

PSR 2014/2020
MISURA 16 – COOPERAZIONE
TIPO DI INTERVENTO 16.2.1 – CREAZIONE DI POLI O RETI PER LO
SVILUPPO DI PROGETTI DI INNOVAZIONE AZIENDALE E DI FILIERA

**Studio dell'attività del *Lactobacillus casei* al fine della
sostituzione del lisozima nel formaggio Montasio DOP**

Capofila:

Consorzio di Tutela del Formaggio Montasio

Partner 1

Caseificio Azienda Agricola La Sisile di Zanello Graziano

Partner 2

Caseificio Azienda Agricola Ziraldo e Figli

Partner 3

Latteria Soc. Coop. Agr. di Coderno

Partner 4

Università degli Studi di Udine – Dipartimento di Scienze Agro Alimentari
Ambientali e Animali



INTRODUZIONE

Difendere e tutelare la produzione e il commercio del formaggio Montasio DOP, proteggere l'uso della sua denominazione e salvaguardarne la tipicità e le caratteristiche peculiari, sono i principali scopi dell'attività svolta dal nostro Consorzio di Tutela.

In questo senso, con la volontà di agevolare e rendere ancora più sicura la tecnologia di trasformazione del latte a Montasio DOP, nonché di offrire al consumatore un formaggio sempre più sano e naturale possibile, in collaborazione con l'Università di Udine abbiamo lavorato per apportare ulteriori miglioramenti tecnologici al prodotto.

Seppur il Disciplinare della DOP preveda la possibilità dell'utilizzo del *lisozima* - un conservante di origine naturale che limita le fermentazioni tardive nel Montasio - grazie al finanziamento PSR 2014-2020 della Regione autonoma Friuli Venezia Giulia (Focus Area 2° Tipologia 16.2.1), il Consorzio si è impegnato in una sperimentazione per l'uso del *Lactobacillus Casei*, in sostituzione del lisozima stesso.

Le conoscenze sempre più ampie sull'argomento e le innovazioni tecnologiche applicate in questi ultimi anni, hanno fatto sì che i numerosi lavori di ricerca e di sperimentazione svolti dalle più importanti Università del Nord Italia sull'uso di pool di ceppi di *L. Casei* in sostituzione del lisozima, abbiano portato ad un approccio scientifico molto concreto.

Il nostro intento è di dare al produttore la massima soddisfazione per la propria attività svolta, consapevoli dell'importanza di far percepire e far conoscere al consumatore le qualità, le doti di salubrità e di naturalità intrinseche del nostro prodotto. Un valore aggiunto per accrescere il gradimento e far apprezzare sempre di più il nostro Montasio.

Per il coordinamento e la realizzazione di questo progetto, un particolare ringraziamento va al Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali dell'Università di Udine. Per la disponibilità ad effettuare le prove in campo, un grazie alla Latteria di Coderno, al Caseificio Borgo Centro di Fagagna, al Caseificio La Sisile di Turrida di Sedegliano e alla ditta Sacco di Como che ha contribuito alla parte sperimentale con materiali e personale. Fondamentale anche il supporto dei collaboratori del Consorzio che hanno attivamente partecipato al collegamento fra i vari partner del programma.

Il Presidente
Valentino Pivetta

PREMESSA

I prodotti caseari sono da millenni presenti nella nostra alimentazione e ricoprono un ruolo molto importante nella nostra tavola. Attualmente nel mondo si producono circa 500 varietà diverse di formaggio, con una produzione annua di ca. 10^7 tonnellate.

La preferenza dei consumatori per i formaggi a latte crudo è in continua crescita, grazie al più intenso e complesso *flavour* di questi rispetto ai formaggi a latte pastorizzato ed al sempre maggior interesse per i prodotti naturali o processati al minimo. Questo tipo di prodotti è strettamente legato al territorio di produzione ed alle sue caratteristiche, che rendono ogni formaggio a latte crudo unico e con una propria identità ben riconoscibile. La microflora tipica della zona di produzione gioca infatti un ruolo fondamentale nella creazione delle caratteristiche e della qualità del formaggio, ed è fondamentale per la tutela dei prodotti artigianali tradizionali e del patrimonio agroalimentare delle nostre regioni.

Utilizzare in caseificazione un latte crudo che non abbia subito trattamenti termici di risanamento comporta tuttavia il rischio che nel formaggio si sviluppino anche microrganismi potenzialmente patogeni o alterativi, dannosi per la salute dei consumatori o in grado di produrre difetti di aroma e di *texture*, primi fra tutti i difetti di gonfiore. Difetti come il gonfiore tardivo nei formaggi duri e semi-duri possono rappresentare un'ingente perdita economica per i produttori, manifestandosi anche dopo mesi di stagionatura quando le forme hanno già subito grandi investimenti e delicate lavorazioni.

I produttori sono da sempre alla ricerca di tecnologie in grado di evitare questi difetti mantenendo il più possibile inalterata la qualità del prodotto. Se la prevenzione delle contaminazioni microbiche non sempre rappresenta uno strumento di facile applicazione e di sicuro successo, sono stati sviluppati diversi approcci di natura tecnologica finalizzati alla riduzione del rischio di gonfiore tardivo. Tali approcci, pur se efficaci, possono influire negativamente sulla microflora autoctona presente nel latte di partenza e quindi sulle caratteristiche sensoriali del prodotto, nonché pregiudicare l'immagine del prodotto presso il consumatore e di conseguenza la sua valorizzazione commerciale. È quindi necessario identificare e studiare approcci alternativi per il controllo del gonfiore tardivo, uno dei quali si basa sull'utilizzo di colture bioprotettive, che devono essere in grado di limitare il rischio di fermentazioni anomale senza alterare le dinamiche microbiche del prodotto tradizionale. La bioprotezione può diventare una valida alternativa ai trattamenti tecnologici tradizionalmente utilizzati e contribuire al controllo di questo difetto, venendo incontro al contempo alla richiesta del consumatore di prodotti alimentari sempre più freschi e naturali, senza aggiunta di conservanti e non sottoposti a trattamenti tecnologici invasivi. La scelta della specie microbica da utilizzare come coltura bioprotettiva deve necessariamente cadere tra quelle naturalmente presenti nel prodotto, al fine di non alterare le caratteristiche sensoriali del formaggio, che guidano la scelta del consumatore.

Lactobacillus casei è una specie lattica frequentemente ritrovata nei formaggi a latte crudo a lunga stagionatura, e rappresenta una delle specie lattiche predominanti anche nel formaggio Montasio DOP: *Lb. casei*, presente naturalmente nel latte crudo in concentrazione esigua, aumenta di numero subito dopo la salatura, diventando dominante durante la stagionatura e rilasciando nel formaggio diverse sostanze che contribuiscono al sapore e all'aroma del prodotto.

Alla luce di queste considerazioni, scopo di questo lavoro di ricerca finanziato dalla Regione Friuli Venezia Giulia nell'ambito della MISURA 16 - INTERVENTO 16.2.1 - PSR 2014/2020 è stato quello di valutare la capacità di un ceppo commerciale di *L. casei* di tenere sotto controllo le fermentazioni anomale nel formaggio Montasio DOP. Ci si è parallelamente posti l'obiettivo di valutare l'impatto che l'aggiunta del *L. casei* può avere sull'evoluzione della maturazione e sul profilo della componente aromatica di questo formaggio.

Prof.ssa Nadia Innocente

Prof.ssa Marilena Marino

Prof.ssa Michela Maifreni

RISULTATI DELL'ATTIVITA' SPERIMENTALE EFFETTUATA PRESSO I CASEIFICI PARTNER DI PROGETTO

Impostazione della sperimentazione

La sperimentazione è stata effettuata presso i tre caseifici Partner di progetto e produttori di formaggio Montasio:

Caseificio 1: Latteria Sociale cooperativa agricola di Coderno, Coderno (UD);

Caseificio 2: La Sisile, Talmassons (UD);

Caseificio 3: Azienda Agricola Ziraldo Lorenzo e figli, Fagagna (UD).

Al fine di valutare la possibile influenza della presenza di *L. casei* sul contenimento dei difetti di gonfiore, nonché sulle caratteristiche chimico-fisiche e sul profilo aromatico del formaggio Montasio, in ciascuno dei tre caseifici considerati sono state allestite due diverse lavorazioni (entrambe senza aggiunta di lisozima): una lavorazione di controllo (**C**) e una lavorazione sperimentale (**SP**) con inoculo di un ceppo di *L. casei*. In particolare, nelle lavorazioni sperimentali SP è stato impiegato un ceppo liofilizzato commerciale di *L. casei* ad inoculo diretto, aggiunto al latte in caldaia (1 Unità Caldaia ogni 100 L di latte).

In **Tabella 1** sono riportati i codici identificativi dei campioni di formaggio ottenuti che sono stati conservati nei magazzini di stagionatura dei rispettivi caseifici. I formaggi sperimentali e di controllo sono stati sottoposti ad analisi chimiche e microbiologiche all'uscita dalla salamoia (tempo 0) e dopo 30, 60 e 90 giorni di stagionatura.

Tabella 1 Codici di identificazione dei diversi campioni sottoposti ad analisi

	Controllo	Sperimentale con <i>L. casei</i>
Caseificio 1	C1	SP1
Caseificio 2	C2	SP2
Caseificio 3	C3	SP3

RISULTATI LATTERIA SOC. COOP. AGR di CODERNO – CASEIFICIO 1

Caratteristiche microbiologiche del latte

In **Tabella 2** sono riportati i dati microbiologici relativi al latte prelevato prima dell'inizio della lavorazione. Come si può notare, il latte presenta basse cariche microbiche che sono indice di una buona qualità e assenza di contaminazione. Va precisato che questo latte ha subito un trattamento di termizzazione, ossia un blando trattamento termico finalizzato a ridurre la carica anti-casearia e a ripristinare le caratteristiche chimico-fisiche del latte precedentemente sottoposto a refrigerazione. I bassi valori dei batteri lattici mesofili possono essere attribuiti a questo trattamento termico, l'unico possibile nel caso del formaggio Montasio, che comporta inevitabilmente una piccola riduzione anche della flora casearia. Il ridotto numero di spore di clostridi non è invece da attribuirsi al trattamento di termizzazione, data l'elevata resistenza termica di questi microrganismi, quanto piuttosto a una buona qualità del latte di partenza.

Tabella 2. Conte microbiche (UFC/mL o MPN/mL) nel latte termizzato prelevato prima dell'inizio delle lavorazioni (caseificio 1).

	Latte termizzato
Lattici mesofili (UFC/mL)	$3,7 \times 10^2$
Coliformi fecali (UFC/mL)	<1
Lieviti/ <i>muffe</i> (UFC/mL)	<10
Clostridi (MPN/mL)	74

In **Tabella 3** sono invece riportati i dati relativi al latte in caldaia prima della coagulazione dopo l'aggiunta del solo starter (campione di latte C1) o dello starter associato al ceppo protettivo di *L. casei* (campione di latte SP1).

Tabella 3. Conte microbiche (UFC/mL) nei campioni di latte in caldaia nelle lavorazioni di controllo (C1) e sperimentali (SP1) del caseificio 1.

	C1	SP1
<i>L. casei</i> (UFC/mL)	$1,3 \times 10^2$	$9,6 \times 10^5$
<i>S. thermophilus</i> (UFC/mL)	$3,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$

L'elevata carica in *L. casei* nella caldaia sperimentale SP1 è sicuramente da attribuirsi all'inoculo effettuato. Tuttavia, si può notare che *L. casei* è presente, seppur in quantità significativamente più basse, anche nella latte della caldaia C1 ove non è stato intenzionalmente aggiunto. Il motivo è che il latte di partenza contiene di per sé un certo numero di microrganismi autoctoni.

Si nota in entrambe le caldaie una concentrazione pari a circa 10^6 UFC/mL di *S. thermophilus* che è da attribuirsi ai microrganismi che sono stati aggiunti con lo starter. Infatti, lo starter impiegato per la produzione di formaggio Montasio, ed aggiunto nelle medesime quantità in entrambe le caldaie C1 ed SP1, è costituito principalmente da ceppi di *S. thermophilus* che restano prevalenti durante tutto il periodo di maturazione del formaggio Montasio.

Monitoraggio dei formaggi nel corso della stagionatura

In **Figura 1** sono riportate le cinetiche microbiche (UFC/g) di *S. thermophilus* e *L. casei* determinate nel corso della stagionatura dei formaggi di controllo (C1) e dei formaggi sperimentali (SP1) prodotti presso il caseificio 1.

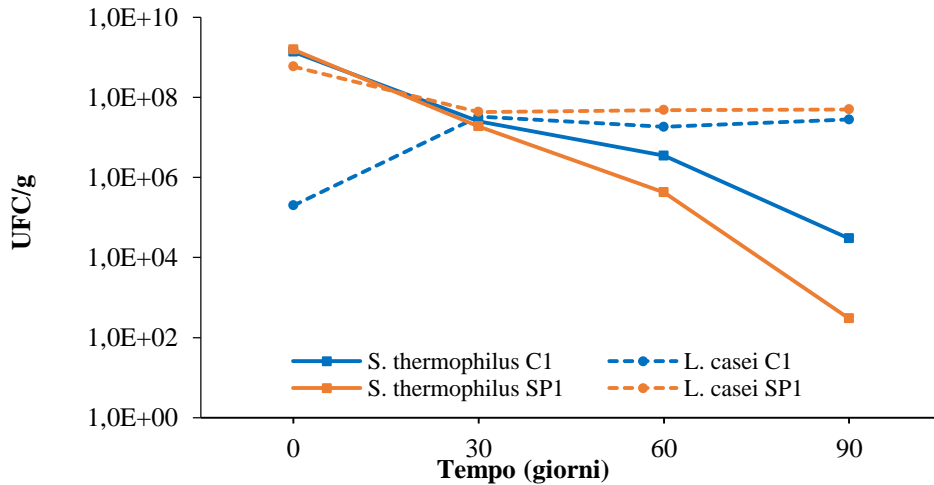


Figura 1 Cinetiche microbiche (UFC/g) di *S. thermophilus* e *L. casei* nelle lavorazioni di controllo (C1) e sperimentali (SP1) del caseificio 1.

Dall'analisi del grafico si evince che *S. thermophilus* si mantiene in entrambi le lavorazioni (C1 e SP1) a concentrazioni sufficientemente elevate e compatibili con il suo ruolo di protagonista dei fenomeni fermentativi fino a 60 giorni di stagionatura.

Gli andamenti di *L. casei* nel formaggio di controllo e in quello sperimentale risultano confrontabili tra loro a partire dai 30 giorni di stagionatura. Va tuttavia precisato che nel caso del campione di controllo sono sicuramente presenti diversi ceppi di *L. casei* che fanno parte della flora autoctona del latte di partenza e che pertanto non sono stati selezionati in funzione della loro attività anticlostridica.

Il campione sperimentale è invece caratterizzato da una prevalenza del ceppo commerciale intenzionalmente aggiunto e selezionato per la sua specifica attività antimicrobica, finalizzata alla prevenzione dei difetti di gonfiore.

In **figura 2** è riportata l'evoluzione dell'umidità e del coefficiente di maturazione valutati per i campioni di controllo (C1) e per i campioni sperimentali (SP1) nel corso della stagionatura.

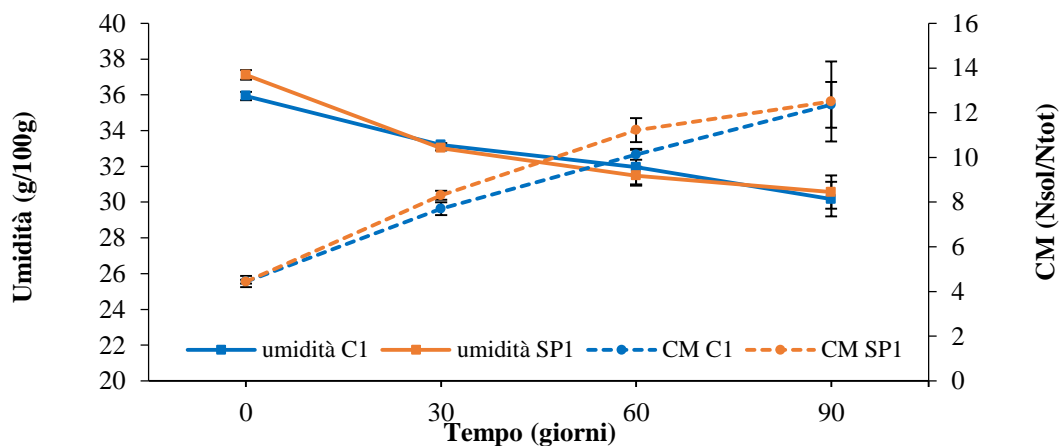


Figura 2. Evoluzione dell'umidità e del coefficiente di maturazione nel corso della stagionatura dei formaggi del caseificio 1

Durante la stagionatura l'umidità tende gradatamente a diminuire, sia nei campioni di controllo che nei campioni sperimentali, per effetto dei normali processi di disidratazione che caratterizzano la maturazione. Come si può notare, gli andamenti relativi ai diversi campioni analizzati risultano confrontabili tra loro. Il coefficiente di maturazione aumenta progressivamente durante la stagionatura per effetto dei processi proteolitici che portano ad una graduale liberazione di peptidi di medie e piccole dimensioni e amminoacidi. Anche nel caso di questo indice non si evidenziano differenze significative tra i campioni di controllo (C1) e i campioni sperimentali (SP1). Questi dati ci portano ad affermare che in questo caso la presenza del *L. casei* non ha influito in alcun modo sul normale procedere dei fenomeni chimico-fisici che si verificano nel corso della maturazione del formaggio Montasio.

Il profilo della frazione volatile è generalmente riconosciuto come uno dei criteri più importanti per valutare la qualità del formaggio. La componente volatile infatti influenza l'odore e l'aroma del formaggio ed è utile sia nel caratterizzare il prodotto, sia nel definire i suoi legami con il territorio e con la tecnologia di produzione. Infatti il profilo della componente aromatica di un determinato formaggio è il risultato di un equilibrio specifico tra i composti volatili prodotti durante il processo di maturazione. Per caratterizzare la frazione volatile dei formaggi oggetto di studio e per valutare la sua evoluzione nel corso della maturazione, è stato impiegato il metodo della micro-estrazione su fase solida (SPME) accoppiato alla gascromatografia.

In **Figura 3** è riportato l'andamento del profilo totale della frazione volatile, espressa come rapporto tra la somma delle aree dei picchi assoluti e l'area dello standard interno ($\sum A_{\text{assolute}}/A_{\text{SI}}$) misurati nello spazio di testa dei campioni durante la stagionatura. Come si può notare, i profili aromatici complessivi dei campioni di controllo e dei campioni sperimentali risultano confrontabili tra loro a tutti i tempi di stagionatura considerati.

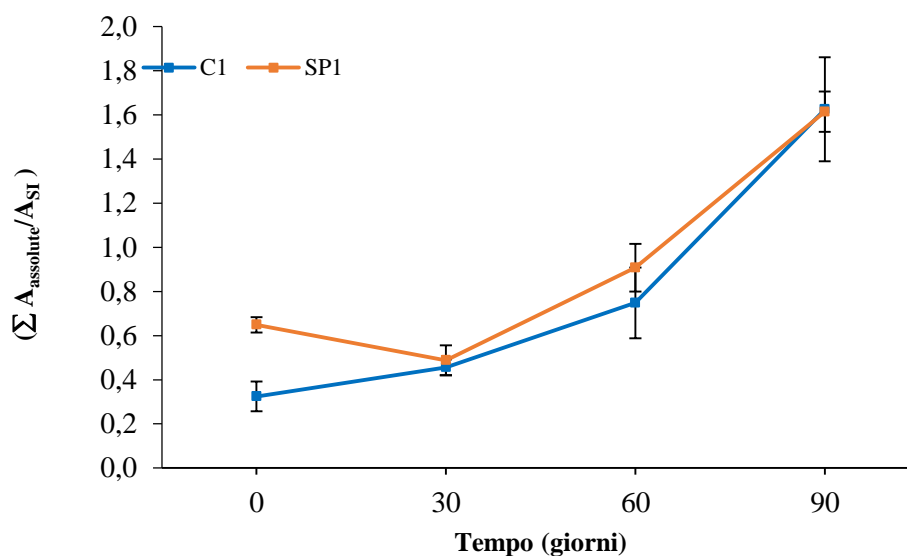


Figura 3. Andamento del rapporto tra la somma delle aree assolute dei picchi dei composti volatili presenti nello spazio di testa e l'area assoluta dello standard ($\sum A_{\text{assolute}}/A_{\text{SI}}$) nei campioni di formaggio del caseificio 1.

Nonostante la grande varietà di composti caratterizza lo spazio di testa dei formaggi considerati, si è deciso di puntare l'attenzione sull'evoluzione dei composti acidi, poiché questi derivano prevalentemente da processi di fermentazione. In particolare, l'acido butirrico e l'acido acetico sono prodotti dalla fermentazione butirrica operata dai clostridi e pertanto possono essere utilizzati come indici per identificare la presenza dello sviluppo indesiderato di questi microrganismi e della comparsa del difetto di gonfiore tardivo.

In **Figura 4** è riportata l'evoluzione dell'acido butirrico ($\sum A_{\text{ac.butirrico}}/A_{\text{SI}}$) e dell'acido acetico ($\sum A_{\text{ac.acetico}}/A_{\text{SI}}$) nei diversi campioni nel corso della stagionatura.

Come si può notare sia nel campione di controllo sia nel campione sperimentale, le aree assolute dell'acido acetico e dell'acido butirrico si mantengono molto basse per tutto il periodo della

stagionatura. Questo dato trova conferma nell'assenza del difetto di gonfiore nei formaggi monitorati nel corso della stagionatura (Figura 5).

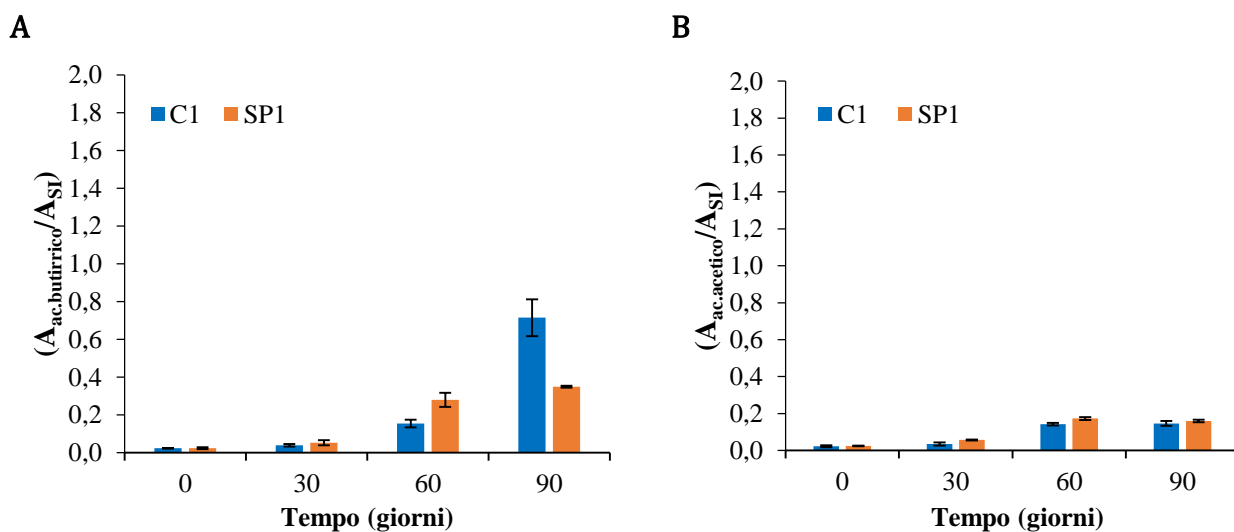


Figura 4. Andamento del rapporto tra l'area assoluta riferita all'acido butirrico (A) o all'acido acetico (B) e la media dell'area assoluta dello standard nel corso della stagionatura nei formaggi del caseificio 1.

Controllo C1



Sperimentale SP1



Figura 5. Foto del campione di controllo senza inoculo di *L. casei* (C1) e del campione sperimentale con inoculo di *L. casei* (SP1) del caseificio 1 a 90 giorni di stagionatura.

RISULTATI AZIENDA AGRICOLA LA SISILE – CASEIFICIO 2

Caratteristiche microbiologiche del latte

Nelle **Tabelle 4 e 5** sono riportati i dati microbiologici del latte crudo prelevato prima dell'inizio della lavorazione e del latte in caldaia prelevato prima della coagulazione dopo l'aggiunta del solo starter (campione di latte C2) o dello starter associato al ceppo protettivo di *L. casei* (campione di latte SP2). Anche in questo caso il latte è risultato di buona qualità e le maggiori cariche in batteri lattici mesofili rispetto al latte del caseificio 1, sono da attribuirsi al fatto che in questo caso il latte non è stato termizzato ed è stato quindi lavorato crudo. I microrganismi aggiunti con lo starter risultano essere vitali e presenti in quantità corretta all'inizio della lavorazione. Il *L. casei* fa parte della microflora del latte per questo viene rilevato anche nella caldaia di controllo C2. Nel campione sperimentale SP2 la conta in *L. casei* risulta elevata proprio perché i microrganismi sono stati intenzionalmente inoculati.

Tabella 4. Conte microbiche (UFC/mL o MPN/mL) nel latte termizzato prelevato prima dell'inizio delle lavorazioni (caseificio 2).

	Latte crudo
Lattici mesofili (UFC/mL)	$5,8 \times 10^3$
Coliformi fecali (UFC/mL)	100
Lieviti/ <i>muffe</i> (UFC/mL)	10
Clostridi (MPN/mL)	92

Tabella 5. Conte microbiche (UFC/mL) nei campioni di latte in caldaia nelle lavorazioni di controllo (C2) e sperimentali (SP2) del caseificio 2.

	C2	SP2
<i>L. casei</i> (UFC/mL)	70	$4,2 \times 10^5$
<i>S. thermophilus</i> (UFC/mL)	$6,0 \times 10^5$	$8,3 \times 10^5$

Monitoraggio dei formaggi nel corso della stagionatura

In **Figura 6** sono riportate le cinetiche microbiche di *S. thermophilus* e *L. casei* determinate nel corso della stagionatura dei formaggi di controllo (C2) e dei formaggi sperimentali (SP2) prodotti presso il caseificio 2. L'evoluzione dei microrganismi durante la stagionatura dei formaggi è molto simile a quella precedentemente discussa nel caso dei formaggi del caseificio 1, pertanto valgono le medesime considerazioni.

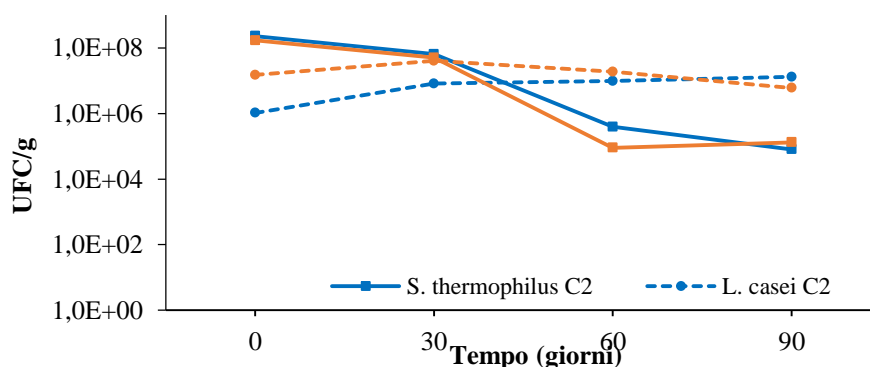


Figura 6. Cinetiche microbiche (UFC/g) di *S. thermophilus* e *L. casei* nelle lavorazioni di controllo (C2) e sperimentali (SP2) del caseificio 2.

Anche in questo caso i formaggi sperimentali e di controllo sono stati sottoposti ad analisi dell'umidità e del coefficiente di maturazione all'uscita dalla salamoia (tempo 0) e dopo 30, 60 e 90 giorni di stagionatura. In **Figura 7** sono riportate le evoluzioni di questi indici.

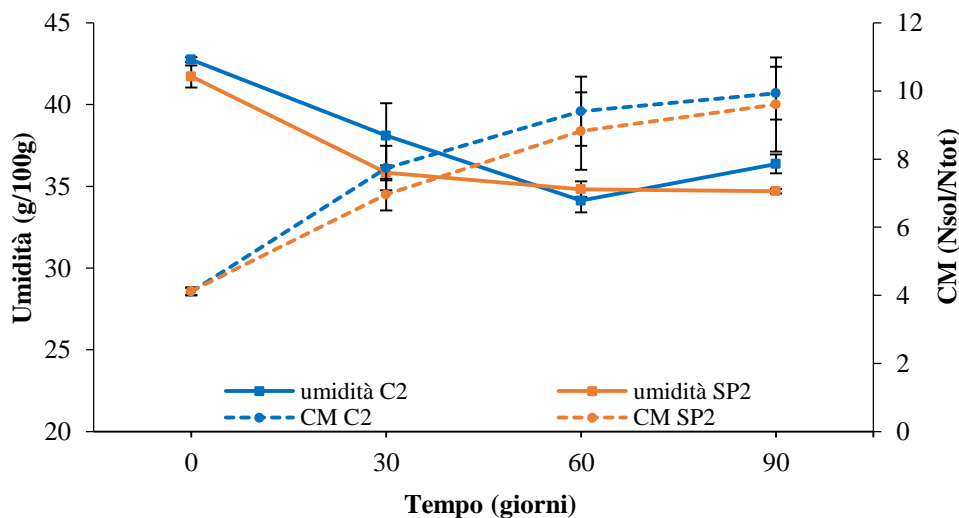


Figura 7. Evoluzione dell'umidità (g/100g \pm DS) e del coefficiente di maturazione nel corso della stagionatura dei formaggi del caseificio 2

L'umidità ha un andamento che è conforme ai normali processi di disidratazione e non differisce in maniera significativa tra il campione senza (C2) e con *L. casei* (SP2). Analoghe considerazioni possono essere fatte per il coefficiente di maturazione che aumenta per effetto dei processi di demolizione proteica che avvengono durante la maturazione del formaggio.

In **Figura 8** è riportato l'andamento del profilo totale della frazione volatile, espressa come rapporto tra la somma delle aree dei picchi assoluti e l'area dello standard interno ($\sum A_{assolute}/A_{SI}$) misurati nello spazio di testa dei campioni del caseificio 2. Anche in questo caso i profili aromatici complessivi dei campioni di controllo e dei campioni sperimentali risultano per lo più confrontabili tra loro.

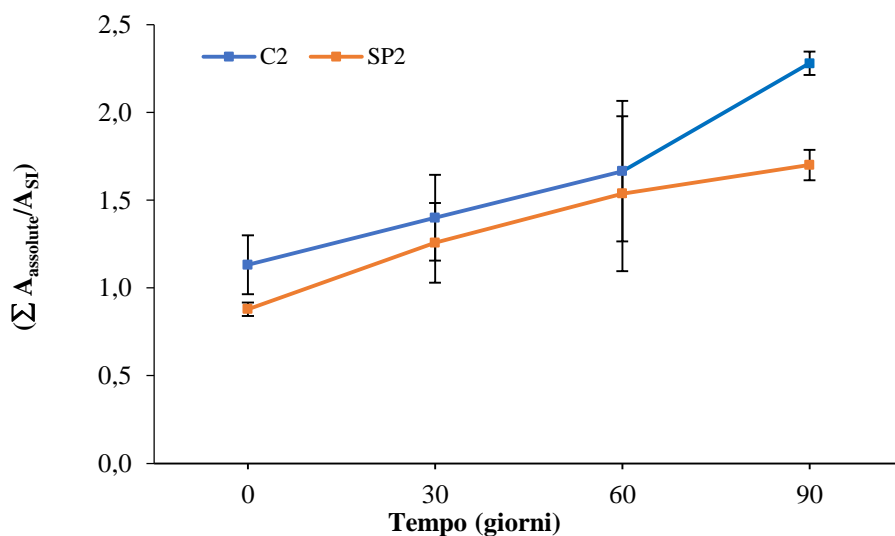


Figura 8. Andamento del rapporto tra la somma delle aree assolute dei picchi dei composti volatili presenti nello spazio di testa e l'area assoluta dello standard ($\sum A_{assolute}/A_{SI}$) nei campioni di formaggio del caseificio 2

In **Figura 9** è riportata l'evoluzione dell'acido butirrico ($\sum A_{ac.butyrico}/A_{SI}$) e dell'acido acetico ($\sum A_{ac.acetico}/A_{SI}$) nei campioni del caseificio 2.

Anche in questo caseificio le aree assolute dell'acido acetico e dell'acido butirrico si mantengono molto basse per tutto il periodo della stagionatura sia nel campione di controllo che nel campione sperimentale. Questo dato trova conferma nell'assenza del difetto di gonfiore nei formaggi a monitorati nel corso della stagionatura (**Figura 10**).

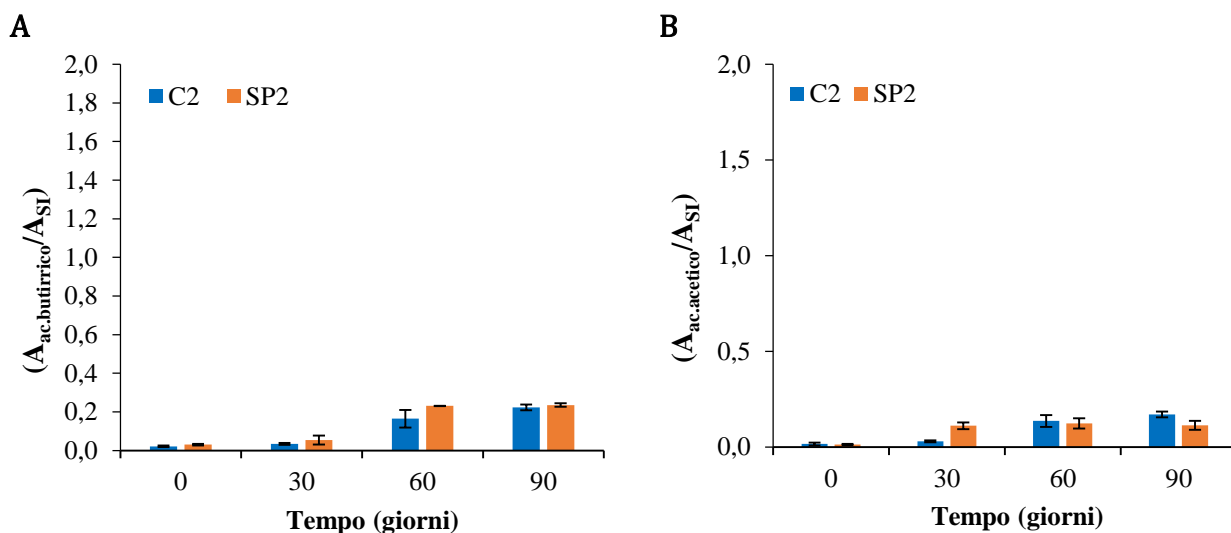


Figura 9. Andamento del rapporto tra l'area assoluta riferita all'acido butirrico (A) o all'acido acetico (B) e la media dell'area assoluta dello standard nel corso della stagionatura nei formaggi del caseificio 2

Controllo C2



Sperimentale SP2



Figura 10. Foto del campione di controllo senza inoculo di *L. casei* (C2) e del campione sperimentale con inoculo di *L. casei* (SP2) del caseificio 2 a 90 giorni di stagionatura.

RISULTATI AZ. AGR. ZIRALDO LORENZO DI FAGAGNA – CASEIFICIO 3

Caratteristiche microbiologiche del latte

In **Tabella 6** sono riportati i dati relativi al latte crudo prima della lavorazione. Va rilevata la presenza di un numero di spore di clostridi significativamente più elevato rispetto a quanto rilevato nel latte impiegato nei caseifici 1 e 2. I dati in **Tabella 7** sono relativi al latte in caldaia prima della coagulazione dopo l'aggiunta del solo starter (campione di latte C3) o dello starter associato al ceppo protettivo di *L. casei* (campione di latte SP3). I microrganismi aggiunti con l'inoculo risultano essere vitali e presenti in quantità di circa 10^7 UFC/mL nel latte di entrambi le caldaie. Va precisato che in questo caso è stato utilizzato un innesto naturale preparato direttamente in caseificio a partire dal latte d'origine cercando di sviluppare una flora microbica lattica acidificante. Il *L. casei* fa parte della microflora del latte per questo viene rilevato anche nella caldaia di controllo C3, sebbene si trovi naturalmente presente in quantità significativamente più basse rispetto quanto rilevato nel latte del caseificio 1. Nel campione sperimentale SP3 la conta in *L. casei* risulta elevata proprio perché i microrganismi sono stati intenzionalmente inoculati.

Tabella 6. Conte microbiche (UFC/mL o MPN/mL) nel latte crudo prelevato prima dell'inizio delle lavorazioni (caseificio 3).

	Latte crudo
Lattici mesofili (UFC/mL)	$2,5 \times 10^3$
Coliformi fecali (UFC/mL)	10
Lieviti/ <i>muffe</i> (UFC/mL)	10
Clostridi (MPN/mL)	210

Tabella 7. Conte microbiche (UFC/mL) nei campioni di latte in caldaia nelle lavorazioni di controllo (C3) e sperimentali (SP3) del caseificio 3.

	C2	SP2
<i>L. casei</i> (UFC/mL)	90	$5,00 \times 10^4$
<i>S. thermophilus</i> (UFC/mL)	$4,00 \times 10^7$	$3,81 \times 10^7$

Monitoraggio dei formaggi nel corso della stagionatura

In **Figura 11** sono riportate le cinetiche microbiche (UFC/g) di *S. thermophilus* e *L. casei* determinate nel corso della stagionatura dei formaggi di controllo (C3) e dei formaggi sperimentali (SP3) prodotti presso il caseificio 3.

L'evoluzione dei microrganismi durante la stagionatura dei formaggi è molto simile a quella precedentemente discussa nel caso dei formaggi del caseificio 1 e del caseificio 2, anche se in questo caso si evidenzia una maggiore riduzione della concentrazione di *S. thermophilus* nel campione di controllo C3.

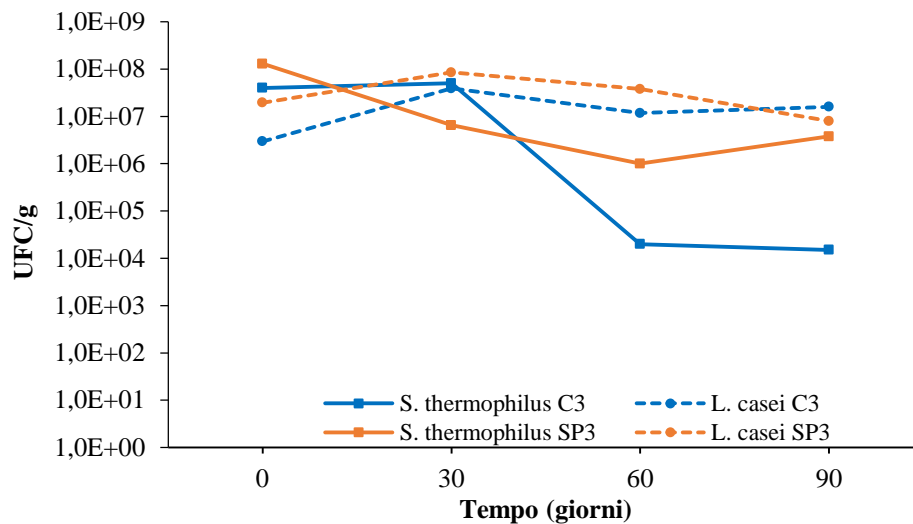


Figura 11. Cinetiche microbiche (UFC/g) di *S. thermophilus* e *L. casei* nelle lavorazioni di controllo (C3) e sperimentali (SP3) del caseificio 3.

I formaggi sono stati analizzati nel corso della stagionatura al fine di valutare l'umidità e il coefficiente di maturazione. In **Figura 12** è riportato l'andamento di questi parametri durante la maturazione sia per i campioni di controllo (C3) che per i campioni sperimentali (SP3). Anche in questo caso non è possibile mettere in evidenza differenze significative tra il campione di controllo e il campione sperimentale inoculato con *L. casei*.

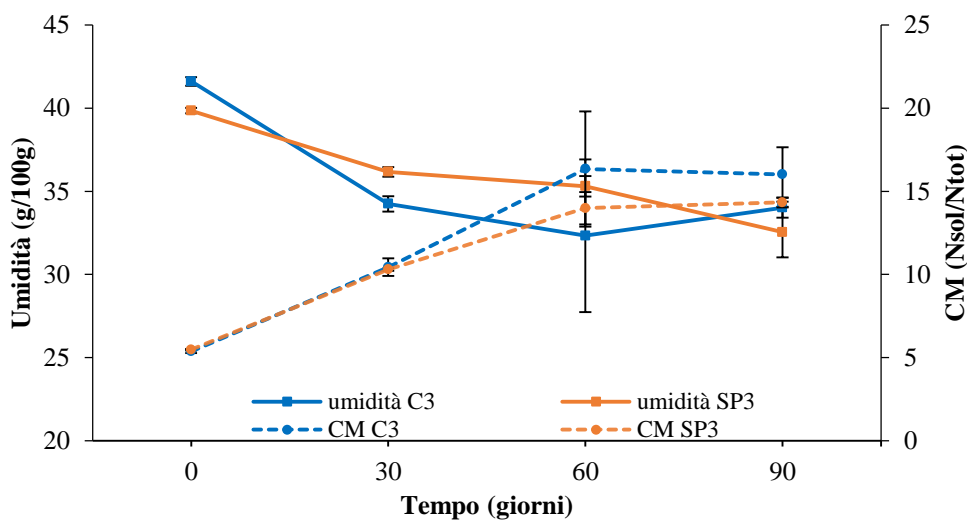


Figura 12. Evoluzione dell'umidità e del coefficiente di maturazione nel corso della stagionatura dei formaggi del caseificio 3

In **Figura 13** è riportato l'andamento del profilo totale della frazione volatile, espressa come rapporto tra la somma delle aree dei picchi assoluti e l'area dello standard interno ($\sum A_{assolute}/A_{SI}$) misurati nello spazio di testa dei campioni del caseificio 3 durante la stagionatura. Come si può notare, i profili aromatici complessivi dei campioni di controllo e dei campioni sperimentali risultano essere significativamente diversi tra loro a partire dai 60 giorni di stagionatura. In particolare, il campione di controllo presenta a 60 e 90 giorni di stagionatura un'area totale dei composti volatili presenti nello spazio di testa superiore rispetto a quella del campione sperimentale inoculato con *L. casei*. Va rilevato che il componente che maggiormente aumenta nel campione di controllo è l'acido butirrico (vedi **Figura 14**), indice della presenza di

una fermentazione anomala indesiderata in questo campione. Il manifestarsi di questa fermentazione anomala è da attribuirsi all'elevato numero di spore di clostridi rilevato nel latte di questo caseificio. La produzione di acido butirrico rimane molto più contenuta nel campione sperimentale. Si può pertanto ipotizzare che, in queste condizioni, il ceppo selezionato di *L. casei* inoculato nel latte di questo campione abbia giocato un ruolo importante nel contenere la germinazione delle spore. Queste considerazioni trovano conferma nelle foto dei formaggi riportate in **Figura 15** che evidenziano un difetto di gonfiore molto marcato nel campione C3.

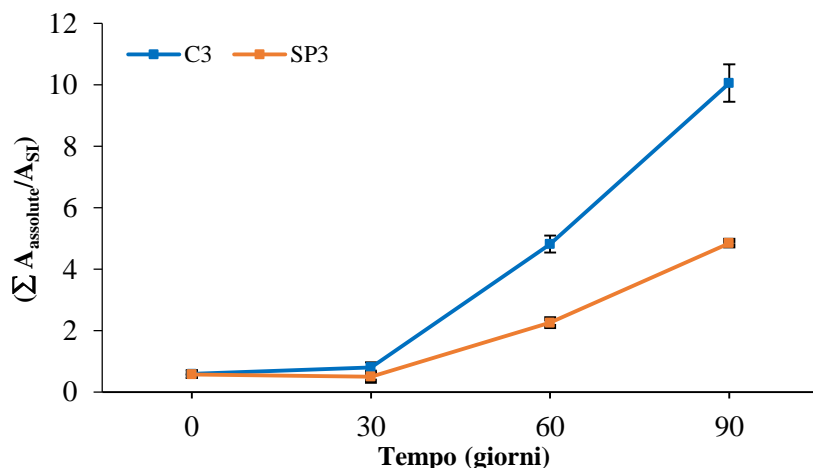


Figura 13. Andamento del rapporto tra la somma delle aree assolute dei picchi dei composti volatili presenti nello spazio di testa e l'area assoluta dello standard ($\Sigma A_{\text{assolute}}/A_{\text{St}}$) nei campioni di formaggio del caseificio 3.

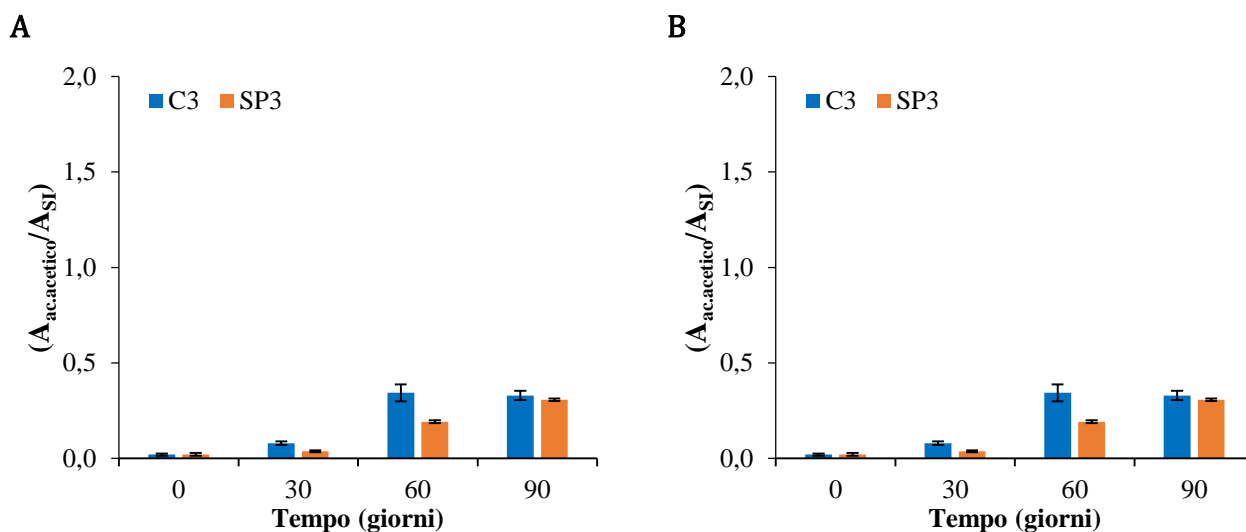


Figura 14. Andamento del rapporto tra l'area assoluta riferita all'acido butirrico (A) o all'acido acetico (B) e la media dell'area assoluta dello standard nel corso della stagionatura nei formaggi del caseificio 3.

Controllo C3



Sperimentale SP3



Figura 15. Foto del campione di controllo senza inoculo di *L. casei* (C3) e del campione sperimentale con inoculo di *L. casei* (SP3) del caseificio 3 a 90 giorni di stagionatura.

CONCLUSIONI

Questa sperimentazione aveva come obiettivo quello di valutare l'efficacia di un ceppo commerciale di *L. casei* nel limitare lo sviluppo degli anomali ed indesiderati difetti di gonfiore nel formaggio Montasio, in sostituzione dell'uso del lisozima. L'inoculo di *L. casei* in caldaia è risultato utile a contenere eventuali difetti di gonfiore. Inoltre, i dati ottenuti dalle sperimentazioni effettuate nei diversi caseifici Partner di Progetto hanno messo in evidenza come, nelle condizioni operative adottate, il *L. casei* non ha influito in alcun modo sull'evoluzione e sull'equilibrio della flora autoctona, sul procedere dei processi di maturazione e sullo sviluppo dell'aroma del formaggio.

Al fine di superare i limiti imposti dal Disciplinare che, per tutelare la biodiversità e le caratteristiche del prodotto, impongono l'utilizzo di soli ceppi provenienti dalla zona di autoctonia del formaggio Montasio, sarà necessario procedere ad una selezione e caratterizzazione di nuovi ceppi autoctoni di *L. casei* che dovranno essere testati in campo per la capacità di contenere i difetti di gonfiore.