

**FONDO EUROPEO AGRICOLO PER LO SVILUPPO RURALE  
L'EUROPA INVESTE NELLE ZONE RURALI**

Evento finanziato dal Reg. CE 1698/2005 e ss.mm. e ii.  
Piano di Sviluppo Rurale 2007/2013 del Lazio  
Misura 124 "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e  
tecnologie, nel settore agricolo, alimentare e forestale".

DIREZIONE REGIONALE AGRICOLTURA E SVILUPPO RURALE, CACCIA E PESCA

**SVILUPPO DI UN PROTOTIPO  
PER L'INDIVIDUAZIONE DELLA MATERIA PRIMA UTILIZZATA  
NELLA PRODUZIONE DELLA MOZZARELLA DI BUFALA**

ASSOCIAZIONE TEMPORANEA DI SCOPO tra

- Società Cooperativa Agricola Circe (capofila)
- Società semplice Agricola Circe
- Centro di ricerca Produzione delle Carni e Miglioramento Genetico  
del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA PCM)

AGOSTO 2015



## **1. Creazione del prototipo**

Il metodo utilizzato si avvale della spettrofotometria NIR a trasmittanza, che analizza le caratteristiche interne degli alimenti. Durante l'acquisizione dei dati in trasmittanza viene misurata l'intensità della luce trasmessa attraverso il campione rispetto all'intensità della luce incidente. Le misure in trasmittanza permettono di ottenere informazioni su tutto il volume della sostanza attraversata dalla luce, al contrario delle misure in riflettanza, che acquisiscono informazioni relative soltanto alla superficie del campione. È un metodo semplice da utilizzare (l'analisi del campione è diretta, senza diluizioni o dispersione in matrici inerti), non distruttivo e innocuo per l'ambiente. La tecnologia consiste nell'illuminare il prodotto in oggetto con un fascio di luce di lunghezza d'onda compresa tra 400 e 1100 nm ed esaminare lo spettro di luce residua dopo che questa ha attraversato il prodotto. La luce bianca che esce dal prodotto viene convogliata da un sensore a fibra ottica e arriva ad un reticolo di diffrazione. Gli spettri che si formano vengono correlati con i valori di caratteristiche note del prodotto creando, mediante algoritmi, delle calibrazioni che ci permettono di ottenere dei valori di predizione in grado di classificare il prodotto in oggetto.

Lo strumento NIR CASE, affidato al in comodato gratuito dalla ditta SACMI, è stato modificato a partire dallo strumento esistente utilizzato per l'analisi dei prodotti vegetali. Sono state apportate le seguenti modifiche strutturali: messa a punto di un nuovo sistema di riferimento per il bianco e il nero; creazione di coni speciali per mozzarelle di diverse dimensioni; inserimento di un copri campione per la schermatura della luce. Il prototipo è stato creato dalla ditta SACMI in stretta collaborazione con il Centro di ricerca per la Produzione delle Carni e il Miglioramento genetico del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA PCM), che ha trasferito le proprie esperienze in merito all'analisi della mozzarella.

## **2. Formazione del personale**

La formazione del personale per l'utilizzo dello strumento NIR CASE, a causa della scarsa disponibilità di tempo per ottemperare a tutte le attività previste dal progetto, è stata effettuata mediante collegamento in videoconferenza tra il CREA PCM e la SACMI. La formazione ha riguardato:

la procedura operativa di installazione del nuovo *software*;

l'autenticazione del *software*;

l'acquisizione del test di *reference*;  
il trattamento dello specifico del campione mozzarella;  
l'acquisizione degli spettri;  
il salvataggio ed e trasferimento dei *files* su *software* NIR;  
l'abbinamento dei valori di predizione con i valori reali;  
la rappresentazione grafica della regressione valori predittivi/valori reali (grafico a dispersione);  
la creazione e l'aggiornamento delle calibrazioni;  
il salvataggio della calibrazione aggiornata sullo strumento NIR CASE.

Per la ricerca, la valutazione e lo sviluppo di algoritmi per il prodotto mozzarella, il personale della ricerca del CREA PCM ha lavorato in stretto contatto con gli esperti statistici della SACMI. Il risultato di questa attività è stato lo sviluppo di algoritmi specifici e la creazione di una curva di calibrazione per l'analisi della mozzarella.

### **3. Prove preliminari sperimentali e analisi dei campioni al NIR CASE**

Tutte le lavorazioni delle prove preliminari e di quelle sperimentali sono state effettuate presso il caseificio della Società Cooperativa Agricola Circe, ubicato a Pontinia (LT). Per la produzione dei campioni di mozzarella, le operazioni di filatura e di formatura sono state eseguite manualmente, e, dopo raffreddamento in acqua, è stata effettuata la salatura in salamoia. Infine le mozzarelle sono state confezionate singolarmente in contenitori di plastica con liquido di governo e sottoposti a refrigerazione.

Dopo il raffreddamento, i campioni di mozzarella sono stati trasportati al laboratorio del CREA PCM, localizzato a Monterotondo (RM), refrigerati e analizzati al prototipo NIR CASE.

Durante la prova preliminare sono stati prodotti i primi campioni di mozzarella da cagliata e latte congelati allo scopo di testare il prototipo, le modalità di acquisizione dei dati e le curve di calibrazione create *ad hoc*.

Durante l'unica replica effettuata nella fase preliminare sono stati prodotti i campioni sperimentali di mozzarella contenenti percentuali crescenti di cagliata e latte congelati, come illustrato nella tabella 1, di seguito riportata. Campioni prodotti con la cagliata congelata: 7 gruppi di mozzarelle rispettivamente con 0, 10, 20, 30, 40, 60 e 100% di cagliata congelata. Campioni prodotti con latte congelato: 2 gruppi di mozzarelle rispettivamente con 50 e 100% di latte congelato; i campioni con 0% di latte congelato sono gli stessi prodotti per il gruppo 0% cagliata congelata. In totale, per ogni replica, sono stati prodotti 112 campioni da 125 g per un peso di 14 kg di mozzarelle. La

produzione di un elevato numero di campioni per ciascuna “tesi” è dovuta all’elevata variabilità della mozzarella prodotta.

In allegato sono riportati i rapporti di prova delle analisi effettuate sui campioni provenienti da tutte le prove effettuate.

Tabella 1. Schema dei campioni di mozzarella prodotti in ciascuna replica da cagliata e latte congelati

gruppi campioni % cagliata congelata	% cagliata congelata	n. campioni mozzarella e cagliata congelata	peso (kg) campioni mozzarella e 125 g	gruppi campioni % latte congelato	% latte congelato	n. campioni mozzarella e latte congelato	peso (kg) campioni mozzarelle 125 g	n. campioni totali mozzarelle	peso totale mozzarella e 125 g (kg)
1	0	16	2	1	50	12	1,5	28	3,5
2	10	12	1,5	2	100	12	1,5	24	3
3	20	12	1,5					12	1,5
4	30	12	1,5					12	1,5
5	40	12	1,5					12	1,5
6	60	12	1,5					12	1,5
7	100	12	1,5					12	1,5
<b>totale</b>		<b>88</b>	<b>11</b>		<b>150</b>	<b>24</b>	<b>3</b>	<b>112</b>	<b>14</b>

Ciascun campione di mozzarella, come riportato nella tabella 2, è stato analizzato, rispettivamente, il giorno successivo alla produzione e dopo 5 giorni. Le analisi sono state effettuate a temperatura refrigerata (5-8°C) e a temperatura ambiente (15-18°C). Inoltre per ogni campione sono state effettuate tre analisi per ciascun lato.

Tabella 2. Metodo di analisi dei campioni di mozzarelle

giorni dalla produzione	temperatura del campione (°C)	n. analisi per lato campione
1	5-8	3
	15-18	3
5	5-8	3
	15-18	3

#### **4. Produzione di campioni sperimentali, analisi dei campioni al NIR CASE e creazione delle curve di calibrazione**

Durante le prove sperimentali sono state effettuate 12 lavorazioni/repliche per la creazione delle curve di calibrazione e 3 repliche per l'aggiornamento delle curve di calibrazione, che, sommate alla replica della fase preliminare, fanno in totale 16 repliche (tabella 3). Gli schemi seguiti per la produzione dei campioni sperimentali e per la loro analisi sono gli stessi illustrati per la fase preliminare e riportati, rispettivamente, nelle tabella 1 e 2.

Tabella 3. Numero delle repliche effettuate per la produzione dei campioni di mozzarella da analizzare

attività	repliche (n.)	campioni mozzarelle 125 g prodotte da cagliata/latte congelati (n.)
produzione campioni sperimentali per <b>prove preliminari</b>	1	112
produzione campioni sperimentali per <b>creazione curve calibrazione</b>	2, 3, 4	336
	5, 6, 7	336
	8, 9	224
	10, 11	224
	12, 13	224
produzione di campioni sperimentali per <b>aggiornamento curve calibrazione</b>	14, 15	224
	16	112
<b>totale</b>	<b>16</b>	<b>1792</b>

Dopo l'analisi del campione, i *files* sono stati salvati e trasferiti per l'elaborazione dei dati. I valori di predizione dei campioni, vale a dire i dati forniti dallo strumento, sono stati associati con i valori reali, corrispondenti al contenuto di cagliata/latte congelati di ciascun campione. La regressione ottenuta tra i valori di predizione e quelli reali è stata rappresentata tramite un grafico a dispersione. Gli indici della retta di regressione, l'errore standard di predizione (SEP), il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) e il BIAS ci hanno permesso di valutare l'accuratezza della nostra analisi, vale a dire il grado di corrispondenza del dato di predizione con il dato reale. In base a questi risultati, dalla curva di calibrazione *standard* dell'apparecchio NIR sono state create le calibrazioni dedicate per la mozzarella di bufala, specifiche per ogni modalità di analisi effettuata (temperatura del campione, giorni dalla lavorazione). Le calibrazioni sono quindi state aggiornate con i dati ottenuti ed elaborati nel corso delle prove sperimentali.

## 5. Elaborazione statistica

L'analisi statistica dei dati ha lo scopo di mettere in luce se il modello risente della variabilità del campione di mozzarella.

### 5.1. Analisi statistica dei dati acquisiti nella fase preliminare mediante i pattern in dotazione del NIR CASE

La calibrazione *standard* dello spettrofotometro NIR CASE è stata creata per la predizione delle caratteristiche della frutta, che si avvale dei risultati delle analisi chimiche. Tuttavia lo strumento può essere utilizzato anche per altre applicazioni e per quantificare parametri qualitativi più complessi. In questo caso, campioni di mozzarella prodotta sperimentalmente con quantità note di latte/cagliata congelati sono stati analizzati per la creazione di una curva di calibrazione da utilizzare per la predizione del tipo/quantità di materia prima utilizzata. I valori di predizione, in grado di classificare il prodotto analizzato, si ottengono dalla correlazione degli spettri con i valori reali di percentuale di cagliata/latte congelati del prodotto.

Per l'analisi dei primi campioni sperimentali sono stati utilizzati i *pattern* (algoritmi di analisi dati) in dotazione dello strumento NIR CASE. Lo sviluppo del software specifico di calibrazione prevede l'individuazione di diversi *pattern*. Le modalità operative proprie dello strumento prevedono infatti lo sviluppo di diversi *pattern* da individuare in base alla specifica applicazione.

Prima di elaborare i dati del presente progetto, sono stati acquisiti ed elaborati alcuni dati del 2014, provenienti da campioni prodotti in un altro caseificio con le stesse caratteristiche di quelli previsti per il presente progetto. Nel primo caseificio (2014) le condizioni ambientali, le attrezzature e le tecniche utilizzate differivano da quelle del caseificio dove si sono svolte le prove sperimentali del progetto (2015). Le differenze osservate sono da ricondurre alla fisiologica variabilità degli stabilimenti di produzione (caratteristiche del latte trasformato, dimensioni e capacità lavorativa degli impianti, meccanizzazione di alcune fasi del processo).

Con i dati acquisiti nel 2014 sono stati individuati 3 possibili algoritmi indicati con i seguenti nomi:

1. Mozzarelle\_4.ptn
2. Mozzarelle\_3.ptn
3. Mozzarelle\_3\_1.ptn

Per ciascun *pattern* sviluppato è stata creata una calibrazione (modello matematico) utilizzando i dati della replica effettuata nelle prove preliminari (replica 1) del presente progetto. I modelli sono stati validati su rimanenti dati (non inseriti nel modello). Il *pattern* più performante è risultato essere Mozzarelle\_4.ptn".

Nella figura 1 è riportato il grafico a dispersione di una delle calibrazioni sviluppate dai *pattern* ottenuti con i dati della replica 1 del 2015 e validato sui dati dei campioni prodotti nella replica 2 del 2014.

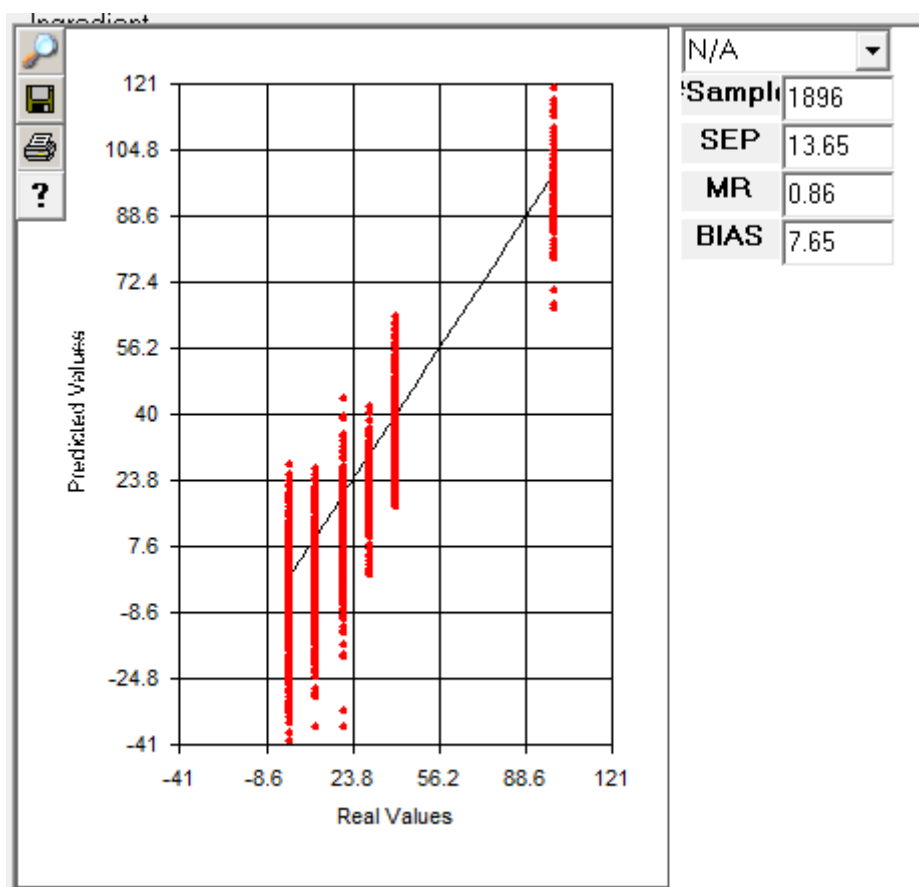


Figura 1. Validazione della calibrazione dei dati della replica 1 del 2015 sulla replica 2 del 2014

Come si nota nella figura 1, i valori dei dati di predizione ottenuti hanno una dispersione troppo elevata che rende difficile una corretta individuazione dei gruppi di campioni di mozzarella con diverso contenuto di cagliata e latte congelati. Durante la produzione dei campioni sperimentali viene applicata una procedura seguendo la quale la percentuale di cagliata mediamente presente in ogni mozzarella dovrebbe essere precisamente quella stabilita, ad esempio 10, 20, 30 %. Tuttavia trattasi di una procedura, per la quale bisogna tenere in debito conto che, in ogni singolo campione di mozzarella, la percentuale di cagliata congelata (o di cagliata ottenuta da latte congelato) può subire delle variazioni. Allo scopo di ridurre la deviazione dalla media dei dati dei singoli campioni, è stato utilizzato un algoritmo di media mobile come riportato di seguito:



## **MEDIE MOBILI SEMPLICI DI ORDINE K (A K TERMINI)**

$$mm(k)_t = \frac{1}{K} \sum_{i=0}^{K-1} x_{t-i}$$

Per avere un risultato più affidabile è necessario eseguire la misura su più campioni di mozzarella e mediane il valore.

Nella figura 2 sono rappresentati i risultati della validazione dell'utilizzo dell'algoritmo di media mobile dei dati della replica 1 del 2015 sulla replica 2 del 2014. Il valore medio è stato ottenuto dai dati di 10 campioni di mozzarelle (6 misure per ciascun campione).

La retta di regressione (colore verde) dei valori di predizione si discosta da quella (colore rosso) dei valori reali (% di cagliata congelata nei campioni) ed ha, rispettivamente -9,1657 e 1,0598 di *bias* e *slope*. I valori di  $R^2$  (Mr nella figura) e dell'errore standard sono, rispettivamente, 9,44 e 0,92. Gli indicatori utilizzati per valutare le *performance* della calibrazione (Malley et al., 2005) sono RPD (rapporto tra la deviazione standard e l'errore standard) e RER (rapporto tra la deviazione standard e il *range*). Nella tabella 4 è riportata la classifica dei valori di questi indicatori. In questo caso i valori di RPD e RER, rispettivamente, 2,51 e 10,48, attestano che la calibrazione, ottenuta con i dati della replica 1 validati sui dati di campioni della replica 2 del 2014, è *moderately successful*. Come si può osservare nella figura 2, la minore dispersione intorno alla media è stata ottenuta con i dati dei campioni contenenti il 30% di cagliata congelata.

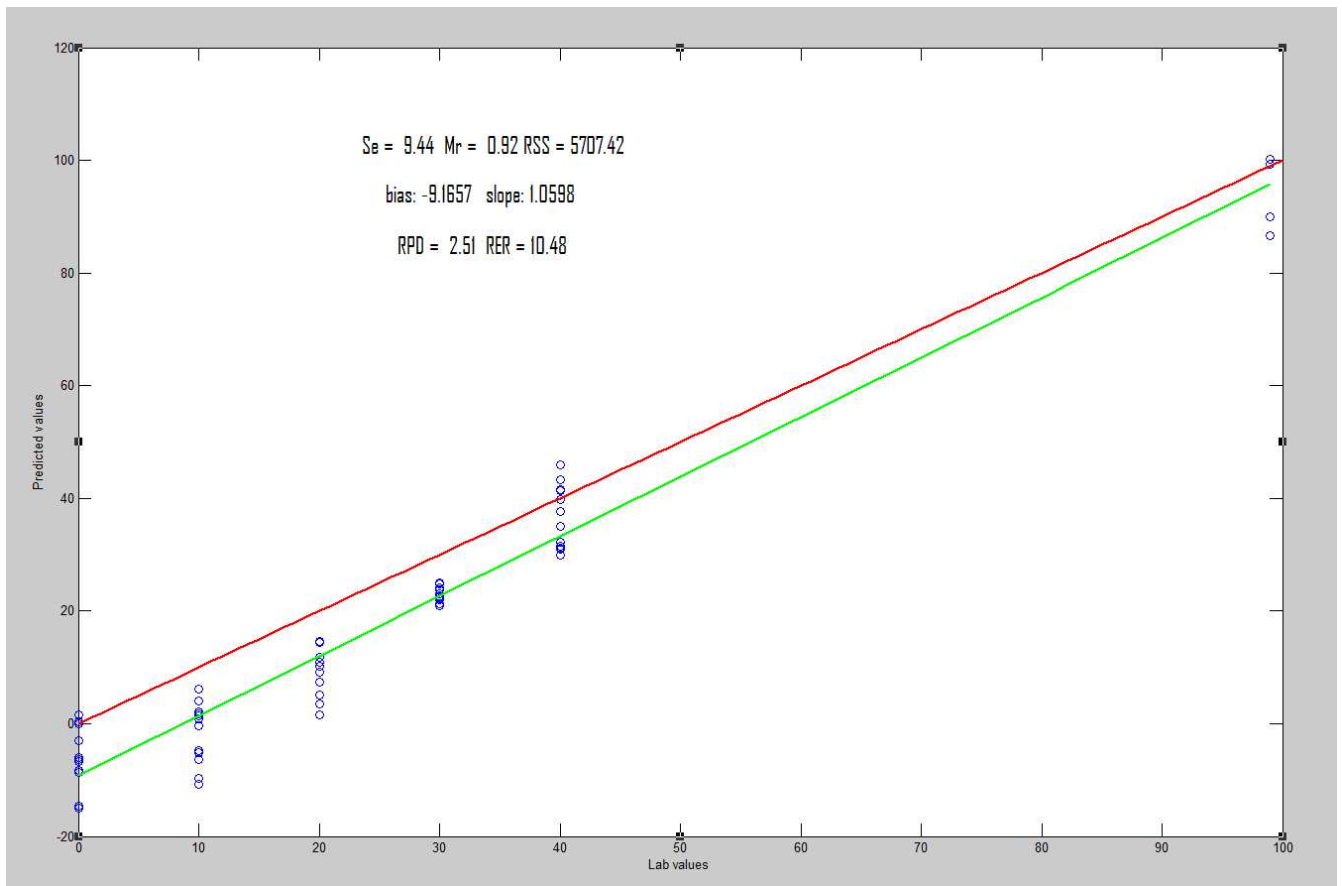


Figura 2. Validazione dell' algoritmo di media mobile delle predizioni dei dati della replica 1 del 2015 sulla replica 2 del 2014

**Table 2.** Calibration performance criteria according to Malley [23].

Degree of calibration success	$R^2$	RPD	RER
Excellent	>0.95	>4	>20
Successful	0.90–0.95	3–4	15–20
Moderately successful	0.80–0.90	2.25–3	10–15
Moderately useful	0.70–0.80	1.75–2.25	8–10

Tabella 4. Criteri di *performance* delle calibrazioni secondo Malley et al. (2005)

## 5.2. Analisi statistica dei dati mediante creazione di nuove calibrazioni

Per l'elaborazione statistica dei dati acquisiti sui campioni sperimentali sono state create e validate calibrazioni *ad hoc* utilizzando nuovi algoritmi dedicati (specifici) per la mozzarella di bufala, che si differenziano da quelli di base in dotazione del NIR CASE.

### 5.2.1. Calibrazione creata sui dati del 2014 e validata sui dati del 2014 – Algoritmo\_1\_cagliata congelata

Nella figura 3 viene riportato il grafico relativo alla validazione della calibrazione creata sui dati del 2014 (repliche 1, 2, 3 e 4) e validata sui rimanenti dati indipendenti del 2014 (repliche 5, 6, 8, 9). I valori di predizione hanno una dispersione piuttosto ampia, il *bias*, uguale a -0,73, esprime una buona accuratezza. In totale, il risultato, considerati i valori di RPD e RER, rispettivamente 2,77 e 11,77, si può considerare soddisfacente. Di conseguenza, nelle condizioni operative (caratteristiche del latte, attrezzatura e tecnologia utilizzata, stagione e altri fattori) del 2014, risulta possibile stimare con sufficiente attendibilità la percentuale di cagliata congelata utilizzata durante la produzione di mozzarella di bufala. La modalità di elaborazione utilizzata prevede che la numerosità dei campioni da analizzare debba essere superiore a dieci.

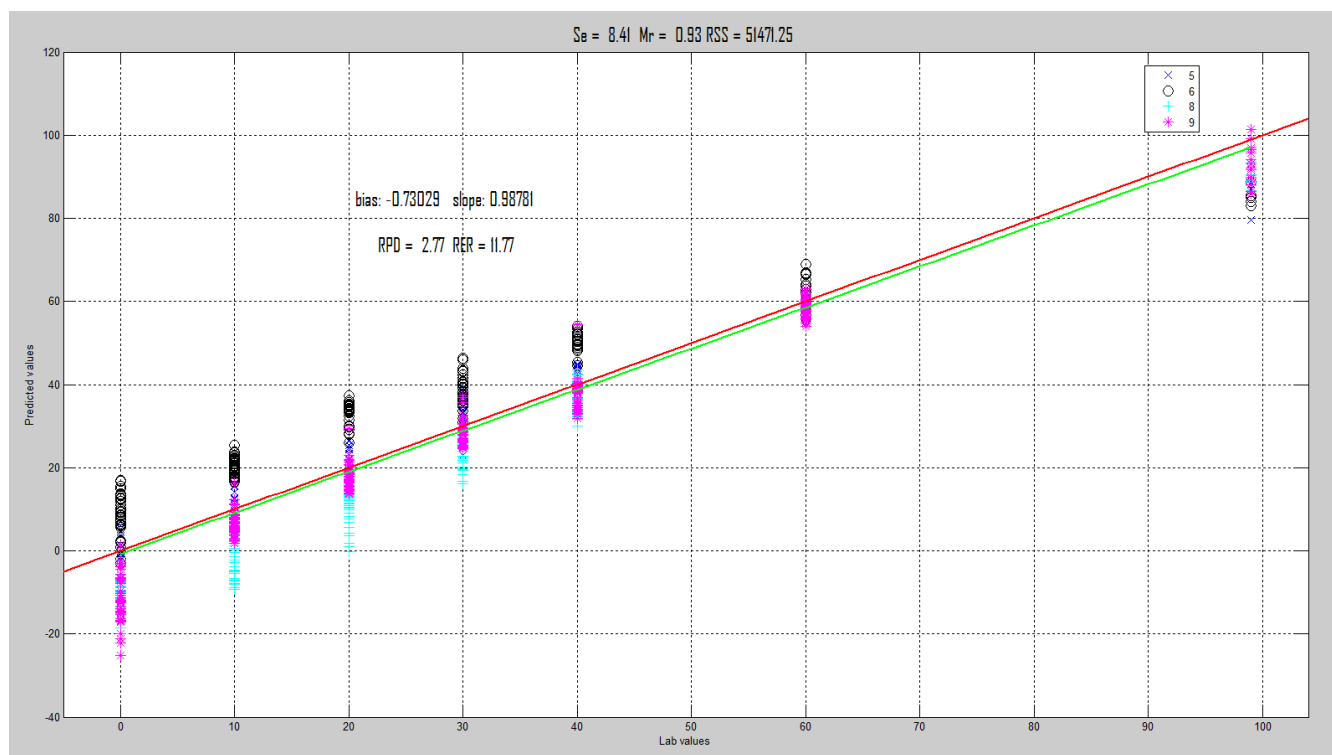


Figura 3. Validazione della calibrazione 2014 sui rimanenti dati indipendenti del 2014

### 5.2.2. Calibrazione creata sui dati del 2014 e validata sui dati del 2015 - Algoritmo\_1\_cagliata congelata

Il modello creato con i dati del 2014 per predire le percentuali di cagliata congelata è stato verificato sulle acquisizioni del 2015 (figura 4). I dati oggetto della verifica sono stati quelli della replica 1 della prova preliminare e delle repliche 2, 3, 4 e 5 delle prove sperimentali. Questa calibrazione non ha prodotto risultati, come si può evincere dai valori degli indici riportati e dalla rappresentazione grafica del modello. Il valore di errore standard di stima della predizione (SEP) è di 31,31 e si discosta molto dai valori ritenuti accettabile (inferiori a 13), pertanto la capacità di predizione del modello è bassa.

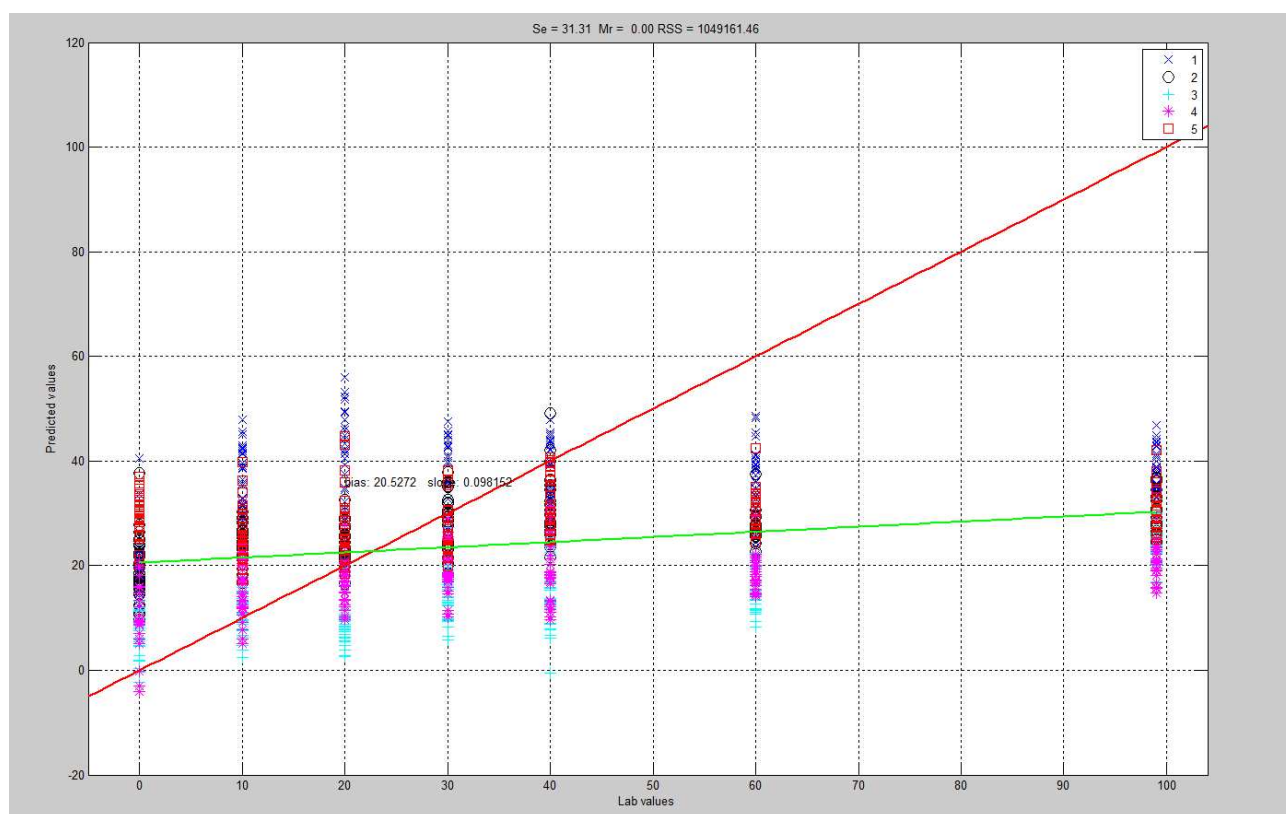


Figura 4. Validazione della calibrazione 2014 sui dati del 2015 (repliche 1, 2, 3, 4 e 5)

### 5.2.3. Calibrazione creata sui dati del 2015 e validata sui dati del 2015 - Algoritmo\_2\_cagliata congelata

Nella figura 5 viene riportato il nuovo modello creato utilizzando i dati del 2015. I risultati delle repliche 1, 2 e 3 sono stati validati sui dati delle repliche 4, 5, 6, 7 e 8 dello stesso anno relative alle prove sperimentali per la creazione delle curve di calibrazione.

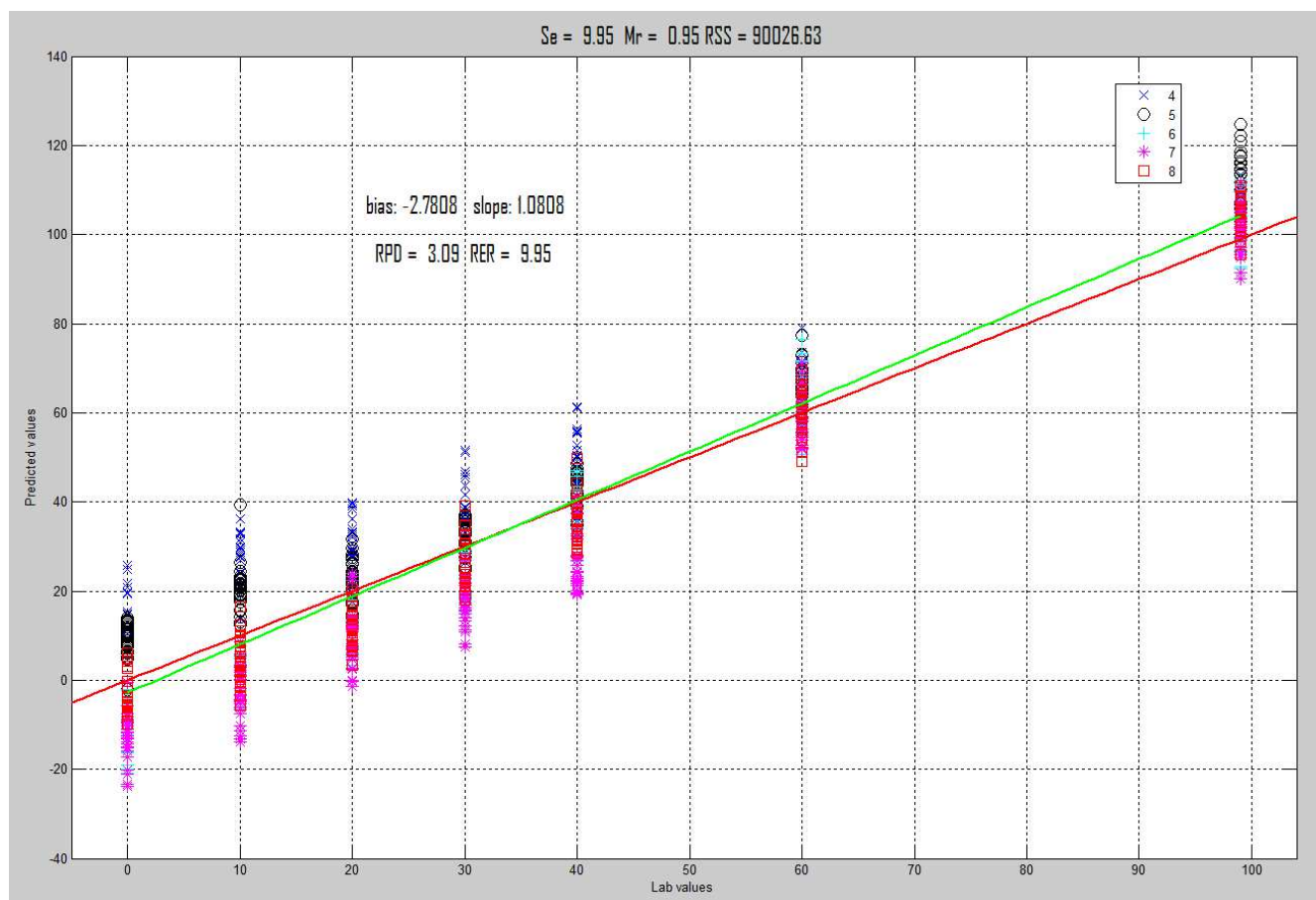


Figura 5. Validazione della calibrazione 2015 sui rimanenti dati indipendenti del 2015

La calibrazione ottenuta e validata sui dati del 2015 ha un indice di performance RPD leggermente superiore rispetto a quello risultante dal modello ottenuto e validato sui dati del 2014 (figura 3), rispettivamente 3.09 vs 2.77. Rimane comunque alta la dispersione delle predizioni probabilmente dovuta ad una elevata variabilità dei campioni. La variabilità riscontrata non necessariamente è da attribuire a una differenza nel contenuto di cagliata congelata nei singoli campioni dello stesso gruppo. Anche altri fattori potrebbero concorrere alla variabilità, fattori difficilmente controllabili durante la produzione dei campioni sperimentali, come ad esempio temperatura del campione durante la filatura, velocità di raffreddamento della mozzarella, contenuto di umidità e di grasso. Per ridurre la dispersione è necessario eseguire la media di un maggior numero di campioni.

### 5.2.4. Calibrazione complessiva - Algoritmo\_3\_cagliata congelata

Per approfondire l'analisi è stato creato un modello con dati del 2014 (replica 1, 2, 3 e 4) e del 2015 (replica 1, 2, 3, e 4). Tale modello (calibrazione complessiva) è stato poi validato sui rimanenti dati indipendenti del 2014 e del 2015. I risultati sono riportati in figura 6 e 7.

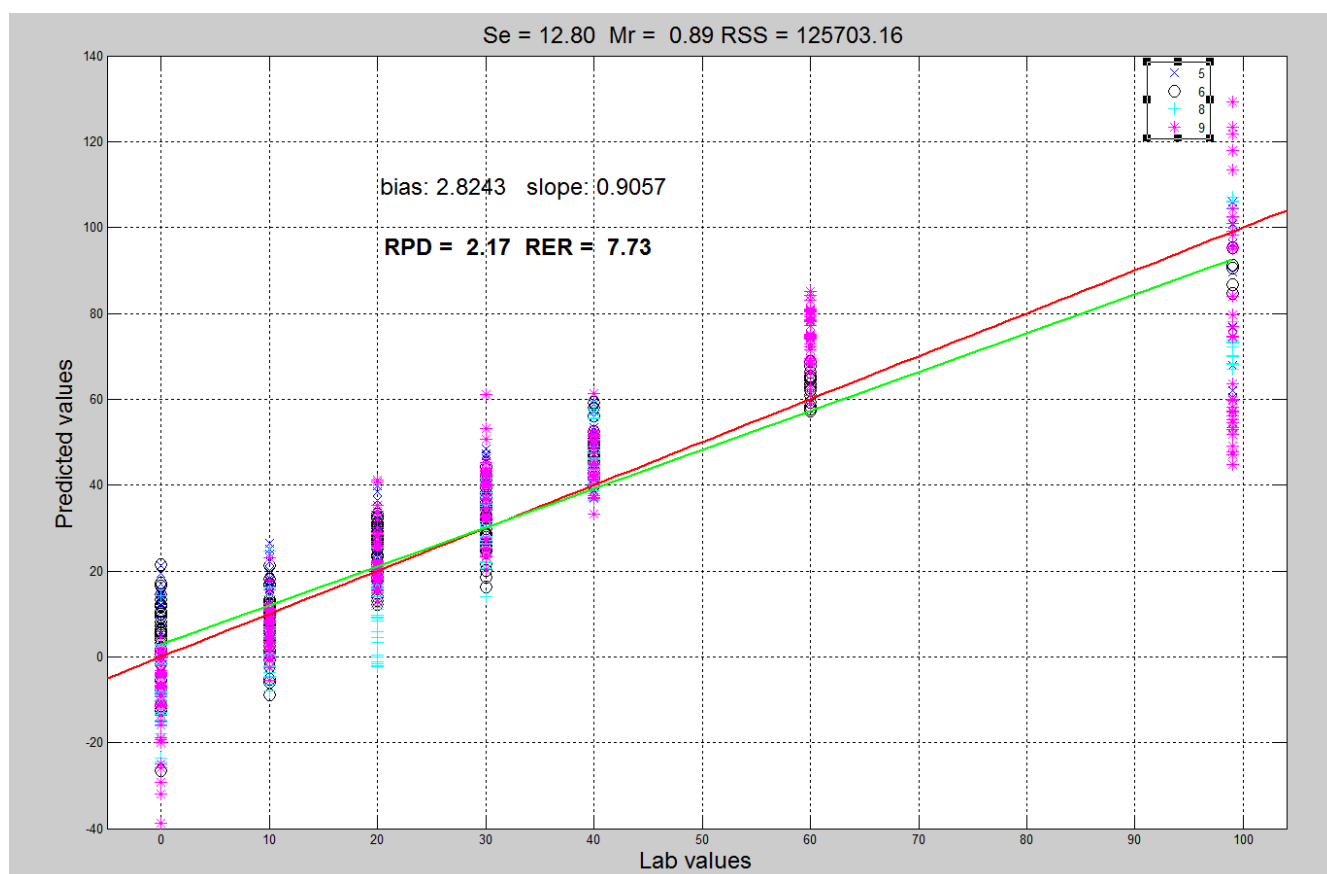


Figura 6. Validazione della calibrazione complessiva su dati indipendenti del 2014 (repliche 5, 6, 8 e 9)

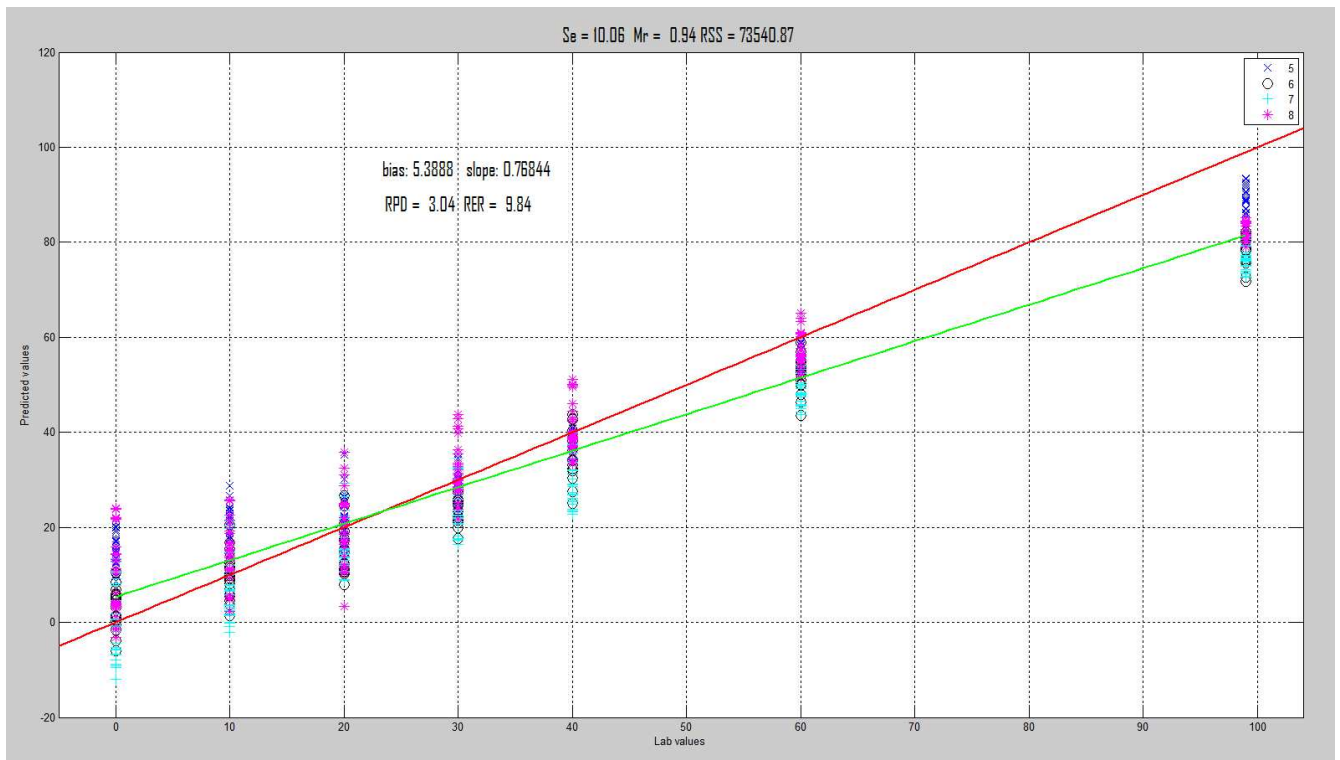


Figura 7. Validazione della calibrazione complessiva su dati indipendenti del 2015 (replica 5, 6, 7 e 8)

Dalla validazione sui dati del 2014 sono stati ottenuti i seguenti indici: SEP=12,80; RPD=2,17; RER=7,73. Per i dati del 2015 i valori trovati sono stati: SEP=9,95; RPD=3,09; RER=9,95. I valori di tali indici rientrano tra quelli ritenuti accettabili.

I migliori risultati in termini di indici di *performance* del modello ottenuto con la calibrazione complessiva potrebbero indurre a pensare che vi sia la possibilità di integrare i modelli creati con i valori di predizione provenienti da un elevato numero di caseifici per produrre risultati più precisi e affidabili.

La variabilità che include un campione di formaggio, in particolare di un formaggio fresco, è nota a chi si interessa di produzione e sperimentazione nel settore lattiero-caseario. Questa constatazione, a maggior ragione quando riguarda i valori ottenuti da una strumentazione NIR, offre una chiave di lettura dei risultati illustrati.

### 5.2.5. Calibrazione cagliata da latte congelato

L'analisi dei campioni di mozzarella ottenuti da cagliata proveniente da latte congelato (50 e 100%) è la prima acquisizione in assoluto ed è stata sottoposta ad un'elaborazione diversa da quella riportata per i campioni contenenti cagliata congelata.

La creazione delle calibrazioni per l'individuazione della presenza di latte congelato nei campioni di mozzarella, ha avuto come base di partenza gli algoritmi e i set di dati provenienti dalle calibrazioni utilizzate per i campioni con presenza di cagliata congelata.

Nella prova preliminare, i valori di predizione ottenuti per i campioni del gruppo che non contiene cagliata da latte congelato sono vicini ai valore reali, così come osservato nell'elaborazione dei dati da cagliata congelata (i campioni hanno la stessa provenienza). Per i gruppi ottenuti da cagliata contenenti, rispettivamente, 50 e 100% di latte congelato, i valori di predizione sono molto distanti dai valori reali. Infatti i valori di predizione del gruppo 100% sono risultati più simili a quelli del gruppo 0%.

Le mozzarelle prodotte nelle prove successive, repliche 2, 3 e 4, sono state analizzate con la calibrazione creata con i dati della replica 1. Tra una replica e quella successiva sono state apportate lievi modifiche alla calibrazione, senza però incrementare il data set con l'immissione dei nuovi dati acquisiti. I valori di predizione ottenuti risultano essere distanti dai valori reali. Per l'analisi dei campioni prodotti nella replica 5 è stata creata una nuova calibrazione. Nel modello sono stati inseriti i dati delle repliche che vanno dalla 1 alla 4. Questo ha permesso di aggiungere al modello dei valori con un'ampia variabilità, in modo da ottenere maggiore attendibilità delle predizioni. Le analisi effettuate sulle repliche 5, 6 e 7 mostrano una maggiore accuratezza del valore di predizione. Per la validazione delle calibrazioni ottenute con i dati delle repliche 1 – 7 è stata creata una calibrazione complessiva con la quale sono stati analizzati i campioni della replica 8. I valori di predizione ottenuti sono migliori, ma la variabilità dei risultati rimane molto elevata.

## **6. Conclusioni**

Dalle elaborazioni effettuate emerge che il metodo ha delle buone possibilità di successo quando la curva di taratura viene creata con i dati di un caseificio e utilizzata per analizzare i campioni all'interno dello stesso caseificio. Risultati simili sono stati ottenuti con la creazione di un modello con i dati dei due stabilimenti e la validazione sui dati indipendenti dei due caseifici. Al contrario, se la calibrazione derivante dai campioni di un caseificio viene impiegata per analizzare i campioni di un altro caseificio, i risultati sono negativi.

La tecnologia NIR su base statistica applicata alla rilevazione di cagliata/latte congelati nella mozzarella di bufala è risultata notevolmente sensibile alla variabilità del campione analizzato, da attribuire a differenze nelle caratteristiche del latte e nel processo di caseificazione nonché a una differenza del contenuto di cagliata/latte congelati presente nei singoli campioni dello stesso gruppo.

Tutto ciò suggerisce che per un prodotto trasformato fresco di origine animale, come la mozzarella, la riduzione della variabilità del campione si potrebbe ottenere solo inserendo nel modello un campione di mozzarelle proveniente da un numero elevato di caseifici e comprensivo di tutte le possibili variabilità. Inoltre la possibilità di integrare più modelli e di verificarli nel tempo potrebbe produrre risultati più precisi e affidabili.