

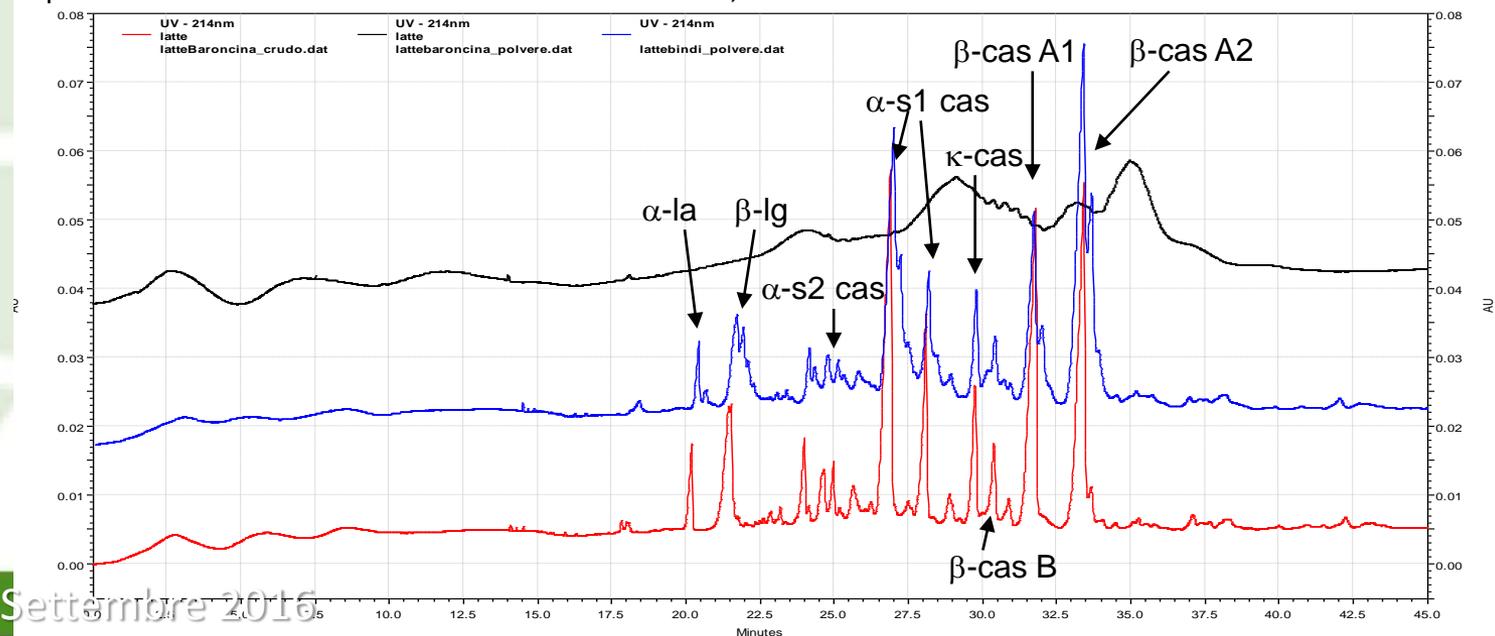
ATTIVITÀ

- ✓ **WP 3.1** sviluppo di modelli predittivi per l'individuazione e quantificazione del latte magro in polvere e dei concentrati proteici nelle produzioni casearie mediante tecniche ottiche (NIR e RAMAN)
- ✓ **WP 3.2** studio di microcostituenti, lattosio e acidi ciclopropilici, in formaggi a lunga maturazione mediante tecnica SERS
- ✓ **WP 3.3** analisi di campioni di Grana Padano e Parmigiano Reggiano nelle diverse fasi di produzione con NIR portatile

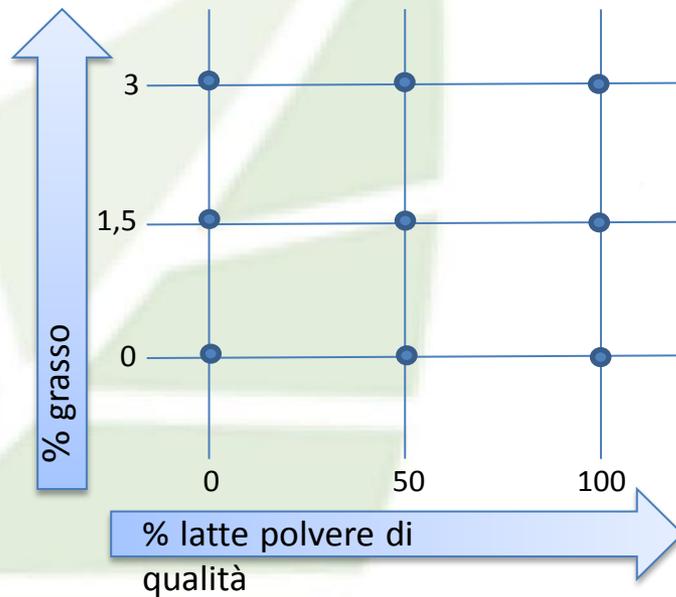
Confronto preliminare dei campioni di latte magro in polvere e latte crudo con elettroforesi capillare zonale:

Campioni analizzati mediante elettroforesi capillare zonale (CZE) in presenza di urea e in condizioni riducenti; la tecnica consente di separare simultaneamente e con un ottimo potere di risoluzione le proteine del latte, evidenziando anche le diverse varianti genetiche (ex. α s1-cas e β -cas) e i diversi stati di fosforilazione delle caseine (ex. α s1-cas e . α s2-cas):

- ✓ **Latte crudo fresco**: picchi ben definiti, simmetrici e ben separati.
- ✓ **Latte magro in polvere di alta qualità e appena prodotto**: visibili alcune alterazioni subite dal latte durante il processo di essiccazione; i picchi principali relativi alle diverse proteine risultano sdoppiati (β -lg, α s1-cas, β -cas). La comparsa di questi nuovi picchi è da ricondurre a fenomeni di lattosilazione che si verificano durante il processo di essiccamento, in maniera più intensa a seconda delle condizioni di tempo/temperatura adottate.
- ✓ **Latte magro in polvere altamente degradato per lunga conservazione**: nel corso della conservazione il fenomeno prosegue, con intensità diversa a seconda delle condizioni di umidità e temperatura durante lo stoccaggio; si osserva una non separazione delle componenti proteiche presenti, probabilmente a causa della modificazione estensiva delle proteine e del loro cross-linking, causati dal riarrangiamento del lattosio, dal progredire delle reazioni di lattosilazione e successivi step della reazione di Millard. A supporto di ciò, il campione analizzato prima della ricostituzione si presentava come un unico blocco duro e consistente, difficile da ricostituire.



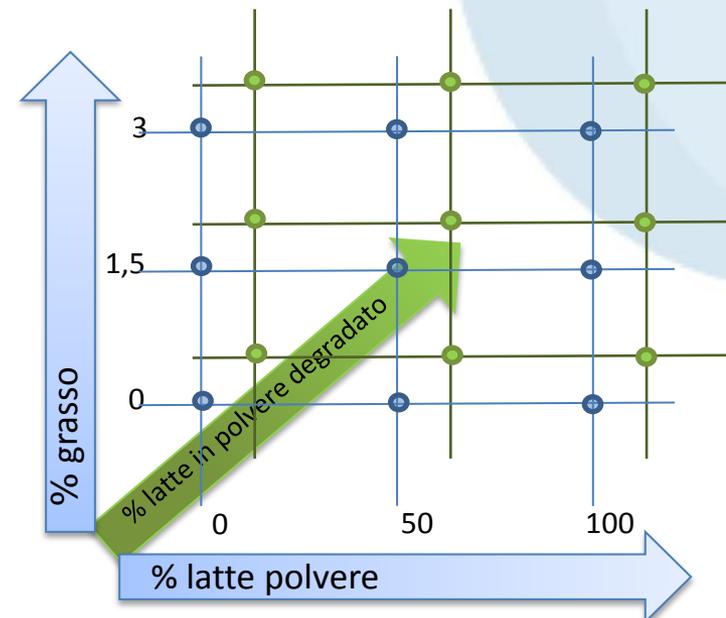
Attività svolte...



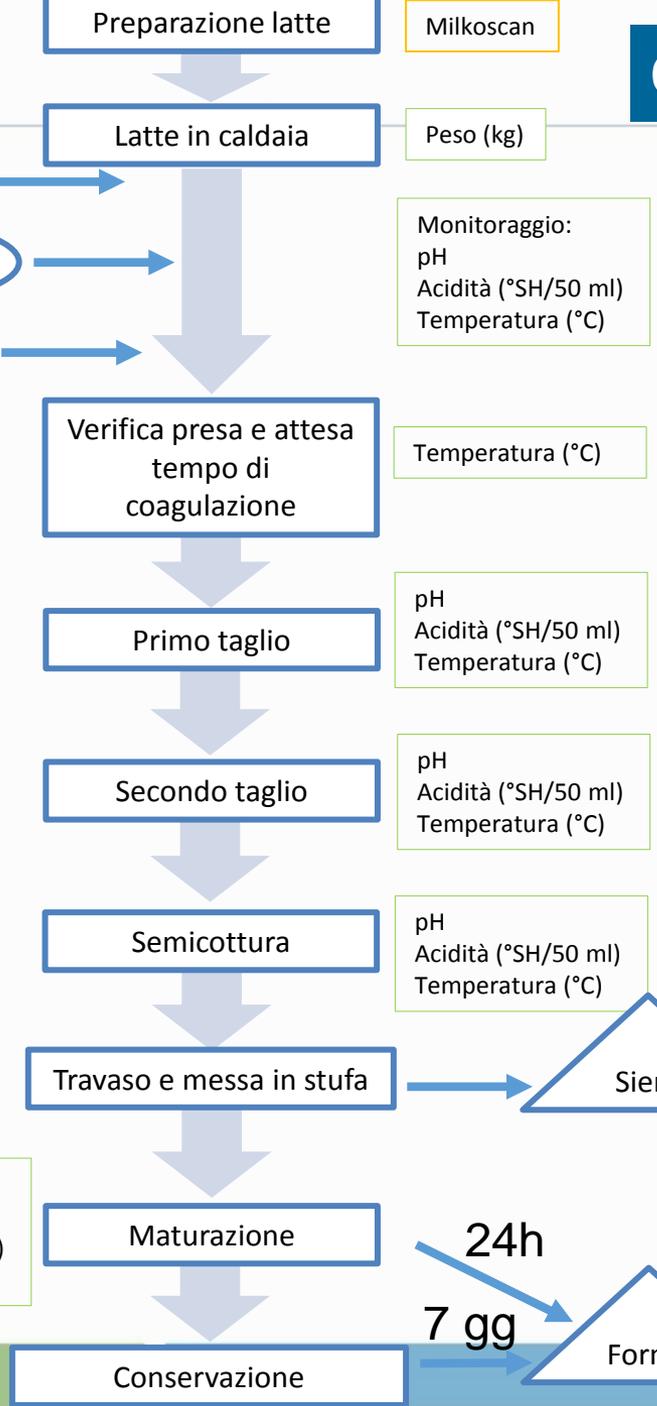
Microcaseificazioni sperimentali

Disegno sperimentale full factorial

Attività da svolgere...



Microcaseificazioni sperimentali



Milkoscan

Peso (kg)

Monitoraggio:
pH
Acidità (°SH/50 ml)
Temperatura (°C)

Temperatura (°C)

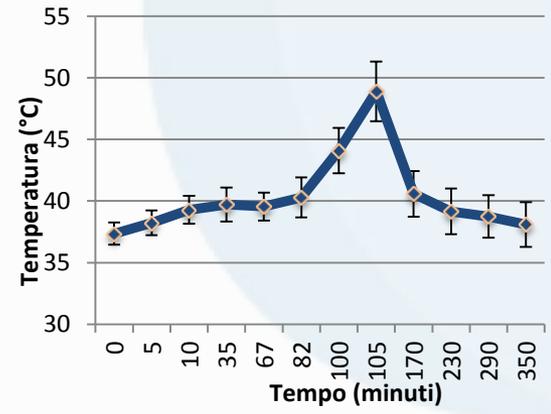
pH
Acidità (°SH/50 ml)
Temperatura (°C)

pH
Acidità (°SH/50 ml)
Temperatura (°C)

pH
Acidità (°SH/50 ml)
Temperatura (°C)

Monitoraggio:
pH
Acidità (°SH/50 ml)
Temperatura (°C)

Micronir



Bianchi di massa,
Calcolo delle rese

24h

7 gg



Milkoscan, Raman, Micronir



Preparazione latte in polvere

Preparazione latte crudo

- ✓ Ricostituzione latte in polvere al 10% in peso per avere un tenore proteico di circa 3%
- ✓ Analisi mediante granulometria laser per valutare la dimensione media degli aggregati proteici attraverso il parametro D[3;2]
- ✓ Omogenizzazione a 300 bar
- ✓ Nuova analisi al granulometro per controllare l'avvenuta omogenizzazione
- ✓ Verifica tenore proteico e grasso tramite Milkoscan

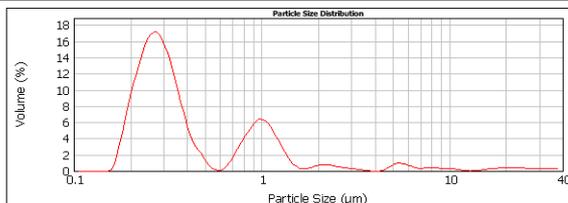
Lavorazioni con latte a 1,5% o 3% di grasso:

- ✓ Affioramento over night in cella a 4°C per ottenere la panna
- ✓ Separazione del latte scremato dalla panna e analisi della loro composizione tramite Milkoscan
- ✓ Aggiunta della quantità opportuna di panna e verifica della composizione al Milkoscan

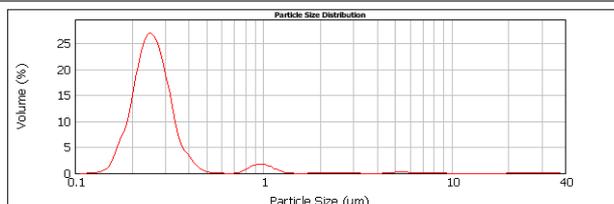
Lavorazioni con latte a 0% di grasso:

- ✓ Scrematura latte tramite centrifugazione a 6000g per 15 minuti a 4°C
- ✓ Separazione del grasso
- ✓ Verifica della composizione al Milkoscan

Concentration: 0.0150 %Vol	Span : 3.253	Uniformity: 2.95	Result units: Volume
Specific Surface Area: 17.3 m ² /g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 0.346 um	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 1.174 um	
d(0.1): 0.212 um	d(0.5): 0.314 um	d(0.9): 1.232 um	

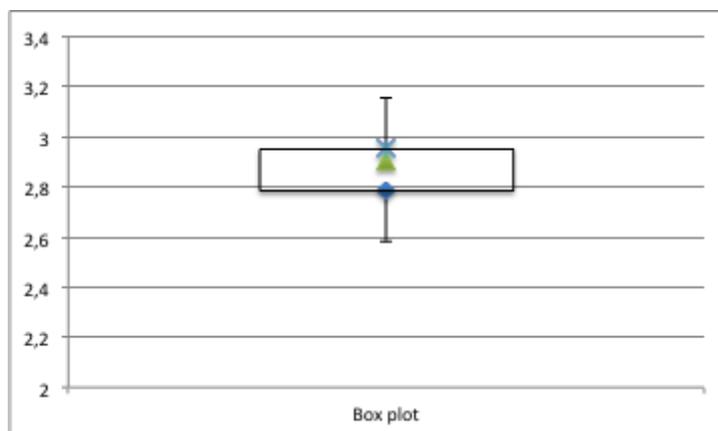


Concentration: 0.0318 %Vol	Span : 0.556	Uniformity: 1	Result units: Volume
Specific Surface Area: 23.2 m ² /g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 0.259 um	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 0.475 um	
d(0.1): 0.195 um	d(0.5): 0.257 um	d(0.9): 0.364 um	





Lavorazioni standardizzate massa di latte e tenore proteico e caseinico



Composizione media del latte (analisi Milkoscan)

classe	Media % fat	DS % fat	Media % prot	DS % prot
0%	0,15	0,13	3,19	0,192
1,5%	1,34	0,28	3,26	0,08
3%	3,12	0,12	3,23	0,045



✓ A temperatura di partenza raggiunta (37/39°C), aggiunta del **sale** (6 g per litro di latte)

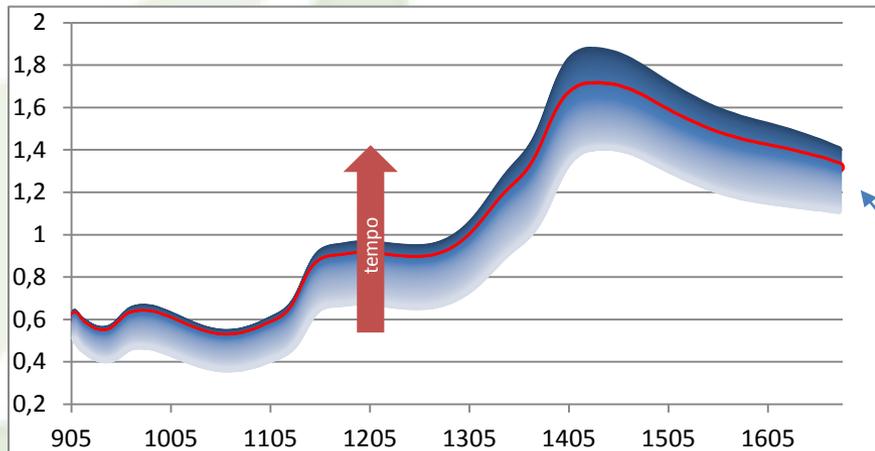
✓ Dopo 5 minuti dopo aggiunto il **lattoinnesto** (quantità calcolata in base all'acidità iniziale del latte per arrivare a 4.0 SH°/50ml)

✓ Dopo 25 minuti di agitazione aggiunto il **caglio 1:10000** (300 microlitri per litro di latte)

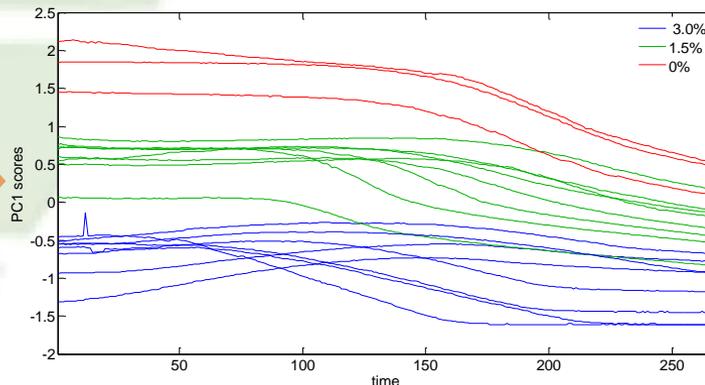
✓ Massa lasciata a riposo in attesa della presa

Lattoinnesto preparato il giorno antecedente la lavorazione: 37,5 mg di una coltura starter di *Streptococcus thermophilus* liofilizzato stemperati in 250 ml di latte e lasciati per una notte in termostato a 42°C



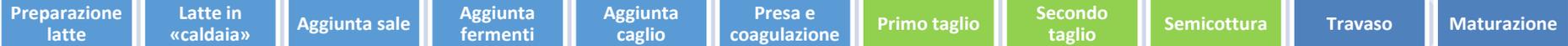


Analisi Micronir di una coagulazione (360 scansioni in continuo, ogni 5 secondi dall'aggiunta del caglio al primo taglio).



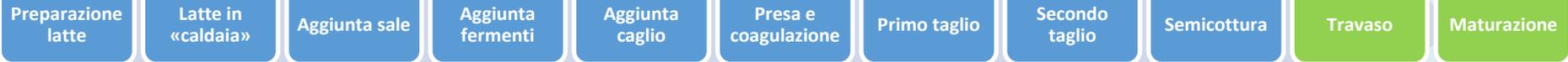
Analisi al lattodinamografo di latte magro in polvere e latte crudo.

- ✓ Misurazione in continuo del processo di coagulazione mediante micronir
- ✓ Modellazione della risposta spettrale dovuta alla modificazione del coefficiente apparente di scattering $\mu(\lambda)$ al procedere del processo



- ✓ Il primo taglio viene effettuato con coltello, dopo aver atteso un tempo pari al doppio del “tempo di presa”, in modo da creare dei cubetti di grandezza 3X3 cm
- ✓ Dopo dieci minuti di agitazione, si effettua il secondo taglio con un piccolo spino e la cagliata viene rotta fino ad ottenere una dimensione “a nocciola” 1x1 cm
- ✓ La massa viene tenuta in agitazione per 10 minuti circa ad una temperatura compresa tra i 45°C e i 48°C per la semicottura

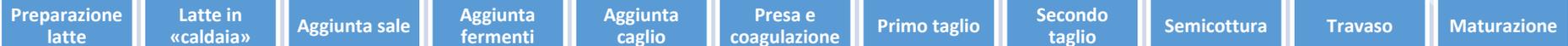




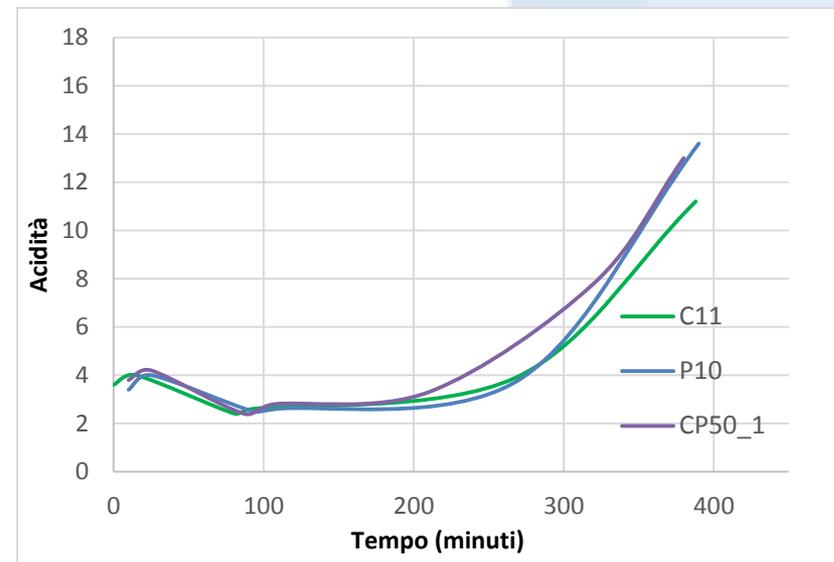
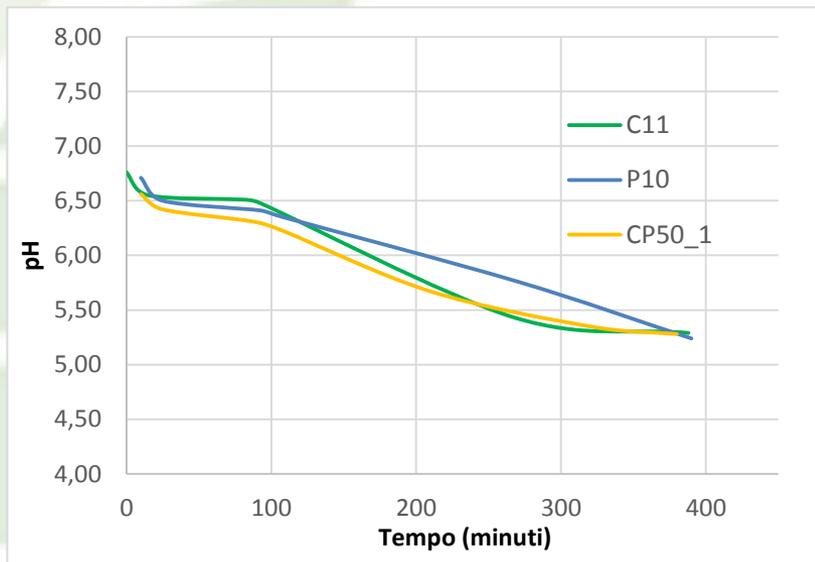
- ✓ La cagliata, raccolta negli stampi, viene posta a maturare in termostato a 42°C
- ✓ Ogni 60 minuti circa viene effettuato il rivoltamento, misurato il pH e l'acidità titolabile del siero
- ✓ Al raggiungimento di un pH inferiore a 5,30 e un'acidità titolabile superiore ai 10 SH°/50, le forme sono poste a 4°C
- ✓ Il siero viene analizzato con il Milkoscan per il calcolo dei bilanci di massa e per verificare la struttura del coagulo



classe	Media % fat	DS % fat	Media % prot	DS % prot
0%	0,039	0,028	0,976	0,042
1,5%	0,295	0,076	0,961	0,046
3%	0,999	0,199	0,898	0,051



Andamento del pH (a sinistra) e dell'acidità (°SH/50 ml, a destra) durante tutta la lavorazione, come esempio per ogni tipologia di latte: C, P e CP:



Conservazione a 4°C

T 1 giorno

T 7 giorni

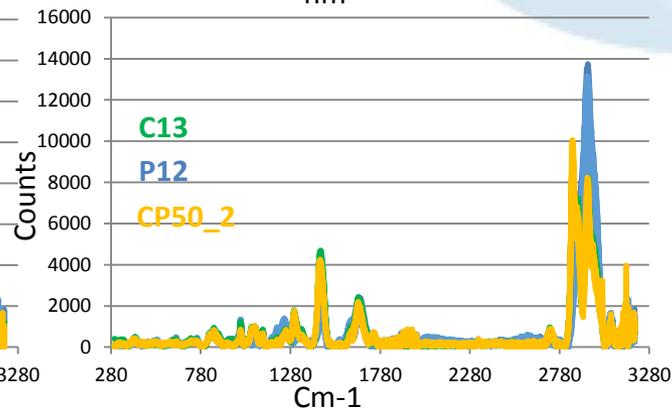
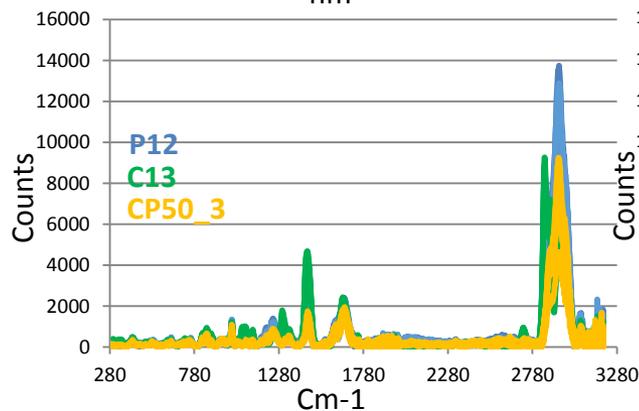
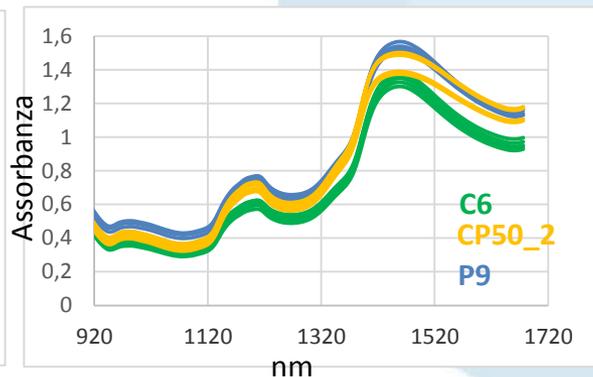
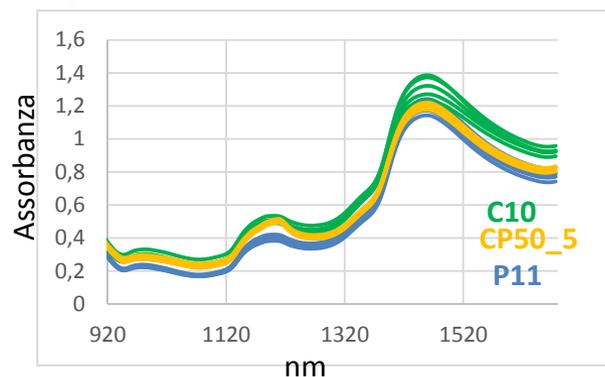
Analisi sulle forme:

✓ Micronir

Analisi quantitative in
linea

✓ Raman

Analisi discriminante



Conservazione a 4°C

T 1 giorno

T 7 giorni

Analisi sulle forme:

Analisi compositiva FT-IR dei formaggi

✓ I campioni dopo solubilizzazione in soluzione alcalina vengono analizzati con Milkoscan (utilizzando le cuve di taratura sviluppate da CREA FLC) per avere una predizione di grasso, proteine e sostanza secca:



Classe	Media di 24h_fat	Dev. standard di 24h_fat2	Media di 24h_prot	Dev. standard di 24h_prot2	Media di 24h_ss	Dev. standard di 24h_ss2	Media di 7g_fat	Dev. standard di 7g_fat	Media di 7g_prot	Dev. standard di 7g_prot	Media di 7g_ss	Dev. standard di 7g_ss
0%	0,17	1,56	40,25	1,88	44,08	2,40	0,10	1,24	40,45	1,84	44,11	2,01
1,5%	12,99	2,77	31,90	1,94	47,94	2,50	12,78	3,06	32,47	1,86	48,23	2,96
3%	25,80	5,04	24,89	1,83	52,30	1,50	23,75	1,34	26,00	1,30	52,20	1,11

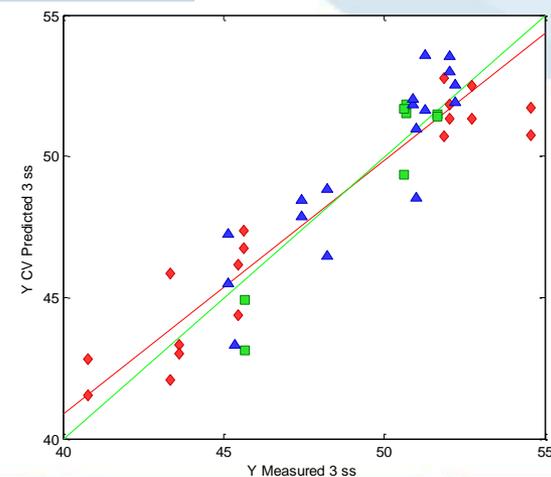
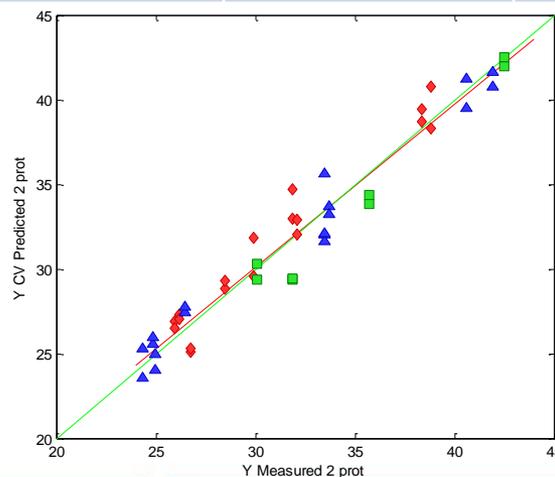
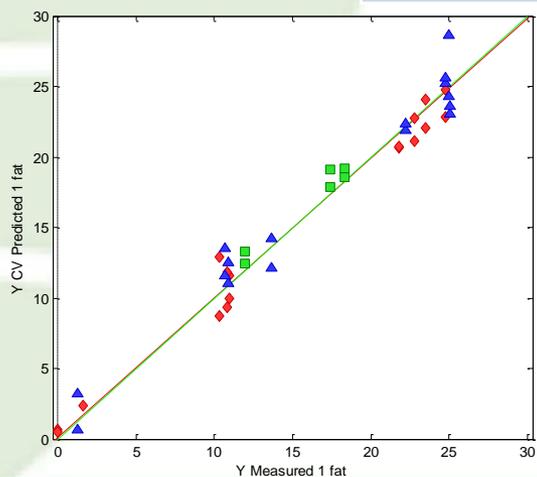
Conservazione a 4°C

T 1 giorno

T 7 giorni

Modelli predittivi micronir sulle forme intere

	Grasso	Proteine	Sostanza secca
Num. LVs	5	5	6
RMSEC	1.140	1.021	1.050
RMSECV	1.389	1.250	1.436
Bias	1.77636e-015	1.42109e-014	0
CV bias	0.0183	-0.0115	-0.0112
R ² cal	0.983	0.967	0.919
R ² val	0.975	0.951	0.852



Conservazione a 4°C

T 1 giorno

T 7 giorni

A horizontal process flow diagram with three boxes: 'Conservazione a 4°C' (blue), 'T 1 giorno' (green), and 'T 7 giorni' (green). A large grey arrow points from right to left across the top. Two grey arrows point downwards from the 'T 1 giorno' and 'T 7 giorni' boxes to the word 'Liofilizzazione' in red text.

Liofilizzazione

- ✓ Dopo le analisi il campione macinato viene posto a -80°C per una notte
- ✓ Successivamente viene spostato a -20°C fino al raggiungimento di un numero sufficiente di campioni
- ✓ Il processo di liofilizzazione richiede almeno due giorni
- ✓ Viene verificata la buona riuscita del processo attraverso l'analisi del residuo secco che deve essere nel range 1.5-2.4%

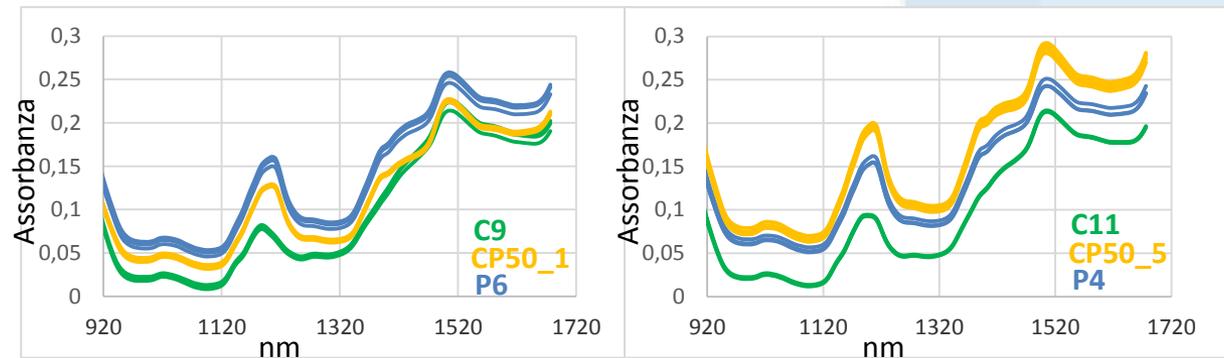
Conservazione a 4°C

T 1 giorno

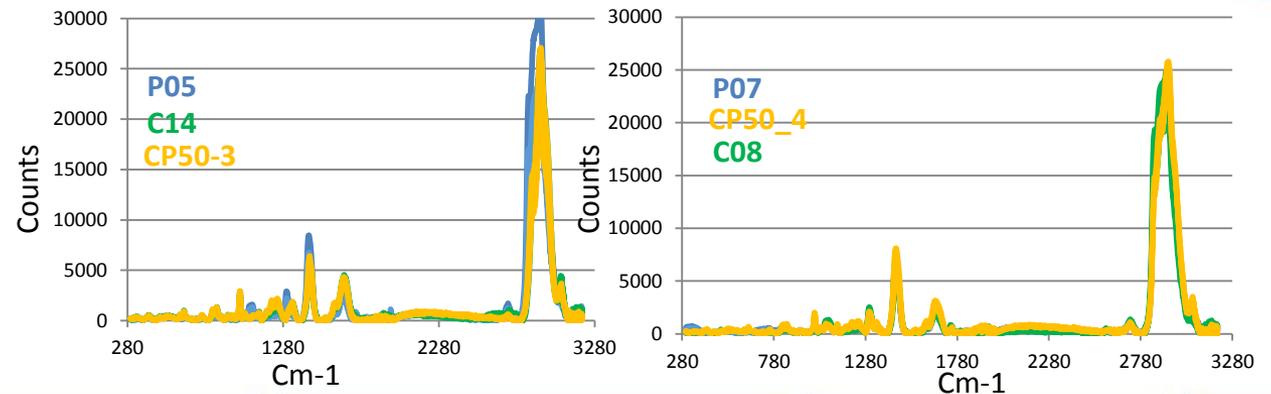
T 7 giorni

Analisi sul liofilizzato:

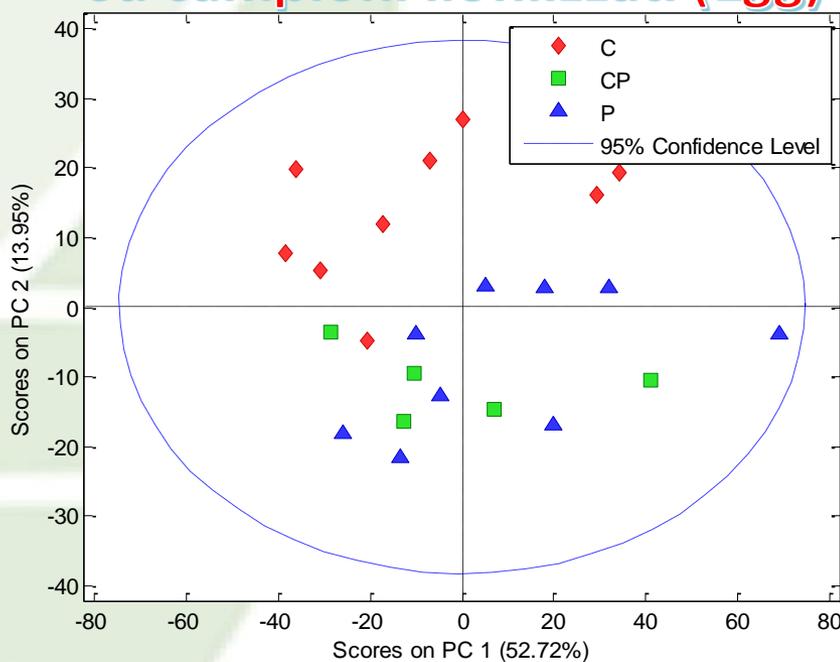
✓ Micronir



✓ Raman



Analisi delle componenti principali degli spettri Raman su campioni liofilizzati (1gg)

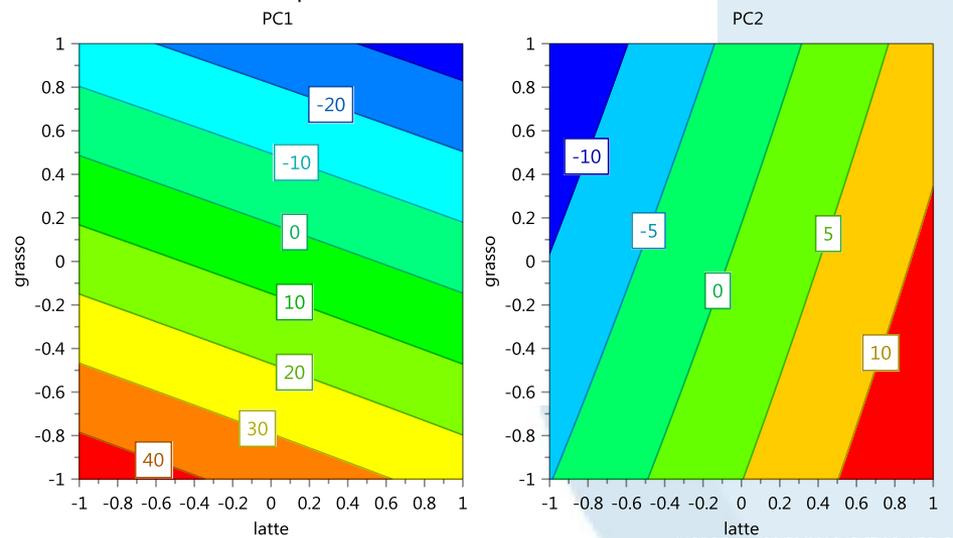


$$\text{PC1 score} = a_0 + a_1 \text{lat} + a_2 \text{fat} + a_3 \text{lat} * \text{fat}$$

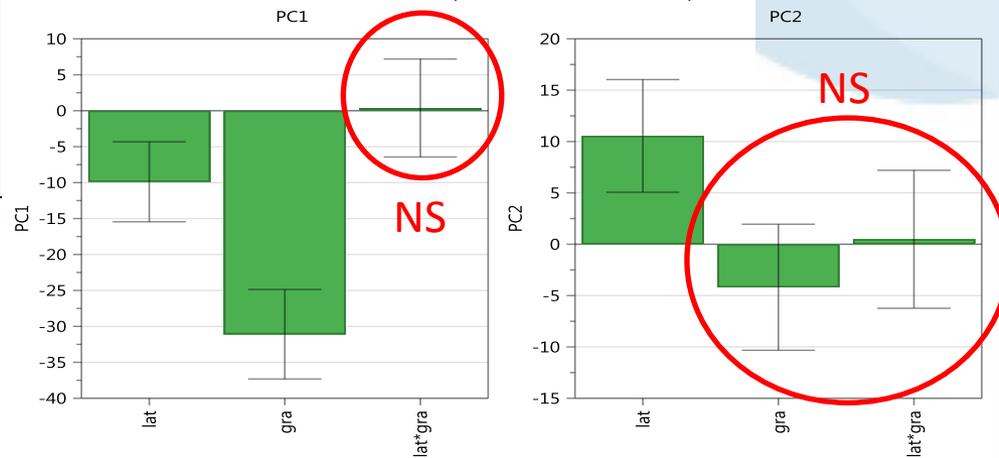
$$\text{PC2 score} = b_0 + b_1 \text{lat} + b_2 \text{fat} + b_3 \text{lat} * \text{fat}$$



Response Contour Plot Raman 24h liof.



Coefficients (scaled and centered)



PC1 (N=23; DF=19; R2=0.87); PC2 (N=23; DF=19; R2=0.51); Confidence=0.95

MODDE 11 - 26/09/2016 17:59:53 (UTC+2)

Analisi discriminante – PLSDA_Liofilizzati

1 gg - Confusion Matrix (CV)

	TPR	FPR	TNR	FNR	N	Err	P	F1
C	0.89	0.07	0.93	0.11	9	0.09	0.89	0.89
CP,P	0.93	0.11	0.89	0.07	14	0.09	0.93	0.93
Matthew's Correlation Coefficient = 0.817								

7 gg- Confusion Matrix (CV)

	TPR	FPR	TNR	FNR	N	Err	P	F1
C	0.89	0.00	1.00	0.11	9	0.04	1.00	0.94
CP,P	1.00	0.11	0.89	0.00	14	0.04	0.93	0.97
Matthew's Correlation Coefficient = 0.911								

Confusion Table (CV)

	Actual class	
	C	CP, P
Predicted as C	8	1
Predicted as CP,P	1	13

Confusion Table (CV)

	Actual class	
	C	CP, P
Predicted as C	8	0
Predicted as CP,P	1	14

TPR: proportion of positive cases that were correctly identified (Sensitivity), = $TP/(TP+FN)$

FPR: proportion of negatives cases that were incorrectly classified as positive, = $FP/(FP+TN)$

TNR: proportion of negatives cases that were classified correctly (Specificity), = $TN/(TN+FP)$

FNR: proportion of positive cases that were incorrectly classified as negative, = $FN/(FN+TP)$

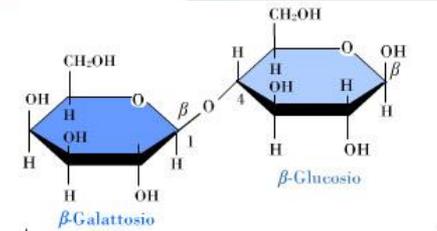
N: Number of samples belonging to each class

Err: Misclassification error = proportion of samples which were incorrectly classified, = $1 - \text{accuracy}$, = $(FP+FN)/(TP+TN+FP+FN)$

P: Precision, = $TP/(TP+FP)$

F1: F1 Score, = $2*TP/(2*TP+FP+FN)$

Lattosio



- ✓ Substrato delle fermentazione microbiche
- ✓ Responsabile di alterazioni colore, sapore e odore nel latte trattato termicamente
- ✓ Fonte primaria di galattosio, zucchero fondamentale per la sintesi dei galattolipidi
- ✓ Intolleranza al lattosio per carenza dell'enzima lattasi
- ✓ Intolleranza al galattosio per carenza dell'enzima galattosio-1-fosfato uridiltransferasi

Legislazione

Le norme in materia di etichettatura che indicano l'assenza o la ridotta presenza di lattosio nei prodotti alimentari non sono attualmente armonizzate a livello UE, fatta eccezione per gli alimenti per lattanti (Direttiva 2006/141/CE). In Italia il Ministero della Salute ha emanato le seguenti indicazioni:

Alimenti senza lattosio \longrightarrow < 0.1 g/100g

Alimenti a ridotto contenuto di lattosio \longrightarrow < 0.5 g/100g

Metodi analitici per la determinazione del lattosio

MATRICE	METODO	ISO	Lattosio (g/100g)
Latte e derivati	HPLC-RI (metodo riferimento)	26662:2007	1.5-50
Latte	Enzimatico-differenza pH	26462:2010	5
Latte in polvere Miscele per gelato Formaggio fuso	Enzimatico Lattosio/D-glucosio	5765-1:2002	10-50
	Enzimatico Lattosio/D-galattosio	5765-2:2002	10-50

Visto la crescente diffusione sul mercato di prodotti senza lattosio (0.1 g/100g) e a ridotto contenuto di lattosio (0.5 g/100g) è necessario lo sviluppo metodi analitici utili a quantificarne bassi contenuti

Determinazione del lattosio mediante HPAEC-PAD

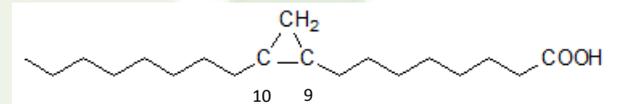
- ✓ Estrazione degli zuccheri con acqua
- ✓ Deproteinizzazione con soluzioni di carrez
- ✓ Purificazione su colonna SPE a scambio cationico
- ✓ Analisi dell'estratto limpido in HPAEC-PAD
- ✓ Quantificazione lattosio con il metodo dello standard esterno

**Metodo UNI in fase
di validazione**

	Lattosio
Standard	LOD = 0.25 mg/100g campione LOQ = 0.41 mg/100g campione
Grana Padano	

Acidi ciclopropanici

Gli acidi ciclopropanici (CPFA) sono costituenti delle membrane cellulari dei batteri lattici



cis9 -10- metilen -octadecanoate (acido diidrosterculico)



cis 11,12 - metilen -octadecanoate (acido lactobacillo)

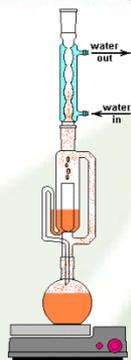


Insilati di mais

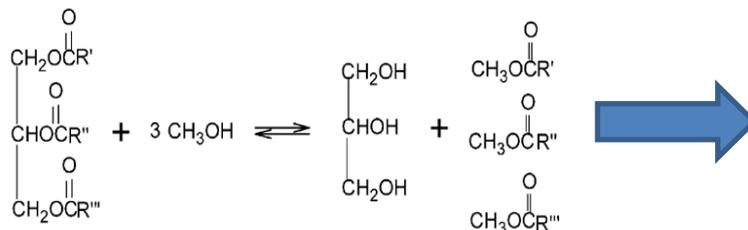
CPFA sono prodotti dai batteri lattici del genere *Lactobacillus* durante il processo di insilamento



Analisi CPFA mediante GC/MS



Estrazione grasso (Soxhlet)

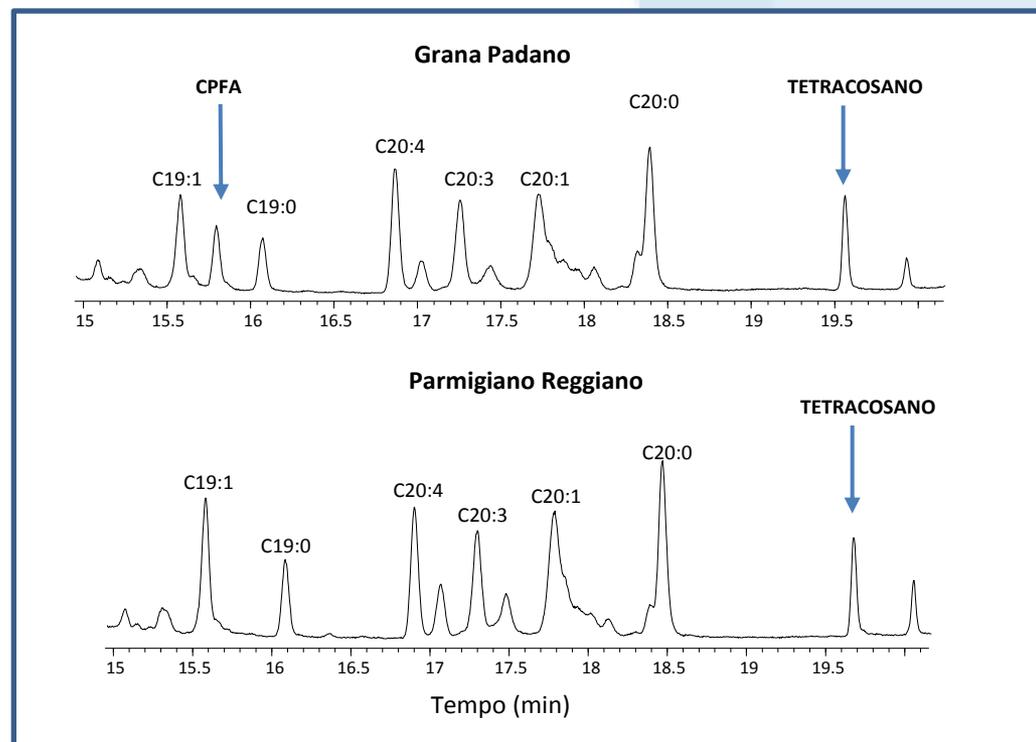


Metilazione basica



Analisi in GC/MS

Metodo UNI in fase di pubblicazione



Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS)

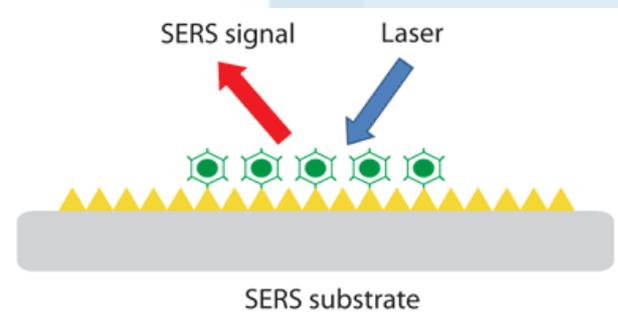
Nanostrutture metalliche in oro o argento che amplificano il segnale

Raman di molecole assorbite sulla superficie

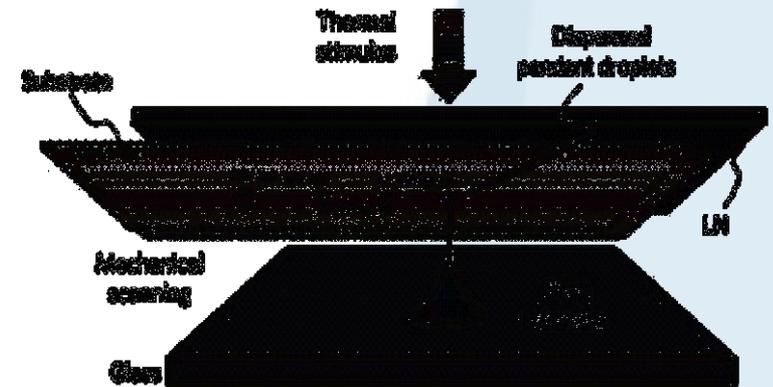
Dosaggio di costituenti dei prodotti lattiero-caseari presenti in minima concentrazione: **lattosio** e **CPFA**

Attività

- ✓ Ricerca bibliografica
- ✓ Acquisizione spettri Raman di standards tal quale e in soluzione
- ✓ Acquisizione spettri SERS-Raman di standards in soluzione a diversa concentrazione e calcolo della curva di calibrazione
- ✓ Quantificazione del contenuto di lattosio e CPFA su campioni di Grana Padano e Parmigiano Reggiano



Sistema di getto elettro-idrodinamico



Attività

- ✓ Studio di protocolli tradizionali di rilevazione del lattosio che si adattano all'apparato di getto elettrocinamico
- ✓ Preparazione di campioni test per la calibrazione del sistema utilizzando soluzioni di lattosio in matrici semplici per testare il comportamento elettro-idrodinamico dei fluidi in esame e della capacità di accumulare le molecole target
- ✓ Preparazione di campioni test con diluzioni seriali per testare la sensibilità della metodica
- ✓ Test dimostrativi su campioni di estratti di formaggio di Grana Padano

Attività

Analisi di campioni di Grana Padano e Parmigiano Reggiano nelle diverse fasi di produzione con NIR portatile

✓ Sono iniziate nel mese di Settembre 2016 le attività di scansione di crosta e pasta di forme a 48 ore di maturazione con l'ausilio di spettrometro Micronir (Viavi, per Parmigiano Reggiano) e X-Nir (dinamica generale, per Consorzio Grana Padano) presso il caseificio Soresina di Soresina (CR) e il caseificio Santa Vittoria di Carpaneto Piacentino (PC).



Micronir



X-Nir