

Relazione di progetto finale

Gestione dei sistemi di allevamento e dei fattori ambientali per la produzione e valorizzazione di starter naturali nei processi di caseificazione

**ACRONIMO DEL PROGETTO:
NATCASEI**

Bolzano, 17 febbraio 2022

Indice

1. Progetto	3
2. Descrizione del progetto	5
3. Relazione finale del progetto	6
3.1. Obiettivi, benefici e criticità del progetto	7
4. Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto	8

1. Progetto

Dati generali

Titolo del progetto	Gestione dei sistemi di allevamento e dei fattori ambientali per la produzione e valorizzazione di starter naturali nei processi di caseificazione Inserire titolo del progetto
Acronimo del progetto	NATCASEI
Area strategica di intervento¹	Area 4 - Qualità, tipicità e sicurezza degli alimenti e stili di vita sani
Linea di attività²	Inserire una delle seguenti linee di attività: a. Produzione di alimenti di qualità per tutti (food security);
Settore produttivo³	Zootecnico
Tipo di progetto	Bando
Riferimento del Bando/Affidamento diretto/Sportello	Procedura di selezione per la concessione di contributi finalizzati alla realizzazione di progetti di ricerca nell'ambito del fondo per gli investimenti nel settore lattiero caseario, ai sensi dell'articolo 8 del Decreto 18 aprile 2016, n. 4293, e successive modifiche, concernente la ripartizione delle risorse del fondo per gli investimenti nel settore lattiero caseario ai sensi dell'articolo 1, commi 214-217, della legge 23 dicembre 2014, n. 190 (legge di stabilità 2015).
Durata del progetto	24 mesi
Costo ammesso	€ 330.853,60 di cui € 46.992,40 per personale a tempo indeterminato, non finanziabile
Contributo concesso	267.809,41 €
Importo rendicontato	

Soggetto proponente il progetto	Libera Università di Bolzano	Natura giuridica <input checked="" type="checkbox"/> Pubblico
Rappresentante legale delegato	Prof. Paolo Lugli - LGLPLA56B08B819J	

Coordinatore del progetto	Prof. Marco Gobbetti – GBBMRC60C01G478V
----------------------------------	---

Numero di Unità Operative	2 - due
----------------------------------	---------

ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE

Unità Operativa n. 1 - Denominazione	Libera Università di Bolzano (UNIBZ)	Natura giuridica <input type="checkbox"/> Pubblico
---	--------------------------------------	---

Unità Operativa n. 2 - Denominazione	Università degli Studi di Bari Aldo Moro (UNIBA)	Natura giuridica <input type="checkbox"/> Pubblico
Numero di partner esterni al progetto	[Indicare a numero e in lettere]	
ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE		
Partner n. 1 - Denominazione		Natura giuridica <input type="checkbox"/> Pubblico <input type="checkbox"/> Privato
Partner n. 2 - Denominazione		Natura giuridica <input type="checkbox"/> Pubblico <input type="checkbox"/> Privato

2. Descrizione del progetto

Sintesi del progetto

Il microbiota del latte è una complessa e unica entità vivente con profonde ripercussioni sulla fisiologia animale e umana, e sulla biotecnologia casearia. NATCASEI ha l'obiettivo di produrre e valorizzare starter naturali e starter aggiunti da impiegare nella produzione di formaggi altoatesini e pugliesi tipici, creando un asse allevamento-trasformazione unico. Il progetto propone un approccio ecologico e sostenibile finalizzato a determinare relazioni causa-effetto tra sistemi di allevamento e condizioni ambientali geograficamente diversificate (Alto Adige e Puglia) e composizione, assemblaggio e uso del microbiota autoctono del latte vaccino. La qualità del latte e il microbiota autoctono hanno un ruolo-chiave nella formazione e stabilità delle colture starter naturali. In cooperazione con la Federazione Latterie Alto-Adige e Associazioni di Allevatori della Puglia, sono state raccolte informazioni sui sistemi di allevamento di aziende rappresentative delle due realtà locali, mediante la compilazione di questionari per ottenere informazioni su allevamenti, sostenibilità, benessere animale, mangimi, diete e pratiche di mungitura e manipolazione del latte. Sulla base dei risultati ottenuti dai questionari, gli allevamenti sono stati clusterizzati, così da ottenere un numero di aziende e campioni di latte gestibili, ma statisticamente significativi. Per ricomprendere variazioni stagionali, sono stati eseguiti quattro campionamenti annuali. Campioni rappresentativi di latte vaccino sono stati sottoposti a caratterizzazione chimica (composizione grezza, caratterizzazione di frazioni caseiniche, siero-proteine, acidi grassi liberi, valutazione dell'attitudine alla caseificazione). Parallelamente, i campioni di latte sono stati sottoposti a caratterizzazione del microbiota, combinando l'approccio coltura-dipendente con quello coltura-indipendente (*high throughput sequencing*) ed includendo le tecnologie "omiche" (metagenomica) per evidenziare i tratti distintivi del microbiota del latte vaccino dell'Alto Adige e della Puglia.

I principali risultati ottenuti dal progetto sono: (i) tipizzazione del microbiota dominante di ciascun allevamento e condizione ambientale (area geografica, condizioni di allevamento, etc.) (ii) creazione di una bio-banca composta da biotipi di batteri lattici autoctoni; (iii) selezione e formulazione di starter naturali ottenuti ricostituendo i biotipi caratteristici e i lattici che mostrano maggiore attitudine alla caseificazione; e (iv) selezione e formulazione di colture aggiunte di batteri lattici autoctoni da impiegare nella produzione di formaggi tipici. Il progetto contribuisce ad ampliare la conoscenza del settore mediante l'acquisizione di dati biochimici, microbiologici e tecnologici completi ed unici per il latte vaccino di Alto Adige e Puglia, impiegati in sistemi-modello di micro-caseificazione. Un approccio meta-omico innovativo è stato utilizzato per valutare la stabilità microbiologica delle colture starter naturali e le loro performance biotecnologiche nei processi di caseificazione. I risultati derivanti dal presente progetto potranno contribuire alla scelta dei sistemi di allevamento maggiormente performanti che migliorano sensibilmente la qualità del latte crudo, rendendolo idoneo alla caseificazione. Inoltre, l'impiego nei processi di caseificazione di colture naturali opportunamente progettate in base alle caratteristiche del latte da trasformare contribuirà all'ottenimento di prodotti lattiero-caseari con migliorate caratteristiche qualitative.

3. Relazione intermedia/finale del progetto

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO

Relazione tecnico-scientifica (finale max 20 pagine)

Di seguito si descrive lo stato dell'arte del progetto NATCASEI e dei risultati acquisiti in accordo al Gantt e ai pacchi di lavoro (WP). In virtù della collaborazione della Federazione Latterie Alto Adige e della Associazione Allevatori di Puglia, i risultati riflettono il contesto di riferimento del territorio Alto-Adige e quello Pugliese.

WP1. Attività di pianificazione e organizzazione (cfr. primo report). Il 18 giugno 2019 e il 4 febbraio 2020 si sono tenuti presso il parco tecnologico di Bolzano NOI Techpark i primi due incontri. L'incontro di fine attività si è tenuto telematicamente il 12 gennaio 2022. Tutti i dati e informazioni del progetto sono raccolti in una cartella condivisa (NATCASEI) organizzata per WP e per attività.

WP2. A2.1. La Libera Università di Bolzano (UNIBZ) ha raccolto informazioni dettagliate su 4225 aziende per mezzo di un questionario, i cui dati sono stati elaborati per l'individuazione di 106 aziende e campioni di latte rappresentativi (cfr. primo report e Figura 1). Analogamente, l'Università degli Studi di Bari (UNIBA) ha somministrato il questionario a 1.535 aziende del territorio pugliese, di cui 133 aziende sono state quindi selezionate come rappresentative delle condizioni di allevamento locale (cfr. primo report)

A2.2. Al fine di verificare l'effetto stagione, sono stati condotti due campionamenti (estivo e invernale) di latte dalle aziende selezionate, analizzato con tecnologia MilkoScan®. Inoltre, è stato valutato l'effetto delle condizioni di allevamento sulla composizione fisico-chimica del latte crudo, l'effetto della stagione sulla composizione fisico-chimica e reologia del latte (cfr. primo report e Tabella 1-2, Figura 2-5).

A2.3. Il microbiota dei campioni di latte selezionati è stato caratterizzato combinando l'approccio coltura-dipendente con quello coltura-indipendente, includendo le tecniche "omiche" (analisi metagenomica shotgun) (cfr. primo report e Figura 6-7).

WP3 – Selezione di latt e microrganismi da usare per la formulazione di starter naturali e colture aggiunte.

A3.1. Selezione dei latt maggiormente idonei allo sviluppo dei batteri lattici. Per l'Alto Adige sono stati considerati i campioni di latte di aziende che hanno vacche di razza a produzione alta, media e mista (3 - 5 campioni) e quelli con il più alto numero di copie di geni di interesse pro-tecnologico. Tali parametri sono stati, infatti, considerati nella modellazione matematica per la selezione degli isolati (cfr. A 3.2).

La selezione dei latt Pugliesi maggiormente idonei allo sviluppo dei batteri lattici è stata effettuata scegliendo latt con assenza di tracce di antibiotici e/o altri composti antimicrobici e aventi la migliore composizione chimica in termini di aminoacidi liberi e peptidi. Sono state condotte delle preliminari prove di crescita di batteri lattici appartenenti alle specie più comunemente utilizzate nella produzione di colture starter naturali e indigeni del latte. Sulla base di queste attività sono stati individuati 5 latt più idonei a supportare la crescita dei batteri lattici per la produzione di Caciocavallo Pugliese

A3.2. Selezione di batteri lattici autoctoni da impiegare come colture starter naturali per la produzione di Stelvio (UNIBZ) e Caciocavallo Pugliese (UNIBA)

Per ottimizzare il processo di selezione degli isolati appartenenti alla bio-banca del latte dell'Alto Adige per la formulazione di starter naturali, è stato disegnato ed applicato un modello matematico che utilizza scelte casuali per produrre combinazioni tra gli isolati della bio-banca stessa. I 2094 isolati sono stati raggruppati in 3 gruppi principali: (i) il primo gruppo comprende gli isolati provenienti dai campioni di latte di aziende con vacche di razza a produzione alta, media e mista; (ii) il secondo gruppo comprende i generi *Lactobacillus* e *Lactococcus* e altre specie in base alla loro tassonomia; e (iii) il terzo gruppo contiene isolati categorizzati in base alla temperatura di crescita ideale (30 o 37°C). Il numero finale di combinazioni casuali è 680 e include 3 isolati per combinazione, di cui è stato effettuato uno screening con particolare riferimento alla capacità di produrre peptidi durante la fermentazione del latte, acidificazione e crescita. Le combinazioni sono state inoculate in latte ricostituito, come di seguito descritto. Latte scremato in polvere (Oxoid, Hampshire, UK) con il 10% (p/v) di solidi solubili totali, 3,4% di proteine, 4,5% di lattosio e 1,5% di grasso è stato idratato e sterilizzato a 121°C for 5 min. Due millilitri di coltura pura dei batteri lattici selezionati sono stati centrifugati a 10,000 rpm per 10 minuti at 4°C, portati alla densità cellulare di 7 log cfu/ml e inoculati in 5 ml di latte ricostituito. Il pH iniziale del latte era 6,7; dopo 6 ore di fermentazione a 30°C, è stato registrato un pH compreso tra 4,01 ± 0,45 e 6,19 ± 0,52, mentre la concentrazione dei peptidi (determinata tramite il metodo OPA) oscillava tra 0,37 ± 2,3 mg/mL e 0,92 ± 0,89 mg/mL. Venti delle 680 combinazioni hanno mostrato una capacità di acidificazione molto bassa e mancanza di coagulazione. Al contrario, 32 combinazioni hanno dimostrato buona capacità di acidificazione, ma i campioni di latte fermentato erano caratterizzati da odori forti. Un totale di 131 combinazioni ha mostrato un pH compreso tra 4,5 e 4,65, vicino al punto isoelettrico delle caseine (4,6), e sono state classificate in ordine decrescente per la concentrazione di peptidi, compresa tra 0,40 ± 2,01 mg/mL e 0,90 ± 0,38 mg/mL. Per esaminare le differenze che possono emergere da un singolo microrganismo della tripla, è stata effettuata una ulteriore selezione random sulle prime quattro combinazioni con concentrazione più alta di peptidi. Sono state individuate 75 nuove combinazioni e modificate in modo casuale dal modello matematico. Come risultato, 150 combinazioni hanno mostrato un range di pH compreso tra 3,8 ± 0,56 e 4,7 ± 0,52 e la concentrazione peptidica da 0,81 ± 1,04 a 1,08 ± 0,89 mg/ml. L'errore relativo standard (RSE) di ogni gruppo di misurazioni

oscillava tra 0,76 e 4,15 per la concentrazione di peptidi, tra 0,86 e 6,4 per il pH. Tale risultato indica che le piccole differenze indotte da un singolo microrganismo nella tripletta sono riproducibili, confermando la validità del modello matematico. Su 150 combinazioni totali, 93 sono risultate le più promettenti in seguito alle prove di fermentazione in latte, e sono state testate per la produzione di mini-formaggi usando il metodo di lavorazione dello Stelvio. Il processo di caseificazione è stato adattato a piastre da 96 pozzetti (**Figura 8**) con sistema di riscaldamento e rottura della cagliata creati *ad hoc*. In breve, il latte è stato pastorizzato a 72°C per 2-3 sec, inoculato con i ceppi della tripletta a densità cellulare di ca. 7 log cfu/ml (1%, v/v) e scaldato a 32-33°C per 50-60 min. Successivamente è stato aggiunto il caglio e incubato 20 min per la formazione del coagulo, che è stato poi tagliato in grani piccoli per 10-15 min. Una parte del siero è stata scaricata, e la cagliata è stata cotta a 40°C per 10 min. Infine, le mini-cagliate sono state sottoposte a centrifugazione per simulare la fase di pressatura, salate in soluzione al 20% (p/v) di NaCl e stagionate a 10-14°C e RH 85-95%. La concentrazione di peptidi nei mini-formaggi era compresa tra 2,75 ± 0,16 mg/g e 3,73 ± 0,14 mg/g, mentre la concentrazione totale di aminoacidi liberi (FAA) oscillava tra 1,4 ± 0,15 mg/g e 1,69 ± 0,16 mg/g. L'umidità dei mini-formaggi era compresa tra 45 ± 1.20% e 50 ± 1.98%, mentre il pH tra 4,70 ± 0,96 e 5,50 ± 1,86 (**Tabella 3**). Le variabili misurate (FAA, peptidi, umidità e pH) sono state sottoposte all'analisi cluster, e raggruppate in 4 cluster rappresentativi con il metodo Elbow per una ulteriore selezione delle combinazioni (**Figura 9**). Da ogni cluster sono state selezionate 5 combinazioni (per un totale di 20), la cui composizione è mostrata in **Tabella 4**. Il profilo dei volatili dei campioni prodotti con le suddette 20 combinazioni è stato analizzato tramite GC × GC-TOF MS.

I composti rilevanti dal punto di vista caseario e l'area media dei picchi delle repliche biologiche sono indicati in **Tabella 5**. I campioni sono stati sottoposti a ulteriore analisi dei cluster in base all'area media dei picchi, includendo anche un campione controllo, prodotto senza l'aggiunta di colture starter. I campioni sono stati raggruppati in 2 cluster principali, uno dei quali contenente il mini-formaggio controllo (**Figura 10**). I composti aromatici totali mostravano una differenza significativa tra i due clusters ($P < 0,001$, One-way Anova), ma nessuna significatività è emersa analizzando le classi di composti identificati. Sulla base di questi risultati e dell'identificazione dei ceppi tramite sequenziamento parziale del 16S rRNA, sono state selezionate 5 combinazioni da testare su scala di impianto pilota per la produzione di Stelvio. Le 5 combinazioni finali sono le seguenti: (i) C3 - *Lactococcus lactis cremoris*, *Lactiplantibacillus paracasei*, *Streptococcus pasteurianus*; (ii) C6 - *Lactococcus taiwanensis*, *L. paracasei*, *Lactobacillus curvatus*; (iii) C15 - *Lc. lactis*, *L. paracasei*, *Lactobacillus gasserii*; (iv) C17 - *Lc. lactis*, *L. paracasei*, *Lactobacillus helveticus*; (v) C20 - *Pediococcus pentosaceus*, *Lc. lactis subsp. cremoris*, *L. helveticus*.

I ceppi selezionati per tale attività e per l'attività 3.3 sono stati sottoposti ad analisi metagenomica con lo scopo di rilevare geni di resistenza agli antibiotici. In seguito all'estrazione del DNA totale, sono state preparate le librerie Illumina, usando il kit di preparazione Nextera XT DNA e sequenziate usando il sequenziatore Illumina HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA, United States). Tutte le sequenze avevano una corrispondenza superiore a 40× coverage, una media N50 superiore a 350,000, e una media di 116 contigs (mediana: 97 contigs). I geni di antibiotico-resistenza sono stati identificati usando il database CARD e lo strumento RGI con il settaggio di default. Il rilevamento di sequenze CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) nel genoma è stato eseguito usando il server CRISPRCasFinder. I profagi putativi all'interno degli scaffold di 10 genomi assemblati de-novo sono stati identificati usando il server PHAST web (PHAge Search Tool). La presenza di plasmidi e l'origine di trasferimento (oriT) sono state analizzate usando rispettivamente il database PLSDb e il server oriT-Finder (v. 3.2). Non sono state individuate resistenze agli antibiotici nei ceppi selezionati, né profagi o elementi di trasferimento oriT, responsabili per il trasferimento genico orizzontale.

Per l'attività di selezione dei batteri lattici isolati dai lattici prelevati dalle 133 aziende pugliesi sono state prese in considerazione le seguenti caratteristiche pro-tecnologiche: i) la capacità di crescere in latte e siero di latte; ii) l'attività antimicrobica; iii) l'assenza di caratteri di antibiotico-resistenza; iv) le attività proteasica e peptidasiche; v) la presenza di enzimi-chiave del catabolismo degli aminoacidi. Per rilevare la presenza di determinanti genici di resistenza agli antibiotici sono stati usati approcci coltura dipendenti e indipendenti, grazie alla collaborazione con il Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione- CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria) su circa 42 batteri lattici dotati di elevata capacità di crescita in latte e siero di latte. Sono stati realizzati dei pre-screening, relativi alla crescita dei microrganismi su piastre contenenti concentrazioni di antibiotici pari ai cut-off (mg/l) riportati nel "Guidance on microorganisms used as feed additives or as production organisms" dell'European Food Safety Authority (EFSA). Per la valutazione del profilo di antibiotico-resistenza (AbR) è stato adottato l'approccio della MIC (Minimum Inhibitory Concentration). In particolare, sono stati considerati ampicillina, gentamicina, kanamicina, streptomina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e cloramfenicolo (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), ISO standard). Alcuni ceppi sono stati saggiati oltre il range di resistenza, in particolare la streptomina fino a 8 g/l e kanamicina ed eritromicina fino a 2 g/l. Dopo incubazione per 24 h le piastre sono state sottoposte a lettura spettrofotometrica a OD600 per individuare la MIC relativa a ciascun antibiotico. Gli esperimenti sono stati condotti su ceppi afferenti alle specie di LAB isolate dai campioni relativi alla stagione invernale e a quella estiva, in particolare: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weissella* e *Enterococcus* dotati di elevata capacità acidificante in latte e siero di latte. La maggior parte dei ceppi testati sono risultati sensibili alla ampicillina, vancomicina, gentamicina, clindamicina e kanamicina. Diversi ceppi invece, sono risultati resistenti alla streptomina con MIC che variano da 64 mg/l a valori superiori a 2 g/l. I risultati hanno evidenziato sensibilità della maggior parte dei ceppi alla eritromicina e alla tetraciclina. Solo un ceppo testato è risultato resistente al cloramfenicolo. I ceppi appartenenti al genere *Leuconostoc* sono risultati sensibili alla kanamicina mentre quelli afferenti al genere *Lactobacillus* sono risultati suscettibili a tutti gli antibiotici testati. Al contrario, i dati delle MIC hanno mostrato la presenza di resistenze multiple per il genere *Lactococcus* ma non per tutti i ceppi. Confrontando i dati tra ceppi isolati da lattici provenienti dalla stagione invernale e quella estiva, non sono state osservate differenze significative. Nell'approccio coltura indipendente, è stato impiegato DNA genomico estratto da latte crudo, che è stato amplificato con coppie di primers specifiche per i geni di antibiotico-resistenza. Non è stata rilevata una corrispondenza diretta tra i risultati di antibiotico resistenza determinati con approccio coltura dipendente e con metodi

molecolari, indicativo che la presenza di un elemento genetico correlato alla resistenza non è necessariamente indicativa di espressione e, quindi, di resistenza. Sulla base dei risultati ottenuti, sono stati ulteriormente caratterizzati i 42 ceppi di LAB considerati relativamente sicuri per essere utilizzati come colture starter naturali o aggiunte nella produzione di Caciocavallo pugliese, in quanto la resistenza era limitata a pochi antibiotici e sono stati rilevati solo pochi geni impiegati come marcatori genetici correlati alla resistenza agli antibiotici.

La selezione di batteri lattici autoctoni da impiegare nella produzione di Caciocavallo Pugliese è stata altresì basata sulla determinazione dell'attività proteasica e peptidasica e sulla presenza di enzimi-chiave del catabolismo degli aminoacidi. Per l'attività proteasica, cellule dei 42 ceppi di batteri lattici dotati da elevata crescita in latte e siero di latte e non antibiotico resistenti, sono state cresciute in fase stazionaria in MRS o M17 liquido. La sospensione cellulare è stata standardizzata (DO650 = 1) e usata per inoculare (4 e 10% v/v) i 5 latti crudi più idonei a supportare la crescita dei batteri lattici, selezionati in A3.1. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, il prodotto di fermentazione è stato aggiunto (4 e 10% v/v) ad una seconda serie di tubi di latte e incubati per 24 ore a 37°C. Sulle sospensioni cellulari standardizzate sono state determinate le attività peptidasiche coinvolte nel catabolismo degli aminoacidi mediante substrati sintetici. Sono state determinate l'attività aminopeptidasi (PepN), iminopeptidasi (PepI), endopeptidasi (PepO), glutammato deidrogenasi (GDH) e cistationina liasi. L'attività dell'aminopeptidasi tipo N è stata valutata sul substrato Leu-p-nitroanilide (Na). L'attività della PepI su Pro-p-Na, mentre l'attività della PepO è stata valutata su Z-Gly-Gly-p-Na, come descritto da Gobetti et al., (1999. Int. Dairy J. 488 9). Non vi sono state differenze significative tra i ceppi isolati dai latti a differente stagionalità. Le attività proteasiche, peptidasiche e coinvolte nel catabolismo aminoacidico sono state testate anche utilizzando tecniche di elettroforesi bidimensionale. I profili elettroforetici ottenuti non presentano differenze statisticamente rilevanti per la stessa specie isolata da latti a diversa stagionalità. I batteri lattici selezionati per la capacità di acidificare latte e cagliata, assenza di antibiotico resistenza, attività proteasica e peptidasi e la presenza di enzimi-chiave del catabolismo degli aminoacidi, sono stati testati per la capacità di ridurre la concentrazione di sostanze indesiderate come le ammine biogene. La capacità dei 42 ceppi di degradare le ammine biogene (BA) è stata saggiata mediante HPLC, la cui percentuale è stata calcolata sulla base del confronto delle aree dei picchi corrispondenti a tiramina, istamina, putrescina, cadaverina, triptamina, 2-fenilettilamina, spermina e spermidina prima e dopo incubazione dei batteri lattici autoctoni selezionati su un substrato sintetico a composizione definita (CDM) e di ciascuno dei 5 latti idonei (attività A3.1) supplementato con concentrazioni note di BA. La maggior parte degli isolati era in grado di degradare almeno una o più BA. Istamina, tiramina, putrescina e cadaverina sono state le BA più comunemente degradate. La capacità di degradare le BA, come evidenziato dalle analisi dei profili HPLC, è stata compresa tra il 22 ed il 43%. I batteri lattici autoctoni capaci di degradare almeno una BA erano stati isolati da latti raccolti sia nel periodo invernale che nel periodo estivo, permettendoci di escludere una possibile correlazione tra la capacità di degradare BA e la stagionalità. I ceppi (30) che hanno mostrato caratteristiche utili ai fini dell'impiego come colture starter sono stati utilizzati in saggi *in vitro* finalizzati a valutare l'attività antimicrobica nei confronti di microrganismi indicatori di qualità e di salubrità specifici dei formaggi, tra cui *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, ed *Escherichia coli*. L'attività antimicrobica è stata stimata mediante saggio *agar well diffusion*. Cellule dei LAB selezionati sono state cresciute in fase stazionaria in MRS o M17 liquido e usate per inoculare (10% v/v) latte crudo idoneo. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C, il surnatante di fermentazione è stato saggiato per l'attività antimicrobica sui ceppi patogeni, e le proteine presenti in esso sono state estratte. La maggior parte dei ceppi testati hanno mostrato la capacità di inibire i ceppi target testati; in particolare, tutti sono stati in grado di inibire *Listeria monocytogenes*. I ceppi termofili e mesofili isolati dai diversi latti, sono stati miscelati per produrre cinque formulazioni di starter autoctoni, come descritto di seguito: NWS1: *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus rhamnosus*; *Lactobacillus gallinarum*; *Streptococcus thermophilus*; NWS2: *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus rhamnosus*; *Lactobacillus gallinarum*; *Lactobacillus fermentum*; NWS3: *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus rhamnosus*; *Lactobacillus delbrueckii*; *Lactobacillus gallinarum*; *Lactococcus lactis*; NWS4: *Lactobacillus plantarum*; *Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus delbrueckii*; *Lactobacillus casei*. NWS5: *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus delbrueckii*; *Lactobacillus casei*; *Enterococcus faecalis*.

I pre-requisiti valutati per ottenere delle colture starter per la produzione di Caciocavallo sono: (i) elevata densità cellulare iniziale (9.0 log₁₀ ufc/g) per evitare ritardi nell'acidificazione; (ii) crescita rapida durante la propagazione; (iii) mantenimento dell'attività acidificante durante la prolungata propagazione; (iv) l'attività antimicrobica; (v) l'assenza di caratteri di antibiotico-resistenza; (vi) le attività proteasica e peptidasiche; (v) la presenza di enzimi-chiave del catabolismo degli aminoacidi. I ceppi di batteri lattici selezionati sono stati coltivati a 30 o 37 °C per 24h in MRS broth per lattobacilli; M17 broth (Oxoid) per lattococchi e streptococchi; e Stanetz & Bartley (Oxoid) per enterococchi. Le colture sono state inoculate alla densità cellulare di ca. 7,0 log ufc/ml nei 5 latti più idonei per la produzione di Caciocavallo Pugliese selezionati nell'A3.1 con incubazione a 30 °C o 37 °C per 18 e 24h. Dopo 30min, è stato aggiunto caglio liquido di vitello (ca. 0.3 ml/kg). A pH 5,1, è stato rotto il coagulo e recuperato il siero di latte incubato, successivamente, a 30 e 37 °C per 18 e 24h. La propagazione back-slopping (10%, v/v) è stata condotta per le cinque miscele starter in ciascuno dei 5 latti più idonei a supportare la crescita dei batteri lattici per 30 giorni alle 2 temperature (30 e 37°C per 18 e 24h) al fine di individuare i protocolli di produzione e propagazione del siero-innesto più performanti e che garantissero migliori stabilità e funzionalità. Durante la propagazione giornaliera, il pH è stato monitorato on line. Inoltre, è stata determinata la densità cellulare e l'acidità totale. La propagazione è stata condotta in tre repliche indipendenti, registrando i dati relativi alla cinetica di acidificazione e di crescita. Dopo 18 e 24h di fermentazione si è osservato un aumento di lattobacilli termofili e mesofili, streptococchi, che è rimasto costante per 30 giorni, per poi decrescere. La cinetica di acidificazione dei NWS durante i 30 giorni di propagazione in latte mostrava valori medi di pH nel range di 3,4-4,44. Valori medi più bassi (3,18-3,9) sono stati trovati durante la propagazione in latte a 37°C. I NWS propagati in latte a 30°C mostravano valori di acidità di titolazione pari a 30-32°SH/50.

L'analisi Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) ha confermato la stabilità dei ceppi durante la propagazione delle formulazioni NWS1, NWS2 e NWS3. Il monitoraggio dei ceppi dei sieroinnesti nelle condizioni

di propagazione selezionate è stato condotto anche attraverso l'analisi Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). La tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization – Microscopia in Fluorescenza), con rilevazione mediante microscopia laser confocale, ha consentito di condurre indagini filogenetiche sulla composizione e struttura delle comunità microbiche dei sieroinnesti sia in termini qualitativi che quantitativi, senza ricorrere a tecniche culturali. È stato possibile visualizzare selettivamente in microscopia i singoli microorganismi dimostrando la stabilità microbiologica dei ceppi in risposta alle condizioni di propagazione.

A completamento di tali analisi sono state condotte anche prove di assimilazione fonti di carbonio e azoto con Omnilog su ogni sieroinnesto selezionato (NWS1, NWS2, NWS3, NWS4 a inizio e fine dei 30 giorni di propagazione), che variava tra l'inizio e la fine della propagazione. In generale, senza significative differenze tra i diversi NWSs, le principali classi chimiche assimilate sono state carboidrati e aminoacidi seguiti da acidi carbossilici. I sieroinnesti all'inizio della propagazione mostravano bassi valori di assimilazione dei substrati, che sono aumentate con il tempo di propagazione. Analisi meta-trascrittomiche sono state condotte per valutare le performance metaboliche dei sieroinnesti selezionati a inizio e durante i 30 gg di propagazione. I risultati hanno fornito evidenza del ruolo dei batteri lattici selezionati nelle attività metaboliche che influenzano positivamente l'odore e il sapore del formaggio e che accelerano la maturazione. Rispetto all'inizio della propagazione, è stato osservato un incremento nell'espressione dei geni relativi alla proteolisi, lipolisi e catabolismo degli aminoacidi. Risultavano anche overespressi geni relativi alla via metabolica di Leloir sulla degradazione del galattosio. Sono stati rilevati differenti livelli di espressione, tra i diversi NWSs, dei geni coinvolti nella sintesi dell'acetoino e del diacetile. Inoltre, sono state rilevate le attività metaboliche relative a numerose peptidasi, permeasi, e lipasi, soprattutto nei sieroinnesti NWS1 e NWS4. La presenza di colture starter è stata positivamente associata ai geni coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi.

Metaboliti organici volatili sono stati analizzati. Al termine della propagazione, erano abbondanti gli acidi grassi volatili a corta catena (acido butanoico, pentanoico, esanoico, eptanoico, octanoico e decanoico), chetoni (2-metil chetone) e alcoli (esano, 1-butanolo). Sulla base dei risultati ottenuti, sono stati selezionati 24 batteri lattici starter con cui sono stati formulati 5 sieroinnesti costituiti da batteri lattici autoctoni e coltivati sui lattii più idonei e sono stati messi a punto protocolli di produzione e propagazione di siero-innesto a base di latte selezionato e batteri lattici autoctoni.

A3.3. Selezione di batteri lattici autoctoni da impiegare come colture aggiunte per la produzione di Stelvio (UNIBZ) e Caciocavallo Pugliese (UNIBA)

L'attività di selezione dei batteri lattici autoctoni idonei alla costituzione di colture aggiunte per la produzione di Stelvio e Caciocavallo Pugliese è stata interrotta il 9 marzo causa Covid-19 e ripresa a giugno 2020.

In accordo con la modellazione matematica sopra descritta (cfr. A3.2), le 680 combinazioni casuali includono 3 isolati per combinazione (appartenti alla bio-banca dell'Alto Adige), che sono state testate preliminarmente sulla base dei caratteri tecnologici che caratterizzano le colture usate come starter, primo fra tutti il ridotto potere di acidificazione. Come regola generale, uno starter dovrebbe produrre abbastanza acido da ridurre il pH del latte in ca. 6 h a 30-37°C. Per la selezione di batteri lattici da usare come colture aggiunte, il potere di acidificazione non è così importante come per le colture starter. Venti su 680 combinazioni, mostravano una capacità di acidificazione molto limitata e assenza di formazione di cagliata. Il pH dei lattii fermentati con queste combinazioni era compreso tra 5,9 e 6,2, la concentrazione di peptidi tra 0,40 ± 1,01 mg/mL e 0,60 ± 1,38 mg/mL. Come è stato descritto per la selezione delle colture starter, queste combinazioni sono state usate per la produzione di mini-formaggi. La concentrazione di peptidi nei mini-formaggi oscillava tra 1,75 ± 0,10 mg/g e 2,00 ± 0,16 mg/g, gli aminoacidi liberi totali (FAA) tra 2,1 ± 0,18 mg/g e 2,75 ± 0,19 mg/g, l'umidità tra 55 ± 1,40 % e 57 ± 1,50 %, e il pH tra 5,00 ± 0,99 e 5,70 ± 1,74. I profili dei composti volatili dei mini-formaggi sperimentali sono stati raggruppati in due cluster e analizzati con l'analisi dei componenti principali (**Figura 11**). Per il primo cluster, i campioni si sono separati sulla PC1 per l'acido acetico e 3-metilbutan-1olo, con correlazione positiva. Al contrario, sulla PC2 l'acido acetico era correlato positivamente, mentre il 3-metilbutan-1olo era correlato negativamente (>0,65%). Sulla PC3, octano, acido 3-methyl-pentanoico, acetoino, 2,5-esandiolo, 2,5-dimetile sono correlati positivamente (>0,65%). Allo stesso modo, la PCA del secondo cluster ha spiegato il 92,4% della varianza totale con le prime 3 componenti principali (PC1 58,76%, PC2 17,46%, e PC3 16,18%). Sulla PC1, 3-metilbutan-1olo, 1-butanolo, 3-metile e acetoino hanno mostrato una correlazione positiva (>0,65%), mentre l'acido acetico aveva una correlazione negativa. Sulla PC2, alcuni alcoli primari e secondari erano correlati negativamente, come il 1-nonano, 2,3 butandiolo (>0,65%), mentre alcuni acidi grassi erano correlati positivamente (>0,65%), tra cui l'acido propanoico e il 2-metile. Sulla PC3, il 2-butanone e l'etanolo hanno mostrato una correlazione positiva, mentre il 3-eptanone ha mostrato una correlazione negativa (>0,65%). I campioni 7, 9, e 13 appartenenti al cluster 1 e i campioni 5, 8 e 18 appartenenti al cluster 2, hanno mostrato la più alta concentrazione di composti volatili con una differenza significativa rispetto al campione controllo (P<0,05, Tuckey test). Un totale di 5 combinazioni (3 appartenenti al cluster 1) e due appartenenti al cluster 2) sono state selezionate per essere testate come colture starter attenuate per la produzione di Stelvio in scala di impianto pilota. Le 2 combinazioni del cluster 1 sono costituite da: C1) *Lactococcus lactis cremoris*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactiplantibacillus paracasei*; C2) *Lactococcus taiwanensis*, *Lactiplantibacillus paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. joggajibkimchii*, mentre le 3 combinazioni del cluster 2 sono costituite da: C5) *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactiplantibacillus paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. joggajibkimchii*, C8) *Lactococcus taiwanensis*, *Lactiplantibacillus paracasei*, *Lactobacillus parabuchneri*, C18) *Lactococcus taiwanensis*, *Weissella hellenica*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. Per la selezione dei batteri lattici autoctoni presenti nella bio-banca di UNIBA per individuare i ceppi idonei alla costituzione di colture sono stati utilizzati i seguenti criteri: (i) ridotto/assente potere acidificante (attenuazione); (ii) capacità di crescere durante la stagionatura del formaggio, in presenza quindi di condizioni ambientali sfavorevoli; (iii) attività peptidasiche multiple; (iv) catabolismo degli aminoacidi liberi; (v) assenza di determinanti di antibiotico-resistenza. Nell'ambito dei 266 testati, sono stati selezionati 42 ceppi di batteri lattici autoctoni presenti nella bio-banca di UNIBA (già selezionati in A3.2 per le migliori attività enzimatiche). Essi sono stati coltivati a 30 o 37

°C per 24h sui seguenti terreni colturali: MRS broth per lattobacilli; M17 broth per lattococchi e streptococchi; e Slanetz & Bartley per enterococchi. Il potere acidificante è stato valutato mediante cinetica di acidificazione durante la fermentazione del latte. Inoltre, è stata testata l'attenuazione come strategia per l'ottenimento di colture aggiunte a ridotto potere acidificante. I batteri lattici sono stati attenuati come descritto da Di Cagno et al. (2012. J Dairy Sci 95,9). Le cellule attenuate o non trattate (non sottoposte a sonicazione) sono state usate per inoculare ciascuno dei latti idonei a supportare la crescita dei batteri lattici per la produzione di Caciocavallo Pugliese o in siero di latte a 30 e 37°C per 72 e 80 h (attenuate) o a 30 e 37°C per 18 e 24h (non trattate). La cinetica di crescita ed acidificazione delle colture aggiunte attenuate e non attenuate è stata stimata monitorando il pH e la densità cellulare mediante conta vitale in piastra e modellazione mediante l'equazione di Gompertz, modificata da Zwietering *et al.* (1990). I batteri lattici autoctoni da impiegare come colture aggiunte differivano nella lunghezza della fase di latenza della crescita (comprese tra 0,49 e 4,54 h), che rifletteva la diversa capacità di adattamento al latte. Quando è stata usata l'attenuazione, le densità cellulari iniziali (circa 5 log ufc/ml) incrementavano fino a 3,5 cicli logaritmici dopo 80 h, lievemente meno rispetto alle colture aggiunte non sonicate. L'aumento della lunghezza della fase di latenza era correlato al trattamento con sonicazione e, probabilmente, al danno delle cellule. Alla fine dell'incubazione, i valori di ΔpH per le colture di batteri lattici non trattate (intervallo da 1,85 a 2,08 unità) e sonicate (intervallo da 1,92 a 2,32 unità) erano significativamente differenti. Inoltre, sulle colture sono state determinate le attività peptidasiche relative al catabolismo degli aminoacidi come descritto nella sezione A3.2. L'attività di numerosi enzimi coinvolti nella stagionatura dei formaggi (aminopeptidasi tipo N, prolina imminopeptidasi e cistationina liasi) erano notevolmente più elevate nelle colture attenuate rispetto alle non trattate. È possibile ipotizzare che il trattamento di sonicazione, danneggiando la membrana cellulare, abbia provocato il rilascio di enzimi intracellulari e quindi attività più elevate, come già riportato da Di Cagno et al. (2012. J Dairy Sci 95, 9). Per rilevare la presenza di determinanti genici di resistenza agli antibiotici sono stati usati approcci cultura dipendenti e indipendenti descritti nella sezione A.3.2 in collaborazione con l'ente convenzionato Centro di Ricerca Alimenti e Nutrizione - CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria). La maggior parte dei ceppi testati sono risultati sensibili alla ampicillina, vancomicina, gentamicina, clindamicina, kanamicina, streptomina, e alla tetraciclina. Solo due ceppi testati sono risultati resistenti al cloramfenicolo e alla eritromicina. Le colture a ridotto/assente potere acidificante ottenute per attenuazione o senza trattamento e prive di determinanti di antibiotico-resistenza sono state usate in prove di microcaseificazione di formaggio Caciocavallo su scala di laboratorio (**Figura 12**). Le colture aggiunte non trattate (non sonicate) sono state aggiunte in differenti combinazioni con densità cellulare di ca. $7,0 \pm 0,2$ log cfu/mL, mentre le colture in forma attenuata sono state aggiunte a densità cellulare (prima del trattamento di sonicazione) di ca. $9,2 \pm 0,1$ log cfu/mL di latte, corrispondente a ca. $5,3 \pm 0,2$ log cfu/mL di cellule coltivabili nel latte. I Caciocavalli pugliesi sono stati prodotti in accordo con il protocollo di Di Cagno et al. (2012. J Dairy Sci 95, 9) in laboratorio e conservati a 10°C per 60 giorni. Campioni controllo senza colture aggiunte e attenuate sono stati contestualmente prodotti. I Caciocavalli ottenuti su scala di laboratorio sono stati valutati mediante conta vitale in piastra su terreni di coltura agarizzati: MRS per lattobacilli mesofili e termofili incubati a 30 e 42°C per 48 h, rispettivamente; M17 per lattococchi e streptococchi incubati a 30 e 42°C per 48 h, rispettivamente, e Slanetz & Bartley per enterococchi incubati a 37°C per 48 h. È stato, inoltre, determinato il pH. Sui campioni di Caciocavallo è stata eseguita la determinazione del tenore di umidità (IDF, 1982) e di proteine attraverso il metodo macro-Kjeldahl (IDF, 1964). La concentrazione dei grassi è stata determinata con il metodo Gerber (IS, 1955). L'uso delle colture attenuate non ha influenzato né il pH né la composizione chimica dei formaggi caciocavallo, come emerge dal confronto con i formaggi controllo. Le densità cellulari relative ai presumibili batteri lattici sono incrementate progressivamente durante la stagionatura fino ad un valore stabile prossimo a $8,3$ log ufc/g (45-60 giorni). Valori leggermente più alti sono stati osservati in formaggi con colture aggiunte (ca. $8,7$ log ufc/g). Colonie isolate casualmente dalle piastre con le più alte diluizioni dei terreni, sono state sottoposte a tipizzazione RAPD-PCR (come descritto in A3.2), confermando la presenza dei profili corrispondenti alle colture aggiunte. Estratti solubili dei formaggi sono stati usati per valutare le attività enzimatiche coinvolte nel catabolismo degli aminoacidi, come descritto per l'attività A3.2. Le maggiori attività enzimatiche sono state osservate dopo 45 giorni di stagionatura, ed erano più alte (minimo 2 volte) nei formaggi prodotti con le colture attenuate rispetto al controllo. La concentrazione totale e quella individuale di aminoacidi liberi (FAA) negli estratti solubili in acqua dei formaggi ottenuti su scala di laboratorio sono state determinate con un analizzatore di aminoacidi Biochrom 30. All'inizio della stagionatura sono state osservate poche differenze, mentre a fine stagionatura, la concentrazione di FAA era significativamente più alta (minimo 3 volte) nei formaggi ottenuti con le colture aggiunte attenuate. Le proprietà sensoriali dei campioni controllo a 60 giorni di stagionatura sono state paragonate a quelle del formaggio con le colture aggiunte attenuate e non dopo 45 giorni, mediante impiego di test triangolare. I dati hanno mostrato che i formaggi non differivano in modo significativo, pertanto, le colture aggiunte avevano determinato un'accelerazione della stagionatura. Inoltre, tutti i campioni controllo e i quelli con colture aggiunte non trattate sono stati classificati come parzialmente accettabili, mentre i campioni con colture aggiunte attenuate sono stati definiti come preferibili. In conclusione, sono state selezionate e formulate 5 colture aggiunte costituite da batteri lattici autoctoni: (i) *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*; (ii) *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*; (iii) *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus reuteri*; (iv) *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*; (v) *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus helveticus*.

WP4 – Messa a punto ed uso in caseificazione di starter naturali e colture aggiunte per la produzione di Stelvio e Caciocavallo Pugliese

A4.1 Messa a punto di un protocollo produttivo su scala di impianto pilota del formaggio Stelvio con migliorate caratteristiche qualitative mediante l'uso di latte-innesti e colture aggiunte specifiche (UNIBZ)

Le 5 formulazioni starter selezionate sono state testate per la produzione di latte-innesti da applicare a livello industriale per la produzione di Stelvio. I prerequisiti più importanti, considerati per utilizzare delle colture starter per la produzione di Stelvio,

sono stati: (i) elevata densità cellulare iniziale (ca. 9,0 Log ufc/mL); (ii) stabilità dei ceppi durante la fermentazione; e (iii) mantenimento dell'attività acidificante durante la fermentazione.

Gli starter mesofili e termofili selezionati sono stati inoculati all'1% in latte fresco intero e incubati rispettivamente a 30 e 37°C per 6 ore, al termine delle quali hanno raggiunto una densità cellulare compresa tra $10 \pm 0,2$ e $8,56 \pm 0,15$ Log ufc/mL.

Secondo il disciplinare DOP, lo Stelvio viene prodotto combinando l'azione di colture starter industriali (1%, p/v) con il latte-innesto prodotto quotidianamente. In questa fase della sperimentazione, il latte-innesto sperimentale è stato usato in combinazione con le miscele selezionate di starters. Per la produzione del latte-innesto, il latte viene termizzato a 55-65 °C per 15 sec, raffreddato a 45°C e incubato per 8-10 h a 10°C. La densità cellulare dei batteri lattici mesofili nel latte-innesto era compresa tra $5 \pm 0,2$ e $3,7 \pm 0,4$ Log cfu/g. Successivamente all'inoculo (1%, v/v) degli starter mesofili e termofili in 10 mL di latte-innesto, la densità cellulare stimata per i batteri lattici mesofili era di ca. 10 Log ufc/mL. La capacità di acidificazione delle formulazioni selezionate e inoculate nel latte-innesto era paragonabile a quella dei ceppi inoculati in latte in termini di valori di pH, ma la formulazione C15 è risultata la migliore in termini di velocità di acidificazione (pH<5 in 3 ore e 40 minuti). Il monitoraggio della stabilità dei ceppi durante la fermentazione è stato condotto attraverso l'analisi Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR). Dopo le 6 h di fermentazione, tutti i batteri lattici inclusi nelle 5 formulazioni sono stati ritrovati. A ulteriore conferma, per il monitoraggio della stabilità dei ceppi durante la propagazione, i biotipi tipizzati mediante RAPD-PCR, sono stati identificati mediante la sequenza parziale del gene che codifica per l'rRNA 16S, amplificata mediante due coppie di primer (LacbF/LacbR e LpCoF/LpCoR), confermando le specie usate. Il disciplinare di produzione del formaggio Stelvio non consente l'uso di siero-innesto, ragion per cui le combinazioni starter non sono state testate per questo scopo. Sulla base dei risultati ottenuti, la formulazione starter C15 è stata selezionata per le prove di caseificazione in impianto pilota. Per le colture aggiunte selezionate in A3.3, esse sono state usate in miscela in latte-innesto con densità cellulare di $7,0 \pm 0,1$ Log cfu/mL. I campioni di formaggio Stelvio sono stati prodotti in laboratorio in accordo con il protocollo in A3.2 e stagionati a 15°C per 60 giorni. Dei formaggi sono stati contestualmente prodotti usando starter industriali e monitorati come controllo. I formaggi ottenuti su scala di laboratorio sono stati usati per valutare la capacità delle colture non trattate di crescere durante la stagionatura del formaggio, come descritto per l'attività A3.2, mediante conta vitale in piastra su terreni di coltura agarizzati: MRS per lattobacilli mesofili incubati a 30°C per 48 h; M17 per lattococchi incubati a 30°C per 24 h. Le densità cellulari relative ai presumibili batteri lattici sono incrementate progressivamente durante la stagionatura fino ad un valore stabile prossimo a 9 Log ufc/g dopo 60 giorni. Colonie isolate casualmente dalle piastre con le più alte diluizioni dei terreni usati per la determinazione delle densità cellulari, sono state sottoposte a tipizzazione RAPD-PCR, confermando la presenza dei profili corrispondenti alle colture aggiunte. Sui campioni è stato, inoltre, determinato il pH e il tenore di umidità. L'uso delle colture aggiunte non ha influenzato né il pH né l'umidità, come emerge dal confronto con i formaggi controllo, ad eccezione delle combinazioni C2 e C18, che hanno causato una riduzione significativa ($p < 0,05$) del pH della cagliata dopo 6 ore dall'estrazione ($4,5 \pm 0,05$), rispetto ai campioni controllo ($4,8 \pm 0,1$). Estratti solubili dei formaggi sono stati usati per la concentrazione totale di FAA, come descritto per l'attività A3.2. All'inizio della stagionatura sono state osservate differenze non significative ($p > 0,05$) in merito alla concentrazione totale di aminoacidi, mentre a fine stagionatura è stato osservato un incremento significativo di FAA totali, pari o superiore a 3 volte, nei formaggi prodotti con le colture aggiunte rispetto ai campioni controllo. La combinazione C2 è risultata la più performante in termini di incremento di FAA totali, corrispondente a 10 volte, ed è stata selezionata per le prove di caseificazione su scala di impianto pilota.

In conclusione, sono state selezionate le formulazioni C15 e C2, rispettivamente come colture starter e aggiunte per la produzione di Stelvio in impianto pilota e messa a punto del protocollo per il successivo step di trasferimento tecnologico.

I formaggi Stelvio sono stati prodotti in accordo con il protocollo descritto in **Figura 13**. Il latte crudo vaccino viene scremato e termizzato a 72°C per 3 sec. Dopo il raffreddamento a 32-33°C, viene inoculato il latte-innesto (1%, v/v), poi viene aggiunto il caglio liquido di vitello (1:15:000; 10 ml/100 L) per favorire il processo di coagulazione, per una durata totale di 25 min a 32-33°C. Il coagulo viene tagliato, cotto a 40°C per 50 min, scaricato e messo in forma. Non appena raggiunto il pH 5,5, le forme vengono trasferite in salamoia al 20% NaCl (p/v) e poi stagionati in cella di maturazione con umidità relativa dell'85% a 10-14°C per 2 mesi. La densità cellulare di ogni specie starter inoculata nel latte-innesto era pari a 7.5 Log cfu/mL. Per le colture aggiunte, esse sono state aggiunte in miscela ad una densità cellulare totale di ca. $5 \pm 0,2$ Log cfu/mL. I formaggi sono stati prodotti in tre repliche su scala pilota, inclusi dei campioni controllo prodotti usando miscele starter commerciali. La stabilità microbiologica dei latte-innesti e le loro performance biotecnologiche nel processo di caseificazione, oltre che il profilo microbiologico dei campioni Stelvio è stata valutata combinando metodi coltura-dipendenti e coltura indipendenti. Essendo la cagliata dei Stelvio capace di formare delle "nicchie" ecologiche durante la stagionatura, ogni campione è stato sottoposto a sub-campionamenti: sotto-crosta e cuore. Per i metodi coltura dipendenti campioni di latte-innesto, latte di massa e formaggio sono stati sottoposti a conta cellulare su terreni agarizzati: MRS per lattobacilli mesofili e termofili incubati rispettivamente a 30 e 42°C per 48 h; M17 per lattococchi e streptococchi incubati rispettivamente a 30 e 42°C per 48 h. I microrganismi mesofili aerobi totali sono stati enumerati su piastre di Plate Count Agar (PCA) e incubate a 30°C. Gli enterococchi sono stati contati dopo semina per spatolamento su piastre di Slanetz and Bartley agar a 37°C e gli stafilococchi su "Baird Parker agar" con "egg yolk tellurite" e incubati a 37°C. Le Enterobacteriaceae sono state valutate su "Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA)" dopo incubazione a 37°C. I lieviti sono stati enumerati su piastre di "Sabouraud Dextrose Agar" e incubate a 25 °C. L'approccio coltura-dipendente applicato ai lattini usati per l'ottenimento dei latte-innesti ha evidenziato che la densità cellulare totale dei microrganismi mesofili totali rientra nel range 4,5 – 3,1 Log cfu/ml, la densità cellulare dei presunti batteri lattici mesofili e termofili era compresa tra 3,5 – 5,8 Log cfu/ml. Gli stafilococchi erano inferiori a 3,2 Log cfu/ml mentre i lieviti erano compresi tra 1,0 e 3,3 Log cfu/ml. La carica microbica totale dei latte-innesto ha evidenziato che la densità cellulare totale rientra nel range 4,6 – 7,6 Log cfu/ml, la densità cellulare media dei presunti batteri lattici mesofili era compresa tra 8,9 e 9,5 Log cfu/ml, gli stafilococchi erano inferiori a 1,3 Log cfu/ml, i lieviti erano compresi tra 1,3 e 3,5 Log cfu/ml. I presumibili batteri lattici sono

stati tipizzati mediante RAPD-PCR ed il profilo comparato con quello degli starter naturali e aggiunti. Il profilo RAPD-PCR ha consentito di individuare le colture costituenti il latte-innesto, mostrandone la stabilità. Sulla base della similarità dei profili RAPD-PCR, i biotipi corrispondenti alle colture starter e aggiunte sono stati identificati mediante la sequenza parziale del gene che codifica per l'rRNA 16S, amplificati mediante due coppie di primer (LacbF/LacbR e LpCoF/LpCoR).

La densità cellulare dei campioni di Stelvio prodotti in impianto pilota usando la combinazione C15, associata alla combinazione C2 è stata monitorata a diversi tempi di stagionatura (1 settimana, 30 e 60 giorni) sulle frazioni cuore e sottocrosta, e confrontata con campioni di Stelvio prodotti con starter convenzionali commerciali. In particolare, la densità cellulare media dei batteri lattici mesofili è risultata simile tra i campioni prodotti con le combinazioni selezionate (7,8 – 8,9 Log ufc/g) rispetto al formaggio Stelvio ottenuto con l'impiego di starter commerciali (7,8 – 8,5 log ufc/g), sia nel cuore che nel sottocrosta. I cocci termofili erano inferiori a 4 Log cfu/g senza differenze significative tra gli starter impiegati. La persistenza degli starter (combinazione C15) e delle colture aggiunte (combinazione C2) è stata valutata con la RAPD-PCR, come descritto precedentemente. Tutti i ceppi sono stati ritrovati nei campioni dopo 1 e 2 mesi di stagionatura.

La qualità igienico-sanitaria dei formaggi ottenuti con gli starter naturali e aggiunti è stata confrontata con quella di formaggi analoghi ottenuti con l'impiego di starter commerciali: carica microbica totale (ISO 4833: 2003), Enterobacteriaceae ed *Escherichia coli* (UNI EN ISO 9308-1:2002), lieviti e muffe (ISO6611/IDF 094: 2004) erano presenti a densità cellulari entro i limiti consentiti. L'evoluzione microbica e la tassonomia dei campioni di Stelvio prodotti con le combinazioni selezionate è stata ulteriormente valutata tramite analisi coltura-indipendente. Dopo aver estratto il DNA totale usando il kit DNeasy PowerFood Microbial (Qiagen), è stata preparata una libreria per la regione V3-V4 del 16S, sequenziata su una piattaforma MiSeq Illumina. I dati relativi alle Unità Tassonomiche Operative (OTU, "Operational Taxonomic Units) assegnate ai principali livelli tassonomici (phylum, classe, ordine, famiglia e genere) sono stati impiegati per la valutazione della diversità di Shannon (Tabella 6).

I Firmicutes (97,4 – 99,9%) sono risultati i più abbondanti nei campioni di Stelvio prodotti con la combinazione di starter selezionata rispetto ai campioni controllo (89,5 – 99,7%), seguiti dai Proteobacteria (0,3 – 10,5%).

A livello di genere sono stati identificati i batteri lattici che costituiscono la combinazione starter usata nel processo di caseificazione e altre comunità batteriche sub-dominanti (Figura 14). *Lactococcus* (>87%), *Lactobacillus* (1,2 – 21,3%) e *Leuconostoc* (0,6-3,2%) erano dominanti in tutti i campioni, e la loro abbondanza relativa aumentava durante il tempo di stagionatura in tutti i campioni, senza differenze significative tra il formaggio Stelvio prodotto con la combinazione starter selezionata e quello prodotto con gli starter commerciali. L'abbondanza relativa di *Lactococcus* era compresa tra i 20 e il 50% dopo 1 mese di stagionatura, ed è aumentata al 40-60% e 80-100% rispettivamente dopo 2 e 3 mesi di stagionatura. La popolazione batterica subdominante apparteneva ai generi *Enterococcus*, *Stenotrophomonas*, *Facklamia*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Delftia*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Allorhizobium*, *Neorhizobium*, *Pararhizobium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Alkalibacterium*, *Marinilactibacillus*, *Vagococcus*, *Corynebacterium* e *Weissella*.

In generale, è stata riscontrata una riduzione della diversità durante la stagionatura, come dimostrato dalla diversità alfa (Tabella 6). I lattococchi mesofili erano notevolmente più abbondanti in tutti i tempi di stagionatura. Non sono state osservate differenze significative tra le sezioni cuore e sottocrosta, né tra i campioni prodotti con gli starter selezionati e quelli prodotti con gli starter commerciali.

L'attività proteolitica nei campioni di Stelvio dopo un mese di stagionatura, espressa come % di azoto solubile a pH 4.6 sull'azoto totale nel formaggio, era nel range 4,2-4,7%, significativamente più elevato rispetto ai campioni controllo (4,0-4,2%). Durante la stagionatura, la concentrazione della frazione di azoto solubile a pH 4,6 aumentava in tutti i formaggi (5,1-5,6%). L'elettroferogramma Urea-PAGE della frazione azotata insolubile a pH 4,6 mostrava per tutti i campioni una progressiva idrolisi della caseina durante la stagionatura (Figura 15), senza differenze tra i formaggi prodotti con latte-innesto C15-C2 e i campioni controllo. La frazione azotata solubile a pH 4.6 è stata anche analizzata tramite RP-FPLC. Alcune differenze quantitative e qualitative sono state evidenziate tra i campioni. Al termine dei 60 giorni di stagionatura, il numero e il volume dei picchi dei peptidi, eluiti nel range di acetonitrile di ca. 20-43%, aumentava per i campioni con latte-innesto C15-C2.

L'analisi dei composti organici volatili ha evidenziato che essi aumentano durante la stagionatura. Sono stati identificati terpenoidi, alcoli, aldedi, chetoni, esteri, acidi grassi, lattoni e composti aromatici, per un totale di 158 composti. Gli esteri rappresentavano il 1,41% dei composti volatili totali durante il processo di produzione e il 6,1% durante il processo di stagionatura dei campioni Stelvio prodotti con il latte-innesto sperimentale, mentre erano il 5,5% nei campioni prodotti con latte-innesto convenzionale. In totale sono stati identificati 18 chetoni nel formaggio Stelvio, e il 2-butanone, 2-pentanone e 2-heptanone erano in maggiori quantità. A fine stagionatura, i formaggi prodotti con latte-innesto sperimentale mostravano meno aldeidi rispetto ai campioni controllo, coerentemente con la quantità di acidi presenti. Inoltre, gli acidi grassi liberi volatili, che contribuiscono al sapore del formaggio ma servono anche come precursori per la sintesi di metilchetoni, alcoli ed esteri, sono stati rilevati in quantità più elevata nei formaggi prodotti con il latte-innesto sperimentale rispetto ai campioni controllo. Gli acidi acetico, esanoico e butirrico erano i più abbondanti. È quindi, possibile ipotizzare che vi sia una relazione tra l'autolisi degli starter primari e i livelli di acidi grassi volatili durante la maturazione dello Stelvio.

A4.2. Messa a punto di un protocollo produttivo su scala di impianto pilota del formaggio Caciocavallo Pugliese con migliorate caratteristiche qualitative mediante l'utilizzo di latte-innesti e colture aggiunte specifiche (UNIBA)

Sono stati prodotti formaggio Caciocavallo pugliese utilizzando le miscele selezionate NWS1, NWS2, NWS3 e NWS4 (attività A3.2) e, utilizzando la combinazione di colture aggiunte più performante in base ai risultati delle attività A3.3 rappresentata da:

(i) *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* in accordo ai protocolli messi a punto nel WP3. La densità cellulare di ogni specie è stata pari a 7 log cfu/mL per lo starter. Le colture aggiunte sono state usate in forma attenuata, aggiunte in miscela (densità cellulare di ogni specie, prima del trattamento di sonicazione, pari a ca. $9,2 \pm 0,1$ log cfu/mL di latte, corrispondente a ca. $5,3 \pm 0,2$ log cfu/mL di cellule coltivabili nel latte) insieme al sieroinnesto. I Caciocavalli pugliesi sono stati prodotti in accordo con il protocollo descritto in Figura 12. Ciascun Caciocavallo è stato prodotto in tre repliche su

scala pilota, anche impiegando impianti presenti presso aziende del territorio pugliese, e conservato a 10°C per 90 giorni. I campioni sono stati valutati combinando metodi coltura-dipendenti ed analisi meta-omiche. Sono inoltre stati effettuati dei sub-campionamenti: crosta, sotto-crosta e centro, rispettivamente. Per i metodi coltura dipendente, campioni di sieroinnesto e latte di massa sono stati sottoposti a conta cellulare su terreni di coltura agarizzati: MRS per lattobacilli mesofili e termofili incubati a 30 e 42°C per 48 h, rispettivamente; M17 per lattococchi e streptococchi incubati a 30 e 42°C per 48 h, rispettivamente. I microrganismi mesofili aerobi totali sono stati enumerati su piastre di Plate Count Agar (PCA) a 30°C. Gli enterococchi sono stati contati dopo semina per spandimento su piastre di Slanetz and Bartley agar e gli stafilococchi su "Baird Parker agar" supplementate con "egg yolk tellurite" ed incubati a 37°C. Le Enterobacteriaceae sono state valutate su "Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) dopo incubazione a 37°C, i lieviti su "Sabouraud Dextrose Agar" a 25 °C. L'approccio coltura-dipendente applicato ai lattici usati per l'ottenimento dei sieroinnesti ha evidenziato che la densità cellulare totale dei microrganismi mesofili totali rientra nel range già emerso nel corso delle attività A2.3, ed erano pari a circa $4.1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ cfu/ml. La densità cellulare media dei presunti batteri lattici mesofili e termofili su terreno colturale MRS e M17 agar è pari a $3,1 \times 10^3 - 5,5 \times 10^5$ cfu/ml. Gli stafilococchi erano inferiori a 1×10^3 cfu/ml. Le densità cellulari dei lieviti comprese tra 1×10 e 2×10^3 cfu/ml. La carica microbica totale dei sieroinnesti ha evidenziato che la densità cellulare totale rientra nel range $3.7 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ cfu/ml. La densità cellulare media dei presunti batteri lattici mesofili e termofili su terreno colturale MRS e M17 agar è pari a $3,2 \times 10^3 - 5,6 \times 10^8$ cfu/ml. Gli stafilococchi erano inferiori a 10 cfu/ml. Le densità cellulari dei lieviti comprese tra 2×10 e 3×10^3 cfu/ml. I sieroinnesti maturi e le colture aggiunte attenuate messe a punto per questa attività come descritto in A2.2. e A2.3 non mostrano differenze significative a carico delle densità microbiche. I presumibili batteri lattici sono stati tipizzati mediante RAPD-PCR ed il profilo comparato con quello degli starter naturali e aggiunti. Il profilo RAPD-PCR ha consentito di individuare le colture costituenti il sieroinnesto e le colture aggiunte, mostrandone la stabilità. Sulla base della similarità dei profili RAPD-PCR, i biotipi corrispondenti alle colture starter e aggiunte sono stati identificati mediante la sequenza parziale del gene che codifica per l'rRNA 16S, amplificati mediante due coppie di primer (LacbF/LacbR e LpCoF/LpCoR). Sono state individuate le specie di LAB usate per la costituzione dei 4 sieroinnesti e le colture aggiunte. Le densità cellulari dei Caciocavalli ottenuti usando i sieroinnesti NWS1, NWS2, NWS3, NWS4 e le colture aggiunte sono state monitorate a differenti tempi di stagionatura (1, 30, 60 e 90 giorni) sulle frazioni core, sottocrosta e crosta. L'analisi statistica multivariata effettuata sui dati di caratterizzazione microbiologica dei formaggi ha consentito di valutare la distribuzione dei Caciocavalli a sieroinnesto differente e il peso delle variabili (Figura 16). Come mostrato, alcune differenze sono emerse nell'impiego dei diversi sieroinnesti sperimentali nella produzione di Caciocavallo su scala pilota dai dati coltura dipendenti. In particolare, la densità cellulare media dei presunti batteri lattici mesofili e termofili a livello di core del prodotto è risultata più alta ($P < 0,05$) nei formaggi ottenuti dal sieroinnesto NWS4 (ca. 7,6 - 7,8 log ufc/g) rispetto al formaggio Caciocavallo pugliese ottenuto con l'impiego di starter commerciali e sieroinnesto convenzionale (ca. 6,6 - 6,8 log ufc/g). Gli stafilococchi erano inferiori a 4 log cfu/g senza differenze significative tra i sieroinnesti sperimentali impiegati. A livello di sottocrosta e crosta, la densità cellulare media dei presunti batteri lattici mesofili e termofili è risultata ugualmente più elevata ($P < 0,05$) nei formaggi ottenuti dal sieroinnesto NWS4 (ca. 7,99 - 8,35 log ufc/g) rispetto al formaggio Caciocavallo pugliese ottenuto con l'impiego di starter commerciali e sieroinnesto convenzionale (ca. 6,1 - 6,5 log ufc/g) ed agli altri sieroinnesti sperimentali. A livello di crosta i batteri lattici erano inferiori a 4 log cfu/g nel caciocavallo ottenuto da NWS2, sebbene superiori rispetto al controllo.

La qualità igienico-sanitaria dei formaggi ottenuti con gli starter naturali e aggiunti è stata confrontata con quella di formaggi analoghi ottenuti con l'impiego di starter commerciali e sieroinnesto convenzionale mediante la ricerca dei seguenti parametri microbiologici: carica microbica totale (ISO 4833: 2003), Enterobacteriaceae ed *Escherichia coli* (UNI EN ISO 9308-1:2002), lieviti e muffe (ISO6611/IDF 094: 2004). I dati raccolti relativi ai criteri di igiene di processo definiti dal Reg. (CE) 2073/2005 non evidenziano né la presenza di densità cellulari superiori ai limiti consentiti né differenze significative tra i caciocavalli ottenuti dai sieroinnesti sperimentali e convenzionali. La stabilità microbiologica delle colture starter naturali e aggiunte e le loro performance biotecnologiche nei processi di caseificazione è stata valutata anche mediante analisi meta-omiche. L'approccio di sequenziamento del gene rDNA 16S coltura-indipendente ha, infatti, evidenziato la stabilità microbiologica dei sieroinnesti ma anche la biodiversità dei campioni di formaggio ottenuti con i diversi sieroinnesti messi a punto. I dati relativi alle Unità Tassonomiche Operative (OTU, "Operational Taxonomic Units) assegnate ai principali livelli tassonomici (phylum, classe, ordine, famiglia e genere) sono stati impiegati per la valutazione della diversità di Shannon (Figura 17).

In base ai dati metagenomici, nei sieroinnesti usati per la produzione su scala di impianto pilota del formaggio Caciocavallo Pugliese sono stati complessivamente identificati 4 phyla batterici (Figura 18). I Firmicutes (99%) sono risultati i più abbondanti in tutti i NWS analizzati, seguiti dai Proteobacteria (0.1-3% nel NWS4). A livello di genere, *Lactobacillus* (>99.8%), *Streptococcus* (0.06-88.6%), *Lactococcus* (0.0 - 0.16%), sono stati identificati nei campioni di NWS, confermando i batteri lattici autoctoni impiegati come colture naturali e aggiunte. Altri generi sub-dominanti, appartenenti ai phyla Firmicutes (*Macroccoccus*) e Proteobacteria (*Enterobacteriaceae*, *Escherichia*, *Shigella*), sono risultati sub-dominanti e rilevati prevalentemente nel NWS4. È ormai provato che le diverse regioni ipervariabili non forniscono sempre gli stessi risultati se applicate a campioni differenti. In ogni matrice, a seconda della comunità batterica vanno identificate le regioni ipervariabili più informative. Nello specifico, i campioni di sieroinnesto e di formaggio Caciocavallo sono stati dettagliatamente analizzati studiando la regione ipervariabile V1-V3, che ha consentito l'identificazione di 6 phyla batterici. I Firmicutes sono risultati i più abbondanti in tutti i campioni analizzati (93,3-99,7% di abbondanza relativa), sia a livello di core, che di crosta e sottocrosta, seguiti dai Proteobacteria (0,06-6,42%). I Bacteroidota e gli Actinobacteria rappresentano abbondanze relative inferiori allo 0,5%. In accordo all'analisi condotta sui sieroinnesti, il formaggio ottenuto impiegando il NWS4 ha mostrato le più alte abbondanze relative ai Proteobacteria. A livello di generi di batteri lattici, l'analisi coltura indipendente sui caciocavalli ottenuti con i diversi sieroinnesti e colture aggiunte ha confermato la stabilità del sieroinnesto (Figura 20A-D). In aggiunta sono stati identificati altri generi batterici. In particolare, nel caciocavallo ottenuto con il NWS1 si evidenzia la presenza di *Lactobacillus gallinarum* (>10%) in tutti i tempi esaminati,

nelle diverse sezioni, *Streptococcus* (>25%), *Lactococcus* (1,4-2,9%), e varie specie del genere *Lactobacillus* (>54%) confermando i LAB impiegati come colture naturali e aggiunte. Nel caciocavallo ottenuto con il NWS2 si evidenzia la presenza di *Lactobacillus gallinarum* (>10%) in tutti i tempi esaminati, nelle diverse sezioni, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii* e varie specie del genere *Lactobacillus* (>80%) confermando i LAB impiegati come colture naturali e aggiunte. Nel formaggio da NWS3 sono state rilevate le specie *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus rhamnosus*; *Lactobacillus delbrueckii*; *Lactobacillus gallinarum*; ed i generi *Lactobacillus*, *Lactococcus*. In CC_NWS4 *Streptococcus*; *Lactobacillus*; *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus gallinarum*; *Lactobacillus delbrueckii*; *Lactococcus*; *Lactobacillus parabuchneri*; *Lactococcus*; *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus buchneri*. Altri generi sub-dominanti, appartenenti ai phyla Firmicutes (*Macrococcus*) e Proteobacteria (*Pseudomonas*; *Enterobacteriaceae*), sono risultati presenti soprattutto nelle fasi iniziali della stagionatura nei diversi formaggi. Complessivamente, le abbondanze relative di *Streptococcus* sp. e specialmente di *St. thermophilus* diminuiscono in alcuni formaggi, mentre quelli di *Lb. casei*, *Lactobacillus* sp. e specialmente *Lb. paracasei* aumentano costantemente. I lattobacilli mesofili restano ad alti livelli fino alla fine della stagionatura. È quindi possibile confermare la persistenza della coesistenza di starter primari termofili e colture aggiunte durante la maturazione del Caciocavallo Pugliese. In generale, è stata riscontrata una minore diversità durante la maturazione e i lattobacilli mesofili erano notevolmente più abbondanti. La persistenza a fine stagionatura di *Lactobacillus rhamnosus* e *Lb. paracasei*, frequentemente studiate per il potenziale ruolo di probiotici caseari (de Souza et al., 2017. Food Chem 135, 3), permette di valutare positivamente il potenziale ruolo funzionale dei formaggi Caciocavalli sperimentali ottenuti con gli starter naturali e aggiunti. La produzione dei Caciocavalli a sieroinnesto rispetto al convenzionale ha permesso un miglioramento qualitativo anche sotto l'aspetto di fattori potenzialmente funzionali. Le specie *Lb. delbrueckii*, *Lb. paracasei*, *Lb. brevis*, *St. thermophilus*, *Lc. lactis* sono note per la produzione di GABA (acido γ -amminobutirrico) durante la stagionatura dei formaggi (Siragusa et al., 2007. AEM 73,22) con la possibilità di indurre benefici alla salute del consumatore, come documentato da altri autori (Minervini et al., 2009. Food Microbiol 26,6).

La qualità sensoriale dei formaggi ottenuti con gli starter naturali e aggiunti è stata confrontata con quella di un Caciocavallo ottenuto con l'impiego di starter commerciali e sieroinnesto convenzionale. I formaggi prodotti a livello di scala pilota avevano la tipica forma ovale, con peso compreso tra 1 e 2 Kg. La colorazione esterna appariva nei toni del giallo, con lievi differenze tra i formaggi ottenuti usando differenti NWS. La parte interna si presentava compatta, con occhiature più evidenti in CC_NWS1 e CC_NWS4, che potrebbero essere associati all'elevata attività enzimatica riscontrata nei corrispondenti sieroinnesti. La qualità nutrizionale dei formaggi ottenuti con gli starter naturali e aggiunti è stata confrontata con quella di un Caciocavallo ottenuto con l'impiego di starter commerciali e sieroinnesto convenzionale. L'attività proteolitica nei campioni di Caciocavallo dopo un giorno dalla produzione, misurata dal livello di azoto solubile a pH 4,6, espresso come % sull'azoto totale nel formaggio, era nel range 4,01-4,89% e, confrontando i campioni ottenuti con protocollo tradizionale, quelli con NWS mostravano un elevato livello di azoto pH 4,6-solubile. Durante la stagionatura, la concentrazione di azoto pH 4,6-solubile aumentava in tutti i formaggi (5,0-5,5%). L'elettroforogramma Urea-PAGE della frazione azotata pH 4,6-insolubile dei formaggi con NWS e convenzionali, durante la conservazione, mostrava per tutti i campioni una progressiva idrolisi della caseina. L'elettroforogramma della frazione azotata pH 4,6-insolubile dei formaggi con NWS non era significativamente differente dal formaggio convenzionale. La frazione azotata pH 4,6-solubile dei Caciocavalli è stata analizzata tramite RP-FPLC. Alcune differenze quantitative, e specialmente qualitative sono state evidenziate tra i campioni. Al termine dei 90 giorni di stagionatura, il numero e il volume dei picchi dei peptidi, eluiti nel range di acetonitrile di ca. 20-43%, aumentava per i campioni con NWS sperimentali. La più alta concentrazione di aminoacidi liberi, dopo 1 giorno dalla produzione, è stata trovata in campioni con starter termofili (242,48 – 296 mg/kg, CC_NWS1, CC_NWS4). Complessivamente, Glu, Cyst, Val, Orn e Pro sono alcuni degli FFA trovati in alte concentrazioni in tutti i formaggi. La concentrazione totale in FAA aumentava progressivamente durante la stagionatura per tutti i formaggi. Dopo 90 giorni, la concentrazione di FAA era la seguente: 1895,2, 2701,65, 2920,24, 2445,1 e 2232,0 mg/kg per i campioni CC_conv, CC_NWS1, CC_NWS2, CC_NWS3 e CC_NWS4, rispettivamente. Ser, Val, Leu, Phe, His, Trp, and Pro sono alcuni degli FFA trovati in alte concentrazioni in tutti i formaggi a fine stagionatura.

L'analisi dei composti organici volatili (Figura 21) ha evidenziato che essi, in generale, incrementano durante la stagionatura. Alcune aldeidi (ottanale, acetaldeide e nonanale) sono state rilevate a concentrazioni più elevate quando nel sieroinnesto vi era la più alta presenza di batteri lattici termofili (CC_NWS1, CC_NWS4). Sono stati identificati alcool primari, secondari e ramificati, soprattutto a fine stagionatura, senza differenze significative tra i diversi caciocavalli. La concentrazione dei chetoni è diminuita durante la stagionatura, a causa della nota riduzione ad alcool. Il diacetile, che deriva principalmente dal precursore instabile α -acetato-lattato tramite il metabolismo del citrato, è stato trovato principalmente nei formaggi analizzati dopo 1 e 30 giorni di stagionatura. Gli esteri (ad es. acetato di etile e butanoato di etile) sono aumentati durante la stagionatura, principalmente in CC_NWS2. I VFFA, che contribuiscono al sapore del formaggio ma servono anche come precursori per la sintesi di metil-chetoni, alcoli ed esteri, sono stati rilevati a concentrazioni differenti nei diversi formaggi, soprattutto erano più abbondanti in CC_NWS2 e CC_NWS4. Gli acidi acetico, esanoico e butirrico erano i più abbondanti. È, quindi, possibile ipotizzare che vi sia una relazione tra l'autolisi degli starter primari (ad es. *St. thermophilus*) e i livelli di VFFA durante la maturazione del Caciocavallo. Nonostante l'abbondanza relativa inferiore di lattobacilli mesofili rispetto a *St. thermophilus* (ad eccezione di CC_NWS3), questi batteri sono correlati positivamente con le concentrazioni totali e individuali degli aminoacidi FAA e con l'area dei picchi peptidici idrofili, confermando il ruolo degli starter e dei NSLAB, durante la maturazione dei formaggi.

Confrontando con gli altri Caciocavalli, quella ottenuta convenzionalmente aveva un significativo basso livello di proteine e un alto livello di umidità. La concentrazione di grassi e proteine a fine stagionatura era pari a circa 32,9% \pm 1,4% per i grassi e 23,5% \pm 1,1% proteine. Durante la stagionatura, il pH dei Caciocavalli a sieroinnesto sperimentale restava stabile o in lieve aumento, mentre per il CC_conv diminuiva. Queste differenze possono essere in relazione con la variazione della capacità tamponante del formaggio come conseguenza dell'attività dei microrganismi.

La produzione dei Caciocavalli a sieroinnesto rispetto al convenzionale ha permesso un miglioramento qualitativo anche sotto l'aspetto di fattori potenzialmente funzionali. Dai dati metagenetici, infatti, si è potuto osservare la perseveranza di specie quali:

Lb. delbrueckii, *Lb. paracasei*, *Lb. brevis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* che apportano produzione di GABA (acido γ -amminobutirrico) durante la stagionatura dei formaggi (Siragusa et al., 2007) con la possibilità di indurre benefici alla salute del consumatore, come documentato in bibliografia (Gobbetti et al., 2004; Siragusa et al., 2007; Minervini et al., 2009).

Considerando i risultati ottenuti, è stato selezionato il protocollo di produzione e propagazione del sieroinnesto sperimentale NWS2, utilizzando la miscela di starter autoctoni selezionata per la produzione di Caciocavallo pugliese, che ha permesso un miglioramento delle caratteristiche igienico-sanitarie, sensoriali, nutrizionali/funzionali, standardizzate nel tempo.

A4.3. Trasferimento dei protocolli produttivi su scala artigianale/industriale (UNIBZ/UNIBA) (20°- 24° mese)

Il protocollo di produzione del latte-innesto sperimentale, che prevede l'uso delle combinazioni selezionate, è stato proposto a un caseificio locale. Sono stati prodotti formaggi Stelvio usando le specie di batteri lattici starter *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus paracasei*, *Lactobacillus gasserii* (combinazione C15) e le colture aggiunte *Lactococcus taiwanensis*, *Lactiplantibacillus paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajimbkimchii* (combinazione C2), che sono risultate le più performanti in base ai risultati delle attività A3.3. I campioni Stelvio sono stati prodotti secondo il protocollo indicato nel disciplinare. Il latte crudo vaccino è stato scremato e termizzato a 72°C per 3 secondi. Dopo il raffreddamento a 32-33°C, è stato inoculato il latte-innesto sperimentale (1%, v/v) contenente le miscele C15 e C2. La densità cellulare delle specie appartenenti alla combinazione starter C15 era 7,5 Log cfu/mL, mentre per le colture aggiunte era 5,0 Log cfu/mL. Per i formaggi controllo è stato invece aggiunto il latte-innesto convenzionale. Successivamente è stato aggiunto il caglio liquido di vitello (1:15:000; 10 ml/100 L) per favorire il processo di coagulazione, per una durata totale di 25 min a 32-33°C. Il coagulo è stato tagliato, cotto a 40°C per 50 min, scaricato e messo in forma. Non appena raggiunto il pH 5,5, le forme sono state messe in salamoia al 20% NaCl (p/v) e poi stagionati in cella di maturazione con umidità relativa dell'85% a 10-14°C per 2 mesi. La caseificazione è stata effettuata in 3 giorni consecutivi (totale di 3 lotti), e i campioni sono stati analizzati in triplicato (totale di 9 campioni analizzati per ogni tempo di campionamento) dopo 7 giorni, 1 mese e 2 mesi di stagionatura, calcolando la media dei tre lotti di produzione. La validazione del trasferimento tecnologico è stata effettuata mediante analisi qualitativa dei formaggi ottenuti, conducendo le stesse analisi descritte a livello di impianto pilota. La composizione chimica prossimale e l'evoluzione microbiologica dei formaggi erano simili a quelle rilevate nei campioni prodotti in scala di impianto pilota. La combinazione dei metodi coltura-dipendenti e coltura indipendenti, associati all'analisi del profilo di proteolisi e dei composti volatili durante la stagionatura in azienda, ha confermato gli effetti delle formulazioni sperimentali usate in termini qualitativi del prodotto. Anche in questo caso, l'approccio di sequenziamento del gene rDNA 16S coltura-indipendente ha evidenziato la stabilità microbiologica del latte-innesto su scala artigianale/industriale.

L'analisi della tassonomia conferma che i Firmicutes mostrano la più alta abbondanza relativa (>98% di abbondanza relativa), seguiti dai Proteobacteria. A livello di generi, l'analisi coltura indipendente ha confermato la presenza nel microbiota dei formaggi dei ceppi selezionati presenti nel latte-innesto come starter o colture aggiunte, sebbene l'identificazione a livello tassonomico non sempre abbia permesso l'attribuzione della specie. Sono stati identificati altri generi batterici, presenti anche nei campioni di Stelvio prodotti in scala di impianto pilota. Altri generi sub-dominanti sono risultati presenti soprattutto nelle fasi iniziali della stagionatura (Figura 22).

La determinazione della proteolisi primaria e secondaria ha evidenziato un'attività residua della chimosina verso l' α s1-CN. Il numero e l'area dei picchi relativi ai peptidi idrofili e idrofobici sono aumentati dopo 1 mese di stagionatura (Figura 23). Il profilo dei composti aromatici è simile a quello determinato per i campioni prodotti in impianto pilota, con un aumento della concentrazione a partire da 1 mese di stagionatura. Sono stati identificati terpenoidi, alcoli, aldedi, chetoni, esteri, acidi grassi, lattoni e composti aromatici, per un totale di 172 composti. Gli esteri rappresentavano il 5.8-6.2% durante il processo di stagionatura dei campioni Stelvio prodotti con il latte-innesto sperimentale, mentre erano il 5.5-5.8% nei campioni prodotti con latte-innesto convenzionale. Gli etil-esteri erano gli esteri predominanti nei campioni analizzati, a causa dell'alta concentrazione di etanolo derivante dalla fermentazione eterolattica del lattosio o dal catabolismo degli amminoacidi. In totale sono stati identificati 18 chetoni nel formaggio Stelvio, e il 2- butanone, 2-pentanone e 2-heptanone erano in maggiori quantità. Gli acidi grassi liberi volatili, che contribuiscono al sapore del formaggio ma servono anche come precursori per la sintesi di metilchetoni, alcoli ed esteri, sono stati rilevati in quantità più elevata nei formaggi prodotti con il latte-innesto sperimentale rispetto ai campioni controllo. Gli acidi acetico, esanoico e butirrico erano i più abbondanti. Il diacetile è stato trovato in tutti i campioni. A livello aziendale, la qualità sensoriale del formaggio ottenuto con il siero-innesto sperimentale è stata confrontata con quella di Stelvio ottenuto con metodo convenzionale, chiedendo ad un panel di 18 assaggiatori addestrati di esprimere un punteggio relativamente a intensità, consistenza, acidità e dolcezza, utilizzando una scala di valutazione 0-9. Attraverso la determinazione della somma dei punti per le proprietà sensoriali, i campioni prodotti con il latte-innesto sperimentale ha ottenuto livelli di accettabilità superiori ai formaggi Stelvio convenzionali dopo 60 giorni di stagionatura, soprattutto per aroma e sapore.

In conclusione, è stato messo a punto e trasferito un protocollo di produzione del formaggio Stelvio con migliorati livelli qualitativi rispetto alla produzione convenzionale.

Per quanto riguarda il Caciocavallo pugliese, in azienda è stato proposto un protocollo per la propagazione e uso di miscele di colture di starter autoctoni e colture aggiunte. Sono stati prodotti formaggio Caciocavallo pugliese utilizzando la miscela selezionata NWS2 e la combinazione di colture aggiunte più performante in base ai risultati delle attività A3.3 rappresentata da: (i) *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* in accordo ai protocolli messi a punto nel WP3 e in A4.2. La densità cellulare di ogni specie è stata pari a 7 log cfu/mL per lo starter. Per le colture aggiunte, esse sono state usate in forma attenuate, aggiunti in miscela (densità cellulare di ogni specie, prima del trattamento di sonicazione, pari a ca. $9,2 \pm 0,1$ log cfu/mL di latte, corrispondente a ca. $5,3 \pm 0,2$ log cfu/mL di cellule coltivabili nel latte) insieme al sieroinnesto. I Caciocavalli pugliesi sono stati prodotti in accordo con il protocollo descritto a livello di impianto pilota. Sono stati prodotti anche formaggi con protocolli

convenzionali comunemente usati in azienda. I formaggi prodotti sono stati analizzati in triplicato (totale di 9 campioni analizzati per ogni tempo di campionamento) ed i risultati sono stati le medie per 3 lotti. Il Caciocavallo è stato campionato ad intervalli di 30 giorni. La validazione del trasferimento tecnologico è stata effettuata mediante analisi qualitative dei formaggi ottenuti, conducendo le stesse analisi descritte a livello di impianto pilota. I valori medi per la composizione prossimale sono simili a quelli precedentemente rilevati per il Caciocavallo Pugliese. A seguito dell'aggiunta del sieroinnesto selezionato (NWS2), il decremento di pH e umidità e, di conseguenza, l'aumento della concentrazione di NaCl sono stati rilevati a 30 giorni, mentre erano nulli all'inizio della stagionatura. La stabilità microbiologica del sieroinnesto e le performance biotecnologiche delle colture starter e aggiunte nel processo di caseificazione è stata valutata combinando metodi coltura-dipendenti ed analisi meta-omiche come descritto in WP3. La densità cellulare degli streptococchi termofili è aumentata fino a 30 giorni e poi sono lievemente diminuiti. Il numero di lattobacilli mesofili è aumentato con la stagionatura, soprattutto dopo 30 e 60 giorni. Sono stati rilevati anche enterococchi e, data l'assenza nella composizione del sieroinnesto, si può ipotizzare fossero componenti del microbiota avventizio. Non sono state evidenziate densità cellulari superiori ai limiti consentiti. In base ai dati metagenomici, sono stati complessivamente identificati 6 phyla batterici (Figura 24), mentre a livello di genere è stata confermata la presenza nel microbiota dei formaggi dei ceppi selezionati presenti nel sieroinnesto o come colture aggiunte (Figura 25).

La determinazione della proteolisi primaria e secondaria ha evidenziato un'attività residua della chimosina verso l' α s1-CN. Come dimostrato dalle analisi elettroforetiche e cromatografiche della frazione solubile a pH 4,6 e dalla liberazione di aminoacidi liberi, i peptidi, generati attraverso la proteolisi primaria, sono stati substrati per la proteolisi secondaria guidata dai batteri lattici. Il numero e l'area dei picchi relativi ai peptidi idrofili e idrofobici sono aumentati a 30 giorni di stagionatura, paragonata all'inizio. La concentrazione di FAA incrementa durante la stagionatura e gli aminoacidi più rappresentativi sono stati Ser, Val, Leu, Phe, His, Trp e Pro. In accordo alla proteolisi secondaria, le concentrazioni dei VOC sono incrementate a partire da 30 giorni di stagionatura. I VFFA, che contribuiscono al sapore del formaggio, maggiormente ritrovati sono stati gli acidi acetico, esanoico e butirrico. A livello aziendale, la qualità sensoriale del formaggio ottenuto con il siero-innesto selezionato e le colture aggiunte è stata confrontata con quella di un Caciocavallo ottenuto con l'impiego di starter commerciali, chiedendo ad un panel di 15 assaggiatori addestrati di esprimere un punteggio relativamente a intensità, consistenza, acidità e dolcezza, utilizzando una scala di valutazione 0-5. Il Caciocavallo con sieroinnesto selezionato è stato preferito in modo significativo dopo 60 giorni di stagionatura, ottenendo un alto punteggio per la struttura e l'aroma.

WP5 - Divulgazione dei risultati, arruolamento e la formazione di giovani ricercatori per promuovere l'avanzamento tecnologico del settore

I risultati della prima parte di attività condotta sui lattici dell'Alto Adige sono stati illustrati mediante un seminario tenuto al personale della Federazione Latterie Alto Adige presso il parco tecnologico NOI Techpark. Parte dei risultati è stata anche presentata durante il seminario annuale dei dottorandi del corso di dottorato internazionale Food Engineering and Biotechnology (12 novembre 2019). È stata effettuata la formazione di due dottorandi e di due assegnisti coinvolti in parte delle attività di ricerca. Infine, nel sito web Micro4Food di UNIBZ è presente uno spazio dedicato e un link a NATCASEI.

Parte dell'attività di ricerca è stata oggetto di una tesi del Master internazionale in Food Sciences for Innovation and Authenticity, Faculty of Science and

Technology, Free University of Bolzano (Student E. Trossolo, Exam date: September 28th, 2021) ed è parte della tesi di dottorato internazionale in Food Engineering and Biotechnology (Dottorando B. Domingues Galli, ancora in corso).

Durante la "Notte Europea dei Ricercatori e delle Ricercatrici" tenutasi in data 24/09/2021 presso l'Atrio Cherubini del Campus Universitario "E. Quagliariello" dell'Università degli Studi di Bari Aldo Moro (Via E. Orabona 4, 70125, Bari), uno spazio è stato dedicato al progetto e ai risultati ottenuti grazie alla partecipazione di personale universitario altamente specializzato ed alla collaborazione con "UNIBA, EIT Food Hub Italiano". L'evento, dal nome *Scient-eating* ha consentito ai consumatori di assaggiare e valutare in un percorso guidato diversi alimenti ottenuti grazie all'innovazione tecnico-scientifica fornita alle imprese del territorio attraverso le attività di ricerca applicata. È stato possibile degustare e dare un parere attraverso la compilazione di una semplice scheda di gradimento sui prodotti caciocavallo da siero innesto.

È stato organizzato un seminario online il giorno 26 novembre 2020 dalle ore 14:30 – 16:30 su piattaforma Microsoft Teams (Teams code dd49csz) per la discussione e condivisione delle attività e delle soluzioni progettuali e per promuovere l'avanzamento nel settore cui hanno partecipato dottorandi e dottori di ricerca, laureandi ed esperti del settore lattiero-caseario. Il seminario (*Management of breeding systems and environmental factors for the production and enhancement of natural starters in the cheesemaking processes* – NATCASEI) è stato organizzato congiuntamente dalla Libera Università di Bolzano e dall'Università degli Studi di Bari Aldo Moro.

I risultati ottenuti dall'analisi degli allevamenti e dei lattici del territorio pugliese sono stati divulgati durante le attività WORKSHOP: "Dall'allevamento alla trasformazione, nuove prospettive per una filiera latte più sostenibile: un confronto tra i protagonisti" organizzato da EIT Food "SUDAPS - Support for Dairy Production Sector in RIS Region". Università di Torino, Università di Bari, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences il 26 Novembre, 2020.

Al fine di divulgare la valorizzazione ed il ruolo dei batteri lattici nei processi di caseificazione e dei formaggi tipici oggetto del progetto, sono state redatte le pubblicazioni attinenti:

- Pasta Filata Cheeses: Traditional Pasta Filata Cheese. Autori Fabio Minervini, Giuseppe Costantino, Maria De Angelis. Capitolo dell'Encyclopedia of Dairy Sciences. 3rd Edition. Editors-in-Chief: Paul McSweeney, John McNamara. eBook ISBN: 9780128187678 pubblicata il 22 settembre 2021. Academic Press.

- *Lactobacillus* spp. and Related Genera: General Characteristics. Autori: Calasso Maria, Calabrese Francesco Maria, De Angelis Maria. Capitolo dell'Encyclopedia of Dairy Sciences. 3rd Edition. Editors-in-Chief: Paul McSweeney, John McNamara. eBook ISBN: 9780128187678 pubblicata il 22 settembre 2021. Academic Press.

- *Lactobacillus casei* Group. Autori: Fabio Minervini e Maria Calasso Capitolo dell'Encyclopedia of Dairy Sciences. 3rd Edition. Editors-in-Chief: Paul McSweeney, John McNamara. eBook ISBN: 9780128187678 pubblicata il 22 settembre 2021. Academic Press.
- The effect of seasonality on chemical and microbiological quality of Apulian raw cow milk. Celano et al. 2022. Microbiology Spectrum.
- How multiple farming conditions correlate with the composition of the raw cow's milk lactic microbiome. Nikoloudaki O, Lemos Junior WJF, Borruso L, Campanaro S, De Angelis M, Vogel RF, Di Cagno R, Gobbetti M. Environ Microbiol. 2021 Mar;23(3):1702-1716. doi: 10.1111/1462-2920.15407. Epub 2021 Feb 16. PMID: 33497002.
- Role prediction of Gram-negative species in the resistome of raw cow's milk. O. Nikoloudaki, Wilson J.F. Lemos, S. Campanaro, R. Di Cagno, M. Gobbetti. Int. J. Food Microbiol. 2021, 340: 109045.
- In situ high throughput screening of strains to select starter cultures intended for traditional cheese making. O. Nikoloudaki, R. Di Cagno, M. Gobbetti. 2022. Int. Dairy Journal. In preparation.
- Ecology and biochemical characterization of PDO Stelvio cheese. I. Carafa, B. Dominigues Gallo, O. Nikoloudaki, M. Gobbetti, R. Di Cagno. 2022. Int. Dairy Journal. In preparation.
- Nikoloudaki, O., Gobbetti, M., Di Cagno, R., 2022. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus helveticus*. In: McSweeney, P.L.H., McNamara, J.P. (Eds.), Encyclopedia of Dairy Sciences, vol. 4. Elsevier, Academic Press, pp. 198–205.

Le Tabelle 1-3 e le Figure 1-7 sono riportate nel primo report. Di seguito sono riportate tabelle e figure riassuntive dei risultati ottenuti nelle attività descritte nel WP3 e WP4.



Figura 8. Sistema modello ad Ac per mini-formaggi, adattato a piastre a 96 pozzetti per la produzione di formaggi con sistema di riscaldamento e rottura della cagliata manuale. Il piano si muove orizzontalmente e verticalmente per simulare le fasi di agitazione e cottura.

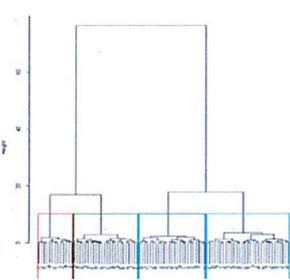


Figura 9. Analisi di cluster gerarchico usando la matrice di distanza Euclidea dei parametri fisico-chimici (amminozidi liberi, concentrazione di peptidi, umidità e pH) dei 93 mini-formaggi e il metodo Ward. Il metodo Elbow ha individuato 4 cluster ottimali (rosso, verde, blu e celeste) spiegando la variabilità dei risultati.

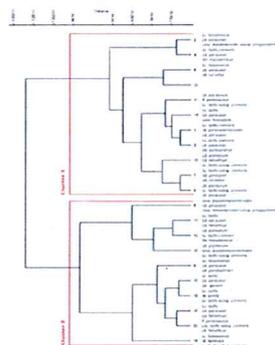


Figura 10. Analisi di cluster gerarchico usando la matrice di distanza Euclidea dei principali composti volatili presenti nei 20 mini-formaggi e metodo Ward. Sul lato destro sono indicate le specie della triplaletta usata per la produzione di ogni mini-formaggio, identificate tramite sequenziamento parziale del 16sRNA e analisi ELAST con una omologia di sequenza del 99%. Cr: campione controllo.

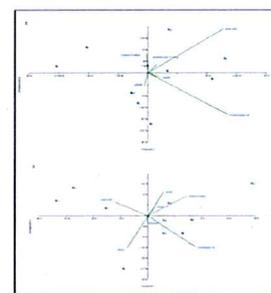


Figura 11. Analisi delle componenti principali dei composti volatili presenti nei 20 mini-formaggi prodotti con le colture starter. (A) Biplot PC1 (38.48%) e PC2 (32.78%) dei 10 campioni appartenenti al cluster 1 e del campione con-trollo e (B) biplot PC1 (58.76%) e PC2 (17.46%) dei 10 campioni appartenenti al cluster 2.

Tabella 4. Specie batteriche che compongono le 20 combinazioni usate per la produzione di mini-formaggi. Cr: campione controllo, in cui non è stata inoculata alcuna cultura.

C1	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>
C2	<i>Lactococcus taiwanensis</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibi</i>
C3	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Streptococcus pasteurianus</i>
C4	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Streptococcus macedonicus</i>
C5	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibi</i>
C6	<i>Lactococcus taiwanensis</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
C7	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
C8	<i>Lactococcus taiwanensis</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
C9	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>
C10	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	<i>Streptococcus macedonicus</i>	<i>Streptococcus macedonicus</i>
C11	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
C12	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Leuc. pseudomesenteroides</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
C13	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
C14	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>
C15	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus gasserii</i>	<i>Lactobacillus gasserii</i>
C16	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
C17	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactiplantibacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
C18	<i>Lactococcus taiwanensis</i>	<i>Weissella hellenica</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
C19	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Weissella bombi</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
C20	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
Cr	—	—	—	—

Tabella 5. Principali composti volatili presenti nei 20 mini-formaggi e nel campione controllo.

Classe chimica	Composto	Cluster 1		Cluster 2		Classe chimica	Composto	Cluster 1		Cluster 2		
		Area	media	Area	media			Area	media	Area	media	
Alcohols	Ethanol	7265315055	11133781058	4312951.318	4123629.15	Esters	1-Pentanol, 2-methyl-, acetate	222.939.833.1	19155.7825.1	302742212.9	1074598312	
	1-Nonanol	4312951.318	4123629.15	944607774.9	946334577.6		Pentanoic acid	5055954.038	5727638.25	210850287.6	208043235.7	
	1-Octan-3-ol	944607774.9	946334577.6	169781979.8	708477103.8		Octanoic acid	7549527.318	11200065.65	2850906.727	8234440.387	
	1-Pentanol	169781979.8	708477103.8	71990094.28	58310478.75		Nonanoic acid	1242524737	1291070350	1326597497	134812917.1	
	1-Propanol, 2-methyl	71990094.28	58310478.75	223499396.8	236451353.8		Hexanoic acid, 2-ethyl	11325782.59	14925529.3	30808234.6	2349079.06	
	Phenylethyl Alcohol	223499396.8	236451353.8	1120393.27	884888.583		Decanoic acid	3247233.848	2349079.06	1326597497	134812917.1	
	Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)	1120393.27	884888.583	11810308.97	8318971.86		Butanoic acid, 3-methyl	1326597497	134812917.1	1210091158	1500511638	
	Phenol	11810308.97	8318971.86	1237009.909	nd		Butanoic acid, 3-methyl	102042849.5	145190354.4	118554323.7	133177315.5	
	Benzyl alcohol	8423930.47	4382521.25	783887544.7	1155735532		Propanoic acid, 2-methyl	4271800278	64818037996	551838940	8076832780	
	Benzenemethanol, a,a-dimethyl	13799200.58	14058815.45	10709745.05	5386910.7		Acetic acid	551838940	8076832780	106580429.7	nd	
	3-Methylbutan-1-ol	29184753738	44079752910	1-Butanol, 3-methyl	2782143844		1533311185	Acetoin	8443010000	nd	186580429.7	nd
	2,6-Nonadien-1-ol	1237009.909	nd	1-Hexanol	188498014.2		186580429.7	3-Heptanone	8443010000	nd	10470144440	11522382852
	2,3-Butanediol	783887544.7	1155735532	1-Hexanol	188498014.2		186580429.7	Undecanal	865297547.9	876509047	10470144440	11522382852
	Ethanol, 2,2-oxybis	10709745.05	5386910.7	1-Hexanol, 2-ethyl	10470144440		11522382852	Octanal	8118810316	5822141455	865297547.9	876509047
	1-Butanol, 3-methyl	2782143844	1533311185	Undecanal	865297547.9		876509047	Benzaldehyde	120212099.2	10434898.8	2782143844	1533311185
	1-Hexanol	188498014.2	186580429.7	Ethyl octanoate	8438254.152		7981382.533	Ethyl octanoate	8438254.152	7981382.533	188498014.2	186580429.7
	1-Hexanol, 2-ethyl	10470144440	11522382852	Pentanoic acid, 2-hydroxy-, 2,4-di-1-butylphenyl esters	3084518.273		456547.25	Pentanoic acid, 2-hydroxy-, 2,4-di-1-butylphenyl esters	3084518.273	456547.25	10470144440	11522382852
	Undecanal	865297547.9	876509047	Pentanoic acid, 2-hydroxy-, 4-methyl-methyl ester	3057930909		3815258308	Pentanoic acid, 2-hydroxy-, 4-methyl-methyl ester	3057930909	3815258308	865297547.9	876509047
	Octanal	8118810316	5822141455	Pentanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	1117732		nd	Pentanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	1117732	nd	8118810316	5822141455
	Benzaldehyde	120212099.2	10434898.8								120212099.2	10434898.8
Ethyl octanoate	8438254.152	7981382.533							8438254.152	7981382.533		
Pentanoic acid, 2-hydroxy-, 2,4-di-1-butylphenyl esters	3084518.273	456547.25							3084518.273	456547.25		
Pentanoic acid, 2-hydroxy-, 4-methyl-methyl ester	3057930909	3815258308							3057930909	3815258308		
Pentanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester	1117732	nd							1117732	nd		

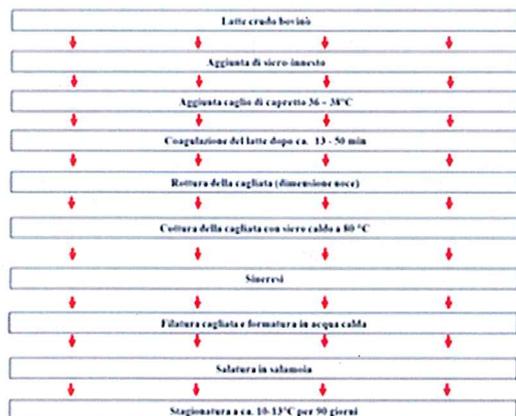


Figura 12. Protocollo usato per la produzione di Caciocavallo pugliese su scala pilota.

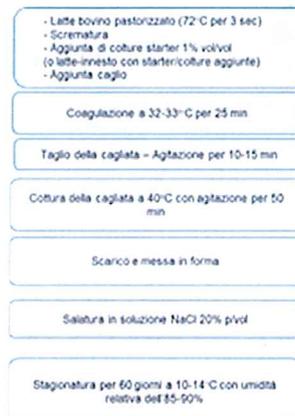


Figura 13. Protocollo di produzione dello Stelvio secondo il disciplinare di produzione.

Tabella 6. Indice Shannon e Chao1 e numero OTU registrati nei campioni di cagliata e formaggio Stelvio dopo 10 giorni, 1 mese e 2 mesi di stagionatura prodotti in impianto pilota.

ID	Starter	Tempo stagionatura	Sezione	Shannon	Chao1	OTU
s_0m_c_rep1	C15+C2	cagliata	cuore	6	273	291
s_0m_c_rep2	C15+C2	cagliata	cuore	6	376	376
s_0m_c_rep3	C15+C2	cagliata	cuore	6	282	278
s_0m_sc_rep1	C15+C2	cagliata	sottocrosta	6	317	327
s_0m_sc_rep2	C15+C2	cagliata	sottocrosta	6	262	251
s_0m_sc_rep3	C15+C2	cagliata	sottocrosta	6	254	250
c_0m_c_rep1	C15+C2	cagliata	cuore	6	242	237
c_0m_c_rep2	commerciale	cagliata	cuore	6	234	244
c_0m_c_rep3	commerciale	cagliata	cuore	6	232	237
c_0m_sc_rep1	commerciale	cagliata	sottocrosta	6	208	204
c_0m_sc_rep2	commerciale	cagliata	sottocrosta	5	216	211
c_0m_sc_rep3	commerciale	cagliata	sottocrosta	5	222	226
s_1m_c_rep1	C15+C2	1 settimana	cuore	5	228	231
s_1m_c_rep2	C15+C2	1 settimana	cuore	5	209	207
s_1m_c_rep3	C15+C2	1 settimana	cuore	5	189	191
s_1m_sc_rep1	C15+C2	1 settimana	sottocrosta	5	224	230
s_1m_sc_rep2	C15+C2	1 settimana	sottocrosta	5	206	207
s_1m_sc_rep3	C15+C2	1 settimana	sottocrosta	5	199	198
c_1m_c_rep1	commerciale	1 settimana	cuore	5	197	200
c_1m_c_rep2	commerciale	1 settimana	cuore	5	197	194
c_1m_c_rep3	commerciale	1 settimana	cuore	5	196	209
c_1m_sc_rep1	commerciale	1 settimana	sottocrosta	5	192	199
c_1m_sc_rep2	commerciale	1 settimana	sottocrosta	5	191	196
c_1m_sc_rep3	commerciale	1 settimana	sottocrosta	5	175	175
s_2m_c_rep1	C15+C2	1 mese	cuore	5	169	173
s_2m_c_rep2	C15+C2	1 mese	cuore	5	182	182
s_2m_c_rep3	C15+C2	1 mese	cuore	5	155	149
s_2m_sc_rep1	C15+C2	1 mese	sottocrosta	5	183	185
s_2m_sc_rep2	C15+C2	1 mese	sottocrosta	5	171	169
s_2m_sc_rep3	C15+C2	1 mese	sottocrosta	5	174	174
c_2m_c_rep1	commerciale	1 mese	cuore	5	157	157
c_2m_c_rep2	commerciale	1 mese	cuore	5	163	165
c_2m_c_rep3	commerciale	1 mese	cuore	5	119	120
c_2m_sc_rep1	commerciale	1 mese	sottocrosta	5	154	155
c_2m_sc_rep2	commerciale	1 mese	sottocrosta	5	151	159
c_2m_sc_rep3	commerciale	1 mese	sottocrosta	5	147	146
s_3m_c_rep1	C15+C2	2 mesi	cuore	5	181	173
s_3m_c_rep2	C15+C2	2 mesi	cuore	5	144	144
s_3m_c_rep3	C15+C2	2 mesi	cuore	5	138	136
s_3m_sc_rep1	C15+C2	2 mesi	sottocrosta	5	135	143
s_3m_sc_rep2	C15+C2	2 mesi	sottocrosta	5	188	187

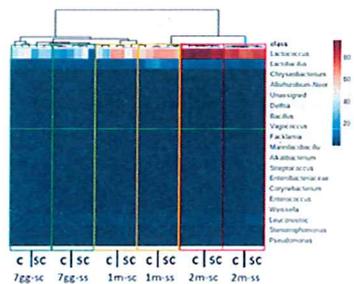


Figura 14. Heatmap della tassonomia a livello di genere dei formaggi Stelvio prodotti in scala di impianto pilota dopo 7 giorni (7 gg), 1 mese (1m) e 2 mesi (2m) di stagionatura. Le Unità Tassonomiche Operative (OTU, "Operational Taxonomic Units") individuate nei campioni prodotti con latte-innesto sperimentale (st) e convenzionale (sc) sono indicate come abbondanza relativa (%) nelle sezioni c: cuore e sc: sottocrosta.

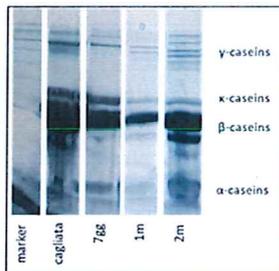


Figura 15. Urea-PAGE delle caseine (CN) (α -, β -, κ - e γ -CN) dei campioni dei formaggi Stelvio prodotti in scala di impianto pilota dopo 7 giorni, 1 mese e 2 mesi di stagionatura.

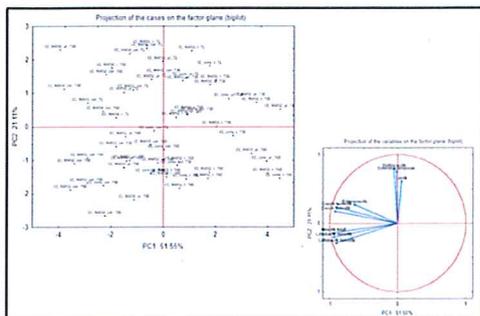


Figura 16. Proiezione dei campioni di Caciocavallo Pugliese ottenuti con gli starter naturali e aggiunti (CC_NWS1; CC_NWS2; CC_NWS3; CC_NWS4) o con l'impiego di starter commerciali e siero-innesto convenzionale (CC_conv) analizzati a livello di core (c), crosta (r) e sottocrosta (ur) dopo 1, 30, 60 e 90 giorni di stagionatura (T1, T30, T60, T90) sul piano delineato dalle due componenti principali sulla base delle caratteristiche microbiologiche.

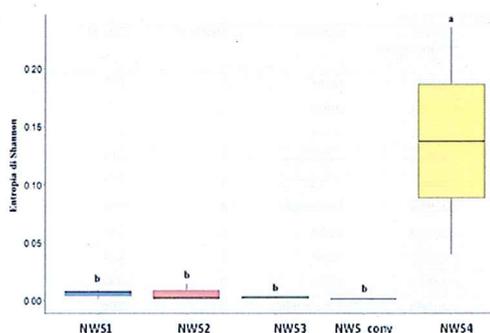


Figura 17. Diversità di Shannon misurata mediante dati relativi alle Unità Tassonomiche Operative (OTU, "Operational Taxonomic Units") assegnate ai principali livelli tassonomici (phylum, classe, ordine, famiglia e genere) nei campioni di siero-innesto sperimentale (NWS1, NWS2, NWS3 e NWS4) e nel campione costituito da starter commerciali e siero-innesto convenzionale (NWS_conv).

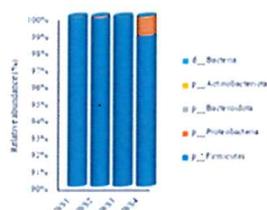


Figura 18. Unità Tassonomiche Operative (OTU, "Operational Taxonomic Units") assegnate al livello tassonomico di Phylum, nei campioni di siero-innesto sperimentale (NWS1, NWS2, NWS3 e NWS4).

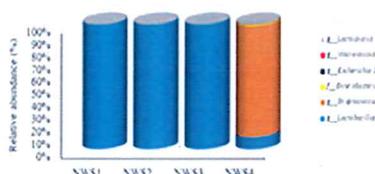


Figura 19. Unità Tassonomiche Operative (OTU, "Operational Taxonomic Units") assegnate al livello tassonomico di genere/specie, nei campioni di siero-innesto sperimentale (NWS1, NWS2, NWS3 e NWS4).

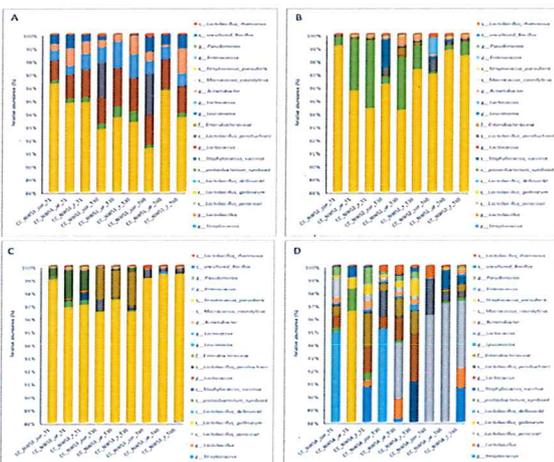


Figura 20. Unità Tassonomiche Operative (OTU, Operational Taxonomic Units) assegnate al livello tassonomico di specie/genere, nei campioni di formaggio Caciocavallo pugliese ottenuto a livello di impianto pilota mediante l'impiego dei siero-innesti sperimentali NWS1 (A), NWS2 (B), NWS3 (C) o NWS4 (D) e delle colture aggiunte in forma attenuata (CC-NWS4) a livello di core (cor), sottocrosta (ur, under-rind) e crosta (r, rind) analizzato dopo 1 (T1), 30 (T30) e 60 (T60) giorni di stagionatura a 10°C.

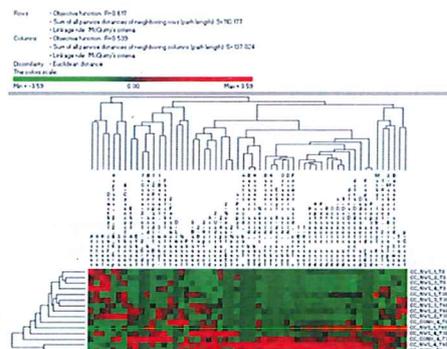


Figura 21. Analisi di permutazione dei principali composti organici volatili determinati nei campioni di formaggio Caciocavallo pugliese ottenuto a livello di impianto pilota mediante l'impiego dei siero-innesti sperimentali e delle colture aggiunte in forma attenuata (CC_NWS1, CC_NWS2, CC_NWS3, CC_NWS4) o dello starter convenzionale (CC_conv) dopo 1 (T1), 30 (T30) e 60 (T60) giorni di stagionatura a 10°C.

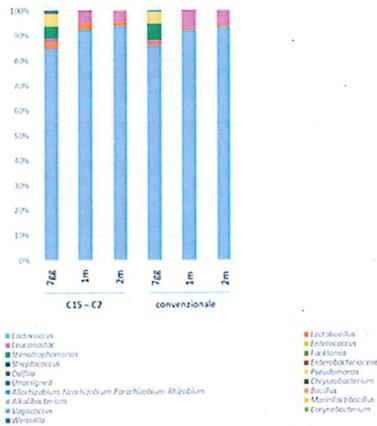


Figura 22. Tassonomia a livello di genere dei formaggi Stelvio prodotti in azienda dopo 7 giorni (7 gg), 1 mese (1m) e 2 mesi (2m) di stagionatura. Le Unità Tassonomiche Operative (OTU, "Operational Taxonomic Units") individuate nei campioni prodotti con latte-innesto sperimentale e convenzionale (controllo) sono indicate come abbondanza relativa (%).

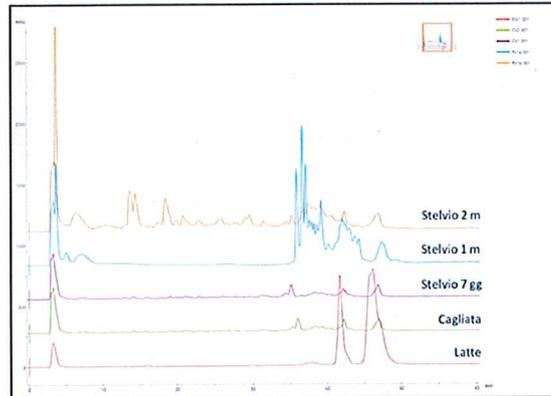


Figura 23. Profilo peptidico della frazione insolubile a pH 4.6 dei campioni di latte, cagliata, formaggio Stelvio prodotti in azienda dopo 7 giorni (7gg), 1 mese (1 m) e 2 mesi (2m) di stagionatura, analizzata su Akta RP-HPLC.

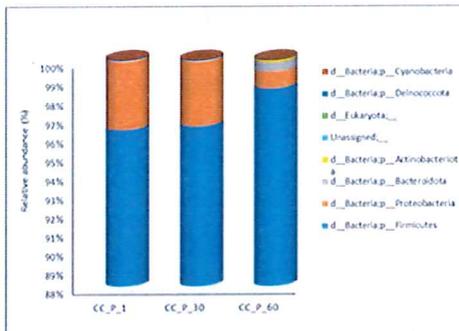


Figura 24. Unità Tassonomiche Operative (OTU, Operational Taxonomic Units) assegnate al livello tassonomico di Phylum, nei campioni di formaggio Caciocavallo pugliese ottenuto a livello di produzione artigianale/industriale (CC-P) mediante l'impiego del sieroinnesto sperimentale selezionato e delle colture aggiunte in forma attenuata analizzato dopo 1 (T1), 30 (T30) e 60 (T60) giorni di stagionatura a 10°C.

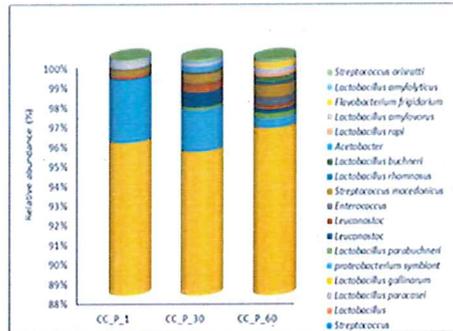


Figura 25. Unità Tassonomiche Operative (OTU, Operational Taxonomic Units) assegnate al livello tassonomico di specie/genere nei campioni di formaggio Caciocavallo pugliese ottenuto a livello di produzione artigianale/industriale (CC-P) mediante l'impiego del sieroinnesto sperimentale NWS2 e delle colture aggiunte in forma attenuata analizzato dopo 1 (T1), 30 (T30) e 60 (T60) giorni di stagionatura a 10°C.

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Osservazioni alla relazione tecnico-scientifica

4. Obiettivi, benefici e criticità del progetto

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO				
Descrizione degli obiettivi del progetto				
Obiettivi generali	Obiettivi specifici	Linee di attività in WP	Risultati attesi	Risultati raggiunti <i>(Se il risultato atteso non è stato raggiunto specificare la motivazione nel campo note)</i>
<p>a.</p> <p>Garantire un'efficiente gestione del progetto nel suo ciclo di vita</p>	<p>1. Costituzione di un piano di monitoraggio mensile delle attività progettuali con specifiche indicazioni dei ruoli dei ricercatori, avanzamento finanziario e raggiungimento risultati</p> <p>2. Costituzione dei piani intermedi di attività e di spesa</p> <p>3. Definizione del calendario Skype con cadenza mensile</p> <p>4. Analisi mensile degli eventuali scostamenti di attività</p> <p>5. Stesura dei report semestrali di avanzamento</p> <p>6. Stesura della relazione economica di fine attività</p>	<ul style="list-style-type: none"> • WP1 – A1.1 • WP1 – A1.2 • WP1 – A1.3 • WP1 – A1.4 • WP1 – A1.5 • WP1 – A1.6 	<ul style="list-style-type: none"> • Piano di monitoraggio mensile comprendente la verifica dei risultati e spesa, individuazione ostacoli e azioni correttive • Verbali delle 24 riunioni Skype • 4 Report semestrali • 2 relazioni scientifiche da trasmettere al MiPAAF • 1 relazione finale scientifica e finanziaria del progetto 	<ul style="list-style-type: none"> • Raggiunto per il I anno di attività mediante realizzazione di cartella NATCASEI condivisa tra i partners; • Raggiunto per il I anno di attività mediante verbali e due riunioni presso la sede di Bolzano • Raggiunto (2 report semestrali per il I anno) • Raggiunto, Trasmissione al MiPAAF della prima relazione scientifica relativa al I anno di attività • Raggiunto
<p>b. Determinazione delle relazioni causa-effetto tra condizioni di allevamento e composizione chimica e microbiologica del latte</p>	<p>1. Descrizione dei nessi causa-effetto</p>	<ul style="list-style-type: none"> • WP2 – A2.1 • WP2 – A2.2 • WP2 – A2.4 	<ul style="list-style-type: none"> • Raggruppamento dei campioni di latte per condizioni di allevamento. • Selezione di almeno 500 campioni di latte statisticamente rappresentativi per Alto Adige e Puglia • Stabilire le relazioni causa effetto tra condizioni di allevamento e composizione chimica del latte • Stabilire le relazioni causa effetto tra condizioni di allevamento e diversità microbiota/microbioma latte 	<ul style="list-style-type: none"> • Raggiunto • Raggiunto • Raggiunto • Raggiunto
	<p>2. Creazione di una bio-banca di batteri lattici autoctoni</p>	<ul style="list-style-type: none"> • WP2 – A2.3 	<ul style="list-style-type: none"> • Costruzione di una bio-banca contenente almeno 100 batteri lattici autoctoni 	<ul style="list-style-type: none"> • Raggiunto

c. Determinazione di combinazioni ottimali di latte e batteri lattici per la produzione di latte-innesti e siero-innesti e la selezione di colture aggiunte	4. Selezione dei lattii maggiormente idonei allo sviluppo dei batteri lattici	<ul style="list-style-type: none"> • WP3 – A3.1 	<ul style="list-style-type: none"> • Individuazione di almeno 10 lattii più idonei a supportare la crescita dei batteri lattici 	<ul style="list-style-type: none"> • Raggiunto
	5 Selezione di batteri lattici autoctoni da impiegare come colture starter naturali per la produzione di Stelvio e Caciocavallo Pugliese	<ul style="list-style-type: none"> • WP3 – A3.2 	<ul style="list-style-type: none"> • Selezione e formulazione di almeno 10 starter naturali (5 latte-innesti e 5 siero-innesti); almeno 4 protocolli di produzione e propagazione di starter naturali a base di latte selezionato e LAB autoctoni 	<ul style="list-style-type: none"> • Raggiunto
	6. Selezione di batteri lattici autoctoni da impiegare come colture aggiunte per la produzione di Stelvio e Caciocavallo Pugliese	<ul style="list-style-type: none"> • WP3 – A3.3 	<ul style="list-style-type: none"> • Selezione e formulazione di almeno 10 colture aggiunte (5 per Stelvio e 5 Caciocavallo Pugliese); almeno 4 protocolli di produzione e uso di colture aggiunte costituiti da LAB autoctoni 	<ul style="list-style-type: none"> • Raggiunto
d. Messa a punto ed uso in caseificazione di starter naturali e colture aggiunte per la produzione di Stelvio e caciocavallo Pugliese	7. Messa a punto ed uso in caseificazione di starter naturali e colture aggiunte per la produzione di Stelvio e caciocavallo Pugliese	<ul style="list-style-type: none"> • WP4 – A4.1 • WP4 – A4.2 • WP4 – A4.3 	<ul style="list-style-type: none"> • Selezione dei migliori protocolli di produzione e propagazione di starter naturali e colture aggiunte per Stelvio • Selezione dei migliori protocolli di produzione e propagazione di starter naturali e colture aggiunte per caciocavallo Pugliese • Trasferimento su scala artigianale e industriale 	<ul style="list-style-type: none"> • Raggiunto
e. Divulgazione dei risultati, arruolamento e formazione di giovani ricercatori per promuovere l'avanzamento tecnologico del settore	3. Dotare allevatori, aziende casearie e stakeholder del settore di informazioni scientifiche atte a migliorare la qualità del latte, produrre e gestire gli starter naturali e colture aggiunte	<ul style="list-style-type: none"> • WP5 	Seminari/giornate di addestramento con esperti ed operatori del settore Adesione a gruppi scientifici tematici di discussione on line Almeno due pubblicazioni Due convegni sui risultati del progetto	<ul style="list-style-type: none"> • Raggiunto Raggiunto Raggiunto Raggiunto
NOTE				

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Osservazioni al raggiungimento degli obiettivi del progetto

5. Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto

Descrivere gli ostacoli occorsi durante la realizzazione delle attività del progetto indicando la linea di attività interessata, l'Unità operativa coinvolta e le azioni che sono state attivate al fine di rimuovere gli ostacoli che impedivano la realizzazione degli obiettivi.

Numero WP	Unità operative coinvolte	Ostacolo	Azioni correttive
WP2	UNIBZ/UNIB A	L'elaborazione dei dati di 4225 aziende ha richiesto un notevole sforzo in termini di competenze statistiche avanzate. L'ostacolo era rappresentato dalla co-presenza di variabili categoriche e numeriche.	L'azione correttiva intrapresa che ha permesso di superare con successo l'ostacolo ha previsto la conversione dei dati in forma binaria e poi il raggruppamento in cluster.
WP2	UNIBZ/UNIB A	Estrazione totale di DNA microbico da latte senza interferenza del DNA dell'ospite	L'azione correttiva intrapresa che ha permesso di superare con successo l'ostacolo ha previsto l'uso di più kit e il settaggio di un metodo che permesso di ridurre l'interferenza.
WP3	UNIBZ/UNIB A	A causa della pandemia di Covid-19 sono state interrotte le attività di ricerca a partire da febbraio/primi di marzo 2020. Tale interruzione ha inevitabilmente ritardato tutte le attività previste in questo WP.	L'azione correttiva intrapresa di proroga di 7,5 mesi per il recupero delle attività non ha compromesso l'esito del progetto.

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Osservazioni alle azioni correttive messe in atto

Timbro dell'Ente proponente il progetto



Firma leggibile del Coordinatore del progetto
Prof. Marco Gobetti



SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)

Valutazione complessiva del progetto

Luogo e Data

Firma leggibile dell'Esperto (qualora designato)

¹Note

Inserire una delle 6 aree prioritarie previste dal capitolo 2 del Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020), ovvero:

- Area 1 - Aumento sostenibile della produttività, della redditività e dell'efficienza delle risorse negli agro ecosistemi
- Area 2 - Cambiamento climatico, biodiversità, funzionalità suoli e altri servizi ecologici e sociali dell'agricoltura
- Area 3 - Coordinamento e integrazione dei processi di filiera e potenziamento del ruolo dell'agricoltura
- Area 4 - Qualità, tipicità e sicurezza degli alimenti e stili di vita sani
- Area 5 - Utilizzo sostenibile delle risorse biologiche a fini energetici ed industriali
- Area 6 - Sviluppo e riorganizzazione del sistema della conoscenza per il settore agricolo, alimentare e forestale
- Area 7 - Pesca e acquacoltura

² Inserire una delle seguenti linee di attività (previste dal Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale 2014-2020). La linea di attività da inserire dovrà corrispondere all'area strategica di intervento indicata nel precedente campo, ovvero per la:

Area 1 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Scelte varietali, di razza, di destinazione d'uso, miglioramento genetico mediante l'utilizzo di biotecnologie sostenibili;
- b. Uso sostenibile dei nutrienti, dei prodotti fitosanitari e dei prodotti zooprofilattici, utilizzazione di microrganismi, insetti utili e molecole bioattive per la difesa delle piante;
- c. Ottimizzazione dei processi produttivi (tecnica colturale, alimentazione, benessere animale, pratiche di prevenzione, risparmio energetico, ecc.), anche mediante l'utilizzo di sistemi di supporto alle decisioni (telerilevamento, agricoltura e zootecnia di precisione, meccanizzazione integrale, robotica e altri sistemi automatici intelligenti, applicazione di principi e strumenti di intelligenza artificiale ecc.) e biotecnologie sostenibili;
- d. Soluzioni tecnologiche per il miglioramento degli impianti e delle strutture aziendali;
- e. Gestione efficiente della risorsa idrica e della qualità delle acque;
- f. Conservazione, conservabilità e condizionamento delle produzioni (riduzione degli sprechi, conservanti naturali ecc.);
- g. Strumenti e sistemi funzionali alla gestione aziendale (pianificazione, costi di produzione, diversificazione ecc.) e alla sua caratterizzazione (impronta ecologica).

Area 2 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Strategie per la mitigazione e per lo studio dell'adattamento al cambiamento climatico;
- b. Valorizzazione delle varietà e razze locali e salvaguardia delle risorse genetiche;
- c. Tutela del fattore "suolo": conservazione, qualità, fertilità e salvaguardia della biodiversità microbica;
- d. Valorizzazione di alcuni servizi ecologici forniti dal settore primario: manutenzione e ripristini ambientali, verde urbano, agricoltore/selvicoltore custode, bonifica dei terreni inquinati ecc.;
- e. Valorizzazione del ruolo sociale dell'agricoltura: "agricoltura sociale", relazioni urbano – rurale, accettabilità sociale dell'attività agricola.

Area 3 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Soluzioni organizzative, economiche e sociali alle difficoltà strutturali di integrazione orizzontale e verticale nei distretti e nelle filiere;
- b. Soluzioni tecnologiche per il miglioramento dei processi di filiera;
- c. Sviluppo di sistemi distributivi, commerciali, promozionali e di marketing.

Area 4 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Produzione di alimenti di qualità per tutti (food security);
- b. Miglioramento, tutela e tracciabilità della qualità e della distintività e adeguamento dei relativi standard di certificazione;
- c. Tecniche sostenibili per la trasformazione, conservazione e confezionamento dei prodotti agroalimentari;
- d. Valorizzazione della relazione tra alimentazione e salute e della valenza nutraceutica dei prodotti agroalimentari.

Area 5 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Sviluppo e razionalizzazione delle filiere di biomasse e di biocarburanti con adeguati requisiti di sostenibilità ambientale ed economica;
- b. Sviluppo di bioraffinerie per la produzione di materiali industriali e mezzi tecnici a partire da residui e scarti agricoli nell'ottica dell'adeguata remunerazione del settore agricolo.

Area 6 - Inserire una delle seguenti linee di attività:

- a. Nuovi strumenti di governance per il coordinamento e l'efficienza del sistema della conoscenza: analisi dei fabbisogni, pianificazione, monitoraggio, valutazione ecc.;
- b. Promozione del trasferimento dell'innovazione mediante servizi di supporto, formazione e consulenza alle imprese agricole, alimentari e forestali;
- c. Sviluppo di nuove modalità.

³ Inserire uno degli 13 settori produttivi previsti dall'Allegato A del Piano Strategico per l'Innovazione e la ricerca nel settore agricolo alimentare e forestale (2014-2020), ovvero:

- a) Zootecnico;
- b) Orticolo;
- c) Cerealicolo;
- d) Viticolo;
- e) Frutticolo;

- f) Olivicolo;
- g) Biologico;
- h) Floricolo;
- i) Forestale;
- j) Innovazione sociale;
- k) Piante officinali;
- l) Riscicolo;
- m) Pesca e acquacoltura.