



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

STUDIO DELL'EFFETTO DI SALAMOIE AD
ELEVATA CONCENTRAZIONE SALINA
SULLA CARICA DI *PSEUDOMONAS* SPP. IN
MOZZARELLA

STUDY OF THE EFFECT OF BRINE WITH A HIGH SALINE
CONCENTRATION ON THE LOADS OF *PSEUDOMONAS* SPP. IN
MOZZARELLA CHEESE

Studente:
Gianmarco Pettinari

Relatore:
Dott.ssa Cristiana Garofalo

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Il latte.....	4
1.1.1 Proteine del latte e cagliata	5
1.2 Mozzarella a bassa umidità.....	6
1.3 Autocontrollo e HACCP.....	10
1.3.2 Critical control point (CCP).....	12
1.4 <i>Pseudomonas</i> spp.	13
1.4.1 Problematiche associate a <i>Pseudomonas</i> spp. nella mozzarella	14
1.5 Osmolarità e crescita microbica.....	15
1.6 Analisi della letteratura scientifica.....	16
2. SCOPO DELLA TESI.....	18
3. MATERIALI E METODI.....	19
3.1 Campionamento	19
3.2 Conte vitali in piastra su terreno selettivo per <i>Pseudomonas</i> spp.	20
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	21
4.1 Conte vitali in piastra	21
5. CONCLUSIONI.....	25
6. BIBLIOGRAFIA.....	26

1.INTRODUZIONE

1.1 Il latte

Il latte è un alimento per cui esistono molte definizioni da un punto di vista giuridico (Regio Decreto 994/1929), “Per latte alimentare si intende il prodotto ottenuto dalla mungitura regolare, ininterrotta e completa delle mammelle di animali in buono stato di salute e nutrizione. Solo con il termine latte si intende quello di vacca, per quelli diversi si deve precisare la specie dell’animale (latte di capra, latte di pecora).”

La definizione bio-fisiologica di latte prevede che “Il latte è il prodotto della secrezione delle ghiandole mammarie delle femmine dei mammiferi, destinato all’alimentazione dei piccoli”, mentre la definizione chimico-organolettica precisa che “Il latte si presenta come un liquido di colore bianco opalescente, di odore caratteristico e di sapore dolciastro. A pH vicino alla neutralità, è formato da una fase acquosa in cui sono disperse molecole solubili (lattosio, sali minerali), colloidali (proteine), grassi e sostanze ad elevata attività biologica (vitamine ed enzimi).”

In dettaglio, il latte è un liquido eterogeneo nel quale coesistono 3 fasi distinte: la fase di soluzione che è costituita dalle sostanze solubili in soluzione acquosa (lattosio, sali minerali, proteine solubili, sostanze azotate non proteiche, enzimi), la fase di sospensione colloidale che è costituita dalle micelle caseiniche disperse nella soluzione acquosa e la fase di emulsione che è costituita dai globuli di grasso in fase acquosa. Queste diverse fasi sono in equilibrio instabile; infatti la conservazione del latte a temperatura ambiente comporta, entro le prime 12-24 h, la separazione e la risalita in superficie della fase grassa in emulsione (affioramento) e, successivamente, in seguito all’azione biologica dei microrganismi, la separazione della sospensione caseinica con formazione del coagulo (Simpson et al., 2012).

1.1.1 Proteine del latte e cagliata

Il tasso proteico del latte di vacca si aggira intorno al 3,2-3,5%, di cui circa il 75-80% è rappresentato dalle caseine mentre il restante 25-20% sono sieroproteine.

Le caseine sono le proteine specifiche del latte e si distinguono in diverse “frazioni” aventi peso molecolare differente e diversa affinità per l’acqua: alfa-s1, alfa-s2, beta, kappa e gamma. Sono un complesso eteroproteico fosforato che precipita a pH 4,6. Esse sono nel latte in forma di un complesso organico e minerale, la micella, costituita da submicelle, particelle sferiche. Tranne la kappa-caseina, sono idrofobiche, quindi in soluzione acquosa, come il latte, tendono a riunirsi formando degli aggregati detti micelle che intrappolano sostanze diverse (Ca, enzimi ed altro). All’interno le micelle vengono tenute assieme da ponti di Ca, interazioni idrofobiche e legami H. La kappa-caseina, che è l’unica caseina idrofila, svolge un ruolo stabilizzante verso le altre caseine; la sua idrolisi porta alla coagulazione (precipitazione).

Per coagulazione si intende la precipitazione delle caseine, la separazione del siero e la formazione della cagliata, la base per produrre qualunque tipo di formaggio. Questo può avvenire grazie all’acidità, alla temperatura, ai sali minerali presenti nel latte e all’aggiunta di caglio. Ci sono 2 modi per far avvenire la coagulazione: via acidificazione e via aggiunta di caglio. Appena munto il latte ha un pH pari a 6,7\6,8, abbassando questo valore fino a 4,6 si raggiunge il punto isoelettrico della caseina; i minerali intrappolati all’interno delle submicelle, che ne garantivano una certa stabilità, in seguito all’acidificazione diventano solubili e, come conseguenza, si ha la precipitazione di tali ammassi. La coagulazione enzimatica è invece un processo a tre stadi che inizia con l’aggiunta di caglio nel latte. Il caglio, isolato dallo stomaco di ruminanti, contiene vari enzimi, tra cui la rennina, in grado di idrolizzare (spezzare in due) la kappa-caseina, la responsabile della stabilità degli ammassi di caseina. A causa di ciò e di una diminuzione di pH, nel secondo stadio della coagulazione le micelle si aggregano. La temperatura è un parametro importante durante tutto il processo. Aumentandola a circa 40 °C le reazioni avvengono più velocemente. Nel terzo stadio si ha un riarrangiamento di questi ammassi ed inizia la cagliatura.

Nell’industria alimentare per ottenere la mozzarella da pizzeria si usa la coagulazione enzimatica (Simpson et al., 2012).

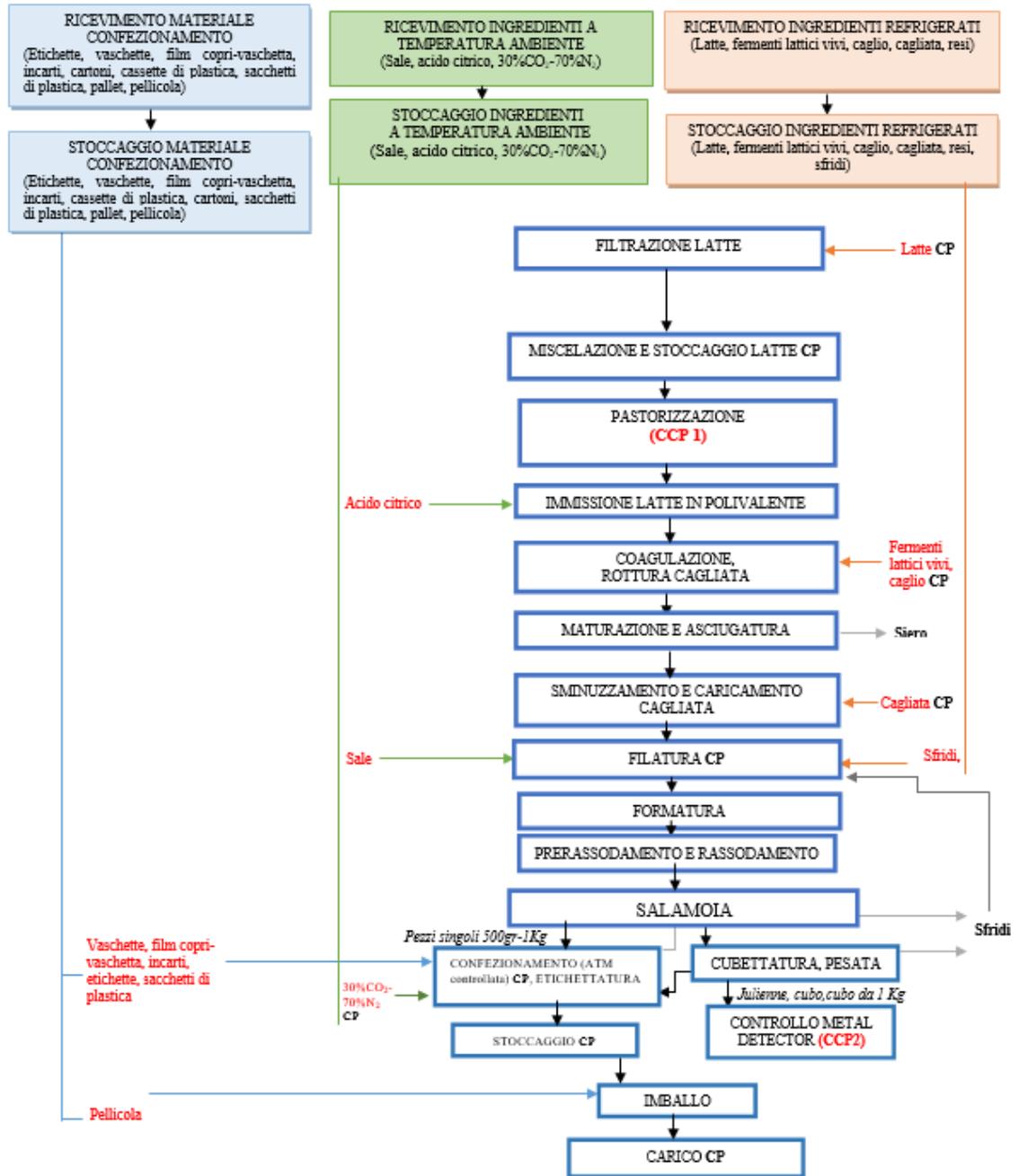
1.2 Mozzarella a bassa umidità

La mozzarella è un formaggio derivato dalla cagliata ottenuta dalla coagulazione enzimatica del latte vaccino. Per mozzarella a bassa umidità si intendono le mozzarelle con le seguenti caratteristiche: umidità 47-50%, grassi 20-22%, proteine 20-22%, sale 0,6-0,8% ed una *shelf life* di circa 30 giorni. Avendo il 10-15% di umidità in meno rispetto ad una mozzarella “Fior di latte”, viene utilizzata principalmente come condimento per la pizza in quanto durante la fase di cottura non rilascia acqua sull’alimento e pertanto viene anche chiamata “mozzarella da pizzeria”.

1.2.2 Processi produttivo della mozzarella da pizzeria

	DIAGRAMMA DI FLUSSO	Doc.: DF Ed. 01 Rev. 00 del 01.03.2019 Pagina 1 di 1
---	----------------------------	---

DIAGRAMMA DI FLUSSO PRODUZIONE MOZZARELLA PIZZERIA



In questo diagramma di flusso si descrivono tutte le fasi di produzione della mozzarella a bassa umidità, partendo dal ricevimento del latte vaccino fino al carico del prodotto finito. Di seguito verranno spiegate brevemente ognuna di queste fasi:

Filtrazione latte: il latte vaccino viene raccolto in stalla dagli allevatori e portato in azienda tramite camion cisterne dove viene scaricato mediante una pompa e stoccato in serbatoi di raccolta.

Miscelazione e stoccaggio latte: in base alla quantità di grasso che si desidera ottenere nel prodotto finito verranno eseguite delle scremature e delle miscele che permetteranno di ottenere tale valore.

Pastorizzazione: la fase di pastorizzazione è un passaggio estremamente importante e complesso, tanto che è uno dei due passaggi di produzione ad essere riconosciuti come Critical Control Point (CCP) del sistema HACCP. Questo avviene perché il latte crudo in questa fase passa attraverso dei pastorizzatori che hanno lo scopo di eliminare i microrganismi patogeni non sporigeni e di ridurre la flora microbica attraverso un innalzamento della temperatura a 72 °C per 15 secondi. Se si dovessero verificare problemi durante questo passaggio, quali potrebbero essere un abbassamento drastico della temperatura, si potrebbe mettere a rischio la salute umana per la mancata uccisione dei microrganismi patogeni.

Immissione latte in polivalente: dopo essere stato pastorizzato correttamente il latte viene immesso tramite un sistema di tubazioni in vasche di acciaio inox denominate polivalenti. In esse avviene la coagulazione enzimatica delle caseine con formazione di cagliata.

Coagulazione, rottura cagliata, maturazione e asciugatura: in questa fase la cagliata passa sopra un nastro trasportatore che ha lo scopo di favorire la sua maturazione e asciugatura con conseguente compattamento, si passerà da una cagliata formata da globuli ad una massa caseosa.

Sminuzzamento e caricamento cagliata: questa massa caseosa arrivata alla fine del nastro trasportatore verrà tagliata in blocchi e caricata attraverso un elevatore in una tramoggia contenente una serie di coclee dove avverrà la fase di filatura.

Filatura: i blocchi caseosi vengono fusi all'interno della tramoggia tramite acqua ad 80°C fino a formare un unico aggregato che verrà considerato mozzarella. La fase di filatura avviene tramite il lavoro di coclee che tirano e stirano la mozzarella fino a che l'operatore addetto a questa pratica non riterrà la consistenza adeguata.

Formatura: in questa fase la mozzarella viene tagliata e formata in filoni da 1Kg.

Prerassodamento e rassodamento: i filoni di mozzarella ancora caldi vengono raffreddati passando attraverso delle vasche contenenti acqua a 15°C.

Salamoia: l'ultima vasca viene denominata vasca di salamoia, qui all'acqua viene addizionato sale alimentare e la concentrazione salina che la vasca assume viene misurata con un densimetro. Inoltre la temperatura è di circa 2° C e le mozzarelle stazionano in questa fase fino a che non raggiungono una temperatura di 8° C circa.

Confezionamento, stoccaggio e carico: le mozzarelle vengono confezionate in atmosfera controllata, 30% CO₂ e 70% N₂, stoccate in cella frigorifera e caricate sui camion per essere spedite alla grande distribuzione.

1.3 Autocontrollo e HACCP

Autocontrollo e sistema HACCP non sono termini sinonimi. Il concetto di autocontrollo ha una valenza più ampia che discende dalla responsabilizzazione dell'Operatore del settore alimentare (OSA) in materia di igiene e sicurezza degli alimenti e corrisponde all'obbligo di tenuta sotto controllo delle proprie produzioni. L'autocontrollo è obbligatorio per tutti gli operatori che a qualunque livello siano coinvolti nella filiera della produzione alimentare. L'HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) è invece un sistema che consente di applicare l'autocontrollo in maniera razionale e organizzata. È obbligatorio solo per gli Operatori dei settori post-primari. Il sistema HACCP è quindi uno strumento teso ad aiutare gli OSA a conseguire un livello più elevato di sicurezza alimentare.

I principi su cui si basa l'elaborazione di un piano HACCP sono sette:

1. Identificare ogni pericolo da prevenire, eliminare o ridurre.
2. Identificare i punti critici di controllo (CCP - *Critical Control Points*) nelle fasi in cui è possibile prevenire, eliminare o ridurre un rischio.
3. Stabilire, per questi punti critici di controllo, i limiti critici che differenziano l'accettabilità dalla inaccettabilità.
4. Stabilire e applicare procedure di sorveglianza efficaci nei punti critici di controllo (monitoraggio).
5. Stabilire azioni correttive se un punto critico non risulta sotto controllo (superamento dei limiti critici stabiliti).
6. Stabilire le procedure da applicare regolarmente per verificare l'effettivo funzionamento delle misure adottate.
7. Predisporre documenti e registrazioni adeguati alla natura e alle dimensioni dell'impresa alimentare.

La prima codifica normativa in Europa risale al 1993 con la Direttiva 43/93/CEE (recepita in Italia con il D. Lgs 26 maggio 1997 n. 155, ora abrogato). Questa normativa è stata sostituita dal Regolamento CE 178/2002 e dal Regolamento CE 852/2004. Data l'ampia gamma di imprese alimentari prese in considerazione dal Regolamento CE 852/2004 e la grande varietà di prodotti alimentari e di procedure di produzione applicate agli alimenti, sono state redatte dalla Commissione Europea delle Linee guida generali sullo sviluppo e sull'applicazione delle procedure basate sui principi del sistema HACCP come documento diretto ad aiutare tutti

coloro che intervengono nella catena della produzione alimentare. Tali linee-guida si ispirano principalmente ai principi enunciati nel “*Codex Alimentarius*” (CAC/RCP 1-1996 Rev 4-2003) e forniscono indicazioni su un’applicazione semplificata delle prescrizioni in materia di HACCP in particolare nelle piccole imprese alimentari.

Considerando un’impresa alimentare, il responsabile del piano di autocontrollo deve predisporre e attuare il piano con l’attiva partecipazione della dirigenza e del personale avvalendosi, se del caso, di un supporto tecnico-scientifico esterno. Il piano deve essere applicabile e applicato, finalizzato a prevenire le cause di insorgenza di non conformità prima che si verifichino e deve prevedere le opportune azioni correttive per minimizzare i rischi quando, nonostante l’applicazione delle misure preventive, si verifichi una non-conformità.

L’obiettivo principale è istituire un sistema documentato con cui l’impresa sia in grado di dimostrare di aver operato in modo da minimizzare il rischio. Tuttavia, in alcuni casi come nelle piccole imprese, l’applicazione del sistema HACCP può risultare complessa.

E’ necessario comunque che la corretta predisposizione e applicazione di procedure, se pure semplificate, consenta nell’ambito del processo produttivo, il controllo e la gestione dei pericoli.

L’applicazione dei principi del sistema dell’analisi dei pericoli e dei punti critici di controllo (HACCP) alla produzione primaria non è ancora praticabile su base generalizzata, ma si incoraggia l’uso di prassi corrette in materia d’igiene in questo settore. Per facilitare l’adozione di piani di autocontrollo adeguati vengono resi disponibili Manuali di Corretta Prassi Igienica (*Good Hygiene Practice o GHP*), che costituiscono documenti orientativi voluti dalla normativa comunitaria ed utilizzabili come guida all’applicazione dei sistemi di autocontrollo (Confalone et al., 2019).

1.3.2 *Critical Control Point (CCP)*

Per tutti i microrganismi patogeni esiste una temperatura massima, oltre la quale la crescita è impossibile, tipicamente perché una o più strutture cellulari fondamentali vengono distrutte o perché una proteina chiave viene degradata.

L'efficienza della sterilizzazione mediante calore è misurata in base al tempo richiesto per ridurre di 10 volte il numero di cellule vive in una popolazione microbica a una data temperatura. La letalità dovuta all'innalzamento della temperatura è una funzione esponenziale ed è tanto più rapida quanto più aumenta la temperatura. Anche il tipo di calore è importante: il calore umido, infatti, ha un potere di penetrazione maggiore del calore secco e permette di ottenere, a una data temperatura, una riduzione più rapida del numero degli organismi vitali.

La pastorizzazione è un processo che utilizza temperatura e tempi correlati fra loro per ridurre in modo consistente il numero totale dei microrganismi non sporigeni nel latte. Il processo prende il nome da Louis Pasteur che per primo utilizzò il calore per eliminare microrganismi da substrati. Alla temperatura e ai tempi usati per la pastorizzazione del latte, vengono uccisi tutti i batteri patogeni non sporigeni che possono essere trasmessi dal latte crudo quali i microrganismi che provocano la tubercolosi, la brucellosi, la febbre Q e la febbre tifoide. Inoltre, diminuendo la carica microbica complessiva, la pastorizzazione ritarda anche la crescita di microrganismi responsabili del deterioramento degli alimenti, aumentando il periodo di conservazione dei liquidi deperibili.

Per ottenere la pastorizzazione, il latte viene fatto fluire attraverso uno scambiatore di calore tubulare e l'attento controllo del flusso, della temperatura e della dimensione della fonte di calore, innalza la temperatura del liquido fino a 71°C per 15 minuti, poi il liquido è rapidamente raffreddato. L'intero processo viene chiamato pastorizzazione istantanea (Madigan et al., 2014).

1.4 *Pseudomonas* spp.

Il deterioramento microbico dei formaggi freschi desta grande preoccupazione nell'industria lattiero-casearia perché i cambiamenti nelle caratteristiche sensoriali dei prodotti riducono la qualità, compromettono la reputazione dei produttori di formaggio e possono causare grandi perdite economiche per le aziende.

I microrganismi particolarmente coinvolti nel deterioramento di prodotti lattiero-caseari freschi conservati in condizioni aerobiche e a temperature di refrigerazione sono ascritti al genere *Pseudomonas* (Carminati et al., 2019). Si tratta di batteri Gram negativi, ubiquitari, psicotolleranti, aerobici e che presentano un flagello polare. La maggior parte delle specie può usare una grande varietà di composti organici come fonte di carbonio e di energia.

Questi microrganismi sono diffusi sia nel suolo sia nelle acque e molte specie causano malattie in piante e animali, compreso l'uomo e sono spesso isolati da latte crudo refrigerato. Sebbene siano inattivati dalla pastorizzazione, membri del genere *Pseudomonas* spp. possono contaminare i prodotti trasformati attraverso la contaminazione post-pastorizzazione negli stabilimenti di trasformazione del latte tramite materiali, suolo e acqua.

Alcune specie di *Pseudomonas* sono patogene opportuniste. Tra queste troviamo *Pseudomonas aeruginosa*, un batterio frequentemente associato nell'uomo a infezioni sia del tratto urinario sia di quello respiratorio, *P. aeruginosa* è spesso all'origine di infezioni nosocomiali causate da cateteri, tracheotomie, iniezioni lombari e infusioni intravenose, con incidenza frequente in pazienti sottoposti a lunghi trattamenti immuno-soppressivi. Questo batterio è inoltre un patogeno ricorrente in pazienti gravemente ustionati o affetti da altra tipologia di seri danni alla cute e in persone sofferenti da fibrosi cistica. Oltre che di infezioni localizzate, può essere anche causa di infezioni sistemiche, soprattutto in persone che hanno subito estesi danni alla cute.

P. aeruginosa ha una resistenza naturale nei confronti di molti tra gli antibiotici più usati, pertanto il trattamento delle suddette infezioni risulta spesso difficile.

Alcune specie di *Pseudomonas* sono patogene delle piante (fitopatogeni). Molto spesso i fitopatogeni colonizzano piante che non sono ospiti (nelle quali i sintomi della malattia non sono evidenti) e da qui possono essere trasmessi alle piante ospiti e dar luogo all'infezione vera e propria (Madigan et al., 2014).

1.4.1 Problematiche associate a *Pseudomonas* spp. nella mozzarella

La contaminazione da parte di *Pseudomonas* spp. svolge un ruolo importante nel deterioramento del latte: questo gruppo microbico produce molti enzimi lipolitici e proteolitici che riducono sia la qualità, che la conservabilità del latte pastorizzato durante la conservazione refrigerata prolungata del latte crudo. La combinazione di tempi di conservazione più lunghi e temperature più basse rappresenta un vantaggio selettivo per i batteri psicrotolleranti, in particolare i membri di *Pseudomonas* che entrano nel latte crudo tramite biofilm nei serbatoi di latte, acqua o suolo contaminati.

L'uso di rigorosi programmi di pulizia, igienizzazione e regime di pastorizzazione (es. Ultra High Temperature) riduce al minimo i batteri da deterioramento *Gram*-negativi presenti nel latte crudo. Pertanto, ridurre la presenza di questi microrganismi di deterioramento negli ambienti di trasformazione dei prodotti lattiero-caseari e dei prodotti finiti è fondamentale per prolungare la durata di conservazione dei prodotti lattiero-caseari pastorizzati.

Una caratteristica importante associata a *Pseudomonas* spp. (es. *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*) è la secrezione di un pigmento giallo-verde fluorescente chiamato fluoresceina. Alcune specie del genere *Pseudomonas* come *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* possono anche produrre pigmenti aggiuntivi come la piocianina (pigmento blu) inoltre *P. fluorescens* biovar IV produce una colorazione blu-verde a causa della produzione di pigmenti piocianina e fluoresceina (Carrascosa et al., 2014).

Il difetto di decolorazione blu in diversi tipi di formaggi freschi sta crescendo in tutto il mondo durante il presente decennio. Nel giugno 2010 le autorità nazionali Italiane hanno notificato al RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) le caratteristiche organolettiche alterate nelle mozzarelle importate dalla Germania: presentavano colorazione blu ed elevato numero di *P. fluorescens* ($5,1 \times 10^6$ UFC/g). Un mese dopo sono stati riportati casi di mozzarella blu anche in prodotti Italiani: circa 70'000 mozzarelle sono state ritirate dal mercato. Il difetto di decolorazione era legato alla contaminazione delle acque di lavorazione da parte di *Pseudomonas* spp. (Olmo et al., 2018).



Figura 1 Fotografia di formaggio fresco con pigmento blu in superficie

1.5 Osmolarità e crescita microbica

La capacità di *Pseudomonas* spp. di produrre proteasi, lipasi e pigmenti fluorescenti contribuisce al deterioramento del formaggio. L'elevato contenuto di umidità (50-60%), un valore di pH intorno a 5,5 e un basso contenuto di sale rendono le mozzarelle suscettibili alla crescita sia di microrganismi deterioranti che patogeni (Meier et al., 2018).

La disponibilità di acqua è un fattore importante per la crescita dei microrganismi, dipende non solo da quanto è umido o secco un ambiente, ma è anche correlata alla concentrazione di soluti (sali, zuccheri o altre sostanze) disciolti in essa. I soluti si legano all'acqua, rendendola meno disponibile per gli organismi. Quindi, perché gli organismi prosperino in ambienti a elevata concentrazione di soluti, sono necessari opportuni aggiustamenti fisiologici.

L'acqua risponde alla concentrazione di soluti in essa disciolti spostandosi da regioni dove la concentrazione di soluti è bassa a regioni a più alta concentrazione, un processo definito osmosi.

Di norma, il citoplasma di una cellula ha una concentrazione di soluti più alta di quella dell'ambiente circostante, così che l'acqua tende a diffondere all'interno della cellula. Questa condizione della cellula è definita di equilibrio idrico positivo e corrisponde allo stato normale della cellula. Tuttavia, quando la cellula si trova in un ambiente in cui la concentrazione di soluti è superiore a quella del citoplasma, l'acqua uscirà dalla cellula, e in assenza di contromisure opportune, la cellula si disidraterà e andrà incontro a morte (Madigan et al., 2014).

1.6 Analisi della letteratura scientifica

Esistono alcuni studi scientifici volti a descrivere alcune metodologie che hanno lo scopo di inibire la crescita di *Pseudomonas* spp. nelle mozzarelle, che verranno di seguito descritti.

La ricerca svolta da Segat e collaboratori nel 2014 mirava a valutare l'efficacia dell'ozono nel ridurre la carica batterica nei processi di produzione di mozzarelle ad alta umidità. Nello studio, alcuni campioni di mozzarella erano confezionati con acqua ozonizzata (2mg/L), conservati a bassa temperatura e monitorati durante il periodo di conservazione a 7, 15 e 21 giorni mediante conte vitali in piastra per la ricerca *Pseudomonas* spp. Altri campioni di mozzarella erano posti a contatto diretto con acqua ozonizzata prima del confezionamento con la concentrazione di ozono pari a 2, 5 e 10mg/L per 60 minuti e poi conservati nel normale liquido di governo. Anche questi campioni sono stati poi analizzati mediante conte vitali in piastra al termine della fase di raffreddamento. Da questo studio è emerso che l'ozono non era efficace per effettuare una riduzione della carica di *Pseudomonas* spp. Infine è stato valutato l'effetto dell'ozono trattando solo l'acqua di raffreddamento, senza mozzarella, precedentemente inoculata artificialmente con *P. fluorescens* e *P. putida* e trattata con ozono a concentrazioni di 2 mg/L. L'acqua così trattata è stata impiegata nella fase di raffreddamento delle mozzarelle. Successivamente sono stati confezionati campioni di mozzarella e analizzati dopo 7, 15 e 21 giorni di conservazione in atmosfera refrigerata. L'acqua così trattata mostrò una riduzione di 4 Log cfu/mL di *Pseudomonas* spp. e la mozzarella mostrava una bassa carica microbica ed un aumento della shelf-life.

Successivamente, nel 2015 lo studio di Caputo e collaboratori aveva lo scopo di verificare l'efficacia della lattoferrina bovina idrolizzata dalla pepsina (LFH) per prevenire la decolorazione bluastra della mozzarella ritardando la crescita dei relativi batteri alteranti. Quando i campioni sono stati trattati con LFH e inoculati con un ceppo di *P. fluorescens* non si sono riscontrate pigmentazioni e alterazioni nei profili di caseina fino a 14 giorni di conservazione in cella frigorifera. Inoltre a partire dal quinto giorno la conta vitale in piastra era di un logaritmo inferiore rispetto ai campioni privi di LFH.

Nello studio condotto da Lacivita e collaboratori nel 2018 venivano proposte nuove tecniche di conservazione degli alimenti come strategie alternative ai tradizionali trattamenti basati sull'uso esclusivo del calore. In questo studio sono stati investigati le potenziali applicazioni del vapore (94-95°C) e degli ultrasuoni (25-40 kHz) utilizzati contemporaneamente per un breve periodo sulle mozzarelle. Quindi, le mozzarelle trattate e non sono state confezionate in vassoi di plastica con salamoia e conservati ad 8°C. È poi stata

inoculata la specie *P. fluorescens*, a due diverse concentrazioni sulla superficie dei campioni. Dalle analisi coltura-dipendenti è emerso che la riduzione del microrganismo target era tra 0,8 e 2 cicli logaritmici.

Nello studio condotto da Faccia e collaboratori nel 2019 è stato proposto l'utilizzo di salamoia acidificata al posto dell'acqua di conservazione delle mozzarelle per ritardare la crescita dei microrganismi. È stata inizialmente sviluppata una salamoia adatta, a base di lattato di calcio e acido lattico che non alterava le caratteristiche organolettiche delle mozzarelle. Sono poi state svolte analisi di conta vitale in piastra durante la shelf-life del prodotto e per quanto riguarda i risultati microbiologici, la salamoia sperimentale si è dimostrata avere alcuni effetti inibitori. Infatti la crescita di *Pseudomonas* spp. è stata ritardata di 1-2 unità logaritmiche. Le caratteristiche organolettiche del formaggio sono rimaste all'interno del limite di accettabilità fino a 21 giorni e, rispetto al campione conservato in acqua di governo, la durata di conservazione è stata estesa di più del 50%. La salamoia sperimentale ha anche impedito il verificarsi del difetto di decolorazione blu, noto per essere causato da *P. fluorescens*.

Infine, lo studio di Roila e collaboratori nel 2019 mirava a valutare un estratto polifenolico da sottoprodotto dell'olio d'oliva per migliorare la conservazione delle mozzarelle. Sono stati presi in esame 9 lotti: 3 trattati con 250 µg/mL di fenoli da sottoprodotti dell'olio d'oliva nel liquido di conservazione, 3 lotti trattati con 500 µg/mL di fenoli e 3 lotti non trattati come gruppo di controllo. I fenoli hanno effettivamente ritardato la crescita di *P. fluorescens* agendo principalmente sulla fase di latenza dei microrganismi, andando a prolungare il tempo necessario per raggiungere il limite microbico accettabile, prolungando la *shelf life* dai 2 ai 4 giorni.

2. SCOPO DELLA TESI

La presente Tesi di Laurea Sperimentale si inserisce all'interno di un progetto più ampio, svoltosi presso il caseificio Fattorie Marchigiane situato nella Val Metauro. Tale progetto aveva lo scopo di migliorare le caratteristiche microbiologiche, chimiche e organolettiche nella mozzarella a bassa umidità. In dettaglio, il presente studio ha avuto come obiettivo quello di limitare la crescita di *Pseudomonas* spp. in mozzarelle a bassa umidità mediante la messa a punto di due salamoie sperimentali contenenti 18% di sale e 22% di sale. In parallelo, è stata allestita una prova di controllo con una salamoia al 15% di sale che rappresentava lo standard aziendale. Ciascuna tesi era composta da 25 campioni per un totale di 75 campioni, che sono stati sottoposti ad analisi colturali tramite conta vitale in piastra su terreni selettivi per *Pseudomonas* spp., al fine di valutare il livello di inibizione svolto dal sale sulla crescita di *Pseudomonas* spp. I campioni sono stati prelevati in giornate lavorative consecutive: un campione ogni giornata per un totale di 75 giornate lavorative consecutive; i primi 25 campionamenti sono stati effettuati con concentrazione salina al 22%, i successivi 25 con concentrazione al 18% ed infine gli ultimi 25 campioni sono stati presi con la concentrazione standard del 15%. I limiti di riferimento per *Pseudomonas* spp. che sono stati considerati per verificare l'abbattimento delle cariche erano quelli previsti nel manuale HACCP aziendale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

In questo studio sono stati presi in analisi 75 campioni di mozzarella a bassa umidità, reperiti presso il caseificio Fattorie Marchigiane situato in Val Metauro. Quotidianamente, in azienda si svolgeva la produzione di mozzarelle e una parte delle mozzarelle prodotte venivano prese alla fine della linea di produzione, non ancora confezionate, nel formato di filoni da 1Kg per poi impiegarle nella sperimentazione. La prima tesi sperimentale prevedeva l'uso della salamoia al 22 % di sale: ogni giorno di produzione per 25 giorni venivano immerse le mozzarelle in tale salamoia e veniva prelevato un campione di mozzarella da analizzare mediante conta vitale in piastra. Al termine della prova, la vasca di salamoia veniva svuotata e riempita con una salamoia contenente 18% di sale, aggiunta poi ogni giorno di nuove mozzarelle. Si procedeva come sopra per 25 giorni ed infine si allestiva la vasca con concentrazione salina standard normalmente utilizzata in azienda che è al 15% di sale nuovamente riempita quotidianamente con mozzarelle da analizzare mediante analisi coltura-dipendenti per 25 giorni.

Le mozzarelle stazionano nella vasca di salamoia fino a che non raggiungono una temperatura di 8° C e generalmente si impiega circa 30 minuti. Una volta raggiunta questa temperatura viene prelevato un campione e portato in laboratorio analisi per poter essere analizzato mediante semine in piastra Petri.

Lo stazionamento in vasca di salamoia al 15% di concentrazione salina apporta al prodotto finito una percentuale di sale pari allo $0,7\% \pm 0,1\%$, le salamoie con concentrazioni saline del 18% e 22% apportano al prodotto finito una percentuale di sale pari all' $1,0\% \pm 0,1\%$ e $1,3\% \pm 0,1\%$ rispettivamente.

3.2 Conte vitali in piastra su terreno selettivo per *Pseudomonas* spp.

Sono stati prelevati in condizioni asettiche 10 grammi da ognuno dei campioni di mozzarelle trattate come descritto al paragrafo precedente e introdotti all'interno di sacchetti sterili di polietilene.

Queste aliquote di mozzarella sono state successivamente schiacciate e diluite con 90mL di acqua peptonata sterile (peptone, 0.1%) ottenendo una diluizione 10^{-1} . Il tutto è stato sminuzzato manualmente nei sacchetti sterili per 5 minuti.

È stata poi eseguita la semina per inclusione in piastre Petri versando aliquote corrispondenti a 1 mL dell'omogenato e aggiungendo il terreno agarizzato sterile selettivo per *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas* Agar Base) mantenuto allo stato liquido a 50°C. Sono stati poi effettuati movimenti circolari, verticali e orizzontali delle piastre Petri chiuse per permettere la distribuzione della sospensione batterica in tutto il terreno. Successivamente le piastre sono state lasciate solidificare a temperatura ambiente e poi incubate in appositi incubatori termostatici a 25°C per 48H.

A seguito della solidificazione del terreno, le piastre vengono poi incubate capovolte, ciò per evitare che l'eventuale condensa formatasi sul coperchio ricada sul terreno di coltura causando una crescita di colonie diffuse e confluenti di difficile interpretazione ai fini della conta.

La lettura delle colonie è stata effettuata sia alla luce bianca che alla luce UV ed ogni colonia cresciuta indicava la presenza di specie del genere *Pseudomonas*: la presenza di pigmentazione blu-verde\marrone o di fluorescenza, può essere considerata come evidenza presuntiva di *P. aeruginosa*.

Per ogni campione la semina è stata effettuata in doppio e i risultati sono stati espressi in Log cfu/g.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Conte vitali in piastra

I risultati delle conte batteriche svolte sui 75 campioni di mozzarella sono riportati nelle seguenti tabelle.

CAMPIONE	DATA	<i>Pseudomonas</i> spp. (Log CFU/g)
1	02/10/2019	2,65 ± 0,03
2	03/10/2019	2,64 ± 0,03
3	04/10/2019	2,65 ± 0,03
4	05/10/2019	2,65 ± 0,03
5	07/10/2019	2,64 ± 0,03
6	08/10/2019	2,66 ± 0,03
7	09/10/2019	2,65 ± 0,03
8	10/10/2019	2,61 ± 0,03
9	11/10/2019	2,56 ± 0,03
10	12/10/2019	2,65 ± 0,03
11	14/10/2019	2,56 ± 0,03
12	15/10/2019	2,59 ± 0,03
13	16/10/2019	2,65 ± 0,03
14	17/10/2019	2,68 ± 0,03
15	18/10/2019	2,59 ± 0,03
16	19/10/2019	2,62 ± 0,03
17	21/10/2019	2,59 ± 0,03
18	22/10/2019	2,6 ± 0,03
19	23/10/2019	2,65 ± 0,03
20	24/10/2019	2,64 ± 0,03
21	25/10/2019	2,64 ± 0,03
22	26/10/2019	2,65 ± 0,03
23	28/10/2019	2,68 ± 0,03
24	29/10/2019	2,57 ± 0,03
25	30/10/2019	2,62 ± 0,03

Tabella 1: i risultati delle conte vitali in piastra di 25 campioni di mozzarella prelevati dal 02/10/2019 al 30/10/2019 in vasca di salamoia contenente soluzione salina al 22%.

CAMPIONE	DATA	<i>Pseudomonas</i> spp. (Log CFU/g)
26	31/10/2019	2,74 ± 0,03
27	02/11/2019	2,74 ± 0,03
28	04/11/2019	2,7 ± 0,03
29	05/11/2019	2,68 ± 0,03
30	06/11/2019	2,69 ± 0,03
31	07/11/2019	2,68 ± 0,03
32	08/11/2019	2,69 ± 0,03
33	09/11/2019	2,66 ± 0,03
34	11/11/2019	2,7 ± 0,03
35	12/11/2019	2,67 ± 0,03
36	13/11/2019	2,75 ± 0,03
37	14/11/2019	2,73 ± 0,03
38	15/11/2019	2,71 ± 0,03
39	16/11/2019	2,75 ± 0,03
40	18/11/2019	2,73 ± 0,03
41	19/11/2019	2,66 ± 0,03
42	20/11/2019	2,64 ± 0,03
43	21/11/2019	2,74 ± 0,03
44	22/11/2019	2,68 ± 0,03
45	23/11/2019	2,69 ± 0,03
46	25/11/2019	2,73 ± 0,03
47	26/11/2019	2,72 ± 0,03
48	27/11/2019	2,64 ± 0,03
49	28/11/2019	2,7 ± 0,03
50	29/11/2019	2,76 ± 0,03

Tabella 2: risultati delle conte vitali in piastra di 25 campioni di mozzarella prelevati dal 31/10/2019 al 29/11/2019 in vasca di salamoia contenente soluzione salina al 18%.

CAMPIONE	DATA	<i>Pseudomonas</i> spp. (Log CFU/g)
51	30/11/2019	2,79 ± 0,01
52	02/12/2019	2,83 ± 0,01
53	03/12/2019	2,81 ± 0,01
54	04/12/2019	2,79 ± 0,01
55	05/12/2019	2,79 ± 0,01
56	06/12/2019	2,79 ± 0,01
57	07/12/2019	2,8 ± 0,01
58	09/12/2019	2,79 ± 0,01
59	10/12/2019	2,79 ± 0,01
60	11/12/2019	2,81 ± 0,01
61	12/12/2019	2,83 ± 0,01
62	13/12/2019	2,79 ± 0,01
63	14/12/2019	2,79 ± 0,01
64	16/12/2019	2,8 ± 0,01
65	17/12/2019	2,83 ± 0,01
66	18/12/2019	2,81 ± 0,01
67	19/12/2019	2,79 ± 0,01
68	20/12/2019	2,79 ± 0,01
69	21/12/2019	2,81 ± 0,01
70	23/12/2019	2,79 ± 0,01
71	24/12/2019	2,83 ± 0,01
72	27/12/2019	2,78 ± 0,01
73	28/12/2019	2,79 ± 0,01
74	30/12/2019	2,79 ± 0,01

Tabella 3: risultati delle conte vitali in piastra di 25 campioni di mozzarella prelevati dal 30/11/2019 al 31/12/2019 in vasca di salamoia contenente soluzione salina al 15%.

Le analisi microbiologiche per il conteggio di *Pseudomonadaceae* hanno mostrato, per tutti i campioni considerati, valori al di sotto del limite previsto dal manuale HACCP aziendale, ossia valori <1000 UFC/g.

Più dettagliatamente per la conta delle *Pseudomonadaceae* rilevate da campioni immersi in soluzione salina al 15%, la media dei 25 campioni è pari a 2,8 Log CFU/g, mentre i campioni prelevati a concentrazioni saline del 18% e del 22% hanno mostrato valori medi più bassi e pari a 2,7 Log CFU/g e 2,6 Log CFU/g, rispettivamente.

Tali risultati erano generalmente in linea con la letteratura scientifica relativa alla sperimentazione di tecnologie mirate a ridurre la carica di *Pseudomonas* spp. in mozzarelle. In dettaglio, i risultati del presente studio erano leggermente superiori a quelli dello studio di Segat e collaboratori del 2014 e di Lacivita et al. (2018). Lo studio di Segat et al. (2014) che si occupava di valutare l'uso dell'ozono per ridurre la carica di *Pseudomonas* spp. in mozzarelle mostrava infatti che l'ozono riduceva fino a circa 2.0 Log CFU/g la carica di *Pseudomonas* spp. mentre lo studio di Lacivita et al. (2018) riportava valori medi pari a 2,3 Log CFU/g di *Pseudomonas* spp. in mozzarelle trattando i campioni con la tecnologia SonoSteam (combinazione di vapore ed ultrasuoni). Lo studio di Caputo et al. (2015) che prevedeva l'uso della lattoferrina bovina idrolizzata dalla pepsina (LFH) su mozzarelle mostrava valori di *Pseudomonas* spp. pari a 2,8 Log cfu/g, pertanto valori identici ai dati ottenuti nel presente studio e relativi alla mozzarella prelevata da salamoia di controllo al 15% di sale.

All'opposto, lo studio di Roila et al. (2019) riportava valori piuttosto bassi di cariche di *Pseudomonas* spp. in mozzarelle trattate con un estratto polifenolico da sottoprodotto dell'olio di oliva e pari a circa 1 Log cfu/g.

Tuttavia, i dati microbiologici ottenuti nel presente studio erano più bassi di quelli ottenuti da Faccia et al. (2019) che otteneva conte di *Pseudomonas* spp. pari a 3,81 Log cfu/g in seguito a trattamento delle mozzarelle con salamoia acidificata ad indicare che salamoie con elevata concentrazione di sale, come quelle attuate nel presente studio, sono più efficaci di salamoie acidificate.

5. CONCLUSIONI

Lo studio svolto nella presente Tesi di Laurea Sperimentale aveva lo scopo di mettere a punto una tecnica mirata a limitare lo sviluppo microbico di *Pseudomonas* spp. su mozzarelle a bassa umidità. Le mozzarelle erano sottoposte a tre diverse salamoie con concentrazioni saline pari a 15%, 18% e 22% e dai risultati emergeva che aumentando la concentrazione di sale nella vasca di salamoia si riduceva il numero di Log ufc/g di *Pseudomonas* spp. da 2,8 a 2,6 e tale riduzione era ampiamente sotto i limiti microbiologici previsti dal piano HACCP aziendale. Da tali dati microbiologici emerge pertanto l'utilità di tale approccio al fine di aumentare la qualità e conservabilità di questo prodotto. Tuttavia, saranno necessari ulteriori studi per definire se questo aumento di concentrazione salina possa causare modificazioni a livello chimico ed organolettico nel prodotto.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Benjamin K. Simpson, Leo M. L. Nollet, Fidel Toldrà, Soottawat Benjakul, Gopinadhan Paliyath and Y. H. Hui. “Food Biochemistry and food processing”, second edition (2012), pp. 436-472.
- 2) Michael T. Madigan, John M. Martinko, David A. Stahl, Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, “Brock. Biologia dei microrganismi” (2014)
- 3) Conrado Carrascosa, Rafael Millàn Jose Raduàa Jaber Pablo Lupiola Cristòbaldel Rosario-Quintana, Cristina Mauricio, Esther Sanjuàn (2014). *Blue pigment in fresh cheese produced by Pseudomonas fluorescens*.
- 4) M. Faccia, G. Gambacorta, G. Natrella, F.Caponio (2019). *Shelf life extension of italian mozzarella by use of calcium lactate buffered brine*.
- 5) Cinzia Confalone, Deborah De Crinito (2019). Ministero della Salute, Autocontrollo e HACCP.
- 6) Domenico Carminati, Barbara Bonvini, Lia Rossetti, Miriam Zago, Flavio Tidona, Giorgio Giraffa (2019). *Investigation on the presence of blue pigment-producing Pseudomonas strains along a production line of fresh mozzarella cheese*.
- 7) Ana del Olmo, Javier Calzada, Manuel Nuñez (2018). *The blue discoloration of fresh cheese: A worldwide defect associated to specific contamination by Pseudomonas fluorescens*.

- 8) Annalisa Segat, Marialuisa Biasutti, Lucilla Iacumin, Giuseppe Comi, Federico Baruzzi, Cristian Carboni, Nadia Innocente (2014). *Use of ozone in production chain of high moisture Mozzarella Cheese.*
- 9) Valentina Lacivita, Amalia Conte, Hanieh S. Musavian, Niels H. Krebs, Vittorio A. Zambrini, Matteo A. Del Nobile (2018). *Steam-ultrasound combined treatment: A promising technology to significantly control mozzarella cheese quality.*
- 10) Fabienne Meier, Christophe Lacroix, Leo Meile, Christoph Jans (2018). *Enterococci and pseudomonas as quality indicators in industrial production and storage of mozzarella cheese from raw cow milk.*
- 11) Leonardo Caputo, Laura Quintieri, Daniela Manila Bianchi, Lucia Decastelli, Linda Monaci, Angelo Visconti, Federico Baruzzi (2015). *Pepsin-digested bovine lactoferrin prevents Mozzarella cheese blue discoloration caused by Pseudomonas fluorescens.*
- 12) Rossana Roila, Andrea Valiani, David Ranucci, Roberta Ortenzi, Maurizio Servili, Gianluca Veneziani, Raffaella Branciarri (2019). *Antimicrobial efficacy of a polyphenolic extract from olive oil by-product against "Fior di latte" cheese spoilage bacteria.*