

WP2: Attività di campo e laboratorio sul formaggio spalmabile

Partner coinvolti: Capofila (A1), Dipartimento di Agraria (D1), Azienda Savoia (B1)

Il WP2 ha come focus la Lattica, un formaggio fresco spalmabile prodotto dall'Azienda Savoia. Situata a Roccabascerana (AV), l'azienda ha aderito al modello della filiera corta ed ha sostituito nel proprio allevamento le vacche Frisone con 19 esemplari di Pezzata Rossa. Le produzioni equilibrate, la resistenza alle malattie, la fertilità, la longevità, la capacità di adattamento e l'attitudine al pascolo sono caratteristiche che rendono questa razza interessante per tutti i contesti produttivi. La produzione media è di 7.146 kg di latte al 3,91% di grasso e 3,44% di proteine, con un contenuto in cellule somatiche sensibilmente inferiore rispetto ad altre razze a più ampia diffusione, che, quindi, si traduce in una resa casearia maggiore. I formaggi freschi spalmabili, utilizzati principalmente in dessert o come creme spalmabili, sono apprezzati da consumatori di tutte le età, in tutto il mondo, difatti, hanno un mercato di circa 2,2 miliardi di kg annualmente, con un tasso di crescita annuale del 2,7% tra il 2017 e il 2019.

Il prodotto in questione ha una lavorazione del tutto singolare. Subito dopo la mungitura, il latte viene abbattuto termicamente a circa 4°C per poi essere destinato al processo di caseificazione. Prima del trattamento termico previsto dalla tecnologia di produzione, l'operatore del settore alimentare misura l'acidità titolabile, che, nel caso di questa tipologia di prodotto, non deve superare 3,7 °SH, difatti, in caso di superamento, il latte verrà destinato ad una differente lavorazione. Con la polivalente "polyfood" il latte viene riscaldato fino ad una temperatura di 93°C per circa 2 minuti, dopodiché raffreddato a 39,9°C. Il trattamento termico "strong" consente di ridurre la presenza di microrganismi autoctoni indesiderati, che potrebbero interferire negativamente con lo sviluppo dello starter. Infatti, è prevista l'aggiunta di una formulazione commerciale di liofilizzato di fermenti, il quale viene aggiunto insieme all'estratto concentrato di caglio liquido (1g). Lo starter, prodotto dalla Prodor, infatti, oltre alle due colture tipiche della produzione di yogurt, ovvero *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, include cinque lattobacilli (*L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e *L. casei*) e un bifidobatterio (*Bifidobacterium bifidum*). Successivamente il latte viene tenuto a temperatura ambiente ricoperto da un telo, per circa 12h. Ottenuta la cagliata, questa viene salata, dopodiché trasferita in un panno di lino e tenuta nuovamente a temperatura ambiente per altre circa 12h, in maniera tale da ottenere la sineresi e lo spurgo del siero. Infine, il prodotto così ottenuto viene confezionato in un packaging di plastica, che può essere di diversa pezzatura. La Lattica è un formaggio estremamente versatile, che può avere vari utilizzi: tal quale, spalmato, in ricette dolci, come *cheesecake* e ricette salate.

Nell'ambito del wp 2.1 e 2.2 sono state effettuate analisi chimiche e microbiologiche per la ricerca di microrganismi patogeni e il conteggio di microrganismi indicatori di contaminazione fecale, sia nell'immediato post-produzione, che durante la conservabilità. Sono stati presi in esame campioni provenienti da un lotto di Lattica prodotto in data 29 marzo, secondo la tecnologia di produzione precedentemente descritta. Dall'azienda di produzione i campioni sono stati trasportati presso i laboratori di Ispezione degli alimenti del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni animali nel rispetto delle temperature di refrigerazione e stoccati in una camera di *shelf-life* ad una temperatura di $+3^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ per tutta la durata della prova. Le analisi sono state effettuate in duplicato, nel giorno di produzione (T₀), e nei giorni 5 (T₁), 9

(T₂), 12 (T₃), 16 (T₄) e 21 (T₅) post-produzione. Ad ogni tempo si è proceduto alle analisi chimiche, microbiologiche e sensoriali. È noto, infatti, che reazioni chimico-fisiche determinano sovente alterazioni delle caratteristiche organolettiche, nutrizionali e strutturali dei formaggi. Queste alterazioni possono arrivare a favorire indirettamente anche lo sviluppo microbico e spesso sono indotte o accelerate da fattori ambientali esterni, come luce, temperatura, umidità e presenza di ossigeno. Pertanto, sono stati rilevati ad ogni tempo ed in triplice misurazione il pH e l'*a_w*, parametri che condizionano fortemente la stabilità dei formaggi durante la conservazione (wp 2.1).

Per capire quali microrganismi potessero essere più problematici per il formaggio fresco spalmabile in esame sono state eseguite ricerche bibliografiche ed è stato stabilito di effettuare: la numerazione di flora totale mesofila e psicrofila, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, Stafilococchi-coagulasi positivi, *Bacillus cereus*/*Pseudomonas spp.*, batteri lattici, muffe e lieviti. Per quanto riguarda i microrganismi patogeni è stata effettuata la ricerca di *Salmonella spp.* e di *Listeria monocytogenes*. La presenza/assenza dei microrganismi patogeni (*Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus spp.*) è stata confermata tramite sistema di spettrofotometria di massa (MALDI TOF).

Con riferimento al punto 2.3 la sez. di Microbiologia del Dipartimento di Agraria in comunione con Fattoria Savoia ha avviato una serie di esperimenti volti ad accertare la percentuale di sopravvivenza in condizioni di transito gastro-intestinale simulato e durante la vita di scaffale degli otto ceppi adoperati come starter.

Tre lotti di formaggio Lattica sono stati sottoposti a digestione simulata in due tempi, ovvero nel giorno di produzione e dopo dieci giorni di conservazione a 4°C, al fine di monitorare la resistenza dei batteri lattici inclusi nello starter durante il passaggio in tratto gastrointestinale simulato. Nella prima prova, la carica iniziale del campione risultava nell'ordine di 10⁷UFC/g; nelle fasi successive si è verificato un abbassamento minimo della carica, che non è mai stata scesa al di sotto di 10⁶ UFC/g dimostrando così una buona resistenza all'attività enzimatica ed alle condizioni di acidità dello stomaco. Dalle piastre di conta di questo primo campione sono state isolate 18 colonie. Tutte quelle derivanti dalle piastre di conteggio dei lattobacilli dopo il passaggio nello stomaco e nel duodeno simulati sono risultate essere lieviti (13). Le rimanenti cinque colture sono state ascritte al gruppo di batteri lattici previo accertamento della reazione di Gram e dell'assenza di attività catalasica. Nessuno degli isolati ha prodotto gas da glucosio e tutti erano in grado di fermentare galattosio, maltosio e mannosio.

Gli isolati di morfologia bastoncellare sono stati sottoposti a test di crescita a 15°C overnight e test di fermentazione del ribosio. Tutti gli isolati sono stati sottoposti ad estrazione del DNA seguita da amplificazione a mezzo PCR della regione spaziatrice compresa tra i geni 16S e 23S dell'operone che codifica per gli RNA ribosomiali. I LAB caratterizzati da un doppietto a 320bp e una banda a 520 bp sono stati riportati al genere *Lactobacillus spp.* L'appartenenza alle specie *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. acidophilus* è stata confermata mediante PCR specie-specifica.

Un ceppo di morfologia coccica (A₂) isolato da saliva simulata dalla diluizione 10⁻³, e in grado di crescere 45 ma non a 10°C ed è stato confermato appartenere alla specie *Streptococcus thermophilus* sulla scorta della spacer analysis.

Nonostante la visibile proliferazione di muffe, il primo campione di lattica è stato comunque sottoposto a digestione simulata dopo 10 giorni di conservazione a 4°C. Dopo la

frigoconservazione si registra un leggero abbassamento della carica iniziale da circa 10^7 CFU/g a 10^6 CFU/g che, comunque durante rimane pressoché costante durante le varie fasi della digestione. Anche in questo caso il grosso degli isolati è risultato essere lieviti o muffe all'analisi microscopica. Sono stati infatti isolate 13 colture di lieviti di cui una dal formaggio tal quale, 5 dalla fase gastrica simulata e 7 da quella duodenale. Solo due colture sono state inquadrare come LAB. Entrambe avevano morfologia coccica ed erano in grado di fermentare ribosio, galattosio, mannosio e maltosio. Essendo capaci di crescere sia a 10, sia a 45°C, i due ceppi sono stati riportati al genere *Enterococcus spp.* La spaceranalysis ha consentito di inquadrare il ceppo O1 come *Enterococcus faecalis* perché caratterizzato da un doppietto con una banda a 300 e una a 400 bp.

Allo scopo di verificare se il riscontrato esubero di lieviti fosse da ritenersi un evento episodico è stato analizzato con il medesimo protocollo un secondo campione di lattica prelevato in azienda ad oltre un mese di distanza dal primo. In questo caso la carica iniziale del formaggio è risultato di circa 10^9 UFC/g, e quindi molto superiore a quella del campione precedente. Contrariamente a quanto riportato per il campione I, la carica iniziale, a seguito della digestione, ha subito un abbassamento di circa 2 log UFC /g. Inoltre, in questo campione non è stato possibile monitorare la carica al decimo giorno di frigoconservazione, perché dopo soli tre giorni il formaggio mostrava un copioso sviluppo di muffe. Questo comportamento si è presumibilmente riflesso nell'elevata carica iniziale del campione che è stata poi attribuita alla presenza di lieviti e muffe. Dalle piastre di conta del campione II al tempo zero sono state isolate 20 colonie. Anche in questo caso tutte quelle derivanti dalle piastre di conteggio dopo transito in succo gastrico e duodenale, all'osservazione al microscopio, sono risultate essere lieviti (n. 3). I batteri lattici sono stati infatti prevalentemente recuperati dal formaggio prima di essere sottoposto alla digestione simulata. Anche in questo caso, su 17 isolati ascrivibili ai LAB, solo due sono risultati di morfologia coccica, ed essendo in grado di crescere sia a 10, sia a 45°C, sono stati ascritti al genere *Enterococcus spp.* In particolare, la spaceranalysis ha consentito di inquadrare il ceppo CBP come *Enterococcus faecalis*. Dei 15 batteri lattici di morfologia bastoncellare, e confermati essere lattobacilli mediante spaceranalysis, nessuno è risultato eterofermentante obbligato. Inoltre, tutti crescevano a 15°C ed erano in grado di fermentare ribosio, maltosio, galattosio e mannosio. Mediante PCR specie-specifica sono stati riportati alla specie *L. rhamnosus* 7 ceppi isolati dallo step in saliva simulata, un ceppo isolato dal formaggio tal quale e uno dopo fase duodenale dimostrando che almeno questa specie presente nello starter adoperato per la produzione è in grado di giungere al colon vivo e vitale in ragione di almeno 4 Log UFC/g, dal momento che questo ceppo era stato isolato da una piastra di conta seminata con diluizione 10^{-4} .

Tre ceppi, tutti provenienti dal passaggio in saliva simulata, sono stati ascritti alla specie *L. casei*. Infine, i ceppi tre sono stati riportati come *Lactobacillus spp.* e per essi si rende necessario il sequenziamento del gene 16S nell'ambito dell'operone che codifica per gli RNA ribosomiali per addivenire alla definizione della specie.

Per il terzo lotto di lattica analizzato - campione III - sono stati utilizzati tre diversi substrati per monitorare l'evoluzione della microflora durante transito gastro-intestinale simulato. Oltre all'MRS sono stati impiegati MRS con aggiunta di cicloesimide per inibire la crescita di lieviti e muffe, e DRBC per il conteggio specifico di funghi. Il monitoraggio ha confermato il risultato

atteso: i conteggi su MRS sono molto più alti di quelli di MRS aggiunto diciclosimide in grado di inibire la crescita dei lieviti. Questo outcome conferma l'ipotesi formulata in precedenza per i campioni I e II, che attribuiva l'elevata carica iniziale registrata su questo substrato ai lieviti presumibilmente presenti nel latte di partenza. Ulteriore conferma è fornita dai risultati dei conteggi su DRBC: il livello dei lieviti nel formaggio fresco, era pari a circa 10^5 log UFC/g, mentre quello dei LAB di circa 10^7 log UFC/g. I LAB in fase gastrica scendevano a livelli di carica pari a circa 10^3 log UFC/g, per poi ristabilirsi a fine digestione nuovamente intorno a 10^5 log UFC/g. Al contrario, il livello dei lieviti è rimasto pressoché invariato durante la digestione attestandosi intorno a 10^5 log UFC/g.

Dopo dieci giorni, si è verificato un leggero abbassamento del pH del campione, dovuto al proseguire delle fermentazioni durante la conservazione a 4°C, ciononostante la carica iniziale del formaggio fresco non ha subito variazioni di rilievo. I LAB hanno mostrato una maggiore resistenza al succo gastrico; i loro livelli, infatti, non sono mai scesi sotto 10^4 log CFU/g. Anche in questo caso, i livelli dei lieviti sono rimasti costanti, fatta eccezione per la fase gastrica, dove hanno mostrato una riduzione di circa 1 log.

Nei tre campioni di formaggio fresco, il pH è stato monitorato in ciascuna delle quattro fasi. Come si può evince dai grafici, nel tempo si è verificata una riduzione del parametro che è passato da valori di circa 5,6 nel campione I a 4,5 nel campione III. Tale diminuzione è da attribuire alle diverse condizioni ambientali, in particolare alla temperatura. Infatti, il primo campione è stato analizzato nel periodo primaverile, con temperatura ambiente intorno ai 25°C, mentre l'ultimo nel periodo estivo, con temperature intorno ai 30°C. Dal campione III sono state isolate circa 58 colonie. Dieci colonie, cinque dal campione al tempo zero e tutte isolate da piastre di MRS privo di cicloesimide, in seguito ad osservazione al microscopio, sono risultate essere lieviti.

Tutti gli isolati sono stati preliminarmente valutati mediante reazione di Gram, attività della catalasi, fermentazione di ribosio e galattosio e test di crescita a 15°C overnight. I 67 isolati, in seguito ad osservazione al microscopio sono risultati di morfologia bastoncellare e hanno mostrato lo stesso comportamento ai test ovvero erano in grado di fermentare entrambi gli zuccheri e crescere a 15°C. In particolare, 8 ceppi sono stati isolati da formaggio, 12 da saliva simulata, 7 da succo gastrico simulato, e 5 da succo duodenale simulato del campione al tempo zero. Dal formaggio dopo dieci giorni di frigoconservazione sono stati isolati 3 ceppi da formaggio, 12 da saliva simulata, 4 da succo gastrico simulato e 15 da succo duodenale simulato. Per questi ceppi è attualmente in corso l'identificazione su base molecolare.

La ricorrente presenza di enterococchi e l'isolamento preferenziale di solo due dei lattobacilli presenti nello starter adoperato dall'azienda Savoia, ovvero *L. casei* e *L. rhamnosus* ha spinto ad effettuare una caratterizzazione dello stasso adoperando gli stessi substrati e condizioni. A seguito dell'identificazione ben cinque isolati su 12 sono risultati ascrivibili alla specie *Enterococcus faecalis* e i lattobacilli identificati sono i medesimi evidenziati durante la digestione simulata. Ulteriori indagini sono in corso per addivenire ad una comprensione della natura dello starter adoperato dall'azienda per produrre la Lattica e sull'adattabilità alle condizioni di processo.