

Metodo biologico di inibizione della microflora contaminante la superficie di formaggi ovis in fase di stagionatura (BIO.ME.CO)

Relazione finale

Il Responsabile scientifico del Progetto
Dott. Antonio Pirisi



<i>Premessa</i>	4
<i>Attività svolta</i>	4
<i>Risorse professionali Agris impegnate nel progetto</i>	5
<i>Predisposizione delle colture e delle modalità d'impiego</i>	6
Attività preliminari	6
Attività pre-sperimentale	6
Tabelle e figure.....	9
<i>Esecuzione delle prove sperimentali</i>	20
Materiali e metodi	20
Risultati.....	20
Tabelle e figure.....	23
<i>Conclusioni finali</i>	35

Premessa

Lo sviluppo di microflora aerobia spontanea (muffe, lieviti e batteri etc.) sulla superficie dei formaggi in stagionatura costituisce un fenomeno naturale. L'intensità di sviluppo di tali microflora sui formaggi dipende dalle caratteristiche della superficie del prodotto e dall'ambiente ove questi sono stagionati. Nella maggior parte dei prodotti tradizionali della Sardegna la microflora di superficie costituisce un evento indesiderato, e tendenzialmente ostacolato mediante l'applicazione di idonee condizioni di conservazione, attraverso periodici trattamenti di toelettatura manuale e/o meccanica delle forme e l'utilizzo di specifici trattamenti antimicrobici che prevedono l'impiego di varie sostanze additive (pimaricina, sorbati, propionati, acidi grassi, etc). In taluni casi, come ad esempio, nelle produzioni biologiche e biodinamiche, l'utilizzo di sostanze chimiche ad azione antimicrobica non è permesso. Inoltre, oggi, anche nell'ambito delle produzioni convenzionali, le aziende ricevono dal mercato sempre più frequentemente richieste di prodotti caseari con superficie priva di trattamenti antimicrobici. Ciò nasce dall'aumentata consapevolezza del consumatore moderno, che è sempre più propenso ad acquistare prodotti naturali, privi di sostanze comunemente estranee all'alimento stesso. Infatti, l'uso degli additivi alimentari è sempre fonte di dibattito soprattutto perché, nell'immaginario collettivo, l'impiego di una sostanza chimica, per la preparazione degli alimenti, è ritenuto un elemento negativo ai fini della salubrità dell'alimento stesso. Tale opinione è alimentata dal fatto che, molto spesso, gli additivi, sono stati incriminati per i loro possibili effetti cancerogeni ed allergenici.

Attività svolta

Nell'ambito di questo progetto è stato condotto uno studio sperimentale che ha permesso di verificare la capacità di inibizione, esercitata da alcune colture selezionate di batteri lattici, sullo sviluppo della microflora fungina indesiderata, che colonizza la superficie dei formaggi ovisi nel corso della maturazione. In particolare, sono state selezionate alcune colture di protezione, fra quelle disponibili sul mercato dei coadiuvanti tecnologici, per le quali non erano disponibili sufficienti informazioni tecnico-scientifiche sulla loro reale capacità di inibizione verso la microflora di superficie dei formaggi e gli effetti della loro attività metabolica sulle caratteristiche fisico-chimiche e sensoriali degli stessi.

Purtroppo, per ragioni di natura organizzativa, non è stata intrapresa la prevista collaborazione con la Facoltà di Agraria di Piacenza (l'Università cattolica del Sacro Cuore), che prevedeva una sperimentazione con l'utilizzo di colture selezionate costituite da ceppi isolati presso i laboratori di questa Facoltà.

Le prove sperimentali con le colture selezionate acquisite sul mercato, sono state condotte presso i laboratori di tecnologia, microbiologia e chimica del Servizio Ricerca Prodotti di Origine Animale dell'Agenzia Agris Sardegna. Le colture sono state utilizzate per la fabbricazione di un formaggio ovino a pasta molle e breve periodo di maturazione, e sono stati valutati gli effetti dell'utilizzo di dette colture sui parametri tecnologici e le caratteristiche fisico-chimiche, microbiologiche e sensoriali dei formaggi realizzati.

Nell'ambito del progetto è stata condotta un'attività preliminare (Relazione 1 - Predisposizione delle colture e delle modalità d'impiego) durante la quale è stata eseguita una ricerca bibliografica inerente gli argomenti

oggetto di studio e successivamente lo *screening* delle colture disponibili sul mercato. Inoltre, sono state condotte le prove pre-sperimentali necessarie per valutare l'efficacia delle colture commerciali acquisite, sui formaggi ovini oggetto di studio. I risultati di questa attività hanno permesso di selezionare le colture da utilizzarsi nella successiva attività sperimentale e definire le condizioni tecnologiche e operative di utilizzo delle stesse. I risultati di questa attività hanno permesso di elaborare il protocollo sperimentale attuato nella fase successiva del progetto (Relazione 2 – Esecuzione delle prove sperimentali).

L'attività svolta ha permesso di verificare l'effettiva capacità antifungina di alcune colture disponibili sul mercato e fornisce alle aziende, coinvolte nel cluster e in generale quelle del comparto caseario, informazioni tecnico-scientifiche utili per attuare una metodologia di controllo biologico della microflora fungina indesiderata sulla superficie dei formaggi molli a breve periodo di maturazione.

Risorse professionali Agris impegnate nel progetto

Nome	Funzione
Antonio Pirisi	Responsabile del progetto, supervisione e coordinamento scientifico del progetto, ricercatore esperto in tecnologia lattiero-casearia
Margherita Addis	Ricercatore esperto in chimica lattiero-casearia, responsabile settore chimica
Roberta Comunian	Ricercatore esperto in microbiologia lattiero-casearia, responsabile settore microbiologia
Antonio Paba	Ricercatore esperto di microbiologia lattiero-casearia
Riccardo Di Salvo	Funzionario Tecnico esperto in analisi sensoriali, responsabile del laboratorio di analisi sensoriali
Daniele Petretto	Tecnico laboratorio analisi chimiche
Massimo Pes	Tecnologo lattiero-caseario – esecuzione delle caseificazioni presso il laboratorio di tecnologia di Bonassai e presso le aziende
Stefano Furesi	Tecnologo lattiero-caseario – esecuzione delle caseificazioni presso il laboratorio di tecnologia di Bonassai e presso le aziende
Adriano Porcu	Tecnico analisi sensoriali
Giacomo Lai	Borsista

Predisposizione delle colture e delle modalità d'impiego

Durante questa fase del progetto si è provveduto a effettuare una ricerca sullo stato dell'arte sull'argomento oggetto di studio (Tabella 1), e successivamente si è proceduto con lo *screening* delle colture disponibili sul mercato, commercializzate dalle aziende produttrici per la specifica azione anti-microbica e anti-fungina (Tabella 2), ma non testate su prodotti caseari realizzati con latte ovino, a breve e medio periodo di maturazione. Durante questa fase le colture acquisite sul mercato sono state utilizzate nell'ambito di un'attività pre-sperimentale (Tabella 3) necessaria per validare l'effettiva efficacia delle stesse sui formaggi ovini oggetto di studio. I risultati di questa attività hanno permesso di individuare complessivamente 3 colture commerciali, che sono state successivamente sottoposte a sperimentazione presso il laboratori di Agris. Purtroppo per motivi amministrativi e organizzativi non è stato possibile avviare e concludere le previste sperimentazioni con colture non commerciali che dovevano essere fornite dai laboratori di ricerca dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Facoltà di Agraria, sede di Piacenza.

Attività preliminari

- Ricerca bibliografica e documentale relativa all'attività delle colture protettive di superficie e alle tecniche di impiego. I lavori selezionati hanno anche permesso di individuare le colture protettive di comprovata efficacia antifungina (vedi tabella 1);
- Individuazione delle colture protettive a specifica azione anti fungina disponibili sul mercato. Sono state identificate 7 colture protettive in forma liofilizzata (vedi tabella 2) per le quali è stata avviata la procedura di acquisizione.
- Predisposizione della convenzione tra Agris Sardegna e UNICATT (Università Cattolica del Sacro Cuore – Facoltà di Agraria) per la prestazione di servizi a carattere tecnico-scientifico sulla messa a punto di nuove colture batteriche protettive, non disponibili in commercio.
- Stesura del protocollo relativo alle prove pre-sperimentali (Tabella 3).

Attività pre-sperimentale

il protocollo relativo alle prove pre-sperimentali è riportato in (Tabella 3). I risultati delle prove hanno permesso di selezionare le colture protettive commerciali da utilizzare nella successiva fase sperimentale. In particolare sono state eseguite 9 caseificazioni pre-sperimentali (7 lavorazioni mediante l'utilizzo di altrettante colture protettive + 2 lavorazioni testimone senza colture protettive), impiegando la tecnologia prevista per la fabbricazione di un formaggio a pasta molle da latte ovino intero (Tabella 4). Prima dell'utilizzo in lavorazione le 7 colture protettive commerciali sono state sottoposte ad analisi microbiologica, con il fine di verificarne la reale concentrazione cellulare (UFC/g di prodotto). Tale informazione era indispensabile al fine di determinare la dose di utilizzo delle colture nel latte in lavorazione. Le colture sono state inoculate nel latte a livelli di concentrazione microbica simili (circa 10^6 UFC/mL di latte, tabella 5).

Sono di seguito riportati i risultati relativi alle colture testate (SA/1- Sacco Lyofast FPR 2, SB/1 – Sacco Lyofast BG112, SC/1 – Sacco Lyofast LPR A, DA/1 – Danisco HOLDBAC YM-C Plus, DB/1 – Danisco HOLDBAC YM-B Plus, DC/1 – Danisco HOLDBAC YM-XPB LYO, DD/1 – Danisco HOLDBAC YM-XPM LYO). Per quanto riguarda le caseificazioni è da rilevare che le colture testate non hanno determinato variazioni dei parametri tecnologici né hanno modificato il profilo di acidificazione dei formaggi nel corso della fabbricazione. Infatti come è possibile notare in figura 1, le curve di acidificazione dei formaggi nelle prime ore dalla fabbricazione hanno avuto un andamento molto simile.

I formaggi ottenuti sono stati salati e sottoposti a maturazione per 20 giorni in condizioni termo-igrometriche controllate (10 ± 2 °C; U.R. $80\pm 10\%$). La superficie dei formaggi a 20 giorni di maturazione è stata fotografata e le immagini ricavate dai due piatti di ciascuna forma sono state sottoposte ad analisi dell'immagine mediante elaborazione delle stesse con il software ImageJ 1.48 v. L'elaborazione dell'immagine ha permesso di misurare l'area scura interessata dallo sviluppo delle muffe, espressa in mm^2 , sulla superficie di ciascun piatto delle forme analizzate. I risultati dell'analisi dell'immagine sono esposti in tabella 6. Come è possibile notare i formaggi prodotti con le colture denominate DC, SB e SC presentavano la minor contaminazione fungina, infatti la superficie contaminata era pari a rispettivamente 0,7%, 0,9% e 1,4 % della superficie dei formaggi analizzata. Mentre le altre colture, nelle condizioni pre-sperimentali applicate, non hanno mostrato sufficienti effetti inibitori sullo sviluppo della microflora fungina, presentando una percentuale di superficie contaminata in alcuni casi anche superiore ai formaggi di controllo. La differente capacità inibitoria esercitata dalle colture testate è anche apprezzabile visivamente dalle immagini della superficie delle forme, riportate in figura 2 e 3.

I formaggi a maturazione sono stati sottoposti ad analisi sensoriale al fine di valutare eventuali differenze rispetto al formaggio di riferimento (controllo) (Figura 4). Come è possibile notare in figura 4, i formaggi prodotti con le colture Sacco, risultavano simili al controllo, mentre significative ($p = 0,05$) differenze sono state osservate tra il formaggio controllo e le colture Danisco.

I risultati sino ad ora conseguiti permettono di individuare 3 colture commerciali (DC - Danisco HOLDBAC YM-XPB LYO 500 DCU, SB – Sacco Lyofast BG112, SC – Sacco Lyofast LPR A). Queste colture presentano infatti, una maggiore capacità inibitoria della microflora di superficie e nel contempo, i formaggi prodotti con tali colture, presentano una minore diversità sensoriale rispetto al controllo. Per tale ragione le colture selezionate sono state utilizzate nella successiva fase sperimentale, in condizioni operative simili a quelle delle prove pre-sperimentali, ma nell'ambito di un differente disegno sperimentale che naturalmente prevederà le repliche necessarie per l'elaborazione statistica dei dati.



Tabelle e figure

Tabella 1 – Lavori scientifici selezionati

Titolo	Autori	Riferimenti
Microbiological, physical, chemical and sensory characteristics of milk fermented with <i>Lactobacillus plantarum</i>	Pereira de Souza et al.	Acta Scientiarum. Health Sciences Maringá, v. 35, n. 1, p. 125-131, Jan-Jun, 2013
Identification and Partial Characterization of Antilisterial Compounds Produced by Dairy Yeasts	Hatoum et al.	Probiotics and Antimicrobial Proteins. 2013, Volume 5, Issue 1, pp 8-17
Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli	Minervini et al.	Journal of Dairy Science Volume 95, Issue 2 , Pages 508-520, February 2012
Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period	Delavenne et al.	International Journal of Food Microbiology Volume 155, Issue 3, 16 April 2012, pp 185–190
Lactic acid bacteria in the inhibition of <i>Fusarium graminearum</i> and deoxynivalenol detoxification	Franco et al.	Journal of Applied Microbiology Volume 111, Issue 3, pp 739–748, September 2011
Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation	Lacroix (ed)	W.P. 2010 – p 536
Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures	Rodgers	Trends in Food Science & Technology Volume 19, Issue 4, April 2008, pp 188–197

Tabella 2 – Caratteristiche delle colture commerciali

Coltura	Ditta produttrice	Caratteristiche dichiarate
HOLDBAC YM-C Plus LYO 100 DCU	Danisco Italia Spa	Coltura protettiva a bassa acidificazione, produzione di acido L(+) lattico, acetico e propionico. Inibizione di microrganismi indesiderati quali lieviti e muffe. L'efficacia della coltura varia in funzione dei ceppi e specie fungine e del loro livello di contaminazione.
HOLDBAC YM-B Plus LYO 100 DCU		Coltura protettiva a bassa acidificazione, produzione di acido L(+) lattico, acetico e propionico e piccole quantità di altri acidi e diacetile. Inibizione di microrganismi indesiderati quali lieviti e muffe. L'efficacia della coltura varia in funzione dei ceppi e specie fungine e del loro livello di contaminazione.
HOLDBAC YM-XPB LYO 500 DCU		Coltura protettiva omofermentante a moderata acidificazione e alofila. L'efficacia della coltura varia in funzione dei ceppi e specie fungine e del loro livello di contaminazione.
HOLDBAC YM-XPM LYO 500 DCU		Coltura protettiva eterofermentante a moderata acidificazione e media aromatizzazione. L'efficacia della coltura varia in funzione dei ceppi e specie fungine, del livello di contaminazione e delle condizioni di processo.
BG112 –D10 (LYOFAST 10 DOSI)	Sacco Srl	Coltura mono ceppo di <i>Lactobacillus plantarum</i> produttore di batteriocine. La coltura può inibire la crescita di lieviti, muffe e batteri in generale. La coltura sviluppa acidità con risultati variabili a seconda del processo di lavorazione.
LPRA – D10 (LYOFAST 10 DOSI)		Coltura costituita da un ceppo di <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e uno di <i>Lactobacillus plantarum</i> . La coltura può inibire la crescita di varie specie di <i>Listeria</i> , lieviti, e muffe. La coltura sviluppa debole acidità ed aromi a seconda del processo di lavorazione.
FPR 2 – D10 (LYOFAST 10 DOSI)		Coltura costituita da <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> (rapporto: 1:1:1). La coltura può inibire la crescita di varie specie batteriche, lieviti e muffe. La coltura sviluppa debole acidità ed aromi a seconda del processo di lavorazione.

Tabella 3 – Schema delle prove pre-sperimentali

Tecnologia	Colture testate	Attività
Fabbricazione di formaggi a pasta molle	<p style="text-align: center;">Formaggio controllo (formaggio prodotto senza coltura protettiva)</p>	<p>1. Monitoraggio parametri tecnologici (evoluzione dell'acidificazione, pH alle 24 ore e in maturazione)</p> <p>2. Verifica della dose di inoculo ottimale delle colture protettive</p>
	vs	
	<p style="text-align: center;">Formaggi sperimentali (Formaggi prodotti con colture protettive)</p>	<p>3. Verifica visiva e mediante tecniche di analisi dell'immagine del livello di sviluppo delle muffe</p> <p>4. Analisi sensoriali</p>

Tabella 4 – Scheda tecnologica formaggio a pasta molle da latte ovino intero

Descrizione		Unità di misura	Parametri di riferimento
Quantità di latte		L	12,0
pH del latte		(UpH)	
Trattamento termico			75°C x 15"
Quantità coltura protettiva	Dosi/100L		(Tabella 5)
	g/L		
	g/latte in lav.		
Tipo d'innesto	CHOOZIT TA 62 LYO - 50 DCU YO-MIX 187 LYO - 100 DCU	g/latte in lav.	0,132 0,072
Temperatura di coagulazione		°C	34,0 – 36,0
Tipo di caglio utilizzato			1:50.000
Quantità di caglio utilizzato			
Durata della presa		min	12,0 – 13,0
Durata dell'indurimento		min	17,0 – 18,0
Rottura 2 fasi		min	10
Temperatura di stufatura		°C	34,0 – 36,0
Durata della stufatura		ore	2,0 – 3,0
pH del formaggio a fine stufatura		UpH	5,40 – 5,60
pH del formaggio alle 24 ore		UpH	5,30 – 5,40
Salatura	Tipo		A secco
	Quantità di sale fino	g/kg	20
	Temperatura	°C	10,0 – 12,0
Stagionatura	Temperatura	°C	8,0 – 10,0
	Umidità relativa	%	85,0 – 90,0
	Durata	giorni	20,0
Forme prodotte		n.	
Peso alle 24 ore dalla produzione		kg	
Resa del formaggio alle 24 ore		%	21,0 – 24,0

Tabella 5 – Dosaggio delle colture protettive nelle prove pre-sperimentali

Fornitore	Coltura	Sigla sperimentale	Inoculo coltura in latte UFC/mL	Quantità coltura in lavorazione g/12 L
Sacco	Lyofast FPR 2	SA	1,8E+06	0,160
Sacco	Lyofast BG112	SB	7,8E+05	0,211
Sacco	Lyofast LPR A	SC	7,3E+05	0,143
Danisco	HOLDBAC YM-C Plus LYO 100 DCU	DA	3,7E+06	0,150
Danisco	HOLDBAC YM-B Plus LYO 100 DCU	DB	2,5E+06	0,429
Danisco	HOLDBAC YM-XPK LYO 500 DCU	DC	5,9E+06	0,092
Danisco	HOLDBAC YM-XPM LYO 500 DCU	DD	1,4E+07	0,375

Tabella 6 – Risultati dell’analisi dell’immagine sulla superficie dei formaggi dopo 20 giorni di maturazione

Coltura	Sigla sperimentale	Superficie formaggio analizzata ⁽¹⁾	Superficie interessata sviluppo muffe	Superficie interessata sviluppo muffe
		(mm ²)	(mm ²)	(%)
Controllo S (Sacco)	CTS	33009	1630	4.9
Lyofast FPR 2	SA	33009	2468	7.5
Lyofast BG112	SB	33009	292	0.9
Lyofast LPR A	SC	33009	476	1.4
Controllo D (Danisco)	CTD	33009	2510	7.6
HOLDBAC YM-C Plus LYO 100 DCU	DA	33009	5094	15.4
HOLDBAC YM-B Plus LYO 100 DCU	DB	33009	8356	25.3
HOLDBAC YM-XPK LYO 500 DCU	DC	33009	223	0.7
HOLDBAC YM-XPM LYO 500 DCU	DD	33009	684	2.1

⁽¹⁾ Somma della superficie dei due piatti di ciascuna forma analizzata. Sono evidenziate in grassetto le colture che verranno utilizzate nella fase sperimentale.

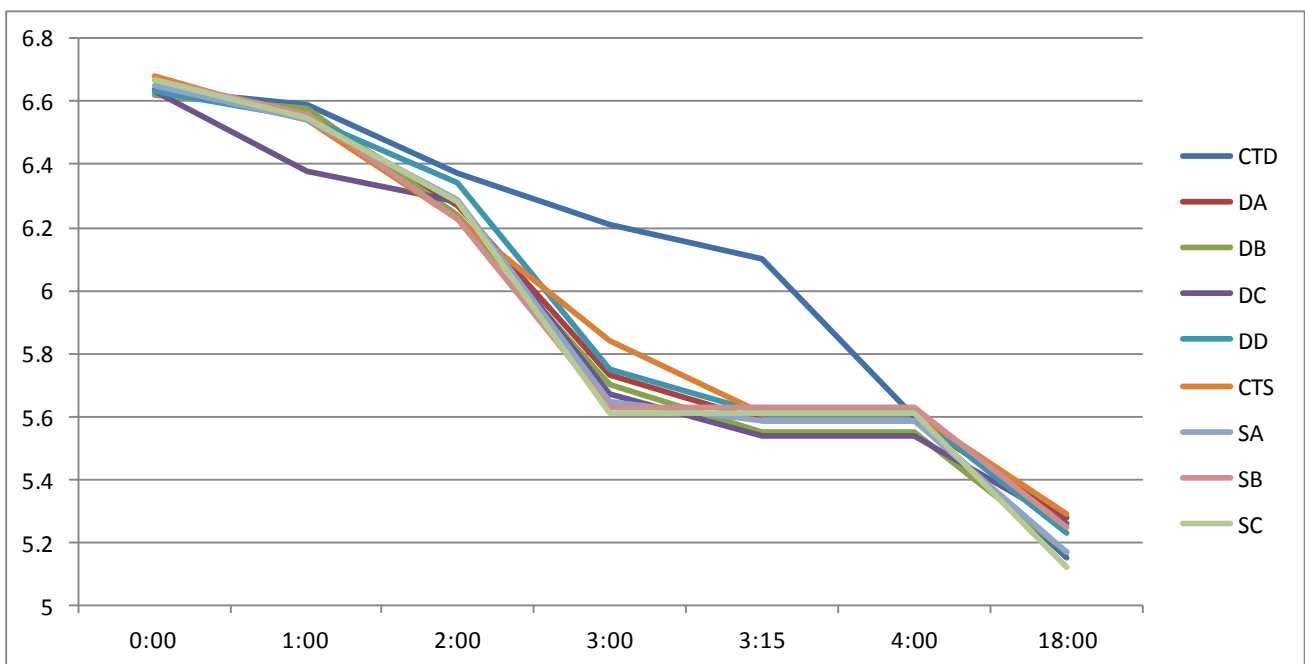


Figura 1 – Curve di acidificazione dei formaggi.

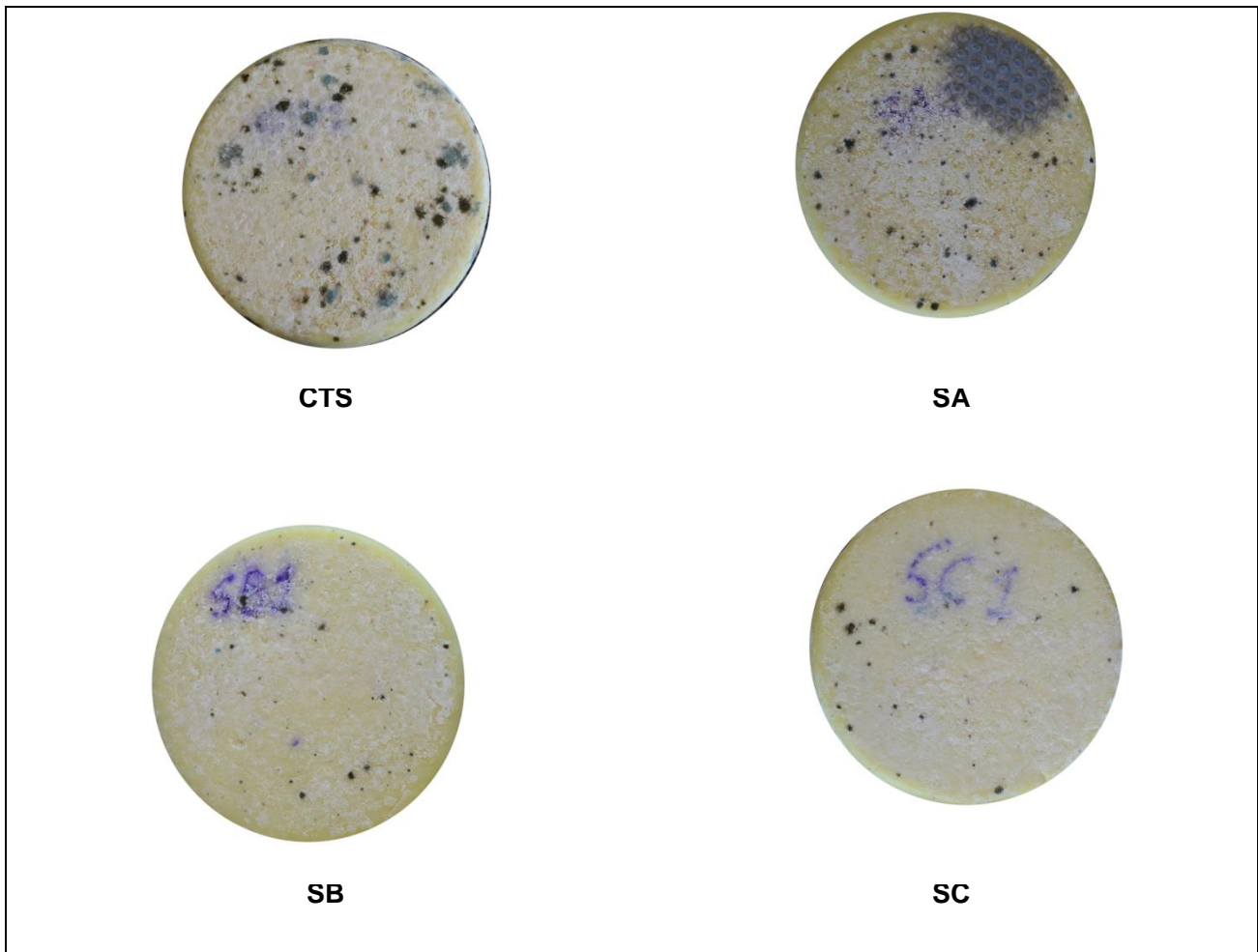


Figura 2 - Immagini relative alla superficie dei formaggi dopo 20 giorni di maturazione (colture Sacco).

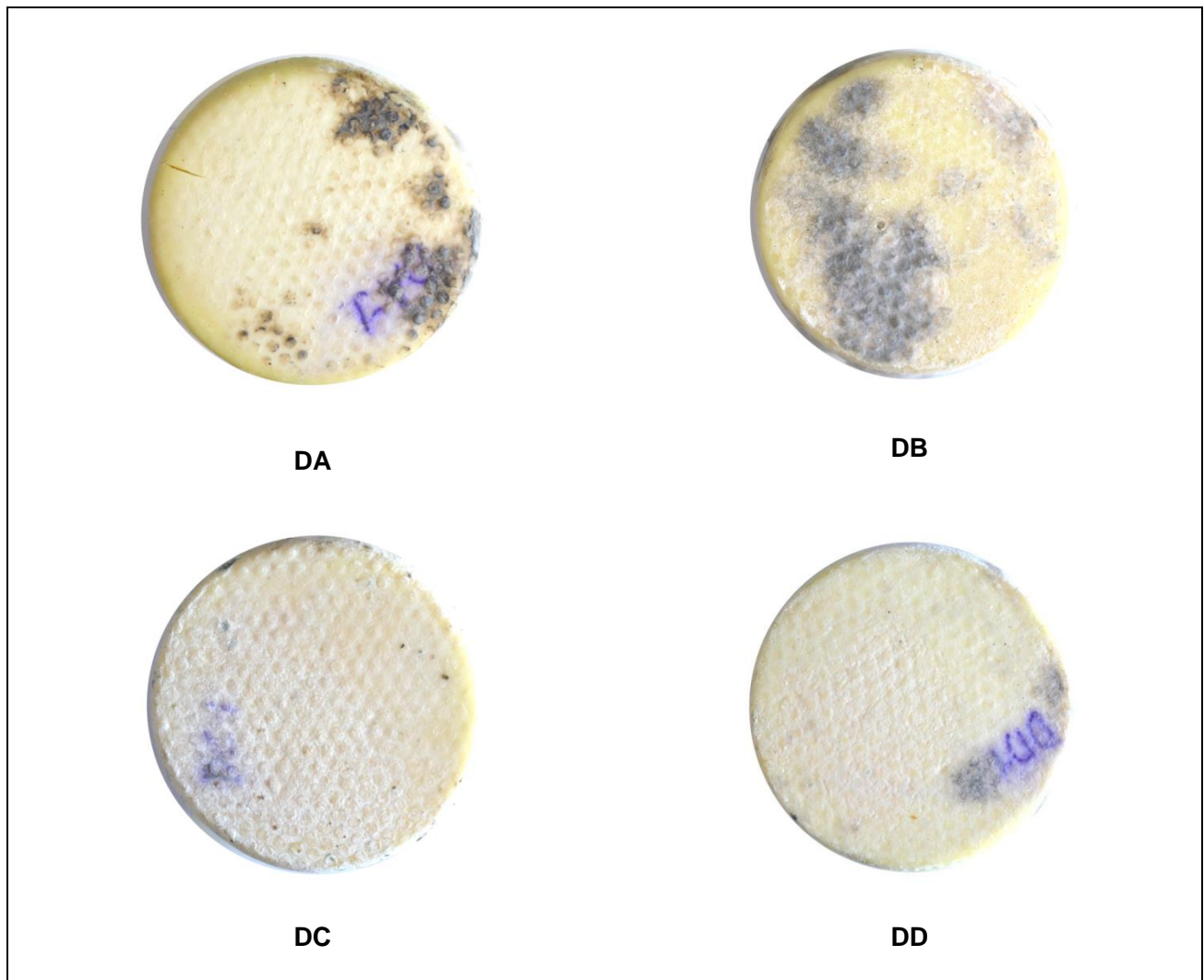
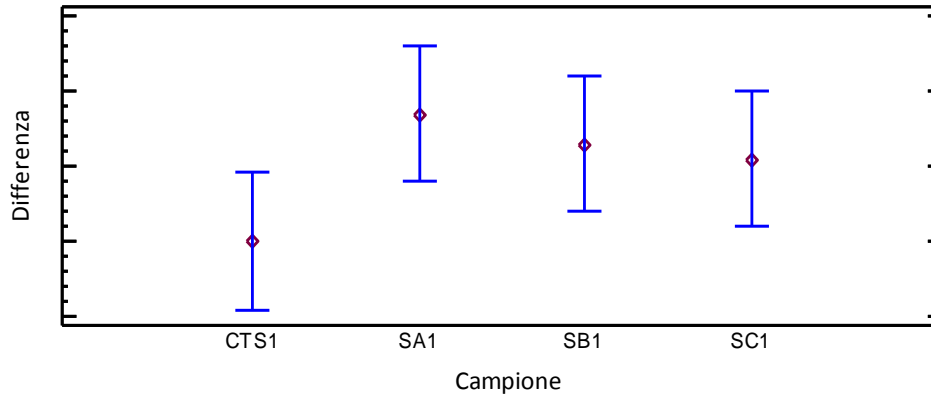
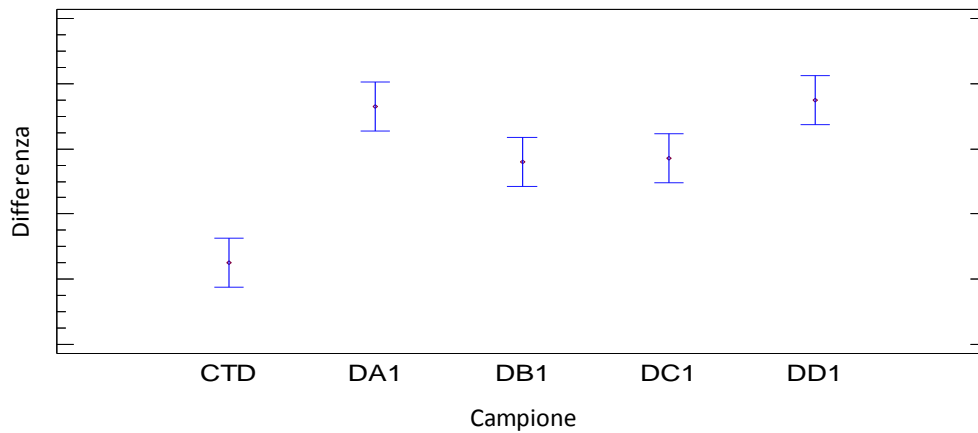


Figura 3 - Immagini relative alla superficie dei formaggi dopo 20 giorni di maturazione (colture Danisco).



(a)



(b)

Figura 4 – Differenza sensoriale dei formaggi analizzati, (a) confronto colture Sacco, (b) confronto colture Danisco.

Esecuzione delle prove sperimentali

Nell'ambito di questa attività è stata testata la capacità inibitoria delle colture protettive commerciali selezionate durante l'attività pre-sperimentale (Relazione 1).

Materiali e metodi

Sono state eseguite complessivamente 12 lavorazioni, 3 lavorazioni testimone (**controllo**, latte senza aggiunta di colture protettive) e 9 sperimentali (latte con l'aggiunta delle colture protettive, Danisco HOLDBAC YM-XPB LYO 500 DCU – sigla **DC**, Sacco Lyofast BG112 – sigla **SB**, Sacco Lyofast LPR A – sigla **SC**) applicando la tecnologia di produzione di un formaggio da latte ovino, a pasta molle e breve periodo di maturazione (20 giorni) (Tabella1).

Il latte crudo veniva trasformato previo trattamento termico di pastorizzazione HTST (72°C per 15”) utilizzando un impianto pilota corredato di scambiatore tubolare a lampade infrarosso (Stoutz-Actinator, ACTINI GROUP, France). Le colture protettive venivano aggiunte in quantità prestabilita al latte pastorizzato direttamente nella caldaia di coagulazione alla temperatura di 37-38 °C. Trascorsi alcuni minuti, necessari per l'adattamento della coltura, il latte veniva prelevato per essere sottoposto alle analisi microbiologiche. Mentre, nel caso della lavorazione testimone, il latte pastorizzato nella caldaia di coagulazione, veniva prelevato prima dell'aggiunta della coltura starter. Si procedeva quindi con l'aggiunta della coltura lattica starter (uguale per tipologia e dosaggio in tutte le lavorazioni eseguite), del caglio e con le successive fasi della trasformazione. I formaggi ottenuti sono stati salati e sottoposti a maturazione per 20 giorni in condizioni termo-igrometriche controllate (temperatura: 9,0±2,0%, U.R.: 90,00±5,00%). Sul latte, sui formaggi alle 24 ore dalla produzione e a maturazione, sono state eseguite le analisi microbiologiche e fisico-chimiche (Tabella 2). Mentre solo sui formaggi a maturazione è stata anche eseguita l'analisi dell'immagine relative alla superficie dei formaggi e l'analisi sensoriale.

Risultati

In tabella 1 sono riportati i parametri tecnologici rilevati nel corso delle prova. Come è possibile notare non sono state riscontrate differenze nei valori medi dei parametri tecnologici rilevati nelle tesi a confronto. E' stato riscontrato che le colture protettive utilizzate non hanno interferito con l'acidificazione del formaggio che in tutte le tesi a confronto è avvenuta in circa 220 min (valore medio del tempo necessario al raggiungimento del pH di fine lavorazione, 5,60 UpH). Per tale ragione, non sono state riscontrate differenze nello spurgo del formaggio. Tale aspetto è anche confermato dalla resa di trasformazione alle 24 h dalla produzione (peso del formaggio kg/peso del latte kg x 100), che nelle tesi a confronto ha mostrato valori simili (Tabella 1).

Nella tabella 3 sono riportati i risultati delle analisi microbiologiche eseguite sul latte e sui formaggi (a 24 ore dalla produzione e a maturazione). Come è possibile notare il latte della lavorazione controllo, presenta una carica microbica che residua dopo il trattamento termico applicato ($2,45 \pm 1,10$ Log UFC/mL). I risultati delle conte (conta mesofila totale e conta della coltura protettiva) del latte inoculato con le colture protettive

sperimentate, confermano la validità del metodo di standardizzazione dell'inoculo in latte delle stesse, che risulta essere pari al valore prestabilito nel protocollo di lavoro, circa 6,0 Log UFC/mL. Per quanto riguarda il formaggio alle 24 ore dalla produzione, i livelli di conta mesofila totale riscontrati sono compresi nell'intervallo 8,36 – 8,86 Log UFC/g. Quest'evoluzione di circa 2,0 Log UFC/g, rispetto al latte di partenza è principalmente da attribuire allo sviluppo della microflora della coltura starter utilizzata. I risultati delle conte delle colture protettive evidenziano, nei formaggi alle 24 ore, una crescita di ciascuna delle colture utilizzate di circa 0,6 Log UFC/g, rispetto all'inoculo in latte. Nei formaggi a maturazione si evidenzia un'ulteriore evoluzione della conta mesofila totale, rispetto ai formaggi alle 24 ore, pari a circa 0,6 Log UFC/g. E' interessante notare il maggiore incremento delle colture protettive nel corso della maturazione dei formaggi, che evolvono di circa 1,40 Log UFC/g rispetto al valore riscontrato nel formaggio alle 24 ore.

Nella tabella 4 è riportata la composizione fisico-chimica del formaggio alle 24 ore dalla produzione. Come è possibile osservare i formaggi presentano valori di pH molto simili fra loro, ciò dimostra che le colture protettive non hanno avuto effetti sull'acidificazione del prodotto nelle prime 24 ore dalla produzione. Per quanto riguarda i parametri relativi alle macrocomponenti, non sono state osservate differenze nei formaggi a confronto. Un simile andamento delle macrocomponenti è stato osservato anche nei formaggi a maturazione (Tabella 5). Tuttavia, in questi formaggi, è da sottolineare un'importante variazione del pH, che risulta mediamente inferiore di circa 0,28 UpH nei formaggi prodotti con l'aggiunta delle colture protettive ($P < 0,05$), rispetto al formaggio controllo. Tale variazione è sicuramente dovuta all'attività metabolica delle colture protettive nel corso della maturazione del formaggio, confermata anche dall'evoluzione delle conte microbiche (Tabella 3).

Nella tabella 6 sono riportati i risultati relativi alla determinazione del profilo volatile-aromatico dei formaggi a 24 ore dalla produzione. Il tipo di coltura utilizzata, in generale, non ha influenzato il profilo quali-quantitativo dei composti volatili-aromatici determinati nei formaggi a 24 ore dalla produzione. L'unica eccezione è rappresentata dai chetoni che risultano essere significativamente più abbondanti sia nel formaggio controllo che nel formaggio SC, rispetto al formaggio SB. I chetoni sono inoltre i composti chimici più rappresentativi del profilo aromatico dei formaggi non maturi sia nel controllo (48%) che nei formaggi prodotti con l'aggiunta delle colture protettive (45% DC, 46% SB, 45% SC, figura 1). Il composto chetonico responsabile di questo andamento è il diacetile (2,3-butandione) che si sviluppa, soprattutto nella prima fase di stagionatura, in seguito al metabolismo del citrato ad opera dei batteri lattici citrato-fermentanti. Nei formaggi a 20 giorni di maturazione l'aggiunta della coltura protettiva non ha avuto alcun effetto sul profilo dei composti volatili aromatici (Tabella 7). E' interessante comunque sottolineare che il contenuto tendenzialmente più elevato, riscontrato nei formaggi prodotti con l'aggiunta delle colture protettive rispetto al controllo, dei composti appartenenti alla classe degli acidi potrebbe giustificare il valore di pH più basso degli stessi formaggi (Tabella 5). Nel corso della maturazione è stato rilevato, in generale, un aumento dei composti volatili (alcoli, acidi, aldeidi, esteri e altri composti) ad eccezione dei chetoni che invece tendono a diminuire (Figura 2).

I risultati dell'analisi dell'immagine sono esposti in tabella 8. La superficie dei formaggi a 20 giorni di maturazione è stata fotografata e le immagini ricavate dai due piatti di ciascuna delle forme analizzate (3

forme per ciascuna tesi) sono state sottoposte ad analisi dell'immagine mediante elaborazione delle stesse con il software ImageJ 1.48 v. L'elaborazione dell'immagine ha permesso di misurare l'area scura interessata dallo sviluppo delle muffe, espressa in mm^2 , sulla superficie di ciascun piatto delle forme analizzate. Come è possibile notare i formaggi prodotti con le colture protettive sperimentate presentavano una minor contaminazione fungina della superficie, rispetto al formaggio controllo (Controllo 27,1%, Coltura DC 2,7%, Coltura SB 20,9%, Coltura SC 4,9%). La differente capacità inibitoria esercitata dalle colture testate è anche apprezzabile dalle immagini della superficie delle forme, riportate in figura 3. I dati disponibili confermano che la coltura DC risulta essere quella con la maggior capacità inibente la microflora fungina di superficie, come già evidenziato nelle prove pre-sperimentali (Relazione 1).

Al fine di valutare l'influenza delle colture sulle caratteristiche sensoriali, i formaggi sono stati sottoposti al test di "differenza verso il controllo", un test aspecifico, che permette di quantificare le differenze percepite dai giudici tra i campioni ed il controllo. I risultati (figura 4) indicano che i formaggi prodotti con le colture protettive della Danisco (DC) sono risultati significativamente ($p=0,05$) differenti rispetto al controllo (CTS), mentre i giudici non hanno percepito delle differenze significative tra i formaggi prodotti con le colture Sacco (SB e SC) e il controllo, a conferma di quanto riscontrato durante le prove pre-sperimentali (Relazione 1).



Tabelle e figure

Tabella 1 - Parametri tecnologici rilevati nel corso delle prove sperimentali (media±d.s.)

	Controllo	Coltura		
		DC	SB	SC
Quantità di latte (kg)	12	12	12	12
Caratteristiche fisico-chimiche del latte (valori medi delle tre repliche)				
- pH (UpH)	6,67±0,01			
- Grasso %	6,61±0,98			
- Proteina %	6,06±0,43			
- Grasso/proteina (-)	1,09±0,08			
Trattamento termico (°C x s)	72 x 15	72 x 15	72 x 15	72 x 15
Coltura protettiva	nessuna	HOLDBAC YM- XPK LYO 500 DCU	LYOFAST BG112	LYOFAST LPR A
Quantità coltura protettiva (g/kg)		0,0077	0,0180	0,0120
Coltura starter	CHOOZIT TA 62 LYO - 50 DCU	CHOOZIT TA 62 LYO - 50 DCU	CHOOZIT TA 62 LYO - 50 DCU	CHOOZIT TA 62 LYO - 50 DCU
Quantità coltura starter (g/kg)	0,011	0,011	0,011	0,011
Quantità di caglio utilizzato (g/kg)	0,10±0,02	0,10±0,02	0,10±0,02	0,10±0,02
Temperatura di coagulazione (°C)	37,2±0,29	37,5±0,50	37,2±0,29	37,3±0,29
Caglio utilizzato (-)	Maxiren 600 (DSM)	Maxiren 600 (DSM)	Maxiren 600 (DSM)	Maxiren 600 (DSM)
Durata della presa (min)	13,33±0,76	14,68±2,92	14,77±3,18	14,90±3,05
Durata dell'indurimento (min)	18,33±0,76	19,68±2,92	19,77±3,18	19,90±3,05
Rottura (min)	5,00	5,00	5,00	5,00
Temperatura di stufatura (°C)	36,00	36,00	36,00	36,00
Durata della stufatura (min)	179±25	186±19	182±26	186±33
pH del formaggio a fine stufatura (UpH)	5,83±0,03	5,82±0,03	5,82±0,03	5,82±0,03
Durata acidificazione (min)	234±24	226±34	218±45	223±30
pH del formaggio a fine acidificazione (UpH)	5,60±0,00	5,60±0,00	5,58±0,08	5,62±0,03
pH del formaggio alle 24 ore (UpH)	5,30±0,09	5,29±0,06	5,39±0,12	5,37±0,09
Salatura a secco - Sale (g/kg)	20,00	20,00	20,00	20,00
Stagionatura (giorni)	20,00	20,00	20,00	20,00
Temperatura di stagionatura (°C)	9,00	9,00	9,00	9,00
Isteresi temperatura di stagionatura (°C)	2,00	2,00	2,00	2,00
Umidità stagionatura (%)	90,00	90,00	90,00	90,00
Tolleranza umidità (%)	5,00	5,00	5,00	5,00
Forme prodotte	4,00	4,00	4,00	4,00
Peso alle 24 ore dalla produzione (kg)	3,4±0,4	3,4±0,4	3,6±0,4	3,6±0,4
Resa del formaggio alle 24 ore (kg)	28,6±3,4	28,7±3,1	29,7±3,6	29,9±3,2

Tabella 2 – Determinazioni analitiche effettuate e metodologie utilizzate

Campioni	Analisi e metodi analitici
Latte Formaggio alle 24 ore Formaggio a maturazione (20 giorni)	<p><i>Analisi microbiologiche</i></p> <p>Preparazione del campione⁽¹⁾</p> <p>Conta delle coltura protettiva: terreno FH agar (facultative heterofermentative agar), incubazione 72 ore in anaerobiosi a 37 °C⁽²⁾</p> <p>Conta mesofila totale: terreno MPCA agar (Milk Plate Count Agar), incubazione 72 ore in aerobiosi a 30°C.</p>
Latte	<p><i>Analisi fisico-chimiche</i></p> <p>Milkoscan (Foss Italia)</p> <p>Sostanza secca⁽³⁾</p>
Formaggio alle 24 ore	<p>pH (metodo potenziometrico con pHmetro Crison Basic 20+)</p> <p>Sostanza secca⁽⁴⁾</p> <p>Grasso (metodo Soxhlet)</p> <p>Azoto totale⁽⁵⁾</p> <p>Proteolisi NS, NS-TCA,NS-PTA⁽⁶⁾</p> <p>Profilo dei composti volatili - aromatici</p>
Formaggio a maturazione (20 giorni)	<p>pH (metodo potenziometrico con pHmetro Crison Basic 20+)</p> <p>Sostanza secca⁽⁴⁾</p> <p>Grasso (metodo Soxhlet)</p> <p>Azoto totale⁽⁵⁾</p> <p>Proteolisi NS, NS-TCA,NS-PTA⁽⁶⁾</p> <p>Profilo dei composti volatili - aromatici</p> <p>Analisi dell'immagine a 8-bit (superficie dei formaggi) (Software Image J)</p>
Formaggio a maturazione (20 giorni)	Analisi sensoriali - Test di valutazione della differenza tra i campioni in esame

⁽¹⁾ Norma FIL-IDF standard 122C (IDF, 1996); ⁽²⁾ Isolini D, Grand M, Glättli H. 1990. Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. Schweiz. Milchw. Forsch. 19: 57–59; ⁽³⁾ IDF. (1987), Milk, Cream and Evaporated Milk – Total Solids. Standard 21B. Brussels, Belgium: International Dairy Federation; ⁽⁴⁾ ISO (2004) Cheese and processed cheese - Determination of the total solids content (Reference method) ISO 3433-IDF 222. International Standardisation Organisation, Geneva, Switzerland; ⁽⁵⁾ IDF (1993) Nitrogen content of milk and milk products IDF Standard 20 B. International Dairy Federation, Brussels, Belgium; ⁽⁶⁾ Gripon J C, Desmazeaud M J, Le Bars D, Bergere J L (1975) Etude du rôle des microorganismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. Lait 55 502-516.

Tabella 3 – Analisi microbiologiche del latte e dei formaggi a 24 ore e a maturazione (20 giorni) (media±d.s.)

		Carica mesofila totale MPCA ⁽¹⁾ (Log UFC/mL)	Conta della coltura protettiva FH ⁽²⁾ (Log UFC/mL)
Latte	Controllo	2,45 ± 1,10	
	Coltura DC	6,49 ± 0,29	6,50 ± 0,25
	Coltura SB	6,09 ± 0,20	6,06 ± 0,20
	Coltura SC	6,16 ± 0,22	6,15 ± 0,24
Formaggio alle 24 ore	Controllo	8,86 ± 0,59	
	Coltura DC	8,66 ± 0,46	7,11 ± 0,30
	Coltura SB	8,36 ± 0,35	6,66 ± 0,10
	Coltura SC	8,77 ± 0,63	6,83 ± 0,44
Formaggio a maturazione	Controllo	9,55 ± 0,04	
	Coltura DC	9,26 ± 0,42	8,44 ± 0,49
	Coltura SB	8,87 ± 0,09	7,92 ± 0,26
	Coltura SC	9,48 ± 0,10	8,30 ± 0,21

⁽¹⁾ MPCA: Milk Plate Count Agar; ⁽²⁾ FH: facultative heterofermentative agar.

Tabella 4 - Composizione fisico-chimica del formaggio alle 24 ore dalla produzione (media \pm d.s.)

	Controllo	Colture			Significatività
		DC	SB	SC	
pH (UpH)	5,30 \pm 0,09	5,29 \pm 0,06	5,39 \pm 0,12	5,37 \pm 0,09	ns
Sostanza secca %	43,2 \pm 0,70	42,8 \pm 0,18	41,9 \pm 0,50	41,7 \pm 0,22	ns
Grasso %	22,1 \pm 0,92	21,8 \pm 1,37	21,2 \pm 0,61	21,4 \pm 0,90	ns
Grasso/sostanza secca %	51,2 \pm 2,21	51,0 \pm 3,05	50,7 \pm 1,54	51,2 \pm 1,93	ns
Proteina %	17,5 \pm 0,69	17,8 \pm 0,51	17,2 \pm 0,64	17,2 \pm 0,91	ns
Proteina /sostanza secca %	40,5 \pm 1,32	41,6 \pm 1,36	41,1 \pm 1,24	41,3 \pm 2,36	ns
NS/NT % ⁽¹⁾	9,6 \pm 0,92	9,1 \pm 0,21	9,8 \pm 0,67	9,8 \pm 0,30	ns
NSTCA/NT % ⁽²⁾	4,4 \pm 0,56	4,2 \pm 0,29	3,7 \pm 0,43	3,7 \pm 0,61	ns
NSPTA/NT % ⁽³⁾	1,5 \pm 0,56	1,6 \pm 0,52	1,5 \pm 0,37	1,8 \pm 0,03	ns

⁽¹⁾NS/NT: azoto solubile/azoto totale; ⁽²⁾NS-TCA/NT: azoto solubile in acido tricloracetico/azoto totale; ⁽³⁾NS-PTA/NT: azoto solubile in acido fosfotungstico/azoto totale. Medie sulla riga affiancate da lettere diverse, sono statisticamente differenti (** Significatività p<0,05); ns, non significativo.

Tabella 5 - Composizione fisico-chimica del formaggio a maturazione (20 giorni) (media \pm d.s.)

	Controllo	Colture			Significatività
		DC	SB	SC	
pH (UpH)	5,31 \pm 0,08 ^a	5,02 \pm 0,02 ^b	5,07 \pm 0,05 ^b	5,05 \pm 0,05 ^b	**
Sostanza secca %	50,2 \pm 0,5	50,1 \pm 1,9	49,4 \pm 1,5	49,3 \pm 1,8	ns
Grasso %	26,0 \pm 0,7	25,8 \pm 0,5	25,6 \pm 0,4	25,4 \pm 0,3	ns
Grasso/sostanza secca %	51,7 \pm 1,8	51,6 \pm 2,0	51,7 \pm 0,9	51,6 \pm 1,5	ns
Proteina %	19,1 \pm 1,0	19,0 \pm 1,6	19,0 \pm 1,9	18,9 \pm 1,5	ns
Proteina /sostanza secca %	38,1 \pm 1,6	37,9 \pm 1,9	38,5 \pm 2,7	38,4 \pm 1,8	ns
NS/NT % ⁽¹⁾	14,0 \pm 1,0	15,2 \pm 0,6	14,7 \pm 1,2	14,8 \pm 1,0	ns
NSTCA/NT % ⁽²⁾	5,7 \pm 0,6	6,6 \pm 0,7	5,8 \pm 0,5	6,6 \pm 0,9	ns
NSPTA/NT % ⁽³⁾	1,8 \pm 0,3	2,0 \pm 0,8	1,7 \pm 0,3	1,7 \pm 0,4	ns

⁽¹⁾NS/NT: azoto solubile/azoto totale; ⁽²⁾ NS-TCA/NT: azoto solubile in acido tricloracetico/azoto totale; ⁽³⁾ NS-PTA/NT: azoto solubile in acido fosforico/azoto totale. Medie sulla riga affiancate da lettere diverse, sono statisticamente differenti (** Significatività $p < 0,05$); ns, non significativo.

Tabella 6 - Profilo volatile-aromatico del formaggio a 24 ore dalla produzione (media \pm d.s.)

	Controllo	Colture			Significatività
		DC	SB	SC	
Alcoli	20541 \pm 4088	19108 \pm 3254	21420 \pm 5613	20945 \pm 5424	ns
Acidi	38677 \pm 9965	40789 \pm 8317	36349 \pm 12418	42844 \pm 14067	ns
Aldeidi	3973 \pm 985	4893 \pm 604	4104 \pm 876	4596 \pm 1074	ns
Chetoni	106469 ^a \pm 1552	99649 ^{bc} \pm 4147	95349 ^c \pm 453	102912 ^{ab} \pm 2603	**
Esteri	2002 \pm 677	3481 \pm 522	2066 \pm 472	2842 \pm 972	ns
Altri composti	47462 \pm 9193	53725 \pm 14972	46293 \pm 12943	54814 \pm 11842	ns
Composti volatili totali	219124 \pm 20018	221645 \pm 30190	205581 \pm 23770	228954 \pm 31542	ns

Medie sulla riga affiancate da lettere diverse, sono statisticamente differenti (** Significatività $p < 0,05$); ns, non significativo.

Tabella 7 - Profilo volatile-aromatico del formaggio a maturazione (20 giorni) (media±d.s.)

	Controllo	Colture			Significatività
		DC	SB	SC	
Alcoli	116658 ± 55972	91322 ± 69821	96891 ± 53781	100352 ± 67716	ns
Acidi	72737 ± 14821	110386 ± 20816	101443 ± 13430	97157 ± 7623	ns
Aldeidi	7175 ± 2322	5445 ± 975	6535 ± 2248	5582 ± 1626	ns
Chetoni	78428 ± 13658	87228 ± 17474	79361 ± 16811	80339 ± 20112	ns
Esteri	10291 ± 6048	9255 ± 5571	7970 ± 5373	8458 ± 4194	ns
Altri composti	71500 ± 42839	74045 ± 35485	55795 ± 25757	56933 ± 37060	ns
Composti volatili totali	356790 ± 27339	377681 ± 47716	347996 ± 39327	348822 ± 20703	ns

Medie sulla riga affiancate da lettere diverse, sono statisticamente differenti (** Significatività p<0,05); ns, non significativo.

Tabella 8 – Risultati dell’analisi dell’immagine sulla superficie dei formaggi a maturazione (20 giorni) (media±d.s.)

	Controllo	Colture		
		DC	SB	SC
Superficie del formaggio analizzata (mm ²) (1)	47124	47124	47124	47124
Superficie interessata dallo sviluppo delle muffe (mm ²)	2240	322	1664	421
Superficie interessata dallo sviluppo delle muffe (%)	27,1	2,7	20,9	4,9

(1) Somma della superficie dei due piatti delle forme analizzate.

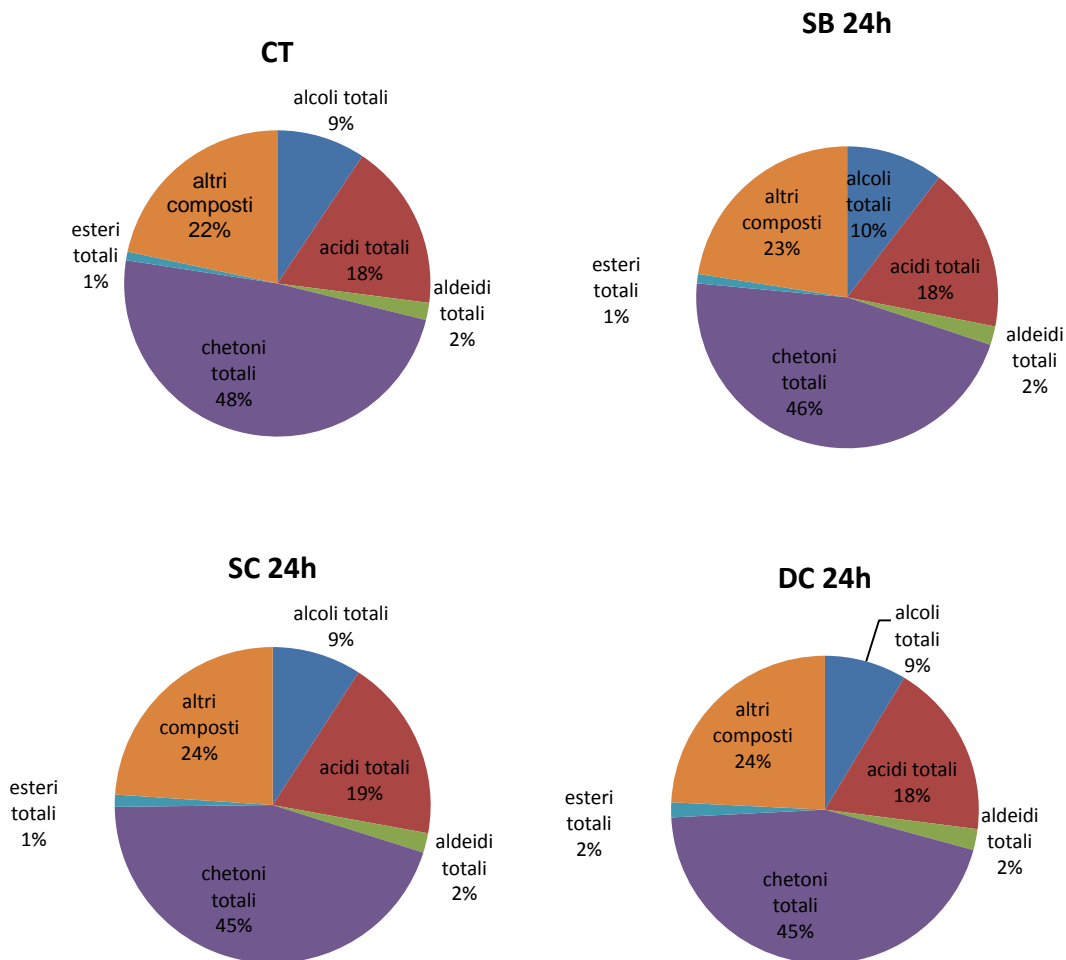


Figura 1- Profilo percentuale dei composti aromatici nei formaggi a 24 ore dalla produzione

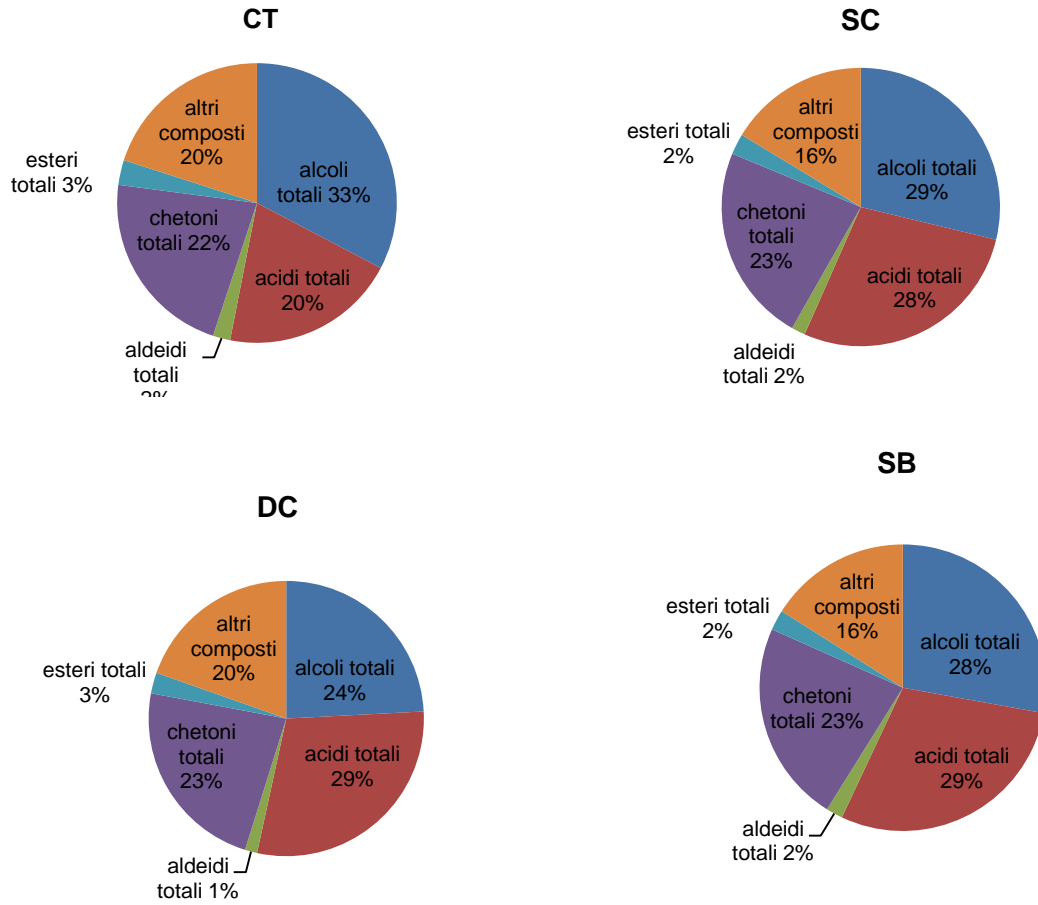


Figura 2- Profilo percentuale dei composti aromatici nei formaggi a maturazione (20 giorni)



Controllo



Coltura SB



Coltura DC



Coltura SC

Figura 3 - Immagini relative alla superficie dei formaggi dopo 20 giorni di maturazione

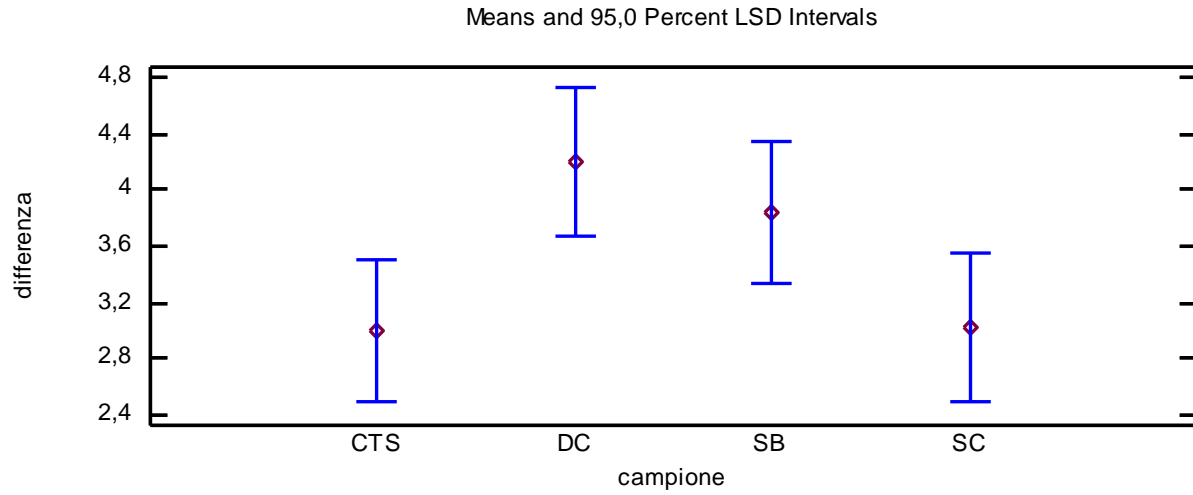


Figura 4 – Media e deviazione standard dei dati ottenuti attraverso il test sensoriale “differenza vs il controllo”

Conclusioni finali

I risultati delle prove condotte nell'ambito del progetto BIO.ME.CO hanno permesso di verificare l'effettiva capacità inibitoria di alcune colture selezionate, disponibili sul mercato dei coadiuvanti tecnologici e per le quali le informazioni tecnico-scientifiche a disposizione, risultavano insufficienti per permettere alle aziende di intraprendere una strategia biologica di controllo della microflora di superficie del formaggio.

E' stato possibile definire le condizioni operative di utilizzo delle colture protettive selezionate, nell'ambito di una tecnologia di fabbricazione di un formaggio di pecora a pasta molle e breve periodo di maturazione. Le colture testate hanno mostrato differenze nella capacità di inibizione della microflora fungina di superficie, tale capacità risultata più elevata in due delle tre colture utilizzate (DC ed SC). E' stato riscontrato che l'attività inibitoria delle colture testate talvolta risulta inefficace rispetto ad alcune specie fungine, non classificate, probabilmente appartenenti al genere *Mucor*, tale aspetto potrebbe essere approfondito in future ulteriori ricerche.

L'attività metabolica esercitata dalle colture utilizzate, non interferisce sui parametri tecnologici di trasformazione e sulla composizione fisico-chimica dei formaggi ma, è causa di una parziale post-acidificazione nella fase di maturazione dei formaggi, che determina differenze nel loro valore di pH. Si ritiene che tale aspetto possa essere risolto riducendo la temperatura di maturazione (6-7°C) e contenendone il campo di variazione (isteresi 1°C). Le differenze del pH, riscontrate nei formaggi sperimentali a maturazione rispetto al controllo, hanno probabilmente influito sulla valutazione sensoriale dei formaggi. Non sono stati eseguiti test sensoriali di valutazione del grado di accettabilità dei formaggi, ma dagli assaggi eseguiti dai tecnici e ricercatori, i formaggi sperimentali hanno presentato caratteristiche di struttura e sapore in linea con quelle tipiche di questa categoria di prodotto.