

Il progetto, si è articolato in diverse attività di ricerca che hanno riguardato sia lo studio e l'applicazione di nuove tecnologie in fase di lavorazione e di conservazione del prodotto sia la messa a punto di nuove colture microbiche autoctone e lo studio di fattori, come l'attacco fagico, che possono comprometterne l'attività.

Attività di ricerca 1

Obiettivo

Standardizzazione della resa e riduzione delle problematiche di spurgo e perdita di consistenza in formaggi molli, in particolare stracchino e casatella.

Attività realizzata

La ricerca si proponeva di valutare gli effetti di una nuova tecnologia di standardizzazione della fase di coagulo basata sull'iniezione di anidride carbonica nel latte.

Secondo diversi Autori l'acidificazione del latte mediante aggiunta di CO₂ gassosa se da un lato, grazie al suo effetto batteriostatico, può consentire di prolungare la conservabilità del latte, dall'altro può determinare un abbassamento del pH del latte, modulabile in funzione delle necessità tecnologiche di trasformazione, determinando un sensibile aumento dell'attività del caglio con conseguente riduzione della quantità da utilizzare in caseificazione. Ciò può influenzare le caratteristiche del coagulo con effetti sia sulla resa di caseificazione che sulle successive caratteristiche organolettiche del prodotto.

Lo studio fin qui condotto si è proposto di verificare l'effetto dell'aggiunta della CO₂ gassosa sull'attività di colture starter di batteri lattici comunemente impiegate nella produzione di formaggi. Sono state testate diverse colture starter per formaggi molli costituite da ceppi appartenenti unicamente alla specie *Streptococcus thermophilus* o da ceppi di *S. thermophilus* associati a ceppi di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Le prove effettuate hanno indicato una diversa risposta alla CO₂ delle colture esaminate; in particolare, alcune colture non risultavano influenzate dalla presenza dell'anidride carbonica, altre evidenziavano un rallentamento della loro velocità di acidificazione.

Da tali risultati si deduce che l'eventuale applicazione della tecnologia di addizione della CO₂ in caseificazione dovrebbe essere preceduta da una valutazione dell'attività dello starter, per verificare eventuali effetti batteriostatici imputabili alla presenza dell'anidride carbonica.

Sono stati inoltre effettuati esami lattodinamografici in latte di Alta Qualità o in latte crudo acidificato con CO₂ gassosa e addizionato con concentrazioni diverse di caglio liquido. Tali esami hanno evidenziato come la correzione del pH con CO₂ consenta effettivamente una riduzione della quantità di caglio utilizzata.

Nel complesso lo studio finora effettuato, che verrà completato con delle prove sperimentali di caseificazione, suggerisce che la metodologia di standardizzazione dell'acidità del latte destinato a caseificazione con CO₂ può trovare applicazione nella tecnologia di trasformazione del latte in formaggi a rapido consumo, dove potrebbe consentire dei vantaggi nel controllo dello spurgo dei prodotti in fase di commercializzazione e nella riduzione di fenomeni proteolitici della pasta generati dagli enzimi coagulanti. La metodologia potrebbe inoltre dare ulteriori importanti vantaggi mettendo i caseifici nelle condizioni di trasformare latte con caratteristiche tecnologiche costanti in qualsiasi periodo dell'anno. Ciò che frena la diffusione dell'innovativa tecnologia nell'industria casearia è l'assenza di riferimenti legislativi necessari ad una legittimazione in campo alimentare anche se in alcuni Paesi europei tale metodologia è già in uso in produzione casearie non a denominazione di origine.

Attività di ricerca 2

Il confezionamento in atmosfera modificata è una tecnologia di conservazione degli alimenti che comporta la sostituzione dell'aria, normalmente presente nella confezione, con uno o più tipi di gas, da soli o in miscela tra loro, in concentrazioni tali da tenere sotto controllo lo sviluppo della flora microbica dell'alimento, mantenerne stabili le caratteristiche sensoriali e prolungarne la conservabilità. La presente attività di ricerca si è posta due obiettivi; un primo obiettivo ha riguardato la valutazione dell'impiego di due diverse miscele di gas e due diverse tipologie di packaging nella conservazione di formaggi freschi, il secondo ha previsto lo studio dell'effetto della conservazione in atmosfera modificata sulle caratteristiche sensoriali dei formaggi duri.

Obiettivo 1

Conservazione formaggi freschi in atmosfera modificata

Attività realizzata

L'attività ha previsto la realizzazione, in collaborazione con un'azienda di packaging, di prove sperimentali in cui sono state utilizzate per la conservazione di formaggi stracchino e casatella, due tipologie di atmosfera modificata costituite da miscele di gas in diverse proporzioni (atmosfera 30, costituita da 70% di azoto e 30% di anidride carbonica e atmosfera 50, costituita da 50% azoto e 50% anidride carbonica) e due diversi sistemi di packaging (tipologia tradizionale e tipologia con film biodegradabile). I prodotti sono stati valutati per le loro caratteristiche microbiologiche e sensoriali. Relativamente agli esiti dell'analisi microbiologica, le ripetizioni disponibili non hanno consentito di effettuare una valutazione statistica dei risultati e di dare un giudizio definitivo sulle tesi esaminate; tuttavia, per quanto riguarda sia i lieviti che i coliformi si evidenzia una maggiore presenza di questi microrganismi nei campioni in atmosfera modificata 50 rispetto ai campioni in atmosfera modificata 30. Per quanto riguarda l'analisi sensoriale, essa è stata effettuata a ridosso della scadenza sui campioni di stracchino con packaging tradizionale e conservati in atmosfera 30 e 50. Per l'analisi sensoriale è stato utilizzato un test triangolare in cui a ciascun giudice, a cui era stato fornito un set costituito da tre campioni di cui due uguali ed uno diverso, veniva chiesto di riconoscere i campioni diversi. Sui 30 triangoli di campioni utilizzati 15 sono stati riconosciuti diversi, il che indica che esiste una differenza significativa tra i campioni, anche se va tenuto presente che per quanto riguarda la significatività del test è appena al di sotto del valore soglia dello 0.05% (0.0435).

Obiettivo 2

Valutazione delle caratteristiche sensoriali di formaggi duri confezionati in atmosfera modificata

Attività realizzata

Sono state svolte una serie di indagini allo scopo di indagare sulle caratteristiche sensoriali di formaggi duri, a differente grado di stagionatura, e sottoposti a diversi sistemi di confezionamento in atmosfera modificata.

In particolare sono state effettuate diverse prove con l'obiettivo di:

- valutare le modifiche organolettiche subite dal prodotto confezionato
- valutare la comparsa di sapori anomali sul prodotto confezionato nel tempo
- valutare eventuali differenze organolettiche tra formaggi conservati in atmosfera modificata, trattati in superficie e formaggi non trattati.
- stabilire una corretta shelf-life del prodotto confezionato in atmosfera modificata

E' stato condotto un piano d'indagine che ha coinvolto la medesima tipologia di formaggio con diversi periodi di stagionatura.

All'interno della tipologia si sono identificate due tesi, definite "trattato" e "non trattato", sottoposte ad analisi sensoriali e reologiche in tempi successivi al confezionamento (a 30, 60, 90, 120 e 180 giorni).

Le indagini ai tempi previsti, sono state condotte solamente dopo aver accertato la presenza di anomalie gusto-olfattive e l'effettiva rilevazione di differenze tra le tesi; in caso contrario, si consideravano i tempi di confezionamento successivi.

La ricerca delle eventuali differenze sensoriali è stata svolta mediante alcuni test di tipo discriminanti-qualitativi, definiti duo-trio test: sono stati presentati ai giudici tre campioni dei quali uno espressamente indicato di riferimento, e gli altri due codificati (uno di questi è uguale

al riferimento), ed è stato chiesto loro quale fra i due campioni codificati risulta essere diverso dal riferimento.

In parallelo all'analisi sensoriale sono state condotte sui prodotti prove reologiche di compressione uniassiale per la definizione delle caratteristiche strutturali.

Risultati

In generale il confronto tra le tesi "trattato" e "non trattato" non ha evidenziato differenze significative.

La mancanza di differenze è stata rilevata anche all'interno delle tipologie nei confronti svolti ai diversi periodi di conservazione.

I risultati del test duo trio non hanno manifestato differenze significative tra il numero di giudici che hanno riconosciuto il campione simile al riferimento e quelli che non l'hanno riconosciuto, quindi anche se esiste una proporzione diversa tra le risposte, tali differenze non sono confermate statisticamente.

Solamente in pochi casi sono state osservate differenze tra formaggi trattati e non, supportate anche dalla conferma statistica, in relazione a caratteristiche indipendenti dal trattamento di confezionamento subito.

I dati reologici confermano quelli sensoriali, in quanto non si osservano differenze nei trattamenti subiti dai campioni.

Concludendo, i diversi trattamenti effettuati sul prodotto non trasferiscono differenze sostanziali al prodotto confezionato, sia nei formaggi mediamente stagionati che in quelli con maggior grado di maturazione; non si sono inoltre osservate modifiche nelle caratteristiche di composizione (ad esempio in umidità) e neppure una modifica del grado di maturazione.

Inoltre i controlli intermedi al maggior periodo di confezionamento non hanno rilevato la comparsa di difetti, dimostrando che la shelf life dei prodotti può essere considerata valida almeno fino ai 180 giorni.

Attività di ricerca 3

Obiettivo

Miglioramento della qualità della mozzarella: il problema fago

Attività realizzata

La presenza di difettosità nella mozzarella ed in altre tipologie di formaggi può essere correlata a rallentamenti nei processi di acidificazione con conseguenti problematiche di tipo tecnologico o igienico sanitario. Tali rallentamenti sono per lo più imputabili alla presenza di fagi, virus che attaccano i ceppi di batteri lattici presenti nelle colture starter.

Nella presente attività progettuale, che ha coinvolto una delle aziende partecipanti al progetto, si è voluto verificare l'eventuale sensibilità dei lattoinnesti naturali liofilizzati, dei lattoinnesti naturali preparati in latte e delle colture commerciali impiegate nella produzione di mozzarella, a fagi presenti in caseificio ed in lavorazione. Entrambe le tipologie di coltura starter (naturale o commerciale) sono inoltre state sottoposte a tipizzazione molecolare allo scopo di verificare la loro composizione in termini di ceppi. E' noto infatti che colture costituite da più ceppi microbici sono meno soggette a problematiche di rallentamento o di perdita di attività dovute ad attacchi fagici, rispetto a colture costituite da uno o pochi ceppi.

Tipizzazione molecolare

Sono state sottoposte a tipizzazione molecolare sei diverse colture impiegate nella produzione di mozzarella; di queste, due erano colture starter commerciali (StC e StD), quattro rappresentavano altrettanti lattoinnesti naturali liofilizzati (lattoinnesto A e B) o preparati in latte (LIM27/09 e LI S84).

La tipizzazione molecolare è stata effettuata utilizzando il metodo molecolare RAPD-PCR. Tale metodologia consente di ottenere dei profili genetici specifici per ciascun ceppo in esame e permette di ottenere sia informazioni per la identificazione di specie sia di riconoscere eventuali ceppi diversi presenti all'interno di una data specie microbica. Dalle piastre di conta (terreno M17 agar) di ciascun campione sono state isolate e successivamente purificate dalle 10 (per le colture commerciali) alle 20 colonie microbiche (per le colture naturali). Le colonie sono state quindi sottoposte a due reazioni di RAPD-PCR utilizzando due diversi primer. I profili genetici ottenuti sono stati quindi elaborati utilizzando un apposito software che consente di ottenere una rappresentazione grafica della similarità tra ceppi (dendrogramma). A titolo di esempio viene riportato in Figura 1 il dendrogramma derivato dall'elaborazione dei profili RAPD-PCR relativi ai ceppi di *Streptococcus thermophilus* isolati dai lattoinnesti naturali liofilizzati considerati nel presente lavoro (lattoinnesto A e B).

La tipizzazione molecolare mediante RAPD-PCR ha consentito di individuare nelle colture esaminate 14 diversi profili genetici corrispondenti ad altrettanti ceppi di *S. thermophilus*; inoltre, è stata rilevata la presenza di più profili e quindi di più ceppi microbici all'interno di tutte le colture esaminate ad eccezione del lattoinnesto liofilizzato B nel quale è stato individuato un unico profilo genetico (Tabella 1). Va sottolineato che alcuni dei profili/ceppi rilevati risultano dominanti o particolarmente frequenti all'interno di una data coltura starter per cui l'eventuale presenza di fagi attivi nei confronti di questi ceppi potrebbe compromettere o ridurre l'attività della coltura stessa.

Figura 1 Dendrogramma derivato dalla elaborazione dei profili RAPD-PCR dei ceppi di *S. thermophilus* isolati dai lattoinnesti naturali liofilizzati

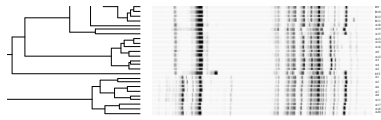


Tabella 1.
Composizione in
profili

Lattoinnesto LI M 27/09, Lattoinnesto S84, StC e StD e lattoinnesti liofilizzati A e B

Profili	LI M 27/09	LI S84	Comm. St C	Comm. St D	LI liofilizzato A	LI liofilizzato B
A	30%	40%	Inf 10%	Inf 10%	40%	Inf. 5%
B	10%	Inf. 5%	Inf 10%	Inf 10%	Inf. 5%	Inf. 5%
C	5 %	Inf. 5%	Inf 10%	Inf 10%	Inf. 5%	Inf. 5%
D	25%	10%	Inf 10%	Inf 10%	45%	Inf. 5%
E	10%	Inf. 5%	Inf 10%	20%	Inf. 5%	Inf. 5%
F	20%	Inf. 5%	Inf 10%	Inf 10%	Inf. 5%	Inf. 5%
G	Inf. 5%	Inf. 5%	Inf 10%	40%	Inf. 5%	Inf. 5%
H	Inf. 5%	10%?	20%	Inf 10%	Inf. 5%	Inf. 5%
I	Inf. 5%	Inf. 5%	10%	Inf 10%	Inf. 5%	Inf. 5%
L	Inf. 5%	Inf. 5%	70%	40%	Inf. 5%	Inf. 5%
M	Inf. 5%	10%	Inf 10%	Inf 10%	10%	Inf. 5%
N	Inf. 5%	5%	Inf 10%	Inf 10%	5%	100%
O	Inf. 5%	20%	Inf 10%	Inf 10%	Inf. 5%	Inf. 5%
P	Inf. 5%	5%	Inf 10%	Inf 10%	Inf. 5%	Inf. 5%

Sensibilità/resistenza ai fagi

I ceppi diversi (profili da A a P) isolati dai lattoinnesti naturali liofilizzati (A e B), dai lattoinnesti preparati in caseificio (LI M27/09 e S84) e dalle colture commerciali (StC e StD) sono stati valutati per la loro sensibilità/resistenza ai fagi. La prova è stata effettuata in latte mettendo a contatto i singoli ceppi con aliquote di siero di fine lavorazione proveniente da diverse produzioni di mozzarella in cui erano stati rilevati dei rallentamenti di acidificazione.

Alcuni dei ceppi esaminati evidenziavano un significativo rallentamento o blocco della loro attività acidificante, il che suggeriva una possibile inibizione da parte di fagi. Successivi test di laboratorio (lisi della coltura in terreno liquido, test delle placche di lisi) hanno effettivamente confermato la presenza di virus. I fagi individuati sono stati successivamente sottoposti a purificazione e conservati in una collezione di fagi (fagoteca), che potrà risultare utile per la definizione di un protocollo di rotazione fagica. La rotazione fagica rappresenta tuttora uno dei più efficaci metodi per la prevenzione e il controllo del problema fago in caseificio. Per stabilire un adeguato protocollo di rotazione fagica, è necessario disporre di una collezione di fagi da utilizzare per studiare la sensibilità/resistenza fagica dei ceppi presenti nelle colture naturali e

selezionate impiegate in caseificio. I fagi isolati nel corso di questo progetto potranno essere in futuro utilizzati per studiare lo spettro di sensibilità fagica dei ceppi di *S. thermophilus* presenti nelle diverse colture adottate dal caseificio e consentire quindi la definizione di una corretta strategia di rotazione delle colture starter impiegate in lavorazione.

Attività di ricerca 4

Obiettivo

Messa a punto di strategie alternative all'impiego di additivi chimici ad attività antimicrobica

Attività realizzata

Considerata la crescente richiesta commerciale di alimenti privi o a basso contenuto di additivi chimici è stata introdotta una attività progettuale, il cui obiettivo è stato quello di individuare dei metodi, di tipo tecnologico, alternativi rispetto all'impiego di additivi chimici ad attività antimicrobica, in particolare alternativi al lisozima utilizzato nei formaggi per prevenire il problema del gonfiore tardivo dovuto allo sviluppo di microrganismi gasogeni (clostridi butirrici).

La sperimentazione ha riguardato il formaggio Grana, ma approcci tecnologici simili potrebbero essere utilizzati anche in altre tipologie di formaggio, a più breve stagionatura.

Relativamente alla possibile riduzione od eliminazione dell'antimicrobico lisozima utilizzato per prevenire lo sviluppo dei clostridi butirrici, precedenti studi condotti da Veneto Agricoltura – Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari hanno accertato l'influenza che la temperatura di stagionatura e le modalità di salatura del formaggio esercitano sullo sviluppo delle spore di clostridi nel formaggio ipotizzando sperimentalmente quali potessero essere i modi e i tempi per effettuare la salatura al fine di contrastare le fermentazioni anomale nei formaggi studiati, senza alterare in alcun modo le caratteristiche di tipicità dei formaggi oggetto della sperimentazione.

Viste le caratteristiche dei microrganismi responsabili delle fermentazioni anomale e la loro sensibilità al sale, appare chiaro che per garantire il mantenimento di una buona qualità del prodotto, si deve agire oltre che sulla selezione della materia prima e sull'affioramento del latte, anche sulla distribuzione rapida e uniforme del cloruro di sodio nella pasta. A questo scopo una delle tesi sperimentali testate nella presente attività progettuale ha previsto l'effettuazione di lavorazioni a formaggio Grana in cui il cloruro di sodio è stato aggiunto direttamente in caldaia.

Nel corso della sperimentazione i formaggi a 48 ore sono stati sottoposti a valutazione analitica allo scopo di determinare l'umidità, il pH, la concentrazione di cloruro di sodio sul tal quale, la sua distribuzione nella forma e l'eventuale presenza di difetti visivi. A 15 mesi è stata svolta una seconda indagine sui parametri sopra citati, aggiungendo inoltre l'analisi degli acidi grassi volatili con l'obiettivo di individuare eventuali fermentazioni anomale.

L'aggiunta di sale direttamente in caldaia è risultata agire favorevolmente nel controllo delle fermentazioni anomale, come evidenziato dal contenuto di acidi grassi volatili nel formaggio stagionato che risulta significativamente inferiore a quello rilevato nel formaggio controllo prodotto senza lisozima e paragonabile a quello riscontrato nel formaggio controllo prodotto con lisozima.

L'aggiunta iniziale di sale in caldaia non comporta inoltre differenze significative nel contenuto in sale rispetto ai campioni controllo in cui la salatura è avvenuta esclusivamente attraverso il passaggio in salamoia.

Tra le tesi controllo con e senza lisozima e la tesi sperimentale con aggiunta di sale in caldaia si rileva invece una sensibile differenza nell'indice di maturazione indicante un ritardo nella maturazione del formaggio sperimentale, ritardo che però non viene percepito all'analisi sensoriale a cui sono stati sottoposti i campioni.

La tesi sperimentale con aggiunta di sale in caldaia ha consentito di ottenere interessanti risultati come evidenziato anche dall'esame radiografico delle forme. Le forme classificate

come "scelto sperlato" (caratteristiche strutturali eccellenti, assenza di qualsiasi difetto) sono state il 100% per la tesi sperimentale superando il Controllo con lisozima classificato come "scelto commerciale" (leggerissimi difetti di struttura interna, crosta, sapore e odore adeguati). L'unico punto di difetto riscontrato nella tesi sperimentale è la colorazione molto più intensa nella parte centrale della forma, difetto presente già nei primi giorni di produzione e che persiste durante il processo di maturazione.

Per scoprire la causa e prevenire il difetto rilevato, è stata allestita un'ulteriore tesi sperimentale nella quale oltre che aggiungere sale in caldaia sono state modificate le temperature di cottura della cagliata allo scopo di favorire l'attività fermentativa dei batteri lattici presenti e l'utilizzo del galattosio. Dati di letteratura indicano infatti che il galattosio non fermentato dai batteri lattici e rilasciato nella pasta del formaggio, può in presenza di alte temperature determinare la comparsa di macchie di colore rosso-bruno. Un'ulteriore variazione introdotta nella nuova tesi sperimentale ha riguardato il tipo di caglio utilizzato; per favorire la proteolisi durante la maturazione ed aumentare così l'indice di maturazione del formaggio è stato infatti utilizzato un caglio arricchito in pepsina.

Allo scopo di individuare eventuali differenze nelle popolazioni di batteri lattici presenti nei campioni con o senza difetto di colorazione, i campioni di formaggio sono stati inoltre sottoposti ad analisi microbiologica e le colonie microbiche ad identificazione e caratterizzazione molecolare. I risultati ottenuti hanno evidenziato che il campione che presenta il difetto di colorazione differisce significativamente dai campioni senza difetto in quanto ha una conta di *Lb. fermentum* significativamente inferiore. *Lb. fermentum* metabolizza il galattosio e si può supporre che la combinazione NaCl-temperatura ne riduca drasticamente la crescita. Nel campione con difetto è invece presente *Lb. delbrueckii lactis* (non metabolizza galattosio) e *Lb. helveticus* che metabolizza il galattosio, ma probabilmente con velocità diversa rispetto a *Lb. fermentum* causando la conseguente permanenza di galattosio non utilizzato e la comparsa del difetto di colorazione.

Si può ritenere che con una adeguata selezione di ceppi di batteri lattici resistenti al NaCl e dotati di un'intensa attività metabolica a carico del galattosio sia possibile eliminare il difetto di colorazione dovuto dalla caramellizzazione del galattosio residuo che resta per molteplici ore a temperature superiori ai 50 °C nel centro della forma.

L'impiego quindi di una adeguato sieroinnesto e l'applicazione del protocollo sperimentale che prevede l'aggiunta di sale in caldaia ed una riduzione della temperatura di cottura della cagliata potrebbe rappresentare un innovativo approccio tecnologico per prevenire lo sviluppo di fermentazioni anomale senza che sia necessario aggiungere lisozima. Il successo di tale tecnica in un formaggio a grande pezzatura e a lunga stagionatura come il Grana, può diventare stimolo per una applicazione della medesima tecnologia anche in altre tipologie di formaggi, a più breve stagionatura e di pezzatura più piccola.

Attività di ricerca 5

Obiettivo

Messa a punto di colture autoctone starter per la produzione di Casatella Trevigiana mediante lattoinnesti naturali liofilizzati

Attività realizzata

La tipicità dei formaggi DOP e tradizionali è influenzata oltre che dalle caratteristiche del latte e dalla tecnologia di produzione, anche dalle colture microbiche naturali (lattoinnesti o sieroinnesti) tradizionalmente utilizzati nella produzione di questi formaggi. Diversi lavori scientifici relativi agli aspetti microbiologici e biotecnologici delle produzioni casearie tradizionali e DOP, suggeriscono infatti che le caratteristiche dei prodotti ottenuti e l'originale qualità che diventa anche tipicità e pregio commerciale, possano essere influenzate dalle peculiari attività biochimico-enzimatiche dei microrganismi che partecipano alla trasformazione del latte in formaggio e alle successive fasi di maturazione. L'attività realizzata in questo progetto ha previsto lo studio delle flore microbiche presenti nei lattoinnesti naturali utilizzati nella produzione di Casatella Trevigiana DOP e ha valutato la possibilità di riprodurre queste colture in forma liofilizzata. La possibilità per i caseifici di disporre di colture naturali in forma liofilizzata prontamente utilizzabili in lavorazione, anziché ricorrere giornalmente alla loro produzione in latte o siero, rappresenta un'importante innovazione tecnologica. La procedura di

preparazione giornaliera delle colture naturali risulta infatti laboriosa e soprattutto non garantisce costanza di caratteristiche di composizione e di attività.

I lattoinnesti liofilizzati sono stati preparati utilizzando lattoinnesti naturali sviluppati presso il caseificio di Soligo e selezionati in base alla loro capacità acidificante in latte e alla loro qualità microbiologica.

L'analisi microbiologica ha previsto la verifica del loro eventuale grado di contaminazione con microrganismi indesiderati come coliformi, stafilococchi coagulasi positivi, enterococchi, lieviti e muffe.

Il processo di liofilizzazione ha riguardato solo i lattoinnesti caratterizzati da una buona qualità microbiologica ed una elevata attitudine all'acidificazione.

I lattoinnesti liofilizzati sono stati impiegati in produzioni sperimentali di Casatella Trevigiana effettuate presso la Latteria di Soligo.

Contemporaneamente, sono stati isolati e studiati batteri lattici presenti nei lattoinnesti e nella Casatella Trevigiana con lo scopo di:

1. caratterizzare le popolazioni microbiche tipiche di questo formaggio;
2. individuare ceppi da utilizzare eventualmente come colture di integrazione al lattoinnesto.

Dai lattoinnesti naturali e da campioni di formaggio Casatella Trevigiana preparato con lattoinnesto naturale sono state isolate e successivamente purificate colonie di presunti *Streptococcus thermophilus* e di lattobacilli.

Gli isolati sono stati sottoposti ad analisi molecolare allo scopo di individuare le specie e i ceppi presenti ed ottenere una "fotografia" della biodiversità microbica che caratterizza i lattoinnesti naturali tradizionalmente utilizzati nella produzione di Casatella Trevigiana. I ceppi identificati come *S. thermophilus* o come lattobacilli termofili sono stati infine valutati per alcune caratteristiche di interesse tecnologico importanti per una loro successiva eventuale applicazione nella produzione di Casatella Trevigiana.

Risultati

a) valutazione microbiologica lattoinnesti e formaggi. Studio delle caratteristiche di acidificazione dei lattoinnesti

Tutti i lattoinnesti, prelevati in diversi momenti stagionali (ottobre, novembre, aprile e luglio), evidenziano buona attitudine all'acidificazione sia in termini di velocità di acidificazione che di pH raggiunto dopo 16 ore di incubazione anche se va segnalata una minore velocità di acidificazione in alcuni campioni.

Tutti i campioni presentano numeri elevati di streptococchi termofili, mentre in un unico lattoinnesto è stata rilevata la presenza di presunti lattobacilli termofili (100 ufc/ml).

b) Studio della biodiversità microbica: caratterizzazione molecolare dei microrganismi isolati dai lattoinnesti e dai formaggi

Dai campioni esaminati sono state isolate 147 colonie di presunti streptococchi termofili e 40 colonie di presunti lattobacilli termofili. I ceppi sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare utilizzando la metodologia molecolare RAPD-PCR che permette di ottenere profili genetici (paragonabili a dei codici a barre) caratteristici per ciascun microrganismo.

E' stato così possibile identificare i microrganismi in esame ed evidenziare la biodiversità genetica presente all'interno delle popolazioni microbiche che caratterizzano questo formaggio DOP. Ad eccezione di alcuni ceppi classificati nell'ambito della specie *Streptococcus macedonicus*, la maggior parte dei ceppi isolati dai lattoinnesti naturali è risultata ascrivibile alla specie *S. thermophilus*. Nell'ambito di questa specie la RAPD-PCR ha individuato la presenza di diversi profili genetici corrispondenti ad altrettanti ceppi diversi. E' inoltre interessante sottolineare la presenza di alcuni profili e quindi di alcuni ceppi ricorrenti, presenti in campioni di lattoinnesto o formaggio prelevati in diversi momenti stagionali.

c) Valutazione dell'attività acidificante dei ceppi isolati

Lo studio dell'attività acidificante, effettuato in latte di alta qualità, ha consentito di individuare ceppi con diversa attività sia in termini di velocità di acidificazione (V_m) che di pH finale. Nell'ambito della specie *S. thermophilus* si individuano infatti sia ceppi ad elevata attività acidificante, sia ceppi scarsamente acidificanti o con caratteristiche intermedie.

d) Preparazione di lattoinnesti liofilizzati

Nel corso del progetto sono stati sottoposti a liofilizzazione i lattoinnesti che avevano evidenziato buona attitudine all'acidificazione e buona qualità microbiologica.

Per verificare la composizione dei lattoinnesti liofilizzati e verificare l'effetto del processo di liofilizzazione sulla loro composizione, sono state prelevate 20 colonie da ognuno dei lattoinnesti liofilizzati. Dopo purificazione le colonie sono state sottoposte a RAPD-PCR. I profili ottenuti sono stati confrontati con i profili RAPD-PCR corrispondenti ai ceppi rilevati nei lattoinnesti naturali da cui erano derivati i suddetti lattoinnesti liofilizzati.

e) Produzioni sperimentali di Casatella Trevigiana

Due lattoinnesti liofilizzati derivati dai lattoinnesti naturali studiati nel corso del progetto (lattoinnesto naturale del 17-10-06 e lattoinnesto naturale del 18-07-07) sono stati utilizzati in alcune produzioni di Casatella Trevigiana presso la Latteria di Soligo. Non sono stati evidenziati problemi nel corso del processo di caseificazione, così come non sono stati identificati difetti nei prodotti ottenuti. Di seguito vengono riassunti i risultati della valutazione sensoriale effettuata presso il Laboratorio di Analisi Sensoriale di Veneto Agricoltura, valutazione sensoriale che ha riguardato prodotti ottenuti con i lattoinnesti liofilizzati e prodotti "controllo" preparati con un fermento selezionato o con un lattoinnesto naturale prodotto in caseificio.

La seguente tabella riassume gli **ordinamenti di preferenza** di 28 giudici per i 4 campioni di casatella oggetto di analisi:

Rank	Lotto 1321 (Controllo con fermento commerciale)	Lotto 1421 (Controllo con LI naturale "selvaggio")	Lotto 1521 (prova con LI liofilizzato del 17-10-06)	Lotto 1621 (prova con LI liofilizzato del 18-07-07)
1	7	0	12	9
2	8	6	7	7
3	8	9	4	7
4	5	13	5	5
Totale	28	28	28	28

Tabella 2: Riepilogo dei risultati

Il rank 1 indica quante volte ciascun campione è stato posizionato al primo posto; il rank 2 indica invece quante volte ciascun campione ha occupato la seconda posizione, il rank 3 il numero di volte che ciascun campione è stato collocato terzo fra i quattro, così la quarta posizione occupata da ciascun campione è indicata nel rank 4 .

I risultati sono stati elaborati applicando il *Test di Friedman*, dal momento che l'ordine di preferenza dei campioni non poteva essere conosciuto a priori.

Il *Test di Friedman* consente di dimostrare l'esistenza o meno di differenze tra i campioni.

Friedman test	
Somma dei Ranks	20230,0
F	13,5000
corrected F	13,5000
Significance (F)	0,0037**
Significance (corrected F)	0,0037**

Tabella 3: Risultati del Friedman Test

In questo caso, come indicano i valori di significatività riportati nella tabella 3, risulta esserci una differenza significativa tra gli ordinamenti dei prodotti valutati, ad un livello di probabilità del 95%; questo significa che i 4 campioni sono stati diversamente graditi dai giudici.

Per stabilire la misura delle differenze esistenti tra i campioni, è stato applicato il test LSD (Least Significant Different), avendo scelto un rischio α dello 0.05%, dove α è la probabilità di concludere che esiste una differenza quando in realtà non esiste.

Campioni	Somma dei Ranks	Gruppi
1421	91	A
1321	67	AB
1621	64	B
1521	58	B

Tabella 4: Risultati del Test LSD

Le lettere stanno ad indicare diversi livelli di preferenza; in particolare il prodotto 1421 differisce, in relazione alla preferenza, dai prodotti 1621 e 1521, mentre il prodotto 1321 si colloca in una posizione intermedia rispetto agli altri campioni anche se, come sottolineano le distanze (24 punti da 1421, 3 punti da 1621 e 9 punti da 1521), risulta trovarsi in una condizione più simile ai campioni dei lotti 1621 e 1521.

Altra cosa da sottolineare è che le somme dei rank devono essere lette al contrario, nel senso che più un punteggio è basso più il prodotto è stato preferito; pertanto il prodotto 1521 è risultato essere preferito dal panel, seguito subito dopo dal prodotto 1621, quindi dalla casatella 1321 e infine dalla casatella 1421. Va ricordato che i lotti 1521 e 1621 corrispondono rispettivamente ai prodotti ottenuti con i lattoinnesti liofilizzati derivati dai lattoinnesti naturali del 17-10-06 e del 18-07-07.

Nella tabella 5 sono indicate le posizioni occupate dai campioni alla fine della valutazione e le motivazioni fornite dai giudici:

Ordine di preferenza		Osservazioni
1° (più gradito)	Casatella lotto 1521	Creoso, leggermente acido, buona struttura in bocca
2°	Casatella lotto 1621	Creoso, adesivo, leggermente troppo salato
3°	Casatella lotto 1321	Troppo salato, acido, presenza di grumi
4°(meno gradito)	Casatella lotto 1421	Troppo proteolizzato, struttura non omogenea causa presenza di grumi, eccessivamente acido, amaro

Tabella 5: Ordine di preferenza

Considerazioni conclusive

Il lavoro effettuato ha consentito di individuare una notevole biodiversità nell'ambito delle popolazioni di streptococchi termofili presenti nel lattoinnesto naturale per Casatella Trevigiana prodotto presso la Latteria di Soligo. Sono stati comunque rilevati dei profili genetici e quindi dei ceppi ricorrenti nelle diverse produzioni considerate. Dai lattoinnesti naturali sono stati prodotti dei lattoinnesti liofilizzati, che testati in lavorazione, hanno consentito di ottenere prodotti con caratteristiche organolettiche interessanti e sicuramente positive. L'impiego di lattoinnesti liofilizzati, derivati dai lattoinnesti naturali tradizionali, potrebbe rappresentare una alternativa alla preparazione del lattoinnesto naturale. Il lattoinnesto liofilizzato oltre che essere di più pratico utilizzo, risulta sicuramente più stabile e controllato rispetto ad un lattoinnesto naturale. Inoltre, essendo derivato dal lattoinnesto naturale, mantiene comunque parte della biodiversità propria dei lattoinnesti naturali, garantendo quindi le caratteristiche di complessità organolettica che caratterizzano i formaggi ottenuti con i lattoinnesti naturali rispetto ai formaggi preparati con colture starter selezionate.