

Progetto LATSIER – Qualificazione della produzione di latte e siero vaccino

L'ormai rodato sistema di controllo del latte, attivo da oltre trent'anni, ha dato negli anni una decisiva spinta al miglioramento qualitativo di questa materia prima e di riflesso ai prodotti derivati, permettendo ai produttori e ai trasformatori di fare scelte di gestione zootecnica, tecnologica, commerciale ed economica. Il settore lattiero Veneto, a grande vocazione casearia, ravvisa da tempo l'esigenza di approfondire l'aspetto della qualificazione del latte e dei suoi derivati sia in termini di formaggio e derivati ottenuti che di siero prodotto. Di seguito le linee di ricerca affrontate e i principali risultati.

1. Implementazione routinaria di analisi e determinazioni MIR della attitudine casearia del latte nell'ambito dei circuiti: dei controlli individuali del latte e dei controlli di massa a livello aziendale.

Durante il corso del progetto è stato installato uno strumento per l'analisi diretta dell'LDG (lattodinamografia) presso il laboratorio dell'associazione provinciale allevatori del Veneto (ARAV) dove vengono analizzati sia campioni di massa a livello aziendale che individuali per i controlli funzionali. Allo scopo di valutare l'affidabilità dell'analisi LDG ripetuta per lo stesso campione nel medesimo laboratorio (ripetibilità) o in laboratori diversi (riproducibilità), sono stati effettuati dei ring-test di comparazione per valutare le performance del laboratorio e monitorarle nel tempo confrontando i metodi, le procedure di analisi e i risultati ottenuti al fine di standardizzare la metodica lattodinamografica. Durante il corso del progetto sono stati fatti 3 ring test tra il Laboratorio Latte di Veneto Agricoltura (Thiene) e laboratorio ARAV eseguiti seguendo un protocollo concordato tra le due parti facendo riferimento a indicazioni scientifiche. Se da una parte si è cercato di implementare e valutare l'analisi diretta dell'LDG, si è inoltre lavorato per rendere routinaria l'analisi. Infatti l'analisi diretta non permette di analizzare una quantità elevata di campioni per giornata di analisi e necessita di molta manualità.

Una tecnica che è stata studiata è l'utilizzo della predizione dell'analisi attraverso lo spettro del medio infrarosso (MIR). Durante il corso del progetto sono stati presi accordi con FOSS Italia, la quale ha elaborato una prima curva di calibrazione per l'analisi LDG inserendola presso le strumentazioni del laboratorio ARAV. Dalle prime analisi, anche se la curva di calibrazione è ancora in fase di messa appunto e collaudo, si riscontra una buona correlazione tra il dato di misura diretta e predetta con il MIR.

2. Utilizzo dei dati di cui al punto 1a per la valutazione genetica dei riproduttori bovini avviati alle prove di progenie nel Veneto.

Durante il progetto si sono presi accordi con il centro di riproduzione animale Itermizoo con lo scopo di iniziare la raccolta e analisi di campioni individuali per l'LDG e valutare i riproduttori per questo nuovo carattere. In collaborazione con le associazioni allevatori del Veneto, sono state campionate circa 3000 bovine figlie di 85 tori. Le bovine venivano campionate durante il controllo funzionale con un campione doppio, uno per l'analisi per i controlli funzionali e l'altro per l'analisi diretta dell'LDG e dell'acidità. Questi primi dati permettono di fare una prima valutazione genetica dei riproduttori per questi nuovi caratteri. Inoltre quando si potrà iniziare la raccolta di dati predetti con la tecnologia MIR, si potrà valutare l'accuratezza della stima con misura diretta verso misura predetta.

3. Utilizzo dei dati di cui al punto 1b per la diffusione di sistemi di pagamento del latte più completi.

Questo punto aveva l'obiettivo di analizzare gli attuali sistemi di pagamento latte qualità. Sono stati raccolti un totale di 5 sistema di pagamento latte qualità applicati presso i caseifici coinvolti nel progetto e uno formulato inserendo anche i parametri di coagulazione del latte. I sistemi di pagamento per il latte qualità prevedono un prezzo base per litro di latte e dei premi o penalità in funzione principalmente del contenuto di grasso, proteina, cellule somatiche, carica batterica totale. Per quanto riguarda il contenuto di grasso e proteina si considera una soglia neutrale e un aumento e decremento lineare del prezzo con lo scostamento delle analisi sul latte da questa soglia. Da questi parametri si possono stimare i valori per unità di prodotto pagati per grasso, proteina e siero di latte. In questa analisi si è considerato un prezzo base del latte di 0.35 €/litro. Da questa stima risulta che i sistemi di pagamento raccolti possono risultare molto variabili per il valore attribuito alle varie componenti. Il valore attribuito al grasso è quello più omogeneo tra i sistemi di pagamento. Si va da un minimo di 1.409 €/kg ad un massimo di 2 €/kg. Il valore per la proteina invece varia tra 4.226 e 10 €/kg. Il valore stimato per il siero (senza però considerare le penalità date a Cellule somatiche, carica batterica totale e altri parametri) risulta anch'esso molto variabile andando da un valore negativo -0.072 €/kg fino ad un valore di 0.172 €/kg.

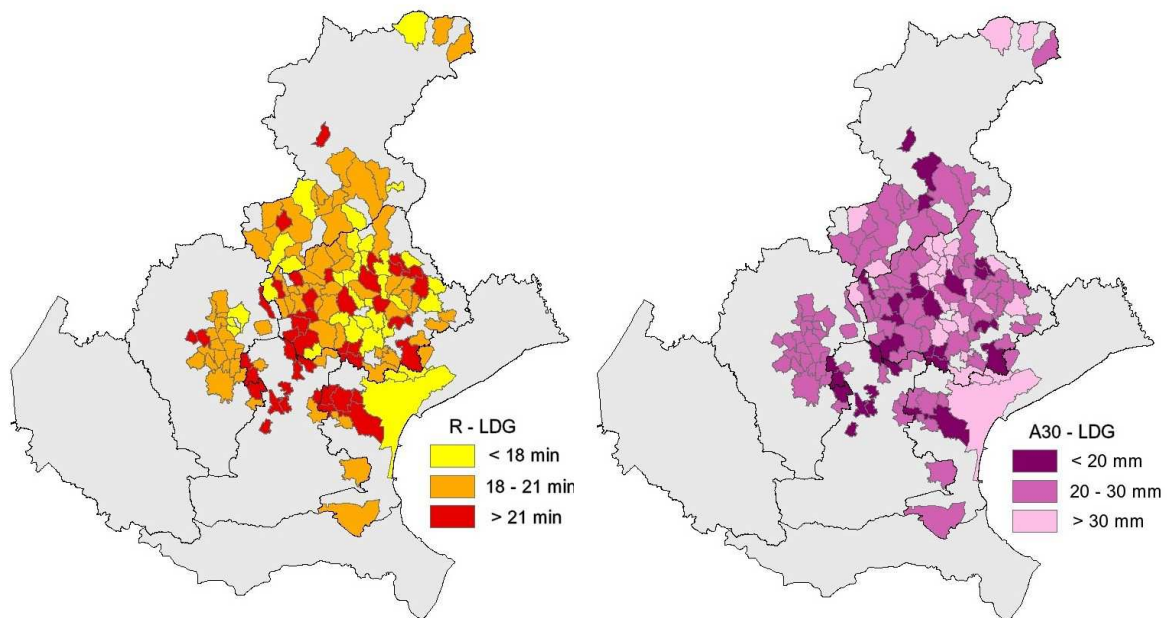
La situazione è molto eterogenea e questo è poco spiegabile visto il fatto che questi caseifici hanno come principale destinazione del latte la trasformazione casearia, e sottolinea il fatto della necessità di definire sistemi di pagamento il più possibile condivisi e uniformati per la filiera lattiero casearia Veneta. Per il sistema di pagamento proposto prevedendo anche caratteri di attitudine casearia, si è ritenuto idoneo per un primo inserimento di questi parametri un valore di 0.2% del prezzo base del latte per minuto di R e 0.1% per mm per l'A30. Considerando un prezzo base di 0.35 €/litro si ha un valore di 0.00070 €/min per R e 0.00035 €/mm per

l'A30. Naturalmente è da considerare in fascia di premio un latte che coaguli prima di un valore soglia e che abbia una consistenza del coagulo superiore ad un valore soglia, e penalità se viceversa.

4. Aggiornamento e diffusione della mappatura territoriale del latte Veneto in funzione delle caratteristiche nutrizionali e di trasformazione casearia.

Questa fase iniziata con il progetto Filatve è stata portata avanti chiedendo l'aggiornamento ai caseifici coinvolti nel progetto dell'archivio degli indirizzi di allevamento dei soci conferenti per ricavare le coordinate geografiche delle singole aziende attraverso l'indirizzo dell'allevamento e utilizzando il software Google Earth®. Una volta rilevate le coordinate di longitudine e latitudine di ogni azienda è stato utilizzato un sistema operativo informatico G.I.S. (ESRI, ArcGIS 9.2®) per la collocazione degli allevamenti nella mappa della regione Veneto. I parametri dell'analisi lattodinamografica hanno un'alta variabilità nel territorio. Si evidenzia come in certe zone si riscontra una scarsa attitudine casearia: alti tempi di coagulazione e bassa consistenza del caugulo. In queste zone sarà opportuno concentrare gli sforzi per un'assistenza tecnica per il miglioramento di questi caratteri.

Rappresentazione del tempo di coagulazione (R-LDG) e della consistenza del coagulo (A₃₀-LDG) per area geografica.



5. Studio della problematica della shelf-life in diverse tipologie di formaggio.

La sperimentazione, realizzata presso tre caseifici, ha previsto:

- la individuazione nei diversi prodotti oggetto di studio di alcuni attributi di qualità che ne potrebbero condizionare qualità e shelf-life. Sono stati considerati i seguenti formaggi: mozzarella, stracchino, caciotta, Asiago Pressato porzionato. Caciotta ed Asiago Pressato porzionato erano confezionati in atmosfera modificata.
- lo studio della variazione degli attributi di qualità durante la conservazione del prodotto (6 °C costanti nel caso di mozzarella, stracchino, caciotta; 8 °C costanti nel caso dell'Asiago Pressato porzionato) .

Non risultano rilevanti nella mozzarella i valori di lieviti e muffe, che nel caso siano presenti non raggiungono mai concentrazioni superiori a 400 ufc/g. Alla scadenza (T4 – 21 giorni) non è inoltre rilevabile la presenza di *Salmonella* e di *Listeria monocytogenes*.

Analoghe considerazioni possono essere fatte per lo stracchino. Nel lotto di stracchino esaminato il principale problema è rappresentato da *Pseudomonas* che pur presente in quantità inferiori a 100 ufc/g al momento del confezionamento, può sviluppare durante la conservazione del prodotto, soprattutto nei campioni non conservati in atmosfera protettiva. Più contenuta risulta la presenza di muffe, mentre per quanto riguarda i lieviti se ne riscontra una presenza significativa in alcuni campioni non conservati in atmosfera protettiva.

Un parametro critico in grado di condizionare notevolmente la shelf life delle caciotte è invece rappresentato dallo sviluppo superficiale di muffe. Dall'esame dei dati microbiologici relativi alle caciotte si osservano comunque valori di coliformi, di *E.coli* e di stafilococchi coagulasi positivi inferiori a 10 ufc/g nella quasi totalità dei campioni considerati. Anche *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* testate a scadenza (T4- 60 giorni) risultano assenti confermando che il prodotto mantiene requisiti di sicurezza per tutta la vita commerciale.

Infine, per quanto riguarda l'Asiago Pressato porzionato, dall'esame dei dati si osservano valori di coliformi, di *E.coli* e di stafilococchi coagulasi positivi inferiori a 10 ufc/g nella totalità dei campioni considerati. *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, testate a scadenza risultano assenti confermando che anche questo prodotto mantiene requisiti di sicurezza per tutta la vita commerciale. I parametri più critici sono rappresentati dai lieviti e dai microrganismi contaminanti, mentre le muffe risultano inferiori a 100 o a 10 ufc/g nella maggior parte delle unità campionarie considerate.

Relativamente ai parametri chimici si rileva in entrambi i lotti di mozzarella una diminuzione di acidità nel tempo e un andamento in crescita degli indicatori della lipolisi (indice di lipolisi) e della proteolisi (indice di maturazione) misurati al T1 e al T4. La concentrazione del cloruro di sodio misurata nel liquido di governo ha inizialmente valori di circa la metà rispetto alla pasta e aumenta arrivando al T4 ad una concentrazione generalmente simile a quella in pasta.

Una leggera tendenza alla crescita dell'indice di proteolisi passando da T1 al T4 si osserva anche nella caciotta, mentre per quanto riguarda l'indice di lipolisi è stato rilevato un leggero andamento in crescita da T1 a T4 nel 1° lotto esaminato e l'assenza di variazioni di rilievo nel lotto successivo.

Per quanto riguarda l'Asiago Pressato porzionato in entrambi i lotti la concentrazione di umidità e proteine non subisce variazioni di rilievo nel corso della shelf-life, così come il valore di pH. Si osservano inoltre un processo proteolitico e un leggero aumento dell'indice di lipolisi da T1 a T4.

Nella mozzarella le analisi sensoriali sono state applicate al tempo T4 ai due lotti di produzione esaminati; il profilo sensoriale è stato costruito attraverso la seguente scheda di valutazione.

L'analisi di tre campioni appartenenti al medesimo lotto ha dimostrato una certa uniformità sensoriale di produzione, che consente di confrontare le mozzarelle al tempo T4 con i relativi controlli.

Nei prodotti vicino al tempo di scadenza sono state evidenziate le seguenti principali modificazioni:

- il colore delle mozzarelle tende verso il giallo in modo riconoscibile visivamente,
- esternamente la buccia ha la tendenza a divenire rugosa e discontinua,
- si osserva un leggero aumento dell'aspetto granuloso della pasta interna,
- si nota una diminuzione dell'intensità globale dell'odore;
- non sono emerse note relative alla comparsa di odori ed aromi anomali.

Anche nel caso della caciotta è stato studiato il profilo sensoriale del prodotto a scadenza rispetto ad un controllo costituito da un prodotto fresco. Sono stati in questo caso considerati i seguenti parametri: colore esterno, colore interno, intensità odore, intensità aroma, dolce, salato, acido, amaro, consistenza, elasticità, adesività. Sono risultate significative le variazioni del colore esterno ed interno della pasta, l'intensità di odore ed aroma e la consistenza. In particolare, si è osservato un aumento di colore e delle intensità olfattive, mentre la consistenza del prodotto, come previsto, è risultata inferiore a scadenza rispetto il controllo.

Analogamente agli altri formaggi, le caratteristiche sensoriali del formaggio Asiago Pressato porzionato sono state monitorate durante la conservazione attraverso la determinazione del profilo sensoriale. Sono stati considerati per questo formaggio i seguenti parametri: intensità odore, intensità aroma, dolce, salato, acido, amaro. Sia l'intensità totale di odore che quella dell'aroma subiscono delle variazioni significative; soprattutto le caratteristiche di aroma aumentano in modo significativo da T1 a T4. Tra le caratteristiche gustative è significativo l'aumento dell'acidità da T1 a T4.

6. Nuove tecnologie finalizzate alla riduzione di conservanti in pasta ed in crosta dei formaggi.

Questa seconda linea di ricerca si è posta come principale obiettivo l'applicazione di nuove tecnologie finalizzate alla riduzione dell'impiego di conservanti chimici nella produzione di formaggi. In particolare, sono state testate due tecnologie, una basata sull'inoculo di particolari ceppi di batteri lattici produttori di sostanze in grado di inibire muffe e lieviti, l'altra sull'impiego di trattamenti con ozono.

Nel primo caso è stato utilizzato in caldaia assieme allo starter un ceppo di *Lactobacillus plantarum* appartenente alla collezione microbica di Veneto Agricoltura. Tale ceppo è in grado di inibire la crescita di diverse specie di lieviti e muffe. Sono stati prodotti sia dei formaggi sperimentali inoculati con il ceppo antifungino, sia dei formaggi controllo non inoculati, prodotti con la tecnologia tradizionale. I formaggi sono stati valutati visivamente per la presenza di muffe superficiali. In tutte le lavorazioni effettuate è risultata un'evidente differenza in termini di quantità e tipologie di muffe presenti. In particolare, le lavorazioni controllo non inoculate con il ceppo di *L. plantarum* presentano una più evidente contaminazione con muffe e risulta predominante la presenza di muffe nere asportabili con maggior difficoltà dalle croste di formaggi.

Nel secondo caso, in collaborazione con il Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria dell'Università di Padova è stata applicata nei magazzini di stagionatura dell'azienda casearia che ha partecipato al progetto, una tecnologia basata sull'impiego di ozono. L'effetto microbicide dell'ozono è ampiamente documentato nei confronti di numerosi batteri patogeni e/o deterioranti sia gram positivi che gram negativi. Risulta inoltre attivo nei confronti di lieviti e muffe. Nel corso di questa attività progettuale è stato studiato l'effetto del trattamento con ozono su muffe e lieviti presenti sulla superficie del piano di appoggio delle forme e sulle forme stesse. È stato inoltre condotto uno studio sul tipo di muffe presenti negli ambienti di stagionatura attraverso campionamenti di aria mediante sistema S.A.S. I risultati ottenuti suggeriscono un interessante effetto dell'ozono sulle muffe e sui lieviti presenti sulle superficie del formaggio e sulle tavole di appoggio. Per quanto riguarda le tipologie di muffe presenti negli ambienti di stagionatura, muffe sulle quali verrà successivamente valutato l'effetto dell'ozono, l'analisi molecolare ha evidenziato la presenza prevalente di *Penicillium commune/camemberti*, specie particolarmente ricorrente nei prodotti lattiero caseari. È stata inoltre riscontrata la presenza di *Penicillium chrisogenum* e *P. angulare* e di alcuni ceppi appartenenti alla specie *Cladosporium*.

7. Implementazione di un approccio di tipo microbiologico per la valorizzazione dei sottoprodotti della caseificazione.

Il siero è composto per circa il 94% di acqua; la parte solida contiene circa 9 g/l di proteine (sieroproteine) e 50 g/l di lattosio, oltre a 6 g/l di ceneri, costituite prevalentemente da sali minerali (principalmente potassio, calcio e fosforo). I lipidi sono presenti in tracce (< 1 g/l) e le vitamine in piccole quantità (essenzialmente vitamina A). Il valore nutritivo è di circa 24 kcal/100 g. La scotta, che rappresenta lo scarto della lavorazione della ricotta, risulta evidentemente più povera di proteine (mancano le sieroproteine) e di zuccheri (usati dai batteri).

Il 94% in volume del latte impiegato per la caseificazione è costituito dal siero, che rappresenta un prodotto ad alto valore biologico, che viene tuttavia destinato prevalentemente all'alimentazione zootecnica. In base all'attuale normativa, il siero di latte è considerato un rifiuto speciale, in ragione del suo alto carico inquinante. Il problema dello smaltimento è quindi molto sentito presso i caseifici, i quali, soprattutto al Nord, risolvono la cosa cedendo ingenti quantitativi di siero a gruppi industriali esteri, che ne ricavano prodotti raffinati ad alto valore aggiunto, che vengono poi ricollocati in gran parte sul mercato italiano.

L'obiettivo verrà raggiunto attraverso uno studio di fattibilità volto ad accertare la possibilità di utilizzare questi materiali come substrato per lo sviluppo di microrganismi fermentativi, scelti tra quelli utilizzati in ambito alimentare. Alla fine del processo i microrganismi potrebbero essere recuperati ed utilizzati in preparati alimentari oppure l'intero prodotto di fermentazione potrebbe essere utilizzato come bevanda fermentata.

Dai caseifici aderenti al progetto sono stati ottenuti i campioni di siero e scotta. Al momento del prelievo in azienda è stato misurato anche il pH dei campioni raccolti che, per quanto riguarda il siero, risultava compreso tra 6,5 e 7,0, tranne nel caso del campione ottenuto dalla lavorazione Grana Padano in cui il valore era inferiore (pH 6,0).

Il pH della scotta in entrambi i campioni è risultato più basso di quello dei sieri e compreso tra 5,4 e 6,0. Questa differenza è imputabile alla tecnologia di produzione della ricotta che utilizza acidi organici (principalmente citrico e lattico) per favorire la coagulazione delle proteine del siero, con conseguente effetto di un abbassamento del pH.

Per poter utilizzare siero e scotta come substrato di crescita per microrganismi, si è ritenuto necessario ridurre il numero di microrganismi presenti in questi substrati, sviluppatasi durante il processo di caseificazione. Per tale ragione sono stati provati i seguenti trattamenti:

- A. Pastorizzazione a 70°C per 30 sec. Questo trattamento ha permesso una riduzione di circa 2 log (=100 volte) della popolazione microbica, eccezion fatta per gli enterococchi, notoriamente più termoresistenti;

- B. Sterilizzazione breve a 121°C per 5 minuti. Eliminazione completa dei microrganismi
- C. Centrifugazione del prodotto "B" a 5000 g a 10°C per 20 minuti
- D. Filtrazione del prodotto "C" a 0,22 µm.

Le prime prove di crescita di microrganismi in siero e scotta sono state condotte in microcolture misurando lo sviluppo attraverso l'aumento di torbidità del mezzo di crescita (densità ottica a 660 nm). Ciò è stato possibile anche grazie al fatto che il siero o scotta erano stati centrifugati, e quindi resi limpidi. Ogni microrganismo è stato introdotto ad una concentrazione di circa 1 milione di cellule per ml. Dai grafici si apprezza come la scotta, che teoricamente è un mezzo nutritivo più povero del siero, sia perfettamente in grado di far sviluppare i microrganismi in modo comparabile con il siero.

Sulla base dei risultati degli esperimenti precedenti sono stati scelti dei microrganismi commerciali, starter e probiotici, da far sviluppare in scotta, e precisamente:

- L. casei Shirota, L. casei Immunitass, L. johnsonii LA1, L. acidophilus LA5, L. rhamnosus GG
- L. delbrueckii subsp. bulgaricus AV e L. delbrueckii subsp. bulgaricus BR
- S. thermophilus CP e S. thermophilus PR

La crescita è stata sempre buona, determinando un aumento della popolazione da 100 a 1000 volte. I valori di pH sono tutti al di sotto del valore del testimone non fermentato, ed in alcuni casi raggiungono valori interessanti, prossimi a quelli dello yogurt.

Sulla base dei risultati precedenti si è scelta una combinazione di ceppi valutando soprattutto la capacità di moltiplicazione e l'abbassamento del pH. La scelta è caduta sui seguenti tre ceppi:

L. acidophilus LA5 - L. bulgaricus AV - S. thermophilus PR

Con questi ceppi si è voluta allestire una fermentazione di scotta per esaminare i risultati ottenibili da un punto di vista tecnologico ed organolettico. E' stata misurata la popolazione microbica raggiunta, il pH finale e fatta una valutazione sensoriale da parte di un panel di consumatori abituale di yogurt.

I valori di sviluppo delle popolazioni batteriche sono stati decisamente elevati, del tutto paragonabili, se non superiori, a quelli presenti nello yogurt. Il valore del pH è nella media del valore degli yogurt. La valutazione organolettica del panel ha rilevato delle note positive, con una prevalenza di note acide ma anche dolci, con forte persistenza della caratteristica acida.

E' possibile concludere che la ricerca ha dato indicazioni positive e che è senz'altro conveniente avviare un programma di ricerca dedicato alla scelta di microrganismi e delle condizioni ottimali per l'utilizzo di scotta per la produzione di una bevanda fermentata contenente batteri probiotici.