

## **Allegati.**

### **1, a) Linee guida per la preparazione di un lattoinnesto naturale termofilo.**

- 1) Utilizzare latte proveniente da animali in perfetta salute, secondo i requisiti di legge e preparare lo starter senza raffreddare il latte. Gli strumenti per la conservazione del latte devono essere puliti e disinfettati
- 2) Termizzare il latte 62 °C per 10 minuti per ridurre la presenza di batteri antagonisti (patogeni o anticaseari). Raffreddare immediatamente il latte termizzato per evitare di danneggiare il microbiota caseario.
- 3) Incubare (stufa, thermos, bagnomaria) il latte così trattato a 44-45 °C per 7-8 ore, fino a quando si verifica una coagulazione naturale dello stesso. Se possibile misurare il valore di pH che deve essere pari a 4,3-4,8. Nel caso si utilizzi un bagnomaria è indispensabile che tutto il latte presente nel contenitore rimanga al di sotto del livello dell'acqua nel bagnomaria. Per questo processo utilizzare contenitori che trasmettano bene il calore.
- 4) La termizzazione e l'incubazione selezionano una popolazione microbica composta principalmente (ma non solo) da ceppi di *Streptococcus thermophilus*.
- 5) Il lattoinnesto così preparato può essere conservato a 4 °C per tre giorni al massimo. Può essere conservato per congelamento, ma deve essere utilizzato entro dieci settimane.
- 6) Il lattoinnesto può essere utilizzato per produrre ulteriore lattoinnesto incubando a 44-45 °C per circa 3 ore del latte UHT o bollito inoculato all'1% (v/v) con il lattoinnesto preparato come descritto nei punti 1-5 precedenti. La coltura ottenuta può essere conservata in un contenitore pulito a 4 °C per 3 giorni al massimo.

### **1b) Protocollo per l'utilizzo dei lattoinnesti congelati Mifisso preparati da CNR ISPA a partire dai ceppi liofilizzati per la preparazione di un lattoinnesto autoctono termofilo**

- 1) Scongellare a temperatura ambiente il lattoinnesto contenuto nella provetta.
- 2) Trasferire l'intero contenuto della provetta in 1 litro di latte UHT scremato.
- 3) Incubare (per le modalità vedi punto 3 precedente) il latte UHT inoculato a 39-40 °C per 7-8 h fino al comparire dei primi flocculi che indicano l'inizio della coagulazione del latte.
- 4) Al termine dell'incubazione misurare il valore di pH che deve essere pari a 4,3-4,8. Verificare la presenza di flocculi/coagulo nel latte.
- 5) Il lattoinnesto ottenuto può essere conservato in un contenitore pulito a 4 °C per 3 giorni al massimo.