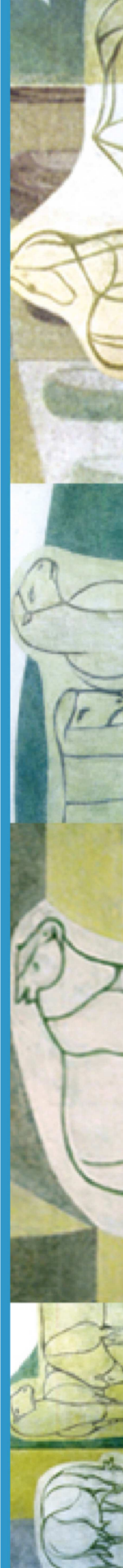
## Determination of alkaline phosphatase activity Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks



**350 mU/L**

è il limite fissato per il latte bovino pastorizzato dal  
**Regolamento (CE) n. 1664/2006** della Commissione, che  
modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005

**NON E' PRESENTE UN LIMITE LEGISLATIVO PER IL LATTE  
DELLE ALTRE SPECIE  
(e nemmeno per il formaggio)**



- La fosfatasi alcalina è un enzima presente nei tessuti dei mammiferi e nel latte crudo
- è una fosfomonoesterasi che idrolizza gli esteri fosforici in ambiente basico (max della attività a pH 9,4)
- È una metallo glicoproteina che ha bisogno dello Zinco e del Magnesio per svolgere al massimo la sua attività
- Approssimativamente il 30-40% del suo contenuto è presente nella membrana del globulo di grasso
- Nel latte scremato si trova legata alle lipoproteine
- La temperatura di conservazione del latte pastorizzato superiore a 30°C può determinare la **riattivazione della fosfatasi alcalina**



## Fosfatasi microbica:

### Tipo I

si inattiva a temperatura di pastorizzazione

### Tipo II NON si inattiva a temperatura di pastorizzazione

La struttura della fosfatasi microbica è simile a quella bovina.

I metodi oggi disponibili non distinguono tra le due forme di fosfatasi.



Il metodo prevede una pastorizzazione eseguita in laboratorio per comprendere se un valore elevato di fosfatasi in latte pastorizzato sia determinato dalla presenza di fosfatasi microbica resistente.

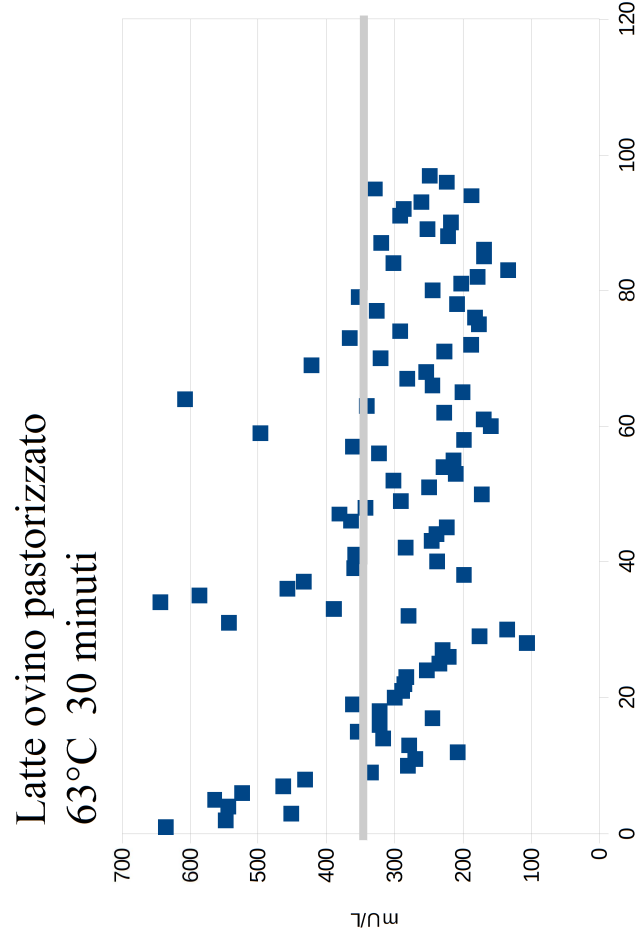




## Latte crudo (dati CReLDOC)

Media latte ovino: 3.670.000 mU/L

Media latte caprino: 253.000 mU/L



Campioni di latte pastorizzato individuali di

**capra:** media

Sarde  $371,76 \pm 339,16$

Saanen  $47,39 \pm 29,62$

(Scintu M.F. et al. 1998)

Campioni di latte di massa pastorizzato di

**pecora:** media

459  $\pm$  124 480  $\pm$  148

492  $\pm$  121 534  $\pm$  87

384  $\pm$  47

(Scintu M.F. et al. 2001)



## **Progetto di ricerca corrente 2016:**

**ATTIVITA' DELLA FOSFATASI ALCALINA  
NEL LATTE DI PECORA, CAPRA E BUFALA  
IN RELAZIONE AL TRATTAMENTO TERMICO DI PASTORIZZAZIONE:  
STUDIO SPERIMENTALE  
PER UN LIMITE DI CONFORMITA'**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana “M. Aleandri” –  
( Sede di Roma – Sez. Latina – Sez. Grosseto )  
**Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati degli Ovini e dei  
Caprini**

Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell’Emilia – Sede di Brescia –  
**Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte Bovino**

Istituto Zooprofilattico de Mezzogiorno – Sezione Diagnostica di Salerno –  
**Centro di Referenza Nazionale sull’igiene e le tecnologie dell’allevamento e delle produzioni  
bufaline**

Istituto Superiore della Sanità –  
**Laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte**



## **ATTIVITA'PREVISTE**

Determinazione dell'ALP  
nel latte crudo durante l'arco della lattazione  
(allevamenti diversi e diverse razze) –

Latte di massa aziendale

-Latte raccolto al caseificio

Prove di pastorizzazione in laboratorio  
Formaggi a latte crudo e pastorizzato





## ATTIVITA'

Confronto con pastorizzazioni industriali

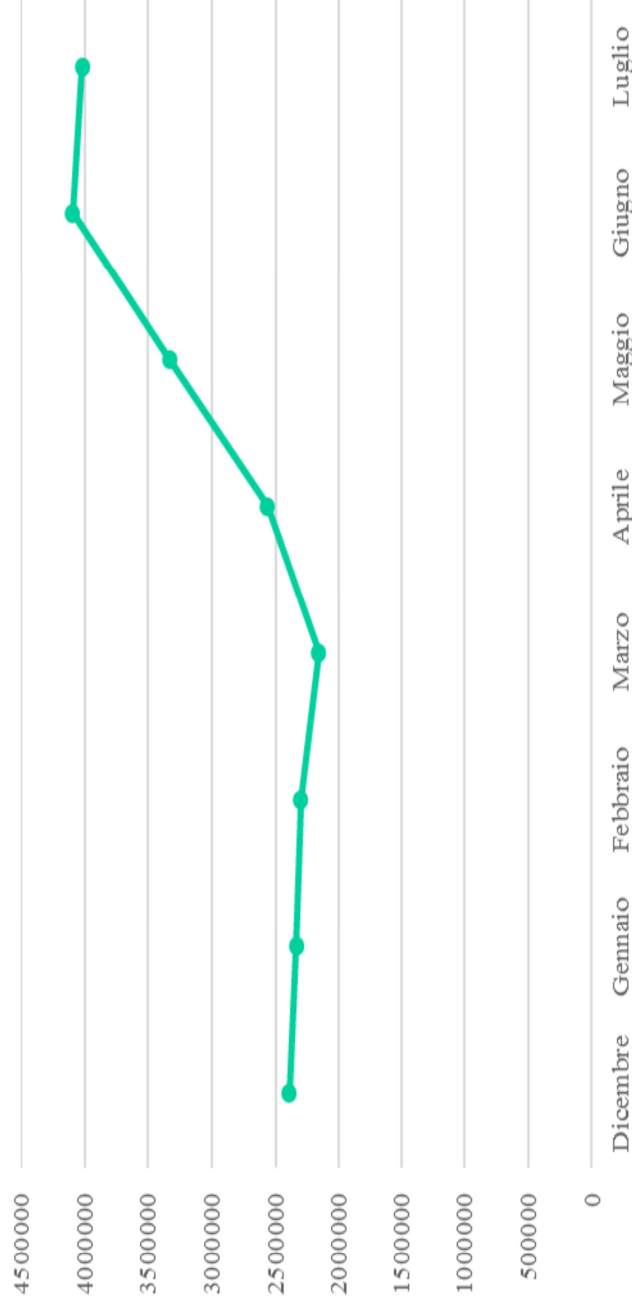
Determinazione della fosfatasi alcalina su  
campioni scremati (differenza con latte intero)

Cinetica di inattivazione durante il trattamento  
termico

- Prove per valutare l'eventuale riattivazione



## Fosfatasi alcalina Latte ovino crudo



## Latte crudo

Media  $2.856.000 \pm 1.128.000$  mU/L

## Latte pastorizzato

Media  $246 \pm 54$  mU/L



# Latte di CAPRA

## Latte crudo

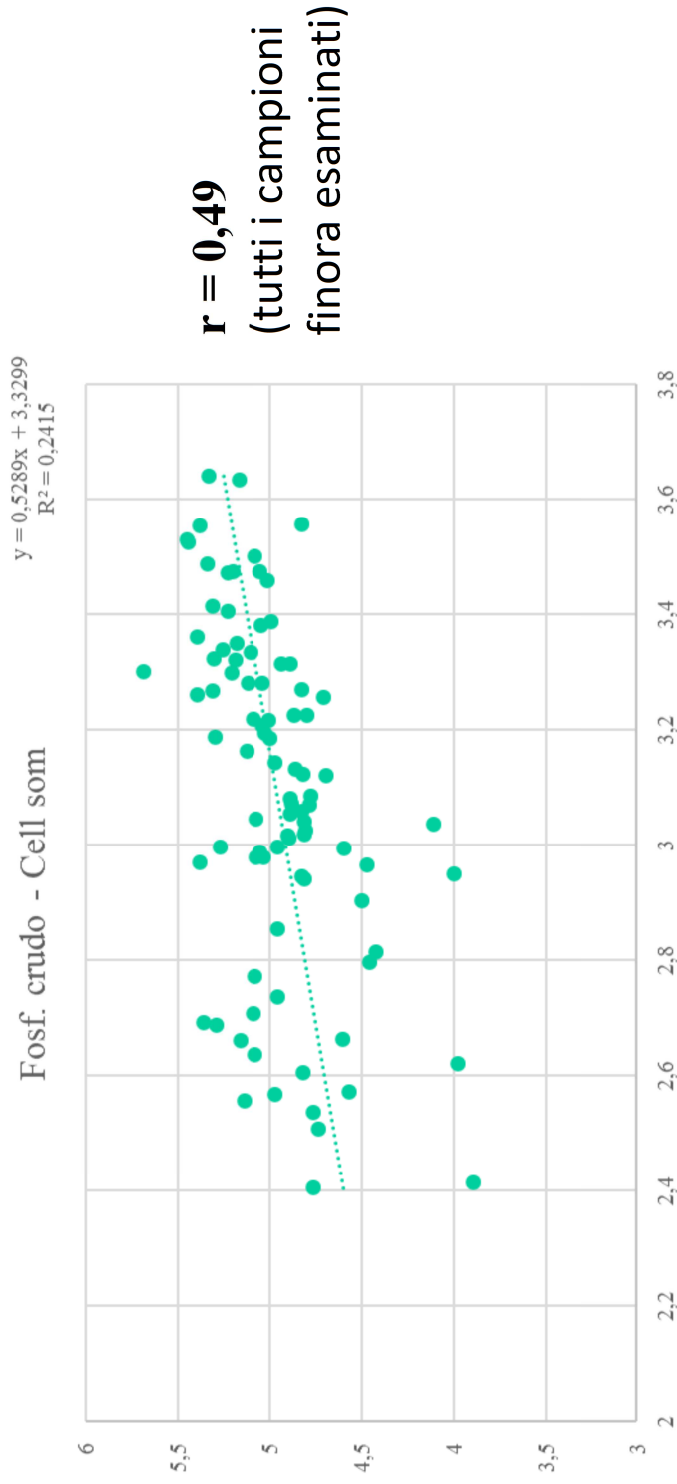
Media  $123.000 \pm 94.000 \text{ mU/L}$

## Latte pastorizzato

Media  $94 \pm 57 \text{ mU/L}$



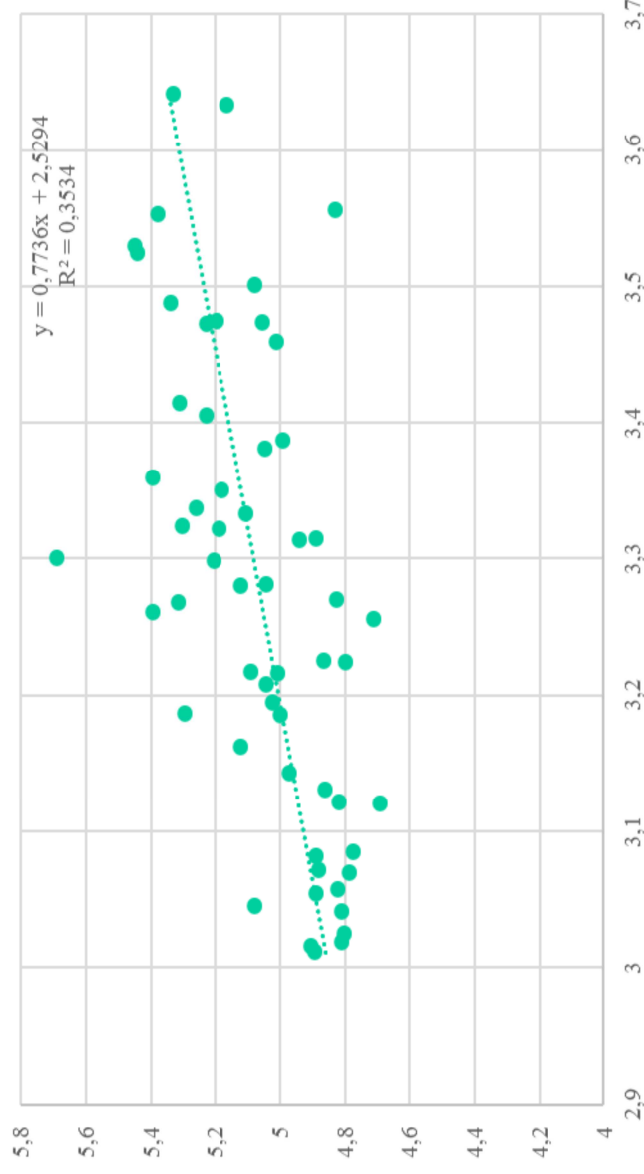
# Latte di CAPRA





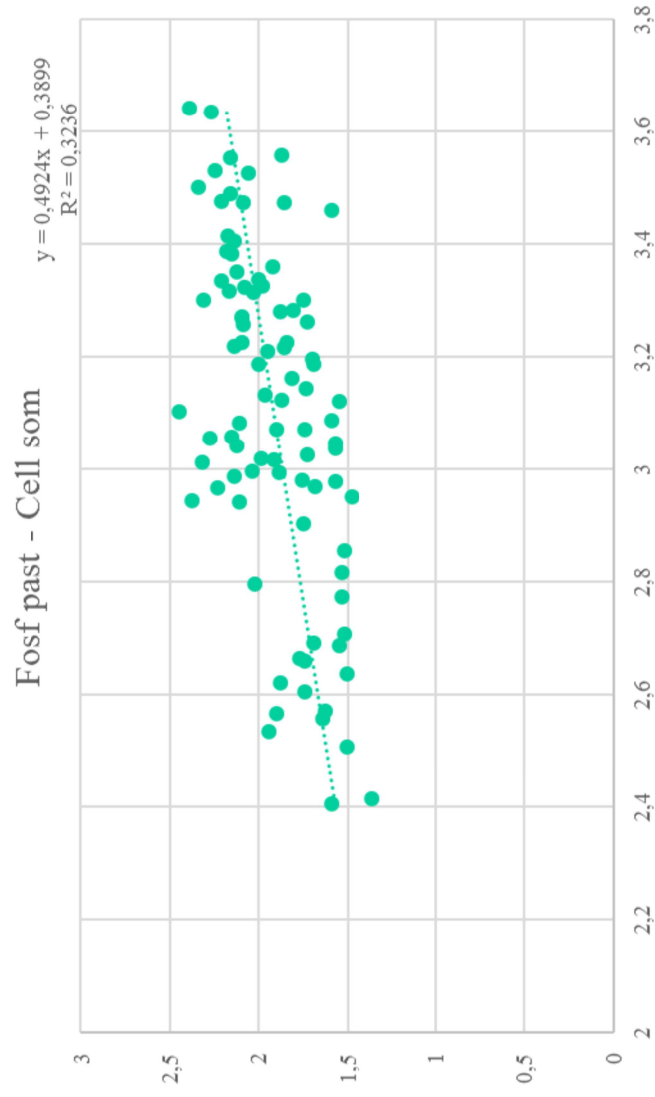
# Latte di CAPRA

FOSF crudo - Cell som



$r = 0,59$   
(Campioni con  
CS > 1,000,000 cell/ml)

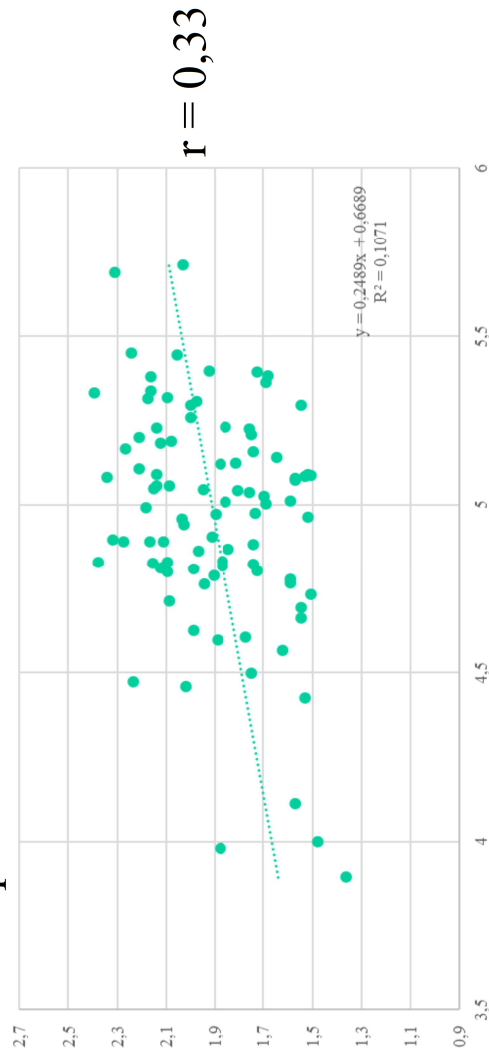




$r = 0,57$

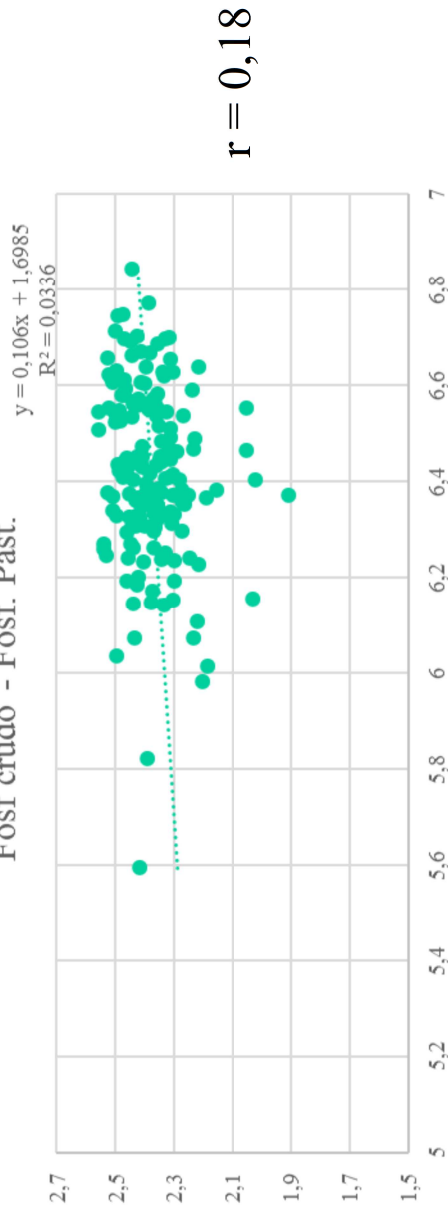


## Caprini Fosf crudo - Fosf pastorizzato



## OVINI

### Fosf crudo - Fosf. Past.



VARIABILITA' DELLA FOSFATASI  
FORMAGGI

A latte pastorizzato

A latte crudo

Per le diverse specie produttori di latte

Stagionatura

Tecnologia casearia

Riattivazione

Zona di prelievo per analisi





Lotti E. et al  
Alkaline phosphatase activity  
in cheese as a tracer for  
cheese milk  
Food Science and Technology  
2016

Pastorizzati: 3 mU/g  
Termizzati : 532 mU/g  
Crudi : 2650 mU/g

**Table 1**  
Compiled results of ALP activities measured in typical cheeses mainly from France, Italy and Switzerland. SD = Standard deviation, N = number of cheeses analyzed in duplicate. Values written in gray color: analysis of single cheese samples in duplicate (N = 1).

Cheese Type	Country	Preserved		Thawed		Raw		
		Age (m/d)	N	Age (m/d)	N	Age (m/d)	N	
Soft Cheeses	Brie	CH	2	1	49	40	3	1813
	Cassoulet	FR	2	1	57	40	3	585
	Camembert	FR	2	1	57	40	3	585
	Coulommiers	FR	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Hard Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585
	Grana Padano	IT	2	1	57	40	3	585
	Parigiano Reggiano	IT	2	1	57	40	3	585
	Stilton	GB	2	1	57	40	3	585
Specialty Cheeses	Cheddar	CH	2	1	57	40	3	585
	Emmentaler	CH	2	1	57	40	3	585

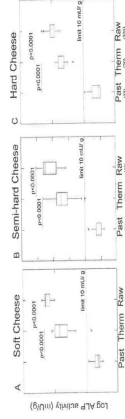


Fig. 3. ALP activities of different cheese types produced with either raw, thermized or pasteurized milk. Whisker plots of ALP activities (log mU/g) measured in Soft, Semi-hard and Hard Cheeses made either from pasteurized (Past), thermized (Therm) and raw milk, respectively. box plots show median, 25th and 75th percentiles. Asterisks indicate the differences between the groups. All three groups are different ( $P < 0.0001$ ). Figures in brackets indicate the number of samples. The asterisks represent values outside the inner fence ( $>1.5$  times outside the inner fence). The number of samples for each group is indicated. The asterisks represent values outside the inner fence ( $>1.5$  times outside the inner fence). The number of samples for each group is indicated. The asterisks represent values outside the inner fence ( $>1.5$  times outside the inner fence). The number of samples for each group is indicated.



Lotti E. et al  
Alkaline phosphatase activity  
in cheese as a tracer for  
cheese milk  
Food Science and Technology  
2016

Importante è anche  
il sito di prelievo  
dalla forma di  
formaggio.

L. Egger et al. / LWT - Food Science and Technology 95 (2018) 983–988

985

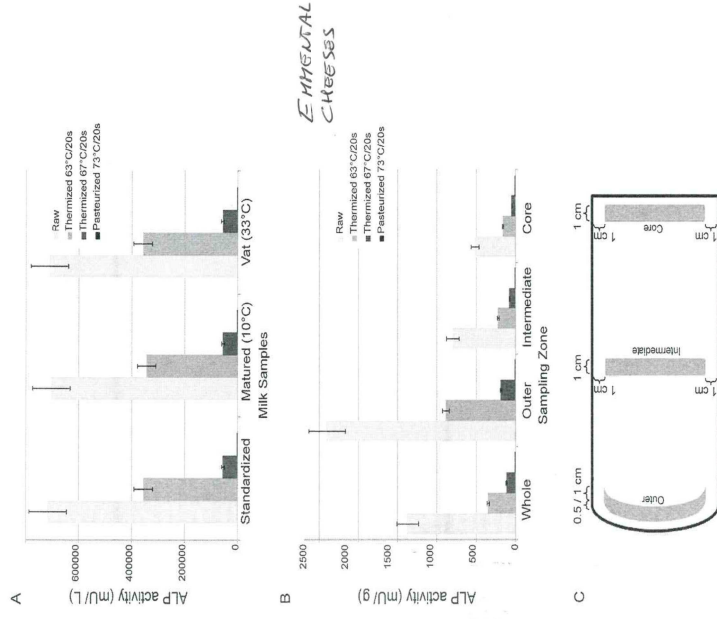
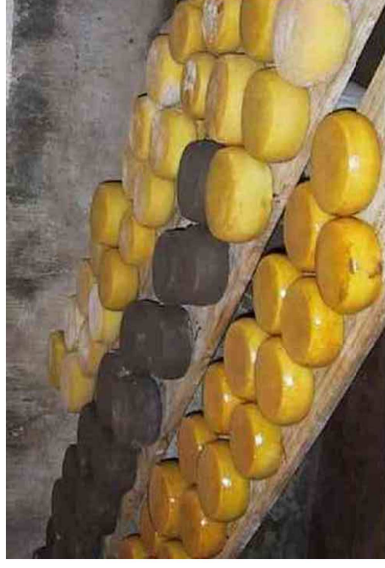


Fig. 1. ALP activity of milk after different heat treatments and of the derived Emmental cheese. ALP activity of cheese milk following different heat treatments and taken at different sampling zones of Emmental cheese. ALP activity of cheese milk following different heat treatments and taken at different sampling zones of Emmental cheese. ALP activity of cheese milk following different heat treatments and taken at different sampling zones of Emmental cheese. ALP activity of cheese milk following different heat treatments and taken at different sampling zones of Emmental cheese.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



# GRAZIE DELL'ATTENZIONE



Centro di Riferenza Nazionale  
per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati  
degli Ovini e dei Caprini

[creldoc@izslt.it](mailto:creldoc@izslt.it)

