Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria
Via Po, 14 – 00198 ROMA

Relazione finale di progetto

NewTeCh
New Technologies for Cheese production

ACRONIMO DEL PROGETTO:
NEWTECH

Lodi, 22 Marzo 2021

Indice

1. ..Progetto.....3
2.Descrizione del progetto 5
3.Relazione finale del progetto 6
4.Obiettivi, benefici e criticità del progetto.....32
5.Ostacoli occorsi ed azioni correttive messe in atto 33
6. Allegato 1 35

1. Progetto

Dati generali

Titolo del progetto	**New technologies for cheese production**
Acronimo del progetto	NEWTECH
Area strategica di intervento[1]	Area 4 - Qualità, tipicità e sicurezza degli alimenti e stili di vita sani
Linea di attività[2]	b. Miglioramento, tutela e tracciabilità della qualità e della distintività e adeguamento dei relativi standard di certificazione
Settore produttivo[3]	Zootecnico
Tipo di progetto	☐ **Bando** X **Affidamento diretto** ☐ **Sportello**
Riferimento del Bando/Affidamento diretto/Sportello	Lettera della DG DISR – DISR 04 con Prot. Uscita N. 0028608 del 02/12/2016
Durata del progetto (mesi)	42
Costo ammesso	€ 809.675,37
Contributo concesso	€ 495.000,00
Importo rendicontato	€ 0,00

Soggetto proponente il progetto	Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA) - Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura (CREA-ZA) sede di Lodi	**Natura giuridica** X **Pubblico** ☐ **Privato**
Rappresentante legale	GAUDIO Carlo – GDACRL57P18D086G	

Coordinatore del progetto	Giorgio Giraffa – GRFGRG58C02F205P

Numero di Unità Operative	2 (DUE)	
ELENCO DELLE UNITÀ OPERATIVE		
Unità Operativa n. 1 - Denominazione	CREA - Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura sede di Lodi (**CREA-ZA, Lodi**) (ex CREA-FLC, Lodi)	**Natura giuridica** X **Pubblico** ☐ **Privato**
Unità Operativa n. 2 - Denominazione	Istituto sperimentale italiano Lazzaro Spallanzani di Rivolta d'Adda (CR) (**IS**)	**Natura giuridica** ☐ **Pubblico** X **Privato**

Numero di partner esterni al progetto	2 (due)	
ELENCO DEI PARTNER ESTERNI		
Partner n. 1 - Denominazione	Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Parma (PR)	**Natura giuridica** **X Pubblico** ☐ **Privato**
Partner n. 2 - Denominazione	Istituto di Scienze Applicate e Sistemi Intelligenti del CNR (CNRISASI) di Pozzuoli (NA)	**Natura giuridica** **X Pubblico** ☐ **Privato**

L'esempio riportato nel presente modello è riferito a un numero di due unità operative e di due partner. Qualora il progetto dovesse prevedere più unità operative o più partner aggiungere una riga per ogni unità operativa/partner.

2. Descrizione del progetto

Sintesi del progetto
Il progetto "New Technologies for Cheese Production" (NEWTECH) si sviluppa in tre filoni principali di ricerca. La prima tematica "Approcci innovativi per la lotta alla contraffazione nelle produzioni DOP del settore caseario (Grana Padano)" riguarda l'autenticità delle produzioni DOP nel settore lattiero-caseario nazionale (con particolare riferimento al Grana Padano DOP). Il Grana Padano è infatti fra i prodotti più "copiati" al mondo. Ciò ha determinato negli anni lo sviluppo di tecniche sempre più sofisticate per la sua caratterizzazione, a difesa della sua autenticità. A tal riguardo, l'analisi del DNA potrebbe consentire di verificare la tracciabilità di filiera valorizzando le produzioni e tutelando sia i produttori, che operano nel rispetto dei disciplinari, sia i consumatori. Nello specifico, l'analisi delle informazioni ottenute dallo studio delle variazioni nella diversità genetica complessiva della microflora e dei "residui vegetali" dell'alimentazione del bestiame, opportunamente elaborate mediante approcci bioinformatici e statistici, consentirà di mappare il latte ed il formaggio in funzione di polimorfismi, che potranno essere utilizzati come potenziali marcatori per test di analisi della biodiversità e della tracciabilità. A tal fine, sarà messo a punto un innovativo protocollo, di facile applicazione ed esecuzione, trasferibile sul territorio e basato su strumenti analitici genetico-molecolari. Lo scopo sarà di valutare l'utilità del DNA barcoding del cloroplasto e/o del DNA batterico per distinguere l'origine geografica del Grana Padano DOP su base molecolare e, contestualmente, di differenziare il formaggio DOP da prodotti similari. La seconda tematica "Aggiunta di latte in polvere e proteine concentrate del latte e impatto sulla qualità dei formaggi freschi" riguarda l'uso di latte in polvere e proteine concentrate in caseificazione. Un'esigenza riconosciuta della moderna industria lattiero casearia, strettamente connessa alla produttività aziendale e alla competitività delle nostre produzioni industriali, riguarda la standardizzazione della composizione del latte. Tale pratica, già applicata a livello internazionale, può essere effettuata agendo direttamente sulla composizione della materia prima, mediante tecnologie di membrana, oppure addizionando derivati concentrati (es. proteine concentrate del latte, o PCL) o anidri (DA) del latte. In Italia, l'utilizzo di questi ingredienti anidri è limitato alla produzione dei formaggi fusi (circolare MIPAAF del 30.06.2009 in conformità al R.D.L. 15 ottobre 1925, n. 2033 e alla legge 11 aprile 1974, n. 138/74, relativa al divieto di ricostituzione del latte in polvere per l'alimentazione umana). La legge 138 vieta di utilizzare (o anche semplicemente detenere in azienda) latte in polvere o concentrato in tutti i tipi di formaggio e nella produzione di latte alimentare. Di recente, la UE ha preso posizione ritenendo che la legge 138 costituisca un ostacolo alla libera circolazione delle merci. Considerata la mancanza di dati specifici in materia, obiettivo di questa ricerca è di studiare gli effetti dell'utilizzo di DA e PCL nella produzione di formaggi freschi tipo crescenza e mozzarella, con particolare riferimento alla ricaduta sui parametri qualitativi e sulla tecnologia di trasformazione, utilizzando differenti approcci tecnologico-produttivi, predefiniti con modellizzazione matematica del processo. Si intende anche valutare se le aggiunte di derivati abbiano una effettiva valenza positiva, in termini sia di resa casearia che di ricaduta economica, senza modificare le caratteristiche qualitative e l'accettabilità dei prodotti da parte del consumatore. All'interno della seconda tematica è contenuta un'attività che intende implementare un sistema spettroscopico-tomografico basato sulla spettroscopia risolta nello spazio per valutare parametri reologico-strutturali dei formaggi, da correlare con altre caratteristiche qualitative dei prodotti. Una tecnica che si presta allo sviluppo di strumentazione a costi compatibili con un utilizzo aziendale grazie alla disponibilità sul mercato di componentistica elettronica (controller, sorgenti monocromatiche, detector di tipo InGaAs) idonea alla realizzazione di strumentazione collocabile nei siti produttivi in line o at line. si intende inoltre dotarsi di uno strumento che potrà permettere una valutazione dei. Questa strumentazione potrà essere applicata anche per valutare particolari attributi del formaggio Grana Padano DOP, con particolare riferimento alla texture della pasta, con l'obiettivo di evidenziare la presenza di anomalie strutturali che influenzano la consistenza del formaggio. Il campionamento previsto per la prima tematica "Approcci innovativi per la lotta alla contraffazione nelle produzioni DOP del settore caseario (Grana Padano)" prevede la raccolta di campioni di latte, uno al mese per un anno in tutti i caseifici afferenti al Consorzio di Tutela di Grana Padano DOP, e del formaggio ottenuto che sarà prelevato dopo 7 - 9 mesi di stagionatura. Da tutti questi campioni verrà estratto il DNA. Quindi è necessario prevedere una durata complessiva del progetto NEWTECH di tre anni per poter completare lo studio.

3. Relazione finale

SPAZIO RISERVATO AL COORDINATORE DEL PROGETTO
Relazione tecnico-scientifica finale

WP1 - Coordinamento

Nell'ambito dell'attività di coordinamento sono state eseguite le seguenti attività.
Nomina del comitato scientifico, nell'ambito della prima riunione di coordinamento.
Riunioni di coordinamento periodiche, con cadenza semestrale o annuale (n=4) con i partner di progetto ed i partner esterni. Le riunioni sono state fatte nelle seguenti date: 3 ottobre 2017 (riunione iniziale), 17 aprile 2018, 14 dicembre 2018, 22 novembre 2019 (quest'ultima presente come allegato 1).

WP2 - Approcci innovativi per la lotta alla contraffazione nelle produzioni DOP del settore caseario (Grana Padano)

UO - CREA-ZA (Lodi)
Sviluppo di un sistema genetico-molecolare per la mappatura del Grana Padano DOP: a case-study per la lotta alla contraffazione delle produzioni DOP nel settore lattiero-caseario

Il lavoro svolto aveva come obiettivi: lo sviluppo di un sistema analitico basato sull'analisi dei profili metagenomici (DNA metabarcoding) e di meta-fingerprinting (mediante RAPD-PCR) per la mappatura del Grana Padano DOP prodotto nei diversi caseifici aderenti al Consorzio di Tutela del Grana Padano DOP attraverso la caratterizzazione delle comunità microbiche presenti nel prodotto finito tipiche di ciascun caseificio. Il DNA metabarcoding è un innovativo metodo di valutazione della biodiversità che associa alle recenti tecniche di sequenziamento massivo e profondo (next generation) la tassonomia basata sul DNA (DNA barcode). I principali vantaggi della metagenomica sono dati dall'identificazione di migliaia di specie in una singola analisi e dalla possibilità di risalire all'abbondanza relativa delle diverse popolazioni che possono quindi definire differenti areali. La tecnica RAPD-fingerprinting è un sistema ampiamente utilizzato per la tipizzazione microbica, applicata in questo progetto al DNA totale dell'intera comunità batterica del formaggio. I dati sono stati quindi aggregati ed elaborati statisticamente.
Il Consorzio di Tutela ha fornito campioni di Grana Padano DOP rappresentativi di un'intera annata di produzione, da Novembre 2017 a Ottobre 2018. Per ognuno dei 12 mesi sono stati forniti i campioni di tutti i caseifici aderenti al Consorzio per un totale di circa 1600 campioni.
In una fase iniziale sono stati messi a punto sia i protocolli di pretrattamento del formaggio e di estrazione del DNA, sia i protocolli per l'analisi del DNA batterico totale, mediante fingerprinting con RAPD-PCR, che per la preparazione del DNA per analisi metagenomica (in outsourcing) tramite sequenziamento di regioni del gene 16S rRNA (le specifiche di queste attività preliminari sono riportate nella precedente relazione intermedia).
Per il pretrattamento ed estrazione del DNA dal formaggio sono stati adottati due distinti protocolli a seconda se utilizzati per l'analisi molecolare/genotipica o per la creazione della biobanca di DNA:
1) per i campioni destinati alle analisi molecolari (fingerprinting e metagenomica): i) porzionatura di 10 gr di campione prendendo in considerazione tre zone della fetta (sottocrosta, centrale e vicino alla punta) per una migliore rappresentatività del campionamento; ii) pretrattamento per frammentare ed omogeneizzare il campione utilizzando soluzioni detergenti (sodio citrato, Triton X-100, PBS) al fine di eliminare i residui di grasso e caseina; iii) estrazione del DNA dal pellet cellulare con metodica fenolo-cloroformio/alcol isoamilico.

2) per i campioni destinati alla biobanca di DNA, un metodo miniaturizzato che ha previsto: i) porzionatura di 500 mg di campione Grana Padano prendendo sempre in considerazione le tre zone della fetta; ii) pretrattamento; iii) estrazione del DNA dal pellet cellulare con estrattore automatico di DNA.
Per lo studio del DNA batterico totale sono state applicate due tecniche:

1) analisi fingerprinting mediante amplificazione del DNA totale delle comunità microbiche con due primers differenti BOXA1R e M13 e la successiva analisi statistica dei profili genotipici ottenuti tramite l'utilizzo del software BioNumerics v.7.2 dell'Applied Maths (Belgio).

2) analisi metagenomica delle comunità batteriche del formaggio mediante sequenziamento della regione (V3-V4) del gene 16S rRNA, commissionata a due aziende specializzate in analisi NGS (Next-Generation-Sequencing) su piattaforma Illumina (BaseClear, Leiden, Olanda; IGA Technology Services, Udine). Dall'analisi bioinformatica, è stata generata la tabella delle specie microbiche (OTUs, Operational Taxonomic Units) e loro relativa abbondanza espressa in numero di reads presenti in ciascun campione di formaggio. Dopo opportuna rimozione delle OTUs aventi un numero di reads minore a 5, è stata condotta l'analisi statistica usando il software RStudio 3.5.2 (R Core Team).

Risultati
Il lavoro svolto in un primo momento su 251 campioni di Grana Padano (118 prodotti nel mese di dicembre 2017 e di aprile 2018, oltre a 15 campioni di formaggi duri similari) ha permesso di evidenziare un'elevata biodiversità all'interno dei campioni di formaggio di Grana Padano e di formaggi duri similari, e allo stesso tempo una tendenza a formare gruppi a seconda della provenienza geografica (province/regione). Dall'analisi dei dati di fingerprinting si è evidenziata la presenza di alcuni genotipi particolari che potrebbero, se confermati, essere considerati come marker di caseificio o di area geografica. Lo stesso risultato è stato ottenuto per l'analisi metagenomica da cui si è evidenziata un'elevata biodiversità fra le specie presenti nei vari campioni. Anche da questa analisi sono state individuate alcune specie che potrebbero essere considerate marker di caseificio e/o di zona geografica. Con entrambe le metodiche è comunque risultato difficile ottenere una distinzione netta dei campioni di Grana Padano rispetto ai formaggi duri similari, anche se alcuni formaggi duri si discostavano in modo statisticamente significativo dagli altri campioni con entrambe gli approcci analitici.
Successivamente sono stati analizzati altri 118 campioni di Grana Padano, prodotti nel mese di Agosto 2018, e 47 campioni di formaggio duro similare forniti dal Consorzio Grana Padano.
Analisi fingerprinting - Dall'amplificazione del DNA microbico estratto da Grana Padano e dai formaggi duri similari, sono stati ottenuti dei profili genotipici caratteristici dell'intera popolazione microbica di ciascun campione. I profili genotipici ottenuti con entrambi i primers (M13 e BOXA1R) sono stati precedentemente analizzati tramite la tecnica del bandmatching e successivamente tramite analisi statistica multivariata differenziale.
I risultati hanno mostrato una significativa differenziazione fra i campioni di Grana Padano e dei formaggi duri similari, sulla base dei dati di tipizzazione delle comunità batteriche presenti nei due tipi di formaggi, come indicato nella Figura 1, infatti i due gruppi di formaggi si separano lungo l'asse orizzontale della dimensione 2.

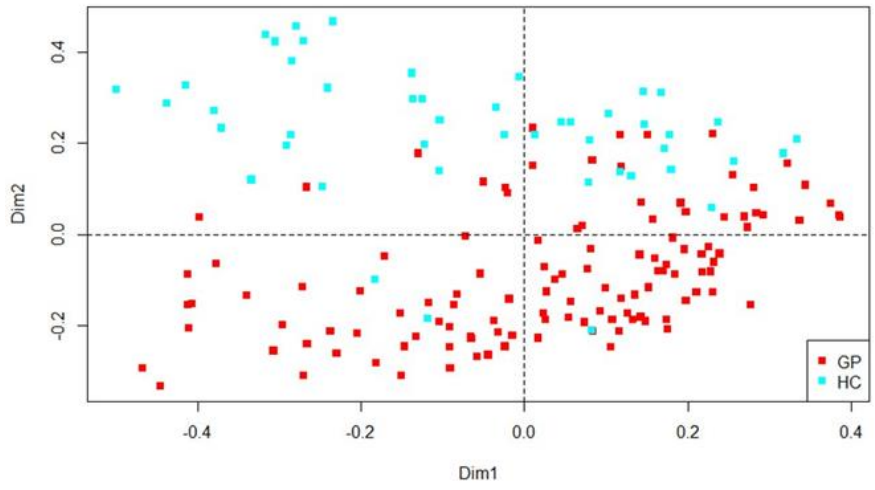


Figura 1 – Analisi differenziale (PCoA) considerando i dati di tipizzazione delle comunità batteriche presenti nei campioni Grana Padano (GP) e formaggi duri (Hard Cheese, HC).

Lo stesso risultato è stato ottenuto, sottoponendo gli stessi dati ad analisi statistica multivariata delle

componenti principali (PCA; Figura 2). Le due componenti principali (PC1-PC2) spiegano rispettivamente il 7.99% e il 7.31% della varianza espressa, e consentono di differenziare i formaggi duri similari dal Grana Padano, anche se in misura meno significativa e distinta rispetto all'analisi differenziale precedente.

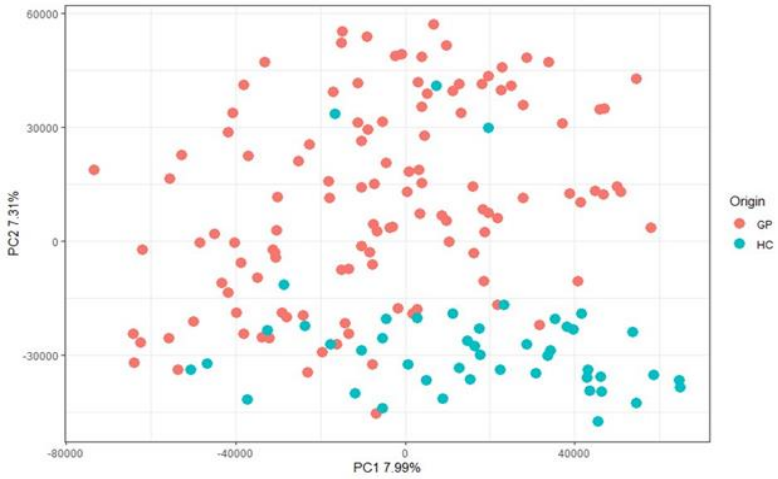


Figura 2 - Analisi PCA considerando i dati di tipizzazione delle comunità batteriche presenti nei campioni Grana Padano (GP) e formaggi duri (Hard Cheese, HC).

Analisi metagenomica - I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica multivariata delle componenti principali (PCA) per valutare la presenza di differenze significative nella variabilità microbica dei campioni di Grana Padano rispetto a quella dei formaggi duri (denominati Hard Cheese, HC) (Figura 3). Le due componenti principali (PC1-PC2) spiegano rispettivamente il 28.14% e il 23.43% della varianza espressa, ma non consentono di differenziare i formaggi duri similari dal Grana Padano.

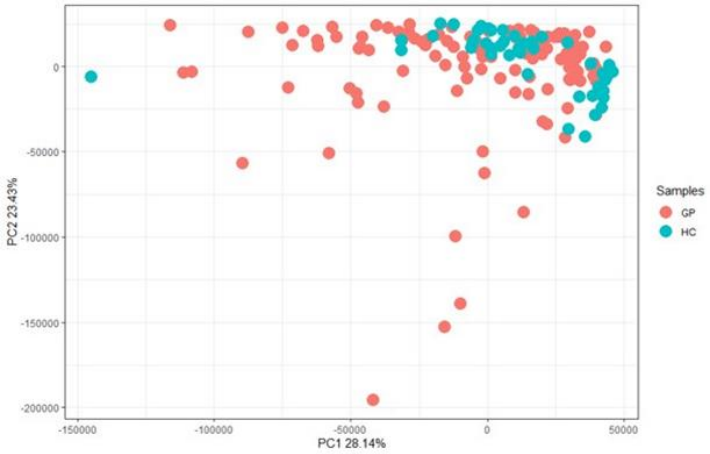


Figura 3 - Analisi PCA considerando i dati di tipizzazione delle comunità batteriche presenti nei campioni Grana Padano (GP) e formaggi duri (Hard Cheese, HC).

Differenze significative sono state riscontrate analizzando gli stessi dati con analisi differenziale (PCoA). Nella figura 4 si osserva come i formaggi similari (HC) si concentrano ai lati del grafico lungo la dimensione 1, anche se non si separano mai nettamente dai campioni di Grana Padano.

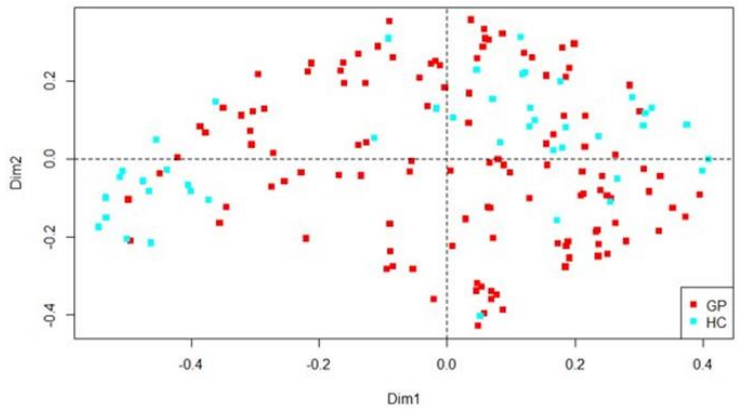


Figura 4 – Analisi differenziale (PCoA) considerando i dati di tipizzazione delle comunità batteriche presenti nei campioni Grana Padano (GP) e formaggi duri (Hard Cheese, HC).

Successivamente, per cercare di estrapolare un'informazione dal numero di specie microbiche e dalla loro rappresentatività sia in Grana Padano che nei formaggi duri, è stata valutata l'abbondanza microbica relativa caratteristica dei vari prodotti. A tal fine, sono state definite dominanti e secondarie le specie la cui abbondanza relativa risultava ≥ o < all'1%, rispettivamente.

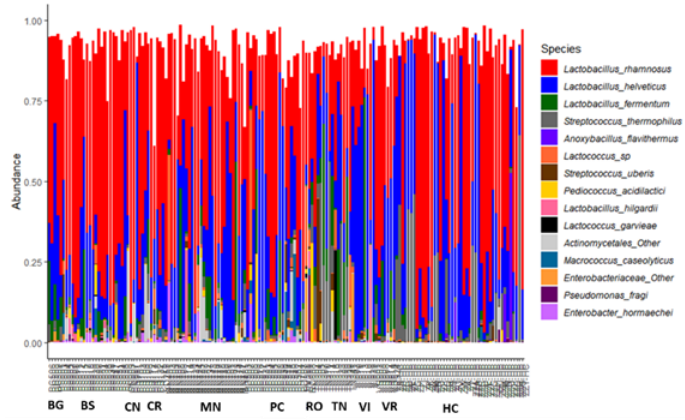


Figura 5 - Abbondanza relativa media delle prime 15 specie microbiche dominanti (≥ 1 %) presenti nel Grana Padano in funzione alla provincia di produzione e dei formaggi duri similari.

Come evidenziato in Figura 5, i campioni di Grana Padano presentano un'elevata biodiversità microbica e le specie maggiormente rappresentate in tutti i campioni sono *L. rhamnosus*, *L. helveticus* e *L. fermentum* (rispettivamente in rosso, blu e verde). Sebbene le specie microbiche maggiormente dominanti siano riscontrabili in tutte le province studiate, le province di Trento e Rovigo si discostano da tale trend, presentando una propria e tipica distribuzione quantitativa microbica. Da rilevare, le stesse specie dominanti in Grana Padano si ritrovano anche nei formaggi duri similari.
Per studiare la biodiversità microbica totale presente nei campioni Grana Padano e formaggi duri sono stati utilizzati anche due indici microbici (Richness e Shannon Diversity) che tengono conto del numero di specie presenti e della loro diversità (Figura 6). É emersa una differenza significativa in termine di Shannon diversity relativa alla diversa tipologia di prodotto (Grana Padano vs formaggi duri), che indica una biodiversità microbica maggiore nei campioni di Grana Padano. Al contrario, non è emersa nessuna differenza significativa riguardante la diversità microbica mediante l'indice di Shannon.

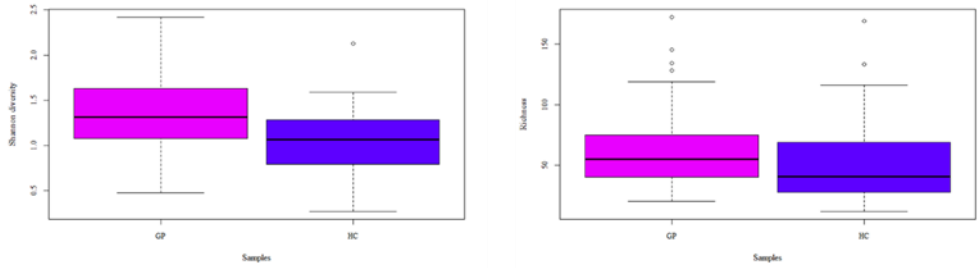


Figura 6 – Indici microbici: Shannon Diversity (a) e Richness (b) applicati alla comunità microbica presente nei Grana padano e nei formaggi duri similari (Hard Cheese, HC).

Conclusioni

Il lavoro svolto ha permesso di evidenziare un'elevata biodiversità all'interno dei campioni di formaggio di Grana Padano e di formaggi duri, e allo stesso tempo una tendenza a formare gruppi collegati alla provenienza geografica (province/regione). Dall'analisi dei dati di fingerprinting si è evidenziata la presenza di alcuni genotipi particolari che potrebbero permettere una distinzione dei campioni di Grana Padano rispetto ai formaggi duri similari. Anche l'analisi metagenomica ha rilevato la presenza di alcune specie microbiche fra quelle dominanti e/o secondarie, che potrebbero rivelarsi una possibile fonte di discriminazione fra Grana Padano e formaggi duri similari. I due approcci molecolari utilizzati per questo lavoro forniscono due informazioni differenti: l'analisi RAPD-fingerprinting consente una valutazione della diversità genotipica a livello di comunità microbica totale all'interno del campione, mentre con l'analisi metagenomica si ha un'informazione a livello di presenza e abbondanza relativa delle specie microbiche, con un'informazione di tipo tassonomico/filogenetico. Per comprendere quanto e come i dati di fingerprinting e di metagenomica possano arrivare a consentire una distinzione fra formaggi Grana Padano e formaggi duri similari sono necessarie ulteriori elaborazioni statistiche. A tale riguardo è in corso l'elaborazione di un modello matematico predittivo che, se validato, sarà oggetto di pubblicazione su riviste specializzate del settore

WP2 – UO Istituto Spallanzani

Nell'ambito del progetto NEWTECH, l'UO Istituto Spallanzani (IS) è stata coinvolta, in collaborazione con CREA_ZA, nella WP2 "Approcci innovativi per la lotta alla contraffazione nelle produzioni Dop del settore caseario (Grana Padano)". La WP2 era articolata in 3 distinte attività:

1. Allestimento banca lattiero-casearia
2. Studio di protocolli analitici per analisi polimorfismi componente vegetale e biodiversità microbica
3. Mappatura dell'areale di produzione ed elaborazione statistica dei dati

Attività 1

Per quanto concerne l'attività 1 è stato completato l'allestimento della Biobanca latte e formaggio: la raccolta dei campioni di latte ha riguardato 136 caseifici della zona di produzione del Grana Padano DOP; attività iniziata ad ottobre 2017 e terminata ad ottobre 2018 con una media mensile di 130 campioni. Tutti i campioni pervenuti in Istituto sono stati codificati e memorizzati in un apposito database per la gestione della biobanca. Lo sviluppo di un metodo affidabile per l'isolamento del DNA vegetale dalla matrice latte è risultato uno step critico fondamentale e ha richiesto accorgimenti particolari in quanto non esistono, in commercio, kit specifici per il target oggetto della nostra ricerca. Pertanto, è stata svolta un'accurata attività di confronto fra differenti protocolli manuali proposti in letteratura (Poms et al 2001; Ponzoni et al. 2009) e 3 kit commerciali, che sono rivelati inadeguati per l'estrazione di DNA vegetale da utilizzare per l'analisi metagenomica in quanto, hanno dato rese estrattive più basse e non sufficienti per i successivi step analitici. Pertanto, il protocollo estrattivo identificato come ottimale è stato quello riportato da Ponzoni et al. 2009 ed opportunamente modificato.
Il kit DNA Plant mini Kit, (Qiagen) è stato utilizzato per estrazione di DNA da campioni di soia e di mais da utilizzare come controlli positivi.
Completata la messa a punto e validazione del metodo estrattivo, si è proceduto ad estrarre il DNA dai campioni di latte con conseguente allestimento della Biobanca, in cui sono state stoccate anche aliquote del campione di latte al fine avere a disposizione la matrice di partenza per eventuali applicazioni future.
La Biobanca prevedeva anche la presenza di DNA batterico estratto da formaggio. 786 campioni di formaggio sono stati raccolti da CREA_ZA, pretrattati e inviati a IS che ha estratto il DNA batterico utilizzando il kit commerciale One For All Vet (Qiagen) che consente di purificare gli acidi nucleici da virus e da batteri a partire da diverse matrici veterinarie mediante la tecnologia di MagAttract, adattabile a sistemi semi automatizzati come il Biosprint 96 (Qiagen) di cui IS è dotato. La Biobanca è conservata in appositi congelatori (Figura 1).

Figura 1. Biobanca dei campioni di latte, DNA da latte e DNA batterico da formaggio

Attività 2

Essendo l'obiettivo di tale studio la caratterizzazione dell'origine geografica del latte attraverso differenze nella componente vegetale, il target specifico indagato tramite metabarcoding è stato il gene *rbcL* del cloroplasto, che codifica per la subunità maggiore dell'enzima ribulosio-1,5- difosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO) ed è un gene altamente conservato all'interno della stessa specie ma allo stesso tempo molto polimorfico, quindi molto variabile tra specie diverse. Tra tutti i 1570 campioni raccolti, per l'analisi in metabarcoding sono stati scelti quelli che erano il più possibile rappresentativi dell'areale di produzione. I campioni identificati provenivano da 13 caseifici distribuiti nelle 4 Regioni (10% dei totali), Piemonte, Lombardia, Emilia-Romagna e Veneto e nelle Province di Cuneo, Brescia, Piacenza, Trento, Verona e Vicenza; per ciascuno dei caseifici sono stati testati 3 campioni sulla base della stagionalità per un totale di 39. A questi sono stati aggiunti dei campioni controllo di latte provenienti da zone completamente esterne all' areale (Napoli, Sicilia, Puglia e latte di montagna- Val di Scalve- Bergamo) e campioni di controllo di cui fosse nota la componente vegetale (soia e due mangimi ammessi dal Disciplinare di produzione del Grana Padano Dop). In totale sono stati destinati al metabarcoding 50 campioni (39 campioni estratti dal latte e 11 controlli), analizzati con un sistema di Next Generation Sequencing (NGS) e metabarcoding che prevedono il sequenziamento mirato per porzioni specifiche (target) di piccole dimensioni al fine di ottenere informazioni tassonomiche sulle specie rilevate.
Data l'origine del DNA vegetale presente nel latte e a causa del passaggio attraverso l'apparato gastrointestinale per raggiungere il sangue, il DNA vegetale circolante può essere fortemente degradato e frammentato, quindi è stato sviluppato un protocollo per la verifica della sua presenza nel DNA totale estratto sui campioni da inviare per il metabarcoding. Il saggio testato ha previsto l'utilizzo dei primer specifici per il gene RuBisCo (rbcL) del cloroplasto sia del Mais che della Soia. La sequenza è stata ricavata dalla bibliografia e verificata tramite BLAST (National Center Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov). Nella Tabella 1 seguente sono riportate le specifiche dei primers utilizzati.

Primer	Sequenza 5'-3'	Gene Target	Amplicone	Bibliografia
RUB F2	TTGGCAGCATTCCGAGTAAC	Maize/soy rubisco	351	Phipps et al. 2003
RUB R2	GTGAGGCGGACCTTGGAAAG			

Tabella 1. Primer per il Gene Rubisco (*rbcL*) del Cloroplasto

I campioni amplificati sono stati verificati tramite corsa elettroforetica su Bioanalyzer (Agilent Tech.), per accertare che le dimensioni dell'amplicone fossero quelle attese e successivamente verificati tramite sequenziamento diretto. Tutti i campioni di DNA sono stati quindi processati nei laboratori dell'IGA Technology Services di Udine, che si avvale di strategie innovative e di tecnologie di sequenziamento avanzato per tracciare l'origine degli alimenti. Le librerie sono state preparate utilizzando i seguenti primer specifici per la regione rbcl variabile del gene RuBisCO: *rbcL* F 5'- ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' and rbcL R 5'- GTAAAATCAAGTCCACCRCG -3' e sono state poi sequenziate sullo strumento MiSeq (Illumina, San Diego,CA) utilizzando la modalità 300-bp paired-end.
Il sequenziamento della regione target nel DNA vegetale, ha prodotto un alto numero di sequenze nucleotidiche per ciascun campione per le quali l'analisi bioinformatica ha permesso di definire le eventuali differenze genetiche, ma soprattutto di identificare le specie vegetali presenti nella matrice latte e di produrre quindi una classificazione tassonomica come riportato a titolo esemplificativo nelle figure 2 e 3. Nel dettaglio, nella fig. 3 è rappresentata la classificazione tassonomica e le abbondanze relative riferite al DNA estratto dal campione controllo soia, dopo l'analisi in metabarcoding (KRONA, strumento web di visualizzazione metagenomica che permette una esplorazione delle abbondanze relative).

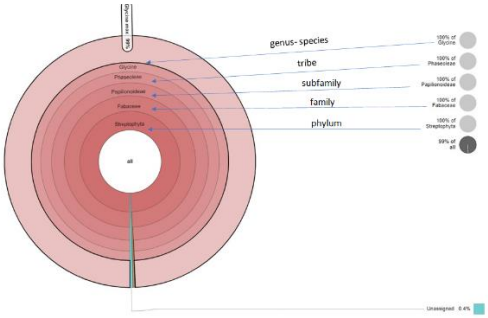


Figura 2. KRONA del campione soia

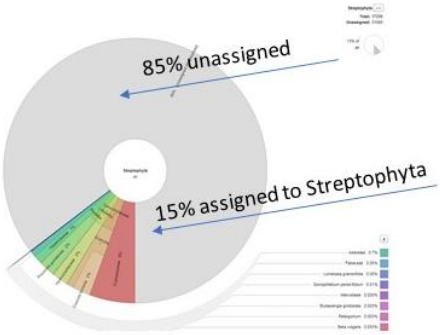


Figura 3. KRONA di un campione di latte indagato

Attività 3

Il punto di partenza per l'analisi bioinformatica è stato il dataset di numerosità di unità tassonomiche (OTU - operational taxonomic unit), prodotto da IGA e riportante, per ciascuno dei campioni analizzati, la numerosità di frammenti di DNA (reads) riferibili a distinti organismi. L'analisi si è concentrata sul DNA vegetale e ha quindi utilizzato, come riferimento, un database contenente le sequenze nucleotidiche di 181 mila specie vegetali (NCBI website). Quando il DNA ritrovato nei campioni di latte non trovava corrispondenza con nessun elemento del database vegetale, la OTU è stata classificata come non identificata. Indagando le sequenze che non trovavano riscontro nel database vegetale con il database bovino (NCBI website) si è potuto definire che il 63.4% del DNA estratto è bovino, e quindi, come atteso, derivante dagli animali che hanno prodotto il latte. Per compensare la natura intrinsecamente frammentaria delle informazioni ottenute sono stati applicati dei filtri aggiuntivi che eliminassero i dati con un basso livello di affidabilità. A tal fine tutte le OTU con numerosità minore di cinque reads sono state scartate.

Per quanto riguarda la componente vegetale, a livello di Phylum tutte le reads sono risultate essere *Streptophyta*, solo un campione non è risultato classificabile e quindi è stato eliminato dalle successive analisi. Una prima analisi dei dati è stata effettuata utilizzando la metrica di "richness di Shannon-Wiener", che misura il numero delle diverse specie contenute in ogni campione. Nell'areale di produzione del Grana Padano DOP l'indice di richness è maggiore rispetto ai campioni extra areale (Figura 4).

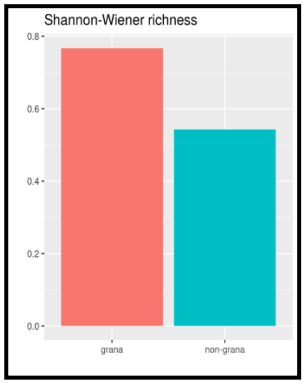


Figura 4. Confronto a livello tassonomico di specie tra campioni "grana" e "non grana" per l'indice di richness.

Per ciascun campione l'indagine successiva ha riguardato le abbondanze relative a livello di famiglia, genere e specie ed ha portato a generare le, rappresentazioni grafiche dei dati che utilizzano le intensità di colore per raffigurare differenti valori (heatmaps); in orizzontale sono riportate le famiglie/genere/specie ed in verticale l'identificativo dei campioni (Figure 5, 6 e 7).

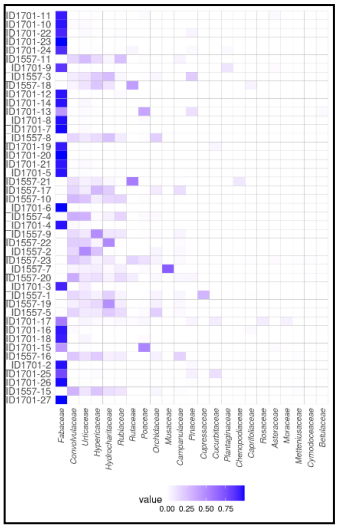


Figura 5. Heatmap a livello tassonomico di famiglia: abbondanza delle famiglie in ciascuno dei campioni analizzati, alla maggior intensità di colore corrisponde una maggior abbondanza

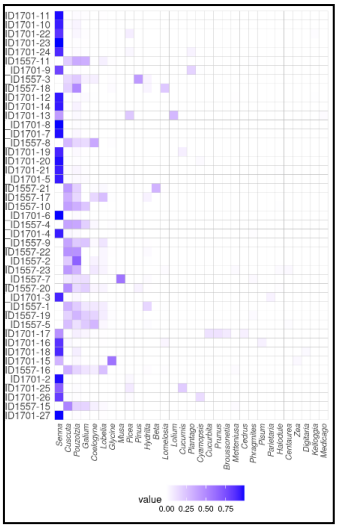


Figura 6. Heatmap a livello tassonomico di genere: abbondanza dei generi in ciascuno dei campioni analizzati, alla maggior intensità di colore corrisponde una maggior abbondanza

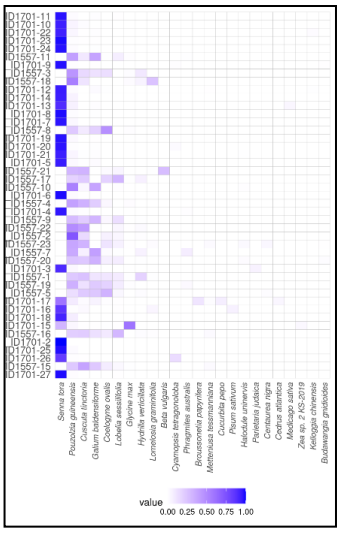


Figura 7. Heatmap a livello tassonomico di specie: abbondanza delle specie in ciascuno dei campioni analizzati, alla maggior intensità di colore corrisponde una maggior abbondanza

Per poter procedere con le analisi dei dati ogni campione è stato quindi considerato come un ecosistema isolato, in questo modo è stato possibile utilizzare alcuni strumenti statistici sviluppati in ambito ecologico: diversità alfa e beta. La diversità alfa, che misura la ricchezza biologica all'interno di ogni singolo campione e si basa sull'abbondanza relativa di OTU, può essere valutata utilizzando due fra i più comuni coefficienti statistici: indice di Shannon e indice di Simpson. Nella Figura 8, sono messi a confronto i due indici per i campioni dell'areale del Grana Padano DOP (grana) e i controlli (non grana).

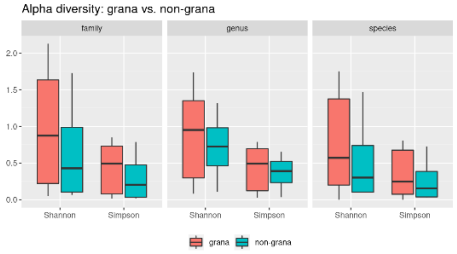


Figura 8. Alpha diversity: indici di Shannon e Simpson per i campioni "grana" e "non grana" a livello di famiglia, genere e specie

La diversità beta, come la alfa, fa uso delle informazioni sulla ricchezza biologica, ma misura la variazione tra comunità. Per questa analisi è stato utilizzato l'indice Bray-Curtis. Dato che la diversità beta confronta coppie di campioni è spesso utile visualizzare i risultati dopo averne ridotto la dimensionalità con una tecnica come il Multi Dimensional Scaling (MDS) in modo che le due dimensioni più significative siano visualizzate in due cluster, se presenti. Per le statistiche di diversità è stato utilizzato il pacchetto Vegan del software R (Oksanen et al., 2019). L'analisi ha evidenziato la presenza di due sottogruppi, trasversali alla divisione grana-non grana, di campioni con alta e bassa ricchezza di specie vegetali (Figura 9).

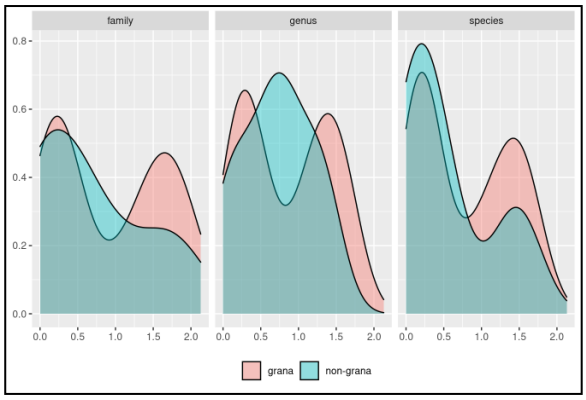


Figura 9. Distribuzione della densità alfa per l'indice di Shannon

L'analisi della diversità beta indica una netta separazione dei campioni in due cluster (Figura 10). In questo plot i campioni "grana" sono rappresentati da un punto rosso, mentre i 4 "non grana" hanno l'etichetta. I campioni di latte sono nettamente suddivisi in due cluster, a conferma dell'analisi della diversità alfa.

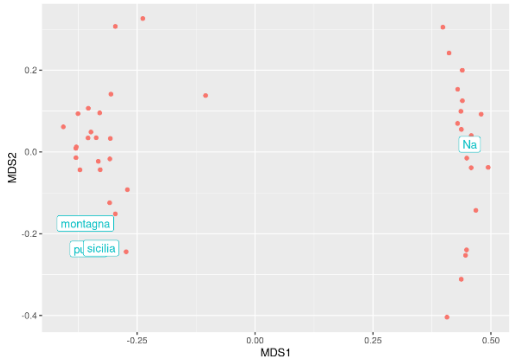


Figura 10. Plot della diversità beta

Tutte le attività della WP2 sono state condotte e portate a termine ed hanno riguardato nello specifico per l'attività 1: il campionamento e la conservazione dei campioni di latte, la messa a punto di un protocollo estrattivo del DNA vegetale circolante e la costituzione della Biobanca di DNA derivato dal latte e dal formaggio. Per l'attività 2, è stata sviluppata una fase di ricerca focalizzata sull'analisi delle sequenze del gene *rbcl* al fine di caratterizzare la componente vegetale del latte dei caseifici selezionati e contestualmente di differenziare il latte destinato alla produzione del Grana DOP da quello non proveniente dall'area di produzione. I risultati ottenuti hanno permesso di caratterizzare la componente vegetale di ciascun campione di latte, che ha manifestato un'alta variabilità fra i campioni "grana" rispetto a quelli "non grana", differenza che potrebbe essere ricondotta ad un'alimentazione più variegata degli animali che producono il latte destinato alla produzione del Grana Padano DOP. Per l'attività 3, l'analisi statistica ha evidenziato differenze tra i campioni "grana" e "non grana" non riconducibili alla provincia d'origine. Infatti, lo studio delle diversità beta pur generando due cluster ben distinti, ha evidenziato come in alcuni casi il latte appartenente alla stessa provincia non si collocasse solo in uno dei cluster, ma in entrambi. Non è ancora stato possibile trovare una risposta esauriente che spieghi il verificarsi di questa condizione anche se è ipotizzabile che differenze nella razione alimentare all'interno dell'areale possa averne influenzato il contenuto in specie vegetali. Al fine di aggiungere informazioni sull'origine geografica del latte destinato alla produzione del Grana Padano DOP i risultati ottenuti sono incoraggianti e rappresentano un punto di partenza sia per lo sviluppo di nuovi approcci molecolari che per l'implementazione di quelli già esistenti

WP3 - Uso di latte in polvere e proteine concentrate in caseificazione, valutazione qualitativa del prodotto finito e sviluppo spettrometria NIR in formaggi

UO - CREA-ZA Lodi

Attività 1 – Aggiunta di latte in polvere e proteine concentrate del latte e impatto sulla qualità dei formaggi freschi

La prima parte del progetto è stata dedicata al reperimento di campioni di latte in polvere da analizzare per verificare le potenzialità d'uso in processi di caseificazione. Sono stati acquisiti sul mercato italiano 9 diversi campioni di latte in polvere scremato spray. La composizione centesimale (umidità, proteine, lattosio, ceneri e grasso) ha confermato i valori tipici dei latti in polvere spray. Sui campioni ricostituiti è stato valutato: l'indice di insolubilità, l'attitudine alla coagulazione, l'acidità titolabile, la conducibilità elettrica e il pH. I valori di pH dei latti in polvere (pH 6.5-6.6), ricostituiti in acqua per avere una composizione target comune in proteine del 3.4%, sono risultati inferiori di quelli del latte fresco, fenomeno comune nei latti in polvere spray, a causa di una certa proliferazione dei microorganismi termoresistenti durante la fase di concentrazione del latte. I valori di acidità, influenzati anche dal contenuto proteico, sono risultati simili a quelli del latte fresco. I valori di conducibilità non hanno mostrato differenze particolari tra i campioni. Anche l'indice di solubilità (IS) ha mostrato differenze minime tra i campioni (0.2-0.5), comunque in linea con i valori noti in letteratura (0.1-0.45). É da sottolineare che perdite anche minime per mancata solubilizzazione (che ammontano al 2-4% della polvere pesata) potrebbero incidere sulle rese di caseificazione.
L'attitudine alla coagulazione dei latti ricostituiti ha evidenziato differenze estremamente significative tra i campioni analizzati. In prove parallele, le polveri ricostituite sono state addizionate con $CaCl_2$ (coadiuvante tecnologico) consentendo di incrementare la velocità di coagulazione e migliorare la consistenza del coagulo. Con il latte in polvere che mostrava una buona attitudine alla coagulazione sono state quindi realizzate su scala di laboratorio mini-caseificazioni a formaggio Crescenza aventi lo scopo di simulare la tecnologia di produzione di tale prodotto e confrontare le differenze quanti-qualitative tra formaggi ottenuti da latte fresco e da latte ricostituito avente composizione simile. In collaborazione con UNIPR è stato approntato un sistema di pastorizzazione di laboratorio che ha consentito di ottenere un trattamento termico del latte equivalente a quello di una pastorizzazione a 73°C per 20". Sono state realizzate caseificazioni utilizzando latte in polvere ricostituito (latte ricombinato, LR), sia tal quale (LR 100%) che in varie miscele costituite da LR + latte fresco (LR 60%, LR 40%) rispetto a Crescenze ottenute da solo latte fresco (LF) usato come controllo. Composizione media in umidità, grasso e proteine e rese dei formaggi sono riportati in Tab. 1. La resa corretta viene normalizzata rispetto a valori standard in grasso e proteine del latte e contemporaneamente al contenuto in umidità del formaggio, annullando gli effetti sulla resa dovuti alla diversa umidità finale del prodotto.
L'umidità dei formaggi ottenuti da latte ricostituito è risultata in genere più elevata di quella dei formaggi controllo ottenuti da latte fresco. L'incremento di umidità è risultato correlato linearmente con la percentuale di latte in polvere nella miscela ed è conseguenza della maggiore inclusione di sieroproteine denaturate nel reticolo caseinico, cui ha fatto riscontro un minor contenuto di grassi e un rapporto grassi/residuo secco inferiore imputabile probabilmente a una minore capacità del coagulo da latte ricostituito a trattenere la frazione grassa del latte. I due effetti si compensano e spiegano perché le differenze di resa corretta fra formaggi ottenuti da miscele di latte ricostituito e controlli non siano risultate statisticamente significative, ad eccezione della resa tal quale in LR 100%, che risente evidentemente dell'elevato contenuto di umidità.

Tabella 1 – Composizione media (%) in umidità, grasso e proteine, resa tal quale e resa corretta dei formaggi ottenuti dai diversi tipi di latte ricombinato rispetto al controllo da latte fresco.

	Umidità (%)	Grasso (%)	Proteine (%)	Resa (%)	Resa corretta (%)
LR 100%	61.27	19.50	14.30	18.54*	17.06
dev. st.	(1.86)	(1.24)	(0.72)	(0.70)	(0.71)
LR 60%	60.31*	20.05*	15.06	17.63	17.37
dev. st.	(0.95)	(0.33)	(0.44)	(1.30)	(0.59)
LR 40%	59.86	20.60	14.84	18.05	17.68
dev. st.	(1.88)	(1.21)	(0.84)	(1.65)	(0.40)
LF	58.13	22.37	15.29	17.09	17.32
dev. st.	(1.88)	(1.05)	(0.91)	(0.83)	(0.21)

Sono stati effettuati test sensoriali discriminativi (Triangolare) di riconoscimento da un gruppo di 20-30 assaggiatori che hanno sempre rilevato differenze statisticamente significative fra tutte le crescenze ottenute da LR rispetto ai formaggi controllo. In una fase di ottimizzazione successiva, il latte LR 40% addizionato di $CaCl_2$ (3.88 g/100 L) e adattando la fase di taglio del coagulo ha consentito di produrre crescenze paragonabili al controllo sia da un punto di vista compositivo che a livello sensoriale.
Dai test condotti in laboratorio è stato fatto uno scale-up presso il caseificio pilota del CREA-ZA di Lodi, testando l'opzione rivelatasi più interessante o tecnicamente percorribile, ovvero il confronto tra latte ricombinato al 40% (LR 40%) rispetto a latte fresco (LF) aventi stessa composizione in grasso e proteine, per la produzione di due tipologie di formaggi molli: crescenza e mozzarella. Le prove sono state eseguite in tre repliche indipendenti per ciascuna tipologia di prodotto, con i relativi controlli.

Produzione Crescenze

Per quanto concerne la produzione di crescenze (Fig. 1), al latte in vasca è stato aggiunto GDL per standardizzare il pH alla coagulazione con il caglio (pH 6,48) e $CaCl_2$ in LR 40% come coadiuvante tecnologico (per evitare ritardi nel tempo di presa (rilevazione della coagulazione). Crema di latte è stata aggiunta al LR (ricavata dallo stesso LF utilizzato come controllo) in modo tale da avere la medesima composizione quali-quantitativa del grasso.

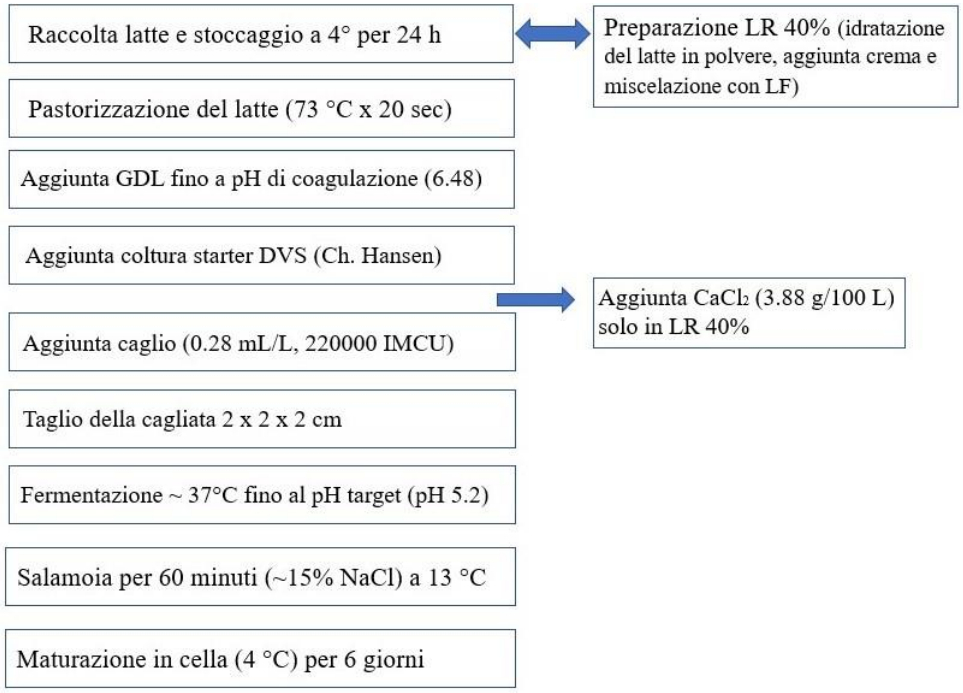


Figura 1. Diagramma di produzione di Crescenza seguito presso l'impianto pilota del CREA-ZA di Lodi

Dopo l'aggiunta del caglio, operando alle stesse alle stesse condizioni di pH e temperatura, il tempo di presa per LR 40% è stato di 10,09 ± 0,55 min, molto simile a quello rilevato per il LF (9,87± 0,47 min), confermando quanto riprodotto su scala di laboratorio. Tempi di lavorazione e parametri acidimetrici (pH e acidità titolabile), molto simili fra loro, hanno indicato che la fermentazione non è stata influenzata dalla materia prima. I parametri tecnologici monitorati, ovvero i tempi di lavorazione per ogni fase di processo e i corrispondenti valori di pH, temperatura e acidità titolabile hanno confermato un andamento simile tra le due tesi (Tab. 2).

Tabella 2. Parametri tecnologici rilevati per ciascuna fase di processo: tempo (min), pH, temperatura (°C) e acidità titolabile (°SH/50).

	LF				LR 40%			
fase	**Tempo (min)**	**pH**	**°C**	**°SH/50**	**Tempo (min)**	**pH**	**°C**	**°SH/50**
latte vasca	0,0	6,59	38,8	3,4	0,0	6,62	38,7	3,4
Aggiunta GDL	6,3	6,59	39,0		10,8	6,61	38,6	
Aggiunta fermenti	26,3	6,52	39,3	4,0	29,0	6,53	38,8	3,9
Aggiunta caglio	56,3	6,48	38,3	3,9	59,3	6,48	38,5	4,0
Presa	66,3	6,49	38,0		69,5	6,48	38,1	
Taglio	71,3	6,46	36,9		74,8	6,46	38,2	
Inizio scarico	114,5				121,3			
Fine scarico	119,0				127,0			
Camera calda	126,8	6,46	36,2	2,4	132,3	6,44	36,6	2,4
1 Rivoltamento	147,5	6,41	36,1	2,5	147,5	6,40	36,6	2,5
2 Rivoltamento	200,0	6,21	35,9	2,7	200,5	6,05	36,3	3,3
3 Rivoltamento	251,3	5,57	36,1	4,9	251,3	5,50	36,2	5,2
4 Rivoltamento	297,5	5,22	35,8	8,6	295,5	5,22	35,8	8,6
Inizio salamoia	303,3	5,22	35,5		311,8	5,19	35,6	
Fine salamoia	364,3	5,16	23,2		371,8	5,12	25,0	
Ingresso cella 4°C	375,5	5,13	21,0		379,3	5,10	24,4	

La cagliata è stata monitorata durante tutti i rivoltamenti effettuati insieme all'acidità del siero drenato. L'evoluzione della sineresi (% di siero drenato dalla cagliata rispetto al latte iniziale) durante la lavorazione ha mostrato un andamento simile e alla fine del processo, il siero drenato dalla cagliata LR 40% è stato lievemente, ma non significativamente, maggiore di quello drenato con LF (Tab. 3), senza quindi evidenziare difficoltà nella contrazione del coagulo, come rilevato dalle prove di laboratorio. La fase di fermentazione in camera calda è stata estesa fino ad un valore target di pH 5.2, che è stato raggiunto dopo circa 4,5 ore per entrambe le tesi. Le Crescenze sono state immerse in salamoia (15% NaCl, 13°C) per 60 min, consentendo anche un parziale raffreddamento delle forme, e poi conservate a 4 °C per sei giorni (maturazione del formaggio). Al termine, i formaggi sono stati confezionati singolarmente in atmosfera protettiva (80% N2 e 20% CO_2). Dal confezionamento, inizio della vita commerciale (T0), i prodotti che sono stati monitorati per due settimane di shelf-life (T7 e T14). Sul latte in trasformazione e sulle Crescenze al T0 è stata eseguita un'analisi del colore mediante colorimetro (Minolta mod. CR300) espressa come indice di giallo (Yellow index). I valori registrati dallo strumento hanno mostrato un indice di giallo significativamente superiore per LR 40% (valori maggiori dell'indice indicano un colore tendente più al giallo) rispetto a LF (Tab. 4).

Tabella 3. Evoluzione della sineresi durante le principali fasi del processo.

Fase di processo	**siero drenato da LF (%)**	**dev.st.**	**siero drenato da LR 40% (%)**	**dev.st.**
Scarico cagliata	52,21	2,30	53,09	5,97
1 Rivoltamento	6,33	1,84	6,89	1,21
2 Rivoltamento	7,65	0,52	8,10	1,61
3 Rivoltamento	6,85	1,37	6,27	1,41
4 Rivoltamento	3,71	0,78	3,48	1,89
Tot lavorazione	76,75	2,32	77,68	3,16

Si può dunque assumere che il latte in polvere ricostituito (privo della frazione grassa, che quindi non può incidere sul risultato) utilizzato in questo studio sia risultato più giallo del latte fresco, probabilmente a causa di tracce di prodotti della reazione di Maillard derivanti dal processo di essiccamento. I formaggi ottenuti con LR 40% hanno mantenuto un indice di giallo leggermente più elevato, una differenza probabilmente difficile da percepire alla vista, che è risultata statisticamente significativa.

Tabella 4. Indice di giallo calcolato sul latte in vasca e sui formaggi a maturazione commerciale.

	Latte in vasca		Crescenza T0	
	LF	**LR 40%**	**LF**	**LR 40%**
Indice di giallo	**4.08**	**4.89**	**18,22**	**18,98**
dev. st.	0.99	1.33	1,29	0,72
significatività		*		*

La resa casearia delle Crescenze ottenute con LR 40%, valutata al T0, è risultata 17.46 ± 1.07 %, di poco inferiore alla resa ottenuta dalle Crescenze fatte con LF, 17.83 ± 0.95 %, sebbene la differenza non sia significativa. Anche relativamente alla composizione dei formaggi al T0 sono osservabili lievi differenze ma non statisticamente significative (Tab. 5).

Tabella 5. Composizione chimica delle crescenze al T0

	Umidità %	**Grassi %**	**Proteine %**	**Ceneri %**
LF	**61.89**	**19.72**	**14.24**	**2.00**
dev. st.	2.15	0.67	0.80	0.21
LR 40%	**59.79**	**20.38**	**15.04**	**2.07**
dev. st.	1.51	0.79	0.94	0.22

Analisi dei formaggi durante la shelf-life

Le crescenze sono state monitorate all'inizio (T0), dopo 7 (T7) e 14 (T14) gg di shelf life. Ad ogni tempo sono state condotte analisi microbiologiche, chimiche e reologiche. Dai tempi di fermentazione registrati durante il processo (4.52 ± 0.26 ore per LF e 4.44 ± 0.18 per LR 40%) è possibile ipotizzare una equivalente crescita della coltura starter nei due tipi di latte. A conferma di questa ipotesi, è stata effettuata la quantificazione dei batteri dello starter, composto da ceppi di *Streptococcus thermophilus* (Fig. 2). Al T0 è stata rilevata una carica di poco superiore al miliardo di cellule per grammo (> 10^9 UFC/g) sia nelle crescenze LF che in quelle LR 40%, confermando una crescita adeguata dello starter. Si è osservata una buona vitalità anche durante la conservazione refrigerata: infatti, la conta dei fermenti lattici vivi dopo 14 gg ha subito una riduzione di un solo ordine di grandezza in entrambi i formaggi. L'andamento del pH ha mostrato un lieve calo durante i 60 min di salatura, durante i quali l'assorbimento di sale e il raffreddamento delle forme non hanno immediatamente arrestato la fermentazione della cagliata. Durante la shelf-life, si è evidenziato un ulteriore lieve abbassamento di pH in LF, un po' più marcato in LR 40% al T14 (Fig. 3).

Figura 2. Conta batterica dei fermenti vivi (UFC/g).

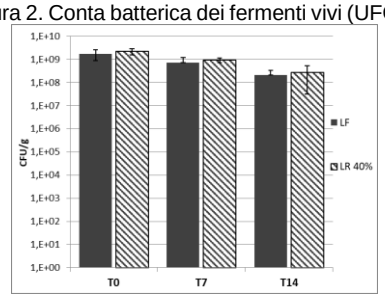
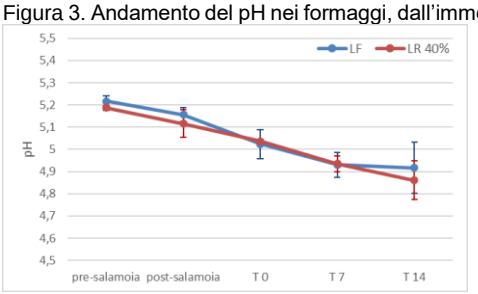


Figura 3. Andamento del pH nei formaggi, dall'immersione in salamoia fino a T14.



L'andamento del pH può anche essere spiegato dal monitoraggio degli acidi organici e zuccheri presenti nel formaggio, osservando un aumento di acido lattico da T0 a T14, in particolare per le crescenze da LR 40% (Tab. 6). L'incremento di acido lattico corrisponde ad un decremento di lattosio nei formaggi, confermando il verificarsi di fenomeni di post-acidificazione, sebbene di lieve entità. Il contenuto di lattosio è apparso comunque moderato, < 1%, per una categoria di formaggio molle a maturazione rapida come la Crescenza, mentre il galattosio residuo non ha subito modifiche durante la shelf-life. In tutti i formaggi sono state rilevate solo tracce di altri zuccheri (glucosio < 0.07%) ma non di altri acidi organici come l'acido acetico.

Tabella 6. Analisi di acidi organici e zuccheri nei formaggi durante la shelf-life (dati espressi in g/100 g)

	T0			**T7**			**T14**		
	Lattosio	Galattosio	ac. Lattico	Lattosio	Galattosio	ac. Lattico	Lattosio	Galattosio	ac. Lattico
LF	**0,71**	**1,05**	**1,11**	**0,54**	**1,06**	**1,20**	**0,48**	**1,06**	**1,20**
dev. st.	0,25	0,05	0,10	0,14	0,01	0,02	0,21	0,07	0,11
LR 40%	**0,64**	**1,07**	**1,15**	**0,49**	**1,09**	**1,24**	**0,42**	**1,09**	**1,27**
dev. st.	0,21	0,04	0,11	0,10	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02

Il contenuto di umidità dei formaggi durante i 60 minuti di immersione in salamoia non ha mostrato variazioni sostanziali, sebbene le Crescenze ottenute dal LF siano risultate più umide rispetto a quelle ottenute da LR 40%, diversamente da quanto ottenuto in laboratorio (Fig. 4), segno che il dato sull'umidità sia anche

influenzato dalla tecnologia. Peraltro, durante la fase di maturazione commerciale, ovvero il breve periodo (6 giorni) di assestamento strutturale del formaggio che precede l'inizio della shelf-life, le Crescenze da LR 40% hanno manifestato una perdita di siero leggermente superiore, accentuando ulteriormente la differenza nel contenuto di umidità rispetto ai formaggi da LF, che viene poi mantenuta durante tutta la shelf-life e che solo al termine diventa, anche statisticamente significativa.

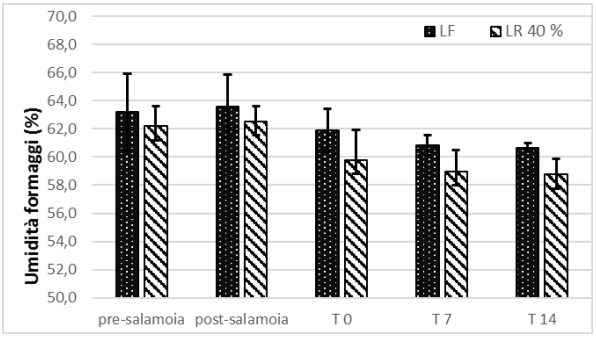


Figura 4. Andamento dell'umidità delle Crescenze dall'immersione in salamoia fino a T14.

Dopo confezionamento, i fenomeni di sineresi sono stati ridotti, specialmente per le crescenze da LR 40%. Infatti, nei prodotti confezionati è stata determinata anche la capacità di trattenere fisicamente l'acqua dei formaggi, valutata come % di siero esprimibile fino a 14 giorni di conservazione (Tab. 7). Dalla tabella si osserva una capacità di ritenzione fisica dell'acqua notevolmente maggiore da parte delle Crescenze LR 40% rispetto a quelle ottenute da LF, anche probabilmente in ragione del minore contenuto di acqua del campione. La maggiore capacità di trattenimento dell'acqua di LR potrebbe inoltre essere dovuta ad una quota di proteine del siero di latte denaturate dovute al trattamento di essicamento del latte in polvere, che potrebbero aumentare la "water holding capacity" del formaggio.

Tabella 7. Siero esprimibile % dei formaggi durante la shelf-life

	Siero esprimibile (%)		
	T0	**T7**	**T14**
LF	**24.49**	**16.38**	**12.38**
dev. St.	(5.57)	(3.21)	(10.83)
LR 40%	**15.96**	**7.41**	**1.74**
dev. St.	(4.34)	(1.58)	(2.68)

La proteolisi è stata determinata mediante elettroforesi capillare zonale (CZE) che ha consentito di separare efficacemente le frazioni caseiniche maggiori (as2, as1 e b-caseina) e i prodotti di degradazione: para-k caseina, g-caseine e as1-I caseina. L'analisi ha rivelato dei tratti distintivi in grado di differenziare efficacemente i formaggi prodotti con LF da quelli prodotti con LR 40%. In figura 5 è infatti possibile osservare che nei formaggi prodotti con latte fresco i picchi si presentano ben definiti e "affilati", mentre nei prodotti contenenti latte in polvere alcune frazioni caseiniche, in particolare as1 e b-caseina, mostrano dei picchi secondari, di mobilità inferiore che figurano come delle spalle dei picchi principali.

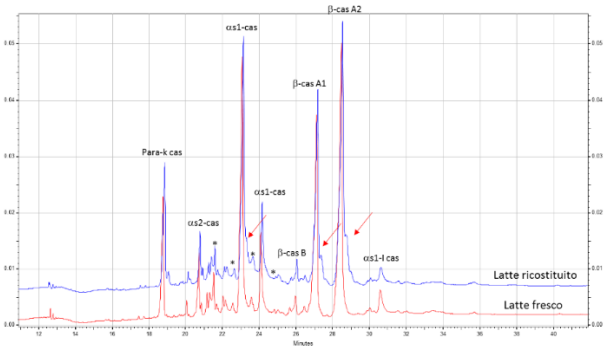
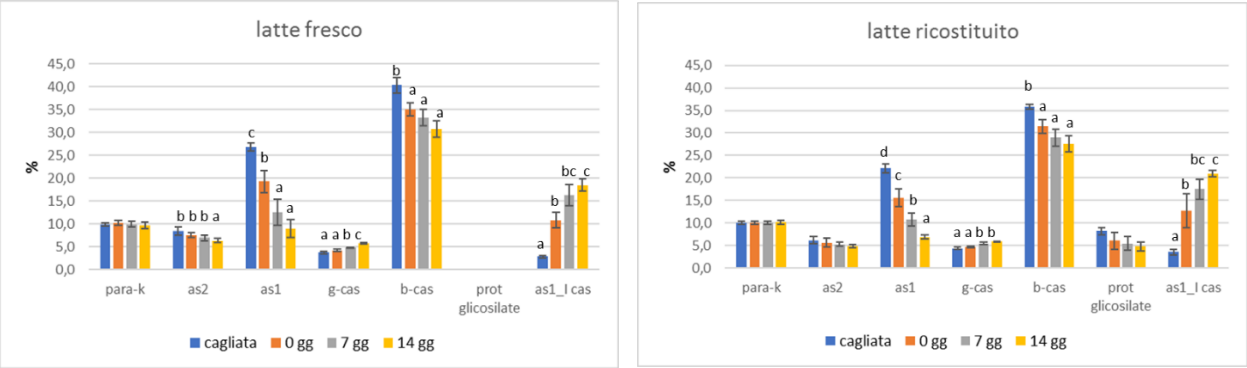


Figura 5: Tracciati elettroforetici di cagliate prodotte con latte fresco e con il 40% di latte ricostituito. Le frecce rosse indicano l'αs1 e la β-caseina glicosilate, mentre gli asterischi identificano le γ-caseine.

Questi nuovi picchi sono il risultato della glicosilazione delle caseine che si verifica nel corso del processo di essiccamento del latte in polvere: durante il processo di riscaldamento e in condizioni di neutralità, come accade alla β-lattoglobulina, il lattosio reagisce con i residui di lisina dell'as1 e della b-caseina avviando la reazione di Maillard. Questa reazione è responsabile di alcuni effetti negativi a livello nutrizionale, quali la minore disponibilità di amminoacidi essenziali, un aumento dell'allergenicità delle proteine modificate e la minore digeribilità enzimatica delle proteine. Analogamente, in un formaggio, la lattosilazione delle caseine può influire negativamente sull'azione degli enzimi naturalmente presenti o aggiunti al latte sulle proteine modificate e di conseguenza sul processo di maturazione. La lattosilazione ostacola soprattutto l'idrolisi da parte della plasmina, in seguito alla modificazione dei residui di lisina (siti di taglio preferenziali per questo enzima), ma anche gli amminoacidi su cui avviene la reazione di glicazione. La presenza dello zucchero crea inoltre un ingombro sterico che potrebbe ostacolare l'accessibilità per l'enzima ai siti di taglio. Questo processo non influisce invece sull'idrolisi da parte della chimosina. Per verificare l'andamento della proteolisi in Crescenze prodotte con e senza latte in polvere ricostituito, è stata calcolata la percentuale delle singole frazioni caseiniche e dei prodotti di degradazione sul totale delle proteine (Fig. 6), analizzando le cagliate e i formaggi durante la shelf-life (T0, T7 e T14).

Figura 6: Andamento delle singole frazioni caseiniche e dei prodotti di degradazione (%) sul totale delle proteine nelle Crescenze prodotte con LF e LR 40%. Per ciascun costituente, lettere diverse indicano valori statisticamente significativi (p<0.05) nel corso della shelf-life.



Nella Crescenza la degradazione proteica avviene soprattutto in seguito all'azione della chimosina sull'αs1-caseina, con formazione di αs1-I caseina. La ritenzione e l'attività della chimosina nella cagliata sono favorite dall'elevato grado di umidità del prodotto e dall'assenza di un processo di cottura. Per contro, l'attività di altri enzimi come la plasmina è ostacolata dalle caratteristiche del formaggio (pH) mentre la proteolisi secondaria, causata da peptidasi rilasciate da microrganismi presenti, ha un effetto molto limitato visto il breve periodo di maturazione (Hynes et al., 2001). Durante la maturazione e nei 14 giorni di vita commerciale, le due tesi hanno evidenziato un andamento analogo di degradazione dell'αs1-caseina e una limitata riduzione del contenuto in β-caseine con conseguente minima formazione di γ-caseina.
Sono stati inoltre confrontati i valori medi di ciascuna frazione nelle due produzioni (Tabella 8) e, a parte per l'αs2 caseina (p<0.05), non sono emerse differenze significative nell'andamento della proteolisi. Ciò può essere imputato al prevalere dell'azione della chimosina sulla plasmina nel corso della shelf-life della Crescenza, per cui la presenza del latte in polvere non ha modificato in maniera significativa il processo di maturazione. Gli effetti di questo fenomeno potrebbero variare a seconda del tipo di formaggio.

Tabella 8: Confronto delle medie (%) delle diverse frazioni caseiniche per le due tesi a confronto

	para-k cas	αs2-cas	αs1-cas+αs1-cas glicata	γ-cas	β-cas + β-cas glicata	αs1-I cas
LF	9,9 ± 0,5	7,2^{b} ± 0,9	16,0 ± 7,0	4,7 ± 0,8	34,3 ± 3,7	12,9 ± 6,0
LR 40%	10,1 ± 0,3	5,5^{a} ± 0,8	12,0 ± 5,6	5,1 ± 0,7	36,3 ± 4,2	13,7 ± 7,1

L'analisi delle componenti principali applicata ai campioni analizzati (Fig. 7) ha permesso di separare i campioni in base alla tipologia di latte utilizzato lungo la PC2 (12%), grazie alla presenza delle varianti glicate di αs1 e β-caseina. Lungo la PC1 (84%) invece, la distribuzione dei campioni ha seguito il grado di maturazione dei formaggi, rappresentato dalla degradazione dell'as1 caseina e la formazione dell'as1-I caseina.

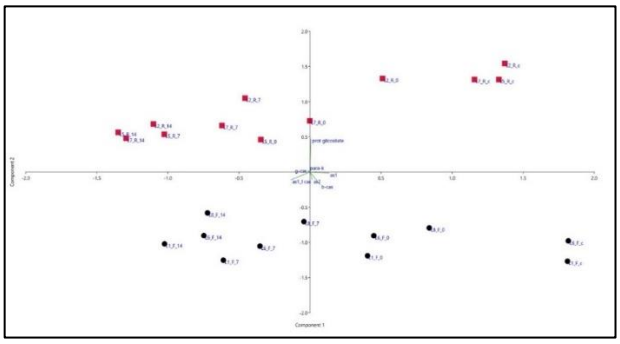


Figura 7: Analisi delle componenti principali dei campioni di Crescenza prodotti con latte fresco (●) e latte ricostituito (□).

L'analisi reologica delle Crescenza ha evidenziato una struttura tipica di un gel viscoelastico, dimostrato dalla maggiore intensità del modulo elastico G' rispetto al modulo viscoso G'' a tutte le frequenze testate nei test di "frequency sweep" ed un conseguente valore di tanδ (che è uguale al rapporto G''/G') minore di 1. I formaggi freschi a pasta molle come Crescenza, pur non presentando livelli di consistenza elevati se comparati a formaggi a media e lunga stagionatura, presentano un grado di strutturazione del network caseinico tipico dei gel viscoelastici. All'interno del network caseinico sono frapposti i globuli di grasso che, assieme all'acqua libera del sistema, da un punto di vista reologico svolgono funzione "plasticizzante". I dati reologici di questo studio (Tabella 10) sono stati elaborati applicando le leggi di potenza come riportato da Steffe (Steffe, J. F. (1996). Rheological Methods in food process engineering. Agricultural Engineering (Vol. 23). MI, USA: Freeman Press. https://doi.org/10.1016/0260-8774(94)90090-6) utilizzando le seguenti equazioni:

$G' = k'(f)^{n'}$

$G'' = k''(f)^{n''}$

dove n', n'' esprimono la dipendenza dei moduli reologici dalla frequenza di analisi e k', k'' esprimono rispettivamente il modulo elastico e viscoso a frequenza angolare di 1 rad/s. Tali equazioni permettono di descrivere il comportamento reologico del formaggio all'interno del campo di frequenze analizzate.

Dai dati riportati in tabella 9 è possibile osservare un diverso andamento durante la shelf life dei parametri reologici in funzione del diverso tipo di latte: i formaggi ottenuti da LF hanno evidenziato un aumento dei valori di n' ed n'' durante la conservazione, indice di una diminuzione del grado di strutturazione del network caseinico dei gels. Al contrario, i formaggi ottenuti da LR 40% hanno evidenziato l'andamento opposto nel corso della shelf life. Queste differenze però non sono tali da risultare statisticamente significative, in parte spiegabile dalla variabilità relativamente ampia (in termini di coefficiente di variazione %, fino al 45%) delle caratteristiche reologiche dei diversi lotti di formaggi, che rappresentano le repliche produttive dello studio.

In generale, i formaggi ottenuti da latte fresco hanno evidenziato una maggiore predominanza della componente elastica su quella viscosa, come osservabile dal parametro tanδ a 6.52 rad/s, che è risultato maggiore ai diversi tempi di shelf-life nel caso di LF rispetto a LR 40%.

Tabella 9: Parametri reologici (k', k'', n', n'', tanδ) di Crescenze ottenute da latte fresco (LF) e dalla miscela di latte ricombinato (LR 40%) durante la shelf life (T 0, T 7 e T 14).

Tesi	Shelf-life (giorni)	n'		k'		n''		k''		Tanδ (6.53 rad/s)	
LF	**T 0**	**0.1970** (0.0159)	±	**4803** (2173)	±	**0.1883** (0.0083)	±	**1646** (667)	±	**0.3393** (0.0262)	±
	T 7	**0.2018** (0.0086)	±	**4352** (1300)	**±**	**0.1908** (0.0109)	±	**1474** (385)	±	**0.3334** (0.0139)	±
	T 14	**0.2076** (0.0122)	±	**3819** (959)	±	**0.1932** (0.0095)	±	**1273** (258)	±	**0.3416** (0.0161)	±
LR 40%	**T 0**	**0.2118** (0.0069)	±	**3478** (581)	±	**0.1869** (0.0017)	±	**1254** (125)	±	**0.3423** (0.0121)	±
	T 7	**0.2045** (0.0390)	±	**4820** (3928)	±	**0.1924** (0.0279)	±	**1612** (1145)	±	**0.3387** (0.0315)	±
	T 14	**0.2031** (0.0241)	±	**4463** (1046)	±	**0.2004** (0.0283)	±	**1513** (287)	±	**0.3427** (0.0426)	±

Produzione mozzarelle

Relativamente alle prove di trasformazione a mozzarella, sono state valutate le performances tecnologiche (resa, recuperi) e le caratteristiche compositive, reologiche e di distribuzione della frazione lipidica ed acquosa

mediante risonanza magnetica nucleare (NMR) a bassa risoluzione dei formaggi sperimentali, comparandole con un formaggio di controllo ottenuto da LF. La tecnologia adottata presso l'impianto pilota del CREA-ZA di Lodi è quella tradizionale per le mozzarelle citriche, senza l'uso di fermenti lattici. I risultati ottenuti hanno di fatto confermato anche per questa tipologia di formaggio che è possibile ottenere Mozzarelle citriche con caratteristiche di composizione, sensoriali e rese di trasformazione statisticamente non differenti, e comparabili a quelle presenti nel mercato.
Le mozzarelle prodotte con LR 40%, pur mostrando una composizione similare al controllo (LF), hanno evidenziato una minor capacità di trattenere il grasso durante la filatura e differenze sono associabili principalmente a diverse "forme" dell'acqua. Le analisi reologiche e di rilassometria NMR hanno rispettivamente evidenziato una struttura caseinica maggiormente organizzata ed una maggiore quota di acqua legata fortemente alle proteine (acqua di solvatazione). Il fatto che siano state evidenziate differenze nei due casi indica che la sostituzione di parte del latte fresco con latte ricombinato incide in qualche misura sulla qualità del prodotto, anche se questo non è riconosciuto con le analisi "tradizionali".

Attività 2 – Nuovi approcci analitici della qualità del formaggio

***Applicazione e sviluppo di tecniche spettrometriche per rilevare difetti di struttura di Grana Padano*.**
La pasta del Grana Padano è caratterizzata dalla presenza di granuli che rendono la struttura irregolare, discontinua e creano la tipica composizione "a scaglie". Alcune forme però presentano una pasta con struttura più compatta, regolare senza le tipiche scaglie. Questo difetto della pasta viene denominato "impatonatura". Si è cercato di verificare la possibilità di discriminare la presenza di impatonatura mediante analisi spettroscopiche, valutando se il comportamento ottico di forme di Grana Padano impatonate fosse diverso nello scattering e nella riflessione della radiazione incidente non assorbita rispetto alla pasta di forme senza difettosità. Una diversa densità della pasta del formaggio dovrebbe causare una variazione degli indici di rifrazione e quindi una risposta anisotropa della superficie ad una radiazione incidente, che un formaggio impatonato con struttura più continua e compatta dovrebbe dare una diffusione della radiazione più isotropa rispetto all'angolo di incidenza.
Uno primo studio è stato effettuato al CREA-ZA dove è stato ideato e progettato un "goniospettrometro" NIR, basato su piattaforma Open Source Arduino (illustrato nella precedente relazione intermedia), per misurare l'anisotropia della diffrazione di una sorgente luminosa collimata incidente un campione di pasta di Grana Padano e verificare la possibilità di discriminare forme di Grana Padano "impatonate" da forme non difettose. Lo strumento è formato da una scheda elettronica con microcontrollore programmabile dall'utente per gestire una serie di input derivanti da sensori ed inviare segnali output come dati o comandi ad altri dispositivi, un supporto fisso per posizionare il LED che emette la radiazione luminosa in banda stretta, un sostegno per il campione ed un supporto mobile sul quale è posizionato il detector per la lettura della radiazione riflessa. La movimentazione del rilevatore attorno al punto di incidenza è garantita da un motore passo-passo. Nelle prove effettuate sono stati utilizzati LED intercambiabili nel vicino infrarosso, 1300 e 1900 nm, ed un sensore InGaAs, perché l'interazione tra radiazione e materia è maggiore quando la dimensione degli scatteratori di nostro interesse è comparabile alla lunghezza d'onda elettromagnetica. Ogni parametro (tempo di acquisizione del fotodiodo, numero di acquisizioni, angolo di intervallo tra letture) è stato programmato tramite codice scritto all'interno dell'ambiente IDE dedicato alla programmazione delle schede Arduino. I valori di corrente rilevati dal sensore sono stati elaborati dalla scheda tramite il codice per ottenere un dato di assorbanza che viene trasmesso in real-time ad un PC, collegato tramite software dedicato che genera una rappresentazione grafica dei valori di assorbanza in relazione all'angolo di acquisizione del sensore. La struttura del goniospettrometro permette di inter cambiare facilmente LED con diverse lunghezze d'onda e sensori con range spettrali d'acquisizione diversi, in modo tale da poter studiare la lunghezza d'onda e la capacità di penetrazione della radiazione ottimali per un miglior studio della pasta di Grana Padano. Con tale prototipo sono stati analizzati 6 campioni inviati dal Consorzio, di cui tre identificati come "impatonati", costituiti da sezioni sottili (circa 5 cm di spessore), confezionati sottovuoto e non refrigerati, presentavano all'apertura una tessitura alterata con perdita di struttura e non hanno evidenziato differenze all'analisi mediante goniospettometro NIR.
Gli stessi campioni sono stati inviati dal Consorzio anche al CNR-ISASI di Pozzuoli per essere sottoposti ad analisi di speckle pattern. Gli esperimenti svolti da CNR-ISASI nell'ambito dell'accordo di collaborazione con CREA-ZA (illustrati nel dettaglio nella relazione tecnico-scientifica allegata), avevano lo scopo di implementare un metodo ottico non invasivo per la rilevazione di parametri fisici misurabili tramite modalità senza contatto. Preliminarmente è stato dimensionato l'apparato di misura eseguendo misure di scattering in riflessione e registrando pattern di speckle ottenuti utilizzando una telecamera a colori, che illumina il campione con due fasci laser (a 532 nm, "Verde" e a 632 nm, "Rosso"), montata su un braccio rotante per variarne la posizione angolare e la distanza dal campione per poter eseguire sia misure "Near-Field" (in campo vicino) che "Far-

Field" (in campo lontano). Le misure preliminari hanno evidenziato una leggera differenza nell'andamento dei valori d'intensità di scattering tra formaggi "scelti" e "impatonati". Non sono comunque state rilevate differenze significative tra i valori acquisiti in Far-Field e quelli in Near-Field. La presenza di micro-gocce di grasso che emergevano dalla superficie del formaggio disturbavano le misure.
Nella seconda parte del lavoro, per cercare di migliorare la scarsa ripetibilità osservata nelle misure preliminari, l'apparato di misura è stato modificato utilizzando un intervallo maggiore per le angolazioni cui la camera registrava le immagini, ovvero 160° contro i 40° di range della misura precedente. Inoltre, sono state effettuate solo misure in Far-Field data la scarsa differenza rilevata tra le due misure rilevate preliminarmente, e sono state modificate le condizioni di temperatura, mantenendo i campioni a circa 18°C per evitare la formazione delle micro-gocce di grasso sulla superficie del formaggio. Poiché dato che durante il porzionamento del campione da esaminare si potrebbero generare striature nella direzione del taglio, le misure in riflessione sono state effettuate sia a 0° che a 90°, sia con polarizzazione verticale (PO) che orizzontale (PV), registrando l'intensità media di illuminazione separatamente per la componente Red (R) e Green (G) per compensare la caratteristica spettrale della camera.

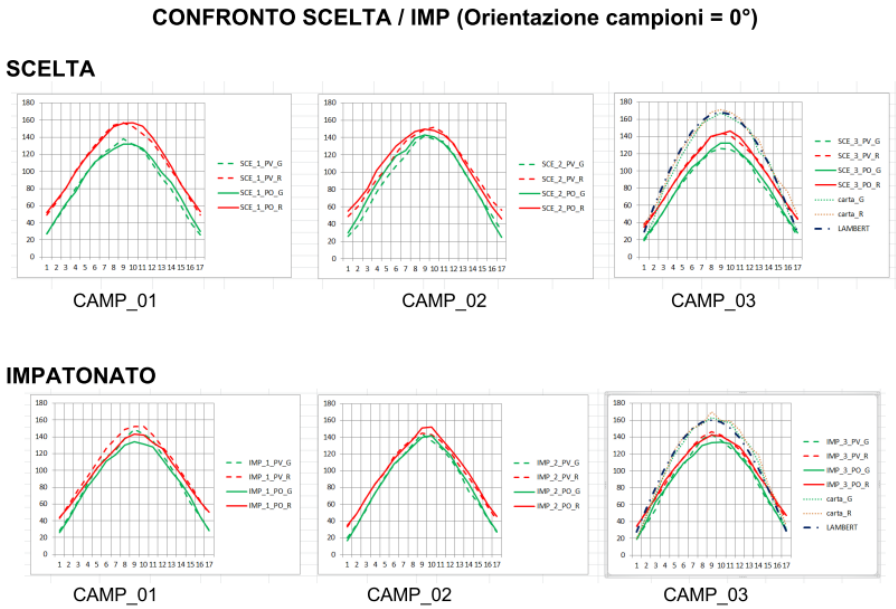


Figura 1 – Valore medio d'intensità d'illuminazione registrata per le componenti R e G con angolazione della camera di 0°; confronto fra formaggi scelti e impatonati.

I campioni hanno mostrato in tutti i casi un comportamento sostanzialmente diverso tra "scelto" e "impatonato" in termini di differenza di scattering tra fascio R e fascio G. In particolare, i campioni "scelto" mostrano sempre un contributo di scattering maggiore nel canale R rispetto al canale G. Al contrario, i campioni "impatonato" mostrano un segnale di scattering nei canali R e G pressoché equivalenti con curve di intensità appaiate tra loro. In prospettiva, questa tecnica potrà essere utilizzata per distinguere la granulosità del formaggio in vari step della stagionatura tramite una procedura basata sull'utilizzo di sorgenti laser nello spettro visibile e quindi non invasiva e non a contatto. In tal modo sarà possibile individuare in modo rapido e non invasivo eventuali difettosità nella texture del formaggio.
Viste le difficoltà di reperimento regolare di campioni con difettosità chiaramente definita in numero sufficiente per una validazione statistica dei sistemi di misura sviluppati, era stato proposto dal Consorzio di Tutela di riorientare lo sviluppo del sistema spettrofotometrico portatile a basso costo verso l'analisi e il monitoraggio del processo di coagulazione del Grana Padano DOP in caldaia, al fine di incrementare sia l'efficienza del controllo di processo sia la tracciabilità nella filiera produttiva.

Sviluppo di un sistema ottico prototipale per il monitoraggio della coagulazione
L'obiettivo è stato la realizzazione di un sistema ottico prototipale per il monitoraggio dei processi di coagulazione di breve durata 10-15 minuti, come nel caso del Grana Padano, da utilizzare per analisi di processo ex-post, per confrontare le tempistiche adottate da diversi operatori, oppure in maniera diretta come un supporto al casaro per la segnalazione del tempo di presa al fine di standardizzare maggiormente il processo produttivo, poiché la determinazione del momento dell'inizio della coagulazione è effettuata

attualmente solo sulla base della sensibilità e dell'esperienza del singolo operatore. Inoltre, il prototipo deve avere costi di contenuti per poter essere inserito in realtà produttive anche di piccole e medie dimensioni.
Uno studio preliminare con uno spettrometro NIR ultracompatto e con elevata velocità di scansione, effettuando 69 prove di coagulazione in laboratorio secondo un protocollo sperimentale basato su un disegno sperimentale full factorial a tre fattori su tre livelli (3 dosi di caglio, 3 concentrazione di grasso, 3 pH), ha permesso di studiare la migliore geometria ottica e selezionare le bande spettrali più idonee per il monitoraggio. Ogni prova è stata monitorata con un lattodinamografo meccanico (Formagraph) come sistema di riferimento e con uno spettrometro NIR (Micronir Viavi) con range spettale 900-1700 nm (Fig. 2).

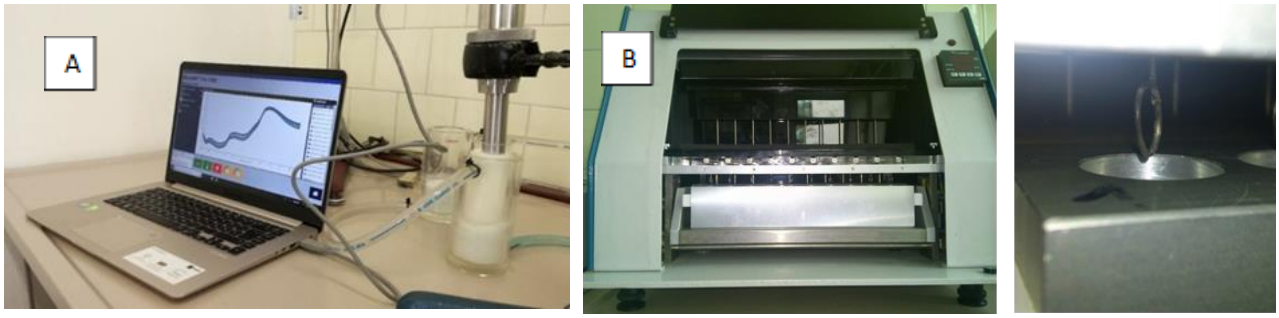


Figura 2 - Misura della coagulazione in laboratorio con spettrometro Micronir (A) e lattodinamografo Formagraph (B).

I tracciati tromboelastografici delle 69 prove di coagulazione ottenuti con il sistema di riferimento hanno restituito il tempo di presa (r), ovvero il tempo trascorso dall'aggiunta del caglio alla comparsa del gel, il tempo per raggiungere una resistenza del coagulo standard (k20) e la resistenza del coagulo dopo 30 minuti di analisi (A30) di ogni condizione sperimentale (Fig. 3).

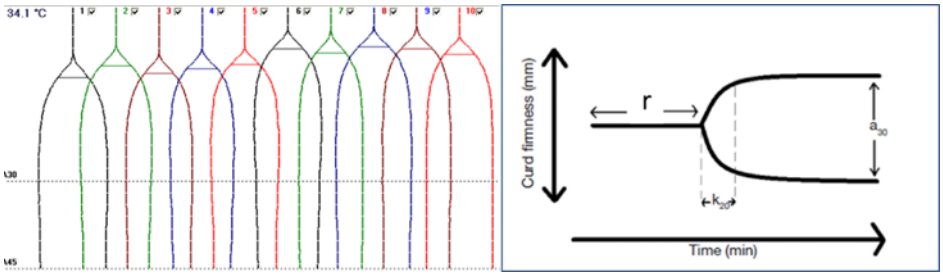


Figura 3 - Esempi di tracciati trombolestografici con dettaglio dei parametri ricavabili (r, k20, A30).

La coagulazione è stata monitorata anche con lo spettrometro Micronir a immersione, raccogliendo spettri in riflettanza diffusa nel range spettrale tra i 900 nm ed i 1680 nm con un intervallo di scansione di 5 secondi. Dall'intero range spettrale sono stati estratti i valori di assorbanza relativi all'intorno di singole bande (970, 1300, 1600 nm) per le quali esistono in commercio LED con emissione corrispondente. A tali lunghezze d'onda sono state osservate maggiori variazioni di assorbanza attribuibili a variazioni nello scattering dovuto alla formazione dei fiocchi caseosi (Fig. 4), mentre non sono presenti forti assorbimenti specifici dovuti a macrocostituenti del latte. In particolare, per la banda a 970 nm è stata evidenziata una buona risposta spettrale del processo di coagulazione.

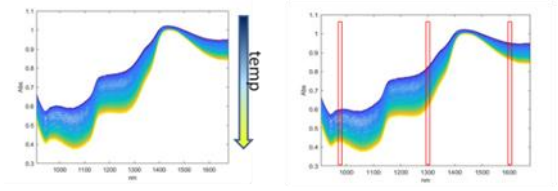


Figura 4 - Spettri con le bande a 970, 1300 e 1600 nm raccolti durante il processo di coagulazione per le quali si è evidenziato una elevata variazione di scattering durante la coagulazione e per le quali sono commercialmente disponibili LED con emissione specifica.

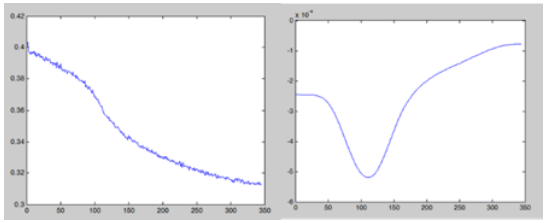


Figura 5 - Curva di evoluzione temporale del processo (sinistra) registrata come variazione di assorbanza a 970 nm, di forma sigmoide e (destra) derivata prima del segnale.

Della curva di evoluzione temporale del processo (Fig. 5) registrata come variazione della componente di backscattering della radiazione incidente, di forma sigmoide, sono stati calcolati i tempi corrispondenti al punto di minimo del segnale della derivata prima ed ai punti di minimo e massimo della derivata seconda. Tali tempi sono stati messi in correlazione con i tempi di presa ottenuti dal Formagraph ottenendo ottime correlazioni per il minino della derivata prima o per il minimo della derivata seconda a 970 nm (Fig. 6).

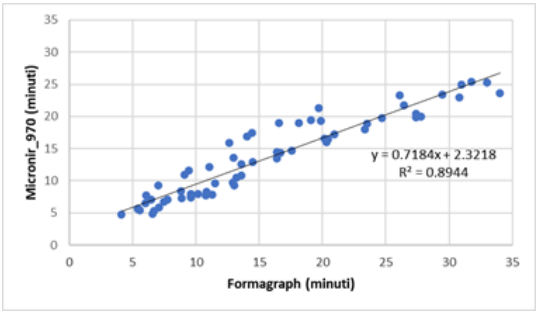


Figura 6 - Correlazione tra stima del tempo di presa misurata con Formagraph e minimo segnale della derivata prima dell'assorbanza a 970nm.

L'analisi della risposta dei due strumenti rispetto ai fattori variati nel disegno sperimentale è stata effettuata utilizzando il software Modde v. 12 (Umetrics) utilizzando un modello di regressione multipla lineare (MLR) che oltre all'effetto dei tre fattori ha considerato anche tutte le loro interazioni. Il confronto tra lo strumento meccanico e quello ottico ha evidenziato una risposta ai fattori del tutto simile e sovrapponibile, come evidenziato dalle superfici di risposta del modello (Fig. 7) e dai valori dei coefficienti (Fig. 8).

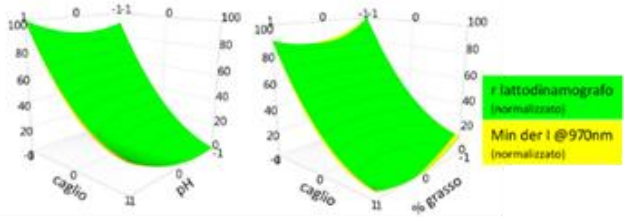


Figura 7 - Superfici di risposta del modello per i due strumenti.

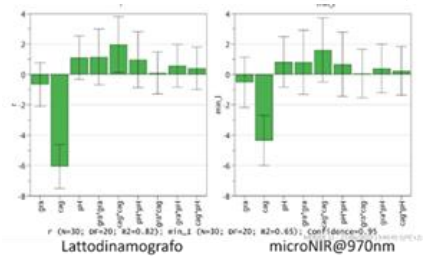


Figura 8 - Stima mediante regressione multipla MLR dei valori dei coefficienti del modello.

Sviluppo del prototipo

Il sistema per sondare otticamente un campione di latte durante la fase di coagulazione è stato sviluppato per rilevare quantitativamente un segnale ottico NIR in riflettanza diffusa. Il nucleo centrale si basa sul concetto optoelettronico di coppia LED-fotodiodo: un diodo emettitore di luce NIR con un picco di emissione attorno a una specifica lunghezza d'onda viene pulsato (acceso e spento consecutivamente), cosicché la radiazione vada a illuminare il campione da analizzare e la frazione da questo rimessa in riflettanza diffusa venga rilevata e quantificata da un fotodiodo (detector); il tutto gestito da un microcontrollore che consente di programmare ogni fase del ciclo di misura (accensione e spegnimento del LED e rilevazione della radiazione da parte del detector con invio dei dati su apposita interfaccia grafica). Il sistema utilizzato prevede il ricorso a due LED con emissione nel vicino infrarosso a 970 nm e 1600 nm. I picchi di emissione dei due LED sono rappresentati di seguito insieme alla distribuzione angolare dell'intensità luminosa (Fig. 9).

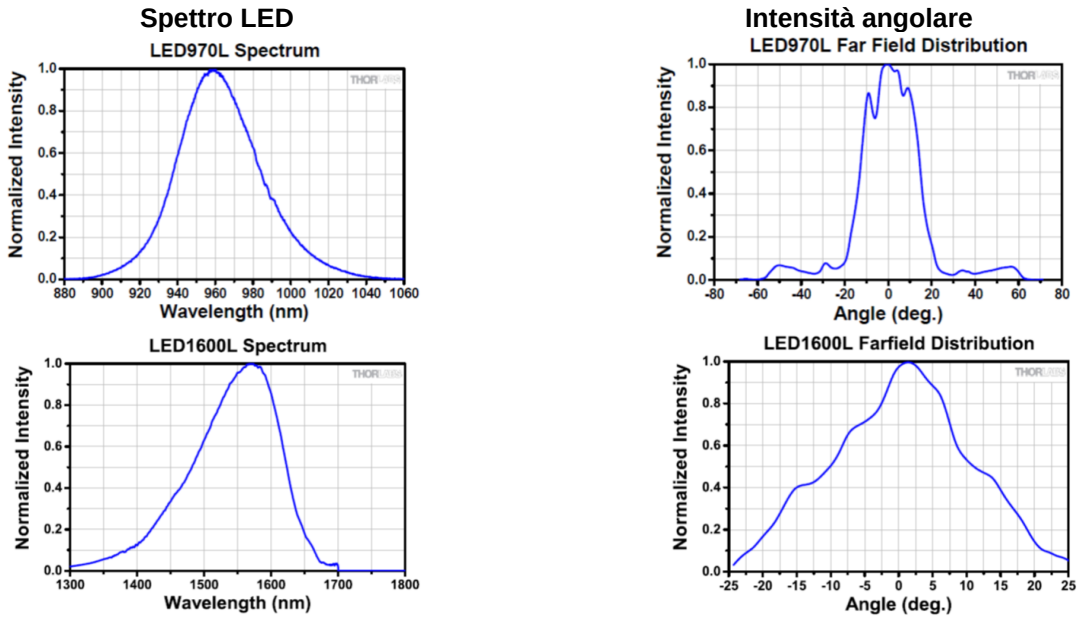


Figura 9 - Caratteristiche di emissione dei LED utilizzati.

La versione finale del prototipo è stata concepita una sonda funzionante a immersione nel campione come raffigurato in Fig 10. La parte attiva della sonda, il banco ottico, è riconoscibile visto da sotto in Fig. 11, in cui si nota il fotodiodo rilevatore al centro con i due LED ai lati.

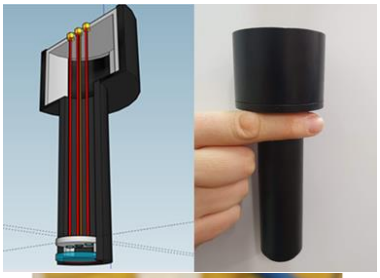


Figura 10 - Layout della sonda funzionante a immersione nel campione.

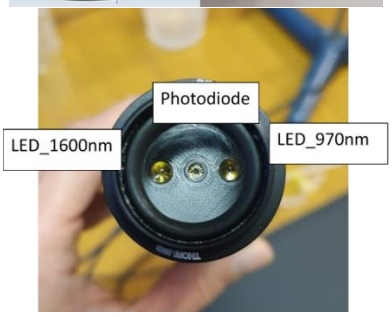


Figura 11 - Vista del banco ottico della sonda ad immersione.

Per evitare surriscaldamenti dannosi dei semiconduttori dei LED, il ciclo di funzionamento è stato programmato in modo da funzionare in modalità pulsata al 50% con un periodo di accensione uguale a quello di spegnimento. Al termine di ogni periodo di accensione viene acquisita la lettura analogica restituita al microcontrollore dal fotodiodo che viene eccitato in riflettanza dal campione illuminato dal LED. Si passa quindi a un identico ciclo eseguito per l'altro LED. Il fulcro del sistema è costituito dal fotodiodo, il quale risulta molto sensibile alla radiazione entrante: questa è in grado di indurre la produzione di una bassissima corrente elettrica che è funzione dell'intensità della radiazione incidente. Poiché, però, i microcontrollori sono in grado di rilevare soltanto dei voltaggi (differenze di potenziale elettrico) e non delle correnti, è stato necessario convertire queste micro-correnti in voltaggi facendo passare la corrente attraverso un'opportuna resistenza e leggere il voltaggio ottenuto ai capi della resistenza.
Pur essendo stato inizialmente provato, tale circuito presentava una serie di svantaggi tra cui la bassa

sensibilità e l'elevato rumore, ragione per cui è stato adottato un classico circuito a transimpedenza in cui il fotodiodo è associato con un amplificatore operazionale. Questo ha il compito di eseguire una conversione della micro-corrente prodotta dal fotodiodo in un voltaggio proporzionale a detta corrente. Tale voltaggio viene poi rilevato su una porta analogica del microcontrollore. In questa modalità il microcontrollore è in grado di ricevere e poi rendere accessibile un segnale molto amplificato, stabile e dall'elevato rapporto segnale/rumore. Il circuito relativo all'alimentazione dei LED, invece, è stato alimentato a 6V attraverso una resistenza dimensionata opportunamente per massimizzare la corrente entro i limiti operativi del componente viene pilotato dal pin digitale del microcontrollore a 3.3V attraverso una resistenza e un transistor operato in modalità 'interruttore'. Come microcontrollore è stato scelto un componente Arduino® DUE che opera a 3.3V con un ARM Core a 32 bit e 84 Mhz ed è stato utilizzato alla sua massima risoluzione equivalente a 12 bit. Questo equivale a ripartire i 3300 mV della porta analogica su 4096 possibili valori con una capacità di discriminazione pari a 0.80 mV. Per operare i circuiti richiesti si è reso necessario creare una scheda prototipale ad hoc da montare poi sull'Arduino DUE e saldare quindi i componenti su detta scheda. Infine, è stato sviluppato il codice per operare il microcontrollore.

Validazione del prototipo

Per valutare le performances del prototipo ad immersione sono state effettuate 84 prove di coagulazione in laboratorio. Le prove di laboratorio hanno seguito un disegno sperimentale full factorial a tre fattori su tre livelli (3 dosi di caglio: 23, 34, 45 IMCU); 3 valori acidità di coagulazione: pH 6.3, 6.4, 6.5; 3 concentrazione di grasso (aggiunto come panna): 0.0, 1.5, 3.0%), replicando 3 volte ciascuna combinazione dei fattori e sei volte il punto centrale. Il protocollo sperimentale ha previsto l'utilizzo di latte ricostituito a partire da latte magro in polvere low heat. Il contenuto proteico è stato mantenuto costante nelle tesi (3.4%) e le coagulazioni sono state condotte seguendo una tabella di lavoro derivata da quella di una lavorazione a Grana Padano.
Nelle prove sono stati messi a confronto i risultati per le stime del tempo di presa (**r**) ottenute dal sistema Formagraph con quella ottenuta dal punto di minimo della derivata prima del segnale in assorbanza a 970 nm mediante il sistema Micronir montato su sonda ad immersione e con il segnale del minimo di derivata prima ottenuto dalla sonda prototipale (utilizzando il segnale ottenuto a 970 mn, il segnale a 1600 nm è stato utilizzato come segnale di controllo). Un esempio di tracciato ottenuto con il sistema prototipale è presentato in Fig. 14.

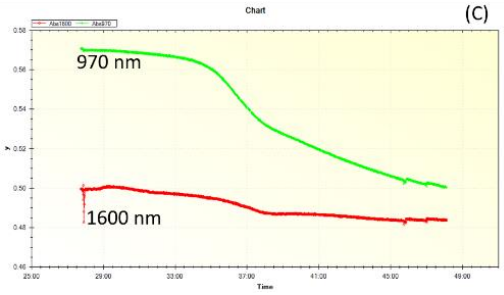


Figura 1 Esempio di tracciato ottenuto dal sistema prototipale, in verde le acquisizioni a 970 nm, in rosso quelle a 1600 nm, sono evidenti i punti di flesso corrispondenti al momento di massima velocità di formazione dei fiocchi caseosi.

Il confronto tra le performances del sistema Micronir e quello prototipale ha evidenziato dei risultati comparabili pur in presenza di una riduzione di costo dei sistemi stimabile nell'ordine di 100-50 volte (30000 € vs 500-1000 €). Le figure 15 e 16 presentano le rette di regressione rispettivamente tra Formagraph e Micronir e tra Formagraph e sonda prototipale evidenziando valori di R^2 rispettivamente di 0,96 e 0,86 per le regressioni con

intercetta e 0,96 e 0,85 per i modelli senza intercetta.

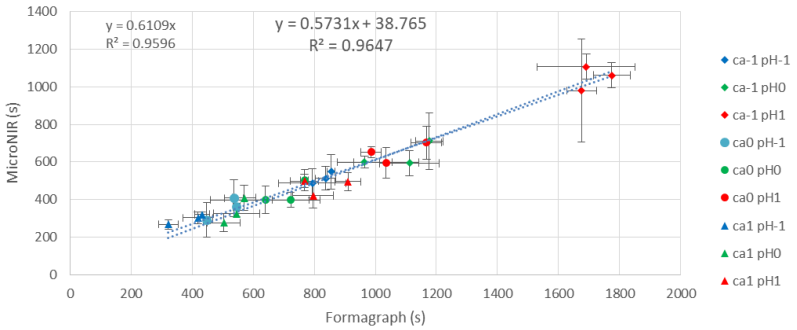


Figura 13 - Regressione tra tempi di gelificazione stimati da Formagraph e Micronir a 970 nm, sono evidenziati con forme e colori i livelli di caglio e pH.

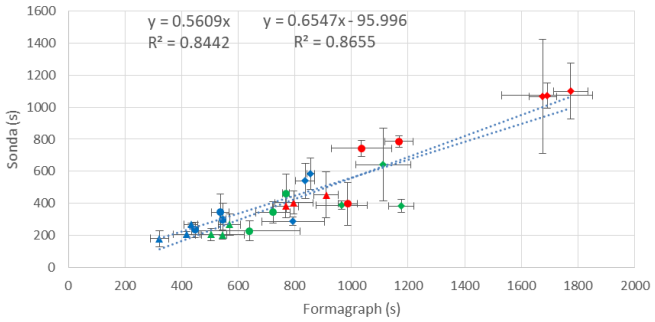


Figura 24 - Regressione tra tempi di gelificazione stimati da Formagraph e sonda prototipale a 970 nm, sono evidenziati con forme e colori i livelli di caglio e pH (per la legenda si rimanda alla figura 20).

Da questi ultimi modelli si è evidenziato un leggero anticipo del segnale del prototipo rispetto al sistema Micronir dovuto alla maggior frequenza di campionamento possibile con il sistema prototipale (5 secondi vs.1,4). Il modello fattoriale sviluppato tenendo conto degli effetti lineari, quadratici e delle interazioni semplici tra tre fattori ($R = Cost + a[grasso] + b[caglio] + cpH + d[grasso]^2 + e[caglio]^2 + fpH^2 + g[grasso]*[caglio] + h[grasso]*pH + i[caglio]*pH$), ha evidenziato ottime performances in termini di R^2 e di riproducibilità anche per il sistema prototipale come riportato nel sommario delle statistiche presentato in figura 17. In figura 18 sono riportate le stime dei coefficienti dei 3 modelli con le barre di errore che definiscono la significatività degli stessi.

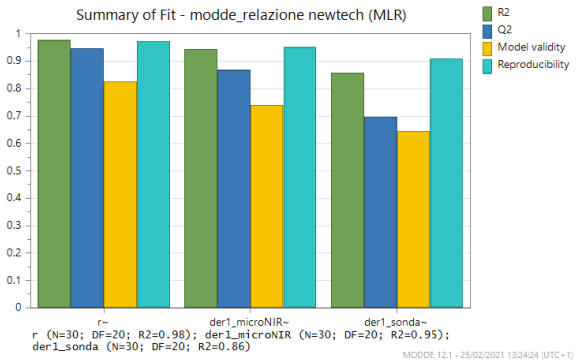


Figura15 - Confronto tra le statistiche descrittive dei modelli fattoriali completi relativi ai tre strumenti messi a confronto.

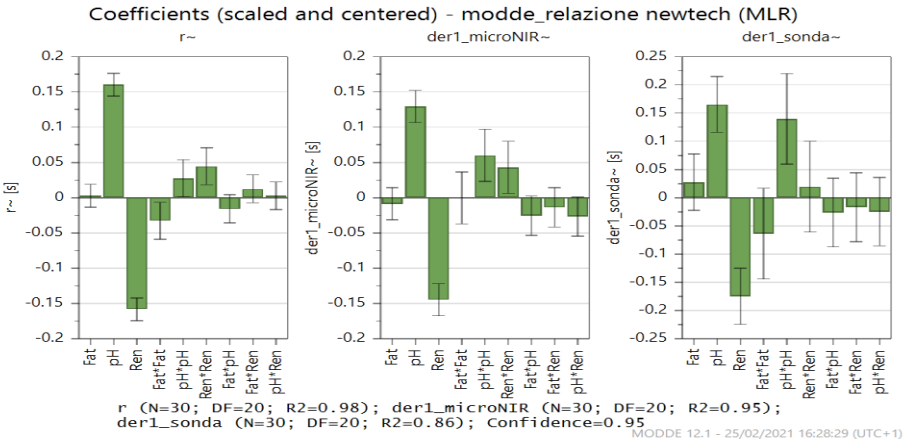


Figura 16 - Stime dei coefficienti del modello fattoriale completo per Fomgraph, Micronir e sonda con le rispettive barre di incertezza.

L'analisi statistica ha evidenziato come la concentrazione di grasso non risulti mai un fattore significativo, di conseguenza questo effetto è stato rimosso dal modello, così come gli altri componenti con coefficienti non significativamente diversi da zero. É stato così ottenuto un modello ridotto più robusto (R = C+ b[caglio] + cpH + fpH^2) le cui statistiche descrittive sono riportate in figura 19. La stima dei coefficienti dei modelli ridotti è riportata in figura 20.

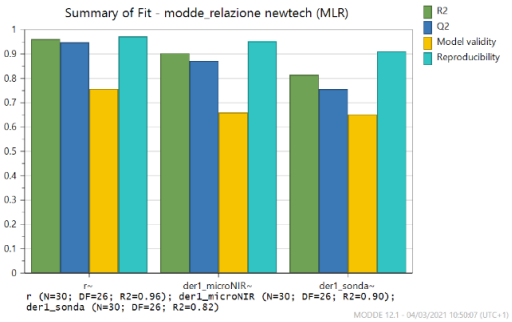


Figura 17 - Confronto tra le statistiche descrittive dei modelli fattoriali ridotti relativi ai tre strumenti messi a confronto.

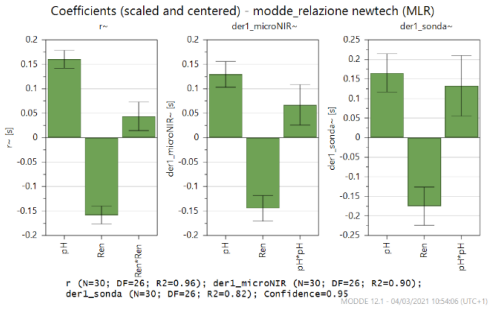


Figura 18 - Stime dei coefficienti del modello fattoriale ridotto per Formagraph, Micronir e sonda con le rispettive barre di incertezza.

Dal confronto dei risultati relativi ai tre strumenti è stato possibile evidenziare come il prototipo sviluppato possa essere proposto per un uso pratico nei siti produttivi garantendo performances solo lievemente inferiori a strumentazioni molto più costose (Micronir montato su sonda ad immersione) e non applicabili *on line* (sistema tromboelastografico Formagraph).
La figura 21 mostra le superfici di risposta (modelli ridotti) dei tre strumenti rispetto ai fattori pH di coagulazione e concentrazioni di caglio. Dalla figura risulta anche evidente l'anticipo (molto utile per le applicazioni tecnologiche come il calcolo del momento di taglio) della risposta dei sistemi ottici rispetto a quello meccanico.

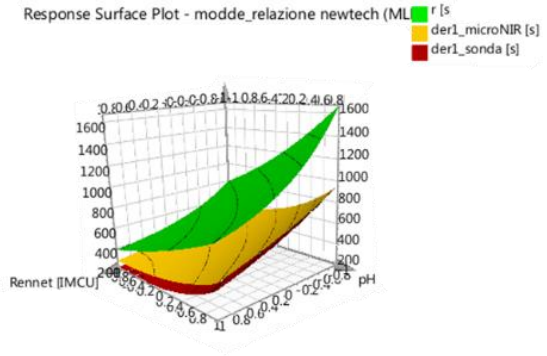


Figura 19 - Superfici di risposta (modelli ridotti) dei tre strumenti rispetto ai fattori pH di coagulazione e concentrazioni di caglio, l'asse verticale riporta i tempi espressi in secondi.

Il sistema potrà dunque essere facilmente sviluppato in una applicazione per l'utilizzo in caldaia direttamente in caseifici con trasmissione wifi dei dati e rilevazione istantanea del punto di flesso.

WP4 - Piano di sfruttamento dei risultati, ricadute e divulgazione dei risultati

Convegni e seminari

- Strumenti innovativi per la valutazione della qualità e tracciabilità del formaggio Grana Padano. Seminario divulgativo, Desenzano del Garda, 16 dicembre 2020.
- M. Zago, T. Bardelli, L. Rossetti, N. Nazzicari, D. Carminati, A. Galli, G. Giraffa. Seasonal variations in the bacterial community of Grana Padano cheese. 13th LAB Symposium, 23-25 Agosto 2021.
- M. Zago, T. Bardelli, L. Rossetti, N. Nazzicari, D. Carminati, A. Galli, G. Giraffa. Similarities and differences in the bacterial community between Grana Padano PDO cheese and similar cheeses. 13th LAB Symposium, 23-25 Agosto 2021.

Webinar

I Giovedì di Newtech, 18 marzo 2021 - Titolo: Il DNA nella caratterizzazione del Grana Padano DOP. (locandina allegata), con circa 200 iscritti.
I Giovedì di Newtech, 25 marzo 2021 - Titolo: Standardizzazione di latte e processi nella produzione di formaggi (locandina allegata), con circa 200 iscritti.

Pubblicazioni

- Bardelli T., Rossetti L., Carminati D., Nazzicari N., Zago M., Giraffa G. Metagenomic analysis of the bacterial community in Grana Padano cheese. Poster, Atti 5th MD 2019, pp. 166-167.
- Bardelli T., Rossetti L., Zago M., Carminati D., Giraffa G., Tidona F. (2020) Extracellular and intracellular DNA for bacterial profiling of long-ripened cheeses. *FEMS Microbiology Letters* **367** (13), fnaa095 (doi.org/10.1093/femsle/fnaa095).
- Tidona F., Francolino S., Ghiglietti R., Locci F., Brusa G., Alinovi M., Mucchetti G., Giraffa G. Application of recombined milk to produce Crescenza-type cheese in laboratory-scale cheesemaking: implications on technology and sensory properties. *Foods* **9**, 928 (2020). doi:10.3390/foods9070928.
- Zago M., Bardelli T., Rossetti L., Nazzicari N. Carminati D., Galli A., Giraffa G. (2021) Evaluation of bacterial communities of Grana Padano cheese by DNA metabarcoding and DNA fingerprinting analysis. *Food Microbiology* **93** (doi.org/10.1016/j.fm.2020.103613).
- Tidona F., Alinovi M., Francolino, S., Brusa G., Ghiglietti R., Locci F., Mucchetti G., Giraffa G. Partial substitution of 40 g/100 g fresh milk with reconstituted low heat skim milk powder in high-moisture Mozzarella cheese production: rheological and water-related properties. *LWT Food Science and Technology* **137** (2021; in corso di stampa).
- Zago M., Carminati D., Nazzicari N., Rossetti L., Bardelli T., Giraffa G. (2021) Recenti acquisizioni sulla diversità microbica del Grana Padano. *Grana Padano Insieme* – gennaio 2021.

A completamento delle attività di ricerca si prevede per la fine del 2021 la sottomissione di ulteriori articoli di carattere sia scientifico che divulgativo.

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**
a - Ottenere la mappatura del Grana Padano DOP per facilitarne l'attribuzione di autenticità	1. Utilizzare DNA barcoding del cloroplasto e/o del DNA batterico per valutare su base molecolare l'origine geografica del Grana Padano DOP	WP 2	Valutazione polimorfismi della componente vegetale del latte e dell'eterogeneità microbica nel formaggio	L'obiettivo è stato raggiunto.
			Messa a punto metodo di discriminazione	L'obiettivo è stato raggiunto.
			Mappatura dell'areale di produzione	L'obiettivo è stato parzialmente raggiunto.
	2. Differenziare il formaggio Grana Padano DOP da prodotti similari	WP 2	Validazione capacità discriminante metodo rispetto a prodotti non-Grana Padano	L'obiettivo è stato raggiunto.
b (1) - Studiare gli effetti dell'utilizzo di derivati anidri del latte nella produzione di formaggi	1. Studiare gli effetti in caseificazione	WP3	Modello validato in formaggi molli	L'obiettivo è stato raggiunto.
	2. Studiare gli effetti sulle caratteristiche qualitative dei prodotti	WP3	Valutazione della composizione materie prime e prodotti	L'obiettivo è stato raggiunto in crescenza e mozzarella citrica.
	3. Studiare gli effetti sui costi e l'accettabilità dei prodotti da parte dei consumatori	WP3	Stima costi e valutazione caratteristiche sensoriali	L'obiettivo è stato parzialmente raggiunto.
b (2) - Mettere a punto un prototipo NIR per la valutazione della texture e del punto di taglio in caldaia di formaggi	4. Evidenziare la presenza di anomalie strutturali ('impatonatura') che influenzano la texture dei formaggi. 5. Messa a punto di una tecnica spettrometrica per rilevare difetti di struttura e il punto di taglio *at line* della	WP3	Disponibilità di un prototipo basato sulla spettroscopia risolta nello spazio validato su formaggi	L'obiettivo è stato parzialmente raggiunto riguardo la valutazione delle anomalie strutturali dei formaggi. L'obiettivo è stato parzialmente raggiunto per quanto riguarda la messa a punto di un prototipo per individuare *at line* il punto di taglio della cagliata e la validazione su formaggi.

	cagliata in Grana Padano			

NOTE
Obiettivo non raggiunto b (2).4: l'obiettivo non è stato raggiunto per la difficoltà da parte del Consorzio di tutela di recuperare i campioni con il difetto "impatonatura". Ciò ha comportato l'avvio di un'azione correttiva (vedi sez. 5.)

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
3	1	Impossibilità di validare in maniera adeguata il prototipo messo a punto per la caratterizzazione del difetto "impatonatura" per la difficolta del Consorzio di tutela nel reperire i campioni difettati necessari.	Il prototipo messo a punto è stato utilizzato dopo opportune modifiche e su suggerimento del Consorzio di tutela per realizzare un sistema ottico prototipale per il monitoraggio dei processi di coagulazione di breve durata (come nella lavorazione a Grana Padano), da utilizzare per analisi di processo ex-post, per confrontare le tempistiche adottate da diversi operatori, oppure in maniera diretta come supporto al casaro per la segnalazione del tempo di presa al fine di standardizzare maggiormente tutto il processo produttivo.

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)
Osservazioni alle azioni correttive messe in atto

Il Coordinatore del Progetto NEWTECH:

Dr. Giorgio GIRAFFA

GIORGIO GIRAFFA 22.03.2021 11:09:11 UTC

SPAZIO RISERVATO ALL'ESPERTO (qualora designato)
Valutazione complessiva del progetto

Luogo e Data *Firma leggibile dell'Esperto (qualora designato)*

6. Allegato 1

VERBALE RIUNIONE DI PROGETTO DEL 22 NOVEMBRE 2019

NewTeCh New technologies for cheese production.

Verbale della quarta riunione di coordinamento del progetto, svolta presso la sede del CREA Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura di Lodi in Via Lombardo, 10 in data 22/11/2019.

Partecipanti:
Giorgio Giraffa – Coordinatore del progetto e Responsabile scientifico, U.O. CREA Lodi
Domenico Carminati – Referente scientifico, WP2 U.O. CREA Lodi
Francesco Locci – Referente scientifico, WP3 (caseificazioni sperimentali e gestione dati analitici) – U.O. CREA Lodi
Germano Mucchetti – Responsabile scientifico Partner Esterno, Università degli Studi di Parma, Dipartimento di scienza degli alimenti
Giovanna Contarini, Rosanna Marino, Miriam Zago, Roberta Ghiglietti – ricercatori, U.O. CREA
Cristina Rossetti, Salvatore Francolino – personale tecnico, U.O. CREA
Graziella Bongioni – Responsabile scientifico, U.O. Istituto Spallanzani, Rivolta d'Adda
Rossana Capoferri, Anna Pozzi – ricercatori, U.O IS
Flavio Tidona, Tommaso Bardelli, Nelson Nazzicari- assegnisti di ricerca U.O CREA

Partecipanti alla riunione di tipo amministrativo:
Daniela Intra - Amministrazione, Istituto Spallanzani, Rivolta d'Adda
Maddalena Carli - Amministrazione U.O CREA

Giorgio Giraffa (GG) introduce il progetto in qualità di nuovo Coordinatore vista la richiesta di "aspettativa dal lavoro" di un anno di Andrea Galli. La comunicazione del nuovo coordinamento è stata già inviata al MIPAAF. GG informa che è stata inviata una richiesta di proroga di un anno del progetto ma non è ancora arrivato il decreto. Il progetto potrebbe essere prorogato solo di 6 mesi e quindi concludersi a Gennaio 2021. Le attività scientifiche e amministrative andranno riprogrammate in base alla proroga. Per gli aspetti amministrativi occorrerà prestare attenzione alle motivazioni di spesa di personale (assegni, contratti, missioni) e altre voci di costo del progetto
Entro la fine di Dicembre 2019 sarà inviata al MIPAAF la RELAZIONE scientifica delle attività svolte nei WP e una parziale rendicontazione delle spese sostenute a ottobre 2019.
GG sottolinea che, per i risultati scientifici disponibili ad oggi, occorre iniziare a valutare l'opportunità di pubblicare lavori su riviste scientifiche o divulgative, e/o partecipare a Convegni con relazioni orali. Inoltre, bisogna iniziare a pensare come e dove organizzare il Convegno di fine progetto che potrebbe svolgersi nel periodo Settembre-Ottobre 2020.
Giovanna Contarini (GC), in qualità di Editor in Chief, illustra l'opportunità di pubblicare sulla rivista ***Scienza e Tecnica Lattiero Casearia***, che è la rivista ufficiale dell'Associazione Italiana Tecnici del Latte (AITeL). GC sottolinea che per la sezione scientifica è stato avviato il processo di indicizzazione, che sarà retroattivo anche per gli articoli pubblicati ora. Inoltre, la rivista si è arricchita di altre due sezioni, una sezione "attualità", con notizie dal mondo e dall'Italia e un'altra, "tecnico divulgativa", con articoli tecnici, interviste, inchieste e approfondimenti per un ulteriore aggiornamento professionale per gli operatori del settore lattiero caseario. Sarebbe pertanto un'ottima opportunità per divulgare le ricerche di Newtech presso una readership adatta, nel contesto del settore lattiero-caseario nazionale.

GG ricorda quali sono le tre tematiche principali a cui fanno riferimento le attività scientifiche del WP2 e WP3:
1) WP2 Approcci innovativi per la lotta alla contraffazione nelle produzioni DOP del settore caseario (Grana Padano) - referente scientifico Carminati
2) WP3 Aggiunta di latte in polvere e proteine concentrate del latte e impatto sulla qualità dei formaggi freschi -referente scientifico Locci

3) WP3 Nuovi approcci analitici della qualità del formaggio - referente scientifico Cabassi (assente). GG afferma che non ci sarà una presentazione delle attività di questa task durante la riunione di coordinamento ma le attività verranno incluse nella RELAZIONE.
Il WP1 è rappresentato dalle attività di coordinamento del progetto mentre il WP4 dalle attività di sfruttamento, ricadute e divulgazione dei risultati.

Anna Pozzi (AP) descrive le attività che sono state svolte dalla UO Istituto Spallanzani nell'ambito del WP2 e che hanno come obiettivo la discriminazione dell'origine geografica dei campioni di latte mediante metodi molecolari. Le attività hanno riguardato sia la costituzione e il mantenimento della Biobanca di DNA che l'attività di ricerca incentrata sull'analisi di sequenza del rbcL, gene presente nei cloroplasti e codificante per l'enzima Ribulosio Bisfosfato Carbossilasi/Ossigenasi (RuBisCO) responsabile della fissazione del carbonio.
I campioni di latte sono stati raccolti mensilmente dal Consorzio a partire da ottobre 2017 ad ottobre 2018 per un totale di 1570 campioni (catalogati e conservati presso IS) relativi a 136 caseifici della zona di produzione del Grana Padano DOP. I dati relativi ai campionamenti sono stati memorizzati in un apposito database per la gestione della biobanca. Per quanto riguarda i campioni di formaggio da destinare alla biobanca, questi sono stati raccolti dal CREA-ZA e a fine novembre 2019 sono disponibili circa 600 campioni pretrattati da utilizzare per l'estrazione del DNA. AP ha indicato le rese di estrazione dei protocolli confrontati (Dneasy mericon Food, DNeasy Plant Kit, fenolo/cloroformio) per l'estrazione del DNA vegetale da campioni di latte congelato. Alla fine, la scelta è ricaduta sul metodo Ponzoni (fenolo/cloroformio) che consente di avere una buona resa in DNA e che è stato opportunamente modificato per ridurre i tempi di lavorazione a 2 gg. Per quanto riguarda il latte, è in fase di valutazione un ulteriore kit commerciale (QIAamp MinElute ccfDNA Kit, Qiagen) specifico per l'isolamento del DNA libero circolante nel sangue umano.
Sono stati inoltre individuati 39 campioni di latte idonei per il metabarcoding in modo da essere il più possibile rappresentativi di tutto l'areale di produzione. In aggiunta, è in corso il recupero di campioni di latte che provengono da territori che non appartengono all'areale e campioni di mangimi. É stata effettuata una verifica preliminare della presenza della componente vegetale sui DNA da inviare per il metabarcoding. Il saggio ha previsto l'utilizzo dei primer specifici per il gene RuBisCo (rbcL) del cloroplasto sia del mais che della soia. I campioni amplificati con il primer identificato sono stati verificati tramite corsa elettroforetica su Bioanalyzer (Agilent Tech.) per accertare che le dimensioni dell'amplicone fossero quelle attese di 351bp. I campioni che dal controllo interno di amplificazione risultavano idonei sono stati sequenziati presso un laboratorio esterno. Gli elettroferogrammi hanno confermato che i frammenti prodotti tramite amplificazione con il primer RUB sono di origine vegetale. A completamento delle attività entro fine anno saranno inviati i 50 campioni per l'analisi metagenomica del cloroplasto. Un'analisi accurata dei dati forniti dalla piattaforma Illumina permetterà di evidenziare se anche a livello di DNA vegetale sussistano delle differenze genetiche che possano essere utilizzate come strumento per la definizione dell'areale geografico del Grana Padano. Inoltre, nel corso del 2020 sarà svolta l'elaborazione bioinformatica e statistica sui dati ottenuti dal metabarcoding del Rubisco. In particolare, i dati ottenuti saranno ordinati mediante Analisi delle Componenti Principali (PCA) e sottoposti a cluster analysis.

Miriam Zago (MZ) interviene per presentare il lavoro finora svolto da U.O CREA nell'ambito del WP2 che ha previsto il pretrattamento, l'estrazione del DNA e l'analisi fingerprinting (utilizzo di due primers M13 e BOXA1R) e analisi metagenomica di 118 campioni di formaggio Grana Padano prodotti con il latte munto a Dicembre 2017, 118 formaggi prodotti con il latte munto ad Aprile 2018 e 15 campioni di formaggi duri non-Grana. In contemporanea 610 campioni di Grana Padano prodotti con il latte munto da Novembre 2017 a Maggio 2018 hanno subito il pretrattamento per poi essere processati con l'estrattore automatico di DNA; questi andranno a costituire la biobanca di DNA.
MZ espone i risultati dell'analisi molecolare mediante tecnica fingerprinting:
- dall'amplificazione del DNA dei campioni di Grana Padano e dei formaggi duri non-Grana sono stati prodotti una serie di profili genotipici caratteristici dell'intera popolazione microbica presente all'interno di ciascun campione i quali, dopo analisi statistica, sono stati suddivisi in 49 gruppi corrispondenti a profili genotipici diversi in tutti 251 campioni studiati. In particolare, emerge come risultato rilevante la presenza di un'elevata biodiversità nella stessa mensilità e fra le due mensilità, ma fatto più rilevante fra i campioni di Grana Padano e i formaggi duri presi dal commercio.
- si evidenzia inoltre la presenza di alcuni genotipi che sono caratteristici per mensilità e zona geografica, come ad esempio per la provincia di Trento.
A seguire Tommaso Bardelli (TB) espone i risultati dell'analisi metagenomica:

- con i dati ottenuti dall'analisi metagenomica è stata condotta l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) al fine di valutare la variabilità microbica spaziale presente nei campioni di Grana Padano provenienti dalle due mensilità e nei formaggi duri. Il risultato evidenza una mancata differenziazione dei formaggi duri non-Grana dai Grana Padano e allo stesso modo una indistinta diversificazione a titolo regionale dei campioni Grana Padano.

- Successivamente, al fine di avere una caratterizzazione delle specie microbiche appartenenti a ciascuna mensilità di Grana Padano e ai formaggi duri è stata determinata l'abbondanza relativa microbica; definendo dominanti e secondarie le specie la cui abbondanza relativa risulta maggiore/uguale (≥) e inferiore all'1%, rispettivamente. Dai risultati emerge che i campioni di Grana Padano della mensilità Aprile 2018 presentano una elevata biodiversità microbica e le province di Brescia, Mantova e Piacenza sono quelle con il più alto numero di specie microbiche dominanti, in particolare *L. delbrueckii, L. rhamnosus* e *L. casei*. Da sottolineare che la provincia di Trento si discosta da tale trend, presentando una propria e tipica abbondanza microbica (evidente la presenza della specie *Streptococcus thermophilus*). Lo stesso macrotrend microbico a livello di provincia è riscontabile anche nei campioni di Grana Padano della mensilità Dicembre 2017.
- Le stesse specie dominanti maggiormente presenti nei campioni Grana Padano si ritrovano anche nei formaggi duri. Di particolare interesse risulta il trend microbico presente in alcuni formaggi duri lombardi dove prevale la specie dominante *L. delbrueckii*.

Le prospettive lavorative future prevedono l'analisi metagenomica e fingerprinting dei campioni di Grana Padano prodotti con il latte munto nel mese di Agosto 2018 e di almeno altri 20-30 formaggi duri. In contemporanea si avvierà il pretrattamento dei campioni di Grana Padano delle restanti mensilità (Giugno-Ottobre 2018) che andranno a costituire la biobanca di DNA.
Flavio Tidona (FT) e Francesco Locci (FL) presentano le attività del WP3 *Aggiunta di latte in polvere e impatto sulla qualità dei formaggi freschi.*
Terminata la fase di caratterizzazione chimico-fisica di 10 campioni di latte in polvere reperibili sul mercato italiano, ne sono state selezionate due per le prove di trasformazione casearia: uno (EPI) è stato scelto per le lavorazioni a mozzarella, il secondo (SCA) per le lavorazioni a crescenza.
FT presenta i risultati relativi alle lavorazioni di Crescenza che sono state realizzate su micro-scala di Laboratorio del CREA-ZA di Lodi, utilizzando un modello che simula tutte le fasi di processo seguite in trasformazione a livello industriale, precedentemente messo a punto in collaborazione con il gruppo di Germano Mucchetti (GM). La progettazione ha consentito di ottenere un trattamento termico del latte equivalente a quello di una pastorizzazione alta (20'' x 73°C) con 3-4 riduzioni decimali dei valori di conta batterica. Lo scopo della sperimentazione è stato quello di confrontare le differenze quali–quantitative tra le Crescenze prodotte da latte fresco (controllo) con quelle ottenute da latte ricostituito (SCA) portato a simile composizione. Tre diverse concentrazioni di latte in polvere sono state scelte a tal proposito:

- SCA 100% + CaCl2 (n = 3 repliche)
- SCA 60% (n = 5 repliche)
- SCA 40% (n = 6 repliche)

Ogni caseificazione con latte in polvere è stata eseguita in parallelo con una seconda caseificazione ottenuta da latte fresco avente la stessa composizione in grasso e proteine. L'impatto sulla tecnologia è stato valutato misurando i tempi di coagulazione e di acidificazione mediante l'uso di colture starter commerciali, il profilo termico seguito durante la fermentazione, la capacità di spurgo della cagliata e le rese ottenute dopo la maturazione del formaggio (6-7 giorni dalla produzione) che coincide con l'inizio della shelf-life del prodotto. Dai risultati è stato osservato un significativo aumento dei tempi di presa in tutte le prove sperimentali con latte in polvere, con progressivo aumento all'aumentare della concentrazione di latte in polvere. Il profilo di acidità e termico è stato invece del tutto paragonabile in tutte le prove effettuate. La valutazione della sineresi ha evidenziato una minore capacità della cagliata prodotto con latte in polvere nella prima fase di scarico dopo il taglio. Le differenze, tuttavia non sono risultate significative e tendono ad attenuarsi durante i rivoltamenti della cagliata fino alla fine della lavorazione. Le rese tal quali ottenute sono apparse leggermente superiori nelle produzioni con latte in polvere anche se è risultata significativa solo con l'utilizzo di 100% SCA nei confronti di 100% latte fresco.
Inoltre, alla concentrazione più bassa di latte in polvere (40%), che viene ritenuta già come una quota importante da sostituire al latte fresco, sono seguiti ulteriori approfondimenti, testando l'ausilio di coadiuvanti tecnologici e di adattamenti alla tecnologia di produzione:

- SCA 40% + calcio fosfato colloidale, CPC (n = 6 repliche)
- SCA 40% + CaCl2 + Modifica tecnologica (n = 3 repliche)

Dall'osservazione di una minore capacità di spurgo della cagliata con latte in polvere, la modifica tecnologica apportata ha riguardato gli organi di taglio longitudinali, modificando lo spazio tra le lame da 2 cm a 1 cm, ottenendo così granuli di cagliata più piccoli con maggiore superficie esposta al drenaggio di siero. I risultati presentati da FT mostrano che i tempi di coagulazione in entrambi i casi si sono avvicinati di molto a quelli dei controlli e le lavorazioni sono risultate molto simili.
Dall'analisi di composizione dei prodotti è emerso che i formaggi con latte in polvere sono risultati più magri e con un maggior grado di umidità, che appare aumentare linearmente all'aumentare della concentrazione di latte in polvere. Inoltre, analizzando i sieri di fine lavorazione, è stata osservata anche una maggiore perdita di grasso nel siero derivato da latte in polvere, significativa solo per alcune lavorazioni e di lieve entità (0.33% in media nei formaggi sperimentali rispetto a 0.26% nei controlli). Diversamente, nelle lavorazioni con il 40% e con l'utilizzo di coadiuvanti tecnologici, in particolare con la modifica tecnologica, le composizioni dei formaggi sperimentali sono risultate del tutto analoghe ai controlli, sebbene sia stata osservata la medesima tendenza a perdere più grasso nel siero di lavorazione.
Su alcune lavorazioni è stata anche effettuata una analisi del colore mediante colorimetro ed è stato calcolato l'indice di giallo che è risultato significativo solo in alcune lavorazioni ma non è stato correlato all'uso del latte in polvere.

Le crescenze ottenute sono state anche sottoposte ad analisi sensoriale. E' stata effettuata una analisi quantitativa descrittiva (QDA) paragonando i controlli ottenuti in questo lavoro con 4 crescenze commerciali dei principali produttori industriali di crescenza. I risultati hanno dimostrato che le crescenze controllo si collocano nella nuvola delle crescenze commerciali, con la sola differenza di fare osservare una texture più consistente rispetto alle altre, anche se il grado di gradimento è stato del tutto paragonabile. Ciò ha permesso di poter confronti sufficientemente corretti tra formaggi sperimentali e controlli. Le analisi sensoriali effettuate per valutare qualora fossero percepite differenze, sono stati dei test triangolari, replicate tre volte per tutte le categorie testate. I risultati hanno mostrato una forte tendenza a riconoscere i prodotti ottenuti da latte in polvere, specialmente al 100%. Solamente nel caso delle crescenze ottenute apportando la modifica tecnologica i prodotti sono risultati simili e non ci sono state differenze significative. Tuttavia, chiedendo una preferenza volontaria agli assaggiatori tra formaggi ottenuti con latte in polvere e controlli, il gradimento generale è stato equivalente.

F.L. presenta i risultati relativi alle prove su mozzarella. Le caseificazioni sperimentali, realizzate nel caseificio de CREA-ZA di Lodi, hanno permesso di verificare la fattibilità della produzione di mozzarella citrica, usando aliquote di latte in polvere magro ricostituito in sostituzione di latte fresco.
Le mozzarelle da latte ricostituito (L.R.), ottenute con latte fresco miscelato a latte ricostituito in misura del 40%, tendono a risultare più umide e meno grasse rispetto alle mozzarelle controllo (L.F.), a causa di un minor recupero del grasso della cagliata in seguito a filatura. L'umidità delle mozzarelle a L.R. può essere controllata agevolmente, abbassando la quantità di acido citrico, miscelata al latte prima della coagulazione. Il contenuto in proteine nei due prodotti è risultato analogo, per cui anche in questo caso non si sono evidenziate significative differenze di rese tra L.R. e L.F. nonostante un minore tenore in grasso.
Le differenze di composizione chimica si sono tradotte in differenze di proprietà sensoriali, che sono state avvertite in modo significativo 3 volte su 4 dal panel di assaggiatori che ha effettuato i test triangolari di riconoscimento. In particolare, è stata notata la diversa consistenza dei prodotti e in molti casi anche differenze di gusto che, peraltro, possono essere attribuite sia alla presenza del latte in polvere che alla diversa origine della panna aggiunta al latte LR. Va sottolineato che l'unica prova in cui le mozzarelle a L.R. non sono state riconosciute da quelle a L.F. la composizione centesimale dei due prodotti era quasi coincidente.
L'indice di giallo una caratteristica, potenzialmente collegabile all'uso di latte in polvere è stata determinata mediante colorimetro in tutte le prove a mozzarella. Nella maggior parte dei casi i valori delle mozzarelle L.R. sono stati significativamente più alti di quelli a L.F., tuttavia le differenze riscontrate non sono quasi mai state colte dagli assaggiatori.

[1] 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) Risicolo;
m) Pesca e acquacoltura.