



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Dottorato in Scienze Veterinarie

XXXIII ciclo

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Rosaria Laurà

Curriculum: Sanità Pubblica e Sicurezza Alimentare

S.S.D. AGR/15

**SELEZIONE DI LATTOBACILLI PROBIOTICI AD ATTIVITA'
β-GALATTOSIDASICA E PRODUZIONE DI UN FORMAGGIO FRESCO
FUNZIONALE A RIDOTTO CONTENUTO DI LATTOSIO.
QUALITA', SICUREZZA E SHELF-LIFE.**

Dottorando:

Maria Merlino

Tutor:

Chiar.mo Prof. Antonella Verzera

Co-Tutor:

Chiar.mo Dott. Fabrizio Cincotta

INDICE

INTRODUZIONE

Capitolo 1

| | | |
|-----|---|--------|
| 1.1 | Intolleranza al lattosio | Pag 8 |
| 1.2 | Epidemiologia dell'intolleranza al lattosio | Pag 9 |
| 1.3 | Tipologie di intolleranza al lattosio | Pag 10 |
| 1.4 | Test diagnostici | Pag 11 |

Capitolo 2

| | | |
|-------|--|--------|
| 2.1 | Il mercato dei prodotti lattiero caseari delattosati | Pag 13 |
| 2.2 | L'industria dei prodotti lattiero caseari delattosati e tecnologia di produzione | Pag 14 |
| 2.3 | β -galattosidasi: metodiche estrattive e suo utilizzo | Pag 14 |
| 2.4 | Sistemi di delattosaggio | Pag 20 |
| 2.4.1 | Delattosaggio in batch | Pag 22 |
| 2.4.2 | Delattosaggio in pack o asettico | Pag 24 |
| 2.4.3 | Sistemi con enzima libero | Pag 26 |
| 2.4.4 | Sistemi con enzima immobilizzato | Pag 26 |
| 2.4.5 | Sistemi di delattosaggio per filtrazione | Pag 27 |
| 2.5 | Prodotti lattiero-caseari delattosati commerciali | Pag 28 |
| 2.6 | Stabilità dei prodotti delattosati | Pag 29 |

Capitolo 3

| | | |
|-----|---|--------|
| 3.1 | Metodi per il monitoraggio della shelf-life | Pag 32 |
| 3.2 | Fattori che influenzano la shelf-life | Pag 33 |
| 3.3 | Shelf-life dei prodotti lattiero caseari | Pag 37 |
| 3.4 | Composti volatili responsabili dell'aroma durante la shelf-life | Pag 47 |
| 3.5 | Shelf-life dei prodotti lattiero caseari delattosati | Pag 48 |

Capitolo 4

- | | | |
|-----|---|--------|
| 4.1 | I batteri lattici | Pag 49 |
| 4.2 | I lattobacilli: utilizzo ed effetti benefici (batteri probiotici) | Pag 50 |
| 4.3 | Ruolo dei lattobacilli nella riduzione del lattosio | Pag 52 |

SCOPO DELLA TESI

Capitolo 5

- | | | |
|-----|------------------|--------|
| 5.1 | Scopo della tesi | Pag 55 |
|-----|------------------|--------|

LINEE DI RICERCA

Capitolo 6

LINEE DI RICERCA 1

Selezione lattobacilli per la produzione di formaggi freschi delattosati probiotici

- | | | |
|-------|---|--------|
| 6.1 | Screening attività β -galattosidasi di lattobacilli presenti in prodotti lattiero-caseari | Pag 58 |
| 6.2 | Preparazione piastre X-gal per testare la presenza dell'attività β -galattosidasi | Pag 60 |
| 6.3 | Curva di crescita dei batteri in diversi terreni di coltura | Pag 62 |
| 6.4 | Valutazione del surnatante in piastre X-gal | Pag 65 |
| 6.5 | Quantificazione dell'attività β -gal mediante kit FDG- β -gal | Pag 66 |
| 6.6 | Rapid PCR e sequenziamento dell'RNA 16s | Pag 70 |
| 6.7 | Studio del comportamento dei lattobacilli nel latte | Pag 76 |
| 6.7.1 | Quantità di cellule messa in 60 mL di latte | Pag 77 |

Capitolo 7

LINEE DI RICERCA 2

Produzione di formaggio probiotico a ridotto contenuto di lattosio

- | | | |
|-----|--|--------|
| 7.1 | Processo produttivo di formaggio fresco probiotico a ridotto contenuto di lattosio mediante l'impiego di lattobacilli ad attività β -galattosidasi | Pag 81 |
|-----|--|--------|

| | | |
|-------|--|--------|
| 7.2 | Preparazione della coltura starter da utilizzare come inoculo nel formaggio | Pag 83 |
| 7.3 | Preparazione dei formaggi freschi | Pag 84 |
| 7.4 | Caratteristiche dei formaggi sperimentali probiotici a ridotto contenuto di Lattosio | Pag 89 |
| 7.4.1 | Determinazione del pH | Pag 89 |
| 7.4.2 | Acidità | Pag 90 |
| 7.4.3 | Contenuto in sale | Pag 92 |
| 7.4.4 | Umidità, Contenuto Lipidico e Proteico | Pag 92 |
| 7.4.5 | Texture | Pag 94 |
| 7.4.6 | Analisi microbiologiche | Pag 96 |
| 7.4.7 | Contenuto di lattosio e glucosio | Pag 99 |

Capitolo 8

LINEE DI RICERCA 3

Sviluppo di un metodo per la determinazione della Shelf-Life di formaggi freschi delattosati tramite lo studio dei composti volatili responsabili dell'aroma

| | | |
|-----|--|---------|
| 8.1 | Produzione dei campioni di mozzarella classica e delattosata | Pag 101 |
| 8.2 | Estrazione HS-SPME della frazione volatile | Pag 102 |
| 8.3 | Analisi GC-MS della frazione volatile | Pag 102 |
| 8.4 | Analisi sensoriale | Pag 104 |
| 8.5 | Analisi statistica | Pag 105 |
| 8.6 | Profilo volatile di TM e LFM durante la shelf-life | Pag 105 |
| 8.7 | Profilo sensoriale di TM e LFM durante la shelf-life | Pag 109 |
| 8.8 | Conclusioni | Pag 110 |

CONCLUSIONI

Capitolo 9

| | | |
|-----|-------------|---------|
| 9.1 | Conclusioni | Pag 120 |
|-----|-------------|---------|

| | |
|---------------------|---------|
| BIBLIOGRAFIA | Pag 121 |
|---------------------|---------|

SUMMARY

The research activity carried out has allowed the development of a new production strategy to improve the quality and safety of lactose-free dairy products. It is well known that lactose-depleted milk is more susceptible to heat treatments and Maillard's reaction with a consequent decrease of its nutritional and sensorial quality. Therefore, the aim of this thesis was to produce lactose-reduced cheeses without using lactose-depleted milk by the addition of commercial lactase enzyme to the cheese milk, but by using lactic bacteria with β -galactosidasic activity as "adjunct culture". Therefore, a screening of β -galactosidasic activity of lactic bacteria isolated from bovine colostrum samples was carried out. This screening allowed to select, characterize and identify two strains of lactobacilli, namely *L. reuteri* and *L. amylovorus*, chosen, not only for their ability to hydrolyze lactose, but also for their probiotic activity. They were applied to the production of a fresh cheese type named Minas Frescal allowing to obtain a fresh cheese with reduced lactose content and, at the same time, a functional cheese. Between the two strains, *L. amylovorus* showed the highest β -galactosidasic activity reducing the lactose content of the cheese to values around 0.3% on the second day after production. The cheese thus obtained has maintained the same compositional (except for the lactose content), microbiological and rheological characteristics of the traditionally produced cheese.

In a world market where the demand for "free from" and health (functional) food is constantly growing, the proposed process innovation suggests interesting developments for large-scale application.

SOMMARIO

L'attività di ricerca svolta ha consentito lo sviluppo di una nuova strategia produttiva per il miglioramento della qualità e sicurezza dei prodotti lattiero-caseari delattosati. È noto che il latte delattosato è più suscettibile ai trattamenti termici ed alla reazione di Maillard con conseguente diminuzione della sua qualità nutrizionale e sensoriale. Dunque, l'obiettivo di questa tesi è stato quello di produrre formaggi a ridotto contenuto di lattosio senza ricorrere all'utilizzo di latte delattosato o all'aggiunta al latte di caseificazione dell'enzima lattasi commerciale, ma di impiegare batteri lattici con attività β -galattosidasica, quali "*adjunct culture*". A tal fine, è stato effettuato uno screening dell'attività β -galattosidasica di batteri lattici, isolati da campioni di colostro bovino, che ha consentito di selezionare, caratterizzare e identificare due ceppi di lattobacilli, *L. reuteri* e *L. amilovorus*, scelti, oltre che per la loro capacità di idrolizzare il lattosio, anche per la loro attività probiotica al fine di ottenere un formaggio fresco a ridotto contenuto di lattosio e, al contempo, funzionale. Tra i due ceppi, *L. amilovorus* ha mostrato la maggiore attività β -galattosidasica riducendo a valori intorno allo 0.5% il contenuto di lattosio del formaggio già al secondo giorno di produzione. Il formaggio così ottenuto ha mantenuto le caratteristiche compositive (eccetto per il contenuto in lattosio), microbiologiche e reologiche del formaggio prodotto in maniera tradizionale.

In un mercato mondiale in cui la domanda di alimenti "free from" e di alimenti salutistici (funzionali) è in continua crescita, l'innovazione di processo proposta lascia intravedere interessanti sviluppi per l'applicazione su larga scala.

INTRODUZIONE

1.1 Intolleranza al lattosio

Per millenni il latte è stato considerato l'alimento più completo offerto dalla natura (Park Y.W. 2009), giocando un ruolo importante nella dieta di oltre 6 miliardi di persone nel mondo (Mcgrane M.M. et al., 2011). Sebbene il latte sia un alimento esclusivo per il nutrimento del neonato nei suoi primi mesi di vita, in quanto fonte di energia, proteine di alta qualità e micronutrienti essenziali (come calcio, magnesio, potassio, zinco e fosforo), il suo consumo può continuare anche in età adulta. Il principale zucchero presente nel latte è il lattosio, un disaccaride sintetizzato nella ghiandola mammaria grazie alla presenza dell'enzima lattasio-sintetasi che idrolizza il legame β -1,4-glicosidico tra il D-galattosio e il D-glucosio.

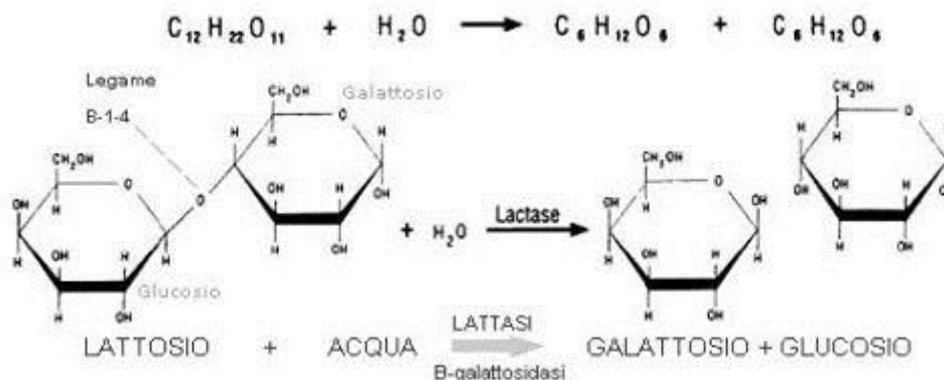


Figura 1.1 – Reazione di idrolisi del lattosio, operata dall'enzima β -galattosidasi lattasi, nei suoi due monosaccaridi glucosio e galattosio.

La concentrazione del lattosio nel latte umano è relativamente elevata (7%), mentre il latte vaccino ne contiene il 4,6% (Van Scheppingen W.B. et al. 2017). Il lattosio, una volta ingerito, subisce idrolisi a livello duodenale per opera di un enzima ad attività β -galattosidasi denominato lattasi, sito sulla superficie apicale degli enterociti nella sommità dei microvilli del piccolo intestino e avente massima espressione a livello medio digiunale. I monomeri glucosio e galattosio, una volta assorbiti a livello degli

enterociti, seguiranno due diversi destini, il primo come fonte di energia e il secondo come componente di glicolipidi e glicoproteine (Panesar, Kumari, & Panesar, 2010). L'attività della lattasi raggiunge la massima espressione alla nascita per poi decrescere dopo i primi mesi di vita sino, a volte, a scomparire. In caso di carenza o assenza dell'enzima (ovvero ipolattasia), il lattosio non verrà digerito ma rimarrà nel lume intestinale (nell'intestino crasso) dove verrà fermentato dalla flora batterica dell'intestino. Il mancato assorbimento del lattosio determina quella che comunemente è nota come *intolleranza al lattosio*, ovvero il fenomeno per cui il disaccaride non idrolizzato, verrà accumulato nella porzione distale del piccolo intestino ove eserciterà un effetto osmotico con richiamo di acqua e sodio provocando dissenteria. Inoltre, a seguito dell'accumulo di lattosio nel colon, il processo di fermentazione batterica produrrà metano, diossido di carbonio, idrogeno e acidi grassi volatili che determinano sintomi come flatulenza, meteorismo, crampi addominali, nausea ed eruzioni cutanee. In molte persone adulte provenienti da paesi dell'Europa occidentale l'attività della lattasi rimane costante, ma nei paesi asiatici circa il 95% della popolazione adulta mostra una carenza di lattasi (Schaafsma G., 2008).

L'intolleranza al lattosio è spesso confusa con l'allergia alle proteine del latte vaccino, tuttavia è nettamente diversa poiché non è immunomediata, ma correlata al malassorbimento del lattosio, benché alcuni sintomi gastrointestinali come diarrea, dolore addominale e vomito siano comuni (Binetti P. et al., 2016).

1.2 Epidemiologia dell'intolleranza al lattosio

Oltre i due terzi della popolazione mondiale, compresa la maggior parte della popolazione del mondo asiatico, sono intolleranti al lattosio. Solo il 35% circa degli esseri umani è in grado di digerire il lattosio dopo i 7-8 anni di età (Leonardi et al., 2012). In Sud Africa, Giappone e Cina la percentuale di latte-intolleranti varia dall'80% al 100% della popolazione, mentre nei paesi scandinavi la percentuale riportata è solo del 5-15%. Negli Stati Uniti l'ipolattasia colpisce il 22% circa della

popolazione adulta. In Europa la diffusione è variegata: nell'Europa meridionale si registra il più alto numero di soggetti intolleranti (circa il 70%), nell'Europa centrale la percentuale si aggira attorno al 30%, mentre nell'Europa settentrionale l'incidenza è nettamente inferiore con una percentuale del 5% ([EFSA, 2010](#)). Anche in Italia vi è eterogeneità epidemiologica tra le regioni. In particolare si registra una maggiore incidenza nelle regioni meridionali e nelle isole (circa il 70%) rispetto alle regioni del nord. Alcuni studiosi sostengono che la modifica genetica che porta alla tolleranza al lattosio (definita 13910 C/T nel gene LCT), sia il risultato della necessità dei nostri avi di fronteggiare le conseguenze della carenza di calcio apportandolo attraverso l'assunzione di latte. In particolare, gli abitanti del Nord Europa ne avrebbero tratto vantaggio poiché soggetti ad un clima poco soleggiato e quindi a una minore produzione endogena di vitamina D, presente nel latte e importante per l'assorbimento di calcio ([Vuorisalo et al., 2012](#)).

1.3 Tipologie di intolleranza al lattosio

Sebbene la sintomatologia sia la medesima, diverse sono le cause che danno origine all'intolleranza al lattosio. Per tale motivo esiste una distinzione tra tre diverse forme di ipolattasia ([NIDDK website, 2014](#)):

- forma genetica o primaria
- forma acquisita o secondaria
- forma congenita

La forma *genetica* detta anche *primaria* è la forma più diffusa e caratterizzata dall'assenza, parziale o totale, della produzione dell'enzima lattasi. È una condizione geneticamente determinata da una progressiva riduzione, nel corso della vita, dell'attività enzimatica, che può manifestarsi dopo lo svezzamento nel bambino o più tardivamente nell'adulto. Si ipotizza sia dovuta a una trasmissione per via autosomica recessiva o autosomica dominante a penetranza incompleta.

L'ipolattasia *acquisita* o *secondaria* è causata da patologie secondarie che, a seguito di alterazioni della mucosa digiunale, determinano un danno enzimatico (Swagerty et al., 2002). A tal fine giocano un ruolo importante le infiammazioni e le infezioni acute dell'intestino come la salmonellosi, il colera e le enteriti acute o patologie croniche intestinali come le gastroenteriti, la celiachia, il morbo di Crohn, i linfomi, le enteriti post-attiniche, la sindrome dell'intestino irritabile e i deficit immunologici. Trattamenti farmacologici come i vari chemioterapici, possono causare una progressiva atrofia dei villi della mucosa intestinale con conseguente declino dell'attività lattasica. Diversamente dalla primaria, la forma secondaria è transitoria, dunque si risolve con la scomparsa della patologia responsabile e l'eliminazione del lattosio dalla dieta per un periodo circoscritto, per poi reintrodurlo gradualmente.

La forma *congenita*, di origine genetica a insorgenza precoce, è piuttosto rara. Si manifesta sin dalla nascita ed è determinata da una totale assenza di lattasi per via di una mutazione non senso a carico del gene codificante la produzione dell'enzima. Questa condizione determina nel neonato l'incapacità di digerire persino il colostro materno, con conseguente ritardo nella crescita, disidratazione e alcalosi metabolica. Si manifesta con diarrea acquosa e permane per tutta la vita.

1.4 Test diagnostici

Esistono diverse metodologie di rilevamento dell'intolleranza al lattosio:

- Test di tolleranza al lattosio
- H₂ Breath Test
- Test genetici

Il *test della tolleranza al lattosio* (Beyerlein L. et al., 2008) è oggi utilizzato raramente nella pratica clinica. Consiste nella misurazione seriata dei livelli della glicemia dopo un carico orale di 50g di lattosio. Le misurazioni glicemiche vengono effettuate a 0, 60 e 120 minuti. Tale test ha una sensibilità del 75% e una specificità del 96%. I falsi negativi si riscontrano principalmente in pazienti diabetici e con

patologie del piccolo intestino. Un anomalo svuotamento gastrointestinale può influenzare i risultati dei test.

L' *H₂ Breath Test* (Law D. et al., 2010) è il più diffuso e permette di diagnosticare l'intolleranza al lattosio rilevando la presenza di idrogeno nell'aria espirata prima e dopo la somministrazione di circa 25g di lattosio. Almeno 6 campioni verranno raccolti facendo espirare l'aria al paziente all'interno di una sacca ogni 30 minuti all'incirca per 3-4 ore. In caso di ipolattasia, dopo l'assunzione di lattosio, si avrà un incremento della produzione di idrogeno, al livello intestinale, per via dei processi di fermentazione. Una volta in circolo l'idrogeno prodotto verrà espulso dai polmoni tramite la respirazione. È un test non invasivo, con una specificità compresa tra il 90.2-100% e una sensibilità tra il 93%-100% (Hovde et al., 2009) benché soggetti con disturbi gastrici o con un'alterazione della flora intestinale in grado di produrre idrogeno o trattati in precedenza con cure antibiotiche potrebbero dare luogo a falsi positivi.

I *test genetici* analizzano principalmente il polimorfismo C/T-13910 mediante blood prick-test e PCR (Polymerase Chain Reaction). Essi sono in grado di definire la predisposizione all'intolleranza al lattosio, individuando così i soggetti a rischio deficit enzimatico. L'utilità di questi test è rappresentata dalla possibilità di poter adottare un adeguato stile di vita e un comportamento alimentare personalizzato per prevenire l'insorgenza dell'intolleranza al lattosio. Sono test semplici e non invasivi, con una sensibilità del 83% e una specificità del 72 % (Alliende et al., 2016), meglio tollerati dal paziente in quanto non prevedono la somministrazione orale di prodotti contenenti il lattosio. A differenza del precedente test, quest'ultimo permette di discriminare la tipologia di intolleranza ed effettuare una dietoterapia, che prevede l'esclusione dalla dieta di tutti gli alimenti contenenti lattosio, per un periodo noto e specifico per quella determinata forma di intolleranza.

2.1 Il mercato dei prodotti lattiero caseari delattosati

Per soddisfare la crescente domanda di prodotti lattiero-caseari, la produzione globale di latte, rappresentata in maggior misura (83% circa) dal latte bovino, è aumentata in tre decenni di circa il 60%, passando da 530 milioni di tonnellate nel 1988 a 843 milioni di tonnellate nel 2018 (FAO, 2018). Secondo le proiezioni dell'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) e dell'Organizzazione per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO), il livello di consumo pro-capite di latte e prodotti lattiero-caseari nei prossimi anni rimarrà elevato nei paesi occidentali dell'Unione Europea e del nord America, aumenterà significativamente nei paesi del Nord Africa, del Medio Oriente, dell'Asia e dell'Est Europa. Si prevede, inoltre, un notevole aumento della domanda nei Paesi dell'Unione Europea centro-orientale, negli Stati Uniti e in Russia (Górska-Warsewicz H. et al., 2019).

Negli ultimi anni, per fronteggiare i bisogni dei soggetti con intolleranza al lattosio, particolare attenzione è stata rivolta alla qualità e alla varietà dei prodotti appartenenti al settore dei prodotti lattiero-caseari senza lattosio. L'ampia disponibilità di questi prodotti delattosati, a livello globale, ha reso il loro commercio non più marginale e di nicchia, ma una scelta preferenziale per i consumatori. Di conseguenza, il mercato dei prodotti delattosati rappresenta decisamente il settore in più rapida crescita nell'industria lattiero-caseario (circa i due terzi del comparto), con un fatturato previsto di 9 miliardi di euro entro il 2022 (Euromonitor Database). Il mercato più grande e in rapida crescita dei prodotti delattosati si ha in Europa occidentale, seguita dall'America Latina (Dekker PJT et al., 2019).

2.2 L'industria dei prodotti lattiero caseari delattosati e tecnologia di produzione

Benché la maggior parte delle persone con intolleranza al lattosio siano paucisintomatiche con un dosaggio di lattosio inferiore ai 12g per pasto (Suchy F.J. et al. 2010), la tendenza generale dell'industria latte-casearia è quella di ridurre il più possibile il contenuto di lattosio. Mentre in passato la maggior parte dei produttori lattiero-caseari riteneva sufficiente ridurre la concentrazione di lattosio allo 0,5% o allo 0,1%, attualmente in alcuni paesi per essere definiti “senza lattosio” i prodotti devono possedere una percentuale inferiore allo 0,01%. Pertanto mezzo litro di latte delattosato avrà, in media, meno di 50 mg di lattosio, un quantitativo inferiore al fabbisogno nutrizionale. Per i soggetti intolleranti non sarà, quindi, necessario rinunciare al loro valore nutrizionale (Suchy F.J. et al 2010). Per ottenere quantità così basse di lattosio nella produzione di latte è necessario fare attenzione non solo alla lavorazione del latte, al dosaggio e all'efficacia dell'enzima utilizzato in questo processo, ma anche ai metodi analitici sensibili per determinare concentrazioni così basse di lattosio (Van Scheppingen W.B. et al. 2017).

È importante enfatizzare come, basse concentrazioni di lattosio possano ottenersi naturalmente e senza complessi procedimenti in alcuni formaggi e nella margarina. Per esempio il formaggio stagionato a pasta dura presenta tipicamente una concentrazione molto bassa di lattosio in quanto quest'ultimo, insieme al galattosio e al glucosio è spontaneamente metabolizzato dalla microflora (Monti L. et al., 2017). Al contrario durante i processi di produzione del burro e delle margarine (dietetiche) le concentrazioni di lattosio sono ridotte grazie a procedimenti quali la zangolatura e il lavaggio (Schripsema J., 2008), (Conzuelo F. et al., 2010).

2.3 β -galattosidasi: metodiche estrattive e suo utilizzo

Gli enzimi sono molecole proteiche che funzionano come catalizzatori delle reazioni chimiche (Chaudhary et al., 2015) e sono interamente coinvolti nel cambiamento e nello sviluppo delle proprietà nutrizionali, funzionali e sensoriali degli ingredienti e

quindi dei prodotti finali (Oort M., 2010). Trovano di conseguenza ampia applicazione nella lavorazione e nella produzione di prodotti alimentari: in particolare, gli enzimi lattici rappresentano un segmento importante dell'industria degli enzimi alimentari, venendo utilizzati per lo sviluppo e per il miglioramento delle caratteristiche sensoriali (aroma, sapore e colore) e delle proprietà funzionali dei prodotti lattiero-caseari (Singh et al., 2016). L'industria lattiero-casearia rappresenta uno dei più grandi mercati per l'applicazione di enzimi commerciali (Kelly & Fox, 2012) e uno degli enzimi più usati è la β -galattosidasi (EC 3.2.1.23) (Grosová et al., 2008).

L'enzima β -galattosidasi, più comunemente nota come “lattasi”, ha importanti applicazioni nell'industria di trasformazione alimentare. Può essere ricavato da una grande varietà di fonti come microrganismi (batteri, funghi e lieviti), piante (mandorle, pesche, albicocche, mele) e animali. Per ridurre i costi di produzione, gli enzimi microbici sono di gran lunga i più usati. L'enzima deve provenire da microrganismi che siano stati considerati “Generally Recognized as Safe” (GRAS), designazione quest'ultima conferita dalla FDA (Food and Drug Administration) a sostanze o additivi intenzionalmente aggiunti agli alimenti che non richiedono una revisione pre-vendita formale per garantirne la loro sicurezza in quanto stabilita da una lunga storia di uso alimentare (Dutra Rosolen et al., 2015). Gli enzimi maggiormente diffusi in commercio sono ricavati da funghi e lieviti (Dutra Rosolen et al., 2015): infatti oltre il 50% degli enzimi totali utilizzati nell'industria, sono ottenuti da lieviti e fonti fungine, mentre solo un terzo viene estratto da fonti batteriche (Panesar, Marwaha, & Chopra, 2010).

L'applicazione delle β -galattosidasi nei processi industriali dipende principalmente dalle loro proprietà intrinseche e dalle condizioni in cui avviene la reazione di idrolisi (Dutra Rosolen et al., 2015). Gli enzimi sono estremamente sensibili al pH del mezzo di reazione e quindi ogni β -galattosidasi ha un pH ottimale in cui raggiunge la massima attività (Scopes, 2002). β -Galattosidasi provenienti da *Penicillium simplicissimum* e *Aspergillus niger*, ad esempio, hanno un pH ottimale di circa 4,0 -

5,0; quelli ottenuti da *Bacillus subtilis* presentano un pH ottimale compreso tra 8,0 - 8,5. Per la produzione industriale è quindi fondamentale scegliere la β -galattosidasi più appropriata in base al pH del prodotto che si vuole realizzare.

Altra proprietà fondamentale della β -galattosidasi è la termostabilità (Dutra Rosolen et al., 2015) che rende ideale l'utilizzo di questi enzimi nei procedimenti industriali, presentando, peraltro, elevata velocità di reazione, minore rischio di contaminazione, lunga semivita, ridotto prodotto d'inibizione, elevata solubilità e rendimento (Pandey, Negi, & Soccol, 2017). Le β -galattosidasi a freddo sono di alto interesse biotecnologico come enzima industriale alimentare, perché operano l'idrolisi del lattosio nel latte e nei prodotti lattiero-caseari a bassa temperatura (Pandey, Negi, & Soccol, 2017). Al contrario la β -galattosidasi ricavata dal *Bacillus stearothermophilus* possiede più alta attività enzimatica a 70 °C: ciò comporta che questo enzima termostabile ha un grande potenziale industriale nella produzione di prodotti che richiedono alte temperature (Chen et al., 2008). Chen et al. (2008) hanno dimostrato che l'enzima proveniente dal *Bacillus stearothermophilus* mostra una buona attività a 70 °C, risparmiando l'80% della sua attività anche a 75 °C. La β -galattosidasi termostabile potrebbe essere una potenziale alternativa per la lavorazione dei prodotti lattiero-caseari, che vengono trattati ad alte temperature per ridurre la contaminazione microbica.

La sensibilità al pH e al calore di alcune β -galattosidasi come quelle estratte dal lievito *Kluyveromyces lactis* sono maggiori in assenza di ioni metallici, dimostrando che anche gli ioni metallici hanno un'influenza sulla stabilità enzimatica (Adalberto et al., 2010).

Le β -galattosidasi possono essere inoltre distinte in neutre o acide (Dekker, P.J.T., 2016). Le *β -galattosidasi neutre* sono principalmente utilizzate nella produzione di prodotti lattiero-caseari senza lattosio su scala industriale e derivano dal lievito lattico *Kluyveromyces lactis* (e dai suoi parenti stretti *Saccharomyces lactis*, *K. marxianus* o *K. fragilis*) (Dekker, P.J.T., 2016). Questo enzima è prodotto da una compagnia Europea (Paesi Bassi) e da tre aziende giapponesi. Gli enzimi di *K. Lactis* hanno

sostanzialmente le stesse prestazioni nell'idrolisi del lattosio, ma sono disponibili in diversi gradi di resistenza e di purezza.

La β -galattosidasi acida è disponibile come integratore alimentare da assumere insieme ai normali prodotti lattiero-caseari per effettuare la scissione del lattosio nello stomaco.

L'impiego industriale delle β -galattosidasi prevede fondamentalmente l'utilizzo dell'enzima in forma libera o immobilizzata. L'applicazione dell'enzima libero è tecnicamente più semplice, benché il suo principale svantaggio sia la produzione ripetuta di preparati enzimatici (Pandey, Negi, & Soccol, 2017). La β -galattosidasi immobilizzata offre d'altra parte la possibilità di un uso ripetitivo e continuo dell'enzima con una buona stabilità operativa (Husain, 2010). La società che per prima ha utilizzato una β -galattosidasi immobilizzata estratta da *Kluyveromyces lactis* per la produzione commerciale di latte privo di lattosio è stata la Centrale del Latte di Milano (Italia) (Panesar, Kumari, & Panesar, 2010). L'azienda Drouin Cooperative Butter Factory (Australia) ha utilizzato la β -galattosidasi di *Aspergillus oryzae* immobilizzata per la produzione di latte e siero di latte idrolizzato (Pandey, Negi, & Soccol, 2017). Questo enzima può essere utilizzato sia in forma solubile che immobilizzata: l'enzima solubile interviene solo nei processi batch mentre la forma immobilizzata ha il vantaggio di poter essere utilizzata sia in modo discontinuo che in funzionamento continuo.

Le β -galattosidasi disponibili in commercio derivano da una grande varietà di microrganismi che sono di grande interesse e offrono una serie di vantaggi come la facilità d'uso e l'elevata resa produttiva (Panesar, Kumari, & Panesar, 2010). Tutte le β -galattosidasi commerciali utilizzate per la produzione di latte senza lattosio sono disponibili come liquidi stabilizzati e sono certificati Kosher/Halal, i quali attestano la conformità dei prodotti di consumo agli standard ebraici e islamici.

Nello specifico le β -galattosidasi di origine fungina sono come la maggior parte termostabili, anche se principalmente sensibili al galattosio (Husain, 2010). Solitamente vengono impiegate per idrolizzare il lattosio in prodotti che hanno un pH

ottimale tra 2.5 e 5.4, come il siero di latte acido (Dutra Rosolen et al., 2015). Tra le fungine, senza dubbio le β -Galattosidasi estratte da *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces spp.* sono di maggiore interesse nel settore industriale, in quanto dotate di attività extracellulare, di una migliore e più alta tolleranza termica e un pH ottimale inferiore (Gargova, Pishtijski, & Stoilova, 1995). Le β -galattosidasi più impiegate oggi sono quelle ottenute da *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*, in quanto GRAS, per la loro natura (o attività) extracellulare, l'elevata attività (Hu X. et al., 2010), la maggiore stabilità termica e per la capacità di idrolizzare il lattosio a basso pH (Hatzinikolaou et al., 2005).

In particolare la β -galattosidasi ottenuta da *Aspergillus niger* opera in modo ottimale in ambienti con pH acido, rendendo pertanto ideale l'impiego di questo enzima nell'idrolisi del lattosio in permeato di siero di latte acido (Hatzinikolaou et al., 2005). Infine anche se tale β -galattosidasi può essere inibita dal galattosio, è complicato ottenere un'idrolisi completa del lattosio (Soccol et al., 2012).

L'enzima da *Aspergillus oryzae*, invece, viene utilizzato per alimenti e mangimi (Nizamuddin, Sridevi, & Narasimha, 2008); grazie, inoltre, alle ottimali condizioni di temperatura (60 °C) e di pH (4,75) dell'azione enzimatica, può essere utilizzato per l'idrolisi del lattosio nel siero di latte. Il vantaggio di questa β -galattosidasi, dal punto di vista tecnologico, è la sua stabilità ad alta temperatura, che è molto importante per il controllo e la prevenzione del rischio microbico durante il processo di idrolisi (Cruz et al., 1999).

Le β -galattosidasi di origine batterica hanno grandi proprietà di fermentazione, attività di idrolisi e stabilità. I batteri lattici (diversi gruppi di lattococchi, streptococchi e lattobacilli) e bifidobatteri sono stati utilizzati come buone fonti di β -galattosidasi, in particolare per la produzione di alimenti funzionali dopo essere stati considerati GRAS (Princely et al., 2013). I lattobacilli isolati da Ragi fermentato hanno un notevole potenziale industriale. Possono fornire migliori rendimenti ad alte temperature ed evitare la contaminazione microbica durante la lavorazione del latte (Mozumder et al., 2012). La β -galattosidasi estratta dal *Bacillus licheniformis* è

stabile e, rispetto ad altri enzimi utilizzati industrialmente, è il più attivo in ambienti con pH compreso tra 5 e 9 a 37 °C o con pH di 6.5 fino a 42 °C. Nella produzione alimentare, l'effetto idrolitico della β -galattosidasi da *Bacillus licheniformis* innalza il livello di solubilità e dolcezza dei prodotti lattiero-caseari. Tuttavia, questo enzima è inibito dai prodotti di idrolisi, glucosio e galattosio (Juajun et al., 2011). La β -galattosidasi estratta da *Escherichia coli* è la più studiata ma non è adatta per un uso industriale, poiché considerata non sicura nelle applicazioni alimentari. Idrolizza il lattosio in glucosio e galattosio, utilizzando questi zuccheri come substrato per la crescita dei batteri eterotrofi. (Pandey, Negi, & Soccol, 2017).

Dal punto di vista industriale il lievito è un'importante fonte di β -galattosidasi (Panesar et al., 2006) e anch'esso conseguentemente sfruttato per la produzione prodotti con basso contenuto di lattosio (Husain, 2010). Gli enzimi del lievito sono comunemente usati per prodotti con pH neutro, che hanno un pH ottimale da 6 a 7 come il latte e il siero di latte dolce (Dutra Rosolen et al., 2015). Il già citato *Kluyveromyces lactis* è una delle più importanti fonti di β -galattosidasi commerciali, che viene utilizzata nell'industria lattiero-casearia (Teles De Faria et al., 2012) a causa della grande capacità di idrolisi del lattosio, nonostante lo svantaggio principale dell'enzima sia la sua scarsa termostabilità (Chen et al., 2008). Viene impiegato anche nella lavorazione del siero di latte per ottenere i due zuccheri semplici dall'idrolisi del lattosio (Teles De Faria et al., 2012). La β -Galattosidasi estratta dal *Kluyveromyces fragilis* è molto simile a quella del *Kluyveromyces lactis* (Jazairi Ghorrah, & Bakri, 2014).

Altre β -galattosidasi commerciali estratte da *Bacillus circulans* o *Aspergillus oryzae* sono meno adatte a produrre prodotti senza lattosio, nella maggior parte delle matrici lattiero-casearie, a causa dei diversi valori ottimali di pH o temperatura (Dekker, P.J.T., 2016) e sono venduti principalmente per la produzione di galatto-oligosaccaridi (GOS). C'è, infatti, un'altra reazione in cui la β -galattosidasi può essere utilizzata ed è la transglicosilazione del lattosio per la sintesi di galatto-oligosaccaridi

(GOS). Questi sono oligosaccaridi non digeribili, che nel tratto intestinale superiore non vengono idrolizzati o assorbiti ([Panesar, Kumari & Panesar, 2010](#)).

2.4 Sistemi di delattosaggio

Nei paesi del Nord Europa, Nord America e in Australia la maggior parte del latte ad uso alimentare viene pastorizzato e conservato in condizioni di raffreddamento per un paio di settimane. Nel Sud dell'Europa, in Sud America e in Asia buona parte del latte viene sterilizzato (UHT) e conservato a temperatura ambiente fino a 9 mesi. La dolcezza extra generata nel latte delattosato dall'idrolisi del lattosio, è particolarmente apprezzata nei paesi asiatici e nell'America Latina, ma non è gradita nelle zone tradizionali di consumo del latte, come l'Europa settentrionale e l'America del Nord.

Per l'analisi della concentrazione del lattosio in una matrice lattiero-casearia sono disponibili diversi metodi e tecniche: il diario dell'AOAC riporta un test enzimatico con misura spettrofotometrica di NAD⁺ ridotto ([Essig A.M. et al., 1983](#)). Altre tecniche descritte in letteratura sono l'elettroforesi capillare (CE), la gas cromatografia (GC), la cromatografia a strato sottile ad alte prestazioni (HPTLC), l'NMR e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). Nel corso degli anni, lo sviluppo e l'utilizzo di biosensori e kit enzimatici commerciali ha preso sempre più piede ([Conzuelo F. et al., 2010](#)). L'Organizzazione internazionale per la standardizzazione (International Organization for Standardization, ISO) specifica un metodo HPLC con un rivelatore di indice di rifrazione e una colonna di resina a scambio ionico per l'analisi del lattosio nel latte e nei prodotti lattiero-caseari. Questo metodo però non può essere applicato ai latti fermentati e ai latti addizionati di oligosaccaridi ([ISO 22662, 2007](#)), in quanto la colonna utilizzata non ha una selettività adeguata a separare tutti i saccaridi dal lattosio, e il rivelatore rifrattometrico non è abbastanza sensibile per determinare le basse concentrazioni. L'HPLC è la tecnica più comune per l'analisi dei carboidrati. Vengono utilizzate diverse selettività cromatografiche e rivelatori come indice di rifrazione (RI),

fotometrico (UV), fluorescenza, rivelatore a diffusione di luce evaporativa (ELSD), rivelatore ad aerosol con carica a corona (CAD), rivelatore amperometrico a impulsi (PAD) e spettrometria di massa (MS). Anche strumenti come la cromatografia a coppia ionica e la derivatizzazione sono menzionati per ottenere una migliore separazione o rivelazione (Erich S. et al., 2012), (Fusch G. et al., 2011). La cromatografia a scambio ionico eseguita a pH elevato è una tecnica di separazione discriminante per i composti anionici. Il principio alla base è che i saccaridi neutri sono in realtà acidi deboli. Ad alto pH, sono almeno parzialmente ionizzati, e quindi possono essere separati con meccanismi di scambio ionico. L'ordine di eluizione dei diversi ioni è influenzato dalla carica degli ioni, dal diametro ionico e dal pH della fase mobile. La rilevazione elettrochimica è selettiva e sensibile, permettendo analisi a basse concentrazioni in una matrice complessa (Van Scheppingen W.B. et al. 2017). Grazie a queste caratteristiche, la cromatografia a scambio anionico ad alte prestazioni con rilevazione PAD (HPAEC-PAD) è uno dei metodi più adatti per l'analisi dei carboidrati.

Il mercato dei prodotti caseari senza lattosio è in crescita e per analizzare i prodotti è essenziale in molti laboratori un metodo affidabile e sensibile. Di recente scoperta è un metodo di analisi basato su HPAEC-PAD che utilizza una colonna CarboPac PA100 per la determinazione di bassi livelli di lattosio in una vasta gamma di prodotti lattiero-caseari come il latte, la bevanda al cioccolato, lo yogurt, la crema di formaggio, il formaggio a pasta dura, il formaggio montato crema, crema pasticcera alla vaniglia, margarina e crema spalmabile alla nocciola al cioccolato (Van Scheppingen W.B. et al. 2017). Per l'analisi di basse concentrazioni di lattosio (< 0,01%) in tutti i tipi di prodotti lattiero-caseari, una buona separazione cromatografica è essenziale per evitare di sopravvalutare il contenuto a seguito della coeluizione. Anche con la rilevazione spettrometrica di massa non è possibile fare distinzione tra due isomeri di uguale peso molecolare.

Due sono i processi attualmente in uso per la produzione del latte delattosato: in batch (discontinuo) e in pack asettico (Harju M., 2004) (Troise A.D. et al., 2016) ed

entrambi utilizzano l'enzima lattasi solubile. I processi che si basano su un enzima immobilizzato sono stati suggeriti nella letteratura scientifica molto tempo fa e persino sperimentati su scala pilota (Finocchiaro T. et al., 1980). Tuttavia, l'immobilizzazione della lattasi non è stata utilizzata fino ad oggi per la produzione di latte senza lattosio a causa di problemi con la stabilità microbica del prodotto finale. Il riciclaggio dell'enzima immobilizzato in un ambiente industriale è quindi limitato, rendendo la procedura meno conveniente (da un punto di vista economico) e più incline a difetti di qualità rispetto all'idrolisi con un enzima solubile.

2.4.1 Delattosaggio in batch

Nel processo *in batch* o discontinuo, la lattasi neutra viene aggiunta ad un serbatoio di latte crudo o termizzato e, comunemente, incubato per circa 24 ore sotto lenta agitazione, per evitare la scrematura. Dal momento che il latte in questa fase non è ancora sterile, questo processo deve essere eseguito in condizioni di raffreddamento (normalmente 4-8°C) per prevenire la crescita microbica. Dopo questa incubazione, il latte viene pastorizzato, omogeneizzato e confezionato. Alcuni produttori di latte UHT utilizzano il processo *in batch* anche se negli ultimi anni il processo *in pack* è diventato molto più popolare in questo settore di mercato. Poiché l'enzima è inattivo durante la pastorizzazione/sterilizzazione del latte, attraverso il processo *in batch* non rimane alcuna attività enzimatica residua nel prodotto finale quando il latte viene prodotto.

Una serie di aspetti sono importanti da considerare quando si utilizza il processo *in batch* per la produzione di latte senza lattosio:

- a) Il dosaggio dell'enzima dovrebbe essere sufficiente a raggiungere il limite richiesto per l'assenza di lattosio durante il tempo limitato e la bassa temperatura dell'incubazione. Pertanto, il dosaggio dell'enzima è relativamente alto. Gli enzimi disponibili per questo processo sono selezionati per la loro attività relativamente elevata a pH neutro e bassa temperatura. Il controllo del processo è elevato poiché la conversione del lattosio può essere misurata nel serbatoio e

poiché il dosaggio dell'enzima o il tempo di incubazione può essere adattato durante il processo.

- b) L'incubazione *in batch* richiede l'occupazione di un serbatoio in fabbrica e la presa del latte per un giorno. Il processo è, quindi, discontinuo. Questo può rappresentare un problema per alcune fabbriche, specialmente quando la produttività è elevata. Lattasi con una maggiore attività specifica (come Maxilact® Smart), possono contribuire ad abbreviare i tempi di produzione in queste condizioni e, quindi, possono aumentare il rendimento della fabbrica. Poiché la pastorizzazione è rinviata di un giorno, la qualità del latte deve essere impeccabile per evitare il deterioramento microbico.
- c) Il latte prodotto con il processo *in batch* è relativamente insensibile a possibili attività collaterali nella preparazione enzimatica. Ciò è dovuto al tempo limitato di conservazione del latte in condizioni di refrigerazione e alla pastorizzazione/sterilizzazione dopo incubazione enzimatica, inattivando la maggior parte delle attività enzimatiche. Anche se in passato alcuni preparati di lattasi hanno mostrato attività proteolitiche collaterali (Mittal S.B. et al. 1991), questi problemi sembrano essere superati, tanto che si verificano pochissime lamentele per latte senza lattosio prodotto con il processo *in batch*.
- d) Poiché l'idrolisi del lattosio porta ad un raddoppio della dolcezza del latte, sono stati sviluppati processi per rimuovere parte del lattosio utilizzando tecniche di cromatografia o di filtrazione (ultra e nano) combinato con l'idrolisi del lattosio rimanente in modo da rigenerare la naturale dolcezza del latte (Jelen P. et al.,2003) (Harju M. et al.,2012). Il latte senza lattosio che ne risulta prodotto con questo processo è di ottima qualità e il gusto è quasi identico al latte normale. Questa caratteristica è particolarmente apprezzata dai bevitori di latte pastorizzato in Nord Europa e Nord America ed è, pertanto, spesso utilizzato in combinazione con il processo *in batch*.

2.4.2 Delattosaggio in pack o asettico

Nel processo asettico o *in pack* il latte viene prima sterilizzato con la procedura UHT. Successivamente una preparazione lattasi sterile viene iniettata nel latte appena prima del confezionamento (Dahlqvist A. et al., 1977). La conversione del lattosio nel latte avrà luogo nella confezione del latte. Poiché il latte UHT è spesso tenuto in quarantena per circa 3 giorni a temperatura ambiente, c'è tempo sufficiente per l'idrolisi completa prima della spedizione del latte al rivenditore. Poiché non esiste un periodo di quarantena per il latte pastorizzato, il processo asettico non è utilizzato per questo tipo di latte senza lattosio.

Esistono due diverse procedure per ottenere una lattasi sterile. Nella prima procedura, l'enzima lattasi viene presterilizzato dal produttore dell'enzima e per l'iniezione sterile sono necessari l'enzima e speciali apparecchiature di dosaggio sterili (ad esempio, il Tetrapak). Nella seconda procedura, l'enzima non sterile viene sterilizzato con filtro poco prima di essere aggiunto al latte sterile nella latteria (ad esempio tramite il sistema Tetrapak Aldose®). Una serie di aspetti sono da considerare quando si utilizza il processo asettico per produrre il latte delattosato:

- a) Il dosaggio dell'enzima può essere molto più basso rispetto al processo *in batch*, poiché sia il tempo di incubazione sia la temperatura sono più alti. Il controllo del processo è tuttavia assente poiché l'enzima è attivo solo nella confezione finale del latte. Ad esempio, la temperatura di conservazione nei magazzini non termostatati può variare dall'estate all'inverno e il produttore di latte deve tenere conto di questi aspetti nella somministrazione dell'enzima.
- b) Il processo *in pack* richiede attrezzature speciali e costi di consumo, soprattutto per la filtrazione in fabbrica richiede operatori altamente qualificati per prevenire la contaminazione microbica del latte durante l'iniezione di lattasi. Tuttavia, il processo può essere gestito in modo completamente continuo quando organizzato correttamente, e questo è un grande vantaggio per le fabbriche che richiedono un'elevata produttività.

c) Il processo asettico per la produzione di latte UHT senza lattosio potrebbe essere completamente sviluppato solo dopo un grande miglioramento della qualità degli enzimi della lattasi. Oltre alla rimozione dell'attività laterale proteolitica, si è anche scoperto che l'attività collaterale dell'aril-solfatasi nella preparazione del lattosio può portare gravi off-flavors medicinali durante la conservazione a causa della formazione di *p*-cresolo da cresolo-solfonato che è naturalmente presente nel latte (De Swaaf M.P.M. et al., 2006). Un produttore di latte UHT senza lattosio dovrebbe prendere in considerazione l'utilizzo solo di lattasi di altissima qualità per questo processo, per evitare problemi durante la shelf-life.

Lattasi prive di arilsulfatasi sono attualmente disponibili in commercio.

d) L'idrolisi del lattosio nel latte porta ad una maggiore presenza di monosaccaridi che favoriscono la reazione di Maillard. Ciò si traduce in una maggiore formazione di off-flavors, nell'imbrunimento del latte senza lattosio rispetto al latte normale e in un valore nutrizionale ridotto se conservato a temperature più elevate (Troise A.D. et al., 2016), (Jansson T. et al., 2014), (Evangelisti F. et al., 1999). L'aumento della reazione di Maillard è probabilmente il fattore determinante più importante per la riduzione della shelf-life del latte UHT senza lattosio rispetto al latte UHT normale. Sebbene in passato sia stato suggerito che la produzione di latte UHT senza lattosio mediante il processo *in batch* possa portare ad un imbrunimento maggiore rispetto al latte prodotto attraverso il processo *in pack* (Mendoza M.R. et al., 2005), dati recenti mostrano che le condizioni di conservazione (temperatura) e la scelta delle lattasi sono molto più rilevanti per determinare la durata di conservazione (Troise A.D. et al., 2016). È stata trovata un'eccellente conservabilità per il latte UHT senza lattosio prodotto con il processo *in batch*. L'imbrunimento del latte durante lo stoccaggio è, quindi, in gran parte indipendente dal processo di produzione utilizzato.

e) processo che viene utilizzato.

2.4.3 Sistemi con enzima libero

Idrolisi con enzima solubile

Quando si utilizza un enzima monouso per l'idrolisi del lattosio, diversi fattori devono essere considerati come la concentrazione del substrato, il pH, la temperatura massima e il tempo di contatto ammissibili, l'attività e i costi dell'enzima. Un tempo di contatto esteso a 35-45°C può essere necessario per ridurre i costi, ma con il latte questo di solito si traduce in una estesa crescita microbica. In alternativa, si può ricorrere alla conservazione notturna a temperatura di refrigerazione (Zadow, 1986). Le lattasi solubili utilizzate sono generalmente di origine microbica (Greenberg & Mahoney, 1981) (Mahoney, 1997) (Tabella 2.1).

Tabella 2.1 - Proprietà delle lattasi microbiche (Mahoney, 1997)

| Fonte | Peso Molecolare (x10 ³) | Optimum di pH | Range Temperatura Di attività | Attivatori | Inibitore ionico |
|------------------------------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------|------------|------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 124 | 3.0-4.0 | 55-60 | nessuno | nessuno |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 90 | 5.0-6.2 | 50-55 | nessuno | nessuno |
| <i>Kluveromyces lactis</i> | 228 | 6.5-7.3 | 35 | K,Mg,Mn | Ca, Na |
| <i>Kluveromyces fragilis</i> | 201 | 6.6 | 37 | K,Mg,Mn | Ca, Na |
| <i>Escherichia coli</i> | 464 | 7.2 | 40 | Na,K,Mg | - |
| <i>Bacillus circulans</i> | 240 | 6.0 | 60 | nessuno | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 88 | 6.5-7.0 | 50 | nessuno | - |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | 116 | 5.8-6.4 | 65 | Mg | - |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 540 | 6.2-6.6 | 55 | Mg | - |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 464 | 7.1 | 55 | Na,K,Mg | Ca |

Il simbolo - indica che i dati non sono disponibili

2.4.4 Sistemi con enzima immobilizzato

I sistemi enzimatici immobilizzati sembrano avere un grande potenziale per essere applicati su larga scala per l'idrolisi del latte, permeato o siero di latte (Zadow, 1986). I sistemi immobilizzati utilizzano spesso lattasi di origine fungina (Harju, 1987) (Zadow, 1984). Possono avere un supporto in resina a scambio ionico (Zadow, 1986), fogli di silice PVC, carbone attivo, perle di vetro porose, perle acriliche, cellulosa

triacetato o resina ad adsorbimento (Harju, 1987). Il pH ottimale per le lattasi fungine è di circa 5 ma generalmente trattengono circa il 50% della loro attività a pH 6,8. Questo li rende ideali per l'idrolisi del lattosio anche nel latte (Zadow, 1986). Il basso pH ottimale (3,5-5,5) degli enzimi fungini offre migliori opportunità per prevenire la crescita microbica durante la lavorazione del siero di latte. Gli enzimi di origine funginea sono molto stabili e gli organismi utilizzati sono sulla lista GRAS, il che significa che possono essere utilizzati per scopi alimentari (Harju,1987). Un sistema immobilizzato può durare diverse migliaia di ore, riducendo significativamente i costi rispetto agli enzimi solubili. Tuttavia, se viene idrolizzato il latte con un pH neutro, la stabilità microbica del reattore diventa più difficile da controllare. L'uso di β -galattosidasi immobilizzata per l'idrolizzazione del lattosio è di solito mirata a ridurre i costi degli enzimi e della lavorazione. È molto più difficile da ottenere una riduzione dei costi degli enzimi quando si idrolizza il lattosio nel latte, rispetto all'idrolizzazione del siero di latte (Harju, 2004). Tuttavia, il latte con il lattosio idrolizzato è un prodotto molto più prezioso del siero di latte idrolizzato. Nell'idrolisi del lattosio del latte, ci sono diverse difficoltà da superare: il pH neutro del latte favorisce la crescita microbica tranne che a livelli molto bassi o molto alti di temperatura; le proteine del latte tendono ad adsorbire sulla superficie enzimatica immobilizzata; β -galattosidasi con un pH neutro ottimale non sono molto stabili quando sono immobilizzati con tecniche classiche come l'adsorbimento o il collegamento covalente (Mahoney, 1997).

2.4.5 Sistemi di delattosaggio per filtrazione

La filtrazione è un metodo utilizzato per separare il lattosio da altri componenti del latte. Il latte scremato senza lattosio preparato con Ultra-Filtrazione (UF) si ottiene mediante il passaggio del latte scremato attraverso una membrana che separa i componenti in base alla dimensione molecolare. Le molecole più piccole, come il lattosio, i minerali solubili e l'acqua, passano attraverso la membrana, mentre le molecole più grandi, come la caseina e le proteine del siero di latte, vengono

trattenute. Questo materiale trattenuto costituisce il latte scremato UF. Purtroppo, oltre a rimuovere il lattosio, questo processo rimuove anche alcuni importanti componenti del latte a beneficio della salute umana. Questi prodotti a ridotto contenuto di lattosio sono spesso arricchiti con minerali e vitamine per sostituire le sostanze nutritive rimosse. Rimuovendo il lattosio con la filtrazione, vengono rimosse anche le calorie associate al lattosio. Il latte e i prodotti lattiero-caseari prodotti in questo modo hanno meno calorie, ma non sono dolci come il latte non filtrato. Il processo di filtrazione, tuttavia, è imperfetto e non elimina tutto il lattosio (Clark George H., 2019). Per eliminare il lattosio rimasto nel latte UF dopo il processo di filtrazione dell'UF, viene applicato un processo chimico dopo il processo di filtrazione meccanica. Il lattosio rimanente verrà idrolizzato con l'enzima lattasi nei monosaccaridi precedentemente descritti.

2.5 Prodotti lattiero-caseari delattosati commerciali

Storicamente la commercializzazione del latte ha avuto un grosso inconveniente poiché il principale costituente è l'acqua (87%), e solo il 13% circa è rappresentato da nutrienti, quindi era alto il rischio in passato di incorrere in contaminazioni batteriche durante la mungitura con conseguente rapida perdita del prodotto raccolto. Il burro è stato prodotto in tempi antichi per superare questo problema. Infatti quando si produce il burro, 100 kg di latte vengono convertiti in 5 kg di burro e oltre il 99% dell'acqua viene rimossa. Così è stato realizzato un prodotto che può essere conservato per diverse settimane anche a temperatura ambiente e, allo stesso tempo, circa il 99% del lattosio viene rimosso.

Esistono prodotti lattiero-caseari aventi un contenuto ridotto o del tutto assente di lattosio e sono generalmente ben tollerati da persone intolleranti al lattosio.

Per alcuni formaggi, ad esempio il Gouda, il processo di produzione prevede una fase di lavaggio della cagliata che abbassa il contenuto di lattosio (Walstra P. Et al 1999). Questi formaggi hanno già un contenuto di lattosio relativamente basso, anche senza maturazione. Tuttavia, per molti altri formaggi, il contenuto di lattosio si riduce

durante la maturazione poiché per azione dei batteri lattici il lattosio viene fermentato ad acido lattico. Quindi, in generale, formaggi stagionati e a pasta dura come il Parmigiano Reggiano, il Cheddar o il formaggio svizzero hanno una concentrazione di lattosio molto bassa, perché quando si aggiunge il caglio al latte, circa il 90% dell'acqua viene eliminato nel siero di latte, insieme al 90% del lattosio. Il lattosio residuo nella massa del formaggio viene fermentato in acido lattico perciò i formaggi gialli stagionati sono praticamente privi di lattosio ([Harju M. et al., 2012](#)).

I formaggi giovani e freschi invece possono contenere un quantitativo di lattosio sufficiente a provocare sintomi di intolleranza al lattosio nelle persone suscettibili a seconda della quantità consumata. Numerosi altri prodotti lattiero-caseari freschi contengono una quantità apprezzabile di lattosio: oltre a latte e bevande a base di latte, questi includono prodotti a base di latte fermentato come yogurt, panna acida, crème fraiche, kefir ecc., gelati e altri dessert a base di latte come il dulce de leche, la panna da latte (montata) e il latte condensato zuccherato. Inoltre, i prodotti a base di siero di latte come concentrati di proteine del siero di latte (WPC), isolati di proteine del siero di latte (WPI) e permeato di siero di latte o latte in polvere, contengono lattosio.

2.6 Stabilità dei prodotti delattosati

I trattamenti termici e lo stoccaggio influenzano la qualità del latte, in particolare nel latte a basso contenuto di lattosio, poiché la maggiore concentrazione di zuccheri riducenti può portare ad un aumento della formazione dei prodotti di reazione Maillard (MRP). Il controllo della formazione dei prodotti Amadori (APs) è il passo fondamentale per mitigare la reazione di Maillard (MRR) nel latte. L'uso di fruttosamina ossidasi, (Faos) ha fornito risultati promettenti ([Troise A.D. et al., 2016](#)).

Il latte e i prodotti a base di latte sono sottoposti ai trattamenti termici necessari per garantire prodotti microbiologicamente sicuri prima della vendita al dettaglio e del consumo ([Van Boekel et al., 2010](#)). Durante il trattamento termico e la conservazione, si verifica una reazione non enzimatica tra zuccheri riducenti e gruppo

amminico di proteine, polipeptidi e oligopeptidi, che porta alla formazione dei prodotti di Amadori (APs) (Yaylayan & Huyghuesdespointes, 1994). Nel latte, gli APs originati dalla reazione del gruppo amminico con il lattosio o con altri zuccheri riducenti, sono coinvolti in un'ulteriore degradazione che favorisce la formazione di prodotti reticolati, α -dicarbonili, idrossicarbonili, deossisoni, come 1-deossiosone o 3-deossiosone, 1-ammino- 1,4-dideossiosone e la degradazione di Strecker (Henle, 2005), (Nursten, 2005). Anche gli amminoacidi liberi reagiscono nel latte con la riduzione dei carbonili, contribuendo alla formazione di fruttosio amminoacidi che causano una riduzione complessiva del valore nutritivo del latte (Mossine & Mawhinney, 2010), (Pischetsrieder & Henle, 2012) e portano alla formazione di off-flavor e molecole indesiderate (Van Boekel, 1998). In base all'aumento della temperatura o allo stoccaggio prolungato, si formano i prodotti finali della reazione di Maillard (MRP). Anche se il consumo di MRPs è stato correlato a diverse proprietà benefiche come l'attività antiossidante (Bedinghaus & Ockerman, 1995) e l'attività chemiopreventiva (Somoza, 2005), è stato anche riportato che la loro formazione porta svantaggi nutrizionali (Hellwig & Henle, 2014). Infatti, l'assunzione di MRP è stata considerata anche un fattore di rischio per molte malattie e la riduzione della loro formazione prima del consumo potrebbe essere di rilevante importanza per la salute umana (Delgado-Andrade et al., 2007). Sono state proposte diverse strategie per mitigare la formazione dei MRP a partire dalle fasi iniziali del MRP (Troise & Fogliano, 2013) come l'uso dell'incapsulamento e delle tecnologie enzimatiche (Fiore et al., 2012), (Troise, Fiore et al., 2014).

Due enzimi FAD-fruttosamina ossidasi, ossia Faox I e II, isolati da *Aspergillus sp.* godono di un buon potenziale d'uso nell'industria alimentare per controllare la formazione di MRP (Troise, Dathan, et al., 2014). È stato dimostrato che sono in grado di promuovere la deglicazione di peptidi e/o piccole proteine quando gli enzimi vengono aggiunti prima della glicazione fino all'80% (Capuano et al., 2007), (Mennella et al., 2005). I dati preliminari ottenuti in un latte a basso contenuto di lattosio UHT commerciale incubato con e senza Faox I e II a 37°C fino a 17 giorni

hanno mostrato che l'idrossimetilfurfurolo legato alla proteina (b-HMF) è stato ridotto di circa il 90% e il Nε (carbossimetilico) - L-lisina (CML) di circa il 60%, evidenziando la forte potenzialità del trattamento enzimatico come strumento per limitare la formazione di MRP ([Troise, Fiore, et al., 2014](#)).

Dunque la presenza dei monomeri glucosio e galattosio, più reattivi del lattosio, può accelerare la formazione di MRP nel latte delattosato rispetto al latte convenzionale, alterando così il profilo sensoriale e nutrizionale dei prodotti ([Jansson et al., 2014](#)).

3.1 Metodi per il monitoraggio della shelf-life

La shelf-life è stata definita dall'Inst. of Food Science and Technology (IFST) Guidelines (IFST 1993) come “il tempo durante il quale un prodotto alimentare rimane sicuro”, quindi mantiene le caratteristiche sensoriali, chimiche, fisiche, microbiologiche e funzionali desiderate e rispetta qualsiasi dichiarazione in etichetta dei dati nutrizionali quando conservati nelle condizioni raccomandate (Sirichat Chanadang e Edgar Chambers IV, 2019). Per iniziare uno studio di shelf-life è fondamentale capire quali sono i fattori microbiologici, chimici, fisici che contribuiscono in maggior misura al decadimento dell'alimento. Per molti alimenti, la shelf-life può essere determinata dai cambiamenti delle caratteristiche microbiologiche senza bisogno di analisi sensoriali (Hough & Garitta, 2012), (Lawless & Heymann, 2010). Tuttavia, l'analisi sensoriale è il fattore chiave per determinare la shelf-life di molti prodotti (Lawless & Heymann, 2010).

La stima della shelf-life sensoriale può essere eseguita utilizzando test sensoriali, discriminanti o descrittivi in funzione dell'obiettivo dello studio (ASTM International, 2011), (Kilcast, 2000). Uno degli approcci più diffusi per la stima della shelf-life sensoriale è l'analisi sensoriale descrittiva (Bereen, 2018), (Hough & Garitta, 2012). Questa tecnica può essere eseguita misurando l'intensità degli attributi critici durante la conservazione. La shelf-life degli alimenti può essere stimata nel momento in cui l'intensità degli attributi critici raggiunge un valore predeterminato (Lawless & Heymann, 2010). Diversi studi hanno utilizzato gli attributi sensoriali legati all'ossidazione, come l'irrancidimento, per determinare la shelf-life dei prodotti contenenti grassi o lipidi (Chanadang, Koppel, & Aldrich, 2016).

3.2 Fattori che influenzano la shelf-life

La shelf-life degli alimenti, in particolare dei latticini, dipende sia da fattori intrinseci che estrinseci che, in molti casi, interagiscono tra loro.

Fattori intrinseci:

- fisico-chimici: pH, attività dell'acqua (a_w), cristallizzazione e cambiamenti strutturali (es. latte in polvere), emulsione destabilizzante e disgregante (es. burro, margarina), idrolisi degli acidi grassi (es. burro, latte intero in polvere), ossidazione di grassi, proteine, pigmenti e vitamine
- cambiamenti indotti dalla luce: foto-ossidazione di vitamine, ossidazione indotta dalla luce, sbiadimento del colore
- microbiologici: batteri spore-formanti, crescita di microrganismi patogeni, tossine microbiche, degrado microbico da batteri Gram negativi, lieviti e muffe
- organolettici

Fattori estrinseci:

- lavorazione
- condizioni di conservazione
- packaging
- questioni logistiche e di vendita al dettaglio

Proteine, grassi, carboidrati e vitamine sono i componenti alimentari che presentano i cambiamenti più importanti durante la shelf-life sotto l'influenza della microflora, degli enzimi e delle condizioni di lavorazione. La shelf-life degli alimenti grassi è molto influenzata dalla loro concentrazione in acidi grassi insaturi, poiché questi acidi sono soggetti ad ossidazione durante la lavorazione e la conservazione, soprattutto in assenza di sostanze antiossidanti come composti fenolici, α -tocoferolo o acido ascorbico. Per prolungare o limitare la shelf-life degli alimenti grassi, vengono utilizzati antiossidanti ed edulcoranti che possono agire come umettanti o crioprotettori (per prodotti congelati).

L'acqua è il substrato per le reazioni chimiche e biochimiche ed è un importante costituente non solo di quei prodotti in forma liquida ma anche di quelli in polvere (es. latte in polvere). Questi ultimi si deteriorano rapidamente se il contenuto di acqua supera il 5%, andando incontro a cambiamenti strutturali e sensoriali. L'attività dell'acqua (a_w) è il rapporto tra la pressione del vapore in una soluzione o in un materiale alimentare e quella dell'acqua pura alla stessa temperatura. In pratica, a_w esprime la disponibilità di acqua nel cibo. Gli alimenti con a_w inferiore a 0,60 hanno una bassa umidità e sono raramente deteriorati da microrganismi. L'attività dell'acqua, il pH e la temperatura sono i fattori più importanti che controllano i tassi di deterioramento degli alimenti causati da microbi e dall'attività enzimatica (Roos Y.H., 2001).

Durante la conservazione, molti alimenti tendono a guadagnare, perdere o scambiare umidità a seconda della loro composizione e delle condizioni ambientali. Inoltre, il trasferimento dell'acqua avviene a temperatura di congelamento, cioè si ha trasferimento del vapore acqueo. La perdita di umidità provoca la diffusione e l'evaporazione dei sapori desiderabili dei prodotti liquidi e cambiamenti nelle caratteristiche strutturali degli alimenti solidi. Il trasferimento di umidità negli alimenti può causare cambiamenti sensoriali come odore o sapore sgradevole; cambiamenti strutturali, per esempio, plastificazione, granulazione, morbidezza, appiccicosità, o cristallizzazione a causa dell'assorbimento di umidità sulla superficie degli alimenti; o cambiamenti biochimici, vedi la germinazione delle spore (Roos Y.H., 2001), (Man D.C.M., 2015).

Il valore del pH è un fattore critico che può indurre o arrestare la crescita microbica. Per questo motivo gli alimenti sono classificati in base al loro valore di pH come alimenti a bassa, media acidità, acidi e ad alta acidità. Gli agenti patogeni e i batteri di deterioramento non possono crescere in un ambiente acido, ma la maggior parte degli alimenti ha un pH basso e medio acido.

La microflora è un fattore chiave per mantenere la qualità degli alimenti durante la shelf-life. Indesiderabili sono i microrganismi patogeni e i batteri che formano spore,

vengono eliminati da trattamento termico, mediante pastorizzazione durante la produzione di alimenti. Al contrario, vengono aggiunti microrganismi selettivi desiderabili che svolgono un ruolo importante in alcuni alimenti come lo yogurt e i prodotti a base di carne fermentata. Tra i potenziali microrganismi di deterioramento presenti in un alimento deperibile, i microrganismi mesofili a conta più alta di 10⁶ ufc/g o ml sono stati associati alla fine della shelf-life (Notermans, 1993).

Gli enzimi che si trovano naturalmente negli alimenti possono causare un deterioramento quando quest'ultimi sono esposti a condizioni favorevoli per la loro attività. Inoltre, gli enzimi prodotti dalla crescita microbica possono deteriorare il cibo inducendo lipolisi e/o proteolisi e con conseguente off-sapore come rancidità e peptidi amari, rispettivamente.

La reazione redox (riduzione e ossidazione) è una reazione accoppiata, in cui l'ossidazione (perdita di elettroni) e la corrispondente riduzione (guadagno di elettroni) avvengono contemporaneamente. Il potenziale redox influenza la microflora e molte reazioni chimiche e biochimiche di un alimento (Man D.C.M., 2015).

Tutti i fattori elencati sin qui rientrano tra i fattori intrinseci. Tra i fattori estrinseci, invece, rientrano le diverse procedure di lavorazione di alcuni alimenti. Alcune di queste mirano ad alterare le proprietà fisiche degli alimenti come l'omogeneizzazione dei grassi; alcune mirano a separare i componenti, per esempio, la centrifugazione del grasso del latte; altre ad uccidere i microrganismi che portano al deterioramento del cibo. Il trattamento termico può essere applicato a quasi tutti i tipi di alimenti e si traduce in un prolungamento della shelf-life. Tuttavia, poiché il trattamento termico può anche influenzare composti alimentari sensibili come le vitamine, nuovi metodi di lavorazione sono stati utilizzati come alternative a, o in combinazione con, il trattamento termico per proteggere la qualità e la shelf-life di alcuni alimenti. L'omogeneizzazione ad alta pressione o ad altissima pressione, il plasma freddo, il riscaldamento ohmico e i campi a impulsi elettrici sono alcuni dei nuovi metodi studiati per la produzione alimentare. Tuttavia, anche con i nuovi processi, si verifica

un deterioramento della qualità. Ad esempio, [Gavahian et al. \(2018\)](#) hanno recentemente riportato che la lavorazione a freddo del plasma può indurre l'ossidazione dei lipidi nei cereali, negli oli alimentari, nei latticini e nei prodotti a base di carne, a causa dell'ossigeno presente come componente del gas che ne influenza l'accettabilità e la shelf-life.

L'umidità relativa, la temperatura, l'ossigeno e la luce sono parametri critici che influenzano la shelf-life degli alimenti deperibili nelle condizioni di conservazione. La qualità dei grassi e degli oli è sensibile a questi fattori, perché possono causare l'irrancidimento. L'elevata temperatura di conservazione accelera il processo di deterioramento degli alimenti inducendo la crescita microbica o la germinazione delle spore. Pertanto, il raffreddamento è il metodo principale per rallentare il deterioramento degli alimenti durante la conservazione. L'aumento dell'umidità relativa nei magazzini favorisce l'attività enzimatica e la crescita di funghi che possono rovinare gli alimenti non confezionati.

Il ruolo principale del packaging è quello di proteggere gli alimenti dal degrado ambientale e dalla distruzione meccanica, mantenendone la qualità e quindi la shelf-life. Tuttavia, possono verificarsi interazioni biologiche, chimiche e fisiche tra cibo, imballaggio e ambiente. Ad esempio, l'ossidazione dei grassi o la perdita di vitamine, può avvenire mediante la trasmissione della luce attraverso le bottiglie trasparenti. Negli ultimi decenni, i sistemi di imballaggio alimentare sono stati progettati per determinare la shelf-life degli alimenti in tempo reale, prevedendo con precisione la domanda di cibo ed evitando lo spreco di cibo. I sistemi di imballaggio intelligente più noti sono indicatori di temperatura a tempo (TTI) che hanno il potenziale di monitorare o prevedere la sicurezza e la shelf-life degli alimenti refrigerati ([Taoukis e Labuza, 1989](#)), ([Zhang et al., 2016](#)) e l'imballaggio attivo. I sistemi di imballaggio attivo hanno incorporato componenti che possono rilasciare sostanze antiossidanti, antimicrobiche o CO₂ nei prodotti alimentari confezionati, o assorbire O₂, umidità o etilene dagli alimenti confezionati o dall'ambiente circostante ([Yildirim et al., 2018](#)).

Pertanto, l'imballaggio attivo aiuta a mantenere o a migliorare le condizioni degli alimenti confezionati, prolungando la shelf-life.

Per gli alimenti deperibili come il pesce, i prodotti a base di carne, i latticini, la frutta e i prodotti vegetali, lo stoccaggio, il trasporto, la distribuzione e la vendita al dettaglio dovrebbero seguire la "catena del freddo". Durante la conservazione a freddo, il monitoraggio continuo della temperatura, dell'umidità e delle loro fluttuazioni supporta la valutazione in tempo reale della qualità del prodotto e determina il resto della sua shelf-life. Per controllare la catena del freddo esistono diversi sistemi basati su dispositivi a sensore come le reti di sensori senza fili e l'identificazione a radiofrequenza (Spagnol et al., 2018). Inoltre, la manipolazione dei consumatori dopo l'apertura della confezione gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento della qualità degli alimenti, almeno fino alla data indicata. I consumatori dovrebbero seguire le indicazioni riportate sulle confezioni degli alimenti, prima o dopo l'apertura della confezione. Dopo l'apertura della confezione, il deterioramento della qualità degli alimenti accelera, e per questo motivo Nicoli e Calligaris (2018) hanno riportato il concetto di "shelf-life secondaria", ovvero il periodo dopo l'apertura della confezione, durante il quale un alimento prodotto mantiene un livello di qualità accettabile.

3.3 Shelf-life dei prodotti lattiero caseari

Secondo la legislazione dell'Unione Europea (Regolamento CE n. 1169/, 2011) la shelf-life, ovvero la durata di conservazione, indica la "data di scadenza minima" (Moschopoulou E. et al., 2019). La shelf-life di un prodotto alimentare può essere indicata sia con la denominazione "da consumarsi preferibilmente entro" (best before) sia da una data di scadenza (use by). La prima denominazione indica la data fino alla quale un prodotto alimentare conserva le sue proprietà specifiche, ad esempio il gusto, l'aroma, l'aspetto e le eventuali qualità specifiche legate al prodotto, a condizione che il prodotto venga conservato in maniera adeguata e la confezione non

sia stata aperta. La data di scadenza, invece, è legata alla sicurezza ed è la data in cui un prodotto alimentare potrebbe non essere più sicuro.

In pratica, il termine "shelf-life" descrive la durata dell'accettabilità di un prodotto alimentare da parte del consumatore. Da questo punto di vista, la fine della shelf-life differisce tra i prodotti e li classifica in quelli con durata di conservazione intermedia o lunga e quelli con durata di conservazione breve. Pertanto, tutti gli alimenti con la data di scadenza o con l'etichettatura "da consumarsi preferibilmente entro" hanno una determinata durata di conservazione, che dipende in primo luogo dalle loro specifiche caratteristiche qualitative e in secondo luogo dalle condizioni ambientali. L'etichettatura riflette il fatto che durante la durata di conservazione le caratteristiche di qualità non sono stabili e, di conseguenza, gli alimenti si deteriorano.

Il latte è un nutriente ricco di grassi, proteine, lattosio, minerali e vitamine. Tuttavia, contiene microrganismi ed enzimi che possono alterarlo rapidamente a seconda delle condizioni di conservazione. I più importanti microrganismi di deterioramento che interessano i prodotti lattiero-caseari sono: gli psicrotrofi, che possono crescere durante lo stoccaggio del latte a 6 °C o meno; i batteri termodurici, che possono sopravvivere alle condizioni di pastorizzazione; i batteri spore-formatori, che producono spore resistenti al calore; i lieviti e le muffe (Moatsou e Moschopoulou, 2014). I batteri aerobi mesofili e termofili che formano spore, come *Paenibacillus spp.* e *Geobacillus stearothermophilus*, possono limitare la shelf-life del latte in polvere, mentre i batteri aerobi psicrotrofici che formano spore come *Bacillus cereus* possono limitare la shelf-life del latte. I batteri anaerobici che formano spore, come il *Clostridium tyrobutyricum*, possono causare difetti nei formaggi a pasta dura. La plasmina proteasi stabile al calore, la lipasi lipoproteica e la catalasi correlate con un numero maggiore di cellule somatiche del latte crudo, influenzano la qualità del latte crudo causando la degradazione delle proteine e dei grassi, producendo sapori sgradevoli. La pratica della conservazione a freddo del latte crudo, subito dopo la mungitura fino alla sua lavorazione, provoca la crescita di batteri psicrotrofici che producono enzimi proteolitici e lipolitici termoresistenti extracellulari o intracellulari

che rovinano il prodotto finale (Barbano et al., 2006). Un raffreddamento profondo a 2 °C per 48 ore controlla la crescita del microbiota psicrotrofo e aumenta la shelf-life del latte crudo (Moatsou e Moschopoulou, 2014).

Il latte per il consumo diretto può essere soggetto a diversi trattamenti termici: ad almeno 72 °C per 15s (pastorizzazione HTST); a temperature superiori a 100 °C per alcuni secondi (ultra-pastorizzato); o a una temperatura di 135-145 °C per alcuni secondi (UHT) in combinazione con un imballaggio asettico. La durata di conservazione del latte pastorizzato è di circa 7-10 giorni, a condizione che la contaminazione post-pastorizzazione sia assente. A seconda del progetto di lavorazione, la pastorizzazione può essere combinata con la microfiltrazione per prolungare la shelf-life (Moschopoulou E. et al., 2019). La qualità del latte pastorizzato conservato è ugualmente influenzata dalla microflora presente e dalle condizioni di conservazione come temperatura, ossigeno e luce (Barbano et al., 2006), (Boor, 2001). Anche la contaminazione post-pastorizzazione può introdurre nel latte trasformato *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas spp.* psicrobiche, che possono crescere a 6 °C, causando difetti sensoriali entro 7-10 giorni dalla lavorazione (Martin et al., 2017). Le spore di *B. cereus* possono sopravvivere alla pastorizzazione e causare anche difetti sensoriali come la cagliatura dolce del latte e la formazione di fiocchi nella panna detta "bitty cream" (Moatsou e Moschopoulou, 2014). Per questo motivo è stato proposto un limite per *B. cereus* 104 cfu/mL (Schoder et al., 2007). Inoltre, le spore dei batteri *Paenibacillus*, che sopravvivono alla pastorizzazione, possono crescere in celle frigorifere e rovinare il latte pastorizzato (Ziarno e Zaręba, 2010). Secondo una recente revisione sistematica che ha esaminato, tramite metanalisi, dati di studi precedenti, i batteri che formano spore possono aumentare nell'intervallo tra 0,58 e 2,41 logs cfu/mL dal latte crudo a quello pastorizzato. Da qui si evince l'importanza di abbassare i livelli di batteri che formano spore e di prevenire la contaminazione post pastorizzazione (Ortuzar et al., 2018). Nel latte intero pastorizzato, l'elevato numero di batteri è stato correlato con l'aumento dei composti volatili e con l'incremento delle attività di proteasi e lipasi per

tutta la shelf-life (Ziyaina et al., 2018). Tuttavia, la correlazione tra la conta microbica e i composti volatili non è lineare e la concentrazione dei volatili cambia notevolmente quando la conta microbica è di 10^6 - 10^8 cfu/mL (Silcock et al., 2014). Inoltre, Alothman et al. (2018) hanno dimostrato che esiste una debole relazione tra la conta microbica totale, i composti volatili e le caratteristiche sensoriali, indicando che il tipo di microflora gioca un ruolo critico. Un altro fattore critico che influenza la shelf-life del latte pastorizzato è la temperatura di conservazione (Brown et al., 1984), (Griffiths e Phillips, 1988). La temperatura di conservazione al di sotto dei 4 °C ritarda la crescita microbica, mentre al di sopra dei 6 °C la favorisce. A 4 °C, l'alterazione è dovuta principalmente a *Pseudomonas spp.*, mentre le *Enterobacteriaceae* e i batteri Gram-positivi sono coinvolti in processi alterativi che avvengono a temperature superiori ai 10 °C (Griffiths e Phillips, 1988). Anche la stabilità della vitamina A e della vitamina E nel latte per lattanti è influenzata dalla temperatura di conservazione, che diminuisce rispettivamente fino al 66% e al 35% quando il latte viene conservato a 37 °C per 9 mesi (Haro-Vicente et al., 2013). La temperatura di conservazione influenza anche il tasso di deterioramento delle caratteristiche sensoriali del latte scremato pastorizzato conservato a 10 °C per 8 giorni, gli sono stati attribuiti sapori di cartone, vegetale, acido, e gessoso (Watson e McEwan, 1995).

Sebbene la pastorizzazione sia il trattamento termico minimo per il consumo di latte, influisce sulle vitamine sensibili al calore, provocando la perdita di acido ascorbico e folato tra lo 0%-17% e il 10%-12%, rispettivamente, e di vitamina B1 e vitamina B12 tra il 5% e il 10%. Tuttavia, durante la conservazione, B12 e folato rimangono intatti, mentre il 25%-45% dell'acido ascorbico residuo può andare perso (Andersson & Osten, 1994). La vitamina D2 non è influenzata dal trattamento termico, ma è influenzata dall'imballaggio del materiale. Essa diminuisce significativamente quando il latte viene conservato in bottiglie di plastica rispetto al latte conservato in bottiglie di vetro a temperatura di refrigerazione. Inoltre, diminuisce ulteriormente quando il latte è conservato in sacchetti di polietilene ed esposto ad una determinata intensità di

luce (Kaushik et al., 2014). In generale, il materiale d'imballaggio influenza la stabilità dei composti sensibili del latte pastorizzato se combinato con determinate condizioni di conservazione in termini di luce e ossigeno. In uno studio di valutazione dei diversi materiali di packaging è stato dimostrato che, per un periodo di 7 giorni, la conta microbica e la composizione chimica non sono state influenzate, mentre il quantitativo di vitamina A è variato. Più specificamente, la perdita di vitamina A è stata, rispettivamente, dell'11%, del 16% e del 31% nel caso di bottiglie multistrato colorate in HDPE e PET, contenitori di cartone e bottiglie in PET trasparente (Moyssiadi et al., 2004). Nel latte intero pastorizzato, la vitamina A e la riboflavina, principale vitamina del latte, sono gli ingredienti più sensibili durante la conservazione e sono state segnalate perdite dal 50% al 73% e dal 34% al 45%, rispettivamente, per il latte conservato in bottiglie trasparenti o in bottiglie in LDPE (Vassila et al., 2002). Pertanto è bene progettare il confezionamento con una specifica combinazione di materiali tale da evitare perdite eccessive di vitamine.

La durata di conservazione del latte sterilizzato, noto come latte a lunga conservazione, può arrivare fino a 12 mesi, anche se in pratica viene consumato molto prima. Il deterioramento del latte UHT è dovuto principalmente alla plasmolisi proteasi indigena e alle proteasi di *Pseudomonas spp.* (Stoeckel et al., 2016), alle spore resistenti al calore e agli enzimi termostabili dei batteri spore-formatori appartenenti ai generi *Bacillus spp.* e *Clostridium spp.* Inoltre, l'ossidazione degli acidi grassi può verificarsi durante la conservazione del latte UHT. Questo fenomeno è influenzato dal profilo degli acidi grassi, dalla presenza di ioni metallici e di sostanze antiossidanti, sia naturali che aggiunte. D'altra parte, la presenza di luce è un fattore più critico per la stabilità del latte UHT durante la conservazione, rispetto al profilo degli acidi grassi. La luce degrada la riboflavina, gli antiossidanti idrofili presenti nel siero del latte e la vitamina E (Smet et al., 2009). Per questa ragione, i materiali moderni per gli imballaggi UHT contengono barriere fotoelettriche.

Un quantitativo di cellule somatiche fino a 800.000 cellule/ml non influenza la lipolisi e la viscosità apparente del latte UHT fino a 120 giorni di conservazione, ma aumenta la proteolisi (Fernandes et al., 2008).

Lo yogurt presenta un'autoprotezione contro i cambiamenti di qualità durante la conservazione grazie al suo basso valore di pH, cioè da 4,4 a 4,6, che si ottiene dall'accumulo di acido lattico prodotto dalla fermentazione del lattosio durante la produzione. Di conseguenza, l'acido lattico è il componente principale del sapore e del gusto dei prodotti a base di yogurt, mentre l'acetaldeide, il diacetile e l'etanolo sono i composti volatili più abbondanti, la cui concentrazione è influenzata dal tipo di coltura iniziale utilizzata e dal periodo di conservazione (Pinto et al., 2009). La durata di conservazione degli yogurt dipende dal tipo di prodotto, dalle condizioni di produzione e dalla temperatura di conservazione. Ad esempio, lo yogurt di varietà greca e lo yogurt tradizionale greco possono essere conservati per circa 40 giorni e 15 giorni, rispettivamente, a 4 °C (Al-Kadamany et al., 2003). Il deterioramento dello yogurt da parte dei batteri è limitato, ma lieviti, funghi e alcuni batteri lattici possono rovinarlo, producendo sapori sgradevoli. Inoltre, quando si verifica la post-acidificazione durante la conservazione, l'eccesso di acidità si traduce in sineresi, che produce siero sulla parte superiore del prodotto, influenzandone la qualità sensoriale. Quando il processo di fermentazione perdura, vengono prodotti derivati dell'acido organico e composti off-flavor di proteolisi, che vengono contrastati con l'utilizzo di colture starter che smettono di crescere a pH 4,4. La shelf-life dello yogurt e dei prodotti a base di latte fermentato viene di solito prolungata con la pastorizzazione e l'aggiunta di conservanti. Sono stati proposti programmi per stimare la shelf-life, la pianificazione integrata e il programma di produzione dello yogurt (Lutke-Entrup et al., 2005).

Tra i prodotti lattiero-caseari va annoverato anche il formaggio che è un alimento molto diversificato in termini di composizione, funzionalità e proprietà sensoriali. La variabilità deriva dalle diverse condizioni di produzione e dai diversi trattamenti di stagionatura. Di conseguenza, i principali fattori e meccanismi che limitano la shelf-

life possono essere: il profilo microbiologico e gli enzimi indigeni del latte; la composizione lorda della cagliata e del formaggio, cioè il contenuto residuo di lattosio, sale, proteine e grassi; infine le condizioni fisico-chimiche del formaggio, cioè il pH, l'attività dell'acqua (a_w) e il potenziale redox (Eh). Fattori estrinseci cruciali per la shelf-life del formaggio sono legati ai processi e ai trattamenti applicati durante la sua produzione, la stagionatura e la conservazione, cioè sono molto importanti le combinazioni temperatura/tempo, l'igiene, la conservazione e le condizioni di distribuzione. La disidratazione della cagliata di formaggio mediante la rimozione del siero è una fase essenziale di ogni procedura di produzione del formaggio. Tuttavia, vari gradi di disidratazione sono applicati a diverse varietà di formaggio, con conseguente variazione della composizione fisico-chimica. La maggior parte delle varietà di formaggio viene sottoposta a maturazione. In generale, i cambiamenti dei principali costituenti e della microflora che avvengono durante la stagionatura aumentano la shelf-life del formaggio. Tuttavia, in circostanze particolari, possono abbreviarne la durata di conservazione inducendo il deterioramento. Sale, pH, attività dell'acqua (a_w) e potenziale redox (Eh) impediscono la crescita di agenti patogeni nel formaggio e riducono al minimo il deterioramento (Guinee & Fox, 2004). L' a_w esprime l'acqua disponibile nel formaggio, cioè l'acqua non legata ai suoi componenti. Dipende dall'umidità del formaggio e dalla concentrazione dei componenti a bassa massa molecolare nei primi giorni/h dopo la produzione, ed è determinata quasi interamente dalla concentrazione di sale in fase acquosa (Marcos, 1999), (Guinee & Fox, 2004). La a_w non è costante durante la stagionatura del formaggio perché avviene la disidratazione e vengono prodotti composti con bassa massa molecolare, come numerosi peptidi che legano l'acqua nei loro gruppi amminici e carbossilici (Hardy, 1986), (Marcos, 1999).

I batteri sono quelli che risentono maggiormente della riduzione dell'attività dell'acqua (a_w) del formaggio, ad eccezione dei batteri alofili, non possono tollerare un $a_w < 0,85$. La maggior parte dei lieviti e delle muffe, ad eccezione di alcune specie di *Saccharomyces*, sono inibiti da $a_w < 0,80$, e solo le specie osmofile possono

tollerare un a_w di 0,55; d'altra parte, il minimo a_w per la crescita di patogeni è vicino allo 0,85, per lo *Staphylococcus aureus* ad esempio (Hardy, 1986), (Veillet-Poncet, 1986), (Guinee & Fox, 2004). Il rischio maggiore per la sicurezza dei formaggi sono gli agenti patogeni *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, e *St. aureus*. (Veillet-Poncet, 1986), (Marcos, 1999), (Donnelly, 2007). Questi ultimi possono produrre tossine nel formaggio prodotto senza starters. I formaggi a crosta fiorita, a crosta lavata, a crosta lavata, ispanici, possono essere soggetti ad agenti patogeni. Per i formaggi a latte crudo sono necessari 90 giorni di stagionatura per garantirne la sicurezza. I formaggi duri di tipo svizzero e italiano sono a basso rischio a causa dell'elevata temperatura della cagliata e del lungo tempo di maturazione, insieme al basso tasso di umidità. I metaboliti e le sostanze battericide prodotte durante la stagionatura del formaggio, insieme ad una diminuzione dell' a_w , possono eliminare i batteri patogeni, soprattutto nei formaggi cotti a pasta dura. Poiché in valori di pH prossimi al neutro avviene la massima crescita dei batteri patogeni, l'acidificazione della massa del formaggio non favorisce la loro crescita. Questo effetto è specifico sia per i batteri lattici che per gli agenti patogeni. I fattori estrinseci che influenzano la crescita degli agenti patogeni sono i trattamenti termici, le temperature di maturazione, le condizioni ambientali e l'imballaggio.

I difetti di sapore di origine microbica limitano la shelf-life del formaggio (McSweeney, 2007). Il gusto amaro può svilupparsi durante la maturazione del formaggio a causa dell'accumulo di peptidi idrofobici <6 kDa provenienti dall'idrolisi delle caseine per via del caglio o delle proteasi cellulari dei batteri. Il basso contenuto di grassi e il basso contenuto di sale nei formaggi favoriscono la produzione di peptidi amari, che si accumulano quando l'attività peptidasica nella massa del formaggio è debole. Per questo motivo, l'amaro può essere considerato un difetto di origine microbica (Lemieux e Simard, 1991 e 1992). L'uso di latte crudo o di latte con alti conteggi psicrotrofici, maturazione prolungata, muffe o altri microrganismi di superficie, o preparati enzimatici specifici possono indurre un sapore rancido (Collins et al., 2003). Un fattore molto importante per la comparsa di “difetti” di tipo

microbico è il contenuto di lattosio residuo alla fine della produzione del formaggio. Quando il contenuto di lattosio residuo è elevato e l'assorbimento del sale basso o non uniforme, ne risultano numerosi piccoli buchi nella massa del formaggio, che a sua volta diventa piuttosto "spugnoso". Lo sviluppo precoce o il gas tardivo dovuto a fermentazioni non desiderate che si verificano nella massa del formaggio durante la stagionatura provoca occhi, crepe e buchi nella sua massa o gas all'interno dell'imballaggio che riducono drasticamente la shelf-life del formaggio.

Se il latte del formaggio è stato pastorizzato, principalmente i coliformi, ma anche i lieviti o i batteri lattici eterofermentativi provenienti da contaminazione, provocano la produzione precoce di gas. I coliformi sono mesofili, ma possono crescere anche a 10 °C e 40 °C, sono inibiti a basso pH 4.1-3.85, e comprendono specie psicrotrofiche. Sono in grado di fermentare il lattosio residuo nel formaggio fresco producendo, tra l'altro, acido lattico, acido acetico, etanolo, CO₂ e H₂. H₂ è debolmente solubile in acqua e favorisce la produzione di gas. Il gas prodotto dai lieviti è CO₂ proveniente dal metabolismo del lattato o lattosio. I fori dei coliformi sono molto piccoli, con un diametro di 1-2 mm, e quando coesistono con quelli più grandi, sono presenti anche i lieviti. Altri microrganismi che causano difetti di gas sono i lattococchi positivi al citrato o *Leuconostoc* che producono CO₂, e lattobacilli tolleranti al sale che producono CO₂ e sapori impuri essendo presenti in salamoie "deboli". La produzione di gas precoce è il difetto più comune delle salamoie bianche formaggi ([Alichanidis, 2007](#)). Le fonti di contaminazione sono: scarsa igiene degli impianti e delle attrezzature dopo la pastorizzazione, contaminazione del latte o degli starter. Per la comparsa di gas precoci, è necessario un alto numero di coliformi e lieviti (>10⁵- 10⁶ per mL di latte). Anche se i conteggi dei coliformi diminuiscono drasticamente durante la stagionatura, l'elevata umidità e l'elevato residuo di lattosio, insieme alla temperatura e al pH piuttosto elevati della cagliata fresca, aumentano la loro moltiplicazione nel formaggio fresco. Pertanto, la rapida fermentazione del lattosio da parte degli starters, il corretto sgocciolamento, il trattamento termico del latte di formaggio, l'igiene nella produzione e le basse temperature dopo la formazione della

cagliata inibiscono la produzione precoce di gas (Alichanidis, 2007). La fermentazione anaerobica del lattato da parte del *Clostridium spp.*, in particolare del *C. tyrobutyricum*, produce acido butirrico e gas. L'accumulo di idrogeno e di CO₂ nella massa del formaggio avviene settimane o mesi dopo la sua produzione, durante la stagionatura o lo stoccaggio, e provoca la comparsa di crepe, fenditure o occhiature anomale nei formaggi a pasta semidura e a pasta dura, come i formaggi di tipo svizzero e olandese (McSweeney, 2007), (Sheehan, 2007). *C. tyrobutyricum* è acido tollerante, cresce anaerobicamente a pH 4.5-7.5 e metabolizza il lattato producendo acido butirrico, acido acetico, CO₂ e idrogeno. A pH ottimale 5.8 *C. tyrobutyricum* tollera il 5,5% - 6% di sale. Pertanto, una rapida diminuzione del pH a valori inferiori di 5 e un rapido apporto di sale (dovuto alla salatura a secco) verso un quantitativo superiore al 5.5% di sale, che si verifica nei formaggi bianchi in salamoia, non viene favorita la produzione di gas tardivo. Il gas tardivo nei formaggi salati a secco, come il Cheddar, può essere dovuto alla fermentazione del lattosio residuo e del galattosio a CO₂ da lattobacilli eterofermentativi (NSLAB) se l'attività iniziale è bassa. Un'altra fonte di gas tardivo potrebbe essere la decarbossilazione degli amminoacidi durante la maturazione. Le misure per evitare la presenza tardiva di gas nel formaggio sono legate sia alla qualità del latte che alle condizioni di maturazione del formaggio. Un insilato di buona qualità e delle buone pratiche di mungitura, limitano il conteggio iniziale delle spore del latte. Possono essere rimosse dal latte del formaggio con metodi fisici, come la retrofugazione o la microfiltrazione. La loro germinazione e la crescita delle cellule vegetative può essere impedita utilizzando KNO₃, NaNO₃ (10-20 g/100 L di latte), o lisozima, se consentito. Coliformi, microflora superficiale dei lattobacilli e l'enzima xantina ossidasi del formaggio riducono il nitrato a nitrito. Il ritardo successivo posticipa la germinazione delle spore fino a raggiungere una distribuzione uniforme del sale all'interno della massa del formaggio (Moschopoulou E. et al., 2019). Tuttavia, i nitrati non possono essere utilizzati nei formaggi a fermentazione propionica a causa dell'effetto inibitorio del nitrito sui propionibatteri. Inoltre, in condizioni di pH basso, il nitrito reagisce con gli amminoacidi aromatici

producendo nitrosammine, che sono sostanze potenzialmente cancerogene. L'uso di starter batteriosinogeni non sembra efficace a causa della loro suscettibilità ai batteriofagi e della loro attività inibitoria sulle colonie starter e non (Brändle et al., 2016). Le condizioni di maturazione e conservazione possono inibire o indurre una produzione di gas tardivo. Secondo Silveti et al. (2018), temperature di maturazione inferiori a 10 °C possono impedire la produzione di gas tardivo. In particolare, a temperature inferiori a 15 °C, la formazione di gas da parte delle cellule vegetative dei Clostridi è impedita per oltre 70 giorni, ma una combinazione di temperatura ≤ 15 °C, pH ≤ 5 e NaCl al 2%, o una temperatura ≤ 10 °C, è necessaria per evitare la germinazione delle spore e la produzione di gas. Tuttavia, a 20 °C, la produzione di gas derivante dalla germinazione e dalla crescita delle spore di *C. tyrobutyricum* non è influenzata dall'acidità e dalla concentrazione di sale. Tecnologie emergenti come il trattamento HHP (alte pressioni idrostatiche) del formaggio giovane a > 300 MPa potrebbero inibire la germinazione delle spore (Ávila et al. 2016).

La superficie esterna del formaggio è una caratteristica specifica per ogni varietà ed è vulnerabile al deterioramento dovuto al contatto diretto con l'ambiente e, in particolare, con l'aria. È caratterizzata da un basso a_w e da un alto contenuto di sale, presenta una particolare microflora composta sia da procarioti (Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria) sia da eucarioti (principalmente lieviti e muffe) che, grazie alle loro varie attività enzimatiche, contribuiscono allo sviluppo del sapore dei formaggi. La microflora della superficie del formaggio è una barriera contro gli agenti patogeni e un vettore di varie attività enzimatiche che influenzano il sapore del formaggio (Irlinger et al., 2015).

3.4 Composti volatili responsabili dell'aroma durante la shelf-life

Alcuni esempi di difetti dell'aroma del formaggio sono: la produzione di stirene da parte di *Penicillium caseicolum*, il gusto di patata dovuto a 2-metossi-3-isopropilpirazina prodotta da alcune specie di *Pseudomonas*, rancidità dovuta agli psicrotrofi nel formaggio a pasta molle, ossidazione dei grassi dovuta a

all'esposizione alla luce o all'uso di cagliata congelata e all'irrancidimento dovuto a un eccessivo contenuto di acidi grassi liberi (Hardy, 1986).

3.5 Shelf-life dei prodotti lattiero caseari delattosati

Il latte UHT delattosato ha una shelf-life di circa tre mesi, rispetto ai nove mesi del latte UHT convenzionale. L'estensione della shelf-life del latte UHT delattosato è altamente auspicabile per aumentare la flessibilità nella distribuzione dei prodotti e per ridurre gli sprechi, questi ultimi soprattutto nel mercato della vendita al dettaglio. Jensen et al. (2015) hanno studiato il gusto amaro nel latte UHT convenzionale e in quello delattosato, dopo quattro mesi di conservazione a temperatura ambiente. Da questo studio è emerso un punteggio più alto di intensità del gusto amaro nel latte UHT delattosato rispetto al latte UHT convenzionale durante la conservazione. Gli amminoacidi liberi, che sono principalmente dovuti ad un'amentata attività di proteolisi e di esopeptidasi, diventano anche parte delle reazioni di Maillard in corso attraverso la formazione di aldeide Strecker, e quindi contribuiscono sia alle reazioni di reticolazione che alla formazione di composti aromatici (Jansson et al., 2014b), (Jensen et al., 2015). I prodotti della reazione di Maillard possono anche influenzare le caratteristiche sensoriali del latte durante la conservazione attraverso la formazione di acidi e composti coloranti e aromatici (Colahan-Sederstrom & Peterson, 2005), (Jansson et al., 2014a).

4.1 I batteri lattici

I batteri lattici (LAB), appartenenti a numerosi generi della famiglia delle Lactobacillaceae, sono i microrganismi più studiati e ampiamente applicati nella fermentazione alimentare in tutto il mondo (Maragkoudakis P. A., et al., 2006), (Yantyati Widyastuti et al., 2014).

Le proprietà più importanti dei LAB sono la loro capacità di acidificare il latte (Mäyrä-Mäkinen A. & Bigret M., 2004) e di generare sapore e consistenza, convertendo le proteine del latte grazie alla loro attività proteolitica (Kongo J. M., 2013), (Griffiths M. W. & Tellez A. M., 2013). Inoltre, producono esopolisaccaridi, essenziali per lo sviluppo della consistenza. Il gusto dolcemente acido e piacevolmente fresco sono caratteristiche dei prodotti a base di latte fermentato come lo yogurt e il formaggio. Il latte di mucca, seguito da quello di capra e di pecora, è il più utilizzato per produrre prodotti a base di latte fermentato.

Sul mercato sono disponibili diversi prodotti a base di latte fermentato provenienti da diverse parti del mondo, le cui variazioni possono essere dovute alla diversa tecnologia applicata e ai ceppi di LAB utilizzati. Il formaggio rappresenta numericamente uno dei maggiori prodotti a base di latte fermentato e può essere classificato in base a diversi criteri che includono il contributo dei ceppi LAB nel processo di maturazione. Le colture starter di LAB sono responsabili della formazione del sapore del formaggio.

La presenza di LAB nella fermentazione del latte si ha sia come colture starter spontanee che inoculate (Delavenne E., et al., 2012). Il ruolo principale delle colture starter è quello di produrre acido e contribuire anche al processo di maturazione. Le colture non starter non sono responsabili della produzione di acido, ma contribuiscono maggiormente durante il processo di maturazione. La formazione del sapore e le caratteristiche del sapore delle singole varietà di formaggio si sviluppano durante il processo di maturazione sia da parte del LAB starter che del LAB non

starter. Tutti i LAB sono attivi in modo sinergico per produrre un sapore specifico dei prodotti caseari. Le colture starter di LAB possono essere sia mesofile appartenenti ai generi di *Lactococcus* e *Leuconostoc* o termofili come i generi *Streptococco* e *Lactobacillus* (Fox P. F. et al., 2004). Tra queste specie, le più studiate sono *Lactococcus lactis* (Hannon J. A., et al. 2007), *Streptococcus termofilo* (Helinck S., et al., 2004) e *Lactobacillus helveticus* (Christiansen J. K., et al., 2008). I LAB non starter giocano un ruolo importante nella maturazione del formaggio, perché rilasciano enzimi che partecipano alla trasformazione della cagliata nel formaggio e, in particolare nei formaggi tradizionali, contribuiscono alla loro intensità di sapore (Beresford T. P., et al., 2001).

Lo sforzo per migliorare la qualità del formaggio producendo un sapore specifico è stato di crescente interesse e sono state ampiamente condotte ricerche incentrate sull'uso di potenziali starter derivati da nuove e potenti tecnologie (Kongo J. M., 2013), (Hols P., et al., 2005), (Steele J., et al., 2013).

4.2 I lattobacilli: utilizzo ed effetti benefici (batteri probiotici)

Considerando le diverse proprietà di promozione della salute e il loro riconoscimento come microrganismi GRAS, i LAB possono essere ampiamente utilizzati nello sviluppo di nuovi prodotti a base di latte fermentato, grazie anche alla loro capacità fermentativa. Tra i loro effetti benefici rientrano il miglioramento della sicurezza alimentare e degli attributi organolettici, l'arricchimento dei nutrienti e l'aumento dei benefici per la salute (Panesar P. S., 2011), (Liu S. N. et al., 2011).

Il latte e i prodotti a base di latte fermentato sono substrati favorevoli per la crescita di microrganismi che possono portare al loro deterioramento. Lo scopo principale della fermentazione del latte mediante l'utilizzo dei LAB è di prolungare la shelf-life e preservare la componente nutritiva del latte. La proprietà conservante è dovuta alla loro capacità di produrre acido, che a sua volta mostra attività antimicrobica, agendo da scudo contro il deterioramento e la proliferazione di agenti patogeni. I LAB sono considerati conservanti naturali sicuri anche perché sono in grado di rilasciare

metaboliti antimicrobici denominati batteriocine (Zacharof M. P. & Lovitt R. W., 2012). Sia gli acidi che le batteriocine rappresentano un grande potenziale da utilizzare nella conservazione degli alimenti. Le batteriocine sono sostanze di natura proteica, sia proteine che polipeptidi, che possiedono attività antimicrobiche e che vengono prodotte durante la fase primaria della crescita batterica. Generalmente le batteriocine sono attive solo contro specie batteriche strettamente correlate. La maggior parte delle batteriocine prodotte dai LAB sono piccoli peptidi cationici (< 10 kDa), termostabili, anfifiliche e permeabilizzanti di membrana. Possono essere suddivise in 3 classi:

1) *lantibiotici piccoli* (< 5 kDa) stabili al calore aventi i caratteristici amminoacidi policiclici tioetere lantiionina o metilantinina, così come gli amminoacidi insaturi deidroalanina e acido 2-amminoisobutirrico;

2) *non lantibiotici piccoli* (< 10 kDa) relativamente stabili al calore, non contenenti peptidi attivi di membrana;

3) *batteriocine* proteine labili al calore aventi, in genere, un grande peso molecolare (> 30 kDa) (Zacharof M. P. & Lovitt R. W., 2012). Possono essere utilizzate come concentrati parzialmente purificati o purificati e integrati a prodotti alimentari, anche se la loro applicazione richiede un'approvazione specifica come conservanti alimentari. Tra le batteriocine prodotte da LAB, la nisina prodotta da *Lactococcus lactis* spp., è l'unica ufficialmente impiegata nel cibo a livello industriale e il suo utilizzo è stato approvato in tutto il mondo (Balciunas E. M., et al., 2013), (Mitra S., et al., 2010).

Recentemente, c'è un crescente interesse nello sviluppo di vari prodotti a base di latte fermentato per altri scopi benefici, in particolare per scopi sanitari e per la prevenzione dalle tossine prodotte da agenti patogeni di origine alimentare e da batteri di deterioramento (Panesar P. S., 2011), (Sharma R., et al., 2012), (Shah N. P., 2007), (Ali A. A., 2010). Gli effetti benefici della fermentazione dei prodotti lattiero-caseari sono prodotti da una varietà di prodotti bioattivi dei LAB (Griffiths M. W. & Tellez A. M., 2013).

Peptidi bioattivi prodotti dall'idrolisi della caseina nel latte generato da *L. helveticus* sono stati esaminati e hanno mostrato un effetto antipertensivo, attività immunomodulatoria, anti-cancro e calcio capacità di legare. *L. helveticus* è conosciuto come uno dei LAB che ha un efficiente sistema proteolitico (Griffiths M. W. & Tellez A. M., 2013). I LAB sono al primo posto tra gli organismi elencati come specie utilizzate nella preparazione probiotica perchè possiedono la maggior parte dei requisiti per essere chiamati probiotici (Fioramonti J., et al. 2003), (Singh K., et al., 2011).

4.3 Ruolo dei lattobacilli nella riduzione del lattosio

Gli acidi organici sono il prodotto finale del metabolismo dei carboidrati ottenuti dai LAB. Le specie omofermentative di LAB convertono il lattosio per lo più in acido lattico, mentre le specie eterofermentative in acido lattico, acido acetico, etanolo e CO₂. La produzione di acido lattico da LAB è dipendente dal ceppo. Il *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121, recentemente identificato, produce elevate concentrazioni di acido L (+)-lattico. Inoltre, la purezza ottica stimata dell'acido lattico prodotto è pari al 96,6% di acido L (+)-lattico. Questo ceppo può essere adatto per l'impiego nella produzione industriale dell'acido lattico (Moon S. K., et al., 2012). Uno studio che ha utilizzato 10 ceppi di *Lactobacillus* ha dimostrato che la produzione di acido organico è stata notevolmente influenzata dai mezzi utilizzati. Sono stati utilizzati tre diversi terreni di coltura, tra cui il latte scremato, il brodo di de Mann Rogosa Sharpe (MRS) e il topinambur. L'acidità più alta è stata ottenuta nel brodo MRS e l'acidificazione più debole è stata trovata nel latte scremato (Zalán Z., et al., 2010).

Diverse fasi dello sviluppo del sapore del formaggio da parte dei LAB comprendono il metabolismo del lattosio, del lattato e del citrato; la lipolisi che libera gli acidi grassi liberi e la proteolisi dove si è verificata la degradazione della caseina seguita dal catabolismo degli aminoacidi (McSweeney P. L. H. & Sousa M. J., 2000).

I batteri lattici contenuti nel latte, o aggiunti come starter, durante la produzione dei prodotti lattiero-caseari provvedono a degradare il lattosio. Il trasporto può avvenire mediante fosforilazione del lattosio, quando viene attraversata la membrana citoplasmatica, o cedendo il gruppo fosfato dal fosfoenolpiruvato, formato durante la glicolisi, grazie alla fosfoenolpiruvato fosfotransferasi. Nel primo processo intervengono 4 proteine: una posizionata nella membrana citoplasmatica che trasporta il lattosio dall'esterno all'interno della cellula; due proteine citoplasmatiche con il compito di trasferire il gruppo fosfato dal fosfoenolpiruvato alla quart'ultima proteina presente nel citoplasma che provvederà a fosforilare il lattosio.

Nel secondo processo sono coinvolte delle proteine site nella membrana citoplasmatica che provvederanno a trasportare il lattosio all'interno della cellula senza apportarvi alcuna modifica chimica e prendono il nome di permeasi. Una volta all'interno della cellula il lattosio verrà scisso ad opera di una fosfo- β -galattosidasi in galattosio-6-fosfato e glucosio, quest'ultimo verrà poi convertito in glucosio-6-fosfato che, nei lattococchi che viene metabolizzato nella via glicolitica, mentre il galattosio-6-fosfato entra nella via metabolica del tagatosio. Successivamente, grazie all'attività enzimatica dell'aldolasi, si avrà la produzione di gliceraldeide-3-fosfato che, partendo da una mole di lattosio, porterà alla formazione di 4 moli di acido lattico (fermentazione acido lattica omofermentante); mentre nei batteri termofili, la produzione sarà di sole due moli di acido lattico poichè il galattosio viene espulso.

Nei ceppi delle specie *leuconostoc* e *lactobacilli*, nella via di Leloir il galattosio viene convertito in glucosio-1-fosfato e il glucosio degradato nella via fosfochetolasica.

Per intervento degli enzimi fosfochetolasi e glucosio-6-fosfato deidrogenasi si avrà la formazione di CO₂ e pentoso-5-fosfato che, a loro volta, formeranno acetil fosfato e gliceraldeide-3-fosfato, il primo verrà convertito in etanolo mentre il secondo in acido lattico e in quest'ultimo caso si parlerà di fermentazione acido lattica eterofermentante (James M. Jay et al., 2009).

SCOPO DELLA TESI

5.1 Scopo della tesi

In un contesto di generalizzata flessione dei consumi, il comparto dei prodotti delattosati rivela un trend positivo con un fatturato annuo, a livello globale, di 20 miliardi di dollari nel 2019 e una crescita annua del 9,38 % prevista per i prossimi cinque anni. L'intolleranza al lattosio si stima colpisca in Italia circa il 40% della popolazione e il “*free-from*” è ormai una consolidata filosofia di vita.

Nell'industria lattiero casearia, la riduzione del contenuto di lattosio si ottiene attraverso l'azione controllata di enzimi specifici (lattasi) che lo scindono in glucosio e galattosio. È stato dimostrato che il latte delattosato è meno stabile ai trattamenti termici, industriali e domestici, e durante la shelf-life; la maggiore presenza di zuccheri riducenti e l'eventuale attività proteolitica delle lattasi determinano più rapidamente reazioni di alterazione, quali la Maillard, con evidenti effetti negativi sulle caratteristiche sensoriali (imbrunimento e sapore di cotto), nutrizionali (diminuzione del contenuto di lisina disponibile) e sulla sicurezza (aumento del contenuto in furosina e composti furfurilici).

Alla luce di quanto sopra esposto, il progetto di ricerca della presente tesi di dottorato ha avuto quale scopo lo sviluppo di un metodo innovativo per la produzione di formaggi freschi a ridotto contenuto di lattosio. Nello specifico, l'obiettivo era quello di produrre formaggi a ridotto contenuto di lattosio senza ricorrere all'utilizzo di latte delattosato o all'aggiunta al latte di caseificazione dell'enzima lattasi commerciale, ma attraverso l'impiego di batteri lattici con attività β -galattosidasica, quali “*adjunct culture*”. A tal fine, è stato effettuato uno screening dell'attività β -galattosidasica di batteri lattici isolati da campioni di colostro bovino. I ceppi da utilizzare nel processo di caseificazione sono stati selezionati oltre che per la loro capacità di idrolizzare il lattosio anche per la loro attività probiotica al fine di ottenere “formaggi probiotici a ridotto contenuto di lattosio”. Una volta selezionati,

caratterizzati ed identificati, i ceppi sono stati utilizzati nella produzione di un formaggio fresco che veniva sottoposto ad analisi microbiologiche, chimiche e chimico-fisiche per la valutazione della qualità e della stabilità durante la shelf-life.

LINEE DI RICERCA

LINEE DI RICERCA 1

SELEZIONE LATTOBACILLI PER LA PRODUZIONE DI FORMAGGI FRESCHI DELATTOSATI PROBIOTICI

6.1 Screening attività β -galattosidasica di lattobacilli presenti in prodotti lattiero-caseari

Nel presente studio è stato condotto uno screening dell'attività β -galattosidasica in ceppi batterici rinvenuti in prodotti lattiero-caseari, in particolare lattobacilli presenti nel colostro di latte vaccino, facendo riferimento all'impiego dell'Xgal. Successivamente, mediante l'utilizzo dell'FDG- β -gal-assay kit con rilevazione di fluorescenza, è stata quantificata la su menzionata attività con una valutazione fluorimetrica.

Lo screening, noto come X-gal, prevede l'impiego di un substrato cromogenico (X-gal) che viene aggiunto in piastre Petri contenenti agar. La presenza di attività β -galattosidasica innesca l'idrolisi dell'X-gal in 5-Bromo-4-Cloro-indossile che dimerizza spontaneamente per produrre un pigmento blu insolubile chiamato 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo. Le colonie che presenteranno attività β -galattosidasica si mostreranno di colore blu mentre quelle prive, di colore bianco.

L'isopropile β -D-1-tioogalatterianolato (IPTG) viene inoltre utilizzato insieme all'X-gal come induttore per l'espressione del gene lacZ.

Al fine di testare la validità del metodo, sono stati selezionati a monte due ceppi batterici di cui era nota la sequenza genica, da utilizzare come controllo positivo e negativo all'interno del cui genoma era stata verificata la presenza o meno del gene codificante l'enzima β -galattosidasi. Uno dei ceppi in questione, *Lactobacillus Rhamnosus*, proveniente dallo stock del Teagasc Moorepark Research Centre, impiegato inizialmente come controllo positivo, pur presentando il gene per la β -galattosidasi nella sequenza genomica, non ha manifestato tale attività poiché

risultava inesperto. Per tale motivo è stato adottato come controllo negativo per i successivi esperimenti. L'altro ceppo batterico per il quale è stata accertata l'attività β -galattosidasi era un *Lactobacillus Delbrueckii*. L'attività β -gal dei due controlli su menzionati è stata verificata mediante l'uso di terreno mMRS (modificato con aggiunta di cisteina cloridrato) contenente X-gal.

Dunque, sono stati identificati due controlli rispettivamente:

- *Lactobacillus Rhamnosus* L09 (negativo)
- *Lactobacillus Delbrueckii* L20 (positivo)

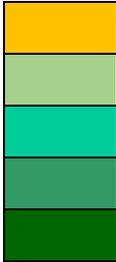
In seguito, 10 campioni di colostro di bovine razza frisona sono stati campionati presso 10 differenti fattorie Irlandesi e sottoposti a uno screening per l'isolamento dei lattobacilli. Quest'ultimo è stato effettuato mediante l'uso di terreno selettivo per lattobacilli (LBS) agar con aggiunta di Acido Acetico Glaciale per abbassare il pH del terreno (660 μ L in 500 ml di terreno di coltura), poiché i lattobacilli prediligono gli ambienti acidi. 100 μ L di ciascun campione di colostro sono stati seminati nelle piastre per ottenere delle colture pure. Altri 100 μ L di colostro sono stati messi in 900 μ L di MRD e facendo delle diluizioni seriali 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} piastrate, poi, in LBS. Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24-48h in anaerobiosi.

Dopo tale periodo è stata monitorata la crescita nelle diverse piastre selezionando le colonie differenti per morfologia e colore. Le singole colonie isolate sono state messe in 10 mL di brodo mMRS (modificato con l'aggiunta di cisteina cloridrato) e fatte crescere per 24h in anaerobiosi a 37 °C. Dopo 24h è stato fatto un 2° brodo prelevando 100 μ L dal primo brodo e mettendoli in un nuovo brodo mMRS. Il giorno seguente è stato preparato lo stock prelevando 700 μ L dal 2° brodo e versandoli in screw tube contenenti 300 μ L di glicerolo al 50% (50% glicerolo + 50% acqua distillata) e messi nel freezer a -30 °C. Dai 10 campioni di colostro iniziale sono state isolate, alla fine dello screening, 43 colonie di lattobacilli di cui soltanto 31 sono risultati positivi al test X-gal.

6.2 Preparazione piastre X-gal per testare la presenza dell'attività β -galattosidasica

Le piastre Petri sono state preparate utilizzando un terreno mMRS agar con aggiunta di 4mL di soluzione X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-Galattopiranoside) formato da 20 mg di X-gal, 1 mL di dimetilformammide (DMF) e 4 mL di Isopropil- β -D-1-tiogalattopiranoside (IPTG). I batteri precedentemente posti in freezer a -30°C , sono stati riattivati dallo stock. Dal 2° brodo sono stati prelevati 50 μL e messi in pozzetti ricavati nelle piastre. Lo stesso esperimento è stato effettuato versando 10 μL sulla superficie delle piastre. Tutte le piastre sono state messe ad incubare a 37°C in aereobiosi per 48h.

Tabella 6.1 - Risultato del test Xgal condotto sui 43 ceppi batterici isolati da 10 campioni di colostro bovino

| Campioni | 24h | | 48h | | LEGENDA |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---|
| | Goccia | Pozzetto | Goccia | Pozzetto | |
| C1 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | cambiamento discreto | cambiamento |  <p>nessun cambiamento cambiamento discreto cambiamento cambiamento intenso c. molto intenso</p> |
| C2 | nessun cambiamento | cambiamento discreto | cambiamento intenso | cambiamento | |
| C3 | nessun cambiamento | cambiamento discreto | cambiamento intenso | cambiamento discreto | |
| C4 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | |
| C5 | cambiamento | cambiamento | cambiamento intenso | cambiamento | |
| C6 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | cambiamento | cambiamento discreto | |
| C7 | cambiamento discreto | cambiamento | cambiamento discreto | cambiamento | |
| C8 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | cambiamento discreto | cambiamento | |
| C9 | nessun cambiamento | cambiamento | cambiamento discreto | cambiamento | |
| C10 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | cambiamento | cambiamento | |
| C11 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | |
| C12 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | |
| C13 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | |
| C14 | cambiamento discreto | cambiamento | cambiamento discreto | cambiamento | |
| C15 | nessun cambiamento | cambiamento | cambiamento discreto | cambiamento | |
| C16 | cambiamento discreto | cambiamento | cambiamento intenso | cambiamento intenso | |
| C17 | cambiamento | nessun cambiamento | cambiamento | cambiamento | |
| C18 | cambiamento | nessun cambiamento | cambiamento intenso | cambiamento intenso | |
| C19 | cambiamento | cambiamento | cambiamento intenso | cambiamento intenso | |
| C20 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | |
| C21 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | |
| C22 | cambiamento | cambiamento | cambiamento | cambiamento intenso | |
| C23 | cambiamento discreto | cambiamento | cambiamento | cambiamento intenso | |
| C24 | cambiamento | cambiamento | cambiamento intenso | cambiamento intenso | |
| C25 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | cambiamento | cambiamento | |
| C26 | cambiamento | cambiamento | cambiamento intenso | cambiamento intenso | |
| C27 | nessun cambiamento | cambiamento | cambiamento | cambiamento intenso | |
| C28 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | |
| C29 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | |
| C30 | nessun cambiamento | cambiamento discreto | cambiamento | cambiamento intenso | |
| C31 | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | nessun cambiamento | |

| | | | | |
|----------|--|--|--|--|
| C32 | | | | |
| C33 | | | | |
| C34 | | | | |
| C35 | | | | |
| C36 | | | | |
| C37 | | | | |
| C38 | | | | |
| C39 | | | | |
| C40 | | | | |
| C41 | | | | |
| C42 | | | | |
| C43 | | | | |
| Positivo | | | | |
| Negativo | | | | |

6.3 Curva di crescita dei batteri in diversi terreni di coltura

È stata studiata la crescita e il tempo al quale si ha la massima attività β -galattosidasica usando i ceppi di controllo e un isolato positivo al test dell'X-gal (C1) in diversi terreni liquidi di coltura per lattobacilli quali LM17 (terreno M17 con aggiunta di lattosio al 5%), mMRS (terreno MRS modificato con aggiunta di cisteina) e LMM ovvero terreno minimo (MRS privo di Glucosio) con aggiunta di lattosio all'1%.

Dopo aver preparato 3 tubi da 10 mL per ciascun terreno di coltura, i ceppi provenienti dallo stock in freezer a -20°C sono stati prelevati e versati nei 3 diversi brodi di coltura, successivamente incubati per 8-20 ore a 37°C . Per individuare l'intervallo di massima attività β -galattosidasica, la conta è stata effettuata a intervalli di 1 ora dal tempo 0 al tempo 10 e poi dopo 24 ore, mediante la misurazione della densità ottica (OD) a una lunghezza d'onda di 600 nanometri, sapendo che un $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ pari a 0,1 è equivalente a circa 1×10^6 cellule per mL. Come bianco è stato versato nelle cuvette 1 mL di ciascun terreno di coltura, mentre nelle cuvette utili per lo studio della crescita batterica sono stati versati 900 μL di terreno e 100 μL di campione.

Nel terreno LM17 non è stata osservata una crescita considerevole di lattobacilli poiché il terreno aveva un pH basico non adatto alla crescita degli stessi e per tale motivo è stato escluso.

Figura 6.1 - Crescita batterica in mMRS

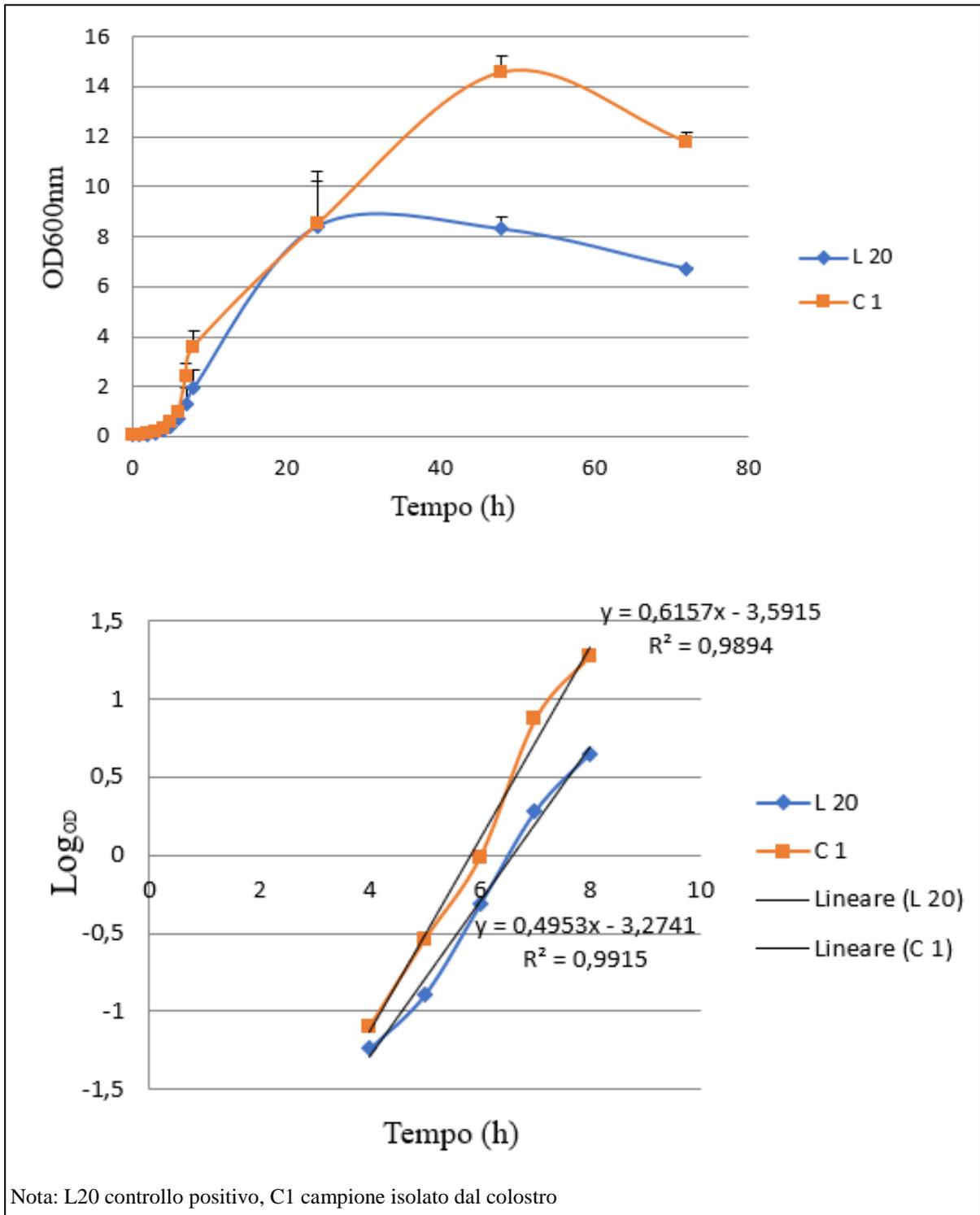
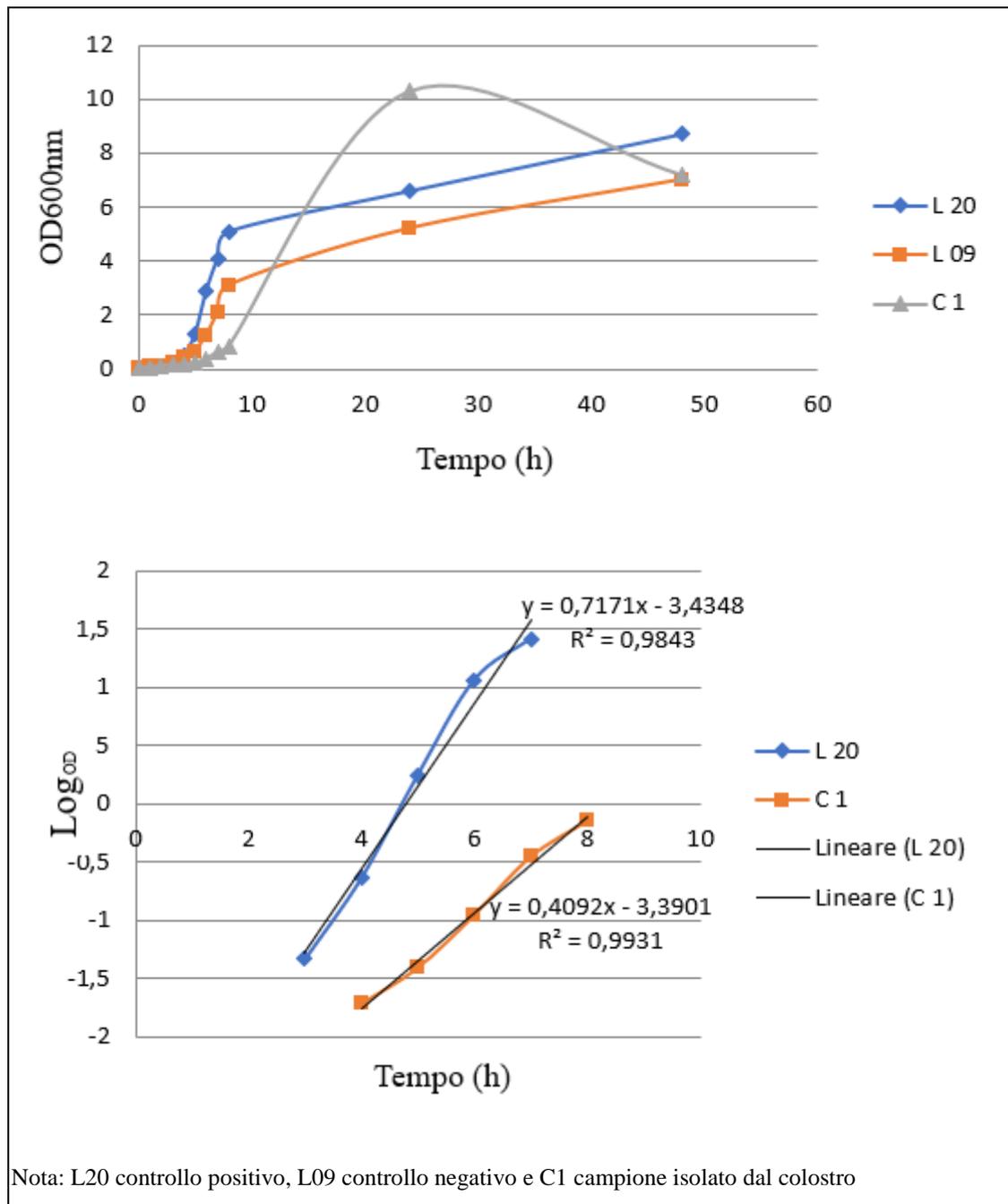


Figura 6.2 - Crescita batterica in LMM



Dai risultati della crescita in terreno mMRS si è osservato che il lattobacillo estratto dal colostro (C1) mostrava una crescita superiore rispetto al controllo positivo. Inoltre il lattobacillo in esame esprimeva la sua massima attività, in termini di velocità di crescita (fase Log), nei tempi compresi tra 6 e 8 ore. Nel terreno LMM il lattobacillo C1 mostrava invece una crescita più lenta rispetto al controllo positivo e negativo nella fase iniziale per poi aumentare solo dopo le 14 ore e in ogni caso in misura

inferiore rispetto al terreno mMRS. Pertanto si è deciso di utilizzare quest'ultimo (mMRS) come terreno di crescita per i successivi esperimenti e di considerare l'intervallo 8 ore come momento di massima attività dei lattobacilli.

6.4 Valutazione del surnatante in piastre X-gal

Dopo aver individuato come tempo ottimale di crescita le 8h (fase Log) per i lattobacilli, al fine di verificare la presenza di enzima rilasciato dalle cellule nel mezzo di crescita, è stato sottoposto al test dell'X-gal il surnatante dei ceppi isolati. Si è proceduto versando il surnatante ottenuto dalla centrifugazione delle colture dei 43 ceppi isolati, riattivati in brodo mMRS in condizioni aerobiche, nei pozzetti ricavati in piastre con terreno mMRS e aggiunta di X-gal, prelevato a differenti tempi di crescita (8h, 24h).



Figura 6.3 - Piastre X-Gal a 8 ore dopo 24 e 48 ore di incubazione a 37°C

Come è possibile osservare dalla figura 6.3 i ceppi che mostravano maggiore attività β -galattosidasica dopo 8 ore di crescita e 24 ore di incubazione delle piastre erano il C8, 13, 25, 26, 27, 31, 32, 33 e 34 seguiti dai ceppi C1, 2, 5, 6, 10, 14, 15, 28, 30, 35 e 36. Dopo 48 ore di incubazione delle piastre si è osservato un incremento dell'intensità di colore per tutti i ceppi prima indicati e la variazione di colore anche

per i ceppi 4, 7, 9, 12, 17, 19, 20, 29, 37, 41, 42 e 43. Pertanto per tutti i ceppi che hanno mostrato una variazione cromatica è stata ipotizzata la presenza dell'enzima che è stato successivamente quantificato.

6.5 Quantificazione dell'attività β -gal mediante kit FDG- β -gal

Dei 43 campioni è stata misurata l'attività β -galattosidasica mediante l'FDG- β -gal kit con misura a fluorescenza alla lunghezza di 490/525nm.

I lattobacilli presenti nello stock sono stati riattivati (conservati in freezer alla temperatura di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) in terreno mMRS a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. Il giorno successivo 100 μL di brodo sono stati aggiunti al nuovo brodo e incubati per 8h. A ciascun tempo sono state prelevate quantità di brodo contenenti la stessa quantità di batteri, centrifugati, lavati con PBS, aggiunta di Lysis solution (proveniente dal kit) e posti nel freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ per il procedimento successivo previsto dal protocollo.

L'FDG- β -gal assay kit è uno strumento utile per misurare rapidamente i livelli di β -galattosidasi attiva espressa in cellule trasfettate con plasmidi che esprimono *Lac Z* che è spesso usato come gene reporter in esperimenti di trasfezione perché la β -galattosidasi è molto resistente alla degradazione proteolitica e la sua attività è misurata facilmente. La β -galattosidasi esegue l'idrolisi della fluoresceina della β -D-galattopiranoside (FDG) in una fluoresceina che può essere rilevata all'eccitazione/emissione di 490/525 nm. La concentrazione della β -galattosidasi è proporzionale alla fluorescenza prodotta.

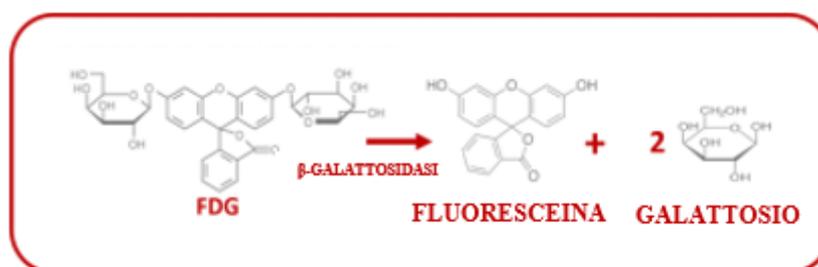


Figura 6.4 - Reazione di scissione operata dall' enzima β -galattosidasi in FDG

L'FDG- β -gal assay kit fornisce un metodo veloce, semplice e molto sensibile per quantificare l'espressione enzimatica in cellule batteriche. Il kit è in grado di misurare l'attività β -galattosidasi fino a livello di femtogrammi (10^{-15} g).

Protocollo FDG- β -gal assay kit

Contenuto del kit

- Tampone di reazione 55mL
- Tampone di lisi 25 mL
- Soluzione di arresto 25 mL
- Enzima β -galattosidasi (0.1 mg/mL) 20 μ L
- β -mercaptoetanololo 500 μ L
- Soluzione FDG (10 mM) 125 μ L

Preparazione dei reagenti

A) Preparazione del tampone di dosaggio (per 100 dosaggi):

Aggiungere 30 μ L di β -Mercaptoetanololo a 10 mL di tampone di reazione (0.3% β -Mercaptoetanololo). Calcolare la concentrazione necessaria per ogni esperimento e preparare la soluzione di substrato fresca necessaria.

B) Preparazione della soluzione di lavoro FDG:

Preparare la soluzione di lavoro FDG aggiungendo 25 μ L di soluzione FDG a 5 mL di tampone di dosaggio.

C) Preparazione della soluzione di lavoro tampone di lisi:

Preparare la soluzione di lavoro tampone di lisi aggiungendo 5 μ L di β -Mercaptoetanololo in 5 mL di tampone di lisi.

Curva di calibrazione β -galattosidasi

Protocollo di dosaggio (piastra a 96 pozzetti)

1. Diluire la β -galattosidasi a 500 ng/mL nella soluzione di lavoro tampone di lisi (1:200).
2. Fare diluizioni seriali per ottenere la concentrazione di 166.66; 55.55; 18.52; 6.17; 2.06; 0.686 ng/mL e un controllo in bianco.
3. Aggiungere 50 μ L delle diluizioni seriali ai pozzetti di una piastra a 96 pozzetti.

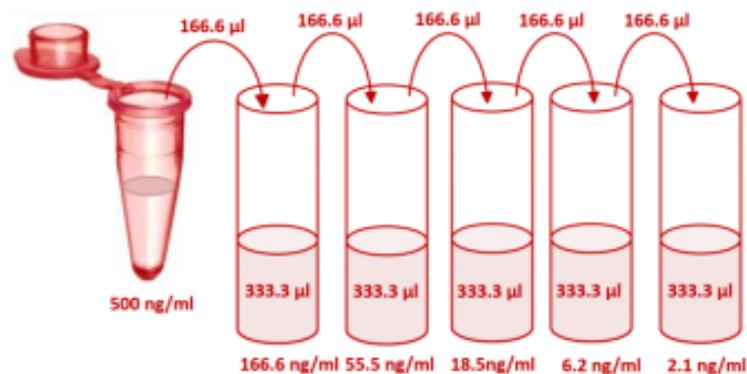


Figura 6.5 – Procedimento seguito per effettuare le sei diluizioni seriali

Preparazione dell'estratto cellulare

1. A) *Cellule aderenti*: aspirare il mezzo di crescita dalle cellule. Lavare le cellule con PBS.
B) *Cellule di sospensione*: far precipitare le cellule in un tubo da centrifuga e lavarle con PBS.
2. Aggiungere 50 μ L/pozzetto (50 μ L⁻² mL/tubo) di soluzione di lavoro tampone di lisi. Incubare a temperatura ambiente per 10 minuti per consentire la lisi cellulare. Procedere al protocollo di dosaggio o congelare il campione a -80 °C fino all'uso.

Protocollo di dosaggio

1. Trasferire 50 μ L di estratti cellulari contenenti la β -galattosidasi nel pozzetto corrispondente della piastra a 96 pozzetti. La quantità di estratto cellulare può essere regolata a seconda del livello di enzima nel campione.
2. Aggiungere 50 μ L di estratti cellulari senza la β -galattosidasi come bianco al suo pozzetto corrispondente.

3. Aggiungere 50 μL /pozzetto di soluzione di lavoro FDG in ciascun pozzetto. Agitare 30 secondi la piastra per omogeneizzare la reazione.
4. Incubare a 37 °C per 30 minuti - 4 ore in base al tipo di cellula. Tenere lontano dalla luce.
5. Aggiungere 50 μL di soluzione di arresto in ciascun pozzetto. Misurare la fluorescenza tramite fluorimetro a Ec/Em pari a 490/525 nm.

Tracciare la curva di calibrazione

Determinare la concentrazione del campione

1. Utilizzare il controllo bianco per eliminare il background. Misurare i campioni.
2. Estrapolare i dati della curva di calibrazione della β -galattosidasi per calcolare la concentrazione dell'enzima negli estratti cellulari.

Figura 6.6 - Curva di quantificazione per la β -galattosidasi

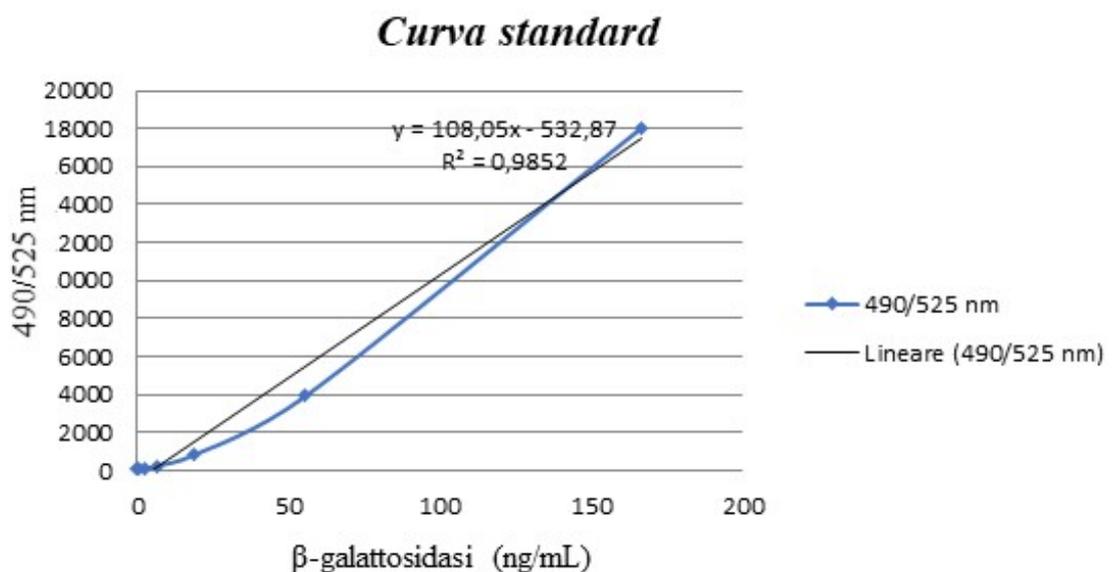


Tabella 6.2 Valori medi attività β -galattosidasica nei campioni dopo 8 ore di crescita

| β -gal (ng/ml) | | β -gal (ng/ml) | |
|-------------------------|-------|-------------------------|-------|
| Campioni | 8h | Campioni | 8h |
| C1 | 551 | C24 | 23837 |
| C2 | 1418 | C25 | 9687 |
| C3 | 1616 | C26 | 39354 |
| C5 | 44646 | C27 | 29750 |
| C6 | 683 | C28 | 537 |
| C8 | 612 | C30 | 29366 |
| C9 | 3343 | C31 | 517 |
| C10 | 1692 | C32 | 628 |
| C13 | 3822 | C33 | 13290 |
| C14 | 30066 | C34 | 2945 |
| C15 | 18420 | C35 | 50088 |
| C16 | 14734 | C36 | 9886 |
| C17 | 37231 | C37 | 11030 |
| C18 | 47465 | C41 | 38193 |
| C19 | 44451 | C42 | 45302 |
| C22 | 26349 | pos | 5241 |
| C23 | 29892 | neg | 630 |

Dalla tabella 6.2 è possibile osservare che i campioni che presentavano un maggiore contenuto di enzima erano: C5, C14, C17, C18, C19, C22, C23, C24, C26, C27, C30, C35, C41 e C42, i quali presentavano un quantitativo di enzima superiore ai 20×10^3 ng/mL. Tra questi, in particolare, il C5, C18, C19, C35 e C42 mostravano i valori più elevati.

6.6 Rapid PCR e sequenziamento dell'RNA 16s

Dei 43 Lattobacilli isolati dal colostro e dei controlli positivo e negativo è stato estratto il DNA utilizzando il Kit GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich).

Protocollo estrattivo

- Impostare il bagnomaria a 37 °C
- Esaminare i reagenti per la precipitazione. Se un reagente forma un precipitato, riscaldare a 55-65 °C finché il precipitato non si scioglie e raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso.

Preparare la soluzione di Lisozima

Sono richiesti 200 µL per campione, ad es. 25 campioni richiedono 5 mL di Lisozima:

45 mg di Lisozima per mL di soluzione di Lisi Gram-Positiva.

Nota: Preparare una soluzione extra per tenere conto dell'errore di pipettatura.

Preparare la soluzione di Proteinasi K

Sono richiesti 20 µL per campione ad es. 25 campioni richiedono 500 µL di soluzione di Proteinasi K

soluzione da 20 mg/mL

Nota: La soluzione di Proteinasi K può essere conservata per diversi giorni a 2-8 °C. Per la conservazione a lungo termine, la parte inutilizzata della soluzione può essere conservata in aliquote a -20 °C.

1. Far precipitare (pellet) 1.5 mL di coltura notturna di brodo batterico mediante centrifugazione per 2 minuti a 12,000-16,000 × g.
2. Risospendere il precipitato in 200 µL di soluzione di Lisozima e incubare per un'ora a 37 °C.

Impostare il bagnomaria a 55 °C

3. Aggiungere 20 µL di soluzione RNase A e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente.
4. Aggiungere 20 µL di soluzione di Proteinasi K, seguiti da 200 µL di soluzione di Lisi C.

Vorticare accuratamente (circa 15 secondi) e incubare a 55 °C per 10 minuti.

5. Aggiungere 500 μL della soluzione di preparazione della colonna a ciascuna colonna di legame. Centrifugare a $12,000 \times g$ per 1 minuto. Eliminare l'eluato.
6. Aggiungere 200 μL di Etanolo (95-100%) al lisato e mescolare accuratamente vortexando per 5-10 secondi.
7. Trasferire l'intero contenuto nella colonna di legame. Utilizzare una pipetta di trasferimento per ridurre il taglio del DNA. Centrifugare a $6500 \times g$ per 1 minuto. Eliminare il tubo di raccolta.
8. Aggiungere 500 μL di soluzione di lavaggio 1 (W0263) alla colonna e centrifugare per 1 minuto a $\geq 6500 \times g$. Eliminare il tubo di raccolta (facoltativo).
9. Aggiungere 500 μL di soluzione di lavaggio (B6553) alla colonna e centrifugare per 3 minuti alla velocità massima. Centrifugare la colonna per un ulteriore minuto alla massima velocità (se ci dovesse essere la presenza di etanolo residuo). Porre la colonna in un nuovo tubo di raccolta da 2 mL.
10. Pipettare 200 μL della soluzione di Etanolo (B6803) direttamente al centro della colonna e incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. Centrifugare per 1 minuto a $6500 \times g$ per eluire il DNA.

Opzionale: Il rendimento può essere migliorato del 20-50% eseguendo una seconda eluizione. Lasciare in frigo.

Successivamente all'estrazione del DNA è stata eseguita la rapid PCR.

È stata preparata una soluzione di 25 μL (12.5 μL di Biomix; 9.5 μL di acqua sterile; 1 μL di Primer universale e 2 μL di DNA) e utilizzato il seguente metodo:

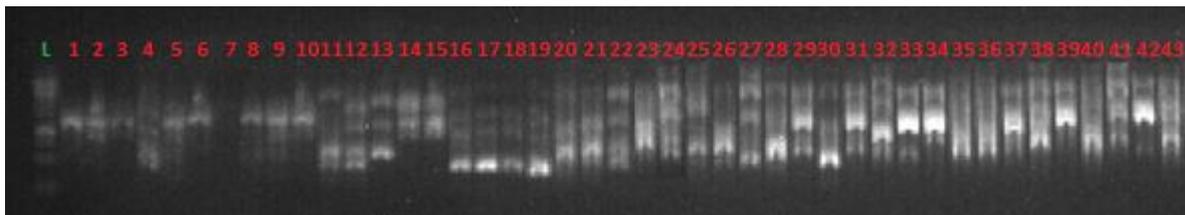
| | | |
|-------|--------|------------|
| 94 °C | 4 min | |
| 94 °C | 1 min | } 35 Cicli |
| 50 °C | 1 min | |
| 72 °C | 2 min | |
| 72 °C | 10 min | |
| 10 °C | hold | |

La preparazione del gel di agarosio all'1,5% (3,75g) in 250 mL di TAE è stata fatta aggiungendo 10 µL di SYBR (bromuro di etidio per visualizzare le bande).

5 µL di campione di soluzione di DNA sono stati aggiunti in ogni pozzetto insieme al “ladder” nel primo pozzetto. La cella è stata impostata a 80V, 400 A per 60 minuti.

Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato osservato all'UV a 800 nm.

Figura 6.7 – Elettroforesi di campioni di DNA estratti dai 43 ceppi isolati



La rapid PCR ha mostrato che molti dei ceppi isolati risultavano avere la stessa lunghezza del filamento di DNA, pertanto si è ipotizzato che questi fossero lo stesso ceppo batterico e per tale motivo si è proceduto alla selezione di 14 differenti ceppi per i quali si è amplificato il gene codificante per l'rRNA 16s.

I campioni selezionati sono stati i seguenti:

C1, C5, C9, C11, C14, C17, C20, C22, C24, C26, C33, C35, C37, C42.

Protocollo PCR

Nel dettaglio è stata preparata una soluzione di 25 µL (12.5 µL di Biomix; 9.5 µL di acqua sterile; 1 µL di primer F; 1 µL di primer R e 1 µL di DNA)

Sequenza primer F **AGAGTTTGATCCTGGCTCAG**

Per la PCR è stato utilizzato il seguente metodo:

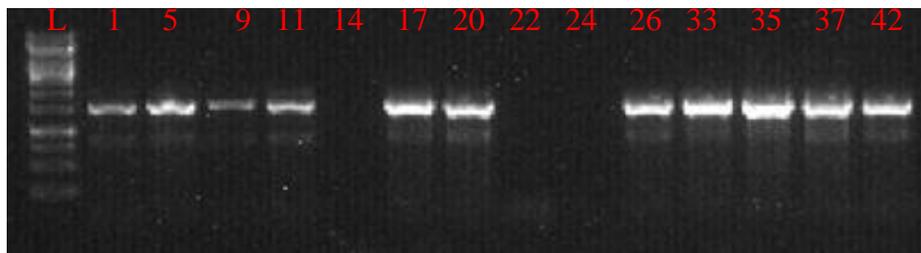
| | | |
|-------|-------------|------------|
| 94 °C | 4 min | |
| 94 °C | 20 sec | } 35 Cicli |
| 55 °C | 30 sec | |
| 72 °C | 1 min 30sec | |
| 72 °C | 10 min | |
| 10 °C | hold | |

Il gel di agarosio all'1% (1,2g) in 120 mL di TAE è stato preparato aggiungendo 4µL/100 mL di SYBR (bromuro di etidio per visualizzare le bande).

5 µL di campione di soluzione di DNA amplificato sono stati aggiunti in ogni pozzetto insieme al "ladder" nel primo pozzetto, impostando la cella a 80V, 400 A per 40 minuti.

Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato visualizzato all'UV a 800 nm.

Figura 6.8 – Elettroforesi dell'amplificato PCR dell'RNA16s



Dall'elettroforesi è stato osservato che i campioni C14, C22 e C24 non presentavano alcuna banda, pertanto si è proceduto alla clean PCR dei rimanenti 11 campioni, successivamente inviati per il sequenziamento.

Protocollo del GenElute PCR Clean-Up Kit

Apparecchiature e reagenti necessari:

Posizionare due racks/trays, uno con le colonne (*fase 1*) e uno con i tubi di raccolta (*fase 2*).

- 3 Campioni
- 4 GenElute plasmide mini colonne di rotazione (*fase 1*)
- 5 Tubi di raccolta per assemblare le colonne (*fase 1*)
- 6 Tubi di raccolta/eppies per miscelare la soluzione legante e il prodotto PCR (*fase 2*)
- 7 Tubi di raccolta per la conservazione del DNA dopo l'eluizione (*fase 5*)

Soluzione di preparazione su colonna (*fase 1*)

Soluzione di legame (*fase 2*)

Soluzione di lavaggio concentrata (*fase 3*)

Etanolo assoluto (*fase di preparazione*)

Soluzione di Eluizione (*fase 5*)

Preparazione:

- Miscelare accuratamente i reagenti.
- Se una qualsiasi forma di reagente precipita, riscaldare a 55-65 °C fino a quando il precipitato si scioglie e raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso.

Nota: conservare il kit a temperature ambiente.

Soluzione di lavaggio concentrata

Soluzione di lavaggio concentrata diluita con 48 mL di etanolo assoluto (100%) usando una pipetta di plastica da 10 mL.

Protocollo:

1. Assemblare le colonne in tubi di raccolta ed etichettarle.

Aggiungere 0.5 mL di soluzione di preparazione della colonna a ogni mini colonna di spin.

Centrifugare a $12,000 \times g$ per 1 minuto.

Eliminare l'eluato ma mantenere il tubo di raccolta.

Riporre la colonna di legame nel tubo di raccolta.

2. Aggiungere 5 volumi di soluzione di legame a un volume di reazione PCR (ad es. 500 μ L di soluzione di legame a 100 μ L di reazione PCR).

Trasferire il volume di soluzione di legame in tubi/eppies di raccolta vuoti ed etichettati.

Trasferire il volume del prodotto PCR in ciascun tubo di raccolta/eppie etichettato e mescolare.

Trasferire la soluzione in ciascuna delle colonne di legame etichettate.

Centrifugare a $16000 \times g$ per 1 minuto.

Eliminare l'eluato ma mantenere il tubo di raccolta.

Riporre la colonna di legame nel tubo di raccolta.

3. Aggiungere 0.5 mL di soluzione di lavaggio concentrata (diluita con etanolo prima del primo utilizzo) alla colonna.

Centrifugare a $16000 \times g$ per 1 minuto.

Eliminare l'eluato ma mantenere il tubo di raccolta.

Riporre la colonna di legame nel tubo di raccolta.

4. Centrifugare nuovamente a $16000 \times g$ per 2 minuti senza aggiunta di soluzione di lavaggio.

Eliminare l'eluato e il tubo di raccolta.

Posizionare la colonna di legame nei nuovi tubi di raccolta

5. Aggiungere 50 μ L di soluzione di eluizione al centro di ciascuna colonna.

Incubare a temperatura ambiente per 1 minuto.

6. Per eluire il DNA, centrifugare a $16000 \times g$ per 1 minuto.

Il prodotto di amplificazione PCR è ora presente nell'eluato ed è pronto per l'uso immediato o lo stoccaggio a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

In seguito al sequenziamento del gene codificante per l'RNA16s dei ceppi selezionati è stata identificata la tassonomia utilizzando il supporto informatico <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

Lattobacilli sequenziati

| | |
|-----|------------------------|
| C1 | <i>L. Amylovorus</i> |
| C5 | <i>L. Amylovorus</i> |
| C9 | <i>L. Amylovorus</i> |
| C11 | <i>L. Paracasei</i> |
| C17 | <i>L. Parabuchneri</i> |
| C20 | <i>L. Paracasei</i> |
| C26 | <i>L. Parabuchneri</i> |
| C33 | <i>L. Parabuchneri</i> |
| C35 | <i>L. Reuteri</i> |
| C37 | <i>L. Reuteri</i> |
| C42 | <i>L. Parabuchneri</i> |

6.7 Studio del comportamento dei lattobacilli nel latte

La crescita dei Lattobacilli sopra sequenziati è stata studiata impegnando i ceppi C5, C17, C26, C33, C35, C37, C42, controlli positivo e negativo, inoculando i batteri sia

nel latte UHT che nel latte in polvere e verificando la variazione del pH, dell'acidità e della crescita mediante la tecnica della microdrop dal tempo 0 fino a 6h a intervalli di 2 ore e dopo 24h.

In un primo momento dallo stock sono stati attivati i ceppi isolati C5, C17, C26, C35, controlli positivo e negativo e posti in brodo di coltura in doppio. Dopo 24h è stato effettuato un secondo brodo degli stessi (in doppio) e dopo altre 24h sono stati prelevati 2 mL da ciascun brodo e centrifugati per 5 min a 10000 rpm a 4 °C. Successivamente è stato rimosso il surnatante e lavato il pellet con 1 mL di PBS e ricentrifugato. È stato sospeso nuovamente il pellet in 1 mL di PBS, misurato l'OD e calcolato il quantitativo di cellule da inoculare in 60 mL di latte.

6.7.1 Quantità di cellule messa in 60 mL di latte

5 mL del secondo brodo sono stati centrifugati. Il pellet è stato lavato in 1 mL di PBS e poi risospeso in 1 mL di PBS. Si è misurato l'OD₆₀₀ eseguendo una diluizione 1 a 100.

| <i>Campioni</i> | <i>OD₆₀₀</i> |
|-----------------|-------------------------|
| C5 | 18 |
| C17 | 6 |
| C26 | 5 |
| C35 | 16 |
| Pos | 18 |
| Neg | 7 |

Tabella 6.4 - Lettura OD600

È stata calcolata la quantità batterica da inoculare in 60 mL di latte per ciascun campione facendo riferimento alla formula $C1 * V1 = C2 * V2$ considerando come V1 il valore 0,05.

| <i>Campioni</i> | <i>μL</i> |
|-----------------|-----------|
| C5 | 171,57 |
| C17 | 500 |
| C26 | 675 |
| C35 | 193,75 |
| Pos | 171,57 |
| Neg | 464,285 |

Tabella 6.5 - Quantità batterica da inoculare in 60mL di latte

Sono stati rilevati i valori di pH, e acidità (acido lattico e °Dornic) nei tempi 0, 2h, 4h, 6h e 24h.

Figura 6.9 – Valori di pH durante la shelf-life

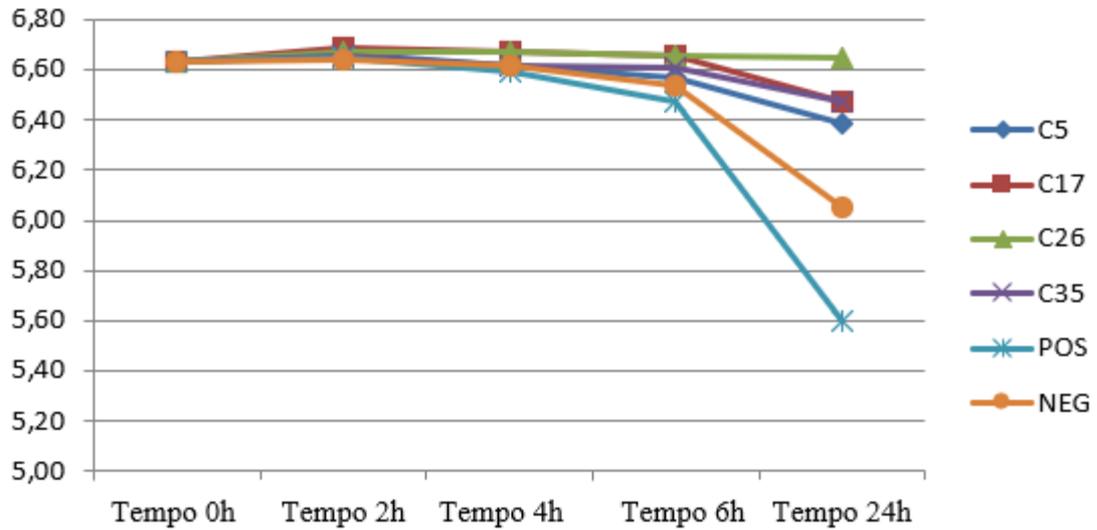


Figura 6.10 – Acidità misurata in termini di acido lattico (LA)

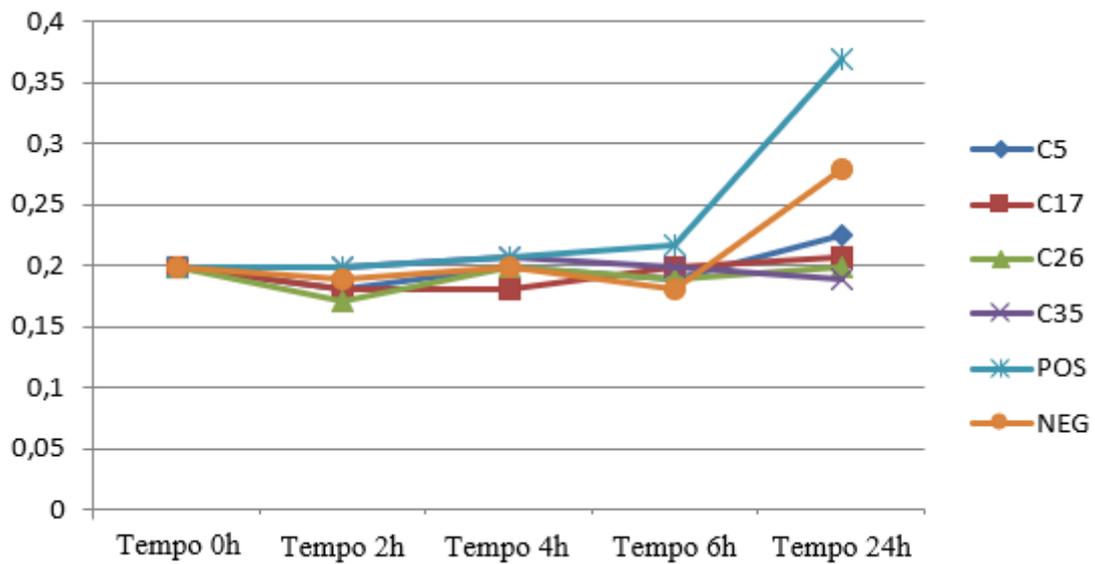
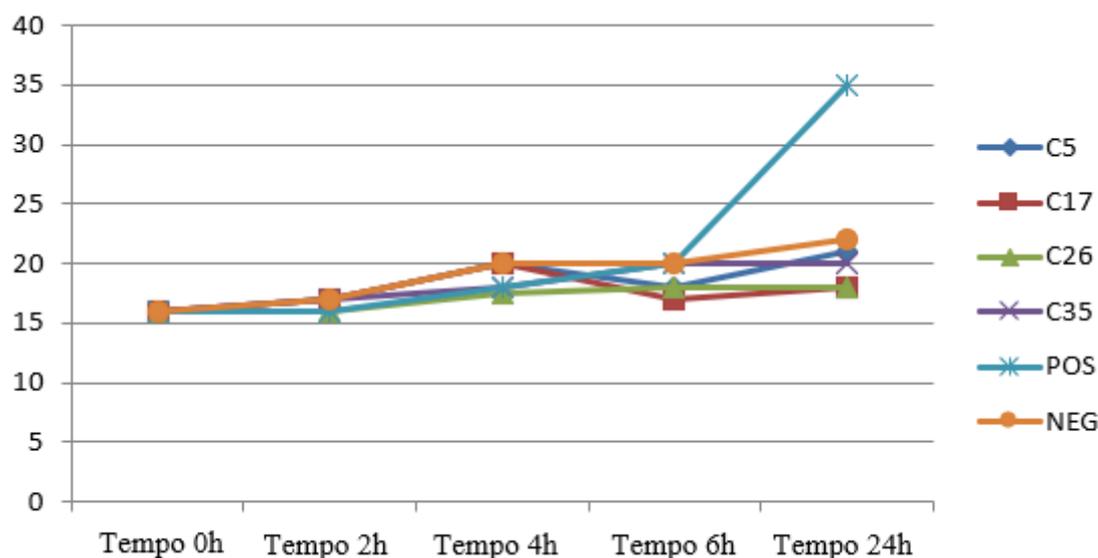
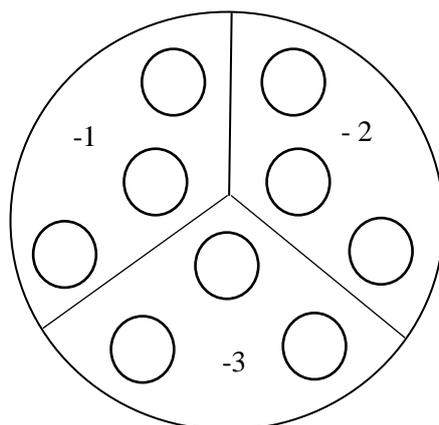


Figura 6.11 – Acidità misurata in °Dornic



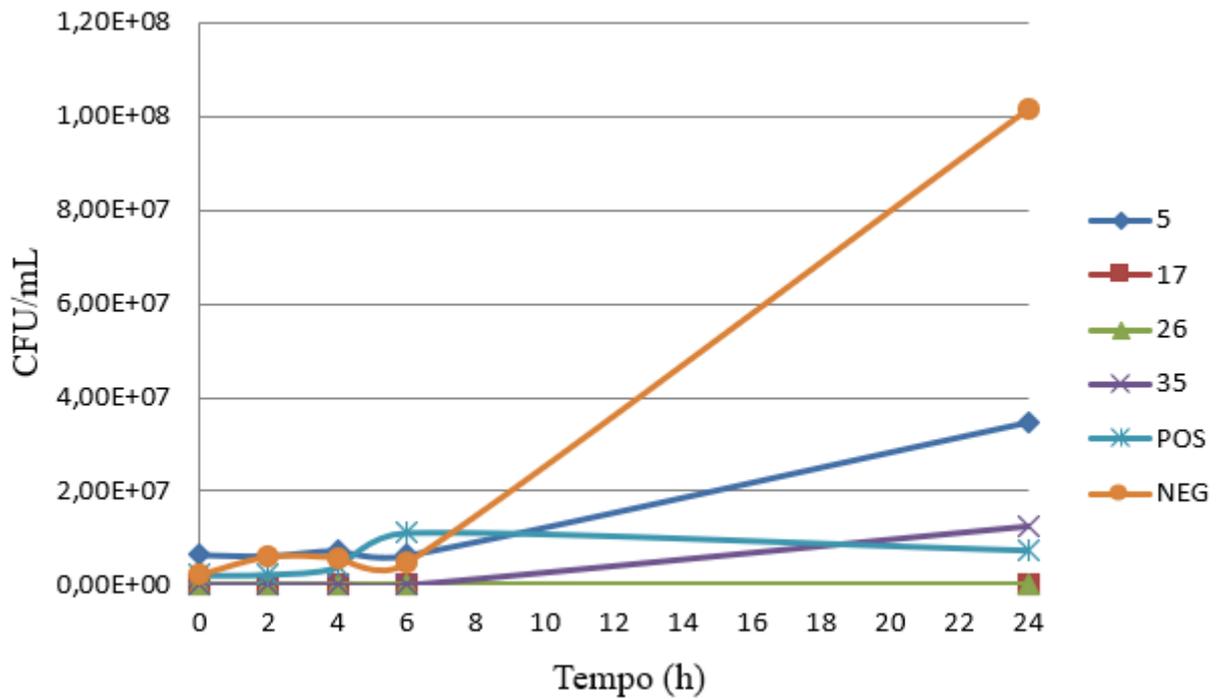
Per quanto riguarda il pH, i batteri non determinavano nessun effetto su questo parametro fino a 4 ore per poi mostrare una diminuzione significativa a partire dalla sesta ora di inoculo. In particolare sia il controllo positivo che negativo mostravano un potere acidificante maggiore rispetto ai ceppi selezionati. Tra questi il C5 (*L. amylovorus*) ha determinato un abbassamento di pH maggiore rispetto agli altri. Stesso comportamento si è osservato per l'acidità espressa in acido lattico. Al fine di valutare la crescita batterica dei ceppi isolati di lattobacilli ai diversi tempi sono state piastrate in terreno mMRS diluizioni decrescenti per ciascun ceppo. Per la semina è stata utilizzata la tecnica nanodrop mettendo 3 gocce da 20 μL in una piastra divisa in 3 (Figura 6.12), ciascuna con una diluizione decrescente 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

Figura 6.12 Disegno per semina diluizioni in piastra Petri



Le piastre sono state messe in stufa a 37 °C e la conta è stata fatta dopo 24h.

Figura 6.13 – Risultati crescita batterica



Come è possibile evincere dal grafico, il controllo negativo ha avuto una crescita superiore rispetto agli altri ceppi dopo 24h seguito dai ceppi C5 e C35.

LINEE DI RICERCA 2

PRODUZIONE DI FORMAGGIO PROBIOTICO A RIDOTTO CONTENUTO DI LATTOSIO

7.1 Processo produttivo di formaggio fresco probiotico a ridotto contenuto di lattosio mediante l'impiego di lattobacilli ad attività β -galattosidasica

Sulla base dei risultati delle analisi precedenti sono stati selezionati i ceppi isolati C5 e C35 come migliori candidati per la produzione di un formaggio a basso contenuto di lattosio. Il ceppo C5 è un *Lactobacillus Amylovorus* mentre il ceppo C35 è un *Lactobacillus Reuteri*. Entrambi i ceppi sono noti per avere attività probiotica. Inoltre producono delle batteriocine, rispettivamente amilovorina e reuterina che, come è noto, agiscono contro numerosi batteri patogeni sia gram positivi che gram negativi.

Tra i lattobacilli selezionati, il C5, produceva una batteriocina identificata al MALDI/TOF figura 7.1 e 7.2 la cui attività è risultata efficace nei confronti di *Lactobacillus Bulgaricus* come mostrato in figura 7.3, tuttavia non aveva alcuni effetti nei confronti di *Lactococcus Lactis* e *Listeria Innocua* per cui si è pensato fosse una nuova batteriocina diversa dall'amilovorina prodotta da questo ceppo batterico.

Lactobacillus Amylovorus è un membro del microbiota benefico presente nel tratto gastrointestinale del maiale; è una specie abbondante di lattobacillo che ha mostrato diverse potenziali proprietà probiotiche, come l'attività antimicrobica contro gli agenti patogeni enterici, sia in prove in vitro che in vivo. Presenta caratteristiche tipiche delle specie omofermentative dei lattobacilli, come la produzione di grandi quantità di acido lattico e piccole quantità di acido acetico ma nessun gas dal glucosio; non presenta attività di ossidasi, catalasi o riduzione dei nitrati ed è membro del gruppo di *L. acidophilus*.

Figura 7.1 – Batteriocina di *L. Amilovor* identificata secondo il metodo MALDI/TOF
Lactobacillus Amylovorus (C5)

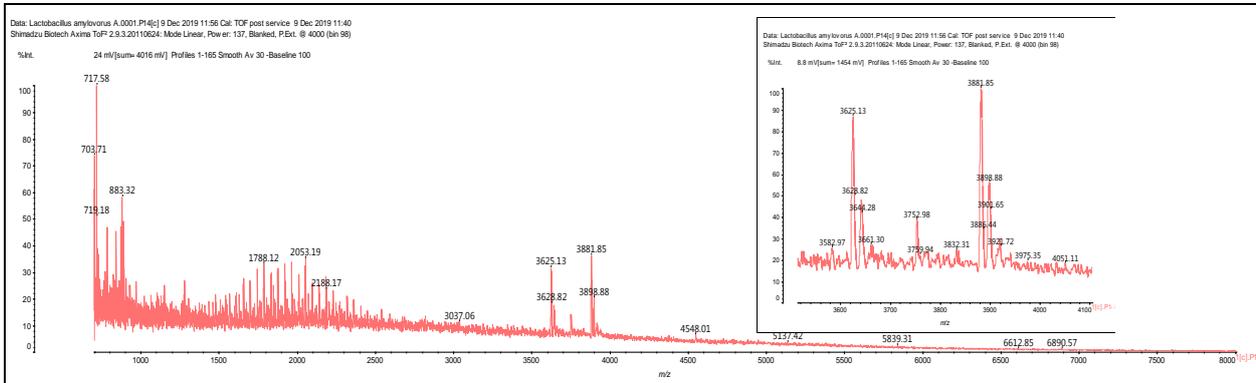


Figura 7.2 - Batteriocina di *L. Amilovor* identificata secondo il metodo MALDI/TOF

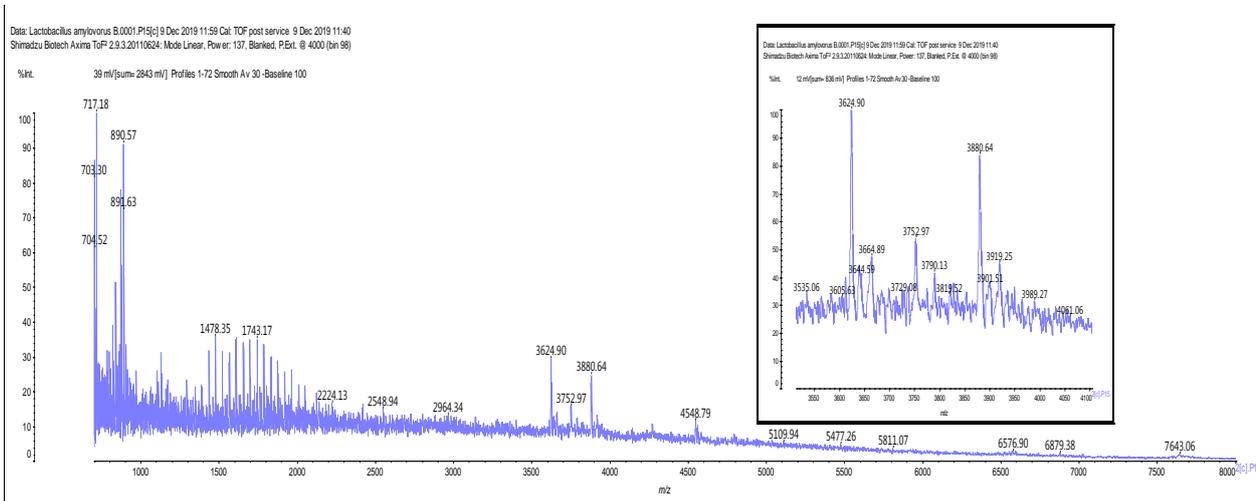
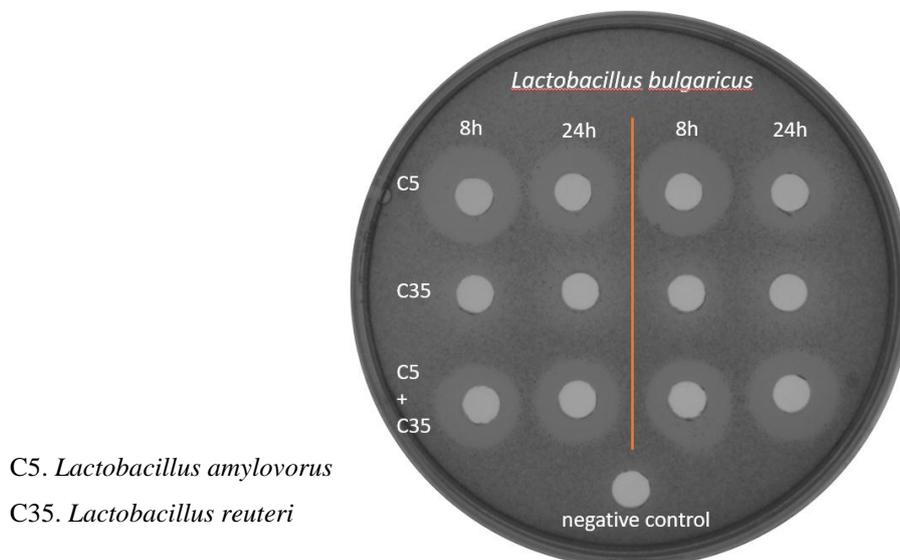


Figura 7.3 -Attività batteriocina prodotta da *L. Amilovor* nei confronti di *L. Bulgaricus*



C5. *Lactobacillus amylovorus*

C35. *Lactobacillus reuteri*

Per la produzione del formaggio si è stabilito di fare un formaggio fresco con elevato contenuto di umidità, usando come modello il Minas frescal cheese, un formaggio tipico della regione Minas Gerais in Brasile. Per la produzione di tale formaggio è stato usato latte intero pastorizzato con 3% di grassi e una coltura starter R604 (*Lactococcus lactis*, *lactis* e *Lactococcus lactis cremoris*) all'1% (Chr. Hansen, Cork, Irlanda). Come caglio liquido è stata usata la chimosina (CHY-MAX[®] plus, Chr. Hansen, Cork, Irlanda). I batteri selezionati (C5 e C35) sono stati impiegati come co-colture insieme agli starter.

Pertanto sono stati preparati 4 formaggi come segue:

- 1) starter
- 2) starter + C5
- 3) starter + C35
- 4) starter + C5 + C35

Per la produzione dei formaggi è stato utilizzato il latte raccolto dalla mungitura della sera e della mattina proveniente dalle stesse bovine. Successivamente pastorizzato, standardizzato e avviato alla caseificazione. Ciascuna produzione è stata fatta in triplo.

7.2 Preparazione della coltura starter da utilizzare come inoculo nel formaggio

I ceppi C5 e C35 sono stati riattivati dallo stock mettendoli in coltura in terreno liquido mMRS per 24h in anaerobiosi a 37 °C. Il giorno successivo è stato misurato il pH dei 2 terreni che è risultato 4,06 per il terreno contenente il ceppo C5 e 4,30 per il terreno con il ceppo C35. A questo punto sono stati inoculati 500 µL di brodo in 50 mL di latte (1%) a 37 °C. Sempre dai terreni liquidi sono stati piastrati 10 µL in mMRS agar per verificare la purezza delle colonie dello stock.

Del latte inoculato il giorno precedente sono state fatte le diluizioni in PBS per la conta microbica. Nel dettaglio 900 µL di PBS venivano versati in eppendorf da 1,5 mL e aggiunti in serie 100 µL di campione partendo dal latte e così via ottenendo le

diluizioni 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . A questo punto sono stati piastrati in terreno agar mMRS le diluizioni 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} .

Concentrazione dei batteri nel latte

| | |
|-----|------------------------------|
| C35 | 2.18×10^{-8} UFC/mL |
| C5 | 7.14×10^{-7} UFC/mL |

Al fine di verificare la crescita dei batteri selezionati nel latte si è proceduto a misurare anche il pH dei campioni ottenendo i seguenti risultati:

| | |
|------------------|------|
| Latte in polvere | 6,37 |
| Latte con C5 | 6,00 |
| Latte con C35 | 5,78 |

Per rendere più vitali i batteri sono stati prelevati 500 μ L dalla coltura precedente e posti in 50 mL di nuovo latte in polvere rinfrescando così la coltura madre. Il giorno successivo 1 mL del latte precedente è stato messo in 50 mL di latte ricostituito.

Due giorni prima della preparazione del formaggio è stata creata una coltura madre della starter allo 0,1% pesando 0,1 g di starter colture R604 proveniente dalla ditta Chr. Hansen (*Lactococcus lactis lactis* + *Lactococcus lactis cremoris*) e aggiungendoli in 100 mL di latte in polvere ricostituito (al 12%). Il giorno successivo 3 mL della coltura madre sono stati aggiunti in 300 mL di RSM per poi impiegarli nella preparazione del formaggio.

7.3 Preparazione dei formaggi freschi

70 L di latte vaccino sono stati raccolti presso la fattoria del Teagasc Moorepark (Irlanda) e trasportati alla BFE (BioFunctional Food Engineering) per la standardizzazione al 3 % di grassi e la pastorizzazione a 75 °C per 15 sec.

La composizione del latte crudo, centrifugato e pastorizzato è stata analizzata utilizzando uno spettrofotometro a infrarossi trasformata Fourier (MilkoScan FT 120, Foss Electric, Hillerod, Danimarca).

Tabella 7.1 - Composizione media grezza del latte pre e post-pastorizzazione

| | <i>Lipidi</i> | <i>Tru. Prot.</i> | <i>Tot. Prot</i> | <i>Caseine</i> | <i>Lattosio</i> |
|----------------------------|---------------|-----------------------|----------------------|----------------|-----------------|
| <i>Prepastorizzazione</i> | 5.19 | 4.07 | 4.30 | 3.28 | 4.34 |
| <i>Postpastorizzazione</i> | 3.21 | 4.16 | 4.40 | 3.34 | 4.44 |

Per la produzione del formaggio fresco sono stati pesati 7,5 kg di latte pastorizzato e versati in 4 caldaie secondo il seguente schema:

VAT1 controllo

VAT2 C5

VAT3 C35

VAT4 C5+C35

Tabella 7.2 – Protocollo utilizzato per la preparazione dei formaggi

| VAT 1 <i>Controllo</i> | VAT2 <i>C5 1%</i> | VAT 3 <i>C35 1%</i> | VAT 4 <i>C5 0.5% + C35 0.5%</i> |
|--|--|---|---|
| 7.5 L latte pastorizzato al 3 % di grasso | 7.5 L latte pastorizzato al 3 % di grasso | 7.5 L latte pastorizzato al 3 % di grasso | 7.5 L latte pastorizzato al 3 % di grasso |
| Riscaldare il latte a 35-37 °C | Riscaldare il latte a 35-37 °C | Riscaldare il latte a 35-37 °C | Riscaldare il latte a 35-37 °C |
| Aggiungere 1% di coltura lattica mesofila omofermentativa di tipo O (R-604, Chr. Hansen) | Aggiungere 1% di coltura lattica mesofila omofermentativa di tipo O (R-604, Chr. Hansen) + 1% C5 | Aggiungere 1% di coltura lattica mesofila omofermentativa di tipo O (R-604, Chr. Hansen) + 1% C35 | Aggiungere 1% di coltura lattica mesofila omofermentativa di tipo O (R-604, Chr. Hansen) + 0.5% C5 + 0.5% C35 |
| Attendere fino a raggiungere un valore di circa 20-22 °D | Attendere fino a raggiungere un valore di circa 20-22 °D | Attendere fino a raggiungere un valore di circa 20-22 °D | Attendere fino a raggiungere un valore di circa 20-22 °D |
| Aggiungere 4.4 mL di soluzione al 34% di CaCl ₂ | Aggiungere 4.4 mL di soluzione al 34% di CaCl ₂ | Aggiungere 4.4 mL di soluzione al 34% di CaCl ₂ | Aggiungere 4.4 mL di soluzione al 34% di CaCl ₂ |
| Aggiungere il caglio (1.5 mL di Chimax Max Plus- Chr. Hansen) | Aggiungere il caglio (1.5 mL di Chimax Max Plus- Chr. Hansen) | Aggiungere il caglio (1.5 mL di Chimax Max Plus- Chr. Hansen) | Aggiungere il caglio (1.5 mL di Chimax Max Plus- Chr. Hansen) |
| Attendere 40 min fino alla coagulazione | Attendere 40 min fino alla coagulazione | Attendere 40 min fino alla coagulazione | Attendere 40 min fino alla coagulazione |

| | | | |
|--|--|--|--|
| Tagliare delicatamente e mescolare la cagliata per 1 minuto, lasciare per 3 minuti e mescolare nuovamente per 5 minuti | Tagliare delicatamente e mescolare la cagliata per 1 minuto, lasciare per 3 minuti e mescolare nuovamente per 5 minuti | Tagliare delicatamente e mescolare la cagliata per 1 minuto, lasciare per 3 minuti e mescolare nuovamente per 5 minuti | Tagliare delicatamente e mescolare la cagliata per 1 minuto, lasciare per 3 minuti e mescolare nuovamente per 5 minuti |
| Drenare 3L di siero di latte |
| Aggiungere 1,5% di NaCl considerando 4,5L di latte (67,5g) e mescolare per 2 minuti | Aggiungere 1,5% di NaCl considerando 4,5L di latte (67,5g) e mescolare per 2 minuti | Aggiungere 1,5% di NaCl considerando 4,5L di latte (67,5g) e mescolare per 2 minuti | Aggiungere 1,5% di NaCl considerando 4,5L di latte (67,5g) e mescolare per 2 minuti |
| Porre la cagliata in contenitori circolari forati |
| Girare il formaggio nello stampo dopo 30 minuti per due volte | Girare il formaggio nello stampo dopo 30 minuti per due volte | Girare il formaggio nello stampo dopo 30 minuti per due volte | Girare il formaggio nello stampo dopo 30 minuti per due volte |
| Mettere nella cella frigorifero a + 6 °C fino al giorno successivo | Mettere nella cella frigorifero a + 6 °C fino al giorno successivo | Mettere nella cella frigorifero a + 6 °C fino al giorno successivo | Mettere nella cella frigorifero a + 6 °C fino al giorno successivo |
| Tagliare ogni formaggio in 3 parti e confezionarlo sottovuoto | Tagliare ogni formaggio in 3 parti e confezionarlo sottovuoto | Tagliare ogni formaggio in 3 parti e confezionarlo sottovuoto | Tagliare ogni formaggio in 3 parti e confezionarlo sottovuoto |

Tabella 7.3 - Valori di pH e acidità del latte monitorati durante la caseificazione

| | <i>Vat 1</i> <i>Controllo</i> | <i>Vat 2</i> <i>C5</i> | <i>Vat 3</i> <i>C35</i> | <i>Vat 4</i> <i>C5 + C35</i> |
|--|----------------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>Condizioni di partenza latte</i> | | | | |
| pH | 6.68 | 6.69 | 6.69 | 6.68 |
| Acidità* | 19 | 19 | 19 | 19 |
| <i>Dopo 1h aggiunta della coltura starter</i> | | | | |
| pH | 6.59 | 6.56 | 6.53 | 6.54 |
| Acidità | 20.3 | 20.3 | 20 | 20.2 |
| <i>Dopo 2h aggiunta della coltura starter</i> | | | | |
| pH | 6.54 | 6.49 | 6.47 | 6.47 |
| Acidità | 21.2 | 21.7 | 22.2 | 21.7 |
| <i>Dopo il taglio della cagliata</i> | | | | |
| pH | 6.32 | 6.34 | 6.35 | 6.35 |
| Acidità | 13 | 15 | 13 | 13.7 |

*Acidità espressa in °D.

Raggiunta la temperatura di 37 °C per il latte è stata inoculata la coltura starter all'1% in tutte le caldaie. Nella VAT 2 è stato aggiunto l'1% di C5, nella vat 3 l'1% di C35 e nella vat 4 la combinazione formata da 0,5% di C5 e 0,5% di C35.

Dopo 2 ore sono stati aggiunti 4,4 mL di cloruro di calcio (soluzione 34%) e 15 mL di soluzione contenente il 10% di caglio (1,5 mL), agitato per 3 minuti e fatto riposare per 40 minuti. Successivamente è stato effettuato il taglio della cagliata ed eliminato circa il 50% di siero e aggiunto l'1,5% di sale (67,5g) rispetto al peso iniziale del latte tolto il siero (7,5 Kg – 3Kg di siero = 4,5Kg).

Una volta aggiunto il sale la cagliata è stata miscelata delicatamente per 3 minuti e successivamente è stato rimosso il siero residuo e messa la cagliata in forme da circa 1 kg, girando il formaggio per 2 volte ad intervalli di 30 minuti. Successivamente il formaggio ottenuto è stato posto in cella frigorifera a +6 °C a drenare per tutta la notte.

Il giorno successivo ciascuna forma è stata tagliata in 3 parti e ciascuna parte è stata confezionata in buste di plastica sotto vuoto e poste in cella a +6 °C fino alle successive analisi.

Per ciascuna tipologia di formaggio sono state effettuate le seguenti analisi:

a 2,7,14,21 e 28 giorni

8 Conta microbica dei lattobacilli e lattococchi su terreni MRS e LM17 e conta microbica totale su PCA

9 pH

10 Acidità titolabile

a 2 e 28 giorni

11 Contenuto in sale

12 Contenuto proteico

13 Contenuto lipidico

14 Umidità

a 14 e 28 giorni

15 Texture

a 2, 14 e 28 giorni

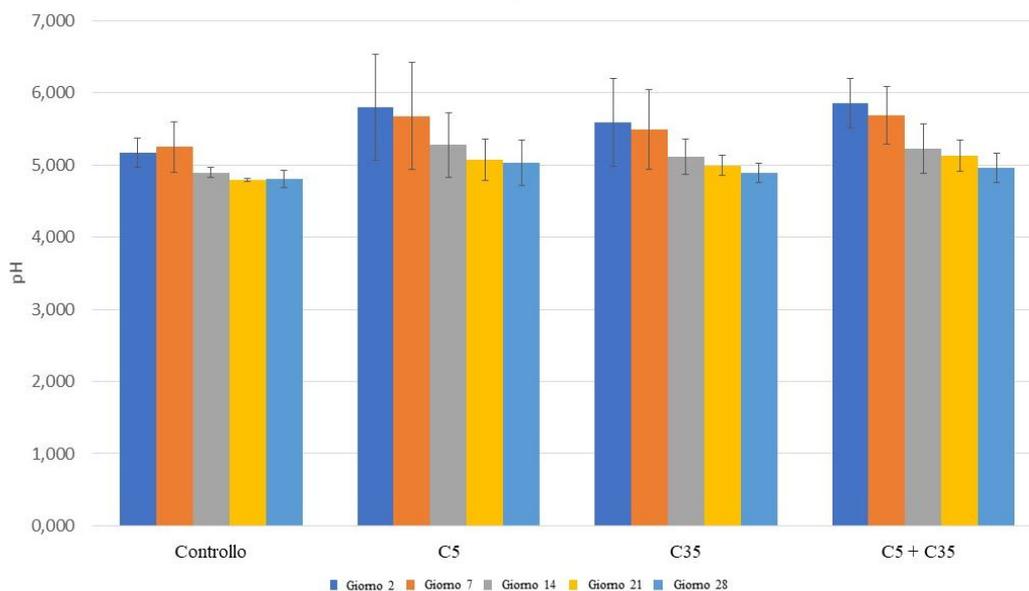
16 Contenuto lattosio e glucosio

7.4 Caratteristiche dei formaggi sperimentali probiotici a ridotto contenuto di lattosio

7.4.1 Determinazione del pH

La determinazione del pH dei campioni di formaggio è stata effettuata con un misuratore portatile di pH HQ11D (HACH) inserendo direttamente l'elettrodo di gel in tre parti diverse di ciascun formaggio.

Figura 7.4 – Valori di pH ottenuti durante la shelf-life dei formaggi freschi



I risultati ottenuti mostrano una progressiva riduzione del pH durante la shelf-life dei formaggi freschi ottenuti, da un pH di circa 5,8 a un pH di circa 4,9, dal secondo giorno di produzione fino al ventottesimo. In particolare, l'andamento risulta omogeneo e simile tra i ceppi selezionati e la combinazione degli stessi.

7.4.2 Acidità

L'acidità titolabile espressa in percentuale di acido lattico è stata determinata secondo il metodo ufficiale AOAC (1995) mediante titolazione con NaOH (0,1N) utilizzando come indicatore la fenoftaleina (1% p/v in etanolo).

Nei grafici sottostanti è mostrato l'andamento dell'acidità nelle quattro tipologie di formaggi prodotti. Come è possibile osservare nelle Figure 7.5 e 7.6 l'acidità aumentava durante la shelf-life in tutti i campioni, tuttavia questo incremento risultava essere meno pronunciato per i campioni di formaggio nei quali è stato aggiunto il ceppo C5, sia da solo che in combinazione con il C35, mentre sia il controllo che il C35 mostravano un profilo simile con un incremento dell'acidità maggiore.

Figura 7.5 – Acidità mostrata nei 4 diversi campioni di formaggio fresco

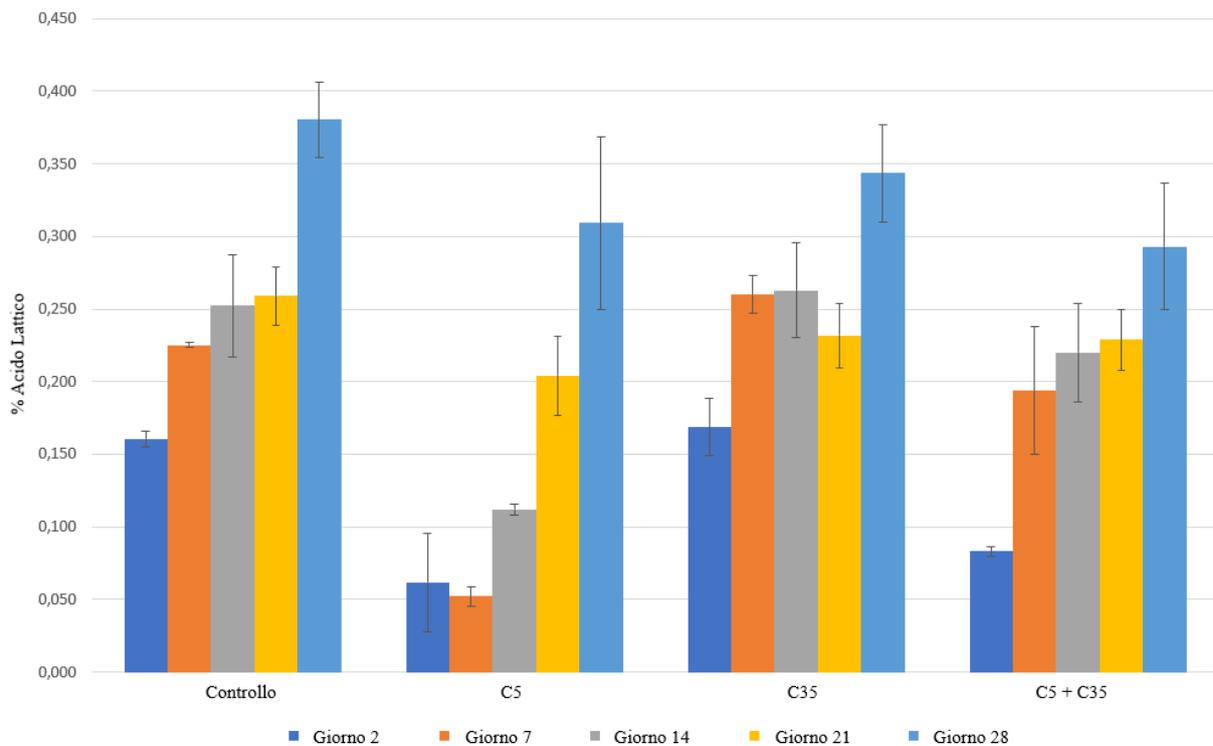
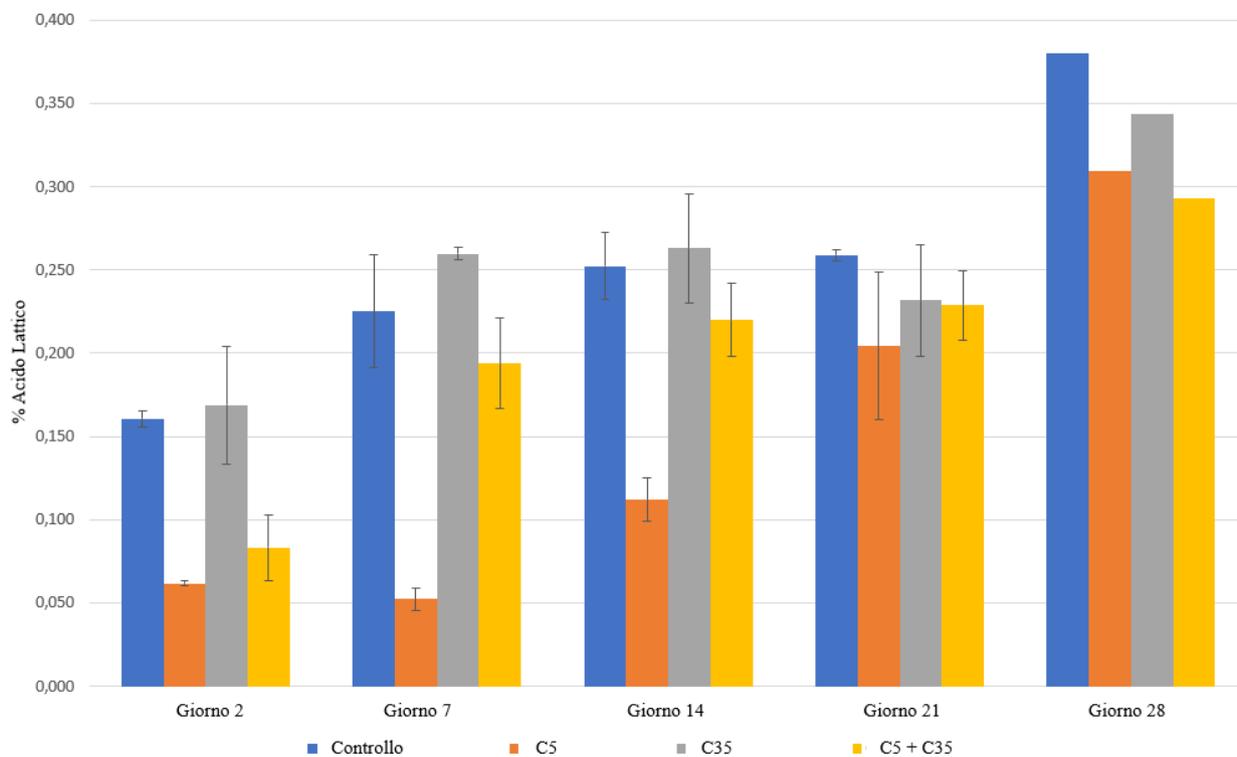


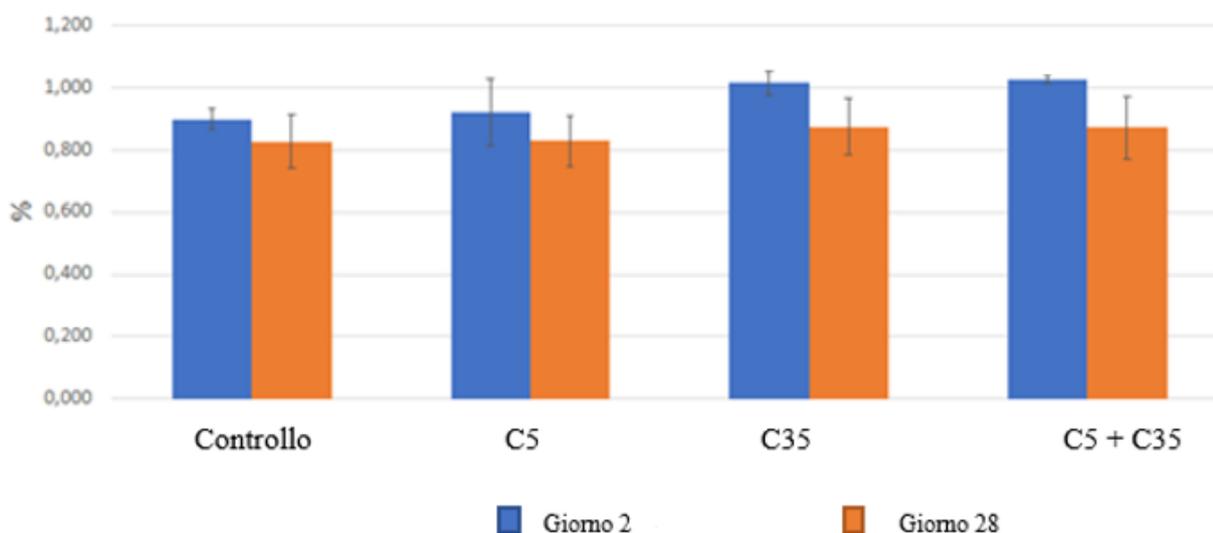
Figura 7.6 – variazioni di acidità mostrate durante la shelf-life



7.4.3 Contenuto in sale

Il tenore di sale è stato determinato secondo metodo ufficiale ISO 5943:2006 (E)/ FIL 88:2006(E). Come è possibile osservare dalla figura 7.7 il contenuto in sale è simile in tutte le tipologie di formaggio con una riduzione del suo contenuto alla fine della shelf-life senza mostrare differenze significative tra le varie tesi.

Figura 7.7 – Contenuto il sale



7.4.4 Umidità, Contenuto Lipidico e Proteico

L'umidità e il contenuto di grassi sono stati determinati utilizzando il metodo sviluppato da Gary Cart Wright et al. (2005) utilizzando un Smart Trac CEM, mentre il contenuto proteico è stato determinato utilizzando il metodo ufficiale Kjeldahl (AOAC International, 2002). Per quanto riguarda l'umidità (Figura 7.8) non si è osservata alcuna differenza significativa tra i vari formaggi prodotti né alcuna variazione durante la loro shelf-life. Per quanto attiene il contenuto lipidico (Figura 7.9) questo risultava superiore nel formaggio controllo rispetto ai nei formaggi addizionati dei lattobacilli a 2 giorni dalla produzione, senza mostrare variazioni statisticamente significative durante la shelf-life. Per quanto attiene il contenuto

proteico (Figura 7.10) questo risultava essere inferiore nei formaggi addizionati dei lattobacilli rispetto al controllo, in particolar modo in quelli addizionati del C35 sia in unicità che in combinazione del C5. Il contenuto proteico in ogni caso diminuiva in ugual misura in tutti i formaggi alla fine della shelf-life, ancora una volta in misura maggiore nel formaggio con aggiunta del C35. Questo comportamento è probabilmente dovuto ad una possibile maggiore attività proteolitica di questo ceppo batterico.

Figura 7.8 – Umidità misurata ad inizio e fine shelf-life dei formaggi freschi

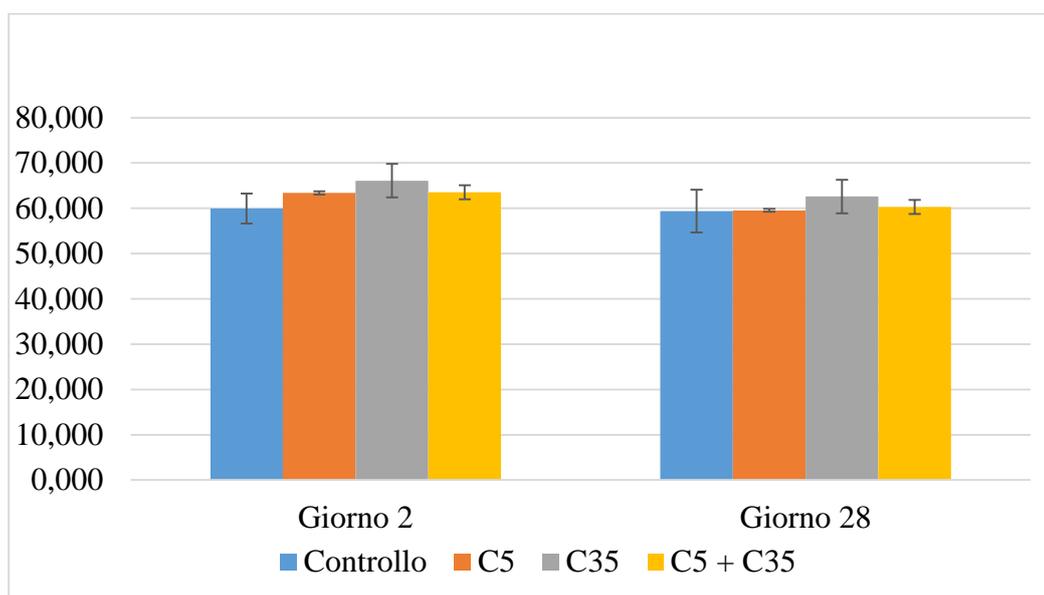


Figura 7.9 – Contenuto lipidico formaggi

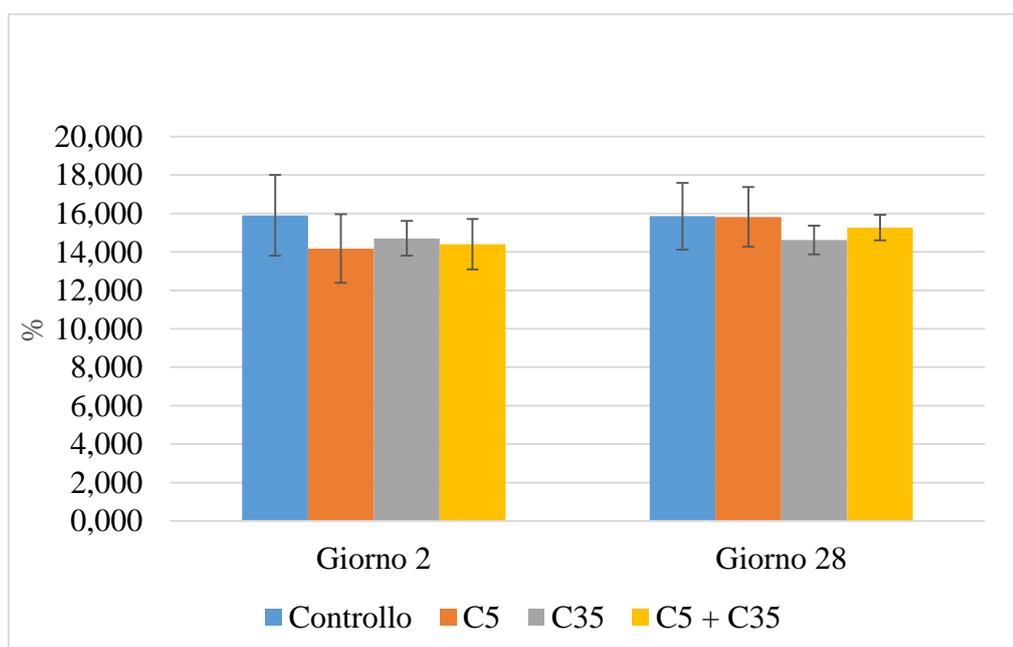
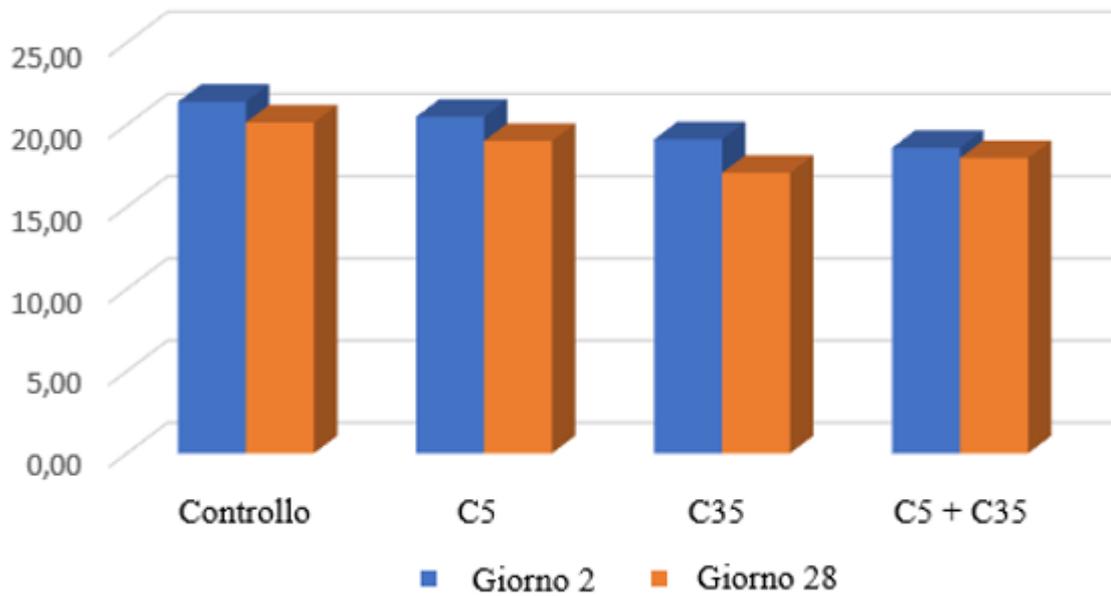


Figura 7.10 – Contenuto proteico formaggi



7.4.5 Texture

La texture è stata analizzata mediante un analizzatore di Texture TAHDI (Stable Micro Systems, Goldalming, Surrey, UK), dotato di una piastra di compressione di 70 mm (diametro) e di una cella di carico di 100 kg. Ciascun formaggio è stato tagliato ottenendo 6 campioni a forma cilindrica dell'altezza di 2 cm (25 mm^3) utilizzando un Cheese Blocker (Bos Kaasgreedschap, Bodengraven, le Netherlands), avvolto in carta stagnola, e conservato per una notte a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Il giorno seguente i campioni di formaggio ($\sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$) sono stati compressi al 40% della loro altezza originale in 2 momenti consecutivi ad una velocità di 60 mm/min (Henneberry et al., 2015). I parametri dell'analizzatore del profilo di texture sono stati calcolati come precedentemente descritto da Chevanan et al. (2006). Nelle figure sottostanti sono riportati i risultati delle analisi della texture eseguite a 14 e 28 giorni, in cui sono stati misurati i seguenti parametri: durezza, adesività, resilienza, coesione, elasticità, gommosità e masticabilità. Dal confronto tra i campioni di formaggio a 14 giorni emergono sostanziali differenze a carico della durezza, gommosità e masticabilità tra le diverse tesi. In particolar modo questi parametri erano di gran lunga superiori nei formaggi in cui era stato addizionato il ceppo batterico C5, mentre un valore inferiore

nel formaggio di controllo. Al termine della shelf-life di 28 giorni queste differenze si assottigliavano tra il formaggio di controllo e la tesi C5 mentre continuavano a persistere per le restanti due tipologie di formaggio. Inoltre alla fine della shelf-life si osservava anche una differenza significativa per la resilienza che risultava superiore nei formaggi controllo e C5 rispetto agli altri 2.

Figura 7.11 - Analisi della texture dopo 14 giorni

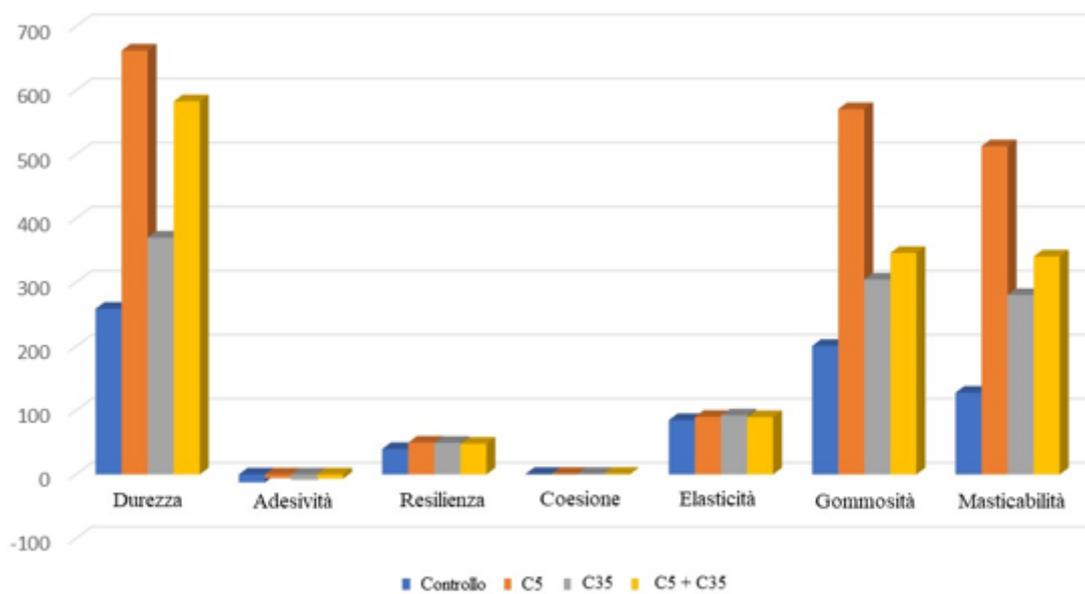
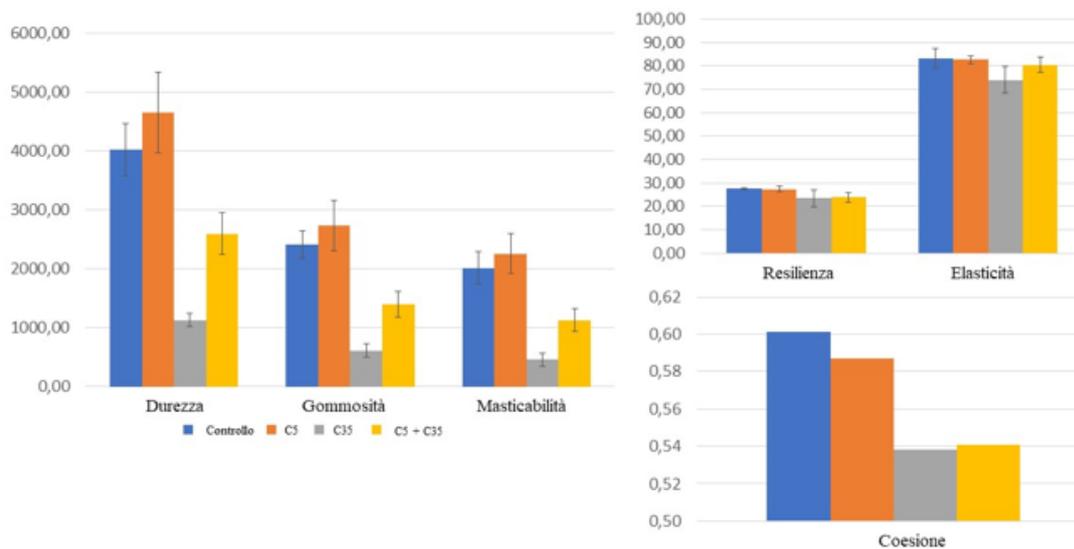


Figura 7.12 - Analisi della texture dopo 28 giorni



7.4.6 Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche (conta microbica totale, conta dei lattobacilli e dei lattococchi) sono state effettuate nei giorni 2, 7, 14, 21 e 28. I campioni sono stati prelevati in modo asettico dalla confezione e, utilizzando un Cheese Trier, 10 g di campioni di formaggio sono stati posti in un sacchetto sterile (Grade, Leicestershire, Regno Unito), diluiti (10 volte) con acqua peptonata al 2% (p/v) e omogeneizzati per 10 minuti con uno stomacher (Iul Instruments, Barcelona, Spagna). Successivamente per ciascun campione sono state effettuate diluizioni seriali utilizzando un diluente a massimo recupero (Oxoid), contenente bassi livelli di peptone (1 g/L) e cloruro di sodio (8,5 g/L). La conta microbica è stata eseguita usando la tecnica della piastra di colata. La conta della carica microbica totale è stata fatta usando PCA agar (Oxoid) incubando le piastre a 37 °C per 72h in condizioni aerobiche; la conta dei lattococchi è stata eseguita utilizzando LM17 agar (Oxoid) con incubazione anaerobica a 37 °C per 72h e per i lattobacilli utilizzando MRS vancomycin agar (Oxoid) con incubazione anaerobica a 37 °C per 72h ([Wang et al., 2010](#)).

Per quanto riguarda la conta microbica totale (Figura 7.13) il formaggio di controllo presentava un numero di microrganismi più alto rispetto agli altri formaggi fino al quattordicesimo giorno. Dopo tale periodo (21 giorni) la carica microbica totale risultava essere quasi uguale in tutte e quattro le tesi. Al termine della shelf-life si osservava in particolar modo un aumento della carica microbica totale nel formaggio addizionato dei ceppi C5 + C35.

In merito al numero dei lattobacilli (Figura 7.14) nessuna differenza è stata osservata tra il controllo e il formaggio addizionato del ceppo C35, i quali avevano lo stesso comportamento per tutta la durata della shelf-life, presentando un numero di lattobacilli maggiore rispetto ai formaggi addizionati dei ceppi C5 e C5 + C35. Questi ultimi due mostravano un andamento contrapposto con una diminuzione della popolazione di lattobacilli nei campioni addizionati dei ceppi C5 dopo 7 giorni, mentre un incremento nel C5 + C35.

Per quanto riguarda la popolazione dei lattococchi (Figura 7.15), questa risultava essere diversa in tutte e quattro le tipologie di formaggio all'inizio della shelf-life. In particolare, il numero di lattococchi era superiore nei campioni addizionati del ceppo C5 seguito dal C35, C5 + C35 e dal controllo. Il loro numero risultava essere abbastanza stabile durante la shelf-life ad eccezione del formaggio controllo in cui si osservava un aumento fino al quattordicesimo giorno e successivamente una diminuzione fino al termine della shelf-life.

Figura 7.13 – Popolazione microbica totale

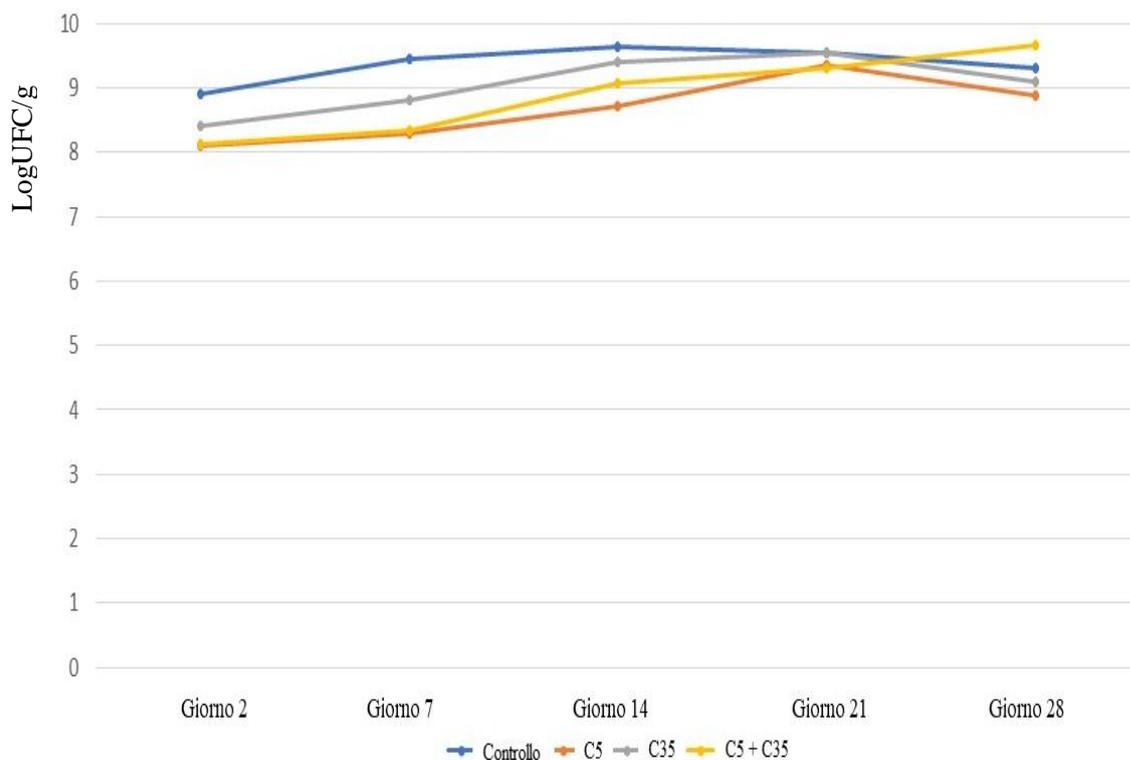


Figura 7.14 – Conta microbica dei lattobacilli

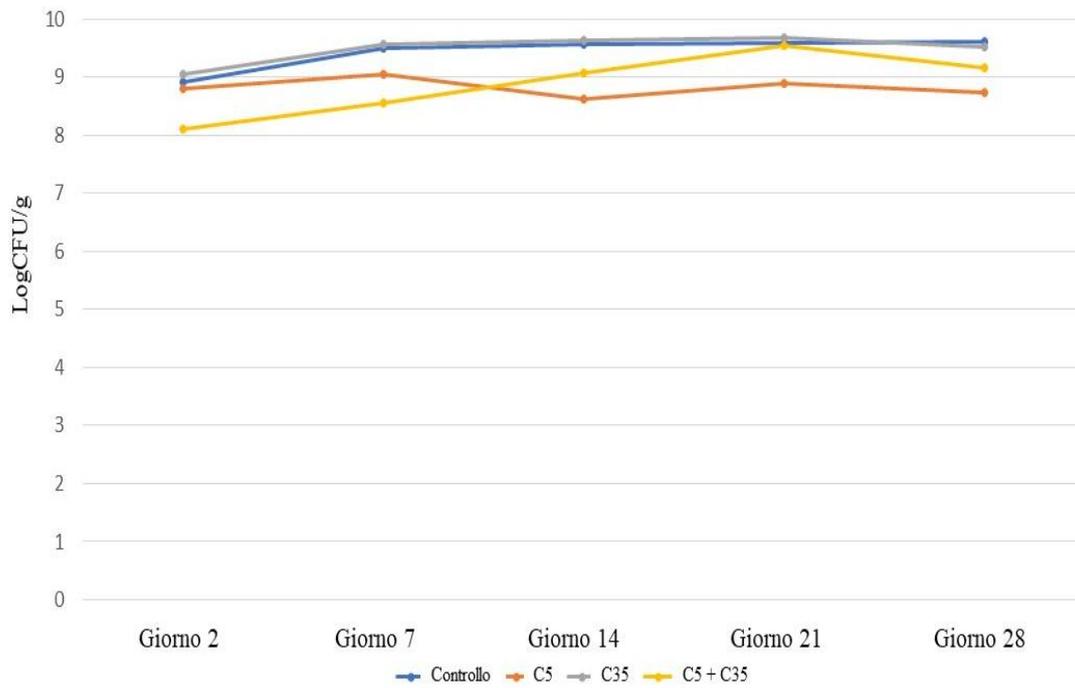
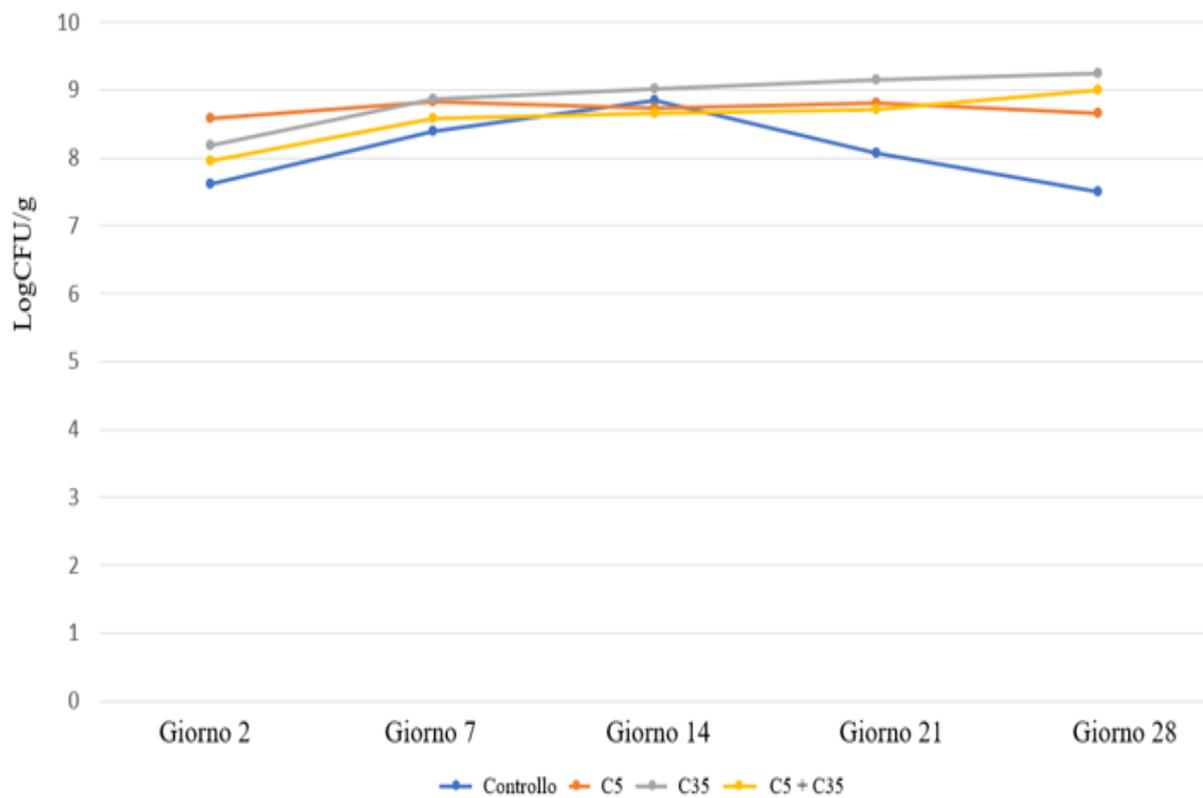


Figura 7.15 – Conta microbica dei lattococchi



7.4.7 Contenuto di lattosio e glucosio

Il contenuto di lattosio e glucosio è stato determinato secondo il metodo sviluppato da [Mangan et al. \(2019\)](#) utilizzando il kit enzimatico K-LOLAC (Megazyme, Cork, Irlanda).

Per quanto riguarda il contenuto di lattosio (Figura 7.16), differenze statisticamente significative sono state osservate tra le varie tesi. La tesi controllo mostrava il contenuto più alto di questo zucchero (circa 1,5%), il quale diminuiva durante la shelf-life fino a raggiungere un contenuto dell'1% al termine della stessa (28 giorni). I campioni addizionati del ceppo C5 hanno mostrato i risultati più interessanti, poiché già dopo 2 giorni mostravano un ridotto contenuto di lattosio, pari a circa lo 0,3%, rispetto al controllo, rimanendo costante durante la shelf-life. I formaggi addizionati dei ceppi C35 e C5 + C35 mostravano un contenuto di glucosio più basso rispetto al controllo, ma comunque superiore rispetto ai formaggi con l'aggiunta del ceppo C5; tale contenuto diminuiva durante la shelf-life, in particolar modo nel C35.

In merito al contenuto di glucosio (Figura 7.17), questo risultava quasi del tutto assente nei campioni controllo, mentre mostrava il contenuto più alto nei formaggi addizionati del ceppo C5 e C35 al giorno 2. Tale contenuto è probabilmente dovuto all'azione dell'enzima β -galattosidasi prodotto dai batteri durante il processo di caseificazione. Il contenuto di glucosio aumentava ulteriormente nei formaggi C5 al giorno 14 per poi diminuire sensibilmente al termine della shelf-life, probabilmente poiché utilizzato come fonte energetica da altre specie microbiche. Tale diminuzione era più rapida nei formaggi con aggiunta dei ceppi C35. Di contro, i campioni addizionati dei ceppi C5 + C35 mostravano un contenuto di glucosio più basso rispetto agli altri due.

Figura 7.16 – Contenuto di lattosio nei campioni di formaggio fresco

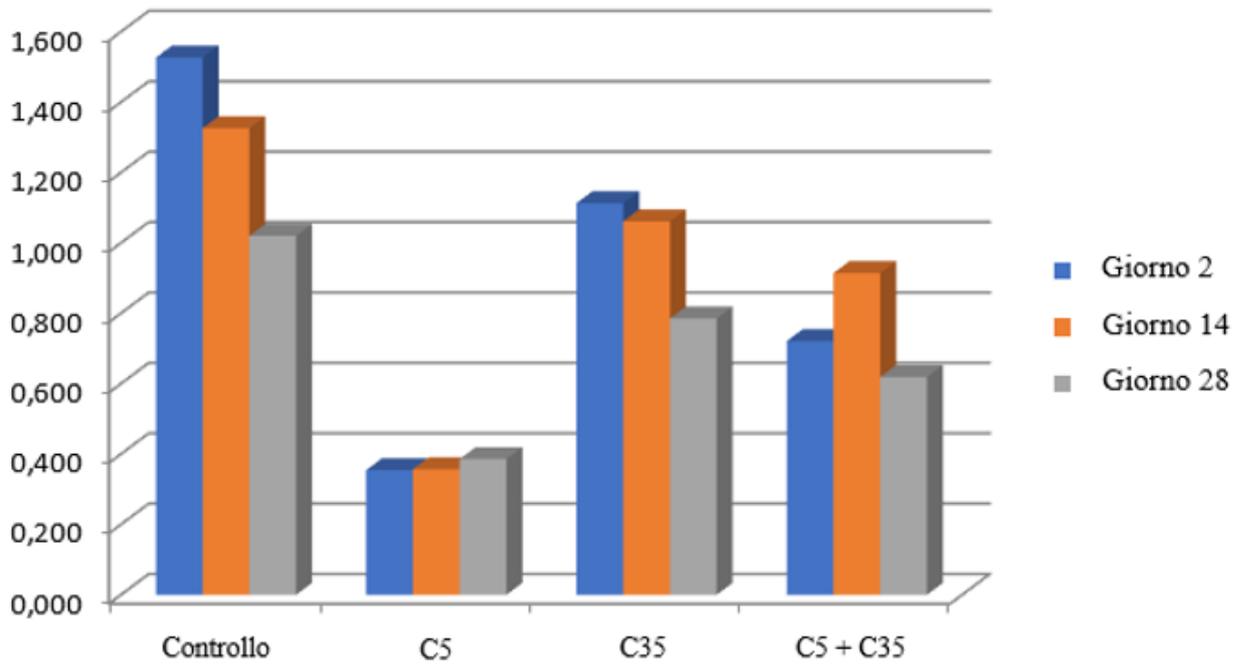
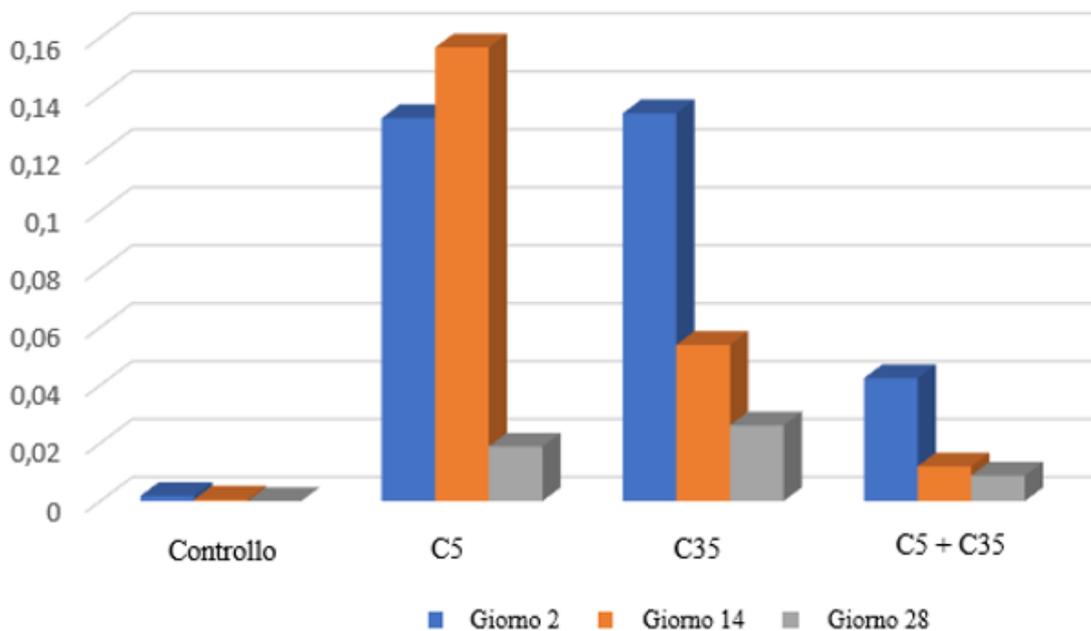


Figura 7.17 -Contenuto di glucosio



Linee di ricerca 3

Sviluppo di un metodo per la determinazione della Shelf-Life di formaggi freschi delattosati tramite lo studio dei composti volatili responsabili dell'aroma

Obiettivo di questa linea di ricerca è stato quello di verificare la possibilità di determinare la shelf-life di prodotti lattiero-caseari freschi attraverso l'analisi sensoriale e la determinazione dei composti volatili responsabili dell'aroma.

A tale scopo il profilo volatile e le caratteristiche sensoriali di campioni di mozzarelle delattosate (LFM) e non (TM) sono state monitorate durante l'intera shelf-life.

I campioni di TM e LFM sono stati reperiti presso un'industria lattiero-casearia locale. Il campionamento è stato effettuato tre volte nell'arco di un mese; ogni volta venivano prelevati 8 campioni di TM, appartenenti allo stesso lotto di produzione, e 8 campioni di LFM, per un totale di 48 campioni.

8.1 Produzione dei campioni di mozzarella classica e delattosata

Le mozzarelle erano prodotte da latte vaccino standardizzato (3,20g/100g proteine, 3,50g/100g lipidi) e pastorizzato (74 °C per 25s.). Dopo la pastorizzazione il latte, veniva diviso in due metà: una parte era destinato alla produzione della TM, l'altra veniva sottoposto al processo enzimatico di scissione del lattosio per la produzione della LFM.

Per idrolizzare il lattosio è stata utilizzato l'enzima HA-LactaseTM 5200 (lattasi 5200 NLU/g, Chr. Hansen Italia S.p.A., Parma, Italia) alla concentrazione di 8000 NLU/L di latte.

I formaggi sono stati preparati utilizzando una tecnologia altamente standardizzata.

Per l'acidificazione e la coagulazione del latte sono stati impiegati, rispettivamente, 12 g/L di acido citrico e 40 IMCU/L di caglio liquido (CHY-MAX[®] plus, 200 IMCU/mL, Chr. Hansen Italia S.p.A., Parma; Italia). La cagliata è stata filata meccanicamente in acqua calda (90-95 °C), modellata in unità di circa 100g e poi

raffreddata in acqua non salata (4 °C). Ogni mozzarella è stata confezionata singolarmente in sacchetti di plastica di polietilene in una soluzione acquosa di cloruro di calcio (6,7 g/L) e cloruro di sodio (4 g/L).

I campioni sono stati conservati a +4 °C per tutta la shelf-life e analizzati a diversi tempi di conservazione ovvero il giorno di produzione (0) e dopo 4, 8, 13 e 20 giorni. Su tutti i campioni sono state eseguite, in triplo, le analisi HS_SPME-GC-MS per la determinazione del profilo volatile e l'analisi quantitativa descrittiva per la determinazione del profilo sensoriale.

8.2 Estrazione HS-SPME della frazione volatile.

Per l'isolamento e la concentrazione delle sostanze volatili è stata utilizzata la tecnica di microestrazione in fase solida (HS-SPME) applicata allo spazio di testa del campione. In particolare una vial da 40 mL dotata di valvola "mininert" (Supelco, Bellefonte, PA, USA) è stata riempita con 10 g, pesati esattamente, di ogni campione omogeneizzato, ai quali sono stati aggiunti 10 mL di soluzione salina satura di NaCl. L'estrazione è stata effettuata nello spazio di testa della vial tenuta in agitazione termica a 40 °C utilizzando una fibra di 50/30 µm Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). La fibra è stata attivata secondo le istruzioni del produttore. Il campione è stato equilibrato per 20 minuti e poi estratto per 30 minuti, durante l'estrazione il campione era in continua agitazione termica. Dopo il campionamento, la fibra SPME è stata introdotta nell'iniettore splitless del GC/MS e tenuta per 3 minuti a 260 °C per il desorbimento termico degli analiti e l'analisi GC-MS.

8.3 Analisi GC-MS della frazione volatile.

Per l'analisi dei composti volatili è stato utilizzato un gascromatografo Shimadzu GC 2010 Plus direttamente interfacciato con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo TQMS 8040 (Shimadzu, Milano, Italia). Le condizioni sperimentali di analisi erano: temperatura dell'iniettore 260 °C; modalità d'iniezione splitless; colonna capillare

VF-WAXms, 60m × 0.25mm i.d. × 0.25-µm spessore del film (Agilent, S.p.a. Milano, Italia); temperatura del forno: isoterma a 45 °C per 5 minuti, incremento fino a 80 °C ad una velocità di 10 °C al minuto e a 240 °C a 2 °C al minuto, isoterma a 240 °C per 5 minuti; gas di trasporto elio a flusso costante di 1mL/minuto; temperatura della trasfer line di 250 °C; range di acquisizione 40-400 m/z; velocità di scansione 1250 amu/s.

Ogni composto è stato identificato utilizzando gli spettri di massa presenti nei database NIST' 18 (NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, versione 2.0, USA) e FFNSC 3.0, gli indici di ritenzione lineare (IRL), i dati bibliografici e l'iniezione degli standard disponibili come riportato in [Cincotta et al 2018](#).

I composti volatili sono stati quantificati utilizzando il metodo dello standard addition come riportato da [Condurso et al. 2020](#). Nello specifico, è stata preparata una soluzione madre contenente i seguenti standards (Merk Life Science S.r.l., Milano, Italia): 2-eptanone (≥99.0%), acetoino (monomero, 99,0%), benzaldeide (≥ 99.5 %), etanolo (≥ 99.9 %), 3-metil-1-butanolo (≥ 98.5 %), 2-eptanolo (≥ 98.0 %), 2,3-butanediolo (≥ 97.0 %), alcol feniletile (≥ 99.0 %), acido acetico (≥ 99.99 %), acido 3-metilbutanoico (≥ 98.5 %), acido ottanoico (≥ 99.5 %), δ-ottalattone (≥ 98.0 %), δ-decalattone (≥ 98.0 %), γ-dodecalattone (≥ 98.0 %), ciascuno con una concentrazione venti volte superiore a quella presente nei campioni di formaggio; successivamente per diluizione dalla madre sono state preparate quattro soluzioni di lavoro (1:3, 1:2, 1:1 e 2:3) poi aggiunte (1,0 mL) a quattro aliquote di ciascun campione di formaggio. Per ciascun campione di formaggio, le aliquote addizionate con le soluzioni di lavoro e un'aliquota non addizionata sono stati estratti e analizzati mediante HS-SPME-GC-MS, come descritto in precedenza. Per la quantificazione è stata usata una curva di taratura a cinque punti generata plottando la risposta del rilevatore in funzione della quantità di standards addizionata.

8.4 Analisi sensoriale

L'analisi sensoriale descrittiva quantitativa (QDA) è stata eseguita secondo la norma ISO 13299 (ISO 2003) da un gruppo di 8 assaggiatori addestrati (panel), 4 maschi e 4 femmine, tra i 21 e i 30 anni, selezionati tra gli studenti del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Messina. Le analisi sono state condotte in un laboratorio sensoriale conforme alla norma ISO 8589 (ISO, 1988).

Gli assaggiatori sono stati scelti tra coloro che abitualmente consumavano mozzarella e sono stati addestrati secondo la norma ISO 8586-1 (ISO,1993). In particolare il gruppo è stato sottoposto a un periodo di formazione di 6 settimane. Durante questo periodo, mozzarelle classiche e delattosate di diverse marche sono state utilizzate per allenare gli assaggiatori, farli familiarizzare con i prodotti e le procedure, e sviluppare un vocabolario comune per la descrizione univoca delle loro percezioni. Al panel è stato chiesto di assaggiare diversi campioni di mozzarella e di descriverne gusto, odore, sapore, aspetto e consistenza; è stato, così, sviluppato un elenco di descrittori con le loro definizioni. I descrittori scelti e le loro definizioni sono stati, poi, validati tramite l'utilizzo di opportuni standard di riferimento in accordo con quanto riportato da [Braghieri et al., 2018](#)).

I descrittori erano in totale 15: colore bianco, superficie liscia, odore di latte, odore di burro, odore di yogurt, sapore acido, sapore amaro, sapore dolce, sapore salato, sapore di latte, consistenza, elasticità, coesione, gommosità, succosità. I descrittori sono stati quantificati utilizzando una scala di intensità a nove punti, dove 1 sta per “non percepibile” e 9 per “fortemente percepibile” su un sistema di registrazione computerizzato diretto (FIZZ Biosystemes. ver. 2.00 M, Couternon, Francia). I risultati sono stati espressi come media per ogni descrittore sensoriale.

Campioni di TM e LFM sono state valutati a 5 diversi tempi di conservazione (0, 4, 8, 13 e 20 giorni) in cinque differenti sessioni (una sessione per ogni tempo di archiviazione). In ciascuna sessione venivano valutati tre campioni di TM e tre campioni di LFM, con una pausa di 10 minuti tra un campione e l'altro. Creckers non salati e acqua naturale venivano serviti tra i campioni per pulire la bocca

I campioni erano etichettati con un numero casuale a tre cifre e serviti uno alla volta, ad una temperatura di 13 °C, su piatti bianchi di polietilene, in ordine casuale. Per evitare qualsiasi influenza dell'aspetto sulla valutazione dei descrittori di odore, flavor, gusto e texture, i campioni sono stati valutati dapprima sotto luce rossa e poi sotto luce bianca per gli attributi relativi all'aspetto.

8.5 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati statisticamente utilizzando il software XLStat software, versione 2014.5.03 (Addinsoft, Damremont, Parigi, Francia). L'ANOVA a due vie (tempo di conservazione e tipo di formaggio), il test di Duncan e l'analisi delle componenti principali (PCA) sono stati eseguiti su dati volatili e sensoriali per analizzare le differenze tra campioni di diverso tipo (TM e LFM) e a diversi tempi di conservazione. Il modello era statisticamente significativo per valore di $P < 0.05$.

8.6 Profilo volatile di TM e LFM durante la shelf-life.

I composti volatili identificati nei campioni di TM e LFM sono riportati in Tabella 8.1 insieme con i loro indici di ritenzione lineare (IRL), il metodo di identificazione e i riferimenti bibliografici dei composti già identificati nella mozzarella.

In totale sono stati identificati 54 composti volatili appartenenti alle seguenti classi di sostanze: chetoni, aldeidi, alcoli, esteri, acidi, terpeni, lattoni e idrocarburi. La maggior parte dei composti identificati erano presenti in entrambi i tipi di mozzarella, TM e LFM; anche se molti di questi sono stati già riportati da altri autori quali componenti della frazione volatile della mozzarella ([Natrella G., Faccia M. et al. 2020](#); [Natrella G., Gambacorta G. et al. 2020](#); [Sabia E. et al. 2020](#); [Sacchi R. et al. 2020](#)), alcuni sono stati identificati qui per la prima volta.

Questi composti volatili originano da processi biochimici complessi e sono legati all'attività enzimatica delle complesse popolazioni microbiche dei formaggi, quali la lipolisi, la proteolisi, il catabolismo di amminoacidi liberi (FAA) e acidi grassi liberi

(FFA), il metabolismo del lattosio residuo, lattato e citrato (McSweeney P. L., & Sousa M. J. 2000).

La tabella 8.2 riporta i dati quantitativi dei composti che hanno mostrato differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) nei campioni TM e LFM durante il periodo di conservazione. Tra questi, l'acetoino era il composto volatile quantitativamente più rappresentato al momento della produzione, sia nei campioni TM che LFM. Al termine della shelf-life i composti prevalenti risultavano l'etanolo, l'acido acetico e l'acido ottanoico, e il 3-metil-1-butanolo limitatamente ai campioni di mozzarella delattosata. Per comprendere meglio le variazioni della frazione volatile della mozzarella classica e di quella delattosata durante la shelf-life, sui dati quantitativi (tabella 8.2) è stata eseguita l'analisi delle componenti principali (PCA). La figura 8.1 rappresenta la distribuzione nel piano PC1-PC2 dei loadings e scores dei composti volatili quantificati nei campioni di TM e LFM a diversi tempi di conservazione. La prima componente principale (PC1) esprimeva il 65,57 % della variabilità del sistema, mentre la PC2 il 17,96%.

I campioni di mozzarella delattosata risultavano separati dai campioni di mozzarella classica lungo la PC2; nello specifico tutti i campioni di LFM si collocavano nella regione positiva della PC2 mentre i campioni TM erano in quella negativa. La PC1 ha invece permesso di differenziare i campioni di mozzarella a diversi tempi di conservazione, infatti sia i campioni di TM che quelli di LFM risultavano distribuiti lungo la PC1 da sinistra verso destra in ordine crescente di tempo di conservazione. In particolare, i campioni TM erano vicini l'uno all'altro nella regione negativa di PC1 fino al 13° giorno di conservazione, mentre i campioni TM a 20 giorni di conservazione si collocavano nella regione positiva della PC1 ben separati da tutti gli altri. Per quanto riguarda i campioni LFM, questi risultavano raggruppati nella regione negativa della PC1 fino al 8° giorno, e in quella nella positiva dopo 13 e 20 giorni di conservazione. Le variabili che maggiormente pesavano sulla regione negativa del PC1 e che caratterizzavano i campioni di TM (TM_0, TM_4, TM_8 e TM_13) e LFM (LFM_0, LFM_4 e LFM_8) presenti in questa parte del grafico erano

il 2-eptanone e l'acetoino. 2-Eptanone e l'acetoino sono considerati i principali composti responsabili dell'aroma del formaggio fresco; il 2-eptanone e, generalmente, i 2-chetoni provengono dalla β -ossidazione di acidi grassi saturi seguita da una decarbossilazione e una successiva decarbossilazione di β -chetoacidi (Dursun A., Güler Z. & Şekerli Y. E. 2017); l'acetoino è il principale composto associato al metabolismo del citrato operato dai batteri lattici (McSweeney P. L., Fox P. F., & Ciocia F. 2017). L'acetoino è caratterizzato da note sensoriali burrose e legnose e ha un ruolo centrale nel determinare il sapore del formaggio fresco immaturo (Curioni P. M. G., & Bosset J. O. 2002) e della mozzarella dove, secondo alcuni autori (Moio L., Langlois D., Etievant P. X. & Addeo F. 1993), è il principale chetone. Il contenuto di acetoino rilevato nei campioni TM e FLM, qui analizzati, era superiore al suo valore di soglia olfattiva, pari a 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Natrella G., Faccia M. et al. 2020), al tempo 0 (giorno di produzione) e, limitatamente alla mozzarella delattosata, anche nella fase iniziale di conservazione (4 giorni).

Le variabili che maggiormente pesavano sulle regioni positive di PC1 erano 2,3-butandiolo, etanolo, acido acetico e 2-eptanolo sul quadrante negativo della PC2, mentre benzaldeide, alcol feniletilenico, acido 3-metilbutanoico, 3-metilbutanolo e lattoni sul quadrante positivo di PC2. Questi composti volatili sono responsabili della separazione dei campioni TM_20 (venti giorni di conservazione) e LFM_13 e LFM_20 (rispettivamente 13 e 20 giorni di conservazione) dai corrispondenti campioni con un tempo di conservazione più breve.

Questi composti potrebbero essere il risultato del deterioramento microbiologico che avviene durante la conservazione della mozzarella, favorito dal tradizionale modo di conservare questo formaggio in salamoia. È stato dimostrato da diversi autori che il deterioramento della mozzarella è dovuto principalmente a coliformi, *Pseudomonas* spp. e/o batteri psicotropi che crescono sulla superficie del formaggio (Sinigaglia M et al. 2008); (Cabrini A. & Neviani E. 1983); (Rondinini G. & Garzaroli C. 1990). I coliformi possono crescere rapidamente alle condizioni di conservazione della mozzarella e sono responsabili della produzione di acido acetico, acido formico,

acido succinico, acido lattico, etanolo, 2,3-butilenglicole, H₂ e CO₂ (Sinigaglia et al., 2008). Le quantità crescenti di acido acetico e di etanolo osservate nei campioni di formaggio TM e LFM durante la shelf-life e le quantità elevate rilevate dopo 20 giorni di conservazione sono presumibilmente attribuibili al metabolismo dei coliformi. *Pseudomonas spp.* e i batteri psicotropi hanno sia attività lipolitica che proteolitica; questi batteri, essendo in grado di crescere a temperature di refrigerazione, possono rapidamente prevalere sulla flora lattica e potrebbero essere responsabili della quantità crescente di 2-eptanolo, δ -ottalattone, δ -decalattone, γ -dodecalattone, 3-butandiolo, benzaldeide, alcol feniletilico, acido 3-metilbutanoico e 3-metil-1-butanolo osservata nei campioni TM e LFM durante il periodo di conservazione.

Il 2-eptanolo e i lattoni derivano da processi lipolitici; in particolare, il 2-eptanolo si forma durante la shelf-life dalla riduzione del 2-eptanone, mentre i lattoni sono prodotti mediante transesterificazione di acidi grassi liberi idrossilati incorporati nei trigliceridi del latte e rilasciati mediante attività lipolitica enzimatica o mediante qualsiasi processo di riscaldamento (Alewijn M. et al 2007). I lattoni si trovano tipicamente nei formaggi stagionati e sono importanti composti aromatici nel Blue cheese (Gallois A. & Langlois D. 1990), nel Cheddar (Wong N. P. et al. 1975) e nel Parmigiano Reggiano (Meinhart E. & Schreier P. 1986). I lattoni sono stati identificati qui per la prima volta nella mozzarella con un contenuto maggiore ($P < 0.05\%$) nei campioni LFM.

Infine, il 2,3-butandiolo, l'acido 3-metilbutanoico, il 3-metil-1-butanolo, la benzaldeide e l'alcol feniletilico derivano dal catabolismo degli amminoacidi liberi (FAA): il 2,3-butandiolo deriva dalla transaminazione dell'acido aspartico (Ardö Y. 2006), l'acido 3-metilbutanoico deriva dalla leucina ed è responsabile dell'odore di rancido, di formaggio e dolce (Thierry A. et al. 2005); la benzaldeide (sapore amaro, fruttato e nocciolato) e l'alcol feniletilico (floreale e rosato) derivano dalla fenilalanina a seguito della transaminazione del fenilpiruvato per degradazione non enzimatica (Kong Y. et al. 1996). Escludendo il 2-eptanolo, tutti i composti volatili

formati dal catabolismo di FFA e FAA erano presenti a livelli più elevati ($P < 0,05$) nei campioni di formaggio LFM. Questa differenza potrebbe essere correlata al processo idrolitico (delattosazione) cui è stato sottoposto il latte per la produzione di LFM. Oltre a scomporre lo zucchero naturale presente nel latte in glucosio e galattosio, l'enzima lattasi utilizzato in questa ricerca ha anche un'attività proteolitica che potrebbe determinare la degradazione delle proteine durante il processo di produzione e la conservazione (Troise et al., 2016). Inoltre, i trattamenti di riscaldamento durante la produzione di formaggio, specialmente durante la fase di filatura, possono aver favorito il rilascio di acidi grassi liberi idrossilati dai trigliceridi e quindi la formazione di livelli più elevati di lattoni nel formaggio LFM.

8.7 Profilo sensoriale di TM e LFM durante la shelf-life.

La tabella 8.3 riporta i risultati dell'analisi sensoriale descrittiva dei campioni TM e LFM durante la shelf-life. Differenze statisticamente significative sono state riscontrate durante la shelf-life per le due tipologie di mozzarelle per tutti i descrittori sensoriali valutati dal panel. Inoltre, TM e LFM differivano ($P < 0,05$) per quanto riguarda l'odore di yogurt, il sapore amaro e salato, l'elasticità e la succosità. La figura 8.2 riporta i risultati della PCA applicata ai dati sensoriali; confrontando le Figure 8.1 e 8.2 emerge un'interessante e chiara somiglianza.: ancora una volta, i campioni sono separati in funzione del tempo di conservazione lungo la PC1 e in funzione del tipo, delattosati e non, lungo la PC2. In particolare, i campioni TM da 0 a 13 giorni di conservazione e i campioni LFM da 0 a 8 giorni erano raggruppati nella regione positiva della PC1 (73,25% della variabilità), ben separati dai campioni TM_20 e LFM_13 e LFM_20. Questa distribuzione dei campioni nel piano PC1-PC2 indica chiaramente che le caratteristiche sensoriali dei formaggi TM e LFM restavano inalterate fino a 13 giorni di conservazione e fino a 8 giorni, rispettivamente.

I descrittori sensoriali che hanno maggiormente influenzato questa separazione erano gusto dolce, colore bianco, compattezza, succosità e gommosità con riferimento alle mozzarelle delattosate, mentre sapore e odore del latte, elasticità, coesione e superficie

liscia per i campioni TM. Tutte questi descrittori sono associati a caratteristiche sensoriali tipiche dei prodotti caseari freschi. I campioni TM₂₀ risultavano caratterizzati da sapore salato e amaro, mentre i campioni LFM₁₃ e LFM₂₀ dai descrittori negativi di odore di burro e yogurt, sapore acido e amaro. Il gusto amaro manifestatosi alla fine della shelf-life potrebbe essere dovuto al rilascio di peptidi dal sapore amaro derivanti dell'attività proteolitica dei microrganismi responsabile del processo di deterioramento e, nel campione delattosato anche all'attività proteolitica dell'enzima latasi (Jansson et al. 2014); (Troise et al 2016), (Nielsen et al.2017).

La figura 8.3 presenta la correlazione tra i composti volatili e i descrittori sensoriali dell'odore e dell'aroma. Come precedente detto, i campioni TM e FLM fino al 8° giorno 8 di conservazione erano caratterizzati da un più elevato contenuto di acetoino, associato principalmente a caratteristiche organolettiche tipiche della mozzarella fresca. Con il trascorrere della shelf-life, i composti derivanti dal metabolismo degli acidi grassi liberi e degli amminoacidi liberi aumentano determinando un aumento dannoso dell'odore di yogurt,-correlato con la presenza di benzaldeide e δ -ottalattone, e dell'odore di burro, correlato con 3-metil-1-butanolo e γ -dodecalattone.

8.8 Conclusioni

La shelf-life delle mozzarelle è stabilita normalmente sulla base della loro stabilità microbiologica. La shelf-life dei campioni di TM e LFM, qui analizzati, era fissata dal produttore, per entrambi, pari a 20 giorni in condizioni di refrigerazione (+ 6 °C).

I dati qui ottenuti indicano che durante la shelf-life i profili volatile e sensoriale di prodotti freschi lattiero caseari tradizionali e delattosati cambia in modo significativo. In particolare si è osservato un'aumento del contenuto di composti volatili derivanti dal metabolismo lipidico e amminoacidico dopo 8 giorni di conservazione nei campioni FLM e, in misura minore, dopo 13 giorni di conservazione nei campioni TM. Contestualmente il panel ha evidenziato una diminuzione della qualità sensoriale attribuendo, alla fine della shelf-life, valori alti a tutti i descrittori negativi.

In conclusione, questo studio evidenzia l'importanza di considerare il profilo aromatico volatile e la qualità sensoriale della mozzarella per la definizione del periodo di conservabilità suggerendo che, nonostante la stabilità microbiologica, per la mozzarella delattosata dovrebbe essere fissata una shelf-life più breve rispetto a quella del prodotto non delattosato.

Tabella 8.1. Composti volatili identificati in TM e LFM

| Composti | IRL^a | TM | LFM | Letteratura^b | Identificazione^c |
|-------------------------|------------------------|-----------|------------|--------------------------------|------------------------------------|
| <i>Chetoni</i> | | | | | |
| 2-Eptanone | 1188 | x | x | 1,2 | IRL, MS, St |
| Acetoino | 1299 | x | x | 1,2,4 | IRL, MS, St |
| 1-Idrossi-2-Propanone | 1318 | - | x | - | IRL, MS, St |
| 6-Metil-5-Epten-2-one | 1343 | - | x | 1,2 | IRL, MS, St |
| 2-Nonanone | 1394 | x | x | 1,2,3 | IRL, MS, St |
| 2-Undecanone | 1602 | x | x | 1,2 | IRL, MS, St |
| Acetofenone | 1657 | x | - | 4 | IRL, MS, St |
| <i>Aldeidi</i> | | | | | |
| Esanale | 1093 | x | - | 1,2,3,4 | IRL, MS, St |
| Nonanale | 1400 | x | x | 1,2,3,4 | IRL, MS, St |
| Furfurale | 1473 | x | - | - | IRL, MS, St |
| Decanale | 1504 | x | x | 1,2,4 | IRL, MS, St |
| Benzaldeide | 1532 | x | x | 2,4 | IRL, MS, St |
| Dodecanale | 1714 | x | x | - | IRL, MS, St |
| Tetradecanale | 1924 | x | x | - | IRL, MS, St |
| <i>Alcoli</i> | | | | | |
| Etanolo | 944 | x | x | 1,2 | IRL, MS, St |
| 3-Metil-1-Butanolo | 1210 | x | x | 1,2 | IRL, MS, St |
| 2-Eptanolo | 1321 | x | x | - | IRL, MS, St |
| 1-Esanolo | 1354 | x | x | 2 | IRL, MS, St |
| 1-Eptanolo | 1457 | - | x | - | IRL, MS, St |
| 1-Ottanolo | 1560 | - | x | 4 | IRL, MS, St |
| 2,3-Butandiolo | 1584 | x | - | 4 | IRL, MS, St |
| 1-Nonanolo | 1663 | - | x | - | IRL, MS, St |
| 2-Furanmetanolo | 1670 | x | - | - | IRL, MS, St |
| Feniletil alcol | 1918 | x | x | 1 | IRL, MS, St |
| 1-Dodecanolo | 1969 | x | x | | IRL, MS, St |
| <i>Esteri</i> | | | | | |
| Acetato di Isoamile | 1124 | - | x | - | IRL, MS, St |
| Otanoato di Etile | 1436 | x | x | - | IRL, MS, St |
| Decanoato di Etile | 1641 | - | x | - | IRL, MS, St |
| Acetato di 2-Feniletile | 1821 | x | x | - | IRL, MS, St |
| <i>Acidi</i> | | | | | |
| Acido Acetico | 1467 | x | x | 1,2,4 | IRL, MS, St |
| Acido Propanoico | 1553 | x | - | - | IRL, MS, St |
| Acido Butanoico | 1644 | x | x | 1,2,3,4 | IRL, MS, St |
| Acido 2-Metilbutanoico | 1682 | x | - | - | IRL, MS, St |
| Acido 3-Metilbutanoico | 1684 | - | x | 2 | IRL, MS, St |
| Acido Esanoico | 1856 | x | x | 1,2,3 | IRL, MS, St |
| Acido 2-Etil Esanoico | 1960 | - | x | - | IRL, MS, St |

| | | | | | |
|--------------------------------|------|---|---|-------|-------------|
| Acido Eptanoico | 1964 | x | x | 1,2 | IRL, MS, St |
| Acido (<i>E</i>)-2-Esanoico | 1980 | x | - | - | IRL, MS |
| Acido Ottanoico | 2071 | x | x | 1,2,3 | IRL, MS, St |
| Acido Nonanoico | 2177 | x | x | 1,2 | IRL, MS, St |
| Acido Decanoico | 2280 | x | x | 1,2 | IRL, MS, St |
| Acido (<i>E</i>)-9-Decenoico | 2345 | x | x | - | IRL, MS |
| Acido (<i>E</i>)-2-Decenoico | 2408 | x | x | - | IRL, MS |
| Acido Dodecanoico | 2494 | x | x | - | IRL, MS, St |
| Acido Tridecanoico | 2599 | - | x | - | IRL, MS, St |
| Acido Tetradecanoico | 2705 | x | x | - | IRL, MS, St |
| Terpeni | | | | | |
| β -Pinene | 1110 | - | x | - | IRL, MS, St |
| Limonene | 1203 | - | x | 1,3 | IRL, MS, St |
| <i>o</i> -Cimene | 1276 | x | x | - | IRL, MS, St |
| <i>p</i> -Cimene | 1279 | - | x | - | IRL, MS, St |
| Latttoni | | | | | |
| δ -Ottalattone | 1972 | - | x | - | IRL, MS, St |
| δ -Decalattone | 2198 | x | x | - | IRL, MS, St |
| γ -Dodecalattone | 2430 | x | x | - | IRL, MS, St |
| Idrocarburi | | | | | |
| Toluene | 1049 | - | x | 3,4 | IRL, MS, St |

^a Indice di ritenzione lineare calcolato su colonna VF-WAXM, 60 m \times 0,25 mm i.d. \times 0,25- μ m. ^b 1) Natrella, Faccia, Lorenzo, De Palo, & Gambacorta, (2020); 2) Natrella, Gambacorta, De Palo, Loenzo & Faccia, (2020); 3) Sabia, Gauly, Napolitano, Cifuni, & Claps, (2020); 4) Sacchi, Marrazzo, Masucci, Di Francia, Serrapica, & Genovese, (2020). ^c Metodo di identificazione: IRL= indice di ritenzione lineare; MS= spettro di massa; St= standard.

Tabella 8.2. Quantitativo medio ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) per i composti volatili con differenze statisticamente significative tra TM e LFM durante la Shelf-life

| Composti | TM | | | | | LFM | | | | | TM vs LFM | Descrittori olfattivi |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|--|
| | Tempo di conservazione (giorni) | | | | | Tempo di conservazione(giorni) | | | | | | |
| | 0 | 4 | 8 | 13 | 20 | 0 | 4 | 8 | 13 | 20 | | |
| 2-Eptanone | 2.88 ^a | 2.80 ^a | 2.89 ^a | 2.69 ^a | 1.81 ^b | 3.56 ^a | 3.69 ^a | 3.79 ^a | 3.79 ^a | 2.49 ^b | ns | Formaggio, fruttato, cheonico, banana verde |
| Acetoino | 975.92 ^a | 671.36 ^b | 611.34 ^b | 412.75 ^c | 134.87 ^d | 1281.22 ^a | 815.12 ^b | 683.22 ^b | 380.88 ^c | 226.01 ^c | ns | Dolce, burro, crema, caseificio, di latte |
| Benzaldeide | tr ^{e,a} | tr ^a | _f,b | _b | _b | 0.30 ^c | 0.53 ^c | 0.88 ^b | 1.89 ^a | 1.93 ^a | * | Mandorla, fruttato, nocciola |
| Etanolo | 4.39 ^d | 7.62 ^d | 17.06 ^c | 116.40 ^b | 482.97 ^a | 13.52 ^d | 59.31 ^c | 76.56 ^c | 243.81 ^b | 469.98 ^a | ns | Piacevole, debole, etereo, vinoso |
| 3-Metil-1-Butanolo | _c | 5.58 ^b | 5.77 ^b | 18.99 ^a | 18.16 ^a | 3.99 ^c | 7.06 ^c | 9.46 ^c | 76.80 ^b | 128.00 ^a | * | Banana, alcol, fruttato |
| 2-Eptanolo | _b | _b | _b | _b | 3.58 ^a | _b | _b | _b | _b | 4.87 ^a | ns | Fresco, limone, prato, erbe |
| 2,3-Butandiolo | _c | _c | 1.64 ^b | 2.32 ^b | 13.78 ^a | _c | _c | _c | 8.88 ^b | 24.39 ^a | * | Fruttato, crema, burro |
| Feniletil alcol | _d | _d | 2.19 ^c | 4.97 ^b | 10.85 ^a | 4.57 ^c | 4.09 ^c | 5.48 ^c | 9.03 ^b | 13.75 ^a | * | Dolce, floreale, di rose |
| Acido Acetico | 37.58 ^c | 47.95 ^c | 62.13 ^c | 237.33 ^b | 820.13 ^a | 9.32 ^d | 37.90 ^c | 74.70 ^b | 64.28 ^b | 727.59 ^a | ns | Aceto, tagliente, pungente |
| Acido 3-Metilbutanoico | 40.51 ^a | _b | _b | _b | _b | _d | 2.83 ^c | 6.49 ^b | 20.83 ^a | 17.80 ^a | * | Pungente, rancido, puzzolente, acido grasso maturo |
| Acido Ottanoico | 34.44 ^c | 67.11 ^c | 125.05 ^b | 224.40 ^a | 265.60 ^a | 50.83 ^c | 60.67 ^c | 140.96 ^b | 184.20 ^b | 292.08 ^a | ns | Ceroso, di muffa, rancido, spiacevole, grasso |
| δ -Ottalattone | - | - | - | - | - | tr ^c | 0.12 ^b | 0.19 ^b | 0.16 ^b | 0.39 ^a | * | Dolce, cocco, crema |
| δ -Decalattone | 0.27 ^c | 0.31 ^c | 0.62 ^b | 0.90 ^a | 1.00 ^a | 0.39 ^b | 0.55 ^b | 0.91 ^a | 1.06 ^a | 1.15 ^a | * | Dolce, crema, cocco, di latte |
| γ -Dodecalattone | _d | _d | tr ^c | 0.10 ^b | 0.22 ^a | 0.10 ^c | 0.13 ^c | 0.21 ^b | 0.22 ^b | 0.47 ^a | * | Grasso, pesca, dolce, metallico, fruttato |

^{a-d} Diverse lettere maiuscole nella stessa riga, per ogni tipo di mozzarella, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) dal test di Duncan durante il tempo di conservazione; *composti volatili che presentavano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) a seconda del tipo di formaggio; ns = non significativo ($P > 0,05$); ^e inferiore a $0,10 \mu\text{g Kg}^{-1}$; ^f non rilevato.

Tabella 8.3. Valori medi e deviazione standard per il QDA durante la shelf-life per i campioni TM e LFM

| Descrittori | TM Giorni | | | | | LFM Giorni | | | | | TM vs LFM |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| | 0 | 4 | 8 | 13 | 20 | 0 | 4 | 8 | 13 | 20 | |
| Colore bianco | 8.63 ^a ±0.75 | 7.89 ^a ±1.31 | 7.67 ^a ±0.46 | 7.20 ^a ±0.94 | 6.75 ^b ±0.83 | 8.17 ^a ±0.93 | 7.60 ^a ±1.26 | 7.40 ^a ±0.86 | 7.17 ^a ±0.74 | 4.40 ^b ±0.51 | ns |
| Superficie liscia | 6.74 ^a ±0.32 | 6.48 ^a ±0.34 | 6.17 ^a ±0.49 | 6.00 ^a ±0.42 | 4.25 ^b ±0.26 | 6.77 ^a ±0.54 | 6.80 ^a ±0.41 | 6.80 ^a ±0.53 | 5.27 ^b ±0.49 | 5.50 ^b ±0.49 | ns |
| Odore di latte | 7.43 ^a ±0.94 | 7.02 ^a ±1.23 | 6.17 ^a ±0.64 | 5.60 ^b ±0.31 | 4.50 ^b ±0.39 | 6.25 ^a ±0.37 | 6.20 ^a ±0.83 | 5.80 ^a ±0.67 | 5.83 ^a ±0.63 | 4.80 ^b ±0.53 | ns |
| Odore di burro | 5.20 ^b ±0.29 | 5.40 ^b ±0.76 | 5.50 ^b ±0.76 | 6.00 ^a ±0.36 | 6.00 ^a ±0.72 | 6.03 ^b ±0.43 | 5.80 ^b ±0.47 | 5.80 ^b ±0.53 | 6.17 ^b ±0.73 | 7.40 ^a ±0.64 | ns |
| Odore di Yogurt | 2.87 ^b ±0.08 | 3.10 ^b ±0.59 | 3.00 ^b ±0.16 | 3.60 ^a ±0.49 | 4.00 ^a ±0.38 | 4.17 ^b ±0.34 | 4.40 ^b ±0.36 | 5.40 ^a ±0.39 | 5.42 ^a ±0.53 | 5.80 ^a ±0.37 | * |
| Sapore acido | 2.80 ^c ±0.13 | 2.74 ^c ±0.24 | 3.17 ^c ±0.37 | 3.80 ^b ±0.73 | 4.00 ^b ±0.61 | 1.83 ^c ±0.31 | 2.80 ^c ±0.31 | 4.20 ^b ±0.28 | 5.17 ^b ±0.46 | 7.20 ^a ±0.83 | ns |
| Sapore amaro | 1.80 ^c ±0.02 | 2.54 ^c ±0.36 | 3.00 ^b ±0.42 | 3.80 ^b ±0.67 | 4.50 ^b ±0.75 | 2.00 ^d ±0.14 | 3.20 ^c ±0.42 | 3.40 ^c ±0.13 | 4.17 ^b ±0.56 | 5.60 ^a ±0.62 | * |
| Sapore dolce | 3.45±0.47 | 3.67±0.43 | 3.33±0.14 | 3.60±0.15 | 3.50±0.24 | 4.67 ^a ±0.29 | 4.00 ^a ±0.36 | 3.00 ^b ±0.41 | 3.00 ^b ±0.25 | 2.60 ^c ±0.18 | ns |
| Sapore salato | 2.24 ^c ±0.34 | 2.50 ^{bc} ±0.51 | 2.83 ^b ±0.34 | 4.60 ^a ±0.29 | 4.75 ^a ±0.68 | 3.50±0.14 | 3.40±0.29 | 3.20±0.27 | 3.17±0.18 | 3.12±0.38 | * |
| Sapore di latte | 7.28 ^a ±0.91 | 6.45 ^a ±0.97 | 5.80 ^b ±0.64 | 4.80 ^c ±0.76 | 4.50 ^c ±0.36 | 6.33 ^a ±0.75 | 6.40 ^a ±0.53 | 5.80 ^a ±0.43 | 4.17 ^b ±0.51 | 4.20 ^b ±0.31 | ns |
| Consistenza | 8.06 ^a ±1.15 | 8.10 ^a ±1.26 | 7.80 ^a ±0.45 | 6.00 ^b ±0.42 | 4.50 ^c ±0.24 | 7.50 ^a ±0.64 | 7.00 ^a ±0.61 | 5.80 ^b ±0.52 | 3.00 ^c ±0.27 | 2.40 ^c ±0.29 | ns |
| Elasticità | 7.10 ^a ±0.68 | 6.36 ^a ±0.72 | 6.40 ^a ±0.73 | 5.20 ^b ±0.61 | 3.75 ^c ±0.48 | 5.50 ^a ±0.39 | 5.30 ^a ±0.46 | 5.20 ^a ±0.34 | 2.83 ^b ±0.19 | 2.80 ^b ±0.17 | * |
| Coesione | 5.10 ^a ±0.49 | 5.20 ^a ±0.43 | 5.00 ^a ±0.27 | 4.40 ^a ±0.38 | 2.00 ^b ±0.15 | 5.17 ^a ±0.43 | 5.20 ^a ±0.13 | 5.12 ^a ±0.29 | 3.17 ^b ±0.42 | 2.20 ^b ±0.13 | ns |
| Gommosità | 6.60 ^a ±0.74 | 6.40 ^a ±0.81 | 5.80 ^a ±0.71 | 5.80 ^a ±0.61 | 3.75 ^b ±0.46 | 6.50 ^a ±0.73 | 6.40 ^a ±0.91 | 6.20 ^a ±0.73 | 3.00 ^b ±0.29 | 2.60 ^b ±0.24 | ns |
| Succosità | 7.03 ^a ±0.87 | 6.78 ^a ±0.57 | 6.80 ^a ±0.94 | 6.40 ^a ±0.73 | 4.75 ^b ±0.53 | 6.00 ^a ±0.45 | 5.40 ^a ±0.36 | 4.80 ^b ±0.31 | 4.50 ^b ±0.36 | 4.40 ^b ±0.53 | * |

^{a-d} Diverse lettere maiuscole nella stessa riga, per ogni tipo di mozzarella, indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) dal test di Duncan durante il periodo di conservazione; *descrittori sensoriali che presentavano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) a seconda del tipo di mozzarella; ns = non significativo ($P > 0.05$); ^cnon rilevato.

Figura 8.1. Biplot (loadings e scores) nel piano PC1-PC2 dei composti volatili di campioni di TM e LFM a diversi tempi di conservazione.

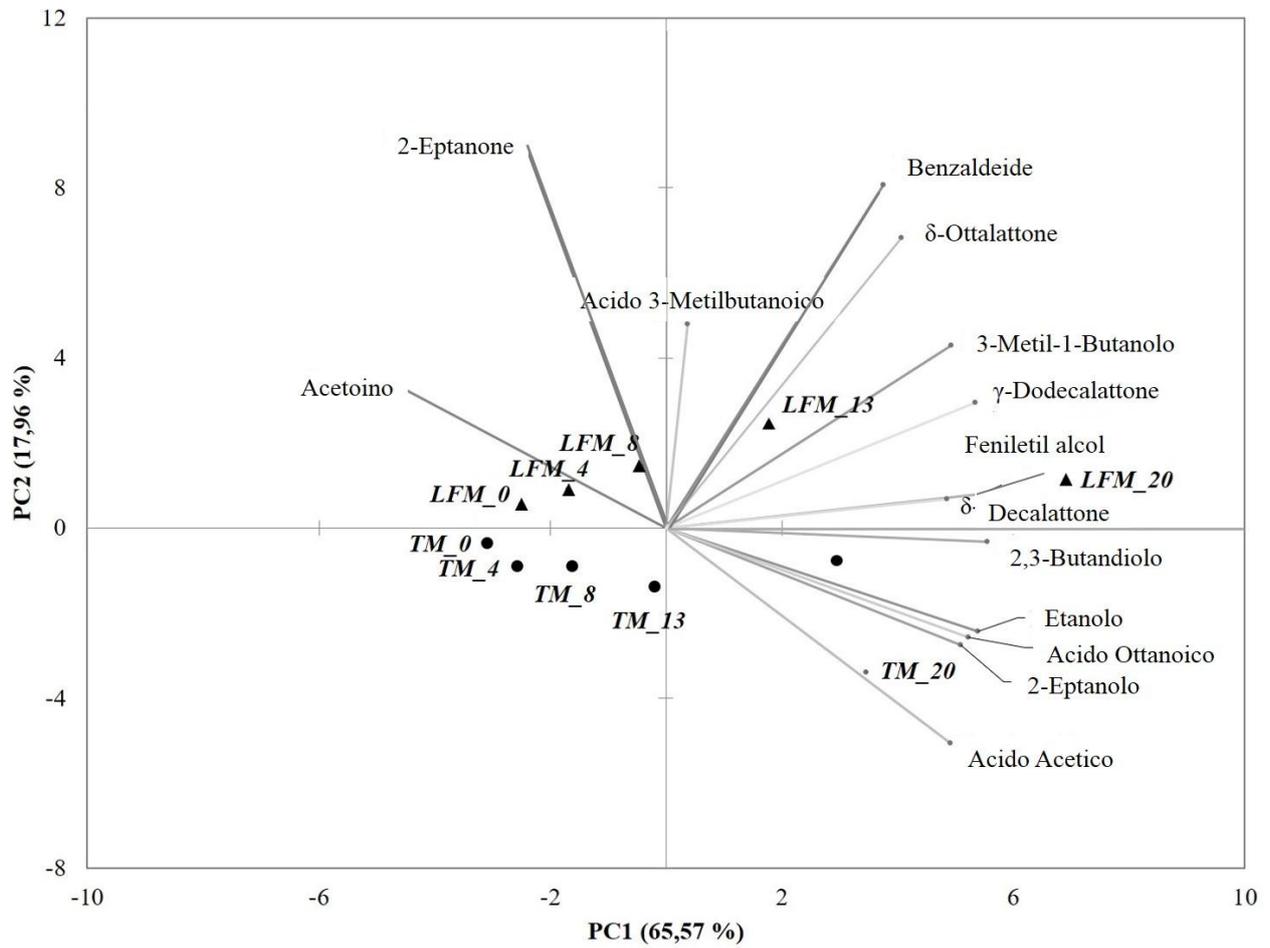


Figura 8.2. Biplot (loadings e scores) nel piano PC1-PC2 dei descrittori sensoriali di campioni di TM e LFM a diversi tempi di conservazione.

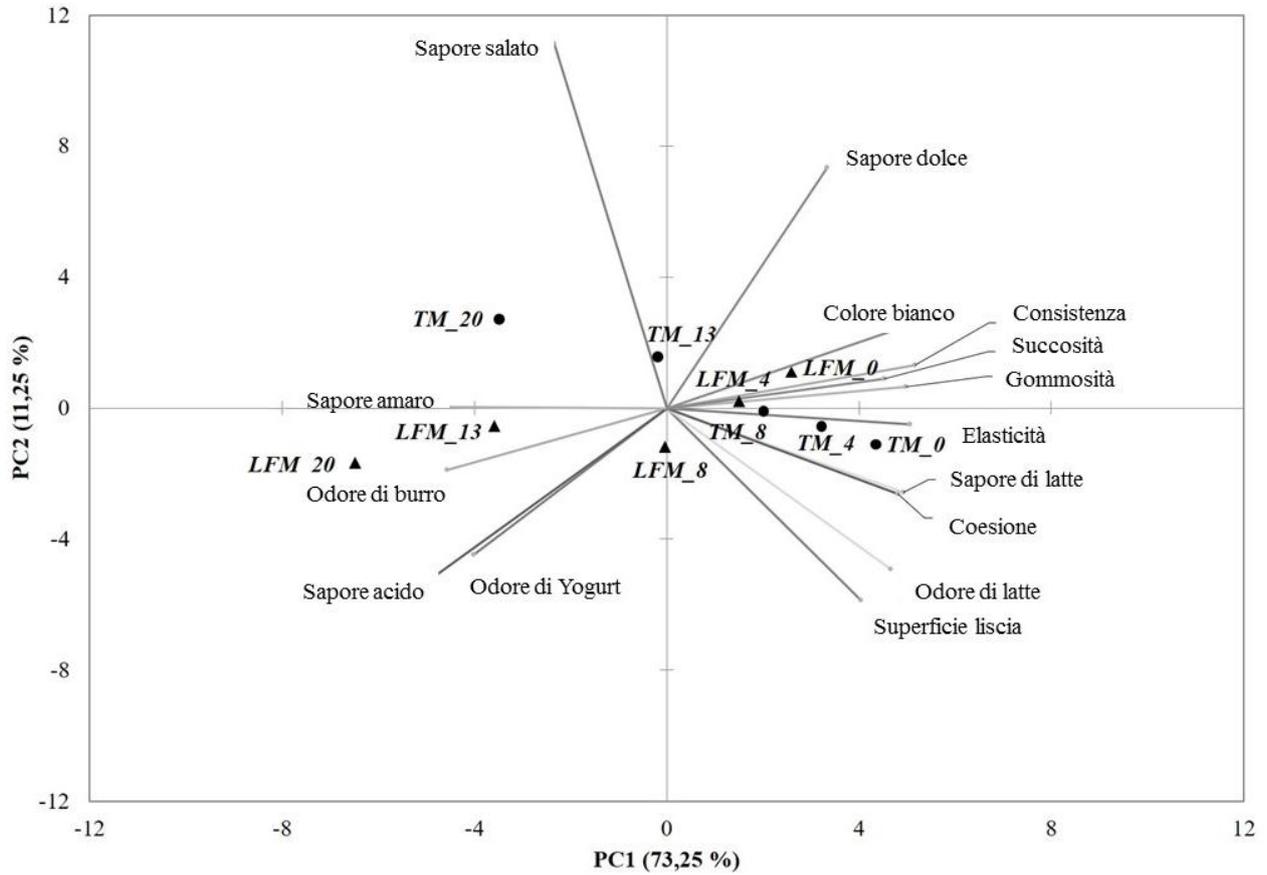
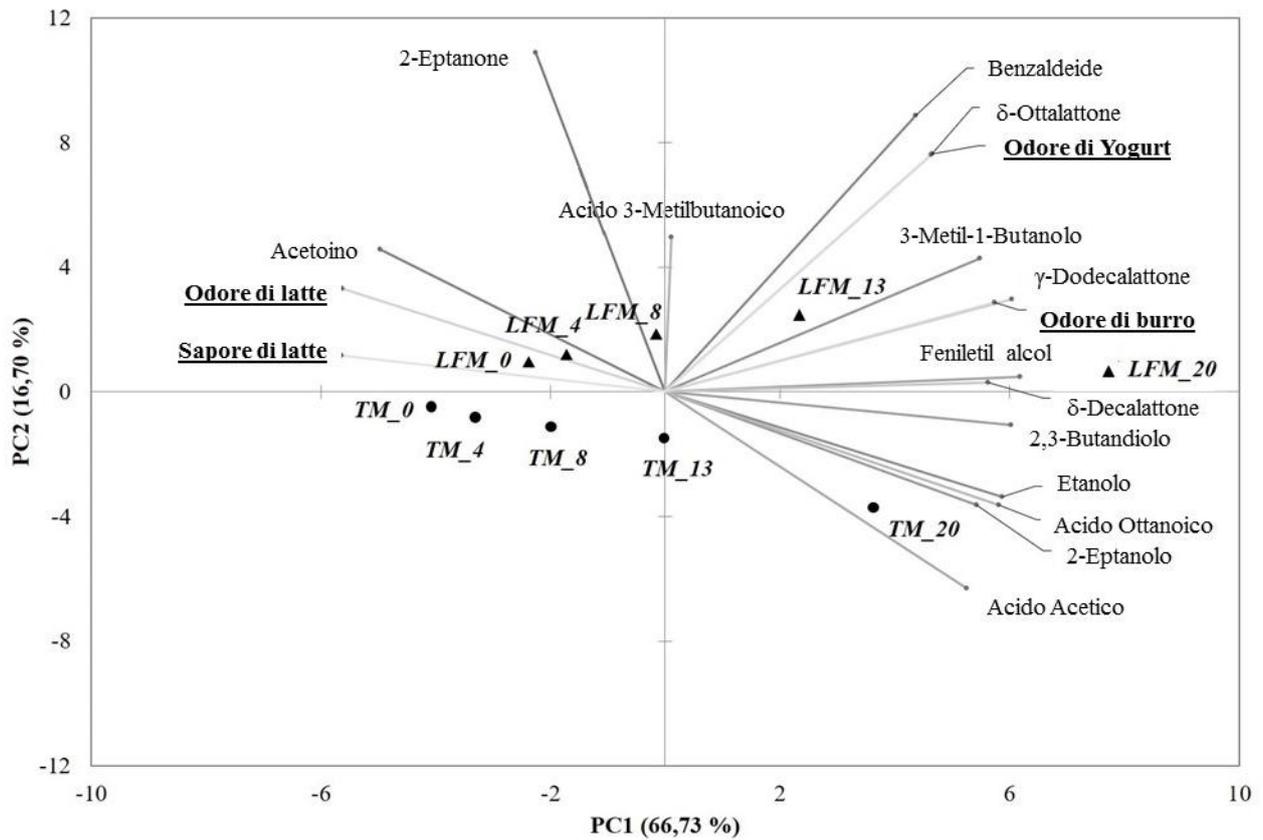


Figura 8.3. Biplot (loadings e scores) nel piano PC1-PC2 dei composti volatili e dei descrittori sensoriali di campioni di TM e LFM a diversi tempi di conservazione.



CONCLUSIONI

9.1 Conclusioni

L'attività di ricerca svolta ha consentito lo sviluppo di una nuova strategia produttiva per il miglioramento della qualità e sicurezza dei prodotti lattiero-caseari delattosati.

Nello specifico ha consentito di selezionare, caratterizzare e identificare due ceppi di lattobacilli probiotici, *L. reuteri* e *L. amilovorus*, con attività β -galattosidasica.

I ceppi sono stati utilizzati, singolarmente ed insieme, come adjunct culture nella produzione del formaggio Minas Frescal. *L. amilovorus* ha mostrato la maggiore attività β -galattosidasica riducendo a valori intorno a 0.3% il contenuto di lattosio del formaggio già al secondo giorno di produzione. Il formaggio così ottenuto manteneva le caratteristiche compositive (eccetto per il contenuto in lattosio), microbiologiche e reologiche del formaggio prodotto in maniera tradizionale.

In considerazione che i ceppi di lattobacilli impiegati nel presente studio oltre a presentare attività β -galattosidasica sono anche probiotici, l'innovazione di processo proposta consente di ottenere un formaggio fresco a ridotto contenuto di lattosio e, al contempo, funzionale. I formaggi probiotici sono, infatti, riconosciuti quali alimenti funzionali o “*function food*” ossia alimenti con effetti benefici e mirati su una o più funzioni dell'organismo tali che risultino evidenti un miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o una riduzione del rischio di malattia. In particolare, il consumo di prodotti alimentari probiotici migliora la flora e la funzionalità intestinale, rafforza il sistema immunitario, riduce i livelli di colesterolo nel siero, riduce il rischio di tumori e altre patologie del colon.

In un mercato mondiale in cui la domanda di alimenti “free from” e di alimenti salutistici (funzionali) è in continua crescita, l'innovazione di processo proposta lascia intravedere interessanti sviluppi per l'applicazione su larga scala.

BIBLIOGRAFIA

- Adalberto, P.R., Massabni, A.C., Carmona, E.C., Goulart, A.J., Marques, D.P., & Monti, R., (2010). Effect of divalent metal ions on the activity and stability of β -galactosidase isolated from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 31(3), 143 – 150.
- Alewijn M., Smit B. A., Sliwinski E. L., & Wouters J. T. M. (2007). The formation mechanism of lactones in Gouda cheese. *International dairy journal*, 17(1), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.002>.
- Ali A. A., (2010). Beneficial Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Human Health. *Research Journal of Microbiology*, Vol. 5, No. 12, pp. 1213-1221.
- Alichanidis E., (2007). What causes early and late gas blowing in white-brined cheeses? In: McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Cheese Problems Solved*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 161–162.
- Al-Kadamany, E., Khattar, M., Haddad, T., Toufeili, I., (2003). Estimation of shelf-life of concentrated yogurt by monitoring selected microbiological and physicochemical changes during storage. *Lebensm. Wiss. Technol.* 36, 407–414.
- Alliende F, Vial C, Espinoza K, Schnettle D, Romero V, Miquel I, Arancibia ME, Rios G, Rodriguez L, Quesada S, Lucero Y, Repetto GM. (2016). Accuracy of a Genetic Test for the Diagnosis of Hypolactasia in Chilean Children: Comparison with the Breath Test. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*; 63(1): e10-3.
- Alothman, M., Lusk, K., Silcock, P., Bremer, P., (2018). Relationship between total microbial numbers, volatile organic compound composition, and the sensory characteristics of whole fresh chilled pasteurized milk. *Food Packag. Shelf Life* 15, 69–75.
- Andersson, I., Osten, R., (1994). Nutritional quality of pasteurized milk. Vitamin B12, folate and ascorbic acid content during storage. *Int. Dairy J.* 4, 161–172.
- Ardö Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology advances*, 24(2), 238-242. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.005>.

- Ávila M., Gómez-Torres N., Delgado D., Gaya P., Garde S., (2016). Application of high-pressure processing for controlling *Clostridium tyrobutyricum* and late blowing defect on semihard cheese. *Food Microbiol.* 60, 165–173.
- Balciunas E. M., Martinez F. A. C., Todorov S. D., de Melo Franco B. D. G., Converti A., de Souza Oliveira R. P., (2013). Novel Biotechnological Applications of Bacteriocins: A Review. *Food Control*, Vol. 32, No. 1, pp. 134-142.
- Barbano, D.M., Ma, Y., Santos, M.V. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf-life. *J. Dairy Sci.* 89 (Suppl 1), E15–E19.
- Bedinghaus A. J., & Ockerman H. W. (1995). Antioxidative Maillard reaction products from reducing sugars and free amino-acids in cooked ground pork patties. *Journal of Food Science*, 60(5), 992–995.
- Beeren C. (2018). Application of descriptive sensory analysis to food and drink products. In S. Kemp, J. Hort, & T. Hollowood (Eds.), *Descriptive analysis in sensory evaluation* (pp. 611–646). Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell.
- Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L., Cogan T. M., (2001). Recent Advances in Cheese Microbiology. *International Dairy Journal*, Vol. 11, No. 4-7, pp. 259-274.
- Beyerlein L, Pohl D, Delco F, Stutz B, Fried M, Tutuian R. (2008). Correlation between symptoms developed after the oral ingestion of 50g lactose and results of hydrogen breath testing for lactose intolerance. *Aliment Pharmacol Ther*; 27(8): 659-65.
- Binetti P., Marcelli M., Baisi R. (2016). *Manuale di nutrizione clinica e scienze dietetiche applicate*. Società editrice Universo. Cap. 34, pp. 405-420.
- Braghieri, A., Zotta, T., Morone, G., Piazzolla, N., Majlesi, M., & Napolitano, F. (2018). Starter cultures and preservation liquids modulate consumer liking and shelf life of mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 85, 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.013>.

- Brändle, J., Domig, K.J., Kneifel, W., (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control* 67, 96–113.
- Brown, J.V., Ranjith, H.M.P., Prentice, G.A., (1984). Comparative shelf-lives of skimmed, semiskimmed and whole milks. *J. Soc. Dairy Technol.* 37 (4), 132–135.
- Cabrini A. & Neviani E. (1983). Il genere *Pseudomonas* causa di sapore amaro e di odore putrido sulla superficie di formaggio Mozzarella. *Il Latte*, 8, 90.
- Capuano E., Fedele F., Mennella C., Visciano M., Napolitano A., Lanzuise S., Fogliano V., (2007). Studies on the effect of amadoriase from *Aspergillus fumigatus* on peptide and protein glycation in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4189–4195.
- Chanadang S., Koppel K., & Aldrich G. (2016). The impact of rendered protein meal oxidation level on shelf-life, sensory characteristics, and acceptability in extruded pet food. *Animals*, 6 e 44.
- Chaudhary S., Sagar S., Kumar M., Sengar R.S., & Tomar A. (2015). The Use of Enzymes in Food Processing: A Review. *South Asian Journal of Food Technology and Environment*, 1(4), 2394 – 5168.
- Chen W., Chen H., Xia Y., Zhao J., Tian F., & Zhang H. (2008). Production, Purification, and Characterization of a Potential Thermostable Galactosidase for Milk Lactose Hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 91(5), 1751 – 1758.
- Chevanan, N., Muthukumarappan, K., Upreti, P., & Metzger, L. E. (2006). Effect of calcium and phosphorus, residual lactose and salt- to- moisture ratio on textural properties of Cheddar cheese during ripening. *Journal of Texture Studies*, 37(6), 711-730.
- Christiansen J. K., Hughes J. E., Welker D. L., Rodríguez B. T., Steele J. L., Broadbent J. R., (2008). Phenotypic and Genotypic Analysis of Amino Acid Auxotrophy in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 2, pp. 416-423.

- Cincotta F., Verzera A., Tripodi G., & Condurso C. (2018). Non-intentionally added substances in PET bottled mineral water during the shelf-life. *European Food Research and Technology*, 244(3), 433-439. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2971-6>.
- Clark George H., Clark Mary Ann, (2019). Process for the preparation of lactose-free and reduced phosphorus skim milk. US Patent 10,285, 413.
- Colahan-Sederstrom P. M., & Peterson D. G. (2005). Inhibition of key aroma compound generated during ultrahigh-temperature processing of bovine milk via epicatechin addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 398 e 402.
- Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G., (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13, 841–866.
- Condurso C., Cincotta F., Merlino M., Stanton C., & Verzera A. (2020). Stability of powdered infant formula during secondary shelf-life and domestic practices. *International Dairy Journal*, 104761. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104761>.
- Cruz R., Cruz V.D., Belote J.G., Khenayfes M.O., Dorta C., & Oliveira L.H.S. (1999). Properties of a new fungal β -galactosidase with potential application in the dairy industry. *Revista de Microbiologia*, 30(3), 265 – 271.
- Curioni P. M. G., & Bosset J. O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12(12), 959-984. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00124-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00124-3).
- Dahlqvist A.; Asp N.-G.; Burvall A.; Rausing H. (1977). Hydrolysis of lactose in milk and whey with minute amounts of lactase. *J. Dairy Res.*, 44, 541-548.
- De Swaaf, M.P.M.; van Dijk, A.A.; Edens, L.; Dekker, P.J.T. (2006). Enzyme Preparation Yielding A Clean Taste. EP1954808 B1.
- Dekker P.J.T. (2016). Enzymes Exogenous to Milk in Dairy Technology: β -D-Galactosidase. In *Reference Module in Food Sciences*, 1st ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; pp. 1–8.

- Dekker PJT, Koenders D, Bruins MJ. (2019). Lactose-Free Dairy Products: Market Developments, Production, Nutrition and Health Benefits. *Nutrients*;11(3). pii: E551.
- Delavenne E., Mounier J., Déniel F., Barbier G., Le Blay G., (2012). Biodiversity of Antifungal Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Milk Samples from Cow, Ewe and Goat over One-Year Period. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 155, No. 3, pp. 185-190.
- Delgado-Andrade C., Seiquer I., Navarro M. P., & Morales F. J. (2007). Maillard reaction indicators in diets usually consumed by adolescent population. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(3), 341–351.
- Donnelly C.W., (2007). What cheeses are the most liable to pathogens? Do pathogens grow during cheese ripening? In: McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Cheese Problems Solved*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 134–139.
- Dursun A., Güler Z., & Şekerli Y. E. (2017). Characterization of volatile compounds and organic acids in ultra-high-temperature milk packaged in tetra brik cartons. *International Journal of Food Properties*, 20(7), 1511-1521. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1213280>.
- Dutra Rosolen M., Gennari A., Volpato G., & Volken De Souza C.F. (2015). Lactose hydrolysis in milk and dairy whey using microbial β -galactosidases. *Enzyme Research*, 2015, 1 – 7. DOI: 10.1155/2015/806240.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2010). Scientific Opinion on lead in food. *EFSA Journal*, 8(4), 1570.
- Erich S., Anzmann T., Fischer L., (2012). Quantification of lactose using ion-pair RP-HPLC during enzymatic lactose hydrolysis of skim milk, *Food Chem.* 135, 2393–2396.
- Essig A.M. & Kleyn D.H. (1983). Determination of lactose in milk: comparison of methods, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66, 1514–1516.
- Evangelisti F.; Calcagno C.; Nardi S.; Zunin P. (1999). Deterioration of protein fraction by Maillard reaction in dietetic milks. *J. Dairy Res.*, 66, 237–243.

- F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, M.A. Ruiz, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, (2010). An integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk and dairy products, *J. Agric. Food Chem.* 58, 7141–7148.
- Fernandes A.M., Moretti T.S., Bovo F., Lima C.G., Oliveira C.A.F., (2008). Effect of somatic cell counts on lipolysis, proteolysis and apparent viscosity of UHT milk during storage. *Int. J. Dairy Technol.* 61 (4), 327–332.
- Wang, C. Y., Lin, P. R., Ng, C. C., & Shyu, Y. T. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*, 16(6), 578-585.
- Finocchiaro T.; Olson N.F.; Richardson T. (1980). Use of immobilized lactase in milk systems. *Adv. Biochem. Eng.*, 15, 71–88.
- Fioramonti J., Theodorou V., Bueno L., (2003). Probiotics: What Are They? What Are Their Effects on Gut Physiology? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Vol. 17, No. 5, pp. 711-724.
- Fiore A., Troise A. D., Mogol B. A., Roullier V., Gourdon A., Jian S. E., Fogliano V. (2012). Controlling the Maillard reaction by reactant encapsulation: Sodium chloride in cookies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(43), 10808–10814.
- Fox P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. M., Guinee T. P., (2004). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Elsevier.
- G. Fusch, A. Choi, N. Rochow, C. Fusch, (2011). Quantification of lactose content in human and cow's milk using UPLC-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 879, 3759–3762.
- G. Schaafsma (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition, *Int. Dairy J.* 18, 458–465.
- Gallois A. & Langlois D. (1990). New results in the volatile odorous compounds of French cheeses. *Le Lait*, 70 (2), 89-106. <https://doi.org/10.1051/lait:199028>.
- Gargova S., Pishtijski I., & Stoilova I. (1995). Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Biotec Eq*, 9(4), 47 – 51.

- Gavahian, M., Chu, Y.-H., Mousavi Khaneghah, A., Barba, F.J., Misra, N.N., (2018). A critical analysis of the cold plasma induced lipid oxidation in foods. *Trends Food Sci. Technol.* 77, 32–41.
- Górska-Warsewicz H, Rejman K, Laskowski W, Czeczotko M. (2019). Milk and Dairy Products and Their Nutritional Contribution to the Average Polish Diet. *Nutrients.* 11(8). pii: E1771.
- Greenberg, N. A., & Mahoney, R. R. (1981). Immobilisation of lactase (beta-galactosidase) for use in dairy processing: a review. *Process Biochemistry*, 16, 2-8.
- Griffiths M. W. & Tellez A. M., (2013). *Lactobacillus helveticus*: The Proteolytic System. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 4, pp. 1-9.
- Griffiths M. W. & Tellez A. M., (2013). *Lactobacillus helveticus*: The Proteolytic System. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 4, pp. 1-9.
- Griffiths M.W., Phillips J.D., (1988). Modelling the relation between bacterial growth and storage temperature in pasteurized milks of varying hygienic quality. *J. Soc. Dairy Technol.* 41 (4), 96–102.
- Grosová Z., Rosenberg M., & Rebroš M. (2008). Perspectives and applications of immobilized β -galactosidase in food industry – a review. *Czech J. Food Sci.*, 26(1), 1 – 14.
- Guinee T.P., Fox P.F., (2004). Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. vol. 1. Elsevier Ltd, London, pp. 207–259.
- Hannon J. A., Kilcawley K. N., Wilkinson M. G., Delahunty C. M., Beresford T. P., (2007). Flavor Precursor Development in Cheddar Cheese Due to Lactococcal Starters and the Presence and Lysis of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*, Vol. 17, No. 4, pp. 316- 327.
- Hardy J., (1986). Water activity and the salting of cheese. In: Eck, A. (Ed.), translated by C.D. Thomson *Cheesemaking-Science and Technology*, second ed. Lavoisier Publishing Inc., New York, pp. 37–61.

- Hardy J., (1986). Water activity and the salting of cheese. In: Eck, A. (Ed.), translated by C.D. Thomson *Cheesemaking-Science and Technology*, second ed. Lavoisier Publishing Inc., New York, pp. 37–61.
- Harju M. (1987). Lactose hydrolysis. *IDF Bulletin*, 212, 50e55, IDF, Brussels, Belgium.
- Harju M. (2004) Chromatographic and enzymatic removal of lactose from milk. *Bull. Int. Dairy Fed.*, 389, 4–8.
- Haro-Vicente J.F., Frontelaseta K., Romeo-Braquehais F., Ros Berruezo G., (2013). Changes in content of vitamins A and E in growing-up milk throughout its shelf life. *Int. J. Dairy Technol.* 66 (1), 31–36.
- Hatzinikolaou D.G., Katsifas E., Mamma D., Karagouni A.D., Christakopoulos P., & Kekos D., (2005). Modelling of the simultaneous hydrolysis–ultrafiltration of whey permeates by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Biochem. Eng. J.*, 24, 161 – 172.
- Helinck S., Bars D. L., Moreau D., Yvon M., (2004). Ability of Thermophilic Lactic Acid Bacteria to Produce Aroma Compounds from Amino Acids. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 7, pp. 3855-3681.
- Hellwig M., & Henle T. (2014). Baking, ageing, diabetes: A short history of the Maillard reaction. *Angewandte Chemie, International Edition in English*, 53(39), 10316–10329.
- Henle T. (2005). Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. *Amino Acids*, 29(4), 313–322.
- Henneberry, S., Wilkinson, M. G., Kilcawley, K. N., Kelly, P. M., & Guinee, T. P. (2015). Interactive effects of salt and fat reduction on composition, rheology and functional properties of mozzarella-style cheese. *Dairy Science & Technology*, 95(5), 613-638.
- Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Decaris B., Bolotin A., Delorme C., Ehrlich S. D., Guédon E., Monnet V., Renault P., Kleerebezem M., (2005). *New Insights in the Molecular Biology and Physiology of*

- Streptococcus thermophilus* Revealed by Comparative Genomics. FEMS Microbiology Review, Vol. 29, No. 3, pp. 435-463.
- Hough G., & Garitta L. (2012). Methodology for sensory shelf-life estimation: A review. *Journal of Sensory Studies*, 27, 137–147.
 - Hovde O, Farup PG. (2009). A comparison of diagnostic tests of lactose malabsorption: which one is best? *BMC Gastroenterol* [online]; 9: 82.
 - Hu X., Robin S., O’Connell S., Walsh G., & Wall J.G. (2010). Engineering of a fungal β -galactosidase to remove product inhibition by galactose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 87(5), 1773 – 1782.
 - Husain, Q. (2010). β -Galactosidases and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1), 41 – 62.
 - Irlinger F., Layec S., Hélinck S., Dugat-Bony E., (2015). Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 362 (2). Article number fnu015.
 - ISO 13299 (2003). General guidance for establishing a sensory profile. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
 - ISO 22662, (2007). Milk and Milk Products–Determination of Lactose Content by High Performance Liquid Chromatography (Reference method).
 - ISO 8586-1 (1993). Sensory analysis: General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1. Selected assessors. Geneva, Switzerland: International Standardisation Organisation.
 - ISO 8589 (1988). Sensory Analysis - General Guidance for the Design of Test Rooms. International Standardization Organization, Geneva, Switzerland.
 - J. Schripsema, (2008). Comprehensive analysis of polar and apolar constituents of butter and margarine by nuclear magnetic resonance, reflecting quality and production processes, *J. Agric. Food Chem.* 56, 2547–2552.
 - James M. Jay, Martin J. Loessner, David A., (2009). *Microbiologia degli alimenti*. Golden pp157-180.

- Jansson T., Clausen M. R., Sundekilde U. K., Eggers N., Nyegaard S., Larsen L. B., et al. (2014a). Lactose-hydrolyzed milk is more prone to chemical changes during storage than conventional ultra-high-temperature (UHT) milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7886e7896.
- Jansson T., Clausen M. R., Sundekilde U. K., Eggers N., Nyegaard S., Larsen L. B., Bertram H. C., (2014). Lactose-hydrolyzed milk is more prone to chemical changes during storage than conventional Ultra-High-Temperature (UHT) milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(31), 7886–7896.
- Jansson T., Jensen H. B., Sundekilde U. K., Clausen M. R., Eggers N., Larsen L. B., Ray C., Andersen H. J., & Bertram H. C. (2014). Chemical and proteolysis-derived changes during long-term storage of lactose-hydrolyzed ultrahigh-temperature (UHT) milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(46), 11270-11278. <https://doi.org/10.1021/jf504104q>
- Jansson T.; Jensen H.B.; Sundekilde U.K.; Clausen M.R.; Eggers N.; Larsen L.B.; Ray C.; Andersen H.J.; Bertram H.C. (2014). Chemical and proteolysis-derived changes during long-term storage of lactose-hydrolyzed ultrahigh-temperature (UHT) milk. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 11270–11278.
- Jazairi A., Ghorrah A., & Bakri Y. (2014). Isolation and identification of a new yeast isolate with high beta-galactosidase activity from Syrian dairy products. *International Food Research Journal*, 21(2), 541–546.
- Jelen P.; Tossavainen O. (2003). Low lactose and lactose-free dairy products—prospects, technologies and applications. *Aust. J. Dairy Technol.*, 58, 161–165.
- Jensen S., Jansson T., Eggers N., Clausen M. R., Larsen L. B., Jensen H. B., et al. (2015). Storage-induced changes in the sensory characteristics and volatiles of conventional and lactose-hydrolyzed UHT processed milk. *European Food Research and Technology*, 240, 1247 e 1257.
- Juajun O., Nguyen T.H., Maischberger T., Iqbal S., Haltrich D., & Yamabhai M. (2011). Cloning, purification, and characterization of β galactosidase from *Bacillus licheniformis* DSM 13. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89(3), 645 – 654.

- Kaushik R., Sachdeva B., Arora S., (2014). Vitamin D2 stability in milk during processing, packaging and storage. *LWT- Food Sci. Technol.* 56 (2), 421–426.
- Kelly A.L., & Fox P.F. (2012). *Biochemistry of Milk Processing*. In B.K. Simpson (Ed.), *Food Biochemistry and Food Processing (Second Edition)*. New Delhi: Wiley-Blackwell.
- Kilcast D. (2000). *Sensory evaluation methods for shelf-life assessment. The stability and shelf-life of food*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Kong Y., Strickland M., & Broadbent J. R. (1996). Tyrosine and phenylalanine catabolism by *Lactobacillus casei* flavor adjuncts: biochemistry and implications in cheese flavor. *Journal of Dairy Science*, 79 (1), 101. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74560-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74560-2).
- Kongo J. M., (2013). *Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments*. Chapter 1.
- L. Monti, S. Negri, A. Meucci, A. Stroppa, A. Galli, G. Contarini, (2017). Lactose, galactose and glucose determination in naturally lactose free hard cheese: HPAEC-PAD method validation, *Food Chem.* 220, 18–24.
- Law D, Conklin J, Pimentel M. (2010). Lactose intolerance and the role of the lactose breath test. *Am J Gastroenterol*; 105(8):1726-8.
- Lawless H. T., & Heymann H. (2010). *Sensory evaluation of food: Principles and practices*. New York: Springer Science & Business Media. Boor, K.J. (2001). Fluid dairy product quality and safety: looking to the future. *J. Dairy Sci.* 84 (1), 1–11.
- Lemieux L., Simard R.E., (1991). Bitter flavour in dairy products. I. A review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait* 71, 599–636.
- Lemieux L., Simard R.E., (1992). Bitter flavour in dairy products (II): a review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure, masking and inhibition. *Lait* 72, 335–382.

- Leonardi M., Gerbault P., Thomas M. G., & Burger J. (2012). The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence. *International Dairy Journal*, 22(2), 88-97.
- Liu S. N., Han Y. and Zhou Z. J., (2011). Lactic Acid Bacteria in Traditional Fermented Chinese Foods. *Food Research International*, Vol. 44, No. 3, pp. 643-651.
- Lutke-Entrup M.L., Günther H.-O., Van Beek P., Grunow M., Seiler T., (2005). Mixed-integer linear programming approaches to shelf-life-integrated planning and scheduling in yoghurt production. *Int. J. Prod. Res.* 43 (23), 5071–5100.
- Mahoney R. R. (1997). Lactose: enzymatic modification. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced dairy chemistry (2nd ed.)*. Lactose, water, salts and vitamins, Vol. 3 (pp. 77-125) London, UK: Chapman & Hall.
- Man, D.C.M., (2015). *Shelf Life*, second ed. Wiley Blackwell, UK.
- Maragkoudakis P. A., Miaris C., Rojez P., Manalis N., Magkanari F., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., (2006). Production of Traditional Greek Yoghurt Using *Lactobacillus* Strains with Probiotic Potential as Starter Adjuncts. *International Dairy Journal*, Vol. 16, No. 1, pp. 52-60.
- Marcos A., (1999). Water activity in cheese in relation to composition, stability and safety. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, second ed. vol. 1. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, pp. 439–470.
- Martin N.H., Boor K.J., Martin Wiedmann, M. (2017). Effect of post pasteurization contamination on fluid milk quality. *J. Dairy Sci.* 101 (1), 861–870.
- Mäyrä-Mäkinen A. & Bigret M., (2004). Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. In: S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand, Eds., *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 175-198.
- Mcgrane M.M.; Essery E.; Obbagy J.; Lyon J.; Macneil P.; Spahn J.; van Horn L. (2011). Dairy consumption, blood pressure, and risk of hypertension: An evidence-based review of recent literature. *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.*, 5, 287–298.

- McSweeney P. L. H. & Sousa M. J., (2000). Biochemical Pathways for the Production of Flavour Compounds in Cheese during Ripening: A Review. *Lait*, Vol. 80, No. 3, pp. 293-324.
- McSweeney P. L., & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*, 80(3), 293-324. <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>.
- McSweeney P. L., Fox P. F., & Ciocia F. (2017). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Fourth Edition, (pp. 411-421). Academic Press.
- McSweeney P.L.H., (2007). Flavour, texture and flavour defects in hard and semi-hard cheeses. In: McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Cheese Problems Solved*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 189–207.
- McSweeney P.L.H., (2007). Flavour, texture and flavour defects in hard and semi-hard cheeses. In: McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Cheese Problems Solved*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 189–207.
- Meinhart E., & Schreier P. (1986). Study of flavour compounds from Parmigiano Reggiano cheese. *Milchwissenschaft*, 41(11), 689-691.
- Mendoza M.R.; Olano A.; Villamiel M. (2005). Chemical indicators of heat treatment in fortified and special milks. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2995–2999.
- Mennella C., Borrelli R. C., Vinale F., Ruocco M., & Fogliano V., (2005). Substrate specificity of amadoriase I from *Aspergillus fumigatus*. *Maillard Reaction: Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease*, 1043, 837–844.
- Mitra S., Chakrabartty P. K., Biswas S. R., (2010). Potential Production and Preservation of Dahi by *Lactococcus lactis* W8 a Nisin-Producing Strain. *LWT-Food Science and Technology*, Vol. 43, No. 2, pp. 337-342.
- Mittal S.B.; Newell G.; Hourigan J.A.; Zadow J.G. (1991). The effect of protease contamination in lactase on the flavour of lactose-hydrolysed milks. *Aust. J. Dairy Technol.*, 46, 46–47.

- Moatsou G. & Moschopoulou E., (2014). Microbiology of raw milk. In: Ozer, B., Akdemir-Evrendilek, G. (Eds.), Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–38.
- Moio L., Langlois D., Etievant P. X., & Addeo F. (1993). Powerful odorants in water buffalo and bovine Mozzarella cheese by use of extract dilution sniffing analysis. *Italian journal of food science*, 5(3), 227-237.
- Moon S. K., Wee Y. J., Choi G. W., (2012). A Novel Lactic Acid Bacterium for the Production of High Purity L Lactic Acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* CHB2121. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 114, No. 2, pp. 155-159.
- Moschopoulou E., Moatsou G., Syrokou M.K., Paramithiotis S., Drosinos E.H. (2019). Food quality changes during shelf life. *Food Quality and Shelf Life*. Volume 1, pp. 1-31.
- Mossine V. V., & Mawhinney T. P. (2010). 1-Amino-1-deoxy-D-fructose (“fructosamine”) and its derivatives. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 64, 291–402.
- Moyssiadi, M., Badeka, A., Kondyli, E., Vakirtzi, T., Savvaidis, I., Kontominas, M.G., (2004). Effect of light transmittance and oxygen permeability of various packaging materials on keeping quality of low-fat pasteurized milk: chemical and sensorial aspects. *Int. Dairy J.* 14, 429–436.
- Mozumder, H.N.M.R., Akhtaruzzaman, M., Bakr, M.A., & Zohra, F.T. (2012). Study on isolation and partial purification of lactase (β -galactosidase) enzyme from *Lactobacillus* bacteria isolated from yogurt. *J. Sci. Res. J. Sci. Res*, 4(41), 239 – 249.
- Natrella G., Faccia M., Lorenzo J. M., De Palo P., & Gambacorta G. (2020). Sensory characteristics and volatile organic compound profile of high-moisture mozzarella made by traditional and direct acidification technology. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17059>.
- Natrella G., Gambacorta G., De Palo P., Lorenzo J. M., & Faccia M. (2020). Evolution of volatile compounds from milk to curd during manufacturing of

- Mozzarella. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 70(1), 50-58. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2020.0105>.
- Nicoli, M.C., Calligaris, S., (2018). Secondary shelf life: an underestimated issue. *Food Eng. Rev.*10 (2), 57–65.
 - Nielsen S. D., Jansson T., Le T. T., Jensen S., Eggers N., Rauh V., Sundekilde U. K., Sørensen J., Andersen H. J., Bertram H. C., & Larsen L. B. (2017). Correlation between sensory properties and peptides derived from hydrolysed-lactose UHT milk during storage. *International dairy journal*, 68, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.013>.
 - Nizamuddin, S., Sridevi, A., & Narasimha, G. (2008). Production of β galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid - state fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 1096 – 1100.
 - Notermans, S., (1993). A user guide to microbial challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. *Int. J. Food Microbiol.* 10, 145–147.
 - Nursten H. E. (2005). *The maillard reaction: Chemistry, biochemistry, and implications*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
 - Oort, M. van (2010). Enzymes in Food Technology - introduction. In R. J. Whitehurst & M. van Oort (Eds.), *Enzymes in Food Technology (Second Edition)*. Iowa, USA: A John Wiley & Sons.
 - Ortuzar, J., Martinez, B., Bianchini, A., Stratton, J., Rupnow, J., Wang, B., (2018). Quantifying changes in spore-forming bacteria contamination along the milk production chain from farm to packaged pasteurized milk using systematic review and meta-analysis. *Food Control* 86, 319–331.
 - Pandey, A., Negi, S., & Soccol, C.R. (2017). *Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products*. Amsterdam: Elsevier.
 - Panesar P. S., (2011). Fermented Dairy Products: Starter Cultures and Potential Nutritional Benefits. *Food and Nutrition Sciences*, Vol. 2, No. 1, pp. 47-51.

- Panesar, P.S., Kumari, S., & Panesar, R. (2010). Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enz Res*, 2010, 1 – 16. DOI: 10.4061/2010/473137.
- Panesar, P.S., Marwaha, S.S., & Chopra, H.K. (2010). *Enzymes in food processing: fundamentals and potential applications*. New Delhi: I K International Publish.
- Panesar, P.S., Panesar, R., Singh, R.S., Kennedy, J.F., & Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *J Chem Tech Biotech*, 81(4), 530 – 543.
- Park, Y.W. (2009). Introduction: Overview of bioactive components in milk and dairy products. In *Bioactive Components in Milk and Dairy Products*; Park, Y.W., Ed.; Publishers, Wiley- Blackwell: Ames, Iowa; Oxford, UK; pp. 3–14. ISBN 978-3-86944-021-7.
- Pinto, S.M., Clemente, M.D.G., Ronaldo de Abreu, L., (2009). Behaviour of volatile compounds during the shelf life of yoghurt. *Int. J. Dairy Technol.* 62 (2), 215–223.
- Pischetsrieder M., & Henle T. (2012). Glycation products in infant formulas: Chemical, analytical and physiological aspects. *Amino Acids*, 42(4), 1111-1118.
- Princely, S., Saleem Basha, N., Kirubakaran, J.J., & Dhanaraju, M.D. (2013). Biochemical characterization, partial purification, and production of an intracellular β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* grown in whey. *European Journal of Experimental Biology*, 3(2), 242 – 251.
- Rondinini G., & Garzaroli C. (1990). Mozzarella prodotte per acidificazione chimica: Aspetti microbiologici e alterativi. *Industrie Alimentari*, 29, 329-334.
- Roos, Y.H., (2001). Water activity and plasticization. In: Eskin, N.A.M., Robinson, D.S. (Eds.), *Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical and Microbiological Changes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 3–36.
- Sabia E., Gauly M., Napolitano F., Cifuni G. F., & Claps S. (2020). The effect of different dietary treatments on volatile organic compounds and aromatic characteristics of buffalo Mozzarella cheese. *International Journal of Dairy Technology*. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12696>.

- Sacchi R., Marrazzo A., Masucci F., Di Francia A., Serrapica F., & Genovese A. (2020). Effects of Inclusion of Fresh Forage in the Diet for Lactating Buffaloes on Volatile Organic Compounds of Milk and Mozzarella Cheese. *Molecules*, 25(6), 1332. <https://doi.org/10.3390/molecules25061332>.
- Schoder, D., Zangerl, P., Manafi, M., Wagner, M., Lindner, G., Foissy, H. (2007). *Bacillus cereus*—a foodborne pathogen of different risk potential for the dairy industry [Bacillus cereus—Ein problemkeim der milchwirtschaft mit unterschiedlich eingeschätztem risikopotenzial]. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 94 (1–2), 25–33.
- Scopes, R.K. (2002). Enzyme Activity and Assays. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1 – 6. DOI: 10.1038/npg.els.0000712.
- Shah N. P., (2007). Functional Cultures and Health Benefits. *International Dairy Journal*, Vol. 17, No. 11, pp.1262-1277.
- Sharma R., Sanodiya B. S., Bagrodia D., Pandey M., Sharma A., Bisen P. S., (2012). Efficacy and Potential of Lactic Acid Bacteria Modulating Human Health. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, Vol. 3, No. 4, pp. 935-948.
- Sheehan, J.J., (2007). What causes the development of gas during ripening? In: McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Cheese Problems Solved*. Woodhead Publishing, Cambridge, pp.131–133.
- Silcock, P., Alothman, M., Zardin, E., (2014). Microbially induced changes in the volatile constituents of fresh chilled pasteurized milk during storage. *Food Packag. Shelf Life* 2, 81–90.
- Silveti, T., Morandi, S., Brasca, M., (2018). Growth factors affecting gas production and reduction potential of vegetative cell and spore inocula of dairy-related *Clostridium* species. *LWT- Food Sci. Technol.* 92, 32–39.
- Singh K., Kallali B., Kumar A., Thaker V., (2011). Probiotics: A Review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol. 1, No. 2, pp. S287-S290.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P.K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.*, 6(2), 1 – 15.
- Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Pati, S., & Del Nobile, M. A. (2008).

- Sirichat Chanadang e Edgar Chambers IV, (2019). Sensory Shelf Life Estimation of Novel Fortified Blended Foods Under Accelerated and Real- Time Storage Conditions. *Journal of Food Science*. Volume 84, capitulo 9, pp. 2638-2645.
- Smet, K., De Block, J., De Campeneere, S., De Brabander, D., Herman, L., Raes, K., Dewettinck, K., Coudijzer, K., (2009). Oxidative stability of UHT milk as influenced by fatty acid composition and packaging. *Int. Dairy J.* 19, 372–379.
- Soccol, C.R., Woiciechowski, A.L., Spier, M.R., Medeiros, A.B.P., & Haghi, A.K. (2012). Advances and Applications of Galactosidases in Food Industry. In A. K. Haghi (Ed.), *Food Science: Research and Technology* (pp. 57 – 73). Apple Academic Press.
- Somoza V. (2005). Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(7), 663–672.
- Spagnol, W.A., Silveira Jr., V., Pereira, E., Filho, N.G., (2018). Monitoring the cold chain: new technologies and recent advances [Monitoramento da cadeia do frio: Novas tecnologias e recentes avanços]. *Braz. J. Food Technol.* 21, 2–8.
- Steele J., Broadbent J., Kok J., (2013). Perspective on the Contribution of Lactic Acid Bacteria to Cheese Flavor Development. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 24, No. 2, pp. 135-141.
- Stoeckel, M., Lidolt, M., Stressler, T., Fischer, L., Wenning, M., Hinrichs, J., (2016). Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: a challenge in the production of ultra-high temperature milk products. *Int. Dairy J.* 61, 250–261.
- Suchy, F.J.; Brannon, P.M.; Carpenter, T.O.; Fernandez, J.R.; Gilsanz, V.; Gould, J.B.; Hall, K.; Hui, S.L.; Lupton, J.; Mennella, J.; et al. (2010). National Institutes of Health Consensus Development Conference: Lactose intolerance and health. *Ann. Intern. Med.*, 152, 792–796.
- Swagerty DL, Jr., Walling AD, Klein RM (2002), Lactose intolerance, *Am Fam Physician*; 65(9): 1845-1851.

- Taoukis P.S., Labuza T.P. (1989). Applicability of time-temperature indicators as shelf-life monitors of food-products. *J. Food Sci.* 54, 783–788.
- Teles De Faria, J., Lopes Moraes, M., Borghi, A.D., Converti, A., Lopes Passos, F. M., Minim, L.A., Coelho Sampaio, F. (2012). Use of response surface methodology to predict optimal conditions of *Kluyveromyces lactis* permeabilization by a physical method. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 26(2), 119 – 125.
- Thierry A., Maillard M.B., Richoux R., Kerjean J.R., & Lortal S. (2005). *Propionibacterium freudenreichii* strains quantitatively affect production of volatile compounds in Swiss cheese. *Lait*, 85, 57-74. <https://doi.org/10.1051/lait:2004036>.
- Troise A. D., & Fogliano V. (2013). Reactants encapsulation and Maillard reaction. *Trends in Food Science & Technology*, 33(1), 63–74.
- Troise A. D., Bandini E., De Donno R., Meijer G., Trezzi M., & Fogliano V. (2016). The quality of low lactose milk is affected by the side proteolytic activity of the lactase used in the production process. *Food Research International*, 89, 514-525. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.021>.
- Troise A. D., Dathan N. A., Fiore A., Roviello G., Di Fiore A., Caira S., Monti S. M., (2014). Faox enzymes inhibited Maillard reaction development during storage both in protein glucose model system and low lactose UHT milk. *Amino Acids*, 46 (2), 279–288.
- Troise A. D., Fiore A., Colantuono A., Kokkinidou S., Peterson D. G., & Fogliano V., (2014). Effect of olive mill wastewater phenol compounds on reactive carbonyl species and Maillard reaction end-products in ultrahigh-temperature-treated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41), 10092–10100.
- Troise A.D., Buonanno M., Fiore A., Monti S.M., Fogliano V., (2016). Evolution of protein bound Maillard reaction end-products and free Amadori compounds in low lactose milk in presence of fructosamineoxidase I. *Food Chemistry* 212, 722-729.
- Troise A.D.; Bandini E.; De Donno R.; Meijer G.; Trezzi M.; Fogliano V. (2016). The quality of low lactose milk is affected by the side proteolytic activity of the lactase used in the production process. *Food Res. Int.*, 89, 514–525.

- Use of active compounds for prolonging the shelf-life of mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 18 (6), 624-630. <https://doi.org/10.1016/j.2007.11.022>.
- Van Boekel M. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, 62(4), 403–414.
- Van Boekel M., Fogliano V., Pellegrini N., Stanton C., Scholz G., Lalljie S., Eisenbrand G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(9), 1215–1247.
- Van Scheppingen, W.B.; van Hilten, P.H.; Vijverberg, M.P.; Duchateau, A.L.L. (2017). Selective and sensitive determination of lactose in low-lactose dairy products with HPAEC-PAD. *J. Chromatogr. B.*, 1060, 395–399.
- Vassila, E., Badeka, A., Kondyli, E., Savvaidis, I., Kontominas, M.G., (2002). Chemical and microbiological changes in fluid milk as affected by packaging conditions. *Int. Dairy J.* 12, 715–722.
- Veillet-Poncet, L., (1986). Manufacturing hygiene. In: Eck, A. (Ed.), translated by C.D. Thomson. *Cheesemaking-Science and Technology*, Second ed. Lavoisier Publishing Inc., New York, pp. 148–149.
- Vuorisalo, T., Arjamaa, O., Vasemägi, A., Taavitsainen, J. P., Tourunen, A., Saloniemi, I. (2012). High lactose tolerance in North Europeans: a result of migration, not in situ milk consumption. *Perspectives in Biology and Medicine*, 55(2), 163-174.
- Walstra, P.; Geurts, T.J.; Noomen, A.; Jellema, A.; van Boekel, M.A.J.S. (1999). *Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes*; Marcel Dekker Inc.: New York, NY, USA; Chapter 22; pp. 555–600.
- Watson, M., McEwan, J.A., (1995). Sensory changes in liquid milk during storage and the effect on consumer acceptance. *J. Soc. Dairy Technol.* 48 (1), 1–8.
- Wong N. P., Ellis R., & LaCroix D. E. (1975). Quantitative determination of lactones in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 58(10), 1437-1441. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84734-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84734-5).

- Yantyati Widyastuti, Rohmatussolihat, Andi Febrisiantosa, (2014). The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. Food and Nutrition Sciences. Vol.5 No.4(2014), Articolo ID:42817,8 pagine.
- Yaylayan V. A., & Huyghuesdespointes A. (1994). Chemistry of Amadori rearrangement products – analysis, synthesis, kinetics, reactions, and spectroscopic properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 34(4), 321–369.
- Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M.K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., Coma, V., (2018). Active packaging applications for food. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 17 (1), 165–199.
- Zacharof M. P. & Lovitt R. W., (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. APCBEE Procedia, Vol. 2, pp. 50-56.
- Zadow, J. G. (1986). Lactose hydrolysed dairy products. Food Technology in Australia, 38, 460-462, 471.
- Zadow, J.G. (1984). Lactose: properties and uses. Journal of Dairy Science, 67, 2654-2679.
- Zalán Z., Hudáček J., Štětina J., Chumchalová J., Halász A., (2010). Production of Organic Acids by Lactobacillus Strains in Three Different Media. European Food Research Technology, Vol. 230, No. 3, pp. 395-404.
- Zhang, X., Sun, G., Xiao, X., Liu, Y., Zheng, X. (2016). Application of microbial TTIs as smart label for food quality: response mechanism, application and research trends. Trends Food Sci. Technol. 51, 12–23.
- Ziarno, M., Zaręba, D. (2010). Characteristics and occurrence of *Paenibacillus bacteria* in milk and milk products [Charakterystyka i występowanie bakterii rodzaju *Paenibacillus* w mleku i przetworach mlecznych]. Med. Weter. 66 (9), 600–603.
- Ziyaina, M., Rasco, B., Coffey, T., Mattinson, D.S., Salbani, S., (2018). Correlation of volatile compound concentrations with bacterial counts in whole pasteurized milk under various storage conditions. Int. J. Dairy Technol. 70 (1), 1–11.

- Mangan D.; McCleary B. V., Culleton H, C., Cornaggia C, Ivory R., McKie V. A., Delaney E., Kargelis T. (2019). A novel enzymatic method for the measurement of lactose in lactose- free products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Volume 99, Issue 2.
- ASTM International (2011). Standard guide for sensory evaluation methods to determine the sensory shelf life of consumer products. (E2454-05). Retrieved from [https://compass.astm.org/EDIT/html_annot.cgi?E2454+05\(2011\)](https://compass.astm.org/EDIT/html_annot.cgi?E2454+05(2011)).
- Euromonitor Database. Available online: <https://www.euromonitor.com/>. Consultato il 16.05.2020.
- FAO (2018). Gateway to Dairy Production and Products FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available online: <http://www.fao.org/dairy-production-products/production/en/>. Consultato il 15.05.2020.
- <https://blast.ncbi.nlm.nih>.
- <https://www.foodhubmagazine.com/2019/04/18/intolleranza-al-lattosio-consumo-di-latte-e-derivati/>.
- NIDDK website (<https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/lactose-intolerance?dkrd=hispt0264>) "Lactose Intolerance". June 2014. Consultato il 14.05.2020.
- www.canvaxbiotech.com consultato il 08.11.2020.